

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE CONSTANTINE 1

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies
Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.)
Département de Biotechnologie

N° d'ordre :
Série :

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} : KERMICHE Meryem

Pour l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires
Option : Biotechnologie Alimentaire

*Caractérisation de certaines souches
microbiennes évoluant dans le blé fermenté et
mise en évidence de leurs activités enzymatiques*

Devant le jury composé de :

Président : Pr. BARKAT M. Dépt. Biotechnologie –I.N.A.T.A.A. –U.C.1
Rapporteur : Dr. BEKHOUCHE F. Dépt. Biotechnologie –I.N.A.T.A.A. –U.C.1
Examineurs : Pr. KHARROUB K. Dépt. Biotechnologie –I.N.A.T.A.A. –U.C.1
Pr. HAMIDECHI M.A. Dépt. Biochimie -Microbiologie- Fac. S.N.VI. –U.C.1

Année universitaire : 2012-2013

Remerciements

Je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Je tiens à remercier le docteur BEKHOUCHE Farida, pour m'avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance et ses encouragements, mais surtout pour sa générosité dans le travail, qu'elle trouve en ces mots toute ma gratitude.

C'est avec un grand honneur que j'adresse tous mes remerciements au Professeur BARKAT Malika, d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Je remercie également les professeurs KHARROUB Karima et HAMIDECHI M.A., d'avoir accepté de juger mon travail.

C'est avec reconnaissance et un grand plaisir que je remercie Monsieur Nuseirat D pour leur précieuse aide, ses conseils et ses encouragements

C'est avec reconnaissance et un grand plaisir que je remercie Monsieur DEBABZA Fayçal qui m'a ouvert les portes du Laboratoire d'hygiène de la commune de Sedrata (Wilya de Souk Ahras), sans oublier Mme Fahima, M^{elle} Zaaboub, Mme Malika Mme Salima ainsi que les membres du laboratoire pour leur aide précieuse.

Je présente mes plus sincères remerciements à mes collègues de la promotion de magister : ZOUBIRI Lamia, AYAD Ryma pour leurs aides et leurs encouragements.

Mes remerciements s'adressent également à M^{elle} MERABTI Ryma pour son aide, ses encouragements et sa gentillesse.

Un grand merci aux techniciens de laboratoire de microbiologie de l'Institut I.N.A.T.A.A., pour tous les moments de travail passés au laboratoire, et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

KERMICHE Meryem

Dédicace

Tout d'abord, louange à « ALLAH » qui ma guidé sur le droit chemin tout au long du travail et qui m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes, sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas aboutit.

À ma très chère mère : Yamina Meniai

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donner la santé, le bonheur et longue vie.

À mon très cher père : Djamel KERMICHE

Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour leur amour, leurs encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.

À mon frère Ismail

À mes sœurs « Sara, Iman, Zyneb »

Spécialement a et l'étoile de la famille Ritedj Tassnim (haboubti touja) ainsi pour le
bien aimé **mouaad**

Spécialement à mon frère djamel Arifi pour sa gentillesse et son aide

Particulièrement à Mr Dheifallah Al- Nuseirat

Pour ces encouragements, aide précieuse, conseils et ces corrections attribuées. De ma part un grand respect. Que Allah te protéger.

À ma chère amie intime Zitouni Farah née Lecheheb, son mari « Mr Zitouni

Namir et la petite Ranim que Allah vous protège

À ma Sœur Chahrazad chouabia et son mari « Bechichi Houssam »

Pour son aide et son bonne humeur et son soutien inébranlable

Spécialement à ma chère sœur Maram et Noussa

À mon oncle Dr KERMICHE Amor

Pour ces encouragements d'aller loin dans la recherche scientifique. A sa femme Dr Yahaoui latifa et mes biens aimés «Feryel, Touma, Abdallah, Rafik ».Que Allah vous protéger.

À mon cher oncle : Meniai Mouhamed et sa femme « Dr Ben dada Hanifa » pour son aide et sa gentillesse. Pour les petits enfants « Abd Arhmane et Meryouma »

À mes chères tantes Faiza et Khadija

Pour toute ambiance dont ils m'ont entouré.

À mes tantes : Karima, Fatima, Djamilia, Fouzia, Sousou, Noujoud, Khadija et ses enfants

À mes oncles : Meniai ABD alaziz et Dr : Meniai Moustapha

 **Meryem KERMICHE**

SOMMAIRE

PAGES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION

01

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. BLE DUR

1. Généralités	03
2. Grain de blé	03
2.1. Structure du grain de blé	04
2.1.1. Enveloppes de la graine et du fruit	04
2.1.2. Albumen	04
2.1.3. Germe	05
2.2. Composition biochimique du grain de blé	06
2.2.1. Matières azotées	06
2.2.2. Glucides	07
2.2.3. Lipides	11
2.2.4. Vitamines et minéraux	12
2.2.5. Facteurs antinutritionnels	12
2.3. Enzymes du blé	14
2.3.1. Enzymes amylolytiques	14
2.3.2. Enzymes lipolytiques	15
2.3.3. Enzymes protéolytiques	16
2.3.4. Phosphatases	16
2.3.5. Polyphénoloxydases	16

CHAPITRE 2. MICROORGANISMES DU BLE

1. Introduction	18
2. Présentation des moisissures, levures et bactéries	18
2.1. Moisissures	18
2.2. Levures	19
2.3. Bactéries	20
3. Flore microbienne du blé	21
3.1. Moisissures	21
3.1.1. Flore des champs	21
3.1.2. Flore intermédiaire	22
3.1.3. Flore de stockage	22
3.2. Levures	24
3.2.1. Flore des champs	24
3.2.2. Flore de stockage	24
3.3. Bactéries	25

Chapitre 3. ACTION DES MICROORGANISMES SUR LE BLE STOCKÉ

1. Modifications visuelles du blé	26
1.1. Germination	26
1.2. Décoloration	26
1.3. Odeur	26
2. Modifications biochimiques du blé	26
2.1. Dégradation des lipides	26
2.2. Dégradation des glucides	27
2.3. Dégradation des protéines	27
	27

3. Production des mycotoxines dans le blé	
3.1. Aflatoxines	28
3.2. Ochratoxines	28
3.3. Trichothécènes	28
3.4. Zéaralénones	28
3.5. Moniliformines	28

CHAPITRE 4. FERMENTATION DU BLE

1. Introduction	29
2. Fermentation du blé	29
2.1. Dans le <i>MATMOUR</i>	29
2.2. Dans les fûts	30
2.3. Avantages de la fermentation du blé	30
2.3.1. Qualité nutritionnelle et digestibilité	30
2.3.2. Formation de l'arôme et de la saveur	31
2.3.3. Préservation et innocuité de l'aliment	31

ETUDE EXPERIMENTALE

1. Présentation des échantillons	34
1.1. L'échantillon de blé fermenté sans vinaigre (BFSV)	34
1.2. L'échantillon de blé fermenté avec vinaigre (BFV)	34
2. Etude physico-chimique	35
2.1. Teneur en eau	35
2.2. Cendres totales	36
2.3. Protéines totales	36
2.4. Lipides totaux	37
2.5. Teneurs en acides gras	38
2.6. Amidon	38
2.7. Glucides totaux	39

3. Etude microbiologique	39
3.1. Flore totale aérobie mésophile (FTAM)	39
3.2. Moisissures	40
3.3. Levures	41
3.4. Bactéries lactiques	42
4. Etude enzymatique	45
4.1. Enzymes des isolats de moisissures	46
4.2. Enzymes des isolats de levures	46
4.3. Enzymes des isolats de bactéries lactiques	47
RESULTATS	
1. Composition biochimique des deux échantillons de blés (BFSV et BFV)	49
2. Flore déterminée dans les deux échantillons de blés (BFSV et BFV)	50
2.1. Flore totale aérobie mésophile	50
2.2. Moisissures	50
2.3. Levures	54
2.4. Bactéries lactiques	58
3. Activités enzymatiques des souches isolées	72
3.1. Activité amylolytique	72
3.2. Activité protéolytique	72
3.3. Activité lipolytique	73
DISCUSSION	76-78
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80-91
ANNEXES	
Résumé	

Liste des abréviations

AFNOR:	Association française de normalisation
Aw:	Activité d'eau
BFSV:	Blé fermenté sans vinaigre
BFV:	Blé fermenté avec vinaigre
CCLS :	Coopérative des céréales et des légumes secs
FAO:	Food and Agriculture Organization
Gl:	Glycolipides
grs:	Gramme
Ha:	Hectare
kDa:	Kilodalton
mm:	Millimètre
M17:	Gélose de Terzaghi
MRS:	Man Rogosa Sharpe
Nl:	Lipides non polaires
OGA:	Oxytétracycline-glucose Agar
OMS:	Organisation mondiale de la santé
PCA:	Plate Count Agar
PDA:	Potato Dextrose Agar
pH:	Potentiel d'hydrogène
Pl:	Lipids polaires
TSI:	Triple Sugar Iron
t/an:	Tonnes/an

Liste des figures

Figure 01.	Coupe longitudinale d'un grain de blé (Pomeranz, 1987)	05
Figure 02.	Structure des granules d'amidon de blé observées au microscope électronique à balayage (Bushuk et Rasper, 1994)	09
Figure 03.	Structure de l'amylose (Bushuk et Rasper, 1994)	09
Figure 04.	Structure de l'amylopectine (Borel <i>et al.</i> , 1997)	09
Figure 05.	Structure de l'hémicellulose (Sun, 2010)	10
Figure 06.	Structure de la cellulose (Moussard, 2006)	10
Figure 07.	Structure de la lignine (Hu, 2002)	10
Figure 08.	Distribution des différents lipides dans le grain de blé (Carver, 2009)	12
Figure 09.	Structure et modifications enzymatiques des éléments constitutants de l'amidon par les amylases alpha (traits continus) et bêta (traits pointillés) (Boudreau et Ménard, 1992)	15
Figure 10.	Action hydrolytique et synthétique des lipases (Salleh <i>et al.</i> , 2006)	16
Figure 11.	Action de certaines enzymes protéolytiques (Roberts <i>et al.</i> , 2000)	17
Figure 12.	Hydrolyse de l'acide phytique (Soetaert et Vandamme, 2010)	17
Figure 13.	Quelques moisissures rencontrées dans le grain de blé, observation au microscope optique (x100) (Pitt et Hocking, 2009)	23
Figure 14.	Exemple de levures dans le grain de blé observées au microscope optique (x100) (Pitt et Hocking, 2009 ; Kurtzman <i>et al.</i> , 2011)	24
Figure 15.	Croissance de levure <i>Pichia anomala</i> sur le blé stocké (Aw 0.95, 25°C) (Druvefors et Schnürer, 2004)	25
Figure 16.	Exemple de Bactéries dans le grain de blé observées au microscope optique (X 100) (Prescott <i>et al.</i> , 2003 ; Podila et Varma, 2005 ; Prescott <i>et al.</i> , 2010)	25
Figure 17.	Constructions des <i>MATMOURS</i> au Maroc (Bartali <i>et al.</i> , 1989)	32
Figure 18.	Grains de blé fermentés dans les fûts, sans le vinaigre (BFSV _a) et avec le vinaigre (BFV _a) et observés à la loupe binoculaire (X 2) (BFSV _b et BFV _b)	35
Figure 19.	Effectifs des isolats de moisissures	51
Figure 20.	Répartition des souches de moisissures	51

Figure 21.	Effectifs des souches levuriennes	54
Figure 22.	Répartition des souches de levures	55
Figure 23.	Effectif des isolats de bactéries lactiques	59
Figure 24.	Répartition des deux formes cellulaires (coques lactiques et lactobacilles)	59
Figure 25.	Répartition des souches de bactéries lactiques	62
Figure 26.	Exemple d'activités enzymatiques des isolats fongiques et lactiques	74
Figure 27.	Pourcentage des activités enzymatiques des isolats dans chaque échantillon	75

Liste des tableaux

	PAGES
Tableau 01. Composition en acides aminés essentiels du grain de blé dur (Brink et Belay, 2006)	07
Tableau 02. Distribution des glucides dans les fractions de blé (g/100grs) (Manay et Shadaksharaswamy, 2001)	11
Tableau 03. Distribution de la vitamine du groupe B (g/100grs) dans les différentes parties du grain de blé (Manay et Sadaksharaswamy, 2001)	13
Tableau 04. Eléments minéraux du grain de blé (Matz, 1991)	13
Tableau 05. Principaux aliments fermentés de l’Afrique de l’Ouest (Yao <i>et al.</i> , 2009)	32
Tableau 06. Association entre les bactéries lactiques (BL) et d’autres micro- organismes dans les aliments fermentés de l’Afrique de l’Ouest (Yao <i>et al.</i> , 2009)	33
Tableau 07. Bactéries lactiques isolées au cours de la fermentation d’aliments à base de céréales (Yao <i>et al.</i> , 2009)	33
Tableau 08. Tableau récapitulatif de tous les résultats physico-chimiques obtenus en comparaison avec les références et exprimés en % de la matière sèche (M.S).	50
Tableau 09. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de moisissures	52
Tableau 10. Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de moisissures	53
Tableau 11. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de levures	56
Tableau 12. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats de levures	57
Tableau 13. Dénombrement de la flore lactique en UFC/grs dans les échantillons de blé fermentés	58
Tableau 14. Répartition des isolats lactiques par origine et par milieu de culture utilisé	58
Tableau 15. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de bactéries lactiques	63

Tableau 15.	Caractères culturaux et morphologiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)	64
Tableau 15.	Caractères culturaux et morphologiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)	65
Tableau 16.	Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de bactéries lactiques	66
Tableau 16.	Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)	67
Tableau 16.	Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)	68
Tableau 17.	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats de coques lactiques	69
Tableau 18.	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats de lactobacilles	71

Introduction

Les aliments fermentés traditionnels contribuent à environ un tiers de l'alimentation dans le monde entier (Haard *et al.*, 1999).

La fermentation a été utilisée depuis des milliers d'années comme moyen efficace pour préserver la qualité et la sécurité des aliments. Les produits alimentaires sont soumis à l'action des microorganismes et/ou des enzymes pour donner des changements biochimiques désirables et des modifications significatives de la qualité des aliments qui sont connus actuellement sous le nom des " produits fermentés ".

Les céréales sont les premières sources d'aliments de l'homme (Matz, 1971). Une manière de la transformation des grains de céréales dans l'alimentation, est par la fermentation (Akinrele, 1970; Akingbala *et al.*, 1981; Fields *et al.*, 1981; Adeyemi et Beckley, 1986). La majorité des produits céréaliers en Afrique ont subi des fermentations et utilisées comme des aliments de sevrage pour les nourrissons et comme des aliments de base pour les adultes (Osungbaro, 2009). Les bactéries lactiques sont les microorganismes dominants retrouvés au cours de la fermentation dans la majeure partie des aliments. Leurs principales fonctions comprennent : la production d'acides organiques et de composés aromatiques, l'inhibition des microorganismes pathogènes, les propriétés probiotiques, l'élaboration de la texture de l'aliment et la dégradation des composés toxiques (Yao *et al.*, 2009).

En Algérie et dans certaines régions, le blé dur est fermenté dans des silos souterrains appelés « MATMOUR ». Après la sédentarisation, les populations algériennes se sont intéressées à un autre procédé pour fermenter le blé dans un délai court ; la fermentation a lieu dans des « fûts ». Les conditions de la fermentation sont réalisées en présence d'eau uniquement ou supplémentées avec du vinaigre. Ce qui favorise un milieu privilégié pour une grande diversité de microorganismes responsables du déclenchement du processus fermentaire et des modifications des caractéristiques du blé : en produisant des variétés de saveurs, de textures et d'arômes particuliers très convoités par le consommateur des régions spécifiques (Boudreau et Ménard, 1992 ; Parveen and Hafiz, 2003 ; Jeantet *et al.*, 2006 a et b).

Les microorganismes ont besoins d'énergie pour assurer leur développement. Le blé présente un excellent substrat à cause de sa richesse en nutriments (glucides, lipides et protéines) ; mais l'accès à ces macronutriments nécessitent le mécanisme des enzymes microbiennes (amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques) pour les convertir en éléments assimilables par les microorganismes. Jusqu'à présent le mécanisme enzymatique du blé fermenté n'a pas fait l'objet d'étude, pour cela notre travail est une première démarche pour étudier les caractéristiques de deux échantillons de blé fermentés avec et sans vinaigre, dans des fûts, durant 15 mois.

Notre étude expérimentale est composée de trois volets :

- La détermination de la composition biochimique va nous permettre d'évaluer les modifications des différents composants du blé durant la fermentation
- La recherche de la flore microbienne (moisissures, levures et bactéries lactiques) qui investie le milieu
- La mise en évidence des activités enzymatiques (amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques), liées à cette flore, nous renseigneront sur le type dominant et responsable de la fermentation et des modifications biochimiques du blé fermenté.

Etude bibliographique

CHAPITRE 1. BLE DUR

1. Généralités

Le blé dur et le blé tendre sont souvent agrégés dans les statistiques, et il est donc difficile d'obtenir des chiffres fiables sur le blé dur seul. Selon les estimations de la FAO, en 1999-2003, la production mondiale moyenne de blé (blé tendre et blé dur confondus) s'est élevée à 576 millions de t/an sur 209 millions d'ha. Dans le monde, le blé dur représente moins de 10 % des superficies cultivées en blé. Les principaux pays producteurs de blé dur sont l'Afrique du Nord, où il couvre presque 50 % du total des superficies emblavées, les Etats-Unis, le Canada et la Russie (Brink et Belay, 2006).

L'utilisation du blé ne se limite pas à la farine, au son et au germe. Le grain de blé peut être consommé sous diverses formes : entier, concassé, en semoule. Le germe peut servir à la production d'une huile (Fortin, 1996).

Les grains de blé entiers sont simplement débarrassés de leur enveloppe extérieure. Ils peuvent être cuits tels quels ou être incorporés aux soupes, aux plats mijotés et aux légumineuses. Les grains de blé entiers peuvent être consommés crus, grossièrement moulus, après avoir trempé 12 heures (Fortin, 1996).

Le blé concassé se fait à partir de grains entiers brisés en plusieurs morceaux, il s'utilise comme les grains entiers et doit donc être mis à tremper comme ce dernier. On ajoute parfois un peu de blé concassé dans la pâte à pain. Il peut être servi comme le riz, être cuisiné en crème dessert ou consommé comme céréales (Fortin, 1996).

Le terme semoule désigne le produit obtenu par la mouture des grains de blé. Il désigne également plus précisément la farine granulée tirée du blé dur et dont on se sert pour fabriquer des pâtes alimentaires. La semoule est aussi transformée en couscous, terme qui désigne aussi bien la graine que le plat national de trois pays d'Afrique du Nord, à savoir l'Algérie, le Maroc et la Tunisie (Fortin, 1996).

2. Grain de blé

Le grain de blé se présente sous la forme d'un corps ovoïde dont les deux extrémités sont inégales, et qui offre sur l'une de ses faces un sillon. Sur la face dorsale de l'une des extrémités se trouve une légère dépression. Les membranes qui recouvrent le grain en ce point sont plus fines, plus blanches et plissées. Cette dépression, qui est plus ou moins étendue suivant les variétés de blé, correspond à l'embryon. A l'autre extrémité du grain se trouvent des poils plus ou moins nombreux et plus ou moins longs. Ces poils constituent la brosse (Dechambre, 1874).

2.1. Structure du grain de blé

Le grain de blé (Figure 01) est formé de trois parties distinctes : les enveloppes, l'albumen, et le germe (Smith et Hui, 2004).

2.1.1. Enveloppes de la graine et du fruit

Les enveloppes représentent 13 à 17 % du poids du grain de blé, contiennent des quantités relativement élevées de cellulose, de protéines et de minéraux (Amendola et Rees, 2003). Elles sont d'épaisseur variable et sont formées de tissus différents: Le péricarpe, le tégument séminal (testa) et les cellules nucellaires ou épiderme du nucelle.

Le péricarpe ou tégument du fruit : Les tissus du péricarpe forment une mince couche de protection sur le grain de blé entier, l'examen microscopique du péricarpe montre qu'il est composé de plusieurs couches, nommées suivant leur position de l'extérieur vers l'intérieur du grain comme suit : l'épiderme, l'hypoderme, les restes de cellules à parois minces, les cellules intermédiaires, les cellules transversales et les cellules tubulaires (Matz, 1991).

Le Testa : Appelé aussi tégument séminal est composé d'une ou double couche de cellules. La couche interne du tégument de blé est souvent très pigmentée qui donne au grain sa couleur caractéristique (Srilakshmi, 2007).

Les cellules nucellaires ou épiderme du nucelle : Encore appelés bande hyaline ou épiderme du nucelle, cette couche est composée d'une assise cellulaire dont l'écrasement progressif lié au remplissage de l'albumen amylicé, ne laisse place qu'aux parois cellulaires à maturité (Fulcher et Wong, 1980).

2.1.2. Albumen

Il représente 80 % du grain de blé (Roudaut et Lefrancq, 2005). L'albumen constitue la réserve de stockage de la plante nécessaire pour la germination jusqu'à ce qu'elle émerge du sol et en mesure de commencer la photosynthèse (Salman *et al.*, 2007). Il se compose d'un mélange intime de protéines et d'amidon. Les protéines sont présentes sous forme de particules discrètes et comme un matériel interstitiel. Différentes protéines sont présentes dans l'albumen mais les quatre principaux groupes des protéines sont les gliadines, les gluténines, les albumines et les globulines (Cauvain, 2003). L'albumen est constitué de deux tissus bien distincts: la couche à aleurone et l'albumen amylicé plus interne. La couche à aleurone, riche en protéines et en lipides, renferme en outre d'importantes quantités de micronutriments (minéraux). L'albumen amylicé est constitué d'amidon enchâssé au sein d'une matrice protéique plus ou moins dense (Surget et Barron, 2005).

2.1.3. Germe

Le germe est partiellement incorporé dans l'albumen. Il est situé à la base du grain (Chichester et Stewart, 1977). Cette partie est composée d'un embryon (lui-même formé de la coléoptile de la gemmule, de la radicule, du coléorhize et de la coiffe) et du scutellum. Le germe est très riche en matières grasses, en matières azotées et en vitamines E et B (Soltner, 1987).

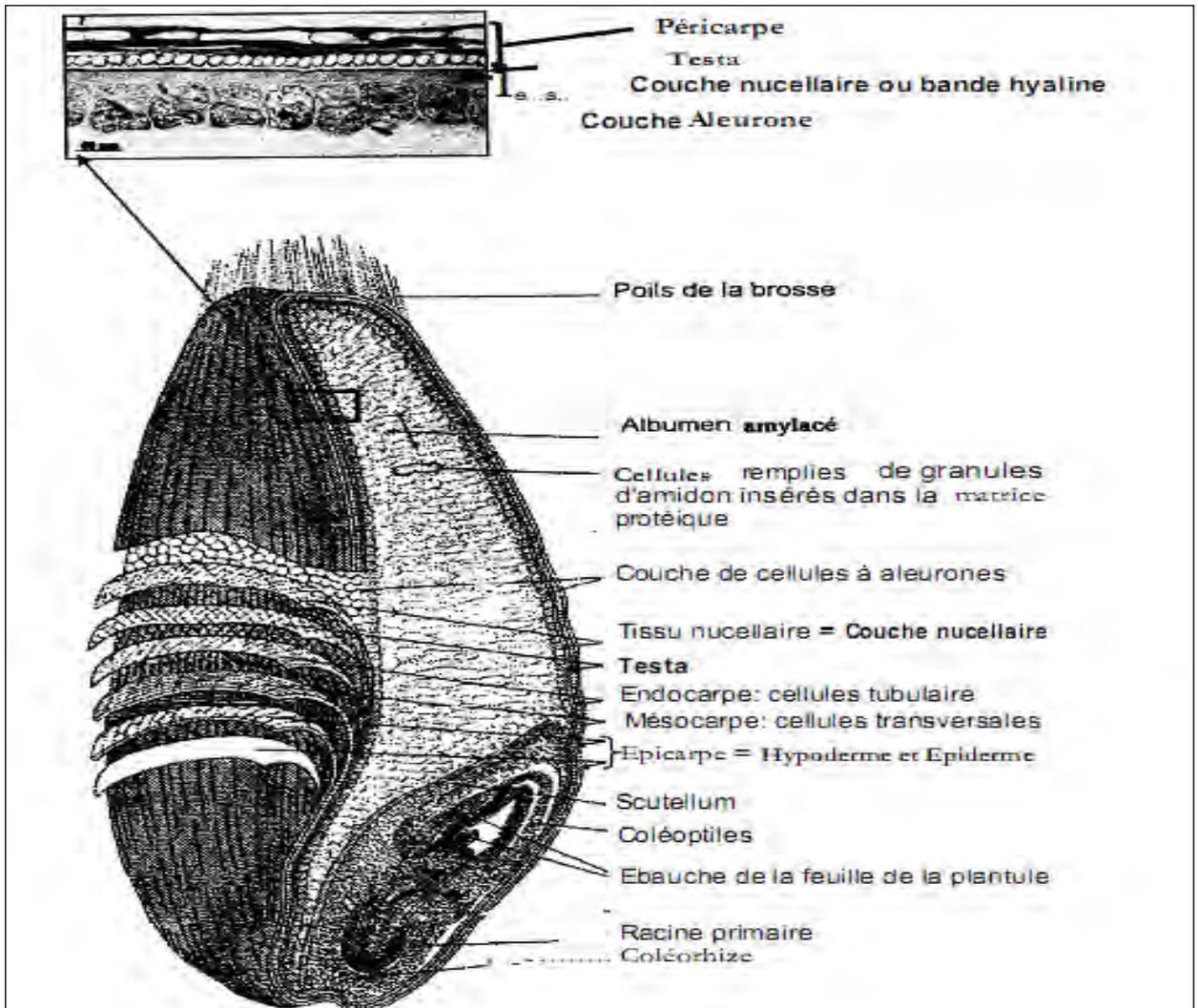


Figure 01. Coupe longitudinale d'un grain de blé (Pomeranz, 1987)

2.2. Composition biochimique du grain de blé

Le grain de blé est principalement constitué d'amidon (environ 70 %), de protéines (10 à 15 %) et de pentosanes (8 à 10 %) ; les autres constituants, pondéralement mineurs (quelques % seulement), sont les lipides, la cellulose, les sucres libres, les minéraux et les vitamines (Feillet, 2000).

2.2.1. Matières azotées

Protéines : Les gliadines et les gluténines représentent 80 à 95 % des protéines du blé et forment ensemble le gluten ; le reste est constitué par des protéines solubles telles l'albumine et des globulines (Roudaut et Lefrancq, 2005).

Depuis les travaux d'Osborne en 1907, les protéines du blé sont classiquement réparties en quatre classes en fonction de leur solubilité : les albumines, solubles dans l'eau, et les globulines, solubles dans les solutions salines neutres, souvent regroupées sous le terme de protéines solubles ; les gliadines, solubles dans les alcools dilués, et les gluténines, insolubles dans les solvants précédents, partiellement solubles dans les solutions acides diluées. Shewry *et al.* (1986) ont proposé une autre classification basée sur le degré de polymérisation et la teneur en acides aminés soufrés des protéines insolubles : les gliadines forment la famille des prolamines monomériques, mélange de chaînes polypeptidiques simples de teneur variable en soufre ; les gluténines sont regroupées dans la famille des prolamines polymériques constituées de sous-unités de faible et de haut poids moléculaire, rassemblées au sein d'agrégats par des liaisons disulfures (Feillet, 2000). Enfin la classification la plus utilisée est basée sur leur mobilité électrophorétique. Les prolamines polymériques sont composées de sous-unités gluténines de faible et de haut poids moléculaire et les prolamines monomériques divisées en quatre groupes : les α -gliadines, les β -gliadines, les γ -gliadines et les ω -gliadines (Yada, 2004).

Composition en acides aminés essentiels : Selon Brink et Belay (2006), le grain de blé dur est déficitaire en certains acides aminés comme le tryptophane et la méthionine et dans certaine mesure en lysine et en thréonine (Tableau 01).

Tableau 01. Composition en acides aminés essentiels du grain de blé dur (Brink et Belay, 2006)

Acides aminés	Composition en mg/100 g
Tryptophane	176
Lysine	303
Méthionine	221
Phénylalanine	681
Thréonine	366
Valine	594
Leucine	934
Isoleucine	533

2.2.2. Glucides

Selon Manay et Shadaksharaswamy (2001) et Dunford (2012), les glucides présentent 60 à 80 % de la matière sèche du grain de blé. L'amidon est le glucide principal trouvé dans l'albumen, les sucres (oses, dioses et trioses) sont présents dans le germe, les glucides des enveloppes sont principalement la cellulose et l'hémicellulose (Tableau 02).

Amidon : C'est un polymère de D-glucose, constituant une source excellente d'énergie, il est surtout localisé dans l'albumen (Bushuk et Rasper, 1994 ; Roudaut et Lefrancq, 2005). Ce polysaccharide est composé de granules subdivisés en deux populations distinctes : des gros granules et des petits granules (Figure 02). Les granules d'amidon de blé sont en effet des entités semi-cristallines formées principalement de deux types de molécules, l'amylose (26 à 28 %) et l'amylopectine (72 à 74 %). Les teneurs respectives en amylose et en amylopectine influencent les propriétés d'un amidon tel que sa susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique (Massaux *et al.*, 2006). Les granules d'amidon de blé contiennent des lipides, principalement sous forme de lysophospholipides composés de 70 % lysophosphatidylcholine, 20 % lysophosphatidyléthanolamine et 10 % lysophosphatidylglycérol et des fragments d'acides gras classés du plus au moins abondant notamment les acides : Palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linolénique dont les plus dominants sont l'acide palmitique et l'acide linoléique (BeMiller et Whistler, 2009).

L'amylose est un homopolymère linéaire (Figure 03) de 500 à 6000 unités de D-glucosyl (sous la forme de D-glucopyranose) liées par des liaisons α -(1, 4) et quelques très rares liaisons α -(1, 6). Sa masse moléculaire est comprise entre 100 et 1000 kDa (Feillet, 2000).

L'amylopectine est le polyside constituant l'amidon. Il diffère de l'amylose par la présence de branchements situés sur le carbone 6 de certains résidus de glucose de la chaîne de poly α (1, 4)-glucoside qui sert de motif fondamental (Figure 04). C'est donc un pont oxygéné α -(1, 6) qui permet la fixation des chaînes latérales (Borel *et al.*, 1997).

Glucides non assimilables (fibres) : Les grains de céréales contiennent une série de structures des parois cellulaires qui sont une source de polysaccharides non amylacés, et sont les principaux composants des fibres alimentaires (Garrow *et al.*, 2000).

Les pentosanes sont des polysaccharides non amylacés constitutifs des parois végétales (Feillet, 2000). Ils représentent un des composants mineurs de l'albumen de blé (Bushuk et Rasper, 1994). Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides qui sont situés dans de nombreuses parois des cellules végétales (Figure 05).

La Cellulose est un homopolysaccharide linéaire. Les unités de D-glucose sont unies par des liaisons *O*-glycosidiques (β 1 \rightarrow 4), chaque unité de glucose est liée à la suivante par une rotation de 180° et l'atome d'oxygène du cycle de l'une est uni par une liaison hydrogène au groupement hydroxyle en C-3 de la suivante (Figure 06) (Moussard, 2006).

La lignine est un polymère tridimensionnel composé d'unités de phénol (Figure 07) avec de fortes liaisons intramoléculaires (Gropper *et al.*, 2009). Les lignines dans les parois des cellules végétales sont physiquement et chimiquement associées aux polysaccharides et aux protéines. L'association entre la lignine et les polysaccharides comprend des liaisons : glycosidiques, liaisons éther-cross, liaisons ester-cross et assemblage d'acide cinnamique (Tingshuang *et al.*, 2002).

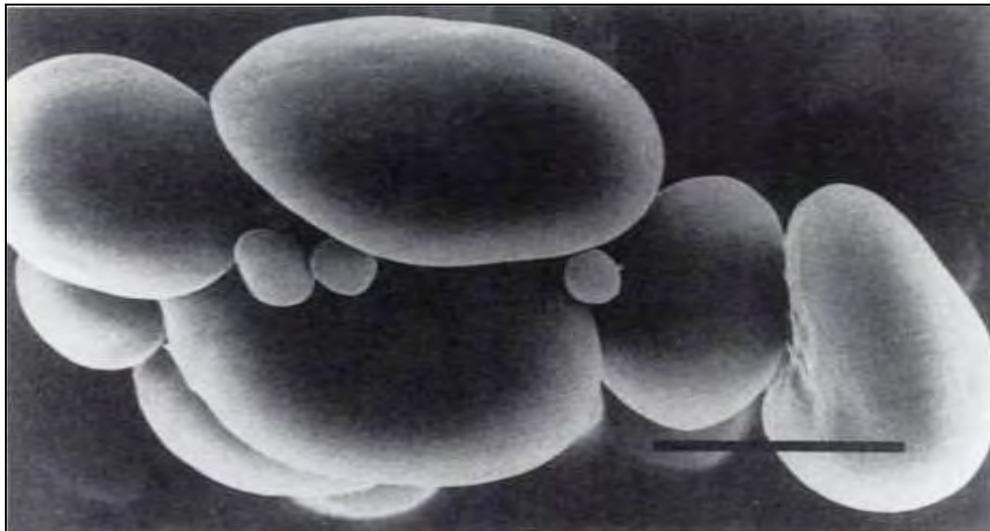


Figure 02. Structure des granules d'amidon de blé observées au microscope électronique à balayage (Bushuk et Rasper, 1994)

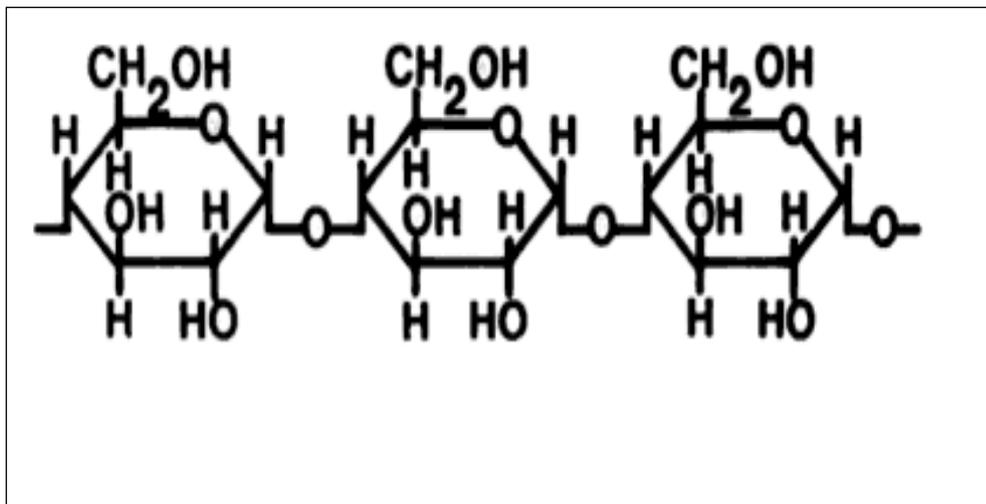


Figure 03. Structure de l'amylose (Bushuk et Rasper, 1994)

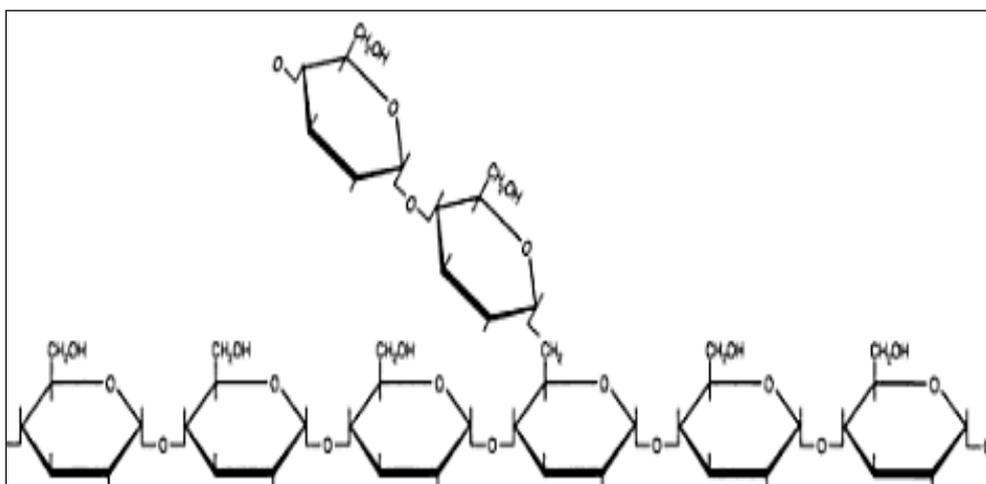


Figure 04. Structure de l'amylopectine (Borel *et al.*, 1997)

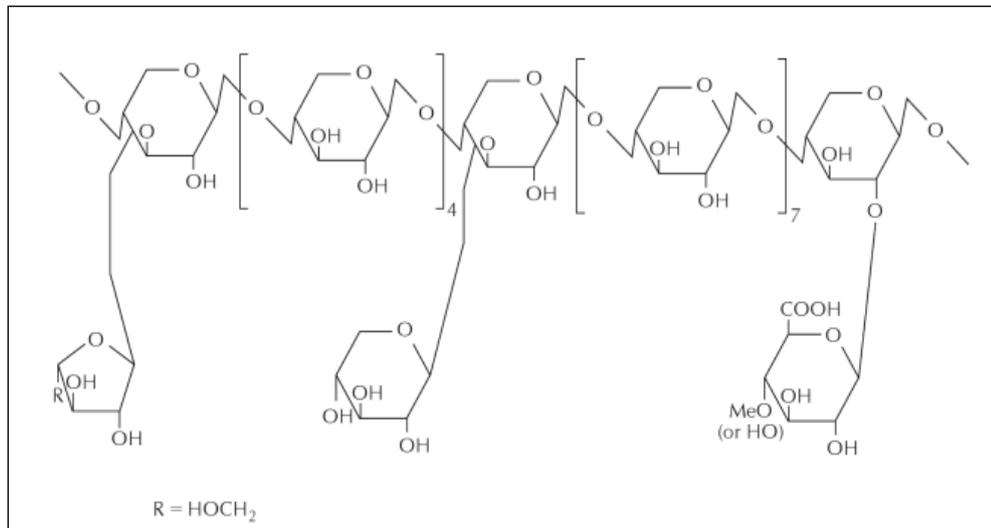


Figure 05. Structure de l'hémicellulose (Sun, 2010)

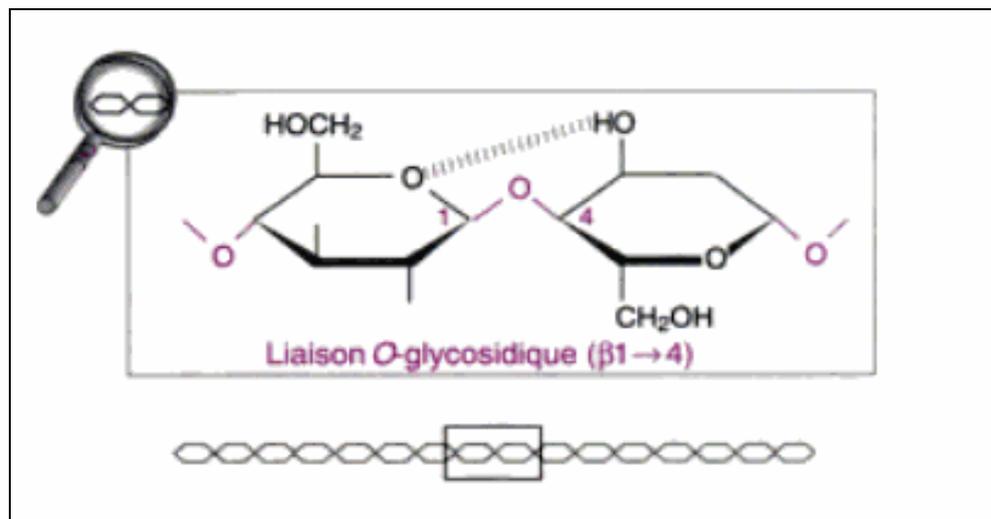


Figure 06. Structure de la cellulose (Moussard, 2006)

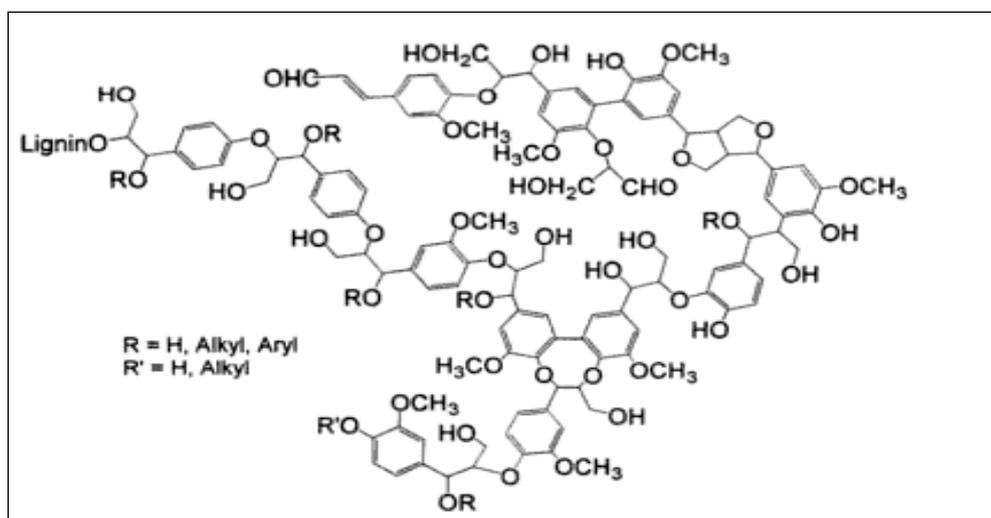


Figure 07. Structure de la lignine (Hu, 2002)

Tableau 02. Distribution des glucides dans les fractions de blé (g/100 grs)
(Manay et Shadaksharaswamy, 2001)

Glucides	Albumen	Germe	Enveloppes
Amidon	95,8	31,5	14,1
sucres	1,5	36,4	7,6
cellulose	0,3	16,8	35,2
hémicellulose	2,4	15,3	43,1

2.2.3. Lipides

Les lipides du blé sont un mélange complexe de composants. Ils sont inégalement répartis dans les différentes parties du grain de blé. Le tiers de la fraction lipidique total est situé dans le germe (Figure 08). Plus de 20 classes de lipides existent dans le grain de blé et peuvent être divisées en deux groupes, les lipides polaires et non polaires. Les triglycérides sont les principaux lipides non polaires qui représentent environ 50% des lipides non polaires totaux dans le blé. Ils sont déposés en sphérosomes (gouttelettes d'huile) délimités par une membrane monocouche (Feillet, 2000).

Les restes sont principalement des mono et des diglycérides, des esters de stérols et des acides gras libres. Les principaux composants des lipides polaires sont les glycolipides et les phospholipides. Les principaux glycolipides dans le grain entier et l'albumen amylicé sont les monogalactosyldiglycérides et les digalactosyldiglycérides, avec des petites quantités de lipides monoacyles. Les phospholipides majeurs sont les phosphatidylcholines, les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylinositol (Haard *et al.*, 1999).

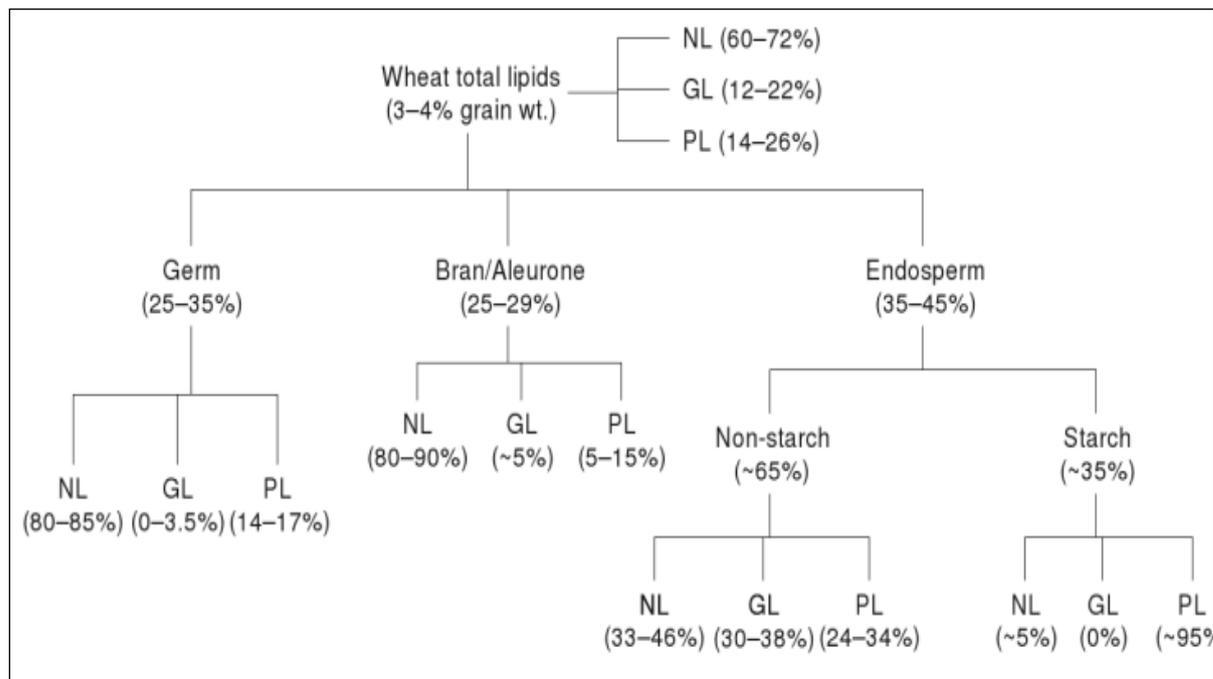


Figure 08. Distribution des différents lipides dans le grain de blé (Carver, 2009)

2.2.4. Vitamines et Minéraux

Selon Vierling (2008), la seule vitamine liposoluble présente dans le grain de blé est la vitamine E. La vitamine C est quasi absente. Le blé est une source intéressante en vitamines du groupe B qui sont inégalement réparties dans les différentes parties du grain (Tableau 03).

Les minéraux forment une petite partie du grain de blé, et en proportion encore plus faible dans l'albumen moins de 1% (Matz, 1991). Le blé contient du fer, du magnésium, du manganèse, du cuivre et du zinc etc (Tableau 04). Ces constituants sont distribués principalement dans les couches extérieures et dans le germe (Manay et Shadaksharaswamy, 2001).

2.2.5. Facteurs antinutritionnels

Les grains de céréales ne contiennent généralement que des quantités limitées ou nulles de facteurs antinutritionnels. Ces composés peuvent être localisés dans le grain entier, le germe, l'embryon ou l'albumen ; on trouve :

- **Les inhibiteurs d'enzymes** : qui sont de nature protéique susceptibles de provoquer par leur action sur les enzymes une mauvaise utilisation des nutriments (anti amylases, anti-lipases).
- **Les phytates** : il s'agit d'un polyacide capable de former des complexes avec des cations divalents dont l'assimilation est fortement perturbée (fer, zinc, magnésium, manganèse, cuivre) (Dupin *et al.*, 1992).

Tableau 03. Distribution de la vitamine du groupe B (g/100 grs) dans les différentes parties du grain de blé (Manay et Shadaksharaswamy, 2001)

	Thiamine (B1)	Niacine (B3)	Riboflavine (B2)	Acide pantothénique (B5)
Péricarpe, Testa, bande hyaline	1	4	5	8
Couche à aleurone	31	84	37	39
Albumen	3	11.5	32	41
Scutellum	62.5	1	14	4
Embryon	2	1	12	3.5

Tableau 04. Eléments minéraux du grain de blé (Matz, 1991)

	Grain entier	Germe	Albumen	Couche à aleurone
Total (%)	0,42	1,66	0,11	1,39
Zn (ppm)	40,4	222	14,1	119
Fe (ppm)	54,6	235	21,5	186
Mn (ppm)	56,4	402	8,80	130
Cu (ppm)	4,25	18	2,8	12
Ca (ppm)	335	1760	173	730
Mg (%)	0,15	0,54	0,02	0,58
K (%)	0,37	0,91	0,12	1,10

2.3. Enzymes du blé

Les enzymes des grains de blé sont des protéines qui exercent une activité catalytique spécifique d'un très grand nombre de réactions chimiques. Les principaux facteurs du milieu qui contrôlent leur fonctionnement sont la température, le pH et l'activité de l'eau (Feillet, 2000).

2.3.1. Enzymes Amylolytiques

Les enzymes amylolytiques sont capables d'hydrolyser l'amidon (amylose et amylopectine) et ses produits de dégradation (dextrines, oligosaccharides). Les enzymes amylolytiques naturellement présentes dans le blé sont des α -amylases et des β -amylases (Feillet, 2000).

Alpha-Amylases (α -amylases) : Ce sont des enzymes dextrinisantes, scindent au hasard les liaisons α -(1, 4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine (Figure 09). Elles libèrent ainsi des dextrines de masses moléculaires de plus en plus réduites qui serviront de nouveaux substrats pour la bêta-amylase (Boudreau et Ménard, 1992). Dans le grain de blé, les α -amylases jouent un rôle important car elles sont responsables de la dégradation de l'amidon en sucres simples (Sindic *et al.*, 2010). Leurs activités peuvent être voisine du zéro dans les grains à pleine maturité ; elles sont maximales dans les enveloppes du grain (péricarpe), faibles dans l'albumen et nulles dans le germe (Feillet, 2000).

Bêta-Amylase (β -amylase) : La β -amylase ou enzyme saccharifiante (figure 09) spécifique des chaînes linéaires libère du maltose. Elle détache le maltose molécule par molécule en attaquant simultanément l'extrémité non réductrice de l'amylose et les ramifications non réductrices de l'amylopectine. Dans ce cas, l'action enzymatique de la bêta-amylase s'arrête aux branchements α -(1, 6) et forme ainsi des dextrines dites "limites" (Boudreau et Ménard, 1992). Dans un blé de haute qualité, le contenu de la β -amylase est faible mais si la pluie vient avant la récolte, les formes inactives de β -amylase sont converties aux formes actives (Cauvain, 2003).

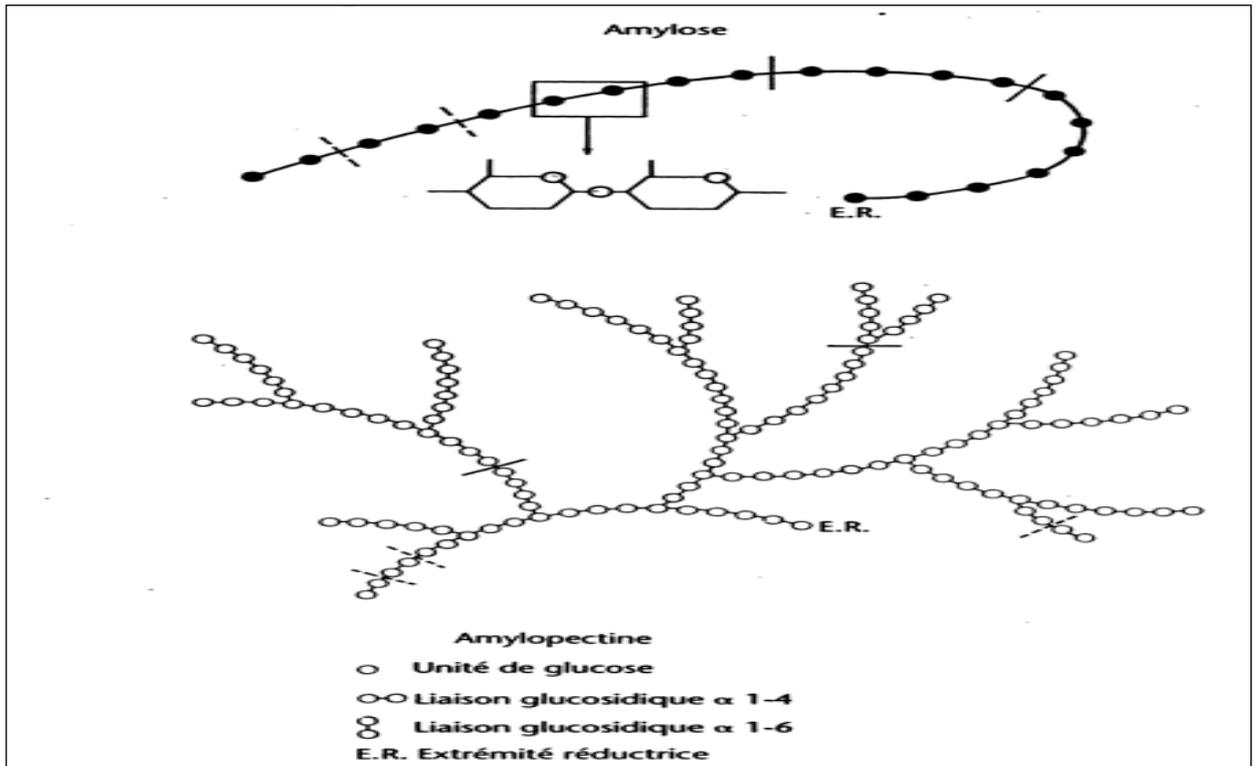


Figure 09. Structure et modifications enzymatiques des éléments constitutants de l'amidon par les amylases alpha (traits continus) et bêta (traits pointillés) (Boudreau et Ménard, 1992)

2.3.2. Enzymes lipolytiques

Lipases : Ce sont des enzymes qui hydrolysent des longues chaînes de triglycérides avec la formation des diglycérides, des monoglycérides, des glycérols et des acides gras libres. La réaction est réversible et les lipases catalysent la formation des lipides (Figure 10). Les lipases sont présentes en quantités significatives dans le germe de blé, ils sont un exemple d'estérase qui hydrolyse en particulier les groupes esters ceux dans les glycérides (Cauvain, 2003). Durant le stockage du blé, l'augmentation de la teneur en acides gras libres est due à l'action des lipases présentes dans le grain (Salleh *et al.*, 2006 ; Carver, 2009).

Lipoxygénases : Les Lipoxygénases du blé sont des enzymes qui oxydent spécifiquement des acides gras libres ou des monoglycérides possédant des doubles liaisons non conjuguées 1-4 cis-cis pentadiène ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$), tels que les acides linoléique, linoléinique et arachidonique. Les réactions sont stéréospécifiques, s'effectuent en présence d'oxygène et conduisent à des monohydroperoxydes optiquement actifs possédant un système de doubles liaisons conjuguées en configuration cis-trans (Feillet, 2000). Ces enzymes sont présentes dans les enveloppes et dans le germe (Edwards, 2007).

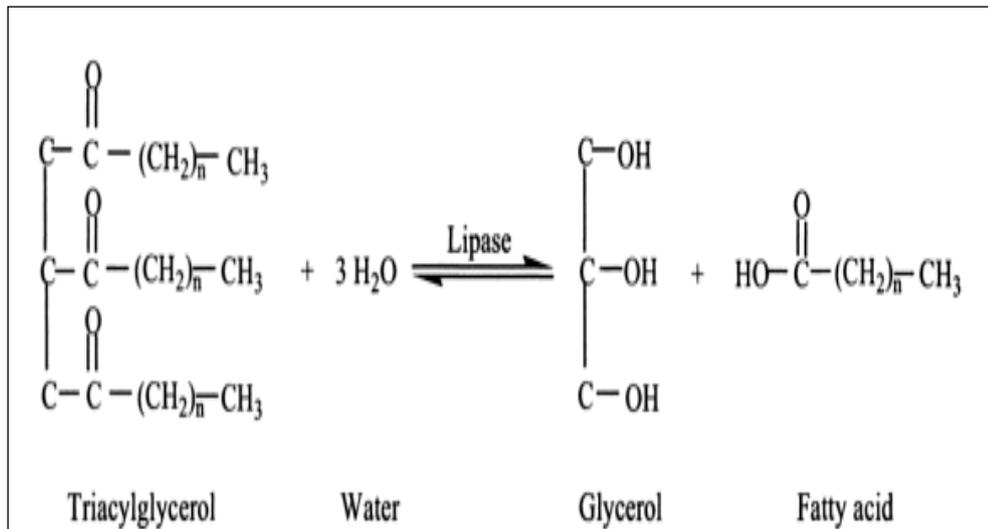


Figure 10. Action hydrolytique et synthétique des lipases (Salleh *et al.*, 2006)

2.3.3. Enzymes protéolytiques

Le grain de blé contient certaines enzymes protéolytiques (Figure 11). Les aminopeptidases (seulement attaquent l'extrémité d'une chaîne polypeptidique d'un groupe amine libre (-NH₂)), les carboxypeptidases (seulement attaquent l'extrémité d'une chaîne polypeptidique d'un groupe carboxyle libre (-COOH)), les endopeptidases (avoir pour effet de diviser les protéines en polypeptides) et d'autres peptidases dont l'augmentation de l'activité s'observe durant la germination du grain (Cichoke, 1999 ; Roberts *et al.*, 2000).

2.3.4. Phosphatases

Les phosphatases sont des estérases appartenant à la famille des hydrolases qui hydrolysent les esters de phosphate, dans le blé, un exemple important est la phytase, qui agit sur l'acide phytique (Figure 12) présent en grande quantité dans les enveloppes. La phytase est donc capable de réduire l'acide phytique, compensant ainsi la complexation des minéraux précieux comme le calcium, le zinc et le fer (Cauvain, 2003).

2.3.5. Polyphénoloxydases

Les polyphénoloxydases catalysent l'oxydation des phénols en quinones. Elles sont concentrées dans les parties périphériques du grain et présentes en très faible quantité, sinon absentes, dans l'albumen ; le germe est dépourvu (Feillet, 2000).

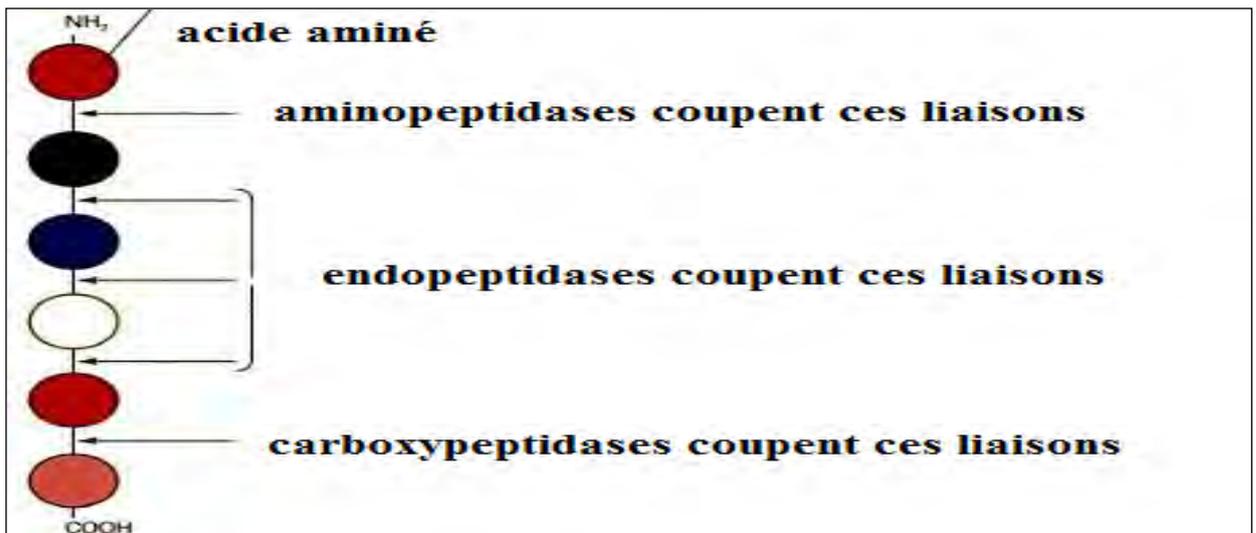


Figure 11. Action de certaines enzymes protéolytiques (Roberts *et al.*, 2000)

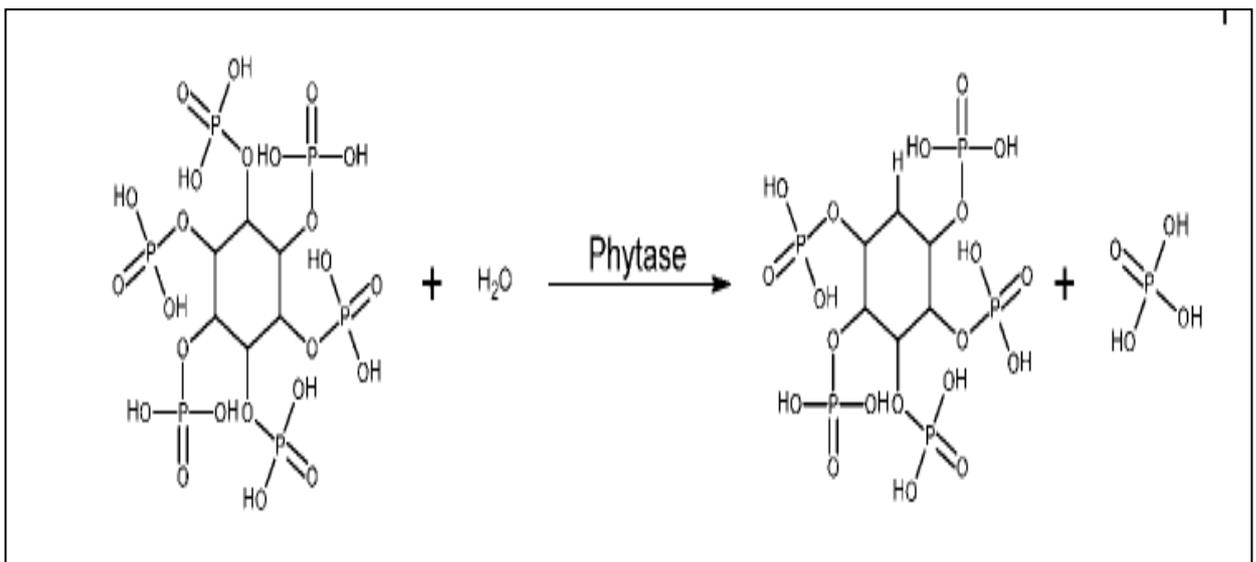


Figure 12. Hydrolyse de l'acide phytique (Soetaert et Vandamme, 2010)

CHAPITRE 2. MICROORGANISMES DU BLE

1. Introduction

Depuis le moment de leur initiation au sein de l'épi jusqu'au passage au moulin ou à l'usine, les grains de blé sont soumis à des proliférations de bactéries, de levures, de moisissures ou de parasites. Pendant la conservation, la microflore du grain à l'origine et celle des produits de mouture subissent des modifications au cours du temps. Différents schémas évolutifs sont possibles : du plus souhaitable qui correspondent au grain sec dont les microorganismes disparaissent ; témoin d'une altération profonde et à l'extrême à la destruction pure du grain par auto-combustion (Bourgeois *et al.*, 1996).

2. Présentation des moisissures, levures et bactéries

2.1. Moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux structurés en mycélium. La reproduction et la dissémination des moisissures s'effectuent grâce à la formation des spores sexuelle ou végétative (Guiraud, 2003 ; Guiraud et Rosec, 2004). Ainsworth (1968) estime le nombre de champignons à 50.000 espèces connues et considère qu'il en existe au moins autant à découvrir. Ces organismes, d'une grande variété de formes et de structures, ont fait l'objet de classifications complexes (Botton *et al.*, 1985). Par simplification, les grandes divisions mentionnées par différents auteurs sont : **Gymnomycota** des organismes amiboïdes, l'appareil végétatif est dépourvu de paroi et l'absorption des nutriments est assurée par engoutissement (Griffin, 1994) ; **Mastigomycota** produisent des cellules flagellées dans certaines parties de leur cycle de vie (Lockey *et al.*, 2004) ; **Amastigomycota** avec des mycéliums bien développés et des hyphes septées ou aseptées (Lockey *et al.*, 2004) ; cette division est subdivisée en : **Zygomycotina** caractérisée par un mycélium sans cloisons. La reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospores ou parfois par "conidies exogènes" et la reproduction sexuée par fusion de gamétocystes (Botton *et al.*, 1985) ; **Ascomycotina** à mycélium septé ou unicellulaire, la reproduction sexuée s'effectue par la formation de spores méiotiques (ascospores) dans des asques et la reproduction asexuée se fait par conidies (Botton *et al.*, 1985) ; **Basidiomycotina** groupe très important de champignons alimentaires les plus communs. Le mycélium est bien développé, ramifié et septé. La reproduction sexuée a lieu par fragmentation ou par bourgeonnement et la reproduction asexuée s'effectue par oidia, conidies ou par la formation de chlamydo-spores (Singh, 2010). **Deuteromycotina** comprend les champignons dans lesquels le stade parfait (zygote, asque ou baside) est absent ou n'a pas été découvert (Sharma, 1989).

La croissance des moisissures nécessite des nutriments, l'eau, une température favorable, une atmosphère et un pH appropriés (Beuchat, 1987). Ce sont des organismes hétérotrophes et jouent un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique. Les sources de carbone les plus utilisées sont les glucides. La flore glucidolytique dans de nombreuses denrées se développe dans un premier temps aux dépens d'oses et ultérieurement à partir des polyosides : l'amidon, la cellulose, la chitine etc. sont dégradés, par l'action d'enzymes glucidolytiques exocellulaires (Leyral et Vierling, 2007). Certaines moisissures ne se développent que sur substrat humide et d'autres peuvent proliférer sur des substrats dont l'humidité est très faible (Leyral et Vierling, 2007). La végétation maximale est produite entre 20°C et 30°C. Certaines espèces sont très résistantes à la chaleur (supérieur à 50°C). A l'opposé, il existe des moisissures psychrophiles supportant des températures basses et même négatives (Leyral et Vierling, 2007). La plupart des moisissures sont aérobies strictes, c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'oxygène pour se développer. Les moisissures vont donc croître préférentiellement en surface des aliments. Néanmoins, certaines souches sont microaérophiles : elles sont capables de se développer même à de très faibles taux d'oxygène résiduel. De telles souches sont donc aptes à se développer dans la masse. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte (Delacharlerie *et al.*, 2008). Contrairement aux autres microorganismes, les moisissures sont extrêmement tolérantes aux différents pH puisqu'elles sont susceptibles de se développer dans une gamme de pH allant de 2 à 9, avec un optimum de 4 à 6,5 (Delacharlerie *et al.*, 2008).

2.2. Levures

Les levures sont des champignons unicellulaires. Les cellules (10 micromètres) sont sphériques, elliptiques ou apiculées (Dupin *et al.*, 1992), se reproduisent par bourgeonnement ; elles peuvent alors se séparer (pas de filaments) ou rester accolées pour donner des filaments appelés mycéliums (*Candida*), d'autres levures (*Trichophyton*) se divisent par scission avec production d'arthrospores. Certaines sont capsulées comme : *Cryptococcus*, *Torulopsis* (Leyral et Vierling, 2007). Les levures appartiennent à trois grandes classes : Les **Ascomycètes (hémiascomycètes)** se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose (Meyer *et al.*, 2004) ; Les **Basidiomycètes** avec une reproduction sexuée et formation de basidiospores sur une baside (Bonnefoy *et al.*, 2002) ; les **Levures imparfaites** de la famille des *Cryptococcaceae*, dont de nombreuses levures peuvent également être rencontrées dans les produits alimentaires (Bonnefoy *et al.*, 2002).

Les composés carbonés sont utilisés par les levures à la fois comme source d'énergie et comme source de carbone. Cette utilisation se fait uniquement par voie oxydative, soit pour la plupart, après une phase aérobie de démarrage de la croissance, par métabolisme fermentaire

(anaérobie) conduisant à la production d'éthanol et du CO₂. Les molécules simples telles que les acides aminés, les monosaccharides, les acides organiques et autres dissoutes dans le milieu sont absorbées directement. Certaines levures sont capables d'utiliser les nitrites et les nitrates. La plupart des acides aminés peuvent être utilisés sous forme d'azote. Suivant les acides aminés, le taux de croissance des levures varie. Certaines d'entre elles ont également besoin d'un ou de plusieurs vitamines (thiamine, biotine..) et d'autres facteurs de croissance. Le potassium est l'élément minéral quantitativement le plus important dans la levure. Le magnésium est nécessaire au bon fonctionnement d'un certains métabolisme d'enzyme, le zinc joue un rôle essentiel dans le métabolisme, il est un cofacteur d'enzyme comme l'aldolase et il est indispensable dans la glycolyse (Leveau et Bouix, 1993). Les températures d'incubation, sont généralement proches de celles qui permettent la propagation des levures dans leurs environnements naturels et se situent entre 25°C et 30°C. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans certains habitats, à savoir les régions à températures basses ou élevées (Vishniac et Hempfling, 1979). L'effet de la pression osmotique varie d'une souche à l'autre. La plupart des souches ne peuvent se développer pour des activités de l'eau inférieures à 0,90, mais certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60, mais avec un métabolisme lent (Leveau et Bouix, 1979). Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (Walker *et al.*, 1997). Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certains sont aérobies strictes et d'autre sont aéro-anaérobies facultatives (Bouix et Leveau, 1991 ; Kanafani-Zahar, 1994).

2.3. Bactéries

Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires. Les cellules bactériennes présentent différentes formes dont les plus courantes sont les coques (sphère), les bacilles (bâtonnet) et la forme intermédiaire ou coccobacille. Les dimensions d'une cellule bactérienne varient de 0,2 à une dizaine de micromètres. La cellule bactérienne est limitée par une enveloppe, dont la nature chimique et en particulier sa teneur en lipides, permet de classer les bactéries en deux grands groupes : Gram positif et Gram négatif (Guiraud, 2003).

Les bactéries utilisent pour se nourrir divers sucres et hydrates de carbone, des acides aminés, des stérols, des alcools, des sels inorganiques et du dioxyde de carbone. Cependant, individuellement aucune bactérie ne peut utiliser tous ces composés car elle ne dispose pas de toutes les enzymes requises et son enveloppe cellulaire ne contient pas les systèmes d'absorption

nécessaires. Certaines bactéries satisfèrent tous leurs besoins nutritifs avec des simples sels inorganiques et des substances comme le dioxyde de carbone et l'ammoniaque. D'autres requièrent à divers degrés des composés organiques plus au moins complexes, provenant d'autres organismes. Selon Baudry et Brezellec (2006), les bactéries sont classées en trois catégories selon la température de croissance (mésophiles : 20°C ; psychrotrophes : <20°C ; psychrophiles : 0°C ; thermophiles : >40°C). Les bactéries aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'oxygène, les bactéries microaérophiles se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air, les bactéries aéroanaérobies facultatives se développent avec ou sans air et les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale, ou presque, d'oxygène, qui est le plus souvent toxique (Branger *et al.*, 2007). L'humidité est primordiale, car l'eau est l'élément indispensable au développement des bactéries (Aw de 0,95 à 0,98) (Roquebert, 2002). Le pH optimal de croissance de la plupart des bactéries se situe aux alentours de la neutralité, certaines bactéries se développent en milieu acide ; bactéries acidophiles : pH <7, alors que d'autres prolifèrent à un pH basique ; basophiles : > 9 (Baudry et Brezellec, 2006).

3. Flore microbienne du blé

Elle accompagne normalement les grains sains, Celle qui se développe au cours du stockage se caractérise par la succession de deux types écologiques : de nouvelles espèces dites de stockage, prenant l'avantage sur les espèces champêtres (Feillet, 2000).

3.1. Moisissures

3.1.1. Flore des champs

Les grains de blé sont contaminés par les microorganismes dans le champ, et cette microflore est dominée par des moisissures (Deák, 2008). Les spores des champignons de champ envahissent les grains et croissent dans le champ ou attendent le battage (Dendy et Dobraszczyk, 2000). Les genres rencontrés sont: *Alternaria* (le plus fréquent), *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Helminthosporium* (moins fréquents), *Chaetomium*, *Curvularia*, *Rhizopus* et *Stemphylium* (Sauer *et al.*, 1982 ; Zillinsky, 1983). Cette flore est bien adaptée à des changements rapides des conditions dans le champ. Elle exige des activités en eau relativement élevées pour une croissance optimale (Adams et Moss, 2008). En fonction des conditions précises, ces champignons peuvent mourir lentement au cours du stockage ou peuvent survivre pendant de longues périodes. La survie est plus longue à basse température et à faibles niveaux d'humidité (Roberts, 2005).

Genre *Alternaria* : Il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides (Dendy et Dobraszczyk, 2000). Les espèces les plus fréquentes sont : *Alternaria alternata* est connue par la production des mycotoxines ; *Alternaria tenuissima* est capable de produire des toxines tel que l'acide ténuazonique (Andersen *et al.*, 2002) et *Alternaria infectoria* cause la décoloration et la dévalorisation du grain mais elle est non toxino-génique (Webley *et al.*, 1997).

Genre *Fusarium* : Il comprend les espèces qui ont à la fois des pouvoirs pathogènes et saprophytes. Les espèces rencontrées sont surtout : *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* (Van der Burgt et Timmermans, 2009). Les champignons *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines. Les deux espèces *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* peuvent causer la pourriture de la tige et la brûlure de l'épi du blé et ces infections de champ peuvent conduire à l'altération post récolte plus importante de ce produit s'il est stocké à une trop forte activité de l'eau (Adams et Moss, 2008).

3.1.2. Flore intermédiaire

Elle est une catégorie à comportement plus diversifié et regroupe des germes capables d'un développement limité, en début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Les genres les plus rencontrés sont : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (Godon et Loisel, 1997).

3.1.3. Flore de stockage

Les moisissures des grains de blé stockés sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés. Les principaux genres rencontrés sont : *Aspergillus* et *Penicillium* en raison de leurs capacités de se développer sur tous substrats possibles et dans une large gamme de température et d'humidité (Mathew *et al.*, 2011).

Genre *Aspergillus* : Chaque espèce de moisissures de stockage a ces conditions de développement (Christensen et Kaufmann, 1969). Dans le blé stocké, les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000). Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans le grain de blé stocké sont surtout : *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* (Mathew *et al.*, 2011). Si le blé est stocké à une teneur d'humidité de 14 à 15% et à une température d'environ 70°C, il sera lentement envahi par d'autres espèces notamment *Aspergillus restrictus*. Cette dernière représente l'espèce qui prédomine dans le blé stocké pendant quelques mois si l'humidité est inférieure à 15%.

Au dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que : *Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus ruber* prédominant et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (Christensen et Kaufmann, 1969).

Genre *Penicillium* : Les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (Neergaard, 1977 ; Boudreau et Ménard., 1992).

Les espèces les plus communes sont essentiellement : *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium hordei*, *Penicillium freii*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium crustosum* (Dijksterhuis et Samson, 2007) (Figure 13).

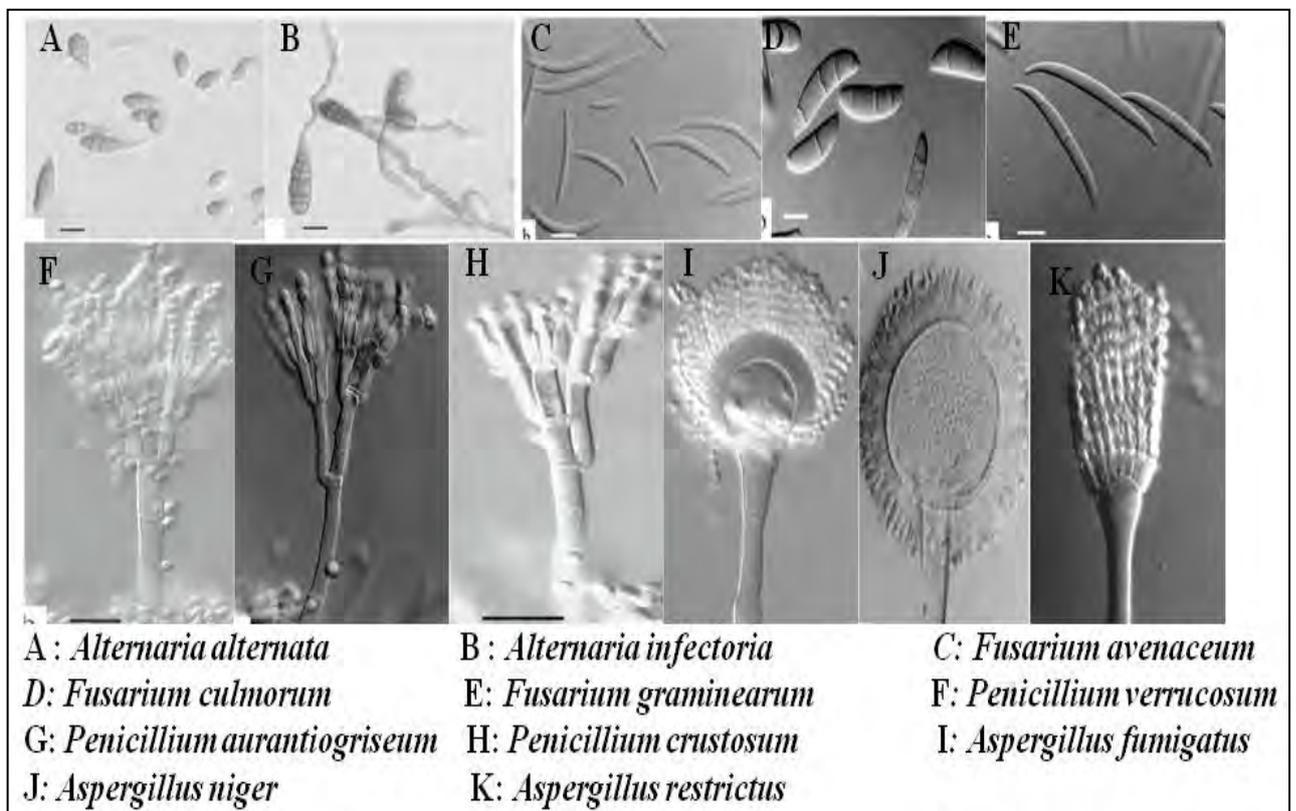


Figure 13. Quelques moisissures rencontrées dans le grain de blé, observation au microscope optique (x100) (Pitt et Hocking, 2009)

3.2. Levures

3.2.1. Flore des champs

Les populations de levures (champignons microscopiques le plus souvent unicellulaires et non pigmentés) dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les genres rencontrés sont : *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* (Figure 14) ne donnent généralement lieu qu'à de faibles niveaux de contamination, ne dépassant que rarement quelques centaines de germes par gramme de grain. Au contraire, des quantités élevées des levures sont souvent le signe d'une humidité élevée à la récolte et /ou d'un pré-stockage humide avant séchage (Cahagnier, 1996).

3.2.2. Flore de stockage

Selon Petersson et Schnürer (1995) ; Druvefors et Schnürer (2004), La levure *Pichia anomala* est fréquemment trouvée pendant le stockage étanche à l'air du blé. Cette levure est un moyen de lutte contre certains champignons d'altération du blé stocké tels que *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus candidus*. En outre, le degré d'inhibition des champignons d'altération est lié à la concentration des cellules de cette levure. L'inhibition est plus prononcée à des températures sous l'optimale pour la croissance et la sporulation du *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus candidus*, inférieure à 15°C et supérieure à 30°C. La levure *Pichia anomala* peut pousser entre 3°C et 37°C, à des pH entre 2 et 12,4 et à une activité de l'eau de 0,92 (Figure 15).

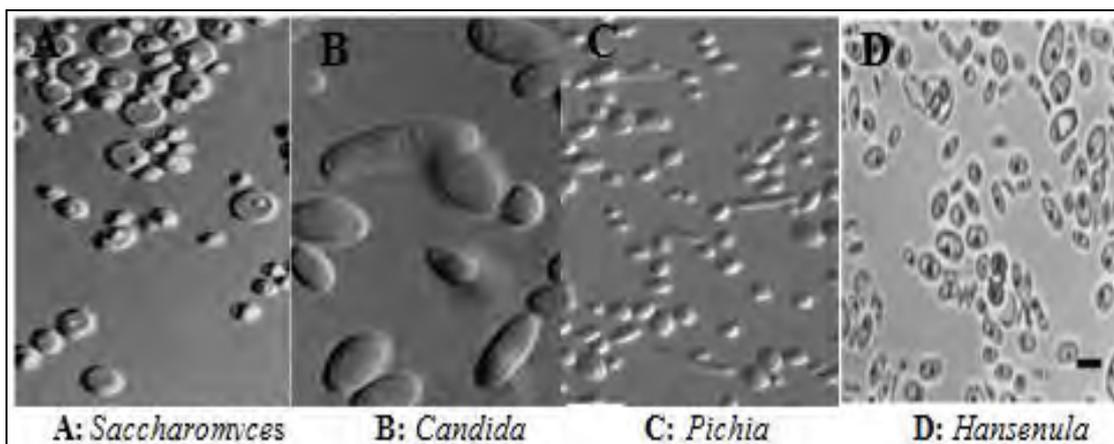


Figure 14. Exemples de levures dans le grain de blé observées au microscope optique (x100)
(Pitt et Hocking, 2009 ; Kurtzman *et al.*, 2011)

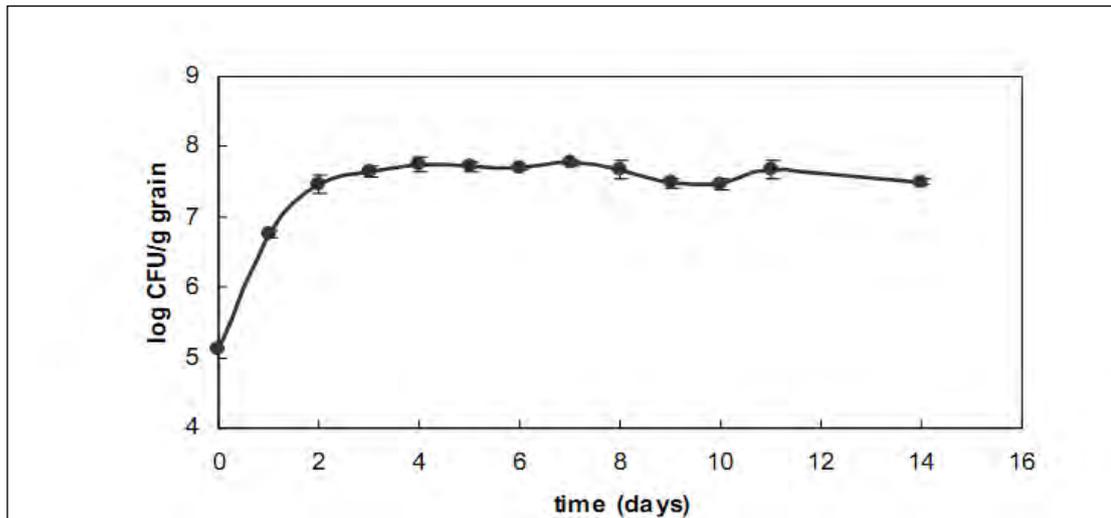


Figure 15. Croissance de levure *Pichia anomala* sur le blé stocké (Aw 0.95, 25°C) (Druvefors et Schnürer, 2004)

3.3. Bactéries

Elles proviennent essentiellement du sol, peuvent être identifiées suivant les critères actuels de la classification (Richard-Molard, 1998). Elles se rangent principalement dans les familles suivantes : *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), *Xanthomonadaceae* (*Xanthomonas*), *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae*, etc (Figure 16). Les grains ne constituent pas un milieu favorable pour les germes pathogènes ou toxigènes comme *Salmonella*, *Clostridium* ou *Staphylococcus*. À la récolte, les produits céréaliers sont toujours faiblement contaminés par les *Streptomycetaceae*, microorganismes que l'on connaît surtout pour leur aptitude à produire des antibiotiques, et dont les principaux représentants sur grains semblent être : *Streptomyces albus* et *Streptomyces griseus* (Cahagnier, 1996).

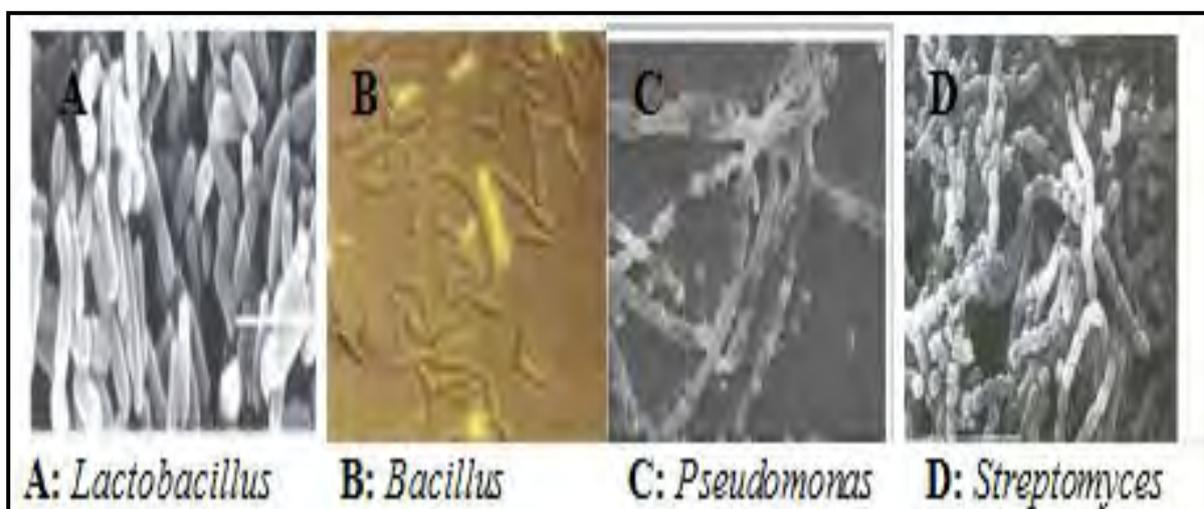


Figure 16. Exemple de Bactéries dans le grain de blé observées au microscope optique (x100) (Prescott *et al.*, 2003 ; Podila et Varma, 2005 ; Prescott *et al.*, 2010)

CHAPITRE 3. ACTION DES MICROORGANISMES SUR LE BLE STOCKÉ

1. Modifications visuelles du blé

1.1. Germination

La diminution de la germination se produit lorsque les champignons de stockage envahissent le germe ou l'embryon du grain. Ce dernier affaibli et meurt lorsque les champignons de stockage l'attaquent pour utiliser ses huiles et d'autres nutriments (Heredia *et al.*, 2009). Cette réduction est influencée par la teneur en humidité des grains, la température de stockage, l'espèce de mycoflore impliqué et la durée de stockage (Bose et Hemantaranjan, 2008).

1.2. Décoloration

La décoloration peut être causée par les champignons de champ et de stockage et peut entraîner un noircissement du germe de blé (Heredia *et al.*, 2009). Les moisissures des champs peuvent induire une décoloration des grains de blé, connue sous le nom (point noir ou tache du noyau) entraînant l'échaudage des grains et l'affaiblissement ou la mort des embryons (Hanson et Christensen, 1953). Les moisissures de stockage provoquent une décoloration sévère des grains, *Aspergillus glaucus* provoque la décoloration du germe ; *Aspergillus candidus* peut se reproduire dans le blé à une teneur en eau de 15-15,5 % entraîne la décoloration de l'ensemble du grain. *Aspergillus flavus* se développe dans le blé entreposé à une teneur en eau supérieure à 18-18,5% et provoque une décoloration rapide du germe et du grain entier. Les moisissures du genre *Penicillium* qui exigent des teneurs en eau relativement élevées peuvent causer la décoloration du grain (Brooker *et al.*, 1992).

1.3. Odeur

La contamination fongique des grains de blé est responsable du rejet des odeurs indésirables. Il a été constaté que les grains stockés à des conditions d'humidité élevées ont une odeur de moisi (Mathew, 2010).

2. Modifications biochimiques du blé

Au cours du stockage du blé, de nombreux changements biochimiques peuvent se produire et provoquent une diminution de la valeur nutritive du produit stocké en attaquant les glucides, les protéines, les lipides et les vitamines (Udayakumar, 2009).

2.1. Dégradation des lipides

Les lipides des grains et notamment les triglycérides se révèlent particulièrement sensibles à la dégradation par les microorganismes. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérols et en acides gras grâce à des enzymes appelé " lipases ", que l'on rencontre chez les moisissures (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*), les levures (*candida*, *Pichia*) et

les bactéries (*Bacillus*). Les acides gras sont dégradés chez les microorganismes aérobies et aéroanaérobies (*Pseudomonas*, *Entérobactéries*, levures, moisissures...) par la β -oxydation (Guiraud, 2003). L'évolution de l'acidité grasse est une des manifestations les plus sensibles des modifications biochimiques que subissent le blé au cours du stockage (Feillet, 2000).

2.2. Dégradation des glucides

Les grains de blé se composent d'environ de 60-80 % de glucides (Dunford, 2012) qui comprennent à la fois des saccharides fonctionnelles et des saccharides de stockage, la plupart sous forme de polysaccharides (amidon, cellulose) qui sont non directement assimilables par les microorganismes et nécessitent l'intervention d'enzymes extracellulaires (amylases et cellulases). La dégradation de la cellulose est assez rare et se limite à quelques moisissures et bactéries. L'amidon est hydrolysé par l'action d'amylases présentes dans les grains et l'amylase fongique et quelques bactéries et levures, cette dégradation fait intervenir des types d'enzymes selon l'espèce : L'alpha-amylase a une action endomoléculaire conduisant à la formation de maltose et d'une petite quantité de maltodextrine (*Bacillus*, nombreuses moisissures, quelques levures), gluco-amylase qui libère des unités glucose à partir des extrémités non réductrices des polymères (moisissures, levures et des bactéries) et la β -amylase qui a une action de type exomoléculaire donnant du maltose et des dextrines (*Bacillus*, levures et bactéries). Le glucose ainsi formé est utilisé par les champignons comme source d'énergie ou pour la production du sucre ribose utilisé pour la synthèse d'acide nucléique (Guiraud, 2003 ; Narayanasamy, 2006 ; Bauer *et al.*, 2010).

2.3. Dégradation des protéines

L'hydrolyse des protéines en polypeptides et en acides aminés assimilables par les microorganismes ne se fait que très lentement dans les conditions de stockage (Multon, 1982). La plupart des protéases microbiennes sont spécifiques. Elles agissent aussi bien sur les protéines que sur les oligopeptides, il s'agit des enzymes généralement exocellulaires (Guiraud, 2003).

3. Production des mycotoxines dans le blé

Certaines espèces de moisissures ont une préoccupation majeure en raison de leurs propriétés génotoxiques. Ils ont le potentiel de produire une gamme de métabolites secondaires toxiques appelés "mycotoxines". Généralement ces métabolites sont produites dans le mycélium des moisissures, mais peuvent s'accumuler dans des structures spécialisées telles que les phialides, les conidies ou les sclérotés ainsi que dans le milieu environnant l'organisme (Bhatnagar *et al.*, 2002). La synthèse des mycotoxines est liée à des facteurs tels que la teneur en humidité, la température, la durée de stockage, le taux de contamination, de grains cassés, des impuretés, de taux d'oxygène, des dommages au cours du traitement de récolte et transport des

grains (Brick *et al.*, 2000). Une telle contamination peut conduire à la réduction et la dégradation de la qualité de blé, ce qui rend impropre à la consommation humaine et animale.

3.1. Aflatoxines

Les Aflatoxines sont des métabolites secondaires des moisissures connues pour être hautement toxiques et potentiellement cancérigènes. Elles ont été détectées dans diverses denrées alimentaires et sont actuellement considérées comme l'un des contaminants les plus dangereux de l'alimentation (Smith et Moss, 1985). La famille des Aflatoxines est produite par les moisissures du genre *Aspergillus* qui se développent comme contaminants dans les grains stockés particulièrement pendant le stockage en milieu humide (Geacintov et Broyde, 2011).

3.2. Ochratoxines

Les Ochratoxines sont des métabolites produits par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* dans le blé stocké (Labbé et Garcia, 2001). La production des Ochratoxines s'effectue même à des températures n'excédant pas 5°C (OMS, 1980).

3.3. Trichothécènes

Les Trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par le genre *Fusarium* (Placinta *at al.*, 1999). Les trichothécènes sont généralement trouvés dans le monde entier dans les céréales telles que le blé, le maïs, l'orge et l'avoine. Ce sont des métabolites fongiques connus pour contaminer les grains stockés et d'autres produits agricoles (Ueno, 1977). La production de trichothécènes dépend de la température et de l'activité de l'eau. Dans le blé stocké, l'optimum de production des mycotoxines du groupe trichothécènes par les moisissures du genre *Fusarium* est à température de 20-25°C (Yazar et Omurtag, 2008).

3.4. Zéaralénones

L'occurrence de ces toxines est favorisée par l'élévation de la teneur en eau et la diminution de température. Des concentrations élevées de zéaralénones ont été mesurées dans le blé stocké dans des conditions humides (Agag, 2004).

3.5. Moniliformines

Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de production de ce groupe de mycotoxine dans le blé : *Fusarium moniliforme*. L'optimum de cette production est dans les températures chaudes 25-30°C (Xu *et al.*, 2003).

CHAPITRE 4. FERMENTATION DU BLE

1. Introduction

La fermentation été utilisée depuis de milliers d'années comme moyen efficace pour préserver la qualité et la sécurité des aliments, les produits alimentaires sont soumis à l'action des microorganismes et/ou des enzymes pour donner des changements biochimiques désirables et des modifications significatives de la qualité des aliments qui sont connus actuellement sous le nom des " produits fermentés ". La majorité des produits céréaliers en Afrique, ont subi des fermentations naturelles et sont utilisés comme des aliments de sevrage pour les nourrissons et comme des aliments de base pour les adultes. Ces aliments à base de céréales proviennent essentiellement de maïs, de sorgho, de mil, de riz ou de blé. En termes de texture, les céréales fermentées sont soit des liquides (bouillies) ou solides. Les bouillies de céréales fermentées sont l'ogi et le mawé qui sont préparées à partir du maïs, du mil ou du sorgho. Les céréales fermentées solides sont le kenkey et le banku (Osungbaro, 2009).

2. Fermentation du blé

2.1. Dans le *MATMOUR*

Les entrepôts souterrains destinés au stockage des grains est une pratique traditionnelle, très ancienne et largement utilisée dans certaines régions du Maroc sous le nom vernaculaire de *MATMOUR* (Figure 17). Ce mode de stockage est aussi utilisé dans plusieurs pays de l'Afrique, au Proche Orient, en Asie et en Algérie. Cette technique de stockage nécessite des matériaux peu coûteux pour la construction et la protection du grain stocké contre les fluctuations de la température extérieure.

Le stockage souterrain est particulièrement utilisé pour son herméticité, qui permet dans certaines mesures, le contrôle des insectes grâce à la réduction du niveau d'oxygène dans l'entrepôt. Cependant ce type de stockage est parfois responsable de la fermentation des grains.

La couche des grains stockés situées en contact de la périphérie de la paroi de la fosse, subit avec le temps une fermentation spécifique en raison de la composition biochimique du grain d'une part et d'autre part des conditions climatiques et la nature de matériaux utilisés pour la confection du *MATMOUR*. La fermentation peut durer 4-9 ans. L'humidité constitue un facteur important pour le développement de certaines bactéries responsables de la fermentation des grains. La température, lorsqu'elle est assez élevée, peut favoriser la prolifération des microorganismes présents dans la masse des céréales. L'augmentation de la température peut être d'origine biologique ou climatique. L'échange de la chaleur entre le stock et le milieu extérieur se fait à travers les parois et les ouvertures (Bartali *et al.*, 1989).

Le *MATMOUR* est fermée, ceci crée une atmosphère confinée autour des grains favorisant le développement des microorganismes anaérobies.

2.2. Dans les fûts

Actuellement, avec l'évolution du mode de vie et la sédentarisation, la fermentation du blé est réalisée dans des fûts par des artisans commerçants. Elle est plus rapide (1 année) que celle utilisée dans les *MATMOURS* (4 à 9 ans).

2.3. Avantages de la fermentation du blé

Jusqu'à présent le blé fermenté n'a pas fait l'objet d'une étude particulière. Dans ce paragraphe nous présentons une description des différentes modifications qui surviennent durant la fermentation d'un aliment en général.

Les principales céréales utilisées comme matières premières au cours des fermentations lactiques en Afrique de l'ouest sont : le maïs, le sorgho et le mil (Tableau 05). Ces produits constituent essentiellement en des pâtes et des bouillies non alcoolisées. La pâte de maïs fermentée, l'une des plus populaires aliments amylicés et fermentés, est utilisée au cours de la préparation d'une grande variété de plats comme aliment de base au : Ghana, Nigéria, Togo et Bénin, où ils constituent une proportion importante de la ration alimentaire quotidienne. La pâte de maïs fermentée obtenue après une fermentation spontanée se caractérise par une teneur en humidité de 50 % et un pH finale de 3,7. Des bactéries lactiques, des levures et des moisissures ont été identifiées comme les principaux micro-organismes se développant au cours de la fermentation (Tableau 06). Les bactéries lactiques du genre : *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Pediococcus* sont les bactéries lactiques les plus fréquentées (Tableau 07).

L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a été associée tout d'abord à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit final, mais aussi au maintien d'une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits. D'autres actions et non des moindres, sont souvent rapportés. Par exemple, les propriétés probiotiques des bactéries lactiques et l'inhibition des bactéries pathogènes sont particulièrement importantes ; les aliments fermentés contribuaient à réduire la durée et la sévérité des diarrhées infantiles (Yao *et al.*, 2009).

2.3.1. Qualité nutritionnelle et digestibilité

La fermentation lactique est fortement recommandée, car elle diminue considérablement la viabilité des germes nocifs. Svanberg et Sandberg (1989) ont étudié la disponibilité du fer. On sait que dans certaines graines, le contenu en acide phytique a pour effet de complexer les minéraux et les immobiliser. Des études ont montré l'effet très significativement positif de la fermentation lactique sur la disponibilité du fer, avec comme corrélation la diminution des phytates (Raimbault, 1995).

2.3.2. Formation de l'arôme et de la saveur

L'analyse bibliographique montre que très peu de travaux ont été consacrés à l'étude des composés aromatiques volatils des aliments amylicés et fermentés. L'acétoïne et ses dérivés ainsi que certains composés aromatiques (acétate d'isoamyle, acétate d'éthyle, et acétoïne, etc), les principaux composés volatiles identifiés, dans la pâte de maïs fermenté proviendraient de l'action des bactéries lactiques et donneraient aux produits ses caractéristiques (Yao *et al.*, 2009).

2.3.3. Préservation et innocuité de l'aliment

La fermentation est une méthode de conservation des aliments. Les bactéries lactiques produisent plusieurs composés antimicrobiens naturels, à savoir des acides organiques, le dioxyde de carbone et des bactériocines (Messens et Devuyst, 2002). La production d'acides organiques au cours de la fermentation entraîne une réduction importante du pH, qui associée à la formation de composés antimicrobiens détermine la stabilité microbienne des produits ainsi que la motilité des bactéries pathogènes et d'autres microorganismes nuisibles (Raimbault, 1995).

Tableau 05. Principaux aliments fermentés de l'Afrique de l'Ouest (Yao *et al.*, 2009)

Matières premières	Nom du produit	Pays de consommation
Maïs	Kenkey	Ghana, Nigéria
Maïs et/ou manioc	Banku	Ghana
Maïs	Ogi-baba, ogi	Nigéria, Bénin, Ghana
Maïs	Mawè	Bénin, Togo
Mil	Ben-saalga	Burkina-Faso
Mil	Kunun-zaki	Nigéria
Mil	Koko	Ghana
Sorgho	Gowé	Bénin
Sorgho et /ou mil maïs	Obiolor	Nigéria

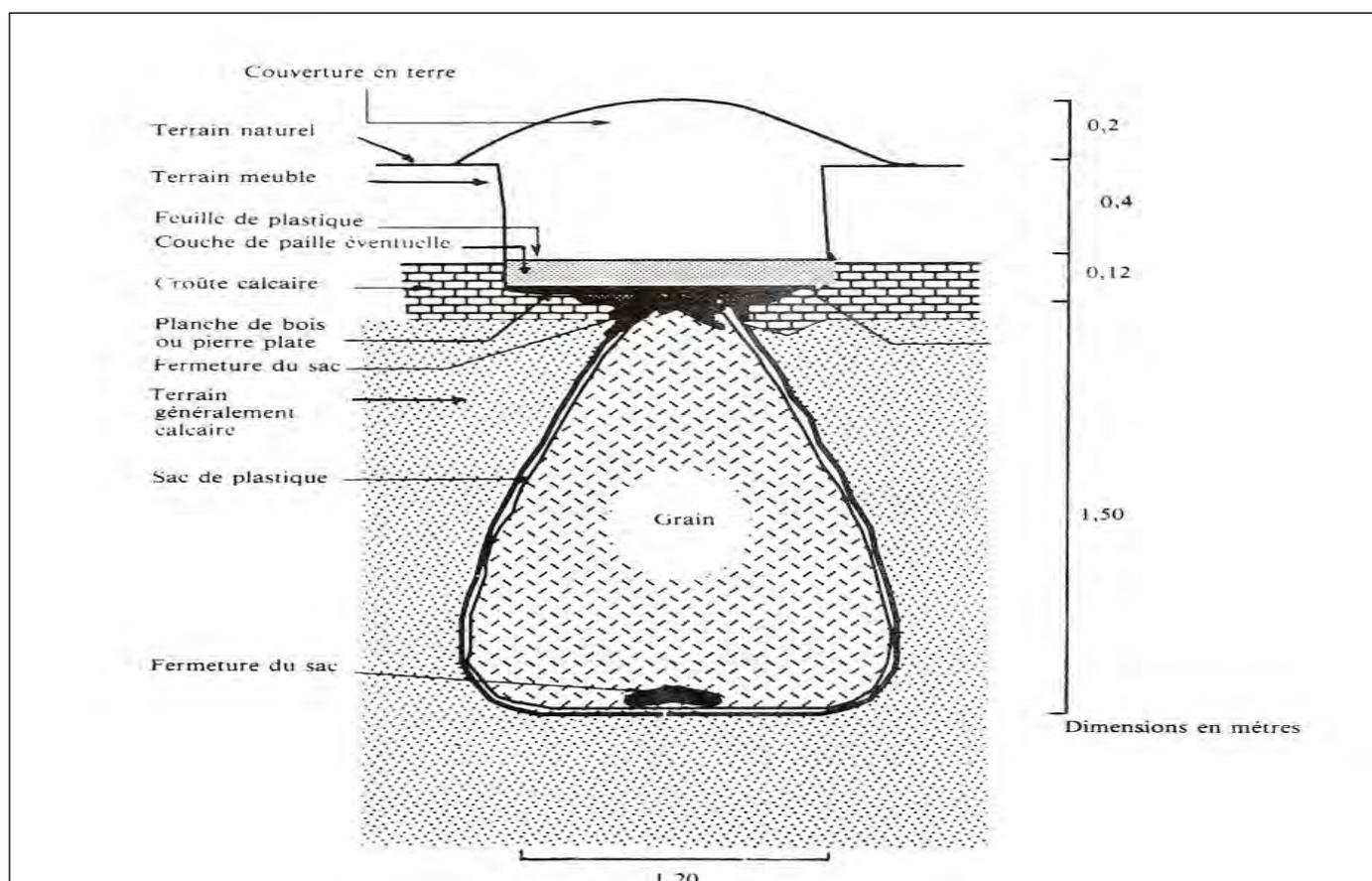
**Figure 17.** Constructions des MATMOURS au Maroc (Bartali, 1989)

Tableau 06. Association entre les bactéries lactiques (BL) et d'autres micro-organismes dans les aliments fermentés de l'Afrique de l'Ouest (Yao *et al.*, 2009)

Nom du produit	Micro-organismes
Banku	BL, levures, moisissures
Ogi-baba Ogi	BL, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida krusei</i> BL, <i>Corynebacterium</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Candida mycoderma</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhodoturula</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>
Kunun-zaki	BL, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Gowé	BL, <i>Kluyveromyces marxianus</i> et <i>Pichia anomala</i>
Obiolor	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bacillus</i> spp, levures

Tableau 07. Bactéries lactiques isolées au cours de la fermentation d'aliments à base de céréales (Yao *et al.*, 2009)

Nom du produit	Bactéries lactiques
Kenkey	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Ogi-baba Ogi	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus raffinolactis</i> , <i>Pediococcus sp</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus suebicus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Mawè	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Ben-saalga	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Koko	<i>Weissella confusa</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i>
Gowé	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Lactobacillus mucosae</i>

Matériel et Méthodes

L'étude expérimentale est réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A ; Université Mentouri-Constantine) pour l'étude physico-chimique et une partie de l'étude microbiologique durant la période de Février à Juin 2012 et au niveau du laboratoire d'hygiène de la commune de Sedrata (Wilaya de Souk-Ahras) pour l'autre partie de l'étude microbiologique et l'étude enzymatique de Juillet jusqu'au mois d'octobre 2012. Notre travail se résumera en trois volets :

- Une étude de la composition biochimique dans l'échantillon de blé fermenté sans vinaigre (BFSV) et dans l'échantillon de blé fermenté avec vinaigre (BFV), afin de détecter les modifications de la composition biochimique après la fermentation ;
- Une étude microbiologique qui consiste à évaluer la flore dans les échantillons cités ci-dessus ;
- Et une mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires de la flore présente.

Matériel et Méthodes

1. Présentation des échantillons

Les échantillons de blé dur fermentés ont pour origine le blé dur de la variété Waha qui provient de la CCLS de Sétif. Deux types de fermentation (avec et sans vinaigre) ont été réalisés antérieurement par une tierce personne selon le protocole suivant : Deux fûts de capacité de 10 L ont été utilisés. Dans chaque fût, 6 kg de blé dur ont été ajoutés. Pour la fermentation du blé dur sans vinaigre (BFSV), 300 ml d'eau stériles sont utilisées et pour la fermentation du blé dur avec du vinaigre (BFV), 150 ml de vinaigre à 5 % et 150 ml d'eau stériles sont utilisées. Après homogénéisation, le pH mesuré est égal à $7,10 \pm 0,10$ à $24,1^{\circ}\text{C}$ (BFSV) et $6,90 \pm 0,02$ à $31,5^{\circ}\text{C}$ (BFV). Les fûts sont scellés et stockés dans une enceinte close à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Après 15 mois de fermentation, l'ouverture des fûts est réalisée dans le laboratoire de microbiologie dans des conditions stériles.

1.1. L'échantillon de blé fermenté sans vinaigre (BFSV) possède un pH égal à $5,93 \pm 0,01$ (24°C), les grains sont brillants, humides, gonflés, de couleur marron foncée, certains sont noirs et donnant une odeur caractéristique (Figure 18).

1.2. L'échantillon de blé fermenté avec vinaigre (BFV) est à pH égal à $5,80 \pm 0,06$ (24°C), les grains sont humides, gonflés, de couleur jaune dorée et donnant une odeur particulière (Figure 18).



Figure 18. Grains de blé fermentés dans les fûts, sans le vinaigre (BFSV_a) et avec le vinaigre (BFV_a) et observés à la loupe binoculaire (x 2) (BFSV_b et BFV_b)

2. Etude physico-chimique

La détermination de la composition biochimique du blé dur fermenté a nécessité différentes techniques d'analyses physico-chimiques. Ces derniers ont pour but la connaissance des changements de la composition. Les constituants sont obtenus selon les normes d'AFNOR (1991) et concernent : l'humidité, les cendres totales, l'azote total, les lipides totaux, les acides gras et l'amidon. Ces dosages sont complétés par les calculs de la teneur en protéines totales et en glucides totaux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la matière humide puis convertis en pourcentage de la matière sèche en multipliant les valeurs humides obtenues par $100 / (100 - H)$. Pour chaque analyse, il faut réaliser trois essais. Les moyennes et les écarts types sont calculés par l'Excel (Microsoft office Excel 2007).

2.1. Teneur en eau

La détermination de la teneur en eau dans nos échantillons a pour but la détermination du changement de sa teneur qui par la suite est considérée comme un indicateur de développement microbien et de transformations (Coord, 1999). Cette détermination est effectuée selon la norme NF V03-707.

Principe : Il consiste en un séchage de 5grs d'échantillon dans une étuve de marque MEMMERT model 700 à une température de 130°C jusqu'à obtention d'une masse constante. La perte de masse observée est équivalente à la quantité d'eau présente dans l'échantillon.

Expression des résultats : L'humidité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau} = \frac{(M_0 - M_1) \times 100}{M_0}$$

M_0 : Masse en grs de la prise d'essai avant séchage

M_1 : Masse en grs de la prise d'essai après séchage

2.2. Cendres totales

Cette détermination est indispensable, et a pour but de constater le changement de la teneur en minéraux dans les échantillons de blé fermentés. Car l'utilisation de la matière minérale est un indicateur de croissance microbienne et d'activités enzymatiques, puisque tous les microorganismes ont besoin de plusieurs micronutriments (minéraux) qui sont des éléments nécessaires à leurs développements et à l'activité de plusieurs enzymes (Dupin *et al.*, 1992 ; Prescott *et al.*, 2010). La teneur en matière minérale est déterminée selon la norme NF V03-720.

Principe : La matière minérale est obtenue après incinération de 5grs d'échantillon dans un four à moufle de marque HERAUS M110 réglé à $900 \pm 25^\circ\text{C}$.

Expression des résultats : Le pourcentage de cendres par rapport à la matière humide est calculé par la relation suivante :

$$\text{Taux de cendres} = \frac{M_1 \times 100}{M_0}$$

M_0 : Prise d'essai en grs

M_1 : Masse des cendres en grs

2.3. Protéines totales

La détermination de la teneur en protéines totales a pour but de déceler la dégradation des protéines du blé fermenté soit par les protéases propres du grain ou bien par les protéases d'origine microbienne (Cichoke, 1999 ; Roberts *et al.*, 2000).

Principe : La teneur en protéines totales est approchée, par la détermination de la teneur en azote total selon la méthode de KJELDAHL (NF V03-050), en multipliant la valeur obtenue par le coefficient de conversion (5,70) spécifique aux céréales (Godon, 1991).

La méthode repose sur :

- **La minéralisation** : Une prise d'essai de 2grs d'échantillon est minéralisée par voie humide, en présence d'acide sulfurique (96 %, d = 1,83) (Annexe 01) et de catalyseurs minéraux (sélénium en poudre pur). Dans ces conditions opératoires, l'acide sulfurique oxydant minéralise les éléments chimiques de la matière organique : C, H, N, O, P, S en CO₂, H₂O, phosphates, oxyde de soufre, tandis que l'azote organique est réduit en ammoniac, fixé sous forme de sulfate d'ammonium ;
- **La distillation** : Après dilution du liquide de minéralisation avec de l'eau distillée, il faut ajouter un excès d'hydroxyde de sodium (40 %) (Annexe 01) ; l'acide sulfurique est neutralisé. Au cours de la distillation, les molécules d'ammoniacs libérées sont entraînées par la vapeur et fixées dans une solution de volume connu d'acide borique (4 %) (Annexe 01) ;
- **La titration**: Nous avons procédé à la titration du distillat récupéré en utilisant de l'acide sulfurique à 0,01 N.

Expression des résultats : La teneur en azote total est exprimée en pourcentage par rapport à la matière humide :

$$\text{Teneur en azote} = \frac{100 \times D \times 14 \times V \times N}{1000 \times P_e}$$

D : Coefficient de dilution de l'échantillon

V : Volume en ml de l'acide sulfurique

N : Normalité de l'acide titrant

14 : Masse en grs d'un atome d'azote

P_e : Masse en grs de la prise d'essai

2.4. Lipides totaux : Elle a pour objectif d'évaluer la dégradation de la matière grasse du blé fermenté (Feillet, 2000 ; Carver, 2009). Cette détermination est réalisée selon la norme NF V03-713.

Principe : Cette méthode repose sur :

- L'hydrolyse d'un échantillon de 8 grs par de l'acide chlorhydrique (37,5 %) (Annexe 01) qu'on dilue en une proportion de 7/3 : acide/eau. L'opération se fait en présence d'éthanol et d'acide formique (80 %, d = 1,18) (Annexe 01). Les lipides liés aux protéines et aux glucides sont ainsi libérés. Le formate d'éthyle qui se forme est lui-même solvant des lipides ;
- L'extraction de la matière libérée par de l'hexane (Annexe 01) ;
- L'élimination de l'hexane avec un évaporateur rotatif type ROTAVAPOR RV 05-ST et séchage du résidu à 60°C jusqu'à poids constant.

Expression des résultats : La teneur en lipides totaux est exprimée en pourcentage par rapport à la matière humide :

$$\text{Teneur en lipides totaux} = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$

P_0 : Masse de la prise d'essai en grs

P_1 : Masse du résidu lipidique

2.5. Teneur en acides gras

Cette détermination consiste à mettre en évidence l'hydrolyse et /ou l'oxydation des lipides du blé fermenté (Feillet, 2000 ; Guiraud, 2003). La détermination de la teneur en acide gras est effectuée selon la norme NF ISO7305.

Principe : Cette méthode repose sur :

- La centrifugation pendant 5 min à 2000 tours/min de 5 grs d'échantillon dans de l'éthanol à 95 % (v/v) ;
- L'homogénéisation de 20 ml de surnageant dans 5 gouttes de la phénolphthaléine (solution à 1g pour 100 ml d'éthanol à 95 %) ;
- Le titrage par de l'hydroxyde de sodium (solution titrée à 0,05 mol/l dans l'éthanol à 95 %) jusqu'au virage au rose pâle persistant quelques secondes. Un essai à blanc parallèlement à la détermination est effectué en remplaçant les 20 ml de liquide surnageant par 20 ml d'éthanol.

Expression des résultats : La teneur en acides gras est exprimée en pourcentage par rapport à la matière humide :

$$\text{Acides gras} = \frac{7,35 (V_1 - V_0) \times T}{M_0}$$

V_1 : Volume en ml de la solution d'hydroxyde de sodium

V_0 : Volume en ml de la solution d'hydroxyde de sodium pour l'essai à blanc

M_0 : Masse en grs de la prise d'essai

T : Concentration de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée

7,35: Facteur de correction

2.6. Teneur en Amidon

La détermination de la teneur en amidon a comme fin de savoir la dégradation de l'amidon du blé fermenté soit par les enzymes du grain soit par les enzymes d'origine microbienne. Ce constituant est dosé selon la méthode citée par la FAO (1986 a).

Principe : cette méthode repose sur la solubilisation des protéines et autres composants azotés, lipides et sels dans une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (Annexe 01) (solution à 8% dans l'éthanol à 95 %). Les lipides sont saponifiés et les protéines hydrolysées. Les pigments, la cellulose et l'amidon resteront comme sédiments. Ainsi, l'amidon dissous dans la solution d'acide chlorhydrique (37,5 %) puis reprecipité avec de l'éthanol. Enfin nous avons procédé à la détermination de sa teneur par gravimétrie. La prise d'essai prélevée est de 10 grs.

Expression des résultats : l'amidon est exprimé en pourcentage par rapport à la matière humide :

$$\text{Teneur en amidon} = \frac{(2)(A - B)(100)}{S}$$

A : Masse du papier filtre en grs + le contenu après séchage

B : Masse du papier filtre en grs séché

S : Masse de l'échantillon en grs

2 : Facteur de correction

2.7. Glucides totaux

La méthode utilisée relève du système classique de l'analyse immédiate. Les glucides totaux sont évalués par la somme des teneurs des constituants suivants : Eau, cendres, protéines totales et lipides totaux, soustraite du total. Les résultats ne donnent qu'une estimation approchée de la quantité totale de glucides présents dans un aliment.

$$\text{Glucides totaux} = 100 - (\text{humidité} + \text{protéines} + \text{lipides} + \text{cendres})$$

3. Etude microbiologique

Cette étude a pour objectif d'évaluer la flore microbienne dans les échantillons de blé fermentés et de déceler la flore dominante. Nous avons pris comme référence, un échantillon de blé non fermenté (BNF) pour le dénombrement de la flore totale. Les quantités insuffisantes en blé non fermenté ne nous ont malheureusement pas permis de rechercher les moisissures, les levures et la flore lactique. Nous avons réalisé une série de deux pour chaque essai. Les isolats obtenus sont répertoriés avec un code composé de lettres et de numéros.

3.1. Flore totale aérobie mésophile (FTAM) : Le but de dénombrement de cette flore est de pouvoir comparer la charge microbienne de l'échantillon fermenté avec l'échantillon non fermenté.

Préparation des solutions mères et des dilutions décimales : Pour préparer la solution mère, 10 grs d'échantillon sont mélangé à 90 ml d'eau peptonnée tamponnée (Annexe 01). A partir de chaque solution mère, nous avons réalisé une série de dilutions décimales jusqu'à la dilution 10^{-5} (Guiraud, 2003 ; Orole et Adejumo, 2011).

Dénombrement : Nous avons prélevé 1ml de chaque solution mère et de chaque dilution décimale et réalisé un ensemencement en profondeur dans une boîte de Pétri avec utilisation du milieu gélosé PCA (Annexes 01 et 02). L'incubation est effectuée à une température de 30°C pendant 72 h (Guiraud, 2003). La charge microbienne obtenue est prise en compte uniquement sur un intervalle compris entre 30 à 300 au maximum (Godon et Loisel, 1997).

Le nombre de colonies par souches est évalué en UFC (unité formant colonie) par grs d'échantillon selon la formule suivante (Guiraud, 2003) :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) \times d}$$

N : Nombre d'UFC par grs de produit initial

$\sum c$: Nombre de colonies comptées par boîte de Pétri

n_1, n_2 : Nombre de boîtes de Pétri

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus

3.2. Moisissures

Dénombrement et isolement : Pour l'isolement des moisissures, nous avons utilisé la méthode directe. Il est préférable d'utiliser cette méthode pour la détection, l'énumération et l'isolement des moisissures. Dans cette technique, les grains sont placés directement sur le milieu gélosé (Pitt et Hocking, 2009). Après homogénéisation des grains à l'aide d'une spatule stérile, nous avons pris grain par grain à l'aide d'une pince désinfectée à l'alcool et flambée pour les placer sur la surface des boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé PDA (Annexe 02), 10 grains sont placés par boîte de Pétri. L'incubation est réalisée durant 7 jours à 25°C (Bensassi *et al.*, 2011). La purification des isolats est effectuée selon la méthode citée par Botton *et al.* (1985). Nous avons prélevé sous la loupe binoculaire une petite bouture mycélienne sur le thalle et la repiquer au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé PDA. Pour obtenir un développement typique, l'inoculation est réalisée en un seul point. L'incubation s'effectue à 25°C durant 7 jours. Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant (Guiraud, 2003). Les isolats ainsi purifiés sont conservés dans leur milieu d'origine dans des tube à essai à la

température de 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Botton *et al.*, 1990).

Identification des isolats : L'identification des souches de moisissures est réalisée selon les clefs de détermination des auteurs suivants : Botton *et al.* (1985) ; Leyral et Vierling (2007) ; Pit et Hocking (2009).

Caractères culturels : Ces caractères sont étudiés sur les isolats purifiés. L'examen des boîtes de Pétri s'effectue à l'œil nu. La détermination des caractères macroscopiques des moisissures fait appel aux caractères suivants : La texture et la couleur du mycélium aérien, la vitesse de croissance, la couleur du revers de la culture, la présence ou l'absence d'exsudation et de pigmentation de chaque isolat.

Caractères morphologiques : Le matériel fongique est observé dans tous les cas en milieu liquide entre lame et lamelle. Une petite culture est prélevée à l'aide d'une aiguille stérile, et placée sur une lame contenant une goutte de la solution aqueuse de lactophénol (Annexe 02) recouverte d'une lamelle pour une observation sous microscope (Objectif X 40). L'observation consiste à mettre en évidence la structure du thalle, la disposition des organes sporifères (Branger *et al.*, 2007).

3.3. Levures

Dénombrement et isolement

La technique utilisée pour le dénombrement est la même que celle citée pour le dénombrement totale. Nous avons utilisés de dilutions décimales allant jusqu'à la dilution 10^{-3} .

L'isolement des levures, en vue de leurs identifications demande l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et si c'est possible anti-moisissures. 0,1 ml de chaque solution mère et de chaque dilution décimale est ensemencé sur la surface de la gélose OGA (Annexes 01 et 02) supplémenté avec de la gentamycine (0,004 grs/l). Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C durant 72 h (Druefors et Schnürer, 2004 ; Pitt et Hocking, 2009). Ensuite, nous avons purifié les isolats sur le même milieu. Chaque isolat a subi une coloration au bleu de méthylène (Annexe 01) et observé au microscope (Objectif x 40). Les souches obtenues sont conservées dans leur milieu d'origine dans des tubes à essai à la température de 4°C (Ul-Haq *et al.*, 2002 ; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

Caractérisation des isolats : La caractérisation des souches de levures est réalisée selon les clefs de détermination des auteurs suivants : Beuchat (1987) ; Harrigan (1998) ; Higgins et Cregg (1998) ; Osiewacz (2002) ; Guilliermond (2003) ; Kavanagh (2005).

Caractères culturels : Des observations à l'œil nu sur l'aspect, la surface ainsi que la couleur des colonies purifiées sont notées.

Caractères morphologiques cellulaires : Cette étude microscopique permet de définir la forme et le mode de division des cellules.

3.4. Bactéries lactiques

Notre étude est fondée sur la recherche des bactéries lactiques et non sur un autre type bactérien car ces bactéries sont le groupe de microorganismes le plus important impliqué dans les fermentations naturelles des aliments (Kalui *et al.*, 2010). La technique utilisée pour le dénombrement est la même que celle citée pour le dénombrement totale. Nous avons utilisés de dilutions décimales allant jusqu'à la dilution 10^{-5} .

Dénombrement et isolement

Coques lactiques : Pour le dénombrement et l'isolement des coques lactiques, 0,1 ml de chaque solution mère et de chaque dilution décimale estensemencé sur la surface du milieu gélosé M17 (Annexe 01). L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24h (Guiraud, 2003).

Lactobacilles : Selon Chen *et al.* (2010), le milieu MRS (Annexe 01) n'est pas sélectif pour les lactobacilles, pour cela le milieu doit être supplémenté avec 1% du CaCO_3 . L'ajout du CaCO_3 (Annexe 01) permet la sélection des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* car elles se caractérisent par un halo clair sur ce milieu sélectif dû à la production d'un grand nombre d'acides. A partir de chaque solution mère et de chaque dilution décimale, nous avons prélevé 0,1 ml et l'ensemencer sur la surface du milieu cité ci-dessus. L'incubation est effectuée en absence d'oxygène (anaérobiose à la bougie) à 30°C pendant 37 h.

- Le nombre de colonies (coques lactiques et lactobacilles) par souche est évalué en UFC par grs d'échantillon (formule décrite dans 3.1).

- A partir des colonies isolées, nous avons réalisé une observation macroscopique à la loupe binoculaire, les caractères étudiés sont la couleur, l'aspect, le pourtour et le diamètre des colonies. Les isolats sont purifiés et conservés dans les milieux M17 pour les coques lactiques et MRS pour les lactobacilles.

Caractérisation des isolats : La caractérisation des souches de bactéries lactiques est réalisée selon les clefs de détermination des auteurs suivants : Wood et Holzapfel (1995) ; Law (1997) ; Shimeld (1999) ; Hensyl (2000) ; Guiraud (2003) ; McMillan *et al.* (2006) ; Dworkin *et al.* (2006) ; Gayon *et al.* (2006) ; Jr *et al.* (2006) ; Fugelsang et Edwards (2007) ; Hui (2007) ; Pelinescu *et al.* (2009) ; Prescott *et al.* (2010) ; Fuquay *et al.*, (2011) ; Bhandari et Roos (2012) ; Whitman (2012) ; Chandan et Kilara (2013).

Caractérisation morphologique des cellules

Certaines bactéries dont la paroi est imperméable à l'alcool dans les conditions opératoires de la coloration restent colorées en violet. Elles sont Gram positif, d'autres dont la paroi est perméable à l'alcool dans les mêmes conditions sont décolorées, elles sont Gram négatif. Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet, les bactéries à Gram négatif sont coloré en rose. Outre le caractère Gram positif ou Gram négatif, la coloration de Gram renseigne également sur la morphologie bactérienne et sur le mode de groupement des cellules (Perrier *et al.*, 1997).

Caractérisation physiologique et biochimique

Test de la catalase : La plupart des bactéries lactiques sont catalase négative, ce qui les dissocier des autres bactéries. L'enzyme catalase est utilisée pour décomposer le peroxyde d'hydrogène formé au cours de la respiration aérobie (Narang, 2004). L'effervescence, provoquée par la libération d'oxygène sous forme de bulles de gaz indique la présence de la catalase dans la culture à tester.

Test Mannitol-Mobilité : Ce test est considéré comme l'un des critères d'identification des bactéries lactiques car elles sont généralement immobiles (Guiraud, 2003). La mobilité des bactéries lactiques est étudiée sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité (Annexes 01 et 02).

Outre la mobilité, ce milieu faiblement gélosé contient du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de pH permet de déceler la production d'acides organiques (diminution du pH, l'indicateur passe du rouge au jaune) générés par la fermentation du mannitol. La technique consiste à ensemencer le milieu cité ci-dessus maintenu dans des tubes à essai en une seule piqûre centrale. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h.

Les bactéries mobiles se distinguent par l'envahissement de la gélose de part et d'autre de la piqûre d'inoculation alors que les bactéries immobiles se développent que le long de la piqûre d'inoculation (Guiraud, 2003 ; Meyer *et al.* , 2004 ; Denis *et al.*, 2007).

Température, pH et NaCl

L'influence sur la croissance de la température, du pH et de la concentration en NaCl est déterminée sur le bouillon MRS (Annexes 01 et 02) en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. Les températures testées sont : 10°C, 37°C, 40°C, 45°C et 50°C pour les coques lactiques, 15°C et 45°C pour les lactobacilles, les pH testés sont : 4,2, 8,5 et 9,6 et les concentrations en NaCl sont de 4% et de 6,5% (pour les coques lactiques et les lactobacilles).

La croissance aux variations de température, de pH et de concentration en NaCl est confirmée visuellement par le changement de turbidité du bouillon MRS après 24 h d'incubation (Azadnia et Khan Nazer, 2009).

Métabolisme des hydrates de carbones

Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)

Le principe de cette technique consiste à déterminer la capacité des bactéries lactiques (homo ou hétérofermentaires) à dégrader des glucides spécifiques incorporés dans un milieu de culture, avec ou sans production de gaz ainsi avec ou sans production de sulfure d'hydrogène (H₂S). Le milieu utilisé est le milieu gélosé TSI (Annexes 01 et 02). Ce milieu contient trois sucres à tester : Le glucose, le lactose et le saccharose et le rouge de phénol comme indicateur de pH. La technique consiste à ensemencer le milieu cité ci-dessus maintenu dans des tubes à essai de façons semi-incliné en une seule piqûre profonde dans le culot et en stries du même isolat sur la pente du milieu. Les tubes à essai sont incubés à 37°C pendant 24h. Pendant l'incubation, les bactéries lactiques utilisent le glucose, le lactose et le saccharose. Après le temps d'incubation, le glucose est épuisé dans la pente et dans le culot. Les bactéries commencent la dégradation oxydative de la peptone présente dans la pente, ce qui entraîne la production de sous-produits

alcalins, ce qui modifie l'indicateur à une couleur rouge. La fermentation anaérobie du glucose dans le culot produite un grand volume d'acide qui va neutraliser l'alcalinité provoquée par la dégradation de la peptone, d'où la couleur jaune du culot. La présence de bulles dans le culot indique la production de CO₂ durant la fermentation des sucres.

Certaines bactéries produisent l'H₂S qui est détecté dans le milieu comme un précipitât noir qui noircit la pente et le culot du milieu. Le milieu est devenu noir en raison de la combinaison entre l'H₂S et les ions ferriques issus des sels ferriques présents dans le milieu pour former du sulfure ferreux comme un précipitât noir (Parija, 2009).

La fermentation du glucose seulement est détectée par une pente rouge et un culot jaune ; la fermentation du glucose, du lactose et/ ou du saccharose est mise par une pente jaune et un culot jaune. La non fermentation des sucres se distingue par une pente rouge et un culot rouge (catabolisme aérobie des peptones).

Utilisation du citrate

L'utilisation du citrate est un critère d'identification chez les bactéries lactiques. Il est basé sur leurs capacités à utiliser le citrate comme seule source de carbone. Le milieu Citrate de Simmons (Annexes 01 et 02) contenant du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol est utilisé pour ce test. La technique consiste à ensemercer en strie les isolats sur la pente du milieu cité ci-dessus maintenu dans des tubes à essai de façon incliné. Les tubes à essai sont incubés à 37°C pendant 24h (Guiraud, 2003).

Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et le plus souvent cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui traduit par un virage au bleu de l'indicateur (Denis *et al.*, 2007).

4. Etude enzymatique

Cette étude est effectuée avec l'utilisation des techniques microbiologiques sur les isolats (moisissures, levures et bactéries lactiques) obtenus à partir des échantillons BFSV et BFV. Elle consiste à évaluer la présence ou l'absence d'enzymes (amylases, protéases et lipases). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux ces enzymes en raison de la richesse du blé en amidon, de la présence d'enzymes protéolytiques chez les bactéries lactiques ainsi que la dégradation éventuelle des lipides des grains de céréales au cours du stockage (Feillet, 2000 ; Spencer et Ragout de Spencer, 2001).

4.1. Enzymes des isolats de moisissures

Mise en évidence de l'activité amylolytique

Il s'agit d'une mise en évidence de la dégradation de l'amidon contenu dans le milieu PDA à 0,5% d'amidon (Annexe 02). Ce dernier estensemencé avec les isolats à tester et incubé à 29°C pendant 7 jours (Nwagu et Okolo, 2011). Après incubation, les boîtes de Pétri sont inondées avec la solution de lugol qui colore spécifiquement l'amidon non dégradé en bleu-violet.

Les souches à halo clair sur le pourtour (dégradation de l'amidon) sont considérées comme productrices d'amylase. Le diamètre des zones de lyse est mesuré (Perrier *et al.*, 1997 ; Prat, 2007).

Mise en évidence de l'activité protéolytique

Elle est réalisée sur la gélatine à 2% dans l'H₂O (Annexe 02). Ce milieu est inoculé par les isolats à tester. Après incubation à 28°C pendant 24 h et refroidissement de 4 h, la présence d'activité protéolytique se traduit par une liquéfaction du milieu.

Cette activité est évaluée par:

- La liquéfaction complète de la gélatine, justifiant une forte production de protéases ;
- L'absence totale de liquéfaction du milieu, justifiant la non production de protéases ;
- La liquéfaction partielle du milieu, justifiant une faible production de protéases (El-Kady *et al.*, 1984).

Mise en évidence de l'activité lipolytique

La recherche d'enzymes lipolytiques est effectuée en utilisant un milieu synthétique contenant le Tween 80 (Annexe 02). Après ensemencement et incubation à 25°C pendant 7 jours, la présence d'enzymes lipolytiques se distingue par la formation d'un précipitât autour des colonies en raison de la dégradation du sel de l'acide gras qui constitue le Tween 80 (Tehreema *et al.*, 2011). Après un intervalle régulier de 24h d'incubation, les boîtes de Pétri sont examinées afin d'évaluer cette activité.

4.2. Enzymes des isolats de levures

Mise en évidence de l'activité amylolytique : C'est la dégradation de l'amidon contenu dans le milieu PDA à 1% d'amidon (Annexe 02). Ce dernier estensemencé avec les isolats à tester. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 72h (Juszczuk *et al.*, 2005). Après le temps d'incubation, les boîtes de Pétri sont inondées avec la solution de lugol qui colore spécifiquement l'amidon non dégradé en bleu-violet (Perrier *et al.*, 1997 ; Prat, 2007).

Les souches à halo clair sur le pourtour (dégradation de l'amidon) sont considérées comme productrices d'amylase.

Le diamètre des zones de lyse est mesuré et interprété comme suit:

- Faible activité : Diamètre inférieur à 2 mm ;
- Activité moyenne : Diamètre entre 2-10 mm ;
- Et forte activité : Diamètre supérieur à 10 mm.

Mise en évidence de l'activité protéolytique : La technique consiste à cultiver à 28°C pendant 5 jours les souches levuriennes sur un milieu riche en protéines (gélose au lait écrémé) (Annexe 02). Après le temps d'incubation, la présence d'halo clair autour des colonies traduit une dégradation des caséines du milieu et donc une présence d'enzymes protéolytiques (Juszczuk *et al.*, 2005). Le diamètre des zones de lyse est mesuré et interprété comme suit :

- Faible activité : Diamètre inférieur à 2 mm ;
- Activité moyenne : Diamètre entre 2-10 mm ;
- Et forte activité : Diamètre supérieur à 10 mm.

Mise en évidence de l'activité lipolytique : Les mêmes étapes décrites pour la détermination de l'activité lipolytique des isolats de moisissures sont respectées pour les souches levuriennes. Le diamètre des zones de lyse est mesuré et interprété comme suit :

- Faible activité : Diamètre inférieur à 2 mm ;
- Activité moyenne : Diamètre entre 2-10 mm ;
- Et forte activité : Diamètre supérieur à 10 mm.

4.3. Enzymes des isolats de bactéries lactiques

Mise en évidence de l'activité amylolytique

Le principe est le même cité pour la recherche d'enzymes amylolytiques des isolats de moisissures mais la culture des souches lactiques est effectuée à 30°C pendant 4 jours sur le milieu gélose à l'amidon (Annexe 02).

La présence de zones claires autour des colonies (dégradation de l'amidon) indique une réaction positive pour l'hydrolyse de l'amidon (Thapa *et al.*, 2006). Le diamètre des zones de lyse est mesuré.

Mise en évidence de l'activité protéolytique : Est la même citée pour la recherche d'enzymes protéolytiques des isolats de levures avec le même milieu synthétique sauf que l'incubation des souches lactiques est effectuée à 30°C pendant 7 jours.

L'apparition de zones claires d'hydrolyse autour des colonies bactériennes indique la présence d'activité protéolytique. Ainsi les diamètres des zones d'hydrolyses sont mesurés et interprétés comme suit:

- Un diamètre entre 0,1-0,6 cm autour de la colonie bactérienne signifie une faible activité protéolytique ;
- Un diamètre entre 0,7-1 cm autour de la colonie bactérienne indique une activité protéolytique moyenne ;
- Un diamètre supérieur à 1 cm autour de la colonie bactérienne indique une activité protéolytique performante.

Mise en évidence de l'activité lipolytique

Le principe de la mise en évidence de cette activité est la même citée pour la recherche d'enzymes lipolytiques des isolats de moisissures mais la technique consiste à cultiver les isolats lactiques à 30°C pendant 3 jours sur le milieu synthétique (Annexe 02).

Une lecture positive est traduite par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de lipases (Sierra, 1957).

Résultats

1. Composition biochimique des deux échantillons de blés (BFSVet BFV)

Les échantillons de blé fermentés récupérés directement des fûts sont très humides. Après le séchage, le **taux d'humidité** a diminué considérablement dans les deux échantillons pour atteindre les valeurs de $12,99 \% \pm 0,05$ (BFSV) et de $10,07 \% \pm 0,02$ (BFV). D'après les références citées dans le Tableau 08, l'humidité d'un blé non fermenté et sec est comprise entre 10 et 15 %. Selon ces données nos échantillons de blé fermentés utilisés après la phase du séchage représentent un bon produit pour la mouture.

Nos échantillons de blé fermentés présentent des teneurs en **cendres** de $1,64 \% \pm 0,12$ (BFSV) et de $1,78 \% \pm 0,11$ (BFV). Nos résultats sont inférieurs à l'intervalle des valeurs relatives au blé non fermenté (Tableau 08).

Les **protéines** dans nos échantillons varient de $09,88 \% \pm 0,20$ (BFSV) à $10,10 \% \pm 0,01$ (BFV). Nos résultats sont situés dans l'intervalle des valeurs du blé non fermenté, décrit par les références citées dans le Tableau 08.

L'analyse des **lipides** dans nos échantillons montre des teneurs de $03,74 \% \pm 0,01$ (BFSV) et de $04,22 \% \pm 0,01$ (BFV). Ces valeurs sont largement supérieures, à celles obtenues dans le blé non fermenté et citées par les auteurs (Tableau 08).

Les teneurs en **acides gras libres** (BFSV : $0,36 \% \pm 0,03$; BFV : $0,25\% \pm 0,03$), dans les échantillons sont élevées par rapport aux valeurs concernant le blé non fermenté (Tableau 08). Selon Feillet. (2000), La teneur en acides gras ne doit pas dépasser 0,05%.

Les résultats du dosage de l'**amidon** dans nos échantillons montrent des teneurs de $33,14 \% \pm 2,20$ (BFSV) et de $28,39 \% \pm 1,43$ (BFV). Selon les différents auteurs (Tableau 08), le pourcentage de l'amidon d'un blé non fermenté varie de 59 à 75,6 %, Si nous comparons nos résultats à ces valeurs, nous constatons que les teneurs en amidon dans nos deux échantillons sont très basses.

Les résultats obtenus des fractions **glucidiques** totales (glucides simples, amidon et fibres) dans l'échantillon BFSV montrent une valeur de $84,36 \% \pm 0,01$, et dans l'échantillon BFV une valeur de $83,63 \% \pm 0,01$. Les glucides présentent 60-80 % de la matière sèche du blé non fermenté (Dunford, 2012). Nos résultats sont largement au dessus des valeurs destinées au blé non fermenté (Tableau 08).

Tableau 08. Tableau récapitulatif de tous les résultats physico-chimiques obtenus en comparaison avec les références et exprimés en % de la matière sèche (M.S)

Composition	BFSV	BFV	Références
Humidité	12,99 ± 0,05	10,07 ± 0,02	Nd ¹ , 15 ² , 10-15 ³
Cendres	1,64 ± 0,12	1,78 % ± 0,11	1,80-2,20 ¹ , 1,90 ² , Nd ³
Protéines totales	09,88 ± 0,20	10,10 ± 0,01	09-18 ¹ , 10-15 ² , 14,5 ³
Lipides totaux	03,74 ± 0,01	04,22 ± 0,01	1,8-2,5 ¹ , 2,7 ² , 2 ³
Acides gras	0,36 ± 0,03	0,25 ± 0,03	Nd ¹ , 0,05 ² , Nd ³
Amidon	33,14 ± 2,20	28,39 ± 1,43	59-75 ¹ , 68,9 ² , 75,6 ³
Glucides	84,36 ± 0,01	83,63 ± 0,01	Nd ¹ , 79 ² , 79 ³

1 : Jarrige *et al.* (1995) ; 2 : Feillet (2000) ; 3 : Godon (1991) ; Nd : non déterminé.

2. Flore déterminée dans les deux échantillons de blés (BFSV; BFV)

2.1. Flore totale aérobie mésophile

Le dénombrement de cette flore est effectué dans les échantillons BNF, BFSV et BFV. Les résultats obtenus montrent une forte charge microbienne et indénombrable dans les solutions mères et les dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-4}) de chaque échantillon. Par contre dans la dilution décimale 10^{-5} des trois échantillons, le nombre de colonies a pu être dénombré.

Le calcul de l'UFC par grs d'échantillon est effectué à partir de cette dilution décimale. Il est estimé à : $4,50 \cdot 10^6$ (BNF), $1,63 \cdot 10^7$ (BFSV) et $2,36 \cdot 10^7$ (BFV). La charge microbienne est augmentée après la fermentation et elle est élevée dans l'échantillon BFV. Nous avons observé que la charge évolue de la même manière dans les deux échantillons de blé fermentés. L'observation des colonies obtenues à l'œil nu indique la présence de deux morphologies différentes: des colonies et des mycéliums.

2.2. Moisissures

Nous avons isolé 07 souches de moisissures (Figure 19) à partir des échantillons BFSV (M_{SV1} , M_{SV2} , M_{SV3} , M_{SV4} , M_{SV5}) et BFV (M_{V1} et M_{V2}).

Les résultats des caractères macroscopiques et microscopiques des isolats appartenant aux deux échantillons de blé fermentés sont rassemblés dans les Tableaux 09 et 10.

Les isolats obtenus sont rapprochés dans deux genres (Figure 20) : Les isolats M_{SV2} , M_{SV3} , M_{SV4} , M_{SV5} , M_{V1} , M_{V2} , appartiennent au genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1985 ; Pitt et Hocking, 2009). La souche M_{SV1} se rapproche du genre *Mucor* (Botton *et al.*, 1985 ; Leyral et Vierling, 2007 ; Pitt et Hocking, 2009).

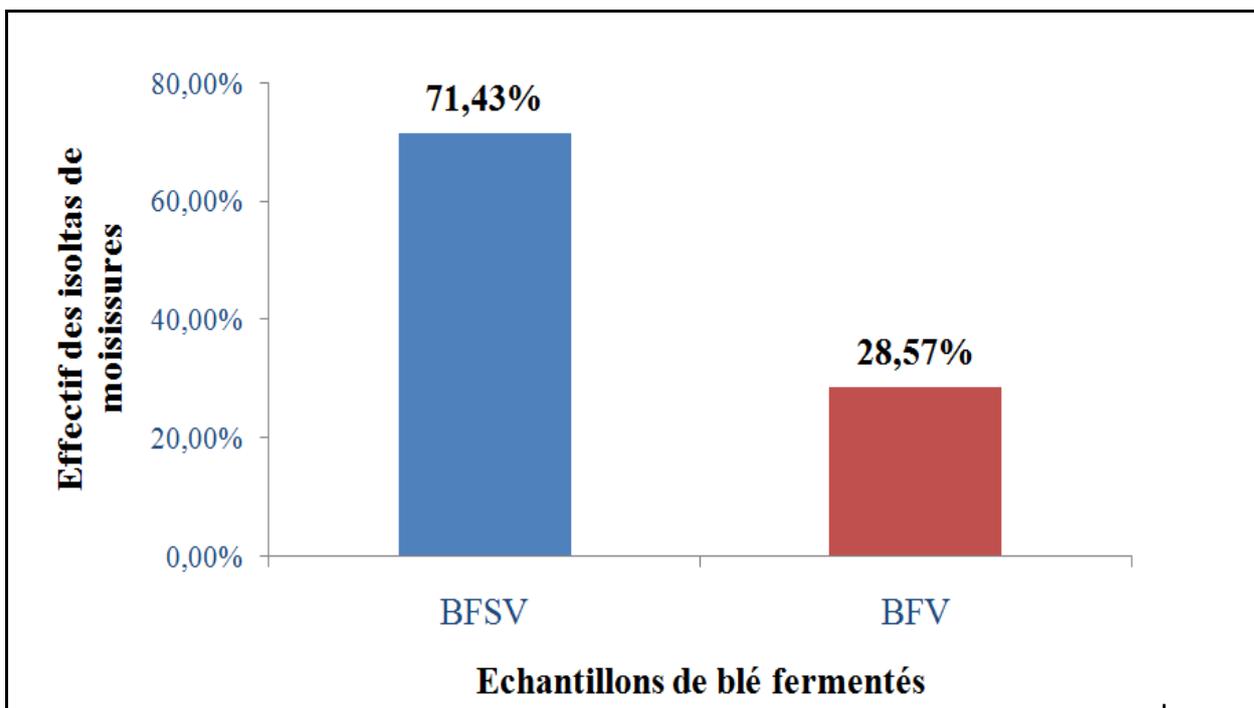


Figure 19. Effectifs des isolats de moisissures

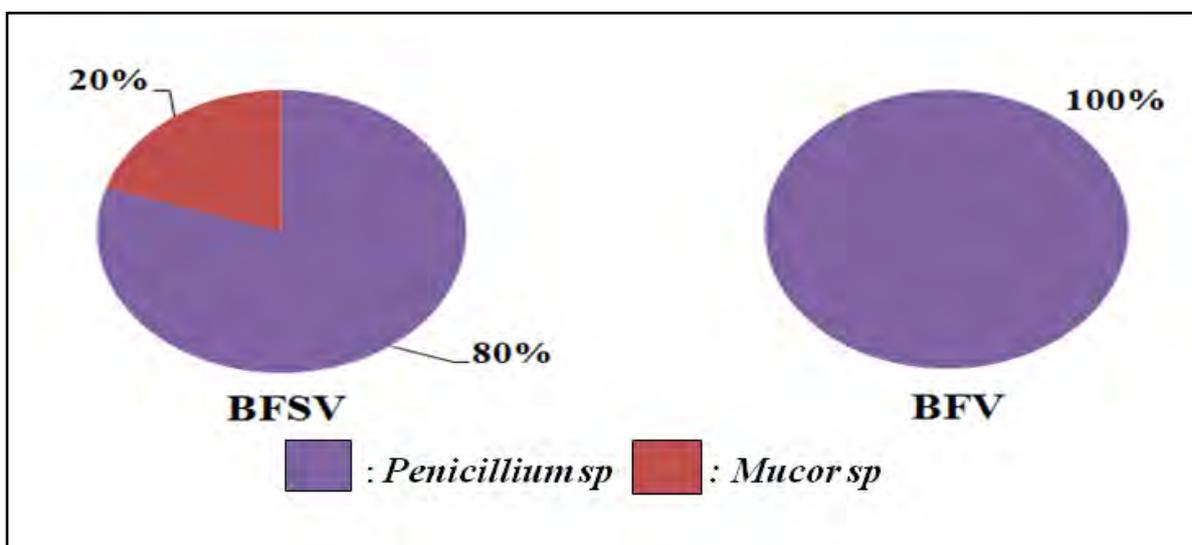
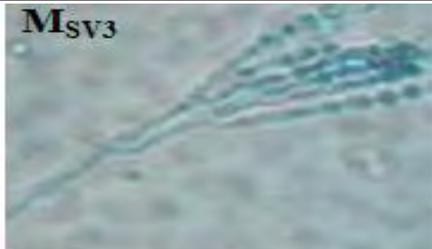
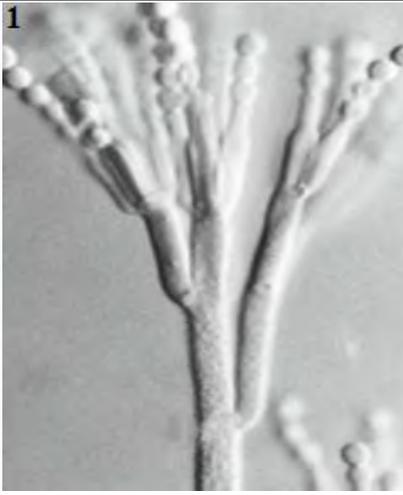
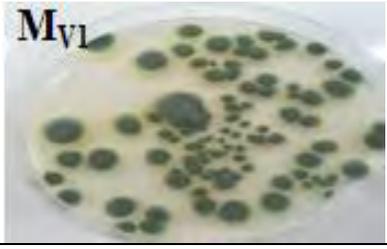
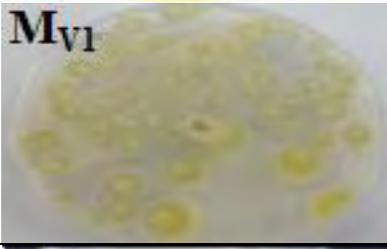
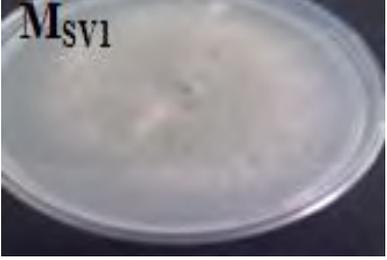
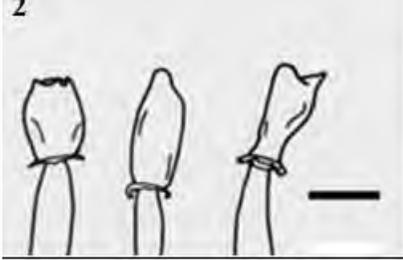


Figure 20. Répartition des souches de moisissures

Tableau 09. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de moisissures

Codes d'isolats	Caractères macroscopiques					Caractères microscopiques	Identifications des genres
	Echantillons de blé fermentés	Mycéliums aériens	Revers des cultures	Exsudations	Pigmentations		
M _{SV2} M _{SV3} M _{SV4} M _{SV5}	BFSV	Vert, duveteux à croissance lente non homogène (72h)	Jaune	Absence	Présence	Conidiophore biverticillé asymétrique Conidies ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales	<i>Penicillium</i>
M _{V1} M _{V2}	BFV	Vert, duveteux à croissance lente non homogène (72h)	Jaune	Absence	Présence		
M _{SV1}	BFSV	Blanc, cotonneux envahissons à croissance rapide (48h)	Blanc	Absence	Présence	Sporangiophores simples Sporanges hémisphériques	<i>Mucor</i>

Tableau 10. Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de moisissures

Codes d'isolats	Observations macroscopiques		Observations microscopiques	
	Mycéliums aériens	Revers des mycéliums	Observations microscopiques (x 40)	Observations microscopiques de <i>Penicillium</i> (1) et <i>Mucor</i> (2) (1,2 : Pitt et Hocking, 2009)
M _{SV3}				1 
M _{V1}				
M _{SV1}				2 

2.3. Levures

Nous avons isolé uniquement 3 souches de levures (Figure 21) à partir des échantillons BFSV (L_{SV1} et L_{SV2}) et BFV (L_{V1}). Les Tableaux 11 et 12 regroupe les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats obtenus.

Le classement des isolats (Figure 22) est réalisé en se basant sur les caractères cultureux et la morphologie cellulaire. Les caractéristiques présentées par la souche L_{SV1} se rapprochent du genre *Saccharomyces* (Harrigan, 1998 ; Osiewacz, 2002 ; Guilliermond, 2003). La souche L_{SV2} semble appartenir au genre *Candida* (Beuchat, 1987 ; Harrigan, 1998). La souche L_{V1} peut être rapprochée au genre *Pichia* (Harrigan, 1998 ; Higgins et Cregg, 1998 ; Kavanagh, 2005).

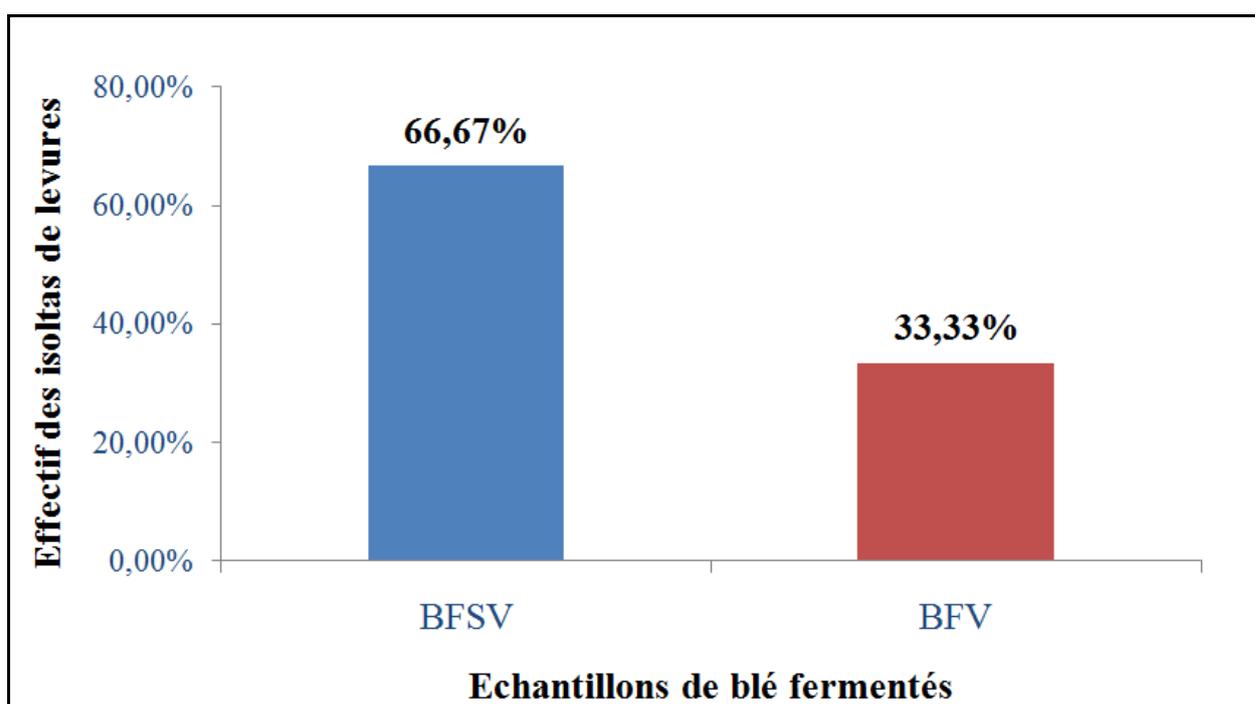


Figure 21. Effectifs des souches levuriennes

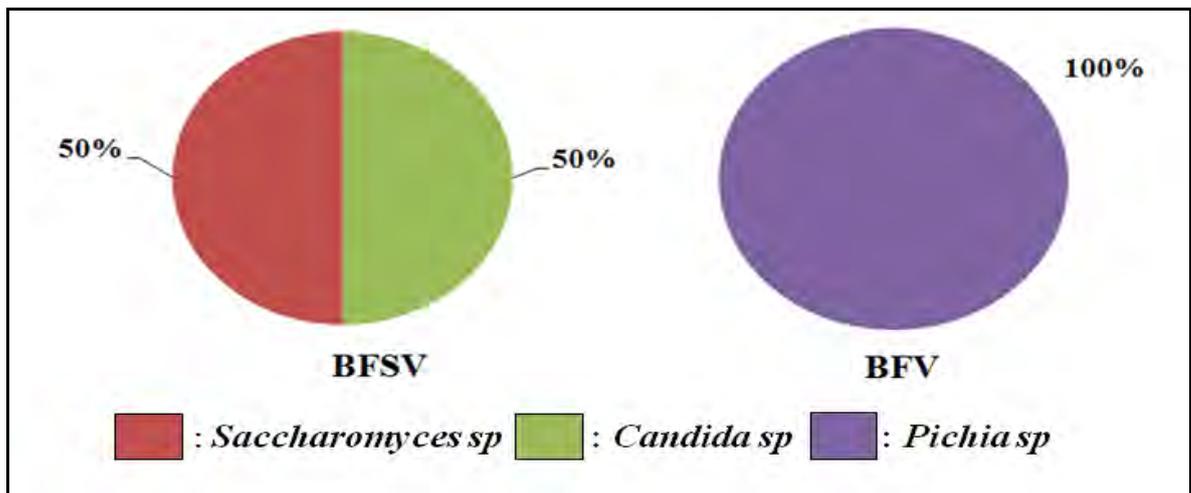
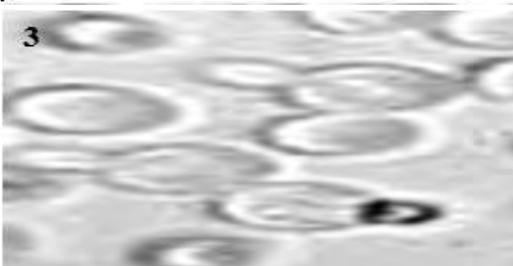


Figure 22. Répartition des souches de levures

Tableau 11. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de levures

Codes d'isolats	Caractères macroscopiques						Caractères microscopiques	Identifications des genres
	Echantillons de blé fermentés	Milieux d'isolements	Dilutions	Aspects	Surfaces	Couleurs		
L _{SV1}	BFSV	OGA	10 ⁰	Lisse	Plate	Crème	Ovoïde avec pseudo mycélium Bourgeoisement multilatéral	<i>Saccharomyces</i>
L _{SV2}	BFSV	OGA	10 ⁻¹	Cireux	Bombée	Blanche Cassée	Thalle cloisonné simple fragmentation du mycélium	<i>Candida</i>
L _{V1}	BFV	OGA	10 ⁰	Plissé	Bombée	Blanche	Sphérique Bourgeoisement Simple	<i>Pichia</i>

Tableau 12. Observations macroscopiques et microscopiques des isolats de levures

Codes d'isolats	Observations macroscopiques	Observations microscopiques (X 40)	Observations microscopiques de <i>Saccharomyces</i> (1) ; <i>Candida</i> (2) ; <i>Pichia</i> (3) (1, 2: Harrigan, 1998; 3: Kavanagh, 2005)
LSV1			
LSV2			
LV1			

2.4. Bactéries lactiques

Le dénombrement de cette flore n'a pu être réalisé qu'à partir de la dilution décimale 10^{-5} ; car dans les solutions mères et les dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-4}) de chaque échantillon, les colonies observées sont très denses et indénombrables. Le calcul de l'UFC par grs d'échantillon est réalisé à partir de la dilution décimale 10^{-5} (Tableau 13).

Nous avons isolé 40 souches (Tableau 14 et Figure 23) à partir des deux échantillons (BFSV : 19 isolats et BFV : 21 isolats).

Les caractères macroscopiques des différents isolats ont permis de définir quatre structures de colonies : lisse, en cratère granuleux, en cratère et lisse avec halo clair sur le pourtour (Tableau 15)

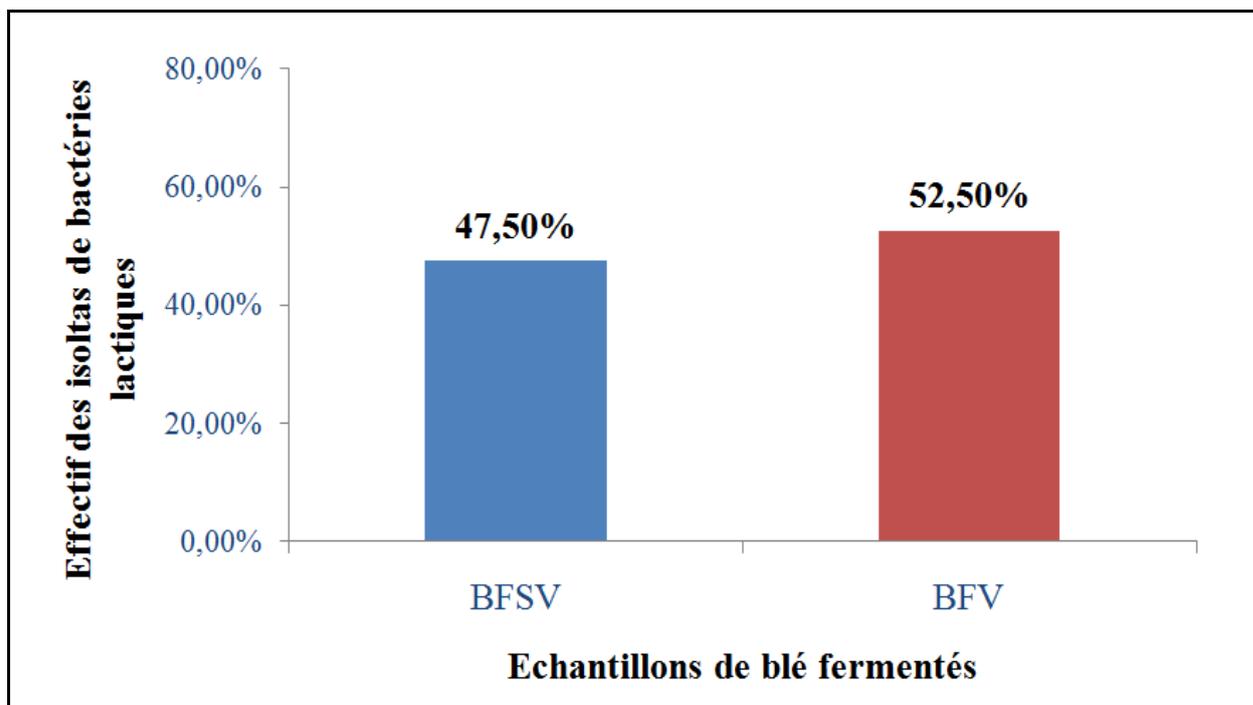
L'observation microscopique des 40 isolats a permis de définir le Gram, la forme et le mode de groupement des cellules. Tous les isolats sont Gram positif avec deux morphologies différentes : des coques groupées en chaînes, en paires, en tétrades et des bacilles (longues et courtes) groupés en paires et en chaînes (Tableau 16). La répartition de ces deux formes dans les deux échantillons de blé fermentés est présentée dans la Figure 24.

Tableau 13. Dénombrement de la flore lactique en UFC/grs dans les échantillons de blé fermentés

Milieux de culture	BFSV	BFV
M17	$1,18 \cdot 10^7$	$2,25 \cdot 10^7$
MRS à 1% CaCO ₃	$3,4 \cdot 10^6$	$8,6 \cdot 10^6$

Tableau 14. Répartition des isolats lactiques par origine et par milieu de culture utilisé

	BFSV	BFV
M17	BL _{SV1} , BL _{SV2} , BL _{SV3} , BL _{SV4} , BL _{SV5} , BL _{SV6} , BL _{SV7} , BL _{SV8} , BL _{SV9} , BL _{SV10} , BL _{SV11} , BL _{SV12}	BL _{V1} , BL _{V2} , BL _{V3} , BL _{V4} , BL _{V5} , BL _{V6} , BL _{V7} , BL _{V8} , BL _{V9} , BL _{V10} , BL _{V11} , BL _{V12} , BL _{V13} , BL _{V14} , BL _{V15}
MRS à 1% CaCO₃	BL _{SV13} , BL _{SV14} , BL _{SV15} , BL _{SV16} , BL _{SV17} , BL _{SV18} , BL _{SV19}	BL _{V16} , BL _{V17} , BL _{V18} , BL _{V19} , BL _{V20} , BL _{V21}



Figures 23: Effectifs des isolats de bactéries lactiques

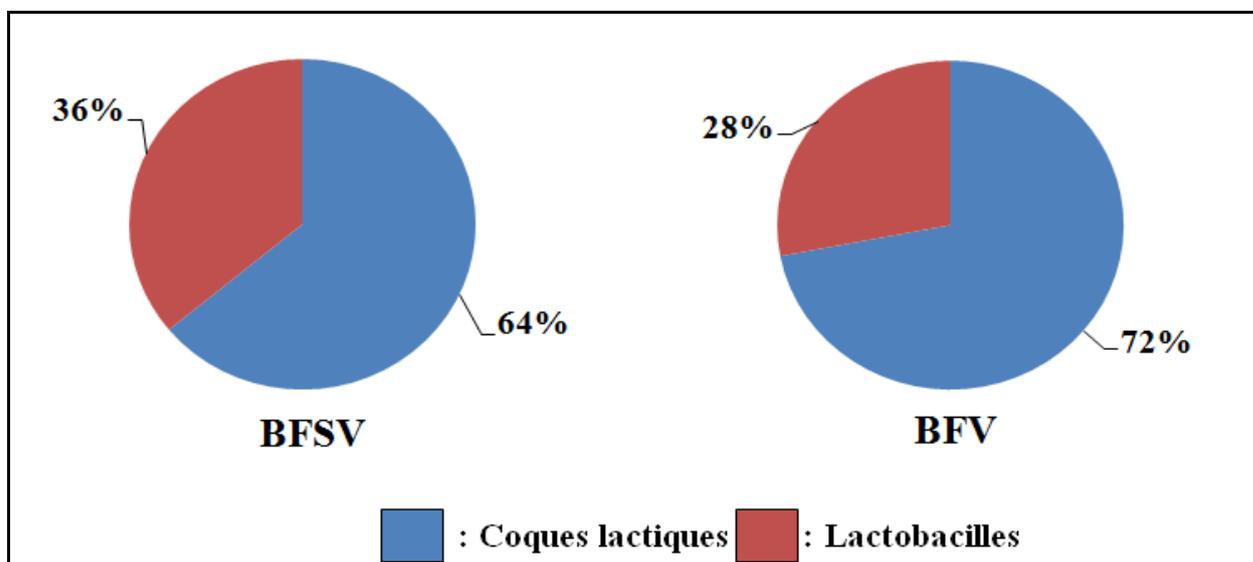


Figure 24. Répartition des deux formes cellulaires (coques lactiques et lactobacilles)

Les Tableaux 17 et 18 regroupent la caractérisation biochimique et physiologique des isolats (coques lactiques et lactobacilles).

Le test de la **catalase** est considéré comme l'un des critères d'identifications des bactéries lactiques, car ces bactéries sont catalase négative ou possèdent une pseudo-catalase (Guiraud, 2003). La réalisation de ce test montre que nos isolats (coques lactiques et lactobacilles) sont catalase négative.

La **mobilité** des bactéries lactiques est considérée comme l'une des tests permettant la différenciation de ces bactéries, car elles sont généralement immobiles (Guiraud, 2003). Ce test montre que tous les isolats (coques lactiques et lactobacilles) ne sont pas caractérisés par leurs envahissements du milieu à partir de la piqûre d'inoculation, il y'a uniquement un développement le long de cette piqûre, donc nos souches sont immobiles. Grâce à l'indicateur de pH, ce test nous a permis de remarquer un virage de la couleur du milieu du rouge au jaune uniquement chez 13 lactobacilles ; cela est dû à l'acidification générée lors de la fermentation du mannitol et donc ces isolats fermentent le mannitol (Figure 25).

✓ **Coques lactiques**

Pour les 27 isolats des coques lactiques déterminés, la gamme de **température** explorée varie de 10 à 50°C. Généralement la croissance de l'ensemble des souches est optimale à une température de 37°C, ce qui correspond à la température initiale de l'isolement des coques lactiques (Guiraud, 2003). Selon les intervalles de croissance obtenus, 3 groupes peuvent être dégagés : Le premier groupe correspond à 6 souches ayant une température de croissance minimale de 37°C et pouvant se développer à 40°C mais pas au-delà ; le deuxième groupe est celui des 8 souches qui ont un intervalle de température plus large (37°C, 40°C, 45°C, 50°C) et le dernier groupe inclut les 13 souches dont la température maximale est de 40°C. Tous les isolats ont un développement positif à **pH** 4,2 et 8,5, mais la croissance est abondante à pH 8,5, ce qui est proche du pH du milieu d'isolement de ces isolats (pH M17 : 6,9). En ce concerne leurs croissances aux variations de la **salinité**, 21 isolats sont sensibles aux concentrations en NaCl (4% et 6,5%) et 6 isolats avec une croissance positive aux mêmes concentrations en NaCl.

✓ **Lactobacilles**

Pour les 13 isolats appartenant au genre *Lactobacillus*, les **températures** testées sont de 15°C et de 45°C. Les isolats sont classés en un seul groupe. Ils ont tous un développement positif à 15°C mais pas à 45°C. Toutes les souches testées ont un développement positif uniquement à **pH** 4,2. La croissance de ces isolats dans les concentrations en **NaCl** dégage deux groupes, 9 isolats qui sont fortement sensibles à toutes les concentrations en NaCl et 4 isolats dont le développement est positif uniquement à une concertation en NaCl de 4%.

La **fermentation du glucose, du lactose et/ou du saccharose** (pente jaune/culot jaune) est observée chez tous les isolats alors que la fermentation du glucose uniquement (pente rouge/culot jaune) est absente. Par ailleurs, cette fermentation n'est pas accompagnée d'une production de CO₂ (pas de bulles dans le culot) et d'H₂S (pas de noircissement du milieu). Donc nos isolats (coques lactiques et lactobacilles) sont homofermentaires (Figure 25).

L'utilisation du **citrate** montre la présence d'un développement sur la pente du milieu utilisé ainsi que le virage de la couleur du milieu du vert au bleu chez 34 isolats. Donc ces isolats sont citrate positive (Figure 25).

Le classement des isolats (Figure 26) est réalisé en se basant sur les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques. Pour les **coques lactiques**, Les caractéristiques présentées par les isolats BL_{SV1}, BL_{SV2}, BL_{SV6}, BL_{V1}, BL_{V7}, BL_{V11} se rapprochent du genre *Pediococcus* (Law, 1997 ; McMillan *et al.* 2006 ; Dworkin *et al.*, 2006 ; Gayon *et al.*, 2006 ; Fugelsang et Edwards, 2007 ; Whitman, 2012). Les isolats BL_{SV3}, BL_{SV10}, BL_{V2}, BL_{V3}, BL_{V4}, BL_{V5}, BL_{V6}, BL_{V10} peuvent être rapprochés au genre *Streptococcus* (Hensyl, 2000 ; Guiraud, 2003 ; Hui, 2007 ; Prescott *et al.*, 2010 ; Bhandari et Roos, 2012). Les isolats BL_{SV4}, BL_{SV5}, BL_{SV11}, BL_{SV12}, BL_{V8}, BL_{V9}, BL_{V12}, BL_{V13}, BL_{V14}, BL_{V15}, BL_{SV7}, BL_{SV8}, BL_{SV9} se rapprochent au genre *Lactococcus* (Wood et Holzapfel, 1995 ; Hensyl, 2000 ; Guiraud, 2003 ; Jr *et al.*, 2006 ; Whitman, 2012 ; Bhandari et Roos, 2012).

Pour les **lactobacilles**, les isolats BL_{SV16}, BL_{SV17}, BL_{SV19}, BL_{V19}, BL_{V20}, BL_{V21}, BL_{SV13}, BL_{SV15}, BL_{SV18}, BL_{SV14}, BL_{V16}, BL_{V17}, BL_{V18} semblent appartenir au genre *Lactobacillus* (Shimeld, 1999 ; Guiraud, 2003 ; Pelinescu *et al.*, 2009 ; Fuquay *et al.*, 2011 ; Chandan et Kilara, 2013).

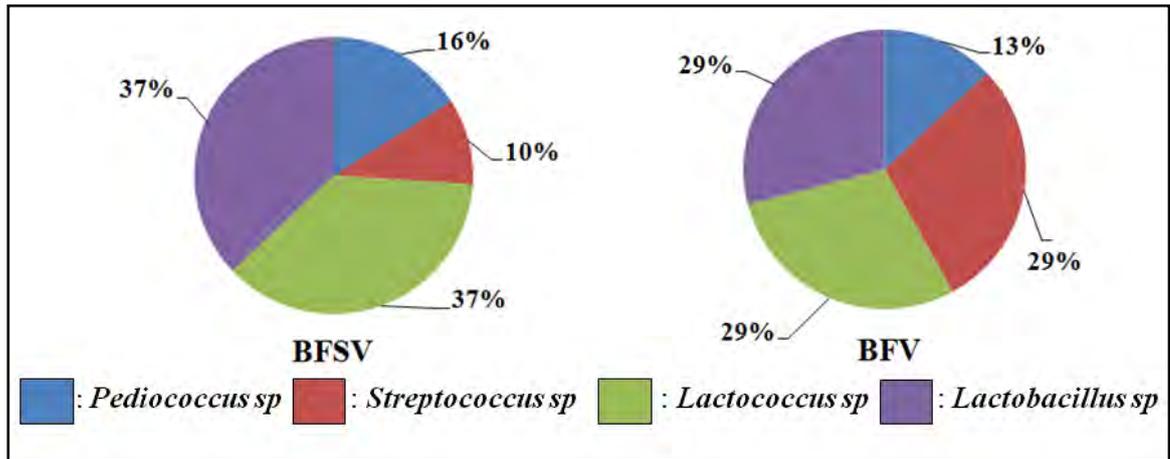


Figure 25. Répartition des souches de bactéries lactiques

Tableau 15. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de bactéries lactiques

Code d'isolats	Caractères macroscopiques						Caractères microscopiques	Identifications des genres
	Echantillons de blé fermentés	Milieux d'isolement	Dilutions	Couleurs	Aspects et pourtours	Diamètres (mm)		
BL _{V1} BL _{V7} BL _{V11}	BFV	M17	10 ⁻⁵	Blanche	Lisse et Régulier	2	Gram+, coques groupées en paires et en tétrades	<i>Pediococcus</i>
BL _{SV1} BL _{SV2} BL _{SV6}	BFSV	M17	10 ⁻⁵	Blanche	Lisse et Régulier	2		
BL _{V2} BL _{V3} BL _{V4} BL _{V5} BL _{V6} BL _{V10}	BFV	M17	10 ⁻⁵	Blanche	Cratère granuleux et Régulier	2 3 2 3 3 3	Gram+, coques groupées en chaînes	<i>Streptococcus</i>
BL _{SV10} BL _{SV3}	BFSV	M17	10 ⁻⁵	Blanche	Cratère granuleux et Régulier	3		

Tableau 15. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)

Code d'isolats	Caractères macroscopiques						Caractères microscopiques	Identifications des genres
	Echantillons de blé fermentés	Milieux d'isolement	Dilutions	Couleurs	Aspects et pourtours	Diamètres (mm)		
BL_{SV4}	BFSV	M17	10 ⁻⁵	Blanche	Cratère et Régulier	2	Gram+, coques groupées en chaînes	<i>Lactococcus</i>
BL_{SV5}						2		
BL_{SV11}						2		
BL_{SV12}						2		
BL_{V8}						2		
BL_{V9}						2		
BL_{V12}						2		
BL_{V13}	BFSV	M17	10 ⁻⁵	Blanche	Cratère et Régulier	2	Gram+, coques groupées en chaînes	<i>Lactococcus</i>
BL_{V14}						2		
BL_{V15}						2		
BL_{SV7}						2		
BL_{SV8}						2		
BL_{SV9}						2		

Tableau 15. Caractères cultureux et morphologiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)

Codes d'isolats	Caractères macroscopiques						Caractères microscopiques	Identifications des genres		
	Echantillons de blé fermentés	Milieux d'isolement	Dilutions	Couleurs	Aspects et pourtours	Diamètres (mm)				
BL _{SV13} BL _{SV14} BL _{SV15} BL _{SV16} BL _{SV17} BL _{SV18} BL _{SV19}	BFSV	MRS à 1% CaCO ₃	10 ⁻⁵	Blanche	Lisse avec halo clair et Régulier	4 3 4 2 2 4 3	Gram+, bacilles groupés en paires et en chaînes	<i>Lactobacillus</i>		
BL _{V16} BL _{V17} BL _{V18} BL _{V19} BL _{V20} BL _{V21}	BFV	MRS à 1% CaCO ₃	10 ⁻⁵	Blanche	Lisse avec halo clair et Régulier	5 4 6 4 5 5			Gram+, bacilles groupés en paires et en chaînes	<i>Lactobacillus</i>

Tableau 16. Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de bactéries lactiques

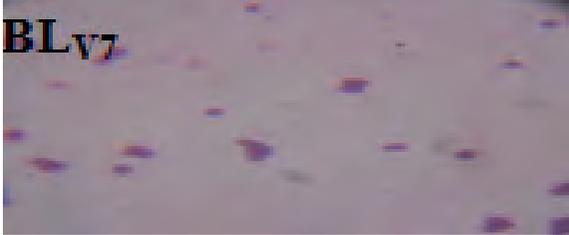
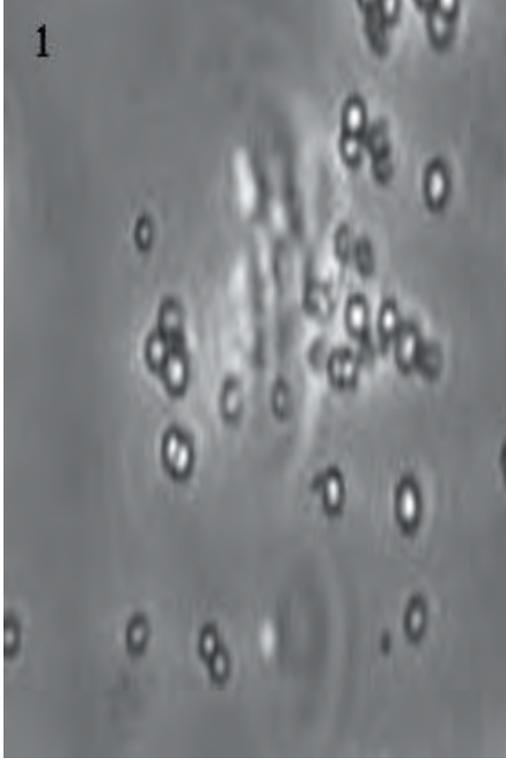
Codes d'isolats	Observations macroscopiques	Observations microscopiques (X 100)	Observations microscopiques de <i>Pediococcus</i> (1) (1 : Whitman, 2012)
BL _{V7}			
BL _{SV2}			
BL _{SV1}			

Tableau 16. Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)

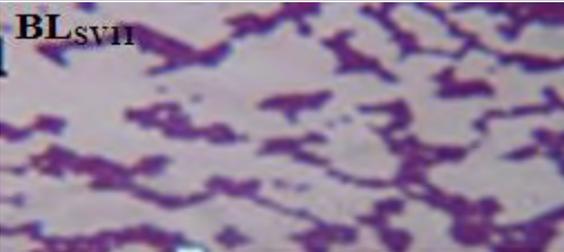
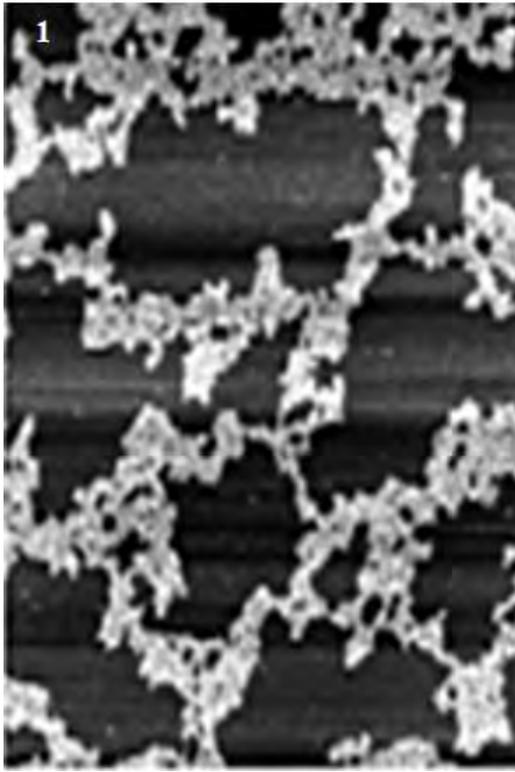
Codes d'isolats	Observations macroscopiques	Observations microscopiques (X 100)	Observations microscopiques de <i>Lactococcus</i> (1) (1 : Hensyl, 2000)
BL _{SV11}			
BL _{SV5}			
BL _{V15}			

Tableau 16. Exemples des observations macroscopiques et microscopiques des isolats de bactéries lactiques (Suite)

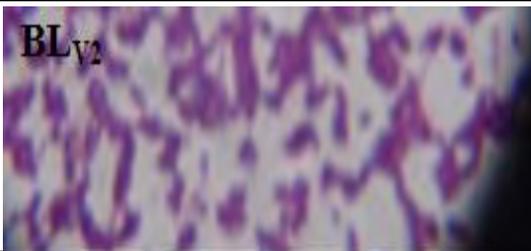
Codes d'isolats	Observations macroscopiques	Observation microscopiques (x100)	Observations microscopiques de <i>Streptococcus</i> (1, 2) et <i>Lactobacillus</i> (3) (1, 2: Prescott <i>et al.</i> , 2010; 3: Shimeld, 1999)
BL _{V6}			
BL _{V2}			
BL _{SV13}			

Tableau 17. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats de coques lactiques

Codes d'isolats	Cr 10°C	Cr 37°C	Cr 40°C	Cr 45°C	Cr 50°C	pH 4,2	pH 8,5	pH 9,6	NaCl 4%	NaCl 6,5%	Man	Cit	Glu	Lac et /ou Sach	Gaz
BL _{SV1}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BL _{SV2}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BL _{SV3}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV4}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV5}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV6}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BL _{SV7}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV8}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV9}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV10}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV11}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{SV12}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{V1}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BL _{V2}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{V3}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL _{V4}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-

BL_{V5}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V6}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V7}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BL_{V8}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V9}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V10}	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V11}	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BL_{V12}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V13}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V14}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BL_{V15}	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-

Tableau 18. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats de lactobacilles

Codes d'isolats	Cr 15°C	Cr 45°C	pH 4,2	pH 8,5	pH 9,6	NaCl 4%	NaCl 6,5%	Man	Cit	Glu	Lac et/ou Sach	Gaz
BL _{SV13}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{SV14}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{SV15}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{SV16}	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
BL _{SV17}	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
BL _{SV18}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{SV19}	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
BL _{V16}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{V17}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{V18}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{V19}	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
BL _{V20}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BL _{V21}	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Cr : croissance ; **Man** : fermentation du mannitol ; **Cit** : utilisation du citrate ; **Glu** : fermentation du glucose ; **Lac et/ ou Sach** : fermentation du lactose et /ou du saccharose ; **Gaz** : production du CO₂ et d'H₂S

3. Activités enzymatique des souches isolées

Les activités enzymatiques des différents isolats sont regroupées dans les Figures 27 et 28.

3.1. Activité amylolytique

Parmi les 07 isolats de **moisissures** testés, 5 isolats (M_{V1} , M_{V2} , M_{SV5} , M_{SV2} , M_{SV1}) ont une activité amylolytique positive, mise en évidence par la présence d'un halo clair autour de la colonie, sur le milieu synthétique utilisé. Les isolats M_{SV1} , M_{V1} et M_{V2} présentent des diamètres de : 70mm, 55mm et 40mm alors que les souches M_{SV5} et M_{SV2} possèdent des diamètres de lyse respectivement de : 5 mm et 15mm. Les isolats M_{SV1} , M_{V1} et M_{V2} se distinguent par une forte activité amylolytique.

L'activité amylolytique des souches **levuriennes** montre que seule la souche L_{SV1} a développée un halo clair sur le pourtour, le diamètre de lyse est égal à 50mm, donc elle est dotée d'activité amylolytique forte.

L'activité amylolytique des 40 isolats de **bactéries lactiques** montre la présence de zones claires autour des colonies appartenant à 12 souches (BL_{V20} , BL_{SV15} , BL_{SV18} , BL_{SV14} , BL_{SV16} , BL_{SV19} , BL_{V19} , BL_{V2} , BL_{V3} , BL_{SV3} , BL_{V10} , BL_{V5}). Le diamètre des zones n'a pas pu être estimé en raison de la croissance non homogène des colonies des souches.

3.2. Activité protéolytique

La recherche de cette activité dans les isolats de **moisissures** nous a permis de détecter 4 souches (M_{V1} , M_{SV3} , M_{SV4} , M_{SV1}) qui ont présenté une liquéfaction de la solution gélatine ; cette liquéfaction est complète et nos souches ont une activité protéolytique forte.

La mise en évidence de l'activité protéolytique des souches **levuriennes** montre l'existence d'halo clair uniquement autour des colonies de la souche L_{SV1} et donc elle est protéolytique. Nous n'avons pas pu mesurer le diamètre de la zone de lyse, car le développement des souches n'est pas homogène.

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez les isolats de **bactéries lactiques** indique l'apparition de zones claires autour des colonies bactériennes, cela est dû à la dégradation des protéines du milieu. On a pu distinguer cette activité chez 27 isolats. Les isolats protéolytiques sont : BL_{SV1} , BL_{SV2} , BL_{SV6} , BL_{SV5} , BL_{SV11} , BL_{SV12} , BL_{V8} , BL_{V9} , BL_{V12} , BL_{V13} , BL_{V14} , BL_{V15} , BL_{SV7} , BL_{SV8} , BL_{SV9} , BL_{SV16} , BL_{SV17} , BL_{SV19} , BL_{V19} , BL_{V21} , BL_{SV13} , BL_{SV15} , BL_{SV18} , BL_{SV14} , BL_{V16} , BL_{V17} , BL_{V18} . Les diamètres des zones de lyse sont mesurés et presque la plupart des isolats ont des diamètres entre 90-100 mm. D'après Thapa *et al.* (2006), nos souches lactiques ont une activité protéolytique performante.

3.3. Activité lipolytique

La mise en évidence de l'activité lipolytique des isolats de **moisissures** nous a permis de distinguer la présence d'un précipitât autour des colonies et donc la dégradation des lipides chez 5 isolats (M_{V2} , M_{SV5} , M_{SV3} , M_{SV4} , M_{V1}). Durant la période d'incubation, nous avons suivi cette activité lipolytique dans chaque 24h et l'apparition du précipitât a lieu après 168h (7jours). Cette dégradation est lente.

La recherche de l'activité lipolytique chez les souches **levuriennes** nous a permis de distinguer une seule souche (L_{V1}) ayant développée un précipitât et donc elle présente une dégradation des lipides. L'évaluation de cette activité se fait par la mesure du diamètre de lyse (40mm). Donc la souche L_{V1} se caractérise par une forte production de lipases.

La recherche de l'activité lipolytique chez nos souches **lactique** indique une absence totale de précipitât autour des colonies et donc une absence totale d'enzymes lipolytiques.

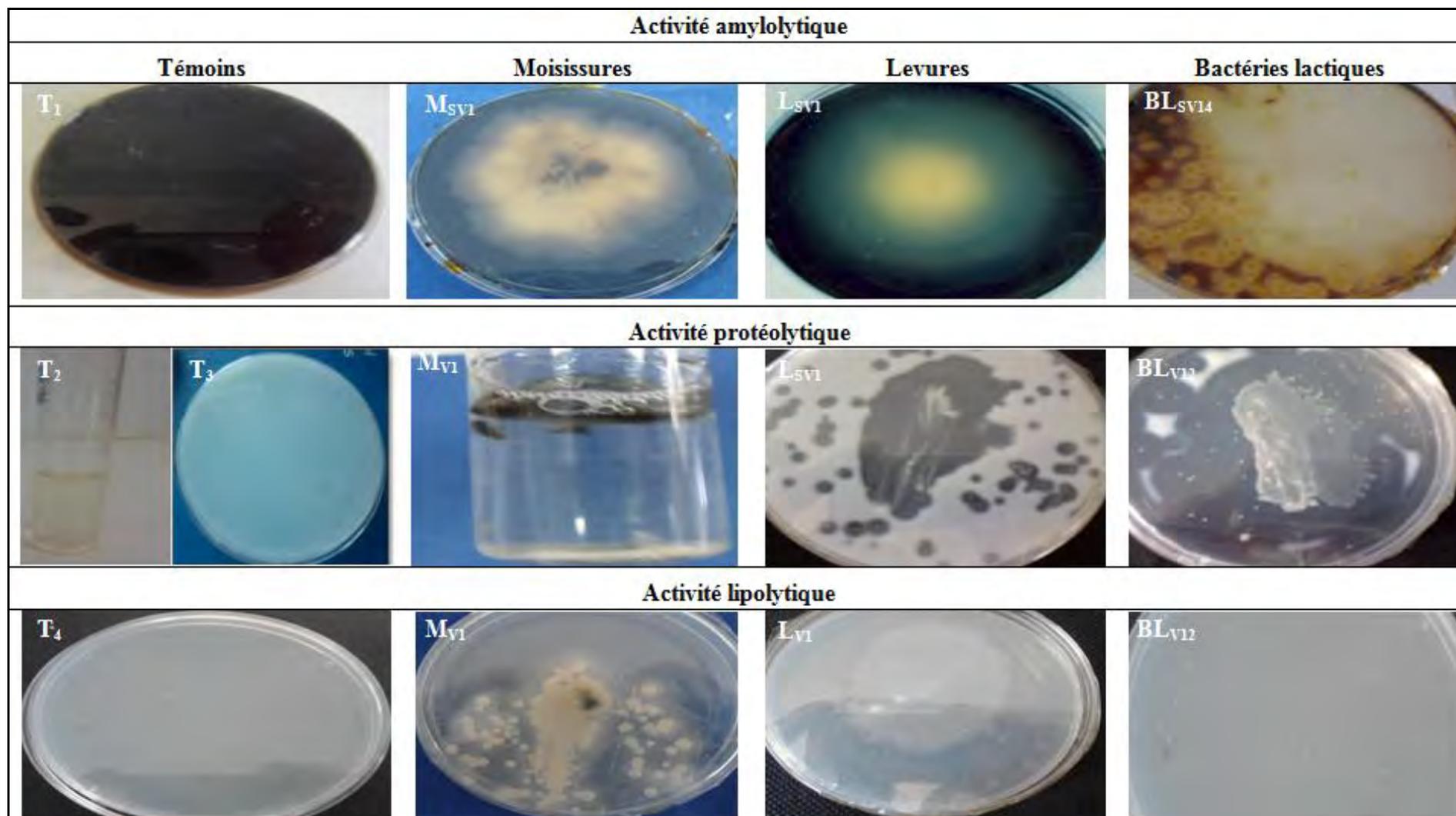


Figure 27. Exemple d'activités enzymatiques des isolats fongiques et lactiques

T₁ : Témoin du milieu utilisé pour la mise en évidence d'activité amylolytique ; **T₂** : Témoin du milieu solution de la gélatine ; **T₃** : Témoin du milieu gélose au lait écrémé ; **T₄** : Témoin du milieu utilisé pour la recherche des enzymes lipolytiques

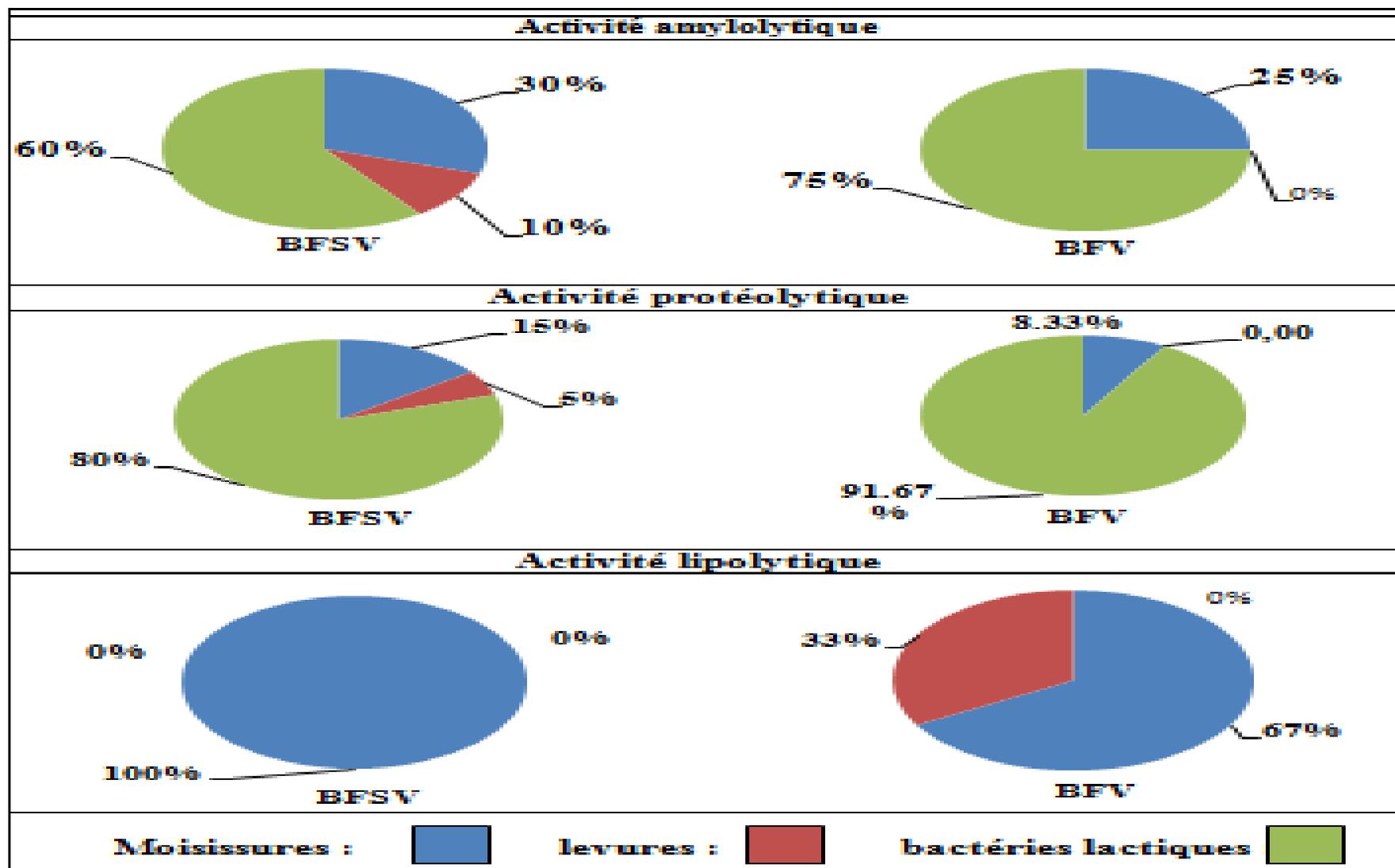


Figure 28. Pourcentage des activités enzymatiques des isolats dans chaque échantillon

Discussion

Les échantillons de blé sont fermentés en présence d'eau et les fûts utilisés pour la fermentation sont scellés durant tout le processus, ce qui favorise un environnement très humide au niveau des grains. Mais, lorsque le blé fermenté est utilisé pour la fabrication du couscous *LEMZEIET*, il doit obligatoirement subir un séchage qui lui permet d'être mieux broyé. Dans le cas de nos échantillons, le taux d'humidité est dans les normes.

Les teneurs en acides gras et en glucides totaux sont élevées dans nos échantillons. L'augmentation de la teneur en acides gras peut être expliquée par l'hydrolyse des lipides, car les lipides des grains sont facilement hydrolysés par l'action des lipases en acides gras libres et en glycérides, lors de leurs entreposages. Cette hydrolyse est accélérée par toute augmentation de température et d'humidité (Bothast, 1978 ; Feillet, 2000), ceci justifie bien la teneur élevée des acides gras et la forte teneur en lipides totaux dans nos échantillons de blé fermentés, ce qui laisse aussi supposer que certains microorganismes constituant la flore ont pu synthétiser l'excédent de lipides dans nos échantillons de blés (Rajakumari *et al.*, 2008). En ce qui concerne les glucides totaux, leurs augmentations peuvent être dû à l'accumulation des monosaccharides issues de la dégradation de l'amidon et d'autres sucres (Bothast, 1978 ; Dunford, 2012). Ce qui justifie, la faible teneur en amidon obtenue dans nos échantillons. Les teneurs en cendres dosés dans nos échantillons sont faibles, ce qui laisse supposé qu'ils sont utilisés par les microorganismes et durant la synthèse des enzymes microbiennes (Dupin *et al.*, 1992 ; Prescott *et al.*, 2010). Les teneurs en protéines sont dans les normes, mais selon Larbier et Leclercq (1992), celles des blés non fermentés sont variables et dépendent des variétés et des conditions agronomiques.

L'évaluation de la flore dans les échantillons de blé fermentés montre la dominance de la flore lactique par rapport à la flore fongique, cela peut être justifié par les conditions de la fermentation dans les fûts qui ne favorisent pas le développement fongique (atmosphère confinée).

Trois types d'activités enzymatiques (amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques) ont fait l'objet dans cette étude, chez les différentes souches isolées des échantillons de blé fermentés.

L'activité amylolytique est mise en évidence chez les isolats rapprochés aux genres *Penicillium*, *Mucor*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. D'après Goodman (1950), durant le stockage des grains, à cause de la richesse en amidon, certaines moisissures du genre *Penicillium*, sont connues par leurs productions d'enzymes amylolytiques. Par ailleurs, l'étude de Popoola *et al.* (2003) a montré que les moisissures du genre *Mucor* produisent une gamme d'enzymes telles que les enzymes amylolytiques. Ces enzymes décomposent les substrats

carbonés sur lesquels les champignons se développent. Les levures du genre *Saccharomyces* sont dotées d'enzymes amylolytiques et la production de ces enzymes est augmentée avec l'augmentation de température (Ul-Haq *et al.*, 2002 ; Juszczuk *et al.*, 2005). Ces conditions de cultures sont identiques à ceux de la fermentation du blé, ce qui confirme la forte activité amylolytique de la souche L_{SV1} que nous avons obtenu. D'après les travaux de Dufour *et al.* (1996), certaines bactéries lactiques hydrolysent l'amidon pour la production de l'acide lactique, d'autres recherches sur la fermentation du mil indiquent que les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* sont connues pour leur production d'enzymes amylolytiques (Songré-Quattara *et al.*, 2008) et en plus du genre *Streptococcus* qui joue un rôle important durant la fermentation des aliments africaines (Diaz-Ruiz *et al.*, 2003) ; Ce qui confirme les résultats enregistrés pour les souches lactiques et amylolytique isolées dans nos échantillons de blé fermentés.

L'activité protéolytique est observée chez les isolats rapprochés aux genres : *Penicillium*, *Mucor*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Lactococcus*. Nous avons constaté une importante activité chez les genres lactiques. Le genre *Lactococcus* est un modèle pour la production d'enzymes protéolytiques (Savijoki *et al.*, 2006). Le genre *Lactobacillus* est responsable de la protéolyse dans les céréales fermentées (Ohenhen et Ikenebomeh, 2007). Ceci explique l'importance de la forte charge en flore lactique isolées de nos échantillons de blé fermentés. Malgré que le système protéolytique du genre *Pediococcus* soit mal étudié (Llorente-Bousquets *et al.*, 2008), nous avons aussi constaté la présence de cette activité chez ce genre. Cette activité est aussi appréciable chez les isolats des moisissures de nos échantillons. En effet, des études portées sur les protéases des genres *Penicillium* dans les grains de coton ont montré l'existence de ces enzymes qui peuvent être faibles ou fortes chez les espèces (El-Kady *et al.*, 1984).

L'activité lipolytique est mise en évidence chez les isolats fongiques rapprochés aux genres : *Penicillium* et *Pichia*. Les changements liés à l'hydrolyse sont provoqués par les lipases avec la production d'acides gras libres et du glycérol (Bothast, 1978).

L'augmentation de l'acidité grasse pendant le stockage est directement liée à la croissance des moisissures. En effet, les résultats de la charge fongique sont en adéquation avec la teneur en acides gras dans nos échantillons de blé fermentés. Les moisissures du genre *Penicillium* sont connus par la synthèse des lipases extracellulaires et ainsi être capable de métaboliser les lipides présents dans l'environnement (Downes et Ito, 2001). Les levures du genre *Pichia* sont connues par la production de lipases extracellulaires. Ces enzymes sont influencées par la température, elles sont optimales à forte température et utilisables dans de nombreuses applications industrielles (Shahidan *et al.*, 2011 ; Tiwari et Upadhyay, 2012). La souche du genre *Pichia* que nous avons déterminée présente une activité lipolytique assez importante. L'activité lipolytique

chez les souches lactiques isolées du blé fermentés est inexistante, ceci peut être expliqué par le fait que les bactéries lactiques sont considérées comme un groupe faiblement lipolytique par rapport à d'autres groupes (Medina *et al.*, 2004).

Conclusion et perspectives

Notre travail a pour objectif d'étudier : la composition biochimique, la détermination de la flore microbienne et la mise en évidence des activités amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques, chez les souches isolées de deux échantillons de blés fermentés dans des fûts durant 15 mois. Les phénomènes produits lors de la fermentation touchent la composition biochimique du blé où les principaux constituants servent comme substrats pour le développement microbien et les activités enzymatiques, en favorisant le développement de la flore lactique au détriment des autres flores. Ceci est très intéressant en raison de l'effet protecteur et bénéfique de cette flore sur le blé fermenté, par l'inhibition des microorganismes pathogènes, la production des acides organiques et des substances antimicrobiennes, la dégradation des composés toxiques et la synthèse des arômes. La richesse du blé en amidon constitue aussi un excellent substrat pour la synthèse d'enzymes amylolytiques. Ce qui est appréciable pour la synthèse des sucres directement assimilables pour les microorganismes. C'est aussi intéressant pour notre produit de mettre en évidence la synthèse d'enzymes protéolytiques surtout chez les bactéries lactiques en raison de l'augmentation de la digestibilité des protéines du blé (en polypeptides et en acides aminés utilisés comme substrats).

La dégradation des lipides dans notre produit par les isolats appartenant à la flore fongique est appréciable en raison de la participation des acides gras libérés dans l'élaboration du goût acide et donc l'acceptabilité du produit par le consommateur.

La fermentation du blé dur dans les fûts n'a pas fait l'objet d'étude particulière et nos résultats sont les premiers et ils constituent une première démarche pour d'autres études. En perspectives, il serait intéressant d'orienter la recherche en ciblant: Le dosage des différentes activités enzymatiques mises en évidences; l'étude des substances volatiles et aromatique synthétisées durant la fermentation ; s'intéressé au pouvoir mycotoxilogique de la flore fongique malgré que nos souches obtenues sont considérées comme faiblement dangereuses ainsi que les propriétés probiotiques des bactéries lactiques (substances bactériocines).

Références bibliographiques

1. **Adams Martin R., Moss Maurice O. (2008).** Food microbiology. RSC Publishing. The Royale Society of Chemistry. Third Edition; 463P.
2. **Adeyemi I.A., Beckley O. (1986).** Effect of period of maize fermentation and souring on chemical properties and amylograph pasting viscosities of ogi. *Cereal Sci.* 4: 353-360.
3. **AFNOR. (1991).** Recueil de normes-contrôle de la qualité des produits alimentaires : céréales et produits céréaliers. AFNOR/DGCC RF. 3^{ème} édition. Paris; 360P.
4. **Agag B.I. (2004).** Mycotoxins in foods and feeds 3-Zearalenone. *Ass. Uni. Bull. Environ. Res.* Vol 7, N°2.
5. **Akingbala J.O., Rooney K.W., Faubion J.M. (1981).** A Laboratory procedure for the preparation of ogi; a Nigerian fermented food. *Food Sci.* 45(5):1523-1526.
6. **Akinrele I.A. (1970).** Fermented studies on maize during preparation of traditional African starch cake food. *J. Sci. Food Agric.* 21: 619-625.
7. **Amendola Joseph., Rees Nicole. (2003).** Understanding baking: The Art and Science of Baking. John Wiley & Sons. INC; 288 P.
8. **Andersen B., Kroger E., Roberts R. G. (2002).** Chemical and morphological segregation of *Alternaria Arborescens*, *Alternaria Infectoria* and *Alternaria Tenuissima* species-groups. *Mycological Research.*, Vol 16: 170-180.
9. **Azadnia P., Khan Nazer A.H. (2009).** Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research.* Shiraz University. Vol 10. N 28.
10. **Bartali E.H., Afie S., Persoons E. (1989).** Stockage des céréales dans des entrepôts souterrains. *Cereals en régions chaudes.* Aupele-UREF. Eds John Libbey Eurotext. Paris : 27-38.
11. **Baudry Chantal., Brezellec Huguette. (2006).** Microbiologie-Immunologie : Exercices d'application. 2^{ème} édition. Wolters kluwer. France ; 126 P.
12. **Bauer Werner J., Badoud Raphaël., Löliger Jürg., Eturnaud Alain. (2010).** Sciences et technologies des aliments. Principe de chimie des constituants et de technologie des procédés. Presses polytechniques; 720 P.
13. **BeMiller James., Whistler Roy. (2009).** Starch: Chemistry and technology. Third Edition. *Food Science and Technology*; 894 P.
14. **Bensassi F., Chennaoui M., Bacha H., Hajlaoui M. R. (2011).** Survey of the mycobiota of freshly harvested wheat grain in the main production areas of Tunisia. *African Journal of food Science.*, Vol.5 (5): 292-298.
15. **Beuchat Larry R. (1987).** Food and beverage mycology. Second Edition. Springer; 661P.

16. **Beuchat Larry R. (1987).** Food and beverage mycology. Second Edition. Springer; 661P.
17. **Bhandari Bhesh., Roos Yrjö H. (2012).** Food materials science and engineering. Wiley Blackwell; 416 P.
18. **Bhatnagar Deepak., Yu Jiujiang., Ehrlich Kenneth C. (2002).** Toxins of filamentous fungi. Fungal Allergy and Pathogenicity. Chem Immunol. Basel. Karger. Vol 8: 167-206.
19. **Bonnefoy Caroline., Guillet Françoise., Leyral Guy., Verne-Bourdais Èvelyne. (2002).** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Doin Editeurs; 245P.
20. **Borel J.P., Maquar F.X., Le Peuch C., Randoux A., Giller P., Bellon G., Monboiss J.C. (1997).** Biochimie dynamique. De Boeck and Larcier; 938 P.
21. **Bose Bandana., Hemantaranjan A. (2008).** Developments in physiology, biochemistry and molecular biology of plant. Vol 2. New India Publishing Agency; 369 P.
22. **Bothast R.J. (1978).** Fungal deterioration and related phenomena in cereals, legumes and oilseeds: 210-243.
23. **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J.Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Collection Biothechnologies.P34-381
24. **Botton B., Breton A., Fevre M., Guy Ph., Larpent J.P., Veau P. (1985).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Masson. Paris; 364 P.
25. **Boudreau Armand., Ménard Germain. (1992).** Le blé : Eléments fondamentaux et transformation. *Presses de l'Université LAVAL*. Paris ; 439 P.
26. **Bouix M., Leveau J. Y. (1991).** Les levures *Ds* : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, 2^{ème} édition. Lavoisier-Tec & Doc, Paris., 3: 206-229.
27. **Bourgeois C.N., Mescmle J.F. et Zucca J., 1996.** Microbiologie alimentaire. Tome 1 « Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». *Edition Technique et Documentation Lavoisier*, Paris : 393-414.
28. **Branger Alain., Richer Marie-Madeleine., Roustel Sébastien. (2007).** Microbiochimie et Alimentation. Educagri Edition. Dijon; 343P.
29. **Brick N.M.M., Lorini I., Scussel V.M. (2000).** Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest. 9th *International Working Conference on stored Product Protection*.
30. **Brink M., Belay G. (2006).** Céréales et légumes secs. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1. Fondation PROTA/ Backhuys Publishers/CTA. Pays-Bas ; 327 P.

31. **Brooker Donald B., Bakker-Arkema Fred W., Hall Carl W. (1992).** Drying and storage of grains and oilseeds. Springer; 468P.
32. **Bushuk W., Rasper V.F. (1994).** Wheat: Production, properties and quality. Blackie Academic & Professional. Springer; 239P.
33. **Cahagnier B. (1996).** Céréales et produit dérivé In « microbiologie alimentaire » tome 1 « aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». *Edition Technique et Documentation Lavoisier.*, Paris : 392-414.
34. **Carver Brett F. (2009).** Wheat: Science and Trade. Wiley-Blackwell; 616P.
35. **Cauvain Stanley P. (2003).** Bread making: improving quality. Woodhead Publishing in Food Science and technology; 589 P.
36. **Chandan Ramesh C., Kilara Arun. (2013).** Manufacturing yoghurt and fermented milks. Second Edition. Wiley Blackwell.
37. **Chen Yi-Sheng, Wu Hui-Chung., Yanagida Fujitoshi. (2010).** Isolation and characteristics of Lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. *Brazilian Journal of microbiology.*, 41: 916-921.
38. **Chichester C. O., Stewart G. F. (1977).** Advances in Food Research. Academic Press. New York; 436P.
39. **Chichester C.O. (1986).** Advanced in food research. Elsevier; 398 P.
40. **Christensen Clyde M., Kaufmann Henry H. (1969).** Grain storage. The role of fungi in quality loss. Minnesota archive Editions; 153 P.
41. **Cichoke A. J. (1999).** The complete book of enzyme therapy. 492P.
42. **Coord Grosclaude G. (1999).** Un point sur l'eau. Tome 1. Milieu naturel et maîtrise. INRA. Paris ; 204 P.
43. **Deàk Tibor. (2008).** Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press. Second Edition. 325P.
44. **Dechambre Amédée. (1874).** Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales. Tome Neuvième. Paris.
45. **Delacharlerie S., De Biourge S., Chéné C., Sindic M., Deroanne C. (2008).** HACCP organoleptique : Guide Pratique. Les Presses Agronomiques de Gembloux; 176P.
46. **Dendy D.A.V., Dobraszczyk (2000).** Cereals and Cereal Products: Technology and Chemistry. Springer; 370P.
47. **Denis François., Ploy Marie-Cécile., Martin Christian., Bingen Edouard., Quentin Roland. (2007).** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. 2^{ème} édition. Elsevier Masson; 573 P.

- 48. Diaz-Ruiz Gloria. Guyot Jean-Pierre., Ruiz-Teran Francisco. Morlon-Guyot Juliette., Wachter Carmen. (2003).** Amylolytic lactic acid bacteria from pozol: a natural potential to produce complementary foods. Food-based approaches for healthy nutrition. Ouagadougou 11: 23-28.
- 49. Dijksterhuis Jan., Samson Robert A. (2007).** Food mycology. A multifaceted Approach to fungi and food. CRC Press; 403P.
- 50. Djekrif-Dakhmouche Scheherazad., Gillmann Louisa., Saunier Monique., Meraihi Z. (2006).** Production d'une α -amylase thermostable par culture mixte de microorganismes.
- 51. Downes France Pouch. Ito Keith. (2001).** Compendium of methods for the microbiological examination of food. Fourth Edition. American Public Health Association; 676 P.
- 52. Druvefors Ulrika Adel., Schnürer Johan. (2004).** Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. FEMS yeast Research. Vol 5: 373-378.
- 53. Dufour D., O'Brien G.M., Best Rupert. (1996).** Casava flour and starch. Progress in research and development; 409 P.
- 54. Dunford Nurhan Turgut. (2012).** Food and industrial bioproducts and bioprocessing. Wiley-Blackwell; 392 P.
- 55. Dupin Henri. Cuq Jean-Louis., Malewiak M.I., Leynaud-Rouaud C., Berthier A.M. (1992).** Alimentation et nutrition humaines. EFS Editeur ; 1533P.
- 56. Dworkin Martin., Falkow Stanley., Rosenberg Eugene., Schleifer Karl-Heinz., Stackebrandt Erko. (2006).** The Prokaryotes: A hand book on the biology of bacteria. Ecophysiology and biochemistry. Third Edition; 1107 P.
- 57. Edwards W.P. (2007).** The science of bakery Products. The Royal Society of Chemistry; 259P.
- 58. El-Kady Ismail A., Mazen Mohamed B., Saber Sabah M. (1984).** Some enzymatic activities of fungi isolated from cotton seeds and cotton seed products. Qatar Univ. Sci. Bul. 85-93.
- 59. Feillet Pierre. (2000).** Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris; 308 P.
- 60. Fields M.L., Hamad A.M., Smith D.R. (1981).** Natural Lactic acid fermentation of corn meal. J. Food Sci. 46: 900-902.
- 61. Fortin François. (1996).** L'encyclopédie visuelle des aliments. Les éditions Québec Amérique inc; 689 P.
- 62. Fugelsang Kenneth C., Edwards Charles G. (2007).** Wine microbiology. Practical Applications and Procedures. Springer. Second Edition; 396 P.

- 63. Fulcher R.G., Wong SI. (1980).** Inside Cereals; A fluorescence microchemical view. In cereals for food and beverages, Inglett GE, Munck L (eds) New York, Academic Press; 126 P.
- 64. Fuquay John W., Fox Patrick F., Mcsweeney Paul L.H. (2011).** Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press; 3200 P.
- 65. Garrow J.S., Ralph Ann., James William Philip Trehearne. (2000).** Human nutrition and dietetics. Elsevier Health Science; 900 P.
- 66. Gayon P Ribéreau., Dubourdiou D., Donéche B., Lonvaud A. (2006).** Handbook of enology. Vol1. The microbiology of wine and vinifications. Second Edition. Wiley; 512P.
- 67. Geacintov Nicholas E., Broyde Suse. (2011).** The chemical biology of DNA damage. Wiley-VCH; 471P.
- 68. Godon B. (1991).** Biotransformation des produits céréaliers, Ed : Technique et documentation .Lavoisier. Paris ; 221 P.
- 69. Godon B. et Loisel W. (1997).** Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. *Edition Technique et Documentation Lavoisier.*, Paris; 819 P.
- 70. Godon B. et Loisel W. (1997).** Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. Edition Technique & Documentation Lavoisier., Paris. 819 P.
- 71. Goodman J.J. (1950).** Adaptative production of amylase and lipase by three species of fungi. American Association for the advancement of science. Vol 112(2902): 176-179.
- 72. Griffin David H. (1994).** Fungal physiology. Wiley Science Paperback Series. Second Edition; 472P.
- 73. Gropper Sareen S., Smith Jack L., Groff James L. (2009).** Advanced nutrition and human metabolism. Cengage Learning. Fifth Edition; 600P.
- 74. Guilliermond Alexandre. (2003).** Yeasts: Culture, identification & microbiology. Watchmaker Publishing ; 448 P.
- 75. Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR; 300P.
- 76. Guiraud Joseph-Pierre. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Dunod. Paris.
- 77. Haard Norman., Odunfa S.A., Lee Cherl-Ho. (1999).** Fermented cereals: A global perspective. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 114P.
- 78. Hanson E.W., Christensen J.J. (1953).** The black point disease of wheat in the United States. Tech. Bull. 206. MINN. AGRI: 30.
- 79. Harrigan W.F. (1998).** Laboratory methods in food microbiology. Third Edition. Gulf Professional Publishing; 532 P.

- 80. Hensyl William R. (2000).** Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth Edition; 787P.
- 81. Heredia Norma., Wesley Irene., García Santos. (2009).** Microbiologically safe foods. John Wiley; 596P.
- 82. Higgins David R., Cregg James M. (1998).** *Pichia* Protocols. Methods in molecular biology. Vol 103. Humana Press Inc; 130 P.
- 83. Hu Thomas Q. (2002).** Chemical modification, Properties and usage of Lignin. Springer; 291 P.
- 84. Hui Y.H. (2007).** Handbook of food products manufacturing. Wiley; 2308 P.
- 85. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M-H., Journet M. (1995).** Nutrition des ruminants domestiques : ingestion et digestion. INRA. Paris.921P.
- 86. Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. (2006a).** Science des aliments. Biochimie Microbiologie Procédé produits, Volume 1 : Stabilisation biologique et physicochimique, Tec. et Doc., Lavoisier, Paris ; 383 P.
- 87. Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. (2006b).** Science des aliments. Biochimie-Microbiologie-Procédés produits, Volume2 : Technologie des produits alimentaires, Lavoisier Tec et Doc., Paris ; 456 P.
- 88. Jr Winn Washington., Allen Stephen., Janda William., Koneman Elmer., Procop Gary., Schreckenberger Paul., Woods Gail. (2006).** Koneman's color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins; 1565 P.
- 89. Juszczak Piotr., Wojtatowicz Maria., Zarowska Barbara., Chrzanowska Józefa., Malicki Adam. (2005).** Diversity of physiological and biochemical properties within yeast species occurring in rokpól cheese. Polish Journal of food and Nutrition Sciences. Vol 14., N 3 : 257-261.
- 90. Kalui Christine M., Mathara Julius M., Kutima Philip M. (2010).** Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods. A review. *African Journal of Biotechnology*.Vol. 9(17): 2490-2498.
- 91. Kanafani-Zahar Aïda. (1994).** Mūne : La conservation alimentaire traditionnelle au Liban. Editions de la Maison des sciences de l'homme. Paris ; 266 P.
- 92. Kavanagh Kevin. (2005).** Fungi: biology and application. Second Edition. Wiley; 384 P.
- 93. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (2011).** The yeasts: A taxonomic study. Elsevier. Fifth Edition; 1500 P.
- 94. Labbé Ronald G., García Santos. (2001).** Guide to foodborne pathogens. Wiley; 400 P.
- 95. Larbier M., Leclercq B. (1992).** Nutrition et alimentation des volailles. INRA. Paris; 355 P.

- 96. Law B.A. (1997).** Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Second Edition. Blackie Academic & Professional; 365P.
- 97. Leveau J., Bouix M. (1979).** Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. *Ind. Alim. Agric.*, 11: 1147-1151.
- 98. Leveau J.Y., Bouix M. (1993).** Les levures In « Microbiologie industrielle ».Ed Tech &Doc. Lavoisier. Paris: 2-93.
- 99. Leyral Guy., Vierling Elisabeth. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 4^{ème} édition; 287 P.
- 100. Llorente-Bousquets A., Pérez-Munguía S, Farrés A. (2008).** Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Can J Microbiol.* 54(8): 694-699.
- 101. Lockey R.F., Bukantz S.C., Bousquet J. (2004).** Allergens and Allergen Immunotherapy. Third Edition; 600 P.
- 102. Manay Shakuntala N., Shadaksharaswamy M. (2001).** Foods: Facts and principles. Second Edition. New Age International Publishers.
- 103. Massaux C., Bodson B., Lenartz J., Sindic M., Sinnaeve G., Dardenne P., Falisse A., Deroanne C. (2006).** L'amidon natif du grain de blé : un composé naturel à valoriser par la connaissance de ses propriétés techno-fonctionnelles. *Livre blanc « céréales ».F.U.S.A et CRA-W. Gembloux.*
- 104. Mathew S. (2010).** A review on the wheat grain quality under post harvest storage. *International Journal of Pharmaceutical and Applied sciences/1 (2).* ISSN : 0976-6936.
- 105. Mathew Shiju., Thomas George., Tufail Ahmad. (2011).** An Evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal Journal of Biotechnology.*, Vol 1: 9-13.
- 106. Matz S.A. (1971).** Cereal Science. A VI Publishing Co. Westport Connecticut; P 241.
- 107. Matz Samuel A. (1991).** The chemistry and technology of cereals as food and feed. Second Edition. Springer ; 751 P.
- 108. McMillan Julia A., Feigin Ralph D., DeAngelis Catherine., Jr Douglas Jones M. (2006).** Oski's Pediatrics: Principles & Practice. Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2808 P.
- 109. Medina R.B., Katz M.B., González S., Oliver G. (2004).** Determination of esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. *Methods Mol.Biol.*268:465-470.
- 110. Messens W., Devuyst L. (2002).** Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs. A review. *Int. J. food Microbiol.*72. 31-43.

- 111. Meyer A., Deiana J., Bernard A. (2004).** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigé. Doin Editeurs; 430 P.
- 112. Moussard C. (2006).** Biochimie structurale et métabolique. De Boeck & Larcier. 3^{ème} Edition; 368 P.
- 113. Narang S.P. (2004).** Food microbiology. APH Publishing; 260 P.
- 114. Narayanasamy P. (2006).** Postharvest pathogens and disease management. John Wiley; 672 P.
- 115. Neergaard Paul. (1977).** Seed pathology. Vol1. MacMillan; 1187P.
- 116. Nwagu T.N., Okolo B.N. (2011).** Growth profile and amylolytic activity of a Thermophilic fungus *Aspergillus Fumigatus* isolated from soil. *Asian Journal of biotechnology*. 3 (1). 46-57.
- 117. Ohenhen R.E., Ikenebomeh M.J. (2007).** Shelf stability and enzyme activity studies of ogi: A corn meal fermented product. *Journal of American Science*. 3 (1).
- 118. Omemu A.M. (2011).** Fermentation dynamics during production of ogi, a Nigerian fermented cereal porridge. *Report and Opinion*. 3 (4).
- 119. OMS. (1980).** Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. Publications. De l'OMS. Genève. pp 142.
- 120. Orole O.O., Adejumo T.O. (2011).** Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. *Journal of Ecology and Natural Environment*. Vol. 3 (9) : 298-303.
- 121. Osiewacz Heinz D. (2002).** Molecular biology of fungal development. Marcel Dekker, INC. New York. Basel; 608P.
- 122. Osungbaro Taiwo O. (2009).** Physical and nutritive properties of fermented cereal foods. *African Journal of food Science* ; Vol 3(2): 023-027.
- 123. Parija Subhash Chandra. (2009).** Test book of microbiology & Immunology. Elsevier. India; 700 P.
- 124. Parveen Sahana and Hafiz Fauzia. (2003).** Fermented Cereal from Indigenous Raw Materials Pakistan *Journal of Nutrition* 2 (5): 289-291.
- 125. Pelinescu Diana-roxana., Sasarman Elena., Chifiriuc Mariana-carmen., Stoica Ileana., Mohit Ana-maria., Avram Ionela., Serbancea Floarea., Dimov Titiana Vassu. (2009).** Isolation and identification of some *Lactobacillus* and *Enterococcus* strain by a Polyphasic taxonomical approach. *Romanian Biotechnological letters*. Vol 14. N°2: 4225-4233.
- 126. Perrier R., Van der Kemp Auffret T., Zonszain. (1997).** Expérience faciles et moins faciles en sciences biologiques. Biosciences et Techniques. Doin Éditeurs ; 476 P.

- 127. Petersson S., Schnürer J. (1995).** Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(3):1027-1032.
- 128. Pitt John I., Hocking Ailsa D. (2009).** Fungi and food spoilage. Third Edition. Springer Science. 519P.
- 129. Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. (1999).** A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal feed science and Technology.* Vol 78: 21-37.
- 130. Podila Gopi K., Varma Ajit. (2005).** Basic research and applications of Mycorrhizae. I.K. International Pvt. Ltd; 511 P.
- 131. Pomeranz Yeshajahu. (1987).** Cereal Crops general. In *Modern cereal science and technology* Pomeranz Y (eds), VCH Publishers, Inc, New York. P: 14-23.
- 132. Popoola A.R., Adeoti A.Y.A., Idakwo P.Y. (2003).** Incidence of mould in some varieties of stored cowpea and peanuts in Maiduguri Nigeria. *ASSET Series A; 3 (4) : 163-169.*
- 133. Prat Roger. (2007).** Expérimentation en biologie et physiologie végétale. Edition Quae ; 296 P.
- 134. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D. A. (2003).** Microbiologie. 2^{ème} édition. De Boeck. 1137P.
- 135. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D. A., Wiley J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2010).** Microbiologie. 3^{ème} Edition. De boeck ; 1216 P.
- 136. Raimbault M. (1995).** Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc. *Transformation Alimentaire du manioc.* Éditions Orstom.
- 137. Rajakumari S, Grillitsch K, Daum G. (2008).** Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog Lipid Res; 47(3):157-71.*
- 138. Richrad-Molard M. (1998).** Microbiologique des céréales et des farines In « Les industries de première transformation des céréales. *Edition Techniques et Documentation Lavoisier.*, Paris : 159 -173.
- 139. Roberts Michael., Reiss Michael., Monger Grace. (2000).** Advanced Biology. Nelson. 800P.
- 140. Roberts T.A. (2005).** Microorganisms in foods. *Microbial Ecology of food Commodities.* Second Edition. Springer; 776P.
- 141. Roquebert Marie-France. (2002).** Les contaminants biologiques des biens culturels. Elsevier; 419 P.

- 142. Roudaut Héléne., Lefrancq Evelyne. (2005).** Alimentation théorique: Sciences des aliments. Doin éditeurs. France; 303 P.
- 143. Salleh A.B., Abdul Rahman R.N.Z.R., Basri M. (2006).** New lipases and proteases. Nova science Publishers. 159P.
- 144. Salman A.D., Ghadiri M., Hounslow M.J. (2007).** Particle breakage. Handbook of powder technology. Elsevier; 1240 P.
- 145. Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles: Importance industrielle. 2^{ème} édition, Masson, Paris : 512 P.
- 146. Sauer D.B., Storey C.L., Ecker O., Fulk D.W. (1982).** Fungi in U.S. Export wheat and corn. Postharvest Pathology and Mycotoxins. Vol 72., 11: 1449.
- 147. Savijoki Kirsi., Ingmer Hanne., Varmanen Pekka. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnology. 71(4): 394-406.
- 148. Shahidan N. H., Rahman R. N. Z. A., Leow T. C., Rosfarizan M., Basri M., Salleh A. B.(2011).** The effect of carbon sources on the expression level of thermostable L2 lipase in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10(62), pp. 13528-13535.
- 149. Sharma O.P. (1989).** Text Book of Fungi. Tata McGraw-Hill Publishing; 365 P.
- 150. Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M., Mifflin B.J. (1986).** The classification and nomenclature of wheat gluten proteins. A reassessment. *J. Cereal Sci.*, 4: 97-106.
- 151. Shimeld Lisa Anne. (1999).** Essentials of diagnostic microbiology. Cengage Learning.690P.
- 152. Sierra G.A. (1957).** Simple method for the selection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leewenhoek*; 23:15-22
- 153. Sindic M., Massaux C., Parideans A.M., Lenartz J., Vancutsem F., Bodson B., Sinnaeve G. (2010).** Valorisation de l'amidon de blé. Incidences des modalités de culture sur les propriétés techno-fonctionnelles. Presses Agronomiques de Gembloux
- 154. Singh Pande Jain. (2010).** Diversity of microbes and Cryptogams. Text Book of Botany. Fourth Edition.
- 155. Smith John E., Moss M.O 1985).** Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance. Wiley; 148 P.
- 156. Smith Scott J., Hui Y.H. (2004).** Food processing: Principles and Application. Blackwell Publishing; 524 P.
- 157. Soetaert Wim., Vandamme Erick J. (2010).** Industrial biotechnology: sustainable Growth and economics success. John Wiley & Sons; 476 P.

158. **Soltner D. (1987).** Les grandes productions végétales « céréales-plantes sarclées-prairies ». 15^{ème} Edition. Collection Sciences et techniques agricoles; 461 P.
159. **Songré-Quattara L.T., Mouquet-Rivier C., Icard-Vernière C., Humblot C., Diawara B., Guyot J.P. (2008).** Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *Inter. J. Food Microbiol.* 10. 128 (2): 395-400.
160. **Spencer John F.T., Ragout de Spencer Alicia. (2001).** Food microbiology protocols. Methods in Biotechnology. Humana Press; 495 P.
161. **Srilakshmi B. (2007).** Food Science. New Age International Publishers; 456 P.
162. **Sun Run-Cang. (2010).** Cereals straw as a resource for sustainable biomaterials and Biofuels. Elsevier. First Edition; 300 P.
163. **Surget A., Barron C. (2005).** Histologie du grain de blé : Industrie des céréales., 145 : 4-7.
164. **Svanberg U., Sandberg G.A. (1989).** Improved iron availability in weaning foods using germination and fermentation. III. *Nutrient Availability: Chemical and Biological aspects*. Ed. Southgate D., Johnson D., Fenwick G., Royal society of Chem. Special Pub.N°72: 179-180.
165. **Tatsinkou F.B., Taveai F., Ndjouenkeui R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soil. *African Journal of Biotechnology.* 4. P14-18.
166. **Tehreema Iftikhar., Mubashir Niaz., Mamona Anwer., Syed Qaiser Abbas., Muhammad Saleem., Rukhsana Jabeen (2011).** Ecological screening of lipolytic cultures and process optimization for extracellular lipase production from fungal hyperproducer. *Pak. J. Bot.* 43(2): 1343-1349.
167. **Thapa N., Pal J., Tamang J.P. (2006).** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int J Food Microbiol.* 1; 107(1): 33-8.
168. **Tingshuang Guo ., Sánchez Manuel D., Yu Guo Pei. (2002).** Animal production based on crop residues: Chinese experiences. *Food & Agriculture;* 210 P.
169. **Tiwari Prakash., Upadhyay Mukesh. (2012).** Characterization of a thermo tolerant lipase from *Pichia anomala*. *Euroean Journal of Experimental biology.* 2(3); 464-467.
170. **Udayakumar Nithya. (2009).** Safe storage Guidelines for Durum wheat. Library &Archive. Canada; 104P.
171. **Ueno, Y. (1977).** Trichothecenes: overview address, p. 189-207. In J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman (ed.), *Mycotoxins in human and animal health*. Chem-Orbital, Park. Forest South, Ill.

- 172. Ul-Haq I., Roheena A., Ashraf H., Shah A.H. (2002).** Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of α -amylase. *Biotechnology*. N°1.Vol (2-4); 61-66.
- 173. Van der Burgt G.J.H.M., Timmermans B.G.H. (2009).** *Fusarium* in wheat. Effects of soil fertility strategies and nitrogen levels on mycotoxins and seedling blight. LBL Publication.
- 174. Vierling Elisabeth. (2008).** *Aliments et Boissons: Filière et Produits*. Doin éditeurs. 3^{ème} édition; 277P.
- 175. Vishniac H.S., Hempfling W.P. (1979).** *Journal of General Microbiology*: 112:301.
- 176. Walker G.M., Wiley J., Chichester S. (1997).** *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley & Sons; 350 P.
- 177. Walker G.M., Wiley J., Chihhster S. (1997).** *Yeast physiology and biotechnology*.
- 178. Webley D.J., Jackson K. L., Mullins J.D., Hocking A.D., Pitt J.I. (1997).** *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian Harvest. *Australian Journal of Agricultural Research.*, 48 (8):1249-1256.
- 179. Whitman William B. (2012).** *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Second Edition. Springer; 1450 P.
- 180. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (1995).** *The genera of Lactic Acid Bacteria*.Vol2. Blackie Academic & Professional. Springer; 398P.
- 181. Xu Xiangming., Bailey John A., Cooke B.M. (2003).** *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*. Springer; 129 P.
- 182. Yada R.Y. (2004).** *Proteins in food processing*. Woodhead Publishing in Food Science and technology; 686 P.
- 183. Yao A.A., Egounlety M., Kouame L.P., Thonart P. (2009).** Les bactéries lactiques dans les aliments ou Boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, 153: 54-65.
- 184. Yazar Selma., Omurtag Gülden Z. (2008).** Fumonisins, Trichothecens and Zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 9 : 2062-2090.
- 185. Zillinsky F.J. (1983).** *Common diseases of small grain cereals. A guide to identification*. CIMMYT; 141P.

Annexes

Annexe 01 : Détails produits, réactifs et milieux de culture
Tableau 01. Produits chimiques utilisés pour les analyses physico-chimiques

Produits	Caractéristiques
Acide chlorhydrique	Fluka Chemik. Hydrochloric acid 37, 5%. ISO for Analysis
Acide borique	CARLO ERB. 61,83g/mol. Boric acid 4%
Acide formique	Fluka Chemik. 80%, d = 1,18
Acide sulfurique	Fluka Chemik. H ₂ SO ₄ . 96%. densité: 1,83 g/cm ³
Ethanol à 95%	Biochem. Mw: 46, 07. C ₂ H ₆ O. Assay/ density(20/20)
Hexane	Biochem. C ₆ H ₁₄ .
Hydroxyde de sodium	Biochem. 40%. Density: 2,1 g cm ⁻³
Hydroxyde de potassium	Biochem. KOH. 56,1056 g/mol Density : 2,04 g/cm ³

Tableau 02. Colorants et réactifs utilisés pour les analyses microbiologiques et enzymatiques

Colorants et réactifs	Caractéristiques
Agar	Pronadisa. Lab CONDA.
Bleu de méthylène	OSI Algérie. Solution aqueuse à 2%.C ₁₆ H ₁₈
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cheminova International SA
Extrait de levure	Pronadisa. Lab CONDA. Yeast Extract
Fuchsine	Merck. Fuchsine phéniquée en solution selon Ziehl- Neelsen. CI: 42520-42510.C ₆ H ₅ OH.1L=0,99kg.
Glycérol	Biochem : Chemopharma : C ₃ H ₈ O ₃ Assay % : Min 99,0 Density (20/4) :1,262 Heavy metals (as Pb)% : Max 0,0001 Iron(Fe)%: Max 0,0001
Lait écrémé	Candia Silhouette
Lugol	CRESCENT Diagnostics
peptone	Pronadisa. Lab CONDA.
Phénol	Fluka Chemik.C ₆ H ₆ O.Mr:94:11
Tryptone	Pronadisa. Lab CONDA.
Violet de gentiane	Biochem: Chemopharma Assay%: 96-100,5 Residue on ignition%: Max 1,5 Alcohol insoluble substances: Max 1 Arsenic %: Max 0,001 Lead(Pb) %: Max 0,003 Zinc(Zn) %: Max 0,001 Water content%: Max 7,5

Tableau 03. Milieux de culture utilisés pour les analyses microbiologiques

Milieux	Caractéristiques
Eau peptonnée tamponnée	Institut Pasteur d'Algérie Formule en g/l d'eau distillée Peptone de viande : 10 Chlorure de sodium : 05 Tampon phosphate : 10 pH:7,2±0,2
PCA	Institut Pasteur d'Algérie. Gélose PCA
OGA	Institut Pasteur d'Algérie
Gélose M17	Pronadisa. Lab CONDA. Formule en g /l d'eau distillée Glycérophosphate sodique : 19 Peptone de soja : 5 Extrait de viande : 5 Lactose : 5 Peptone de viande : 2,5 Peptone de caséine : 2,5 Extrait de levure : 2,5 Acide ascorbique : 0,5 Sulfate de magnésium : 0,2 Agar bactériologique : 12,75 pH : 6,9±0,2. 55g/l
Gélose MRS	BIOKAR Diagnostics. Journal 04-01-1978/ISO 7889- IDF 117/2003/ISO 9232-IDF 146:2003. Composition Polypeptone:10g Extrait de viande: 10g Extrait autolytique de levure : 5g Glucose : 20g Tween 80 : 1,08ml Phosphate dipotassique : 2g

	Acétate de sodium : 5g Citrate d'Ammonium : 2g Sulfate de magnésium : 0,2g Sulfate de manganèse : 0,05g Agar : 15,0g 70,3g/l. pH 5,7±0,1
Mannitol-Mobilité	Institut Pasteur d'Algérie
Bouillon MRS	Institut Pasteur d'Algérie
Triple Sugar Iron (TSI)	Institut Pasteur d'Algérie
Citrate de Simmons	Institut Pasteur d'Algérie

Tableau 04. Sucres utilisés pour les analyses microbiologiques et enzymatiques

Sucres	Caractéristiques
Amidon	Gmbh: Ultra Tex-2 National starch and chemical
Glucose	Biochem. Chemopharma $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$. M=188,17g/mol

Annexe 02. Composition des milieux de culture

Tableau 01. Milieux de culture utilisés pour l'isolement, la purification et la conservation des souches.

Milieux	1	2	3
Constituants	Quantités (%p/v, v/v)		
Extrait de pomme de terre		100	
Extrait de levure	0,25		0,5
Peptone	0,5		
Glucose	0,1	2	2
Agar	1,5	2	1,6
Eau distillée	100	100	100

Milieu 1 : PCA (Guiraud, 2003) ; **Milieu 2 :** PDA (Botton *et al.*, 1985) ; **Milieu 3 :** OGA (Guiraud, 2003).

Tableau 02. Milieux de culture utilisés pour la caractérisation

Milieux	1	2	3	4	5
Constituants	Quantités (%p/v, v/v)				
Extrait de viande		1	1	0,3	
Extrait de levure		0,5	0,5	0,3	
Peptone	2	1	1	2	
Mannitol	0,2				
Rouge de phénol	0,004			0,0025	
Bleu de bromothymol					8
Nitrate de potassium	0,1				
Glucose		2	2	0,1	
Lactose				1	
saccharose				1	
Tween 80		0,1	0,1		
NaCl		4	6,5	0,5	0,5
Phosphate monoammonique					0,1
Phosphate dipotassique		0,2	0,2		0,1
Acétate de sodium		0,5	0,5		
Citrate triammonique		0,2	0,2		
Sulfate de magnésium		0,02	0,02		0,02
Sulfate de manganèse		0,005	0,005		
Citrate de fer				0,05	
Citrate de sodium					0,2
Hyposulfite de sodium				0,05	
Agar	0,4			1,2	1,2

Milieu 1 : Mannitol-mobilité (Guiraud, 2003) ; **Milieu 2** : Bouillon MRS à 4% NaCl (Guiraud, 2003) ; **Milieu 3** : Bouillon MRS à 6,5% NaCl (Guiraud, 2003) ; **Milieu 4** : TSI (Guiraud) ; **Milieu 5** : Citrate de Simmons (Guiraud, 2003).

Tableau 03. Milieux de culture utilisés pour la recherche des activités enzymatiques

Milieux	1	2	3	4	5	6	7
Constituants	Quantités (%p/v, v/v)						
Extrait de pomme de terre	100	100					
Glucose	2	2					
Gélatine				2			
Peptone						1	0,2
Tryptone			0,5				
Amidon	0,5	1	0,5				
Tween 80						1	1
Extrait de levure			0,2				0,1
Lait écrémé					3		
NaCl			0,5			0,5	
CaCl ₂ 2H ₂ O						0,01	
Agar	2	2	1,5		2	2	3
Eau distillée	100	100	100	100	100		100

Milieu 1 : Milieu PDA à 0,5% (Nwagu et Okolo, 2011) ; **Milieu 2** : Milieu PDA à 1% (Tatsinkou et al. 2005) ; **Milieu 3** : milieu gélose à l'amidon (Thapa et al., 2006) ; **Milieu 4** : Solution gélatine (El-Kady et al., 1984) ; **Milieu 5** : Gélose au lait écrémé (Juszczyk et al., 2005) ; **Milieu 6** : Milieu d'activité lipolytique des moisissures et levures (Tehreema et al., 2011) ; **Milieu 7** : Milieu d'activité lipolytique des bactéries lactiques (Sierra, 1957).

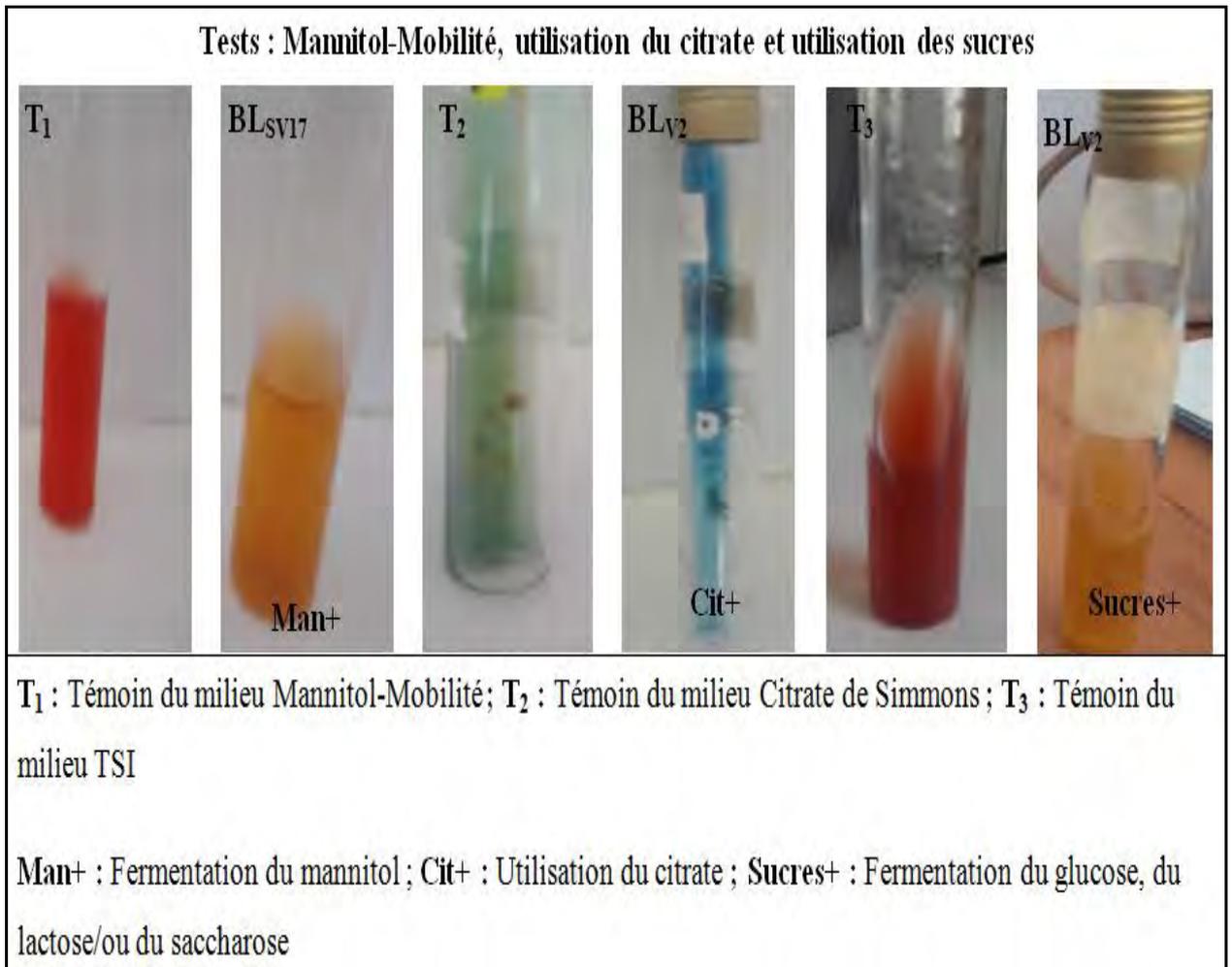


Figure 01. Exemple de souches lactiques cultivées sur trois milieux

Résumé

En Algérie, le blé était fermenté dans le *MATMOUR* (silo souterrain), Cette technique commence à disparaître en raison de la sédentarisation des populations agricoles dans les zones urbaines. Aujourd'hui, la fermentation est réalisée dans des fûts en plastique ou en métal. Durant le processus de la fermentation, le blé est soumis par l'action des microorganismes et/ou des enzymes, à des changements biochimiques désirables. Dans ce contexte, notre étude a ciblé deux échantillons de blé fermentés, dans des fûts avec (BFV) ou sans vinaigre (BFSV), durant 15 mois. Elle a pour but d'évaluer la composition biochimique, de mettre en évidence la flore microbienne et leurs hydrolases extracellulaires respectives (amylases, protéases et lipases).

L'étude comparative de la composition biochimique, entre les résultats de nos échantillons et celles d'un blé non fermenté (selon les références des auteurs), a permis de distinguer des modifications significatives surtout au niveau des lipides et de l'amidon au sein des échantillons de blé fermentés. L'amidon constitue le substrat le plus dégradé durant le processus de la fermentation, en raison de la richesse du blé en ce constituant.

L'analyse microbiologique, nous a permis d'isoler, 07 souches de moisissures, 3 isolats de levures et 40 isolats de bactéries lactiques. L'étude de propriétés présentées par ces souches, a permis de les classer parmi neuf genres: *Penicillium* (6 isolats), *Mucor* (1 isolat), *Saccharomyces* (1 isolat), *Candida* (1 isolat), *Pichia* (1 isolat), *Pediococcus* (6 isolats), *Streptococcus* (8 isolats), *Lactococcus* (13 isolats) et *Lactobacillus* (13 isolats).

La mise en évidence de leurs activités enzymatiques a montré que la majorité des isolats de la flore fongique (moisissures et levures) sont amylolytiques (moisissures : 5 isolats ; levures : 1 isolat), protéolytiques (moisissures : 4 isolats ; levures : 1 isolat) et lipolytiques (moisissures : 5 isolats ; levures : 1 isolat). Chez les 40 isolats de la flore lactique, les activités enzymatiques relevées sont de type amylolytique (12 isolats) et protéolytique (27 isolats) avec une dominance de l'activité protéolytique.

Mots clés : Blé fermenté, fûts, isolements, moisissures, levures, bactéries lactiques, hydrolases microbiennes

Abstract

In Algeria, the wheat was fermented in the *MATMOUR* (underground silo); this technique starts to disappear because of settlement of the farming populations in the urban areas. Today, fermentation is carried out in metal or plastic barrels. During the process of fermentation, the wheat is subjected by the action of the micro-organisms and/or the enzymes, with desirable biochemical changes. In this context, our study targeted two fermented wheat samples, in barrels with or without vinegar, during 15 month. The purpose of it is to evaluate the biochemical composition, to demonstrate the microbial flora and their extracellular enzymes such as amylases, proteases and lipases.

The comparative study of the biochemical composition, between the results of our samples and those of a wheat not fermented (according to the references), made it possible to distinguish from the significant modifications especially on the level of the lipids and the starch within the fermented wheat samples. The starch constitutes the substrate more degraded during the process of fermentation.

The microbiological analysis enabled us to isolate, 07 isolates of moulds, 3 isolates of yeast and 40 isolates of lactic acid bacteria. The study of the properties of the isolates supported their ranking among nine kinds: *Penicillium* (6 isolates), *Mucor* (1 isolate), *Saccharomyces* (1 isolate), *Candida* (1 isolate), *Pichia* (1 isolate), *Pediococcus* (6 isolates), *Streptococcus* (8 isolates), *Lactococcus* (13 isolates) and *Lactobacillus* (13 isolates).

The description of their enzymatic activities showed that the majority of the isolates of the fungus flora (moulds and yeasts) are amyolytic (moulds: 5 isolates; yeasts: 1 isolate), proteolytic (moulds: 4 isolates; yeasts: 1 isolate) and lipolytic (moulds: 5 isolates; yeasts: 1 isolate). At the 40 isolates of the lactic flora, the raised enzymatic activities are amyolytic (12 isolates) and proteolytic (27 isolates).

Keywords: Fermented wheat, barrels, isolations, moulds, yeasts, bacteria, microbial hydrolases

ملخص

في الجزائر يتم تخمير القمح في المظمور (صومعة تحت الارض) بدأت هذه التقنية بالاندثار بسبب استيطان المزارعين في المناطق الحضرية حاليا يتم تخمير القمح في براميل بلاستيكية او معدنية خلال فترة التخمر يتعرض القمح بفعل للكائنات المجهرية او الانزيمات لتغيرات بيوكيميائية مرغوب فيها لذلك ركزت دراستنا على عينتين من القمح المخمر في براميل بلاستيكية مع او بدون اضافة الخل خلال خمسة عشر شهرا وذلك بهدف تقييم التغيرات البيوكيميائية مقارنة مع قمح غير مخمر البحث عن الكائنات المجهرية وانزيماتها الاماهية لنا دراسة التركيبية البيوكيميائية لعينتين من القمح المخمر مقارنة مع قمح غير مخمر بملاحظة تغيرات سمحت خاصة على مستوى الدهون والنشاء باعتبار ان القمح غني بعنصر النشاء فقد كان اكثر عنصر معرض للهدم خلال التخمر

سمحت لنا الدراسة الميكروبيولوجية بعزل سبع فطريات ثلاث خمائر واربعين بكتيريا لبنية سمحت لنا دراسة خصائصها بتصنيفها ضمن تسع اصناف بنسيليوم (ست عزلات) ميكور (عزلة واحدة) ساكارومييساز (عزلة واحدة) كندية (عزلة واحدة) بيشيا (عزلة واحدة) بيديوكوكيس (ست عزلات) ستربتوكوكيس (ثمان عزلات) لاكتوكوكيس (ثلاثة عشر عزلة) لاكتوياسيليس (ثلاثة عشر عزلة) سمحت لنا دراسة انزيمات الاماهة لدى العزلات باستخلاص ان العزلات هم محللين للنشويات (فطريات خمس عزلات خمائر عزلة واحدة) ومحللين للبروتينات (فطريات: اربع عزلات، خمائر: عزلة واحدة) محللين للدهون (فطريات: خمس عزلات، خمائر عزلة واحدة) من ضمن اربعين عزلة من البكتيريا اللبانية النشاط الانزيمي لال حظ هو محلل للنشويات (ثلاث عشر عزلة) ومحلل للدهون (اثنتان) وعشرين عزلة)

اللممات اللمتاحة:

قمح مخمر ببراميل، عزلات، فطريات، خطر بلعقي بيبيية، انزيمات الاماهة.