



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique



Université des frères Mentouri Constantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الميكروبيولوجيا

Département de Microbiologie

Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie fongique/ fermentation et production de substances fongiques

Intitulé :

Kéfir : Production des grains et mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Présenté et soutenu par : BRIHMETTE Radja

Le : 06 juillet 2017

CHAOUA Samah

Jury de soutenance

Présidente du jury : Mme. MIHOUBI I.

Prof.UFM.Constantine.

Encadreur : Mr. KACEM CHAOUACHE N.

Prof.UFM.Constantine.

Examinatrice : Mme. CHERFIA R.

MAA.UFM.Constantine.

Tutrice : Mme. BENHASSINE S.

Dr.UFM.Constantine.

Année Universitaire
2016-2017

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui, de près ou de loin, nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Tout d'abord nous remercions Mme. MIHOUBI d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.

Nous remercions tout particulièrement Mr. KACEM CHAOUCHE, qui, en tant qu'encadreur, s'est toujours montré à l'écoute, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre tutrice Mme.BENHASSINE pour le temps qu'elle nous a consacré, ses conseils et son suivi.

Nous n'oublions pas Mme KARA ALI que nous lui devons de grands remerciements pour sa collaboration, sa gentillesse et ses directives précieuses.

Nous serons toujours reconnaissantes envers tous les consultants et le staff de LaMyBAM rencontrés lors du travail élaboré et qui ont accepté de répondre à nos questions avec gentillesse et générosité y compris Mme.CHERFIA qui a également accepté d'examiner ce travail.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Avec l'aide du dieu le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce
modeste travail que je dédie :

À Mon père Mr. Brihmet Tahar

Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te
donne santé et longue vie.

A Ma mère Mme. Matmat Fatima

Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide
précieuse et toutes ces années de compréhension.

A ma sœur Asma et son mari Tahar et ses enfants Haider et Amir, Ma sœur Hasna et
son mari Moussa et leur petit Adem, ma sœur Lina

Pour toute l'affection qu'ils m'ont donnée et pour leurs précieux encouragements.

A mon frère Amar, mon ange gardien dans les moments les plus délicats dans ma vie.

A mon cher mari Mr. Messadi Malik pour tous ses encouragements et son soutien, avec
tout mon amour, merci pour tout.

A mes chers oncles : Rabah, Hassen Et A mes chères tantes : Bariza, Chahrazed, fatima,

Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent. Vous comble de
bonheur, de santé, de succès et de prospérité dans votre vie.

A mes belles sœurs : chahrazed, meriem, samia, sabah.

A mes beaux-frères : rabah, issam, halim et bilel.

A Ma chère amie et mon binôme Samah.

A mes très chères amies : besma, laila, sara

En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liés et des bons moments passé ensemble je
vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux

A tous les membres de ma famille et mes collègues aussi à beaucoup d'autres personnes
que je n'ai pas eu l'occasion de les mentionner.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents,

*A ma tendre mère qui n'a pas cessé de m'encourager et de
prier pour moi,*

*A mon papa chéri qui m'a appris d'avoir confiance en moi et qui
m'a toujours pousser à aller de l'avant.*

*A mes très chers frères qui étaient, qui sont et qui seraient
toujours la pour me soutenir.*

A mes adorables amies Amira, Amina, Assia, Meriem et Radia.

A mes collègues Khadidja et Rokeya.

*A mon fiancé et à toute ma belle famille pour leur
encouragement et affection.*

Samah

Table des matières

1-Introduction	1
2- Revue bibliographique	3
2.1- Généralité sur les grains du kéfir	3
2.2- L'origine et l'historique du kéfir	3
2.3- Statistiques sur la consommation du kéfir	4
2.4- Structure des grains de kéfir	5
2.5- La microflore des grains de kéfir	6
2.5.1- Relations entre les microorganismes du kéfir	7
2.6- Formation et production des grains de kéfir	8
2.7- Qualité des grains de kéfir	9
2.8- Procèdes de fabrication.....	9
2.8.1-Préparation à partir d'une culture mère	9
2.8.2- Préparation à partir du kéfir lui-même.....	10
2.8.3- Fabrication industrielle	10
2.8.4- Conservation et entretien	10
2.8.5- Méthode de préparation du kéfir	10
2.9- Composition du Kéfir	11
2.9.1- Le lait	11
2.9.2- Acides organiques	11
2.9.3- Le Lactose.....	12
2.10- Bienfaits du Kéfir	12
2.11- Activité antibactérienne	13
2.11.1- <i>Escherichia coli</i>	13

2.11.2- <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.11.3- <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.11.4- <i>Candida albicans</i>	14
2.11.5- <i>Aspergillus flavus</i>	15
3-Matériel et méthodes	16
3.1- Isolement de la microflore du Kéfir et des grains du Kéfir	16
3.1.1- Origine et maintenance du grain de kéfir GK	16
3.1.2- Isolement des microorganismes à partir du lait fermenté	17
3.1.3- Isolement des microorganismes à partir des grains de Kéfir « GK.....	17
3.1.4- Isolement de la microflore du Kéfir reproduit « GKS»	18
3.1.5- Méthode d'ensemencement à partir du lait et des grains de kéfir	19
3.1.6- Purification des souches.....	20
3.2- Etude de l'activité antimicrobienne.....	20
3.2.1- Réactivation des souches test	20
3.2.2- Préparation des échantillons de lactosérum	21
3.2.3- Test d'antagonisme.....	21
3.2.3.1- Test d'antagonisme à partir du lactosérum	21
3.2.3.2- Test d'antagonisme à partir des grains de Kéfir	22
3.2.3.3- Test d'antagonisme à partir de souches isolées du lait fermenté et des grains de kéfir	22
4- Résultats	23
4.1- Isolement de la microflore du Kéfir et des grains du Kéfir	23
4.2- Production des grains de Kéfir	28
4.3- Etude de l'activité antimicrobienne.....	28
4.3.1- Test d'antagonisme à partir du lactosérum	29

4.3.2- Test d'antagonisme à partir des grains de Kéfir.....	30
4.3.3- Test d'antagonisme à partie des souches isolées du kéfir et des grains de kéfir GK	31
4.3.4- Test d'antagonisme à partie des souches isolées du kéfir et des grains de kéfir GKS	33
5-Discussion	35
6-Conclusion	45
7-Résumés	47
9-références bibliographique	49
10- Annexe	

Liste des abréviations

APM : acétobacter peroxydant medium

BK : bouillon de kéfir

ECEH : *Escherichia coli* enterohémorragique

EPS : exopoly saccharide

GK : grains de kéfir

GKS : grains de kéfir de sac

LB : lactobacilles

LS : lactosérum

LSS : lactosérum de sac

MRS : Gélose de Man, Rogosa, Sharpe

PCA : agar-plate count

SHU : syndrome hémolytique et urémique

SNLS : surnageant de lactosérum

SNLSS : surnageant de lactosérum de sac

STEC : *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

YPG : Yeast , Peptone, Glucose

Liste des tableaux

Tableau 1 : Conditions de culture appliquées pour l'isolement et l'énumération des groupes microbiens du grain.....	20
Tableau 2 : Tableau représentant quelques aspects morphologiques de colonies développées sur les milieux sélectifs choisis, isolées à partir des échantillons de laits fermentés de grains de Kéfir	25
Tableau 3 : Tableau déterminant les souches isolées des différents échantillons	26
Tableau 4 : résultat du test d'antagonisme des lactosérums des grains GK et GKS, sur les souches test choisies.....	29
Tableau 5 : résultat du test d'antagonisme des grains GK et GKS, sur les souches test choisies.....	30
Tableau 6 : résultats du test d'antagonisme des souches isolées du Kéfir et de grains du Kéfir GK sur les microorganismes test.....	32
Tableau 7 : résultats du test d'antagonismes des souches isolées du Kéfir et de grains de Kéfir GKS sur les microorganismes test.....	34

Liste des figures

Figure 1 représenté la structure de grains de kéfir	5
Figure 2 Illustration d'un grain de kéfir en grossissement de 7000 X.....	17
Figure 3 Grain de Kéfir (GK).....	16
Figure 4 Kéfir mis en fermentation	16
Figure 5 Echantillons préparés à partir du lait fermenté	17
Figure 6 Récupération des grains de Kéfir	18
Figure 7 Grains de Kéfir désinfectés	18
Figure 8 Processus de production des grains de Kéfir.....	18
Figure 9 Ensemencement des Grains de Kéfir GK	19
Figure 10 Préparation de l'échantillon du lactosérum.....	21
Figure 11 Récolte des grains de Kéfir produits GKS	28



Introduction

1- Introduction

Les laits fermentés sont des produits traditionnels qui ont été développés dans le monde entier, afin de répondre au besoin de prolonger le temps de conservation du lait. De nos jours ils sont fabriqués à une échelle industrielle au moyen de souches microbiennes sélectionnées et d'équipements modernes. Ce sont des fractions essentielles de l'alimentation de divers peuples d'Europe mais également d'Asie et d'Afrique. Parmi ces produits, le **kéfir**, un lait fermenté d'origine caucasienne, qui a été largement utilisé dans le traitement de la tuberculose, les tumeurs et Les troubles gastro-intestinaux (Sezginer, 1980). Dès leur enfance, Les habitants du Caucase boivent le **Kéfir** comme de l'eau et vivent en moyenne jusqu'à l'âge de 110 ans, c'est la seule région au monde où les habitants atteignent cet âge en étant en bonne santé (Kocak et Gursel, 1981; Rosi, 1978). Le **kéfir**, doit sa particularité et son goût spécifique à une association de bactéries lactiques, de bactéries acétiques et de levures. En effet, Les « **grains de kéfir** » avec lesquels nous réalisons l'agréable boisson appelée **Kéfir**, et qui se formaient exclusivement dans la région du Caucase, sont des agrégats de nombreuses espèces de micro-organismes vivant en symbiose, agglutinés par un unique hydrosoluble exopolysaccharide appelé *Kéfiran* (Toba *et al.*, 1990; Yokoi *et al.*, 1991) ; ainsi, le docteur Jones professeur en diététique et nutrition à l'Université Mc Gill de Montréal (Canada), cite le **Kéfir** comme exemple d'aliment fonctionnel de type probiotique (Jones, 2002).

Depuis quelques années, les études scientifiques commencent à s'intéresser aux bénéfiques que le **kéfir** aurait sur la santé humaine, entre autres son effet antitumoral (Shiomi *et al.*, 1982), la stimulation des sécrétions gastriques et de la formation des acides chez les patients atteints de tuberculose pulmonaire (Evenshtein, 1978), traitement des ulcères duodénaux et peptiques (Batinkov, 1971) ; Safonova *et al.* (1979) ont étudié aussi son effet hypocholestérolémique et ils l'ont recommandé aussi pour les enfants prématurés...

Par ailleurs, seulement un petit nombre d'études et peu d'information sur l'activité antimicrobienne du Kéfir ont été publiés ; En effet, depuis l'utilisation des antibiotiques il ya 50 ans, plusieurs microorganisme ont développé une résistance (Martinez et Baquero, 2002), c'est a cause de ça, que des efforts se faisaient afin de

développer de nouveaux composés antimicrobiens en dehors des antibiotiques, en l'occurrence des probiotiques.

De ce fait, la recherche de l'activité antibactérienne et antifongique du Kéfir et du grain de Kéfir a fait l'objectif de notre travail, pour ce faire, plusieurs axes sont visés, à savoir:

- l'isolement des groupes microbiens à partir du Kéfir et des grains du Kéfir.
- La production des grains de Kéfir au laboratoire.
- La mise en évidence de l'activité antimicrobienne du Kéfir et de son origine.



Revue
bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- Généralité sur les grains du kéfir

Le kéfir est un lait fermenté acidulé, produit principalement à partir des laits de vache, de brebis ou de chèvre à l'aide de « grains de kéfir ».

La région d'origine de cette boisson est le Sud du Caucase où on la prépare jusqu'à nos jours, sous des noms très variés. La dénomination la plus fréquente est « kéfir » qui est d'origine turque (Horvath, 1968).

Dans les grains de kéfir on est en présence d'une association entre plusieurs groupes microbiens : des streptocoques mésophiles, des leuconostocs, des lactobacilles mésophiles ou thermophiles, des levures et des bactéries acétiques (Moulin *et al.*, 1977). A l'échelle industrielle, les ferments acceptés pour la préparation du kéfir sont les levures fermentant le lactose, les lactobacilles, les streptocoques lactiques et les grains de kéfir. Chaque groupe microbien, suivant ses propriétés physiologiques, prédomine pendant une phase différente de la préparation du kéfir.

Les streptocoques lactiques mésophiles produisent de l'acide lactique au début de la fermentation. Ensuite, le développement des lactobacilles augmente l'acidité qui diminue la population des streptocoques. Les leuconostocs se multiplient plus lentement (Merilainen, 1984). Les levures et les bactéries acétiques se développent plus tardivement par rapport aux bactéries lactiques (Koroleva, 1982).

2.2- L'origine et l'historique du kéfir

L'origine du mot "kéfir" vient du mot turc "*keif*", dont la signification est «...Sensation de bien-être après l'avoir bu » en se référant à se sentir en bonne santé après sa consommation (Chaitow and Trenev, 2002).

L'histoire du kéfir remonte bien avant l'écriture. Anciennement, les bergers nomades transportaient le lait de chèvre, de moutons et d'autres animaux dans des sacs de peau durant leurs voyages (Farnworth, 2005). Dans les préparations traditionnelles, le lait macérait dans une outre, en présence d'un fragment d'estomac de mouton, de veau ou de chèvre. Après coagulation, on remplaçait le produit par du lait frais, et ceci pendant quelques semaines au

bout desquelles apparaissait peu à peu sur la paroi interne de l'outre une croûte spongieuse et blanchâtre. Celle-ci, divisée et séchée, constitue les grains de kéfir. La fermentation qui prenait place dans ces sacs transformait le lait en un breuvage épais avec un goût unique que l'on appelle kéfir. La bactérie et les levures présentes dans ce sac, en même temps, combinées avec des protéines de lait, forment une masse de micro-organismes vivants qui est utilisée pour transformer le lait en kéfir.

Les peuples nomades sont les premiers qui utilisaient le kéfir comme complément dans leur régime alimentaire constitué de viande et surtout de végétaux (millet, blé...). (Anonyme, 2008)

La préparation du kéfir était un savoir-faire réservé aux femmes, qui observaient les effets bénéfiques du kéfir sur les maladies infantiles. Elles remarquaient la meilleure résistance des adultes aux agressions extérieures et enfin elles constataient la vitalité de leurs anciens. Dans un premier temps le kéfir est utilisé en tant que boisson mais il est devenu très vite un ingrédient précieux pour l'alimentation quotidienne et pour le maintien de l'équilibre nutritionnel par conséquent et pour la première fois dans ces régions, on a vu apparaître des centaines.

Au cours des siècles, les grains de kéfir ont été légués de génération en génération. Les grains étaient donnés seulement aux personnes qui comprenaient les méthodes de conservation et le soin qu'ils devaient déployer pour garder ces précieux grains (Kemp *et al.*, 1984).

2.3- Statistiques sur la consommation du Kéfir

Le kéfir serait dans les pays de l'Est la boisson la plus populaire... après la vodka. Chiffrée, la consommation annuelle moyenne de kéfir en Union Soviétique était estimée à quelque 5 litres par personne dans les années 80 (Kosikowski, 1982). En 1997, les seuls Moscovites en auraient consommé quotidiennement 400 tonnes (Reynaud, 1997). Dans ces pays, la demande en kéfir en justifiait une production à l'échelle industrielle : en 1981, Lacrosse rapporte que des laiteries roumaines produisaient jusqu'à 100.000 litres de kéfir par jour, tandis qu'une centaine de laiteries polonaises en produisaient respectivement 22 et 32 millions de litres en 1982 et en 1988 (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990). Aujourd'hui, de grands groupes laitiers comme Danone ou Valio investissent dans des lignes locales de production de kéfir (Anonyme Groupe Danone, 2006 ; Anonyme Valio, 2007). Le groupe Danone, qui occupe une place prépondérante dans le marché des produits laitiers frais, a bien compris

l'attachement des populations de l'Est au kéfir. Pour tenir compte des habitudes alimentaires locales, Activia, un de ses produits phares, a été réinterprété : le yaourt au bifidus actif que l'on connaît chez nous est ainsi devenu un lait fermenté de type kéfir pour le marché russe (Anonyme Groupe Danone, 2007).

Le kéfir est connu bien au-delà des frontières soviétiques, comme en témoigne la provenance des grains utilisés dans les études publiées. Ces grains ont en effet été collectés auprès de particuliers habitant des pays aussi divers que l'Afrique du Sud (Witthuhn *et al.*, 2004), Taiwan (Kuo & Lin, 1999), l'Argentine (Garrote *et al.*, 1998), le Portugal (Pintado *et al.*, 1996), l'Espagne (Angulo *et al.*, 1993), la France (Vayssier, 1978), l'Irlande (Rea *et al.*, 1996), l'Allemagne (Neve, 1992) ou la Belgique (Ninane *et al.*, 2005).

2.4- Structure des grains de kéfir

Les grains de kéfir sont décrits comme étant de "petites masses ridées, à consistance gélatineuse, de grosseur variable" (Jamotte, 1974), des "granules irréguliers gélatineux, blanchâtres ou jaunâtres, de la taille d'une noix" (Kosikowski, 1982) ou encore de "petites masses blanches élastiques, en forme de chou-fleur" (Pidoux, 1984), insolubles dans l'eau et dans la plupart des solvants. A l'état frais, ils sont blanchâtres et rappellent le « pop-corn» (Ottogalli *et al.*, 1973).

Si l'apparence d'un chou-fleur est souvent évoquée pour décrire des grains de kéfir, la dimension des grains de kéfir est variable et homogène ou hétérogène au sein d'un lot selon qu'ils sont petits ou plus gros. Les grains de Bottazzi et Bianchi (1980) ont 2 à 3 mm de diamètre tandis que ceux d'Abraham et De Antoni (1999) ont un diamètre compris entre 1 et 40 mm.



Figure1 représenté la structure de grains de kéfir (anonyme, 2009)

2.5- La microflore des grains de kéfir

La composition microbienne de grains de kéfir met en lumière une microflore complexe, souvent composée de plusieurs espèces de bactéries lactiques et de levures, parfois associées à d'autres micro-organismes. La microflore identifiée à partir de grains de kéfir comprend de nombreuses espèces, associées dans les grains de kéfir en diverses combinaisons.

Parmi les bactéries lactiques, la majorité des espèces appartient au genre *Lactobacillus*. Elle inclut des espèces homofermentaires: *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens* ; et des espèces hétérofermentaires facultatives ou obligatoires : *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefiri*, *Lb. paracasei*, *Lb. parakefiri*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*. Les autres bactéries lactiques, représentées dans une moindre diversité d'espèces que les lactobacilles, appartiennent aux genres homofermentaires *Lactococcus* (*L. lactis*), *Pediococcus* et *Streptococcus* (*St. thermophilus*) ainsi qu'aux genres hétérofermentaires *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis*) et *Weissella* (*W. viridescens*) (Ninane, 2008).

Les levures isolées à partir des grains comprennent de nombreuses espèces incapables de fermenter le lactose : *Candida friedrichii*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Candida tenuis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torasporula delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces sp.*, et seulement deux espèces capables de fermenter le lactose : *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus* (Ninane, 2008).

Les autres micro-organismes, identifiés occasionnellement dans des grains de kéfir, comprennent des bactéries d'intérêt alimentaire : *Acetobacter sp.* et *Micrococcus sp.* et des bactéries contaminantes : *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* et *Sphingobacterium sp.* (Ninane, 2008).

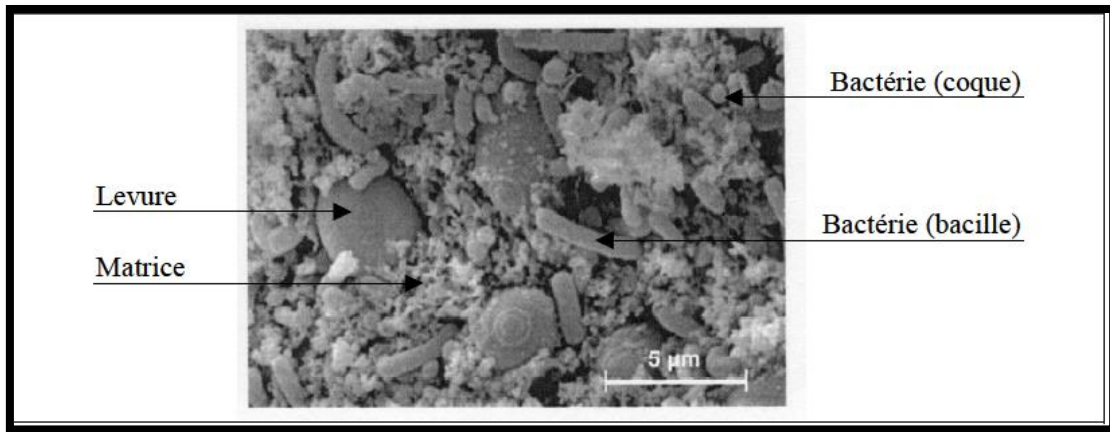


Figure 2 Illustration d'un grain de kéfir en grossissement de 7000 X (Guzel-Seydim *et al.*, 2005). Reproduit avec l'aimable autorisation de Wiley-Blackwell Publishing (Oxford, UK).

2.5.1- Relations entre les microorganismes du kéfir

Le kéfir représente une association typique de groupes microbiens ayant des demandes différentes pour les facteurs de croissance. Les lactobacilles et les levures sont étroitement liés à bénéfices réciproques. Les levures produisent probablement des facteurs de croissance tels que la riboflavine et l'acide folique qui paraissent indispensables pour la synthèse d'un polysaccharide bactérien participant à la structure du grain. A titre d'exemple, *Lactobacillus brevis*, qui produit du polysaccharide en présence d'extrait de levure, ne se développe dans du lait non supplémenté qu'en présence de *Saccharomyces delbrueckii*, levure isolée du kéfir (La Riviere *et al.*, 1967). Les levures, en s'autolysant, libèrent des acides aminés et des facteurs de croissance permettant la survie et la multiplication des lactobacilles qui ont des difficultés à utiliser les acides aminés et la caséine du lait. La synthèse par les bactéries lactiques d'une 13-galactosidase (lactase) qui hydrolyse le lactose favorise les levures, si celles-ci ne peuvent pas utiliser ce sucre contrairement au glucose et/ou au galactose qui en résultent (Jacquet et Thevenot, 1961 ; Rosi, 1978; Rosi et Rossi, 1978).

Le rôle des bactéries acétiques paraît aussi intéressant (Rosi et Rossi, 1978). Elles synthétisent la vitamine B12 et oxydent l'acide lactique produit durant la fermentation lactique et utilisent l'éthanol produit par les levures et les bactéries lactiques hétérofermentaires, pour la biosynthèse de l'acide acétique. Le tamisage du caillé sélectionne la population des grains, puisque les microorganismes qui n'y sont pas bien attachés restent dans le lait fermenté (La Riviere *et al.*, 1967). Koroleva (1982) rapporte que les relations établies entre les microorganismes du kéfir sont responsables de certaines propriétés d'intérêt industriel.

2.6- Formation et production des grains de Kéfir

Les données bibliographiques concernant la production traditionnelle du Kéfir sont insuffisantes. Le mécanisme de formation des grains de kéfir reste à ce jour méconnu. (Anonyme, 1983). Jamais un grain n'a pu être constitué *in vitro* à partir de cultures microbiennes. Les grains sont jusqu'à présent reproduits par fragmentation (Koroleva, 1988). Naturellement ou mécaniquement, des morceaux se détachent d'un grain existant et grossissent pour fournir à leur tour de petits grains. Dans la nature, le développement de bactéries en film flottant sur une surface liquide ou collé à une interface solide est fréquent. Dans ces structures, les bactéries sont assemblées dans une matrice de polymères qu'elles synthétisent. Les matrices des biofilms se composent d'éléments communs dont notamment des exopolysaccharides (Lasa, 2006). Ces exopolysaccharides bactériens ne sont généralement pas utilisés comme source énergétique par les micro-organismes qui les produisent ; la plupart d'entre-eux sont incapables de cataboliser le polymère qu'ils synthétisent. Les exopolysaccharides auraient plutôt une fonction écologique de protection vis-à-vis de facteurs de stress environnementaux et d'adhésion cellulaire (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Dans le processus de formation des biofilms, ils jouent un rôle prépondérant au niveau de l'adhésion des bactéries aux surfaces qu'elles colonisent (Cerning, 1990 ; Cammarota et Sant'Anna, 1998 ; Lasa, 2006).

Les microorganismes à l'origine de la synthèse de *kéfiran*, l'exopolysaccharide bactérien identifié dans les grains de kéfir, sont des lactobacilles. Observés en microscopie dans des extraits de grains de kéfir, les microorganismes enrobés d'une gangue mucoïdale en ont la morphologie caractéristique (la Rivière *et al.*, 1967). Parallèlement, les isolats de grains de kéfir capables de produire du *kéfiran* en culture pure sont tous des lactobacilles (la Rivière *et al.*, 1967 ; Toba *et al.*, 1986 ; Toba *et al.*, 1987 ; Yokoi *et al.*, 1990). Ceux isolés par les équipes de la Rivière et de Toba ont fait l'objet d'une identification plus précise et ont été assignés à deux taxons : *Lactobacillus brevis* (la Rivière *et al.*, 1967) et *Lb.kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (Fujisawa *et al.*, 1988 ; Vancanneyt *et al.*, 2004) respectivement. Ottogalli *et al.* (1973) attribuent cette propriété à *Lb. acidophilus* par déduction, après examen de la morphologie des cellules microbiennes identifiées dans le grain de kéfir étudié, mais une production de *kéfiran* par ces bactéries isolées en culture pure n'a jamais été établie.

2.7- Qualité des grains de kéfir

La qualité du kéfir devrait prendre en compte l'ensemble de ses propriétés, à savoir la composition chimique, la microflore (du point de vue quantitatif et qualitatif), les qualités rhéologiques et les caractères organoleptiques. Ainsi, est-elle liée à l'origine, à la composition et à la qualité du lait et des grains, mais aussi aux conditions de production et à la technologie utilisée (Zourari et Anifantakis, 1988).

La composition et les caractéristiques biochimiques du kéfir dépendent de la composition de la microflore, puisqu'elles résultent de son activité métabolique. Par conséquent, elles sont influencées par le temps d'incubation en présence des grains, la proportion entre les grains et le lait (dont la diminution favorise la plupart des microorganismes), l'utilisation simultanée des grains et du levain déjà prêt et le lavage des grains. Ce dernier, en éliminant une quantité importante des microorganismes acidifiants, ralentit l'acidification et réduit les taux d'acide lactique et d'acides volatils (Koroleva et Bavina, 1970).

Les qualités organoleptiques du kéfir sont associées aux modifications chimiques, résultant de l'activité microbienne des grains et du levain ; elles dépendent de processus de fermentation et de maturation.

2.8- Procèdes de fabrication

Pendant longtemps, le kéfir de lait fut préparé au foyer ou artisanalement. La production industrielle n'a débuté qu'au début des XIX et XX^e siècles. On additionne au lait pasteurisé refroidi 2 à 10% de grains. Il y aura une fermentation pendant 24 heures puis maturation. Les grains, récupérés par tamisage, peuvent être réutilisés pour un nouveau cycle de fermentation (Hencké, 2000).

2.8.1- Préparation à partir d'une culture mère

C'est la technique russe par excellence qui consiste à préparer extemporanément le ferment à partir d'un mélange de grains et de lait. Après 24 heures, le ferment est prêt, filtré puis mélangé à du lait frais pour une seconde fermentation de 12 à 18 heures (Hencké, 2000).

2.8.2- Préparation à partir du kéfir lui-même

Ce procédé consiste à ajouter du lait à du kéfir préparé par la technique précédente c'est à dire à la fin de la seconde fermentation, le lait fermenté joue le rôle de ferment pour une troisième fermentation de 8 à 20 h suivie d'une maturation très variable (12 h à 7j) (Roissart *et al.*,1994).

2.8.3- Fabrication industrielle

Le mode de fabrication traditionnel du kéfir ne convient pas à la production industrielle, vu que les quantités de grains de kéfir nécessaires seraient beaucoup trop importantes, ce qui est un inconvénient sur le plan de la production comme du point de vue de la qualité. C'est pourquoi en Europe occidentale, le grain de kéfir est remplacé par un levain. Les produits industriels sont beaucoup plus doux, le goût de levure y est moins marqué (Zourari et Anifantakis, 1988).

2.8.4- Conservation et entretien

Contrairement au yogourt, la préparation du kéfir n'exige pas que l'on réchauffe le lait. Le lait de vache ou de chèvre ou de brebis, peut être utilisé. Le kéfir se conserve toujours dans du lait, dans un récipient fermé. Si les grains de kéfir restent longtemps sans lait ou eau, ils se dégradent ; le surnageant doit être éliminer avant d'ajouter du lait frais et les grains doivent être rincés après chaque utilisation (Zourari et Anifantakis , 1988).

2.8.5- Méthode de préparation du kéfir

- Recouvrir les grains de Kéfir de lait en respectant les proportions suivantes : 250 ml grains de kéfir pour 1 litre de lait et fermer le récipient.
- Laisser fermenter à la température ambiante environ 24 heures ; pour un goût un peu piquant, laisser fermenter pendant plus longtemps sans dépasser 40 heures. À l'opposé, pour un goût plus doux, réduire le temps de fermentation.
- Passer au tamis les grains de kéfir. Le liquide recueilli sera le kéfir à consommer.
- Rincer les grains, de préférence une fois par semaine, avec une eau non chlorée.
- Recouvrir les grains de kéfir de lait en respectant les mesures données précédemment.
- Recommencer le processus mentionné ci-haut (Cyrill, 2009).

2.9- Composition du Kéfir

2.9.1- Le lait

Originellement, le kéfir était préparé à partir de lait de vache, de chèvre ou de brebis (Kosikowski, 1982). Il est aujourd'hui, généralement préparé à partir de lait de vache (Cyrill, 2009). La qualité du kéfir, tant au niveau du goût que de sa valeur nutritionnelle ou diététique, dépend de celle du lait et des transformations résultant de l'activité des différents micro-organismes présents dans le ferment. La diversité de la composition microbienne des ferments et des pratiques déterminant leur développement engendre une grande diversité de kéfirs. Les traits communs à ces kéfirs, mais développés avec des intensités variables, sont l'acidification, la présence d'un fond levuré, ainsi qu'une texture onctueuse et mousseuse. Au niveau sensoriel, le kéfir traditionnel est décrit comme étant plus onctueux et plus crémeux mais aussi plus acide et plus amer qu'un yaourt, lait fermenté mieux connu chez nous (Muir *et al.*, 1999).

2.9.2- Acides organiques

L'acide lactique du kéfir est presque exclusivement sous la forme de son isomère L(+), forme la plus assimilable par l'organisme humain. Les teneurs en acide lactique communément citées pour le kéfir, et confirmées par les mesures de Lacrosse (1970), sont comprises entre 6 et 10 g.l⁻¹ (Pidoux, 1984 ; Hallé *et al.*, 1994 ; Libudzisz et Piatkiewicz, 1990). Il semblerait cependant qu'elles puissent être beaucoup plus élevées : une teneur de 15 g.l⁻¹ a en effet été mesurée dans un lait fermenté à partir de grains argentins (Assadi *et al.*, 2000). Ces teneurs sont, dans l'ensemble, comparables à celles d'un yaourt. Ce dernier doit en effet avoir une teneur minimale en acide lactique de 7 g.kg⁻¹ (Norme FIL 163, 1992) et si possible comprise entre 10 g.kg⁻¹ et 13 g.kg⁻¹ (Loones, 1994), mais elle peut s'élever jusqu'à 17 g.kg⁻¹ (Muir *et al.*, 1999).

Le kéfir peut contenir des quantités relativement élevées d'acide acétique : 0,9 g.l⁻¹ alors que celle d'un yaourt est de 0,2 g.l⁻¹ (Muir *et al.*, 1999). Ce composé contribue probablement à la perception "acide" du kéfir.

2.9.3- Le Lactose

La quantité de lactose restant après fermentation varie, selon Hallé *et al.* (1994) de 20 g.l⁻¹ et 35 g.l⁻¹. Assadi *et al.* (2000) en mesuraient toutefois une quantité moindre dans un kéfir traditionnel : 14 g.l⁻¹.

Malgré la présence de lactose résiduel, le kéfir peut, selon Zourari et Anifantakis (1988), être consommé sans problème par les personnes intolérantes au lactose. A quantités égales, le lactose ingéré par l'intermédiaire de kéfir est effectivement mieux digéré et mieux toléré par l'homme adulte que celui ingéré par la consommation de lait (Hertzler et Clancy, 2003). Cette amélioration de la digestion et de la tolérance au lactose proviendrait de la libération, dans le tube digestif, de β -galactosidase microbienne.

2.10- Bienfaits du Kéfir

Plusieurs recherches se sont focalisées sur les bienfaits de la consommation du Kéfir, il a été utilisé dans les hôpitaux et les sanatoriums pour divers maladies entre autres les troubles métaboliques, les athéroscléroses et l'allergie dans l'ancien union soviétique (Koroleva, 1988). Il a même été utilisé dans le traitement de la tuberculose, le cancer et les troubles gastro-intestinaux lorsque les traitements modernes n'étaient pas encore disponibles ; il a été associé a la longévité dans la région du Caucase (Cevikbas *et al.*, 1994; Zourari et Anifantakis, 1988). La consommation régulière du Kéfir peut aider à soulager les problèmes intestinaux, favoriser leurs mouvements, réduit la flatulence et rend le système digestif plus sein. Il fournit des bactéries et des levures, des vitamines, des minéraux et des protéines bénéfiques pour le corps ; il renforce le système immunitaire, il a été consommé par les gens souffrant du VIH, du syndrome de fatigue chronique, Herpès et cancer. L'effet Immunologique (Furukawa *et al.*, 1990), antitumoral (Furukawa *et al.* 1991), antibactérien (Zacconi *et al.*, 1995) et hypocholestérolémique (Tamai *et al.*, 1996) du Kéfir ont été abordé dans des études récentes. Puisque le kéfir balance tout l'écosystème interne, il contribue directement à une santé optimale et à la longévité (Plantes, 2014).

Pour une guérison complète survenant au bout de 2 semaines à 2 mois de "cure" (Mireille, 2005) :

- Maladie des Nerfs ; Scléroses ; Ulcère de l'estomac, Maladie de la Vésicule, Asthme, Catarrhes Bronchiques ; Catarrhes vésiculaires, Maladie des Reins : 1 litre par jour.
- Anémie, Renouvellement du sang : 1 litre par jour, en cas grave : 2 litres par jour.
- Eruptions, Eczémas : 1/2 litre par jour, enduire au Kéfir et laisser sécher, puis laver à nouveau le matin .

2.11- Activité antimicrobienne

Des centaines de milliers de personnes tombent malades suite à une infection par plusieurs microorganismes chaque année, et des centaines d'entre elles meurent. Parmi ces microorganismes (*E.coli*, *B.subtilis*, *S.aureus*, *C.albicans*, *A.flavus*) ; Producteurs de Shiga-toxines (STEC), et des milliers de cas sporadiques de colite hémorragique (diarrhée sanglante), dont certains qui ont évolué en syndrome hémolytique et urémique (SHU) potentiellement mortel. Ces épidémies de STEC ont eu un impact significatif sur les systèmes de soins médicaux, la production agricole et le commerce dans de nombreux pays à travers le monde.

2.11.1- *Escherichia coli*

E. coli est une bactérie à Gram négatif, bacille qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches d'*E. Coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches d'*E. Coli* dites entérohémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec ces souches peuvent être également à risque (D'Ari et al., 2008).

Jusqu'à maintenant, l'ECEH de sérotype O157 : H7 est le plus souvent rapporté lors des éclosions de colites hémorragiques. Les quelques centaines d'autres sérotypes d'*Escherichia coli* sont actuellement moins souvent recherchés par les laboratoires, mais peuvent être responsables de maladies aussi graves (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012).

2.11.2- *Bacillus subtilis*

Une bactérie catalase-positif, Gram positif que l'on trouve habituellement dans le sol, mais c'est surtout une espèce ubiquitaire. Elle est aérobic stricte, sa température optimale est de 40 °C (espèce mésophile) et son type trophic est chimioheterotrophe. Enfin, son temps de génération est d'environ 26 minutes. Les conditions optimales de croissance de cette souche se situent pour un pH compris entre 5,5 et 8,5, et à une température de 10 °C à 50 °C. . Comme d'autres espèces, *B. subtilis* peut se constituer une coque protectrice dure (endospore) lui permettant de tolérer des conditions environnementales difficiles ou extrêmes. *B. subtilis* peut produire ou coproduire des biofilms qui peuvent abriter d'autres espèces, éventuellement pathogènes. Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. Ses spores peuvent survivre à de très hautes températures, telles que celles communément utilisées pour cuire les aliments. Elle peut être responsable de la présence de zones collantes ou gluantes dans le pain (Peter *et al.*, 2013).

2.11.3- *Staphylococcus aureus*

l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom. (George *et al.*, 2005).

2.11.4- *Candida albicans*

l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida* (Anonyme, 2007). *C.albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobic (Céline L ; 2007).C'est un organisme commensal saprophyte qui provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. Les candidoses orale et œsophagienne sont fréquentes chez le patient atteint du sida. Lorsque *Candida* s'infiltré dans le flux sanguin, l'infection devient

systémique et on parle alors de candidémie. Les candidémies sont caractérisées par une mortalité de l'ordre de 40 %. *C. albicans* peut donner également une multitude d'autres infections car il s'agit d'un pathogène opportuniste très polyvalent : il peut être responsable d'infection superficielle cutanée, causer un érythème fessier chez les nouveau-nés, une bronchopneumonie et, ou une pneumonie, une vaginite, une balanite ou être responsable d'infections profondes.(Dromer, 2013).

2.11.5- *Aspergillus flavus*

une espèce de champignon ascomycète, cosmopolite, *A. flavus* peut coloniser de nombreux substrats (Abdul et al., 1979).*Aspergillus flavus* est le principal producteur d'aflatoxines B1 (la plus importante), B2, G1 et G2. L'aflatoxine B1 est actuellement considérée comme le plus important agent carcinogène d'origine naturelle connu. D'autres mycotoxines sont produites : acideaspergillique, acidekojique (très toxique pour les animaux), flavicine, flavicidine, granegilline, orizazine, acideflavicidique (phytotoxique), acide β propionique, substancetrémorgénique (Bennett, 2010).



Matériel et méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail consiste à étudier principalement l'activité antimicrobienne du « **Kéfir et de ses grains déjà formés** », ainsi du « **Kéfir reproduit au laboratoire** », contre quelques agents bactériens et fongiques, connus comme étant pathogènes, présentant un danger potentiel sur la santé humaine.

Le développement de cette étude a eu lieu au cœur du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'activité Microbienne (**LaMyBAM**), Université des Frères Mentouri Constantine.

3.1- Isolement de la microflore du Kéfir et des grains du Kéfir

3.1.1- Origine et maintenance du grain de kéfir GK

Les grains de kéfir (**GK**) provenaient de la collection de l'association **EL FEDJR** d'aide aux personnes atteintes de cancer (Koubba, Alger), ces grains étaient transmis en Algérie de particulier à particulier depuis quelques années, par l'intermédiaire d'un médecin Allemand.

Dès leur acquisition, les grains de kéfir ont été cultivés à température ambiante dans du lait de vache cru provenant d'une ferme située à Ouled Rahmoune (Constantine), avec un taux d'ensemencement de 5 %. Le lait a été renouvelé après 72h à deux reprises puis des fermentations de 48h ont été réalisées successivement avec agitation de temps en temps. A l'occasion du renouvellement du lait, les grains étaient rincés à l'eau stérile et égouttés. Ces manipulations d'entretien des grains se faisaient à température ambiante (Ninane, 2008).



Figure 3 Grain de Kéfir (**GK**)



Figure 4 Kéfir mis en fermentation

3.1.2- Isolement des microorganismes à partir du lait fermenté

Cette étape a été réalisée afin d'isoler les différentes souches bactériennes et levuriennes présentes dans le Kéfir. Pour ce faire, 25 g de grains de Kéfir «**GK**» a été ajouté aseptiquement à 500ml de lait cru de vache, l'incubation a été réalisée à température ambiante pendant 48h. Cette étape a été répétée une fois afin de confirmer les résultats et d'éviter les contaminations.

Après fermentation, un échantillon de 1ml a été prélevé, et ajouté à 9ml d'eau physiologique stérile (9g d'NaCl dans 1litre d'eau distillée), afin d'obtenir une solution mère qui a servi à préparer des dilutions décimales de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} par l'ajout successif de 1 ml de la solution obtenue à 9ml d'eau physiologique stérile (Norme NF ISO 7218).

La méthode d'ensemencement, les milieux de culture utilisés ainsi que le temps d'incubation sont récapitulés dans **tableau 2**.



Figure 5 Echantillons préparés à partir du lait fermenté

3.1.3- Isolement des microorganismes à partir des grains de Kéfir «**GK**»

Cette étape consiste à mettre en évidence la flore des grains de Kéfir. En effet, après fermentation (**Section 3.1.2**), le lait fermenté a été filtré minutieusement, à travers une gaze stérile ; Les grains obtenus sont ensuite rincés soigneusement avec de l'eau distillée stérile puis désinfectés par de l'eau de Javel afin de conserver que la flore microbienne présente dans les grains (Tamime, 2006)

Ensuite, 1g de grains a été ajouté à 9 ml de l'eau physiologique afin de préparer une solution (Bouillon de Kéfir) « BK » ; Le tube a été agité à l'aide d'un vortex. (Simova *et al.*, 2002). L'ensemencement a été réalisé de la même manière, expliquée dans la section (3.2). Par ailleurs, une quantité des grains a été conservée à -4°C dans du lait en poudre pour un usage ultérieur.



Figure 6 Récupération des grains de Kéfir

Figure 7 Grains de Kéfir désinfectés

3.1.4- Isolement de la microflore du Kéfir reproduit « GKS »

En suivant la procédure la plus traditionnelle, une tentative de production des grains a été mise en place et ce, par l'introduction des morceaux de caillette de veau (3%) (Beijerinck, 1889), lavés et rincés à l'eau distillée stérile, dans un sac de peau contenant 3 litres du lait cru. Le sac a été alors gardé à température ambiante avec agitation de temps en temps, et la moitié de la quantité du lait a été renouvelée une seule fois entre deux fermentations de 72H (Ot-es et Cagindi , 2003).



Figure 8 Processus de production des grains de Kéfir

Après le temps d'incubation, le sac a été bien agité, avant qu'une quantité du lait ne soit versée dans une boîte de pétri stérile, et à partir de laquelle une prise de 1ml a été diluée dans un tube de 9ml d'eau physiologique, des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-3} de la suspension mère ont été ensuite réalisées de la même manière (Norme NF ISO 7218). Cette même procédure a été répétée pour une deuxième quantité de lait versée après une deuxième agitation du sac.

3.1.5- Méthode d'ensemencement à partir du lait et des grains de kéfir

Les groupes microbiens présumés, ont été isolés à partir du lait ainsi qu'à partir du bouillon de kéfir « **BK** » par étalement, sur boîtes de Pétri sur des milieux de culture gélosés sélectifs (**Annexe1**) et dans les conditions d'incubation décrites au **tableau 2** (Ninane, 2008). L'ensemencement a été réalisé soit en surface dans des conditions d'aérobiose en prélevant 0,1 ml de la solution testée, ou en masse par le prélèvement de 1 ml dans des conditions d'anaérobiose (Bonnefoy *et al.*, 2002).

Quant à l'ensemencement des grains « **GK** » et « **GKS** », il a été effectué en déposant quelques fragments de grains sur des boîtes de pétri contenant les mêmes milieux de culture sélectifs.



Figure 9 Ensemencement des Grains de Kéfir **GK**

Tableau 1: Conditions de culture appliquées pour l'isolement et l'énumération des groupes microbiens du grain.

Groupes microbiens présumés	Milieux de culture	Conditions d'incubation
Lactobacilles	MRS-Agar	3 jours à 30 °C, en anaérobiose
Pédiocoques	MRS-Agar, + 10 mg.L ⁻¹ vancomycine,	1 jour à 30 °C, en anaérobiose
Leuconostocs	Milieu de Mayeux	10 jours à 22 °C, en aérobiose
Microcoques	Agar plate-count (PCA) au lait écrémé + 5 % (p/v) NaCl;	3 jours à 30 °C, en aérobiose
Bactéries acétiques	Acetobacter Peroxydans Medium	3 jours à 25 °C, en aérobiose
Levures	YGC-Agar	5 jours à 22 °C, en aérobiose

3.1.6- Purification des souches

L'aspect des colonies bien individualisées, c'est-à-dire développées en nombre inférieur à 150 par boîte de Pétri, a été observé macroscopiquement. Les isolats ont été purifiés par des repiquages successifs sur leurs milieux de culture sélectif. Pour chaque échantillon, 1 à 3 colonies ont été prélevées (Bonney *et al.*, 2002). La pureté des isolats a été vérifiée par l'observation de l'homogénéité de la morphologie des cellules. Les souches pures ont été placées à +4°C.

3.2- Etude de l'activité antimicrobienne

3.2.1- Réactivation des souches test

Pour les tests d'activité antimicrobienne, Les souches pathogènes ont été identifiées au laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'activité Microbienne (LaMyBAM), et utilisées comme souches de références, il s'agit des souches bactériennes et fongiques suivantes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.

Avant la réalisation des tests antimicrobiens, trois repiquages consécutifs ont été effectués pour chaque souche. Les souches ont été inoculées sur gélose nutritive, avec ensemencement par stries, puis incubées à 30°C, pour les bactéries les deux premières cultures ont été laissées 24h par contre la dernière a été d'une durée de 18h, tandis

que pour les mycètes, l'incubation a été faite pendant 2 jours pour la levure et 5 jours pour la moisissure (Boubricit *et al.*, 2007) « avec quelque modification ».

3.2.2- Préparation des échantillons de lactosérum

Cette étape a été réalisée suivant le protocole de Racotta *et al.* (1978) avec quelques modifications. Le lactosérum « **LS** », issu de la fermentation du lait par les grains de Kéfir **GK**, ainsi celui issu de la production des grains dans le sac « **LSS** » ont été récupérés par filtration, à travers une gaze stérile, puis il a été introduit dans un tube à fond conique type Falcon de 45 ml, pour être centrifugé après équilibrage des volumes, à 6000 tours pendant 30 min à 4°C. Les surnageant « **SNLS** » et « **SNLSS** » ont été ensuite récupérés dans des tubes stériles.



Figure 10 Préparation de l'échantillon du lactosérum

3.2.3- Test d'antagonisme

3.2.3.1- Test d'antagonisme à partir du lactosérum

Pour ce test, la méthode de diffusion sur gélose a été adoptée, à partir des cultures fraîches des bactéries test. Pour ce faire, une suspension mère est préparée pour chaque bactérie ainsi pour *Candida albicans*, dont 0.1 ml a été étalé sur la surface de la gélose nutritive, tandis que pour la levure, l'ensemencement a été fait sur gélose YGP (**Annexe1**). D'autre part, un disque d'un diamètre précis (0.6cm) a été prélevé à partir des cultures réactivées d'*Aspergillus flavus*, et déposé sur le centre des boîtes de la gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol.

Par ailleurs, des disques stériles de papier Wattman de 0.5cm de diamètre ont été imprégnés d'une quantité de lactosérum **SNLS** et **SNLSS**, et déposés à l'aide d'une

pince stérile sur la surface des géloses inoculées, à la cadence de trois disques par boîte. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 24h pour les bactéries et la levure, et 5 jours pour la moisissure.

L'inhibition, *in vitro*, du développement des microorganismes test, se traduit par la formation d'une zone de lyse autour de l'agent antagoniste. Les diamètres des zones d'inhibition ont été ensuite observés et mesurés (Prescott *et al.*, 2007).

3.2.3.2- Test d'antagonisme à partir des grains de Kéfir

Les grains de Kéfir **GK** qui ont été prélevés à partir du lait fermenté, ainsi que les grains **GKS** récoltés du sac, ont été rincés à l'eau distillée stérile puis déposés sur les boîtes de gélose inoculées par les souches test, à la cadence de trois morceaux de grain par boîte, ensuite les boîtes ont été incubées dans les conditions précédentes.

3.2.3.3- Test d'antagonisme à partir de souches isolées du lait fermenté et des grains de kéfir

L'activité antimicrobienne des souches isolées à partir du Kéfir (le lait fermenté) et des grains de Kéfir a été testée. Pour ce faire, les différentes souches ont été tout d'abord réactivées par la méthode de stries sur gélose nutritive. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h. Ensuite, une suspension mère a été préparée, par dépôt de quelques colonies de chaque souche pure dans des tubes contenant 9ml de bouillon nutritif ; des dilutions sont préparées en cas de nécessité (Boubrin *et al.*, 2007).

L'inoculation des boîtes a été faite de la même manière décrite dans le paragraphe 3.2.3.1). Les disques stériles de papier Wattman, ont été imprégnés d'une quantité de suspensions préparées à partir des souches pures, et déposés sur la surface des géloses inoculées. Les diamètres des zones d'inhibition ont été ensuite observés et mesurés.



Résultats

4- Résultats

Le but de ce travail est de produire un grain de Kéfir par fermentation ainsi d'identifier la microflore et de tester l'activité antimicrobienne de deux types de grains **GK** (acquis) et **GKS** (produits).

4.1- Isolement de la microflore du Kéfir et des grains du Kéfir

Dans ce travail, l'isolement de quelques groupes microbiens, a été ciblé par l'utilisation de milieux de culture sélectifs (Annexe), pour ces groupes microbiens prédéfinis et recensés dans la littérature (tableau 1).

Tous les milieux utilisés ont conduit à un développement microbien, le développement de deux ou plusieurs aspects morphologiques sur un même milieu a été clairement observé, en revanche cette diversité a été rencontrée que ce soit sur les boîtesensemencées à partir des deux laits fermentés, ou sur cellesensemencées par les grains de Kéfir **GK** et **GKS**.

Les résultats montrent la présence des bactéries lactiques, cela est révélé par une croissance microbienne sur les milieux MRS ; MRS+ATB et le Milieu Mayeux, sélectifs respectivement aux lactobacilles, pédiocoques et leuconostocs. Le tableau 4 reprend quelques aspects morphologiques, rencontrés sur ces différents milieux de cultures.

En effet, sur milieu MRS, les colonies de lactobacilles étaient de forme rondes parfois lenticulaires, de tailles différentes (petites, moyennes et grandes), certaines étaient blanches et opaques tandis que d'autres étaient translucides de couleur crème, leur contour varie entre régulier et irrégulier, on a observé des aspects lisses, rugueux et parfois cotonneux ; de petites colonies blanches à centre marron et bombées ont été aussi observées.

Par ailleurs, des colonies de pédiocoques lisses, arrondies, grisâtres ou blanchâtres ont recouvert le milieu MRS+ATB.

Sur le milieu Mayeux, il y avait l'apparition de colonies blanches et transparentes, rondes, lenticulaires et par fois en étoile ; de différentes tailles, d'un aspect gluant ou rugueux.

La présence des microcoques a été mise en évidence, par le développement de quelques colonies rondes incolores ou de couleur crème à contour régulier, et d'un aspect lisse et brillant et d'autres colonies étalées sur la surface.

Par ailleurs, les bactéries acétiques ont fait preuve de présence par le développement microbien sur milieu APM. Les colonies étaient de couleur blanche ou crème, de forme ronde ou irrégulière, aplatie ou bombée, d'un contour irrégulier ou régulier de différentes tailles : petites, moyennes et grandes, avec un aspect lisse ou rugueux.

La morphologie cellulaire typique des levures s'est visiblement manifestée sur le milieu YGC ; grandes colonies blanches, crémeuses, lisses et brillantes, parfois d'aspect filamenteux sont observées.

Les grains désinfectés cultivés sur MRS, ont montré eux aussi le développement du même aspect morphologique constaté sur ce milieu, avec l'apparition d'autres colonies blanchâtres qui entouraient les grains.

Cette étape a permis par la suite, la purification de trente et une souches microbiennes jugées avoir divers aspects morphologiques et provenant des différents échantillons, réparties comme suit : huit bacilles, deux pédiocoques, six leuconostocs, quatre microcoques, cinq bactéries acétiques et six levures ; le tableau 3 rassemble les détails de cette opération.

Tableau 2 : Tableau représentant quelques aspects morphologiques de colonies développées sur les milieux sélectifs choisis, isolées à partir des échantillons de laits fermentés de grains de Kéfir.


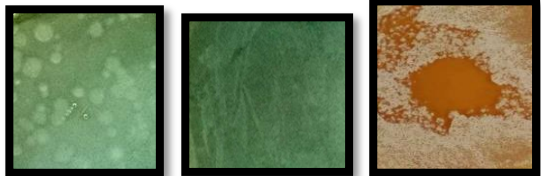




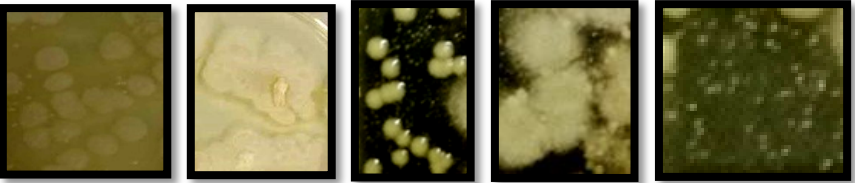
Milieu	Colonies développées	Milieu	Colonies développées
MRS		MRS+ATB	
Mayeux		PCA	
APM		MRS	
YGC		«grains désinfectés »	

Tableau 3 : Tableau déterminant les souches isolées des différents échantillons

N°	Code	Origine*	Milieu*	N°	Code	Origine*	Milieu*	N°	Code	Origine*	Milieu*
1	L10⁻³ MS	Lait fermenté par les grains GK.	MRS	07	GS₁ MS	Grains produits GS	MRS	13	L₃MY	Lait fermenté par les grains GK.	Mayeux
2	L 10⁻² MS	Lait fermenté par les grains GK.	MRS	08	GS₂ MS	Grains produits GS	MRS	14	S10⁻³ MY	Lait du sac	Mayeux
3	S₁10⁻³ MS	Lait du sac	MRS	09	GS₁ ATB	Grains produits GS	MRS+ATB	15	S10⁻² MY	Lait du sac	Mayeux
4	S₂10⁻³ MS	Lait du sac	MRS	10	GS₂ ATB	Grains produits GS	MRS+ATB ₂	16	GKMY	Grains de Kéfir GK	Mayeux
5	S₃10⁻³ MS	Lait du sac	MRS	11	L₁MY	Lait fermenté par les grains GK	Mayeux	17	L₁PC	Lait fermenté par les grains GK.	PCA
6	GK MS	Grains de Kéfir GK	MRS	12	L₂MY	Lait fermenté par les grains GK.	Mayeux	18	S₁10⁻³ PC	Lait du sac	PCA

N°	Code	Origine*	Milieu*	N°	Code	Origine*	Milieu*	N°	Code	Origine*	Milieu*
19	S ₂ PC	Lait du sac	PCA	24	BKPM	Bouillon de grains de Kéfir BK	APM	28	S ₂ (10 ⁻³)YG	Lait du sac	YGC
20	L ₁ 10 ⁻² PM	Lait fermenté par les grains GK	APM	25	L ₁ YG	Lait fermenté par les grains GK	YGC	29	BK ₁ YG	Bouillon de grains de Kéfir BK	YGC
21	L ₂ PM	Lait fermenté par les grains GK.	APM	26	L ₂ YG	Lait fermenté par les grains GK	YGC	30	BK ₂ YG	Bouillon de grains de Kéfir BK	YGC
22	S10 ⁻³ PM	Lait du sac	APM	27	S10 ⁻³ YG	Lait du sac	YGC	31	L ₂ PC	Lait fermenté par les grains GK	PCA
23	S10 ⁻¹ PM	Lait du sac	APM								

Milieu* : Milieu d'isolement.

Origine* : Echantillon ensemencé

4.2- Production des grains de Kéfir

Cette étape a été effectuée afin de produire les grains de Kéfir au laboratoire, et ce en réalisant une fermentation dans un sac de peau. Au fait, pour récolter les grains formés, le sac vidé du lait a été coupé et ouvert soigneusement dans une zone stérile, et les grains de kéfir du sac « **GKS** » ont été récupérés, à partir des parois, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis conservés dans une boîte de pétrie stérile. Le rinçage de quelques petits morceaux de caillé a permis enfin la récupération de quelques autres grains.

Les grains formés étaient d'une taille plus petite par rapport à celle des grains acquis « **GK** », la couleur et l'élasticité de la paroi extérieure étaient par ailleurs assimilables à celles du grain **GK** (figure 11).



Figure 11 Récolte des grains de Kéfir produits **GKS**

4.3- Etude de l'activité antimicrobienne

D'une part, ce test consistait à chercher la sensibilité des souches pathogènes choisies, vis-à-vis les grains de Kéfir, le Kéfir et les microorganismes isolés à partir de ces deux sources. D'autre part, il a permis de comparer l'intensité de l'effet inhibiteur provoqué par les grains **GK** par rapport à celui induit par les grains **GKS**.

Le rapport d'inhibition a été déterminé à partir des valeurs des diamètres de zones de lyse, permettant la mise en évidence de cette activité antimicrobienne.

4.3.1- Test d'antagonisme à partir du lactosérum

Les résultats affichés dans le tableau 4, montre que la levure *Candida albicans*, est le microorganisme le plus sensible aux substances bioactives des deux types de surnageant de lactosérum testés (SNLS et SNLSS), par ailleurs, il semble que *Escherichia coli* ait une sensibilité plus ou moins remarquable surtout dans le cas de la suspension SNLSS (1.6cm), tandis que pour les autres souches test, aucune zone de lyse n'a été détectée que ce soit par le surnageant SNLS ou par le surnagent SNLSS. Le tableau 4, reprend les valeurs en centimètre, des zones d'inhibition manifestées par les suspensions SNLS et SNLSS, sur différentes souches test choisies.

Tableau 4 : résultat du test d'antagonisme des lactosérums des grains GK et GKS, sur les souches test choisies.

lactosérum	Souches test									
	bactéries						mycètes			
	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>A.flavus</i>		<i>C.albicans</i>	
	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)
SNLS/ 10 ⁻¹	+	-	-	0	-	0	-	0	+	1
	+	0.36	-	0	-	0	-	0	+	1.25
SNLSS 10 ⁻²	+	1.16	-	0	-	0	-	0	+	0.55
	-	0	+	0.2	-	0	-	0	+	0.1

SNLS : surnageant du lactosérum issu de la fermentation faite par les grains GK.

SNLSS : surnageant du lactosérum issu de la fermentation faite par les grains GKS.

4.3.2- Test d'antagonisme à partir des grains de Kéfir

Les résultats illustrés dans le tableau 5, montrent la présence de zones de lyse, allant de 0.1cm à 3.3cm, sur toutes les boîtes de culture des souches tests testées par les grains GK et les grains GKS. En revanche, il semble que les grains reproduits dans le sac GKS ont permis l'apparition des zones de lyse plus importantes que celles obtenues par les grains GK par rapport aux mêmes souches testées, excepté *E. coli*, où les grains GK (1.05cm) s'avèrent plus efficaces comparés aux grains de sac GKS (0.3cm).

Tableau 5 : résultat du test d'antagonisme des grains **GK** et **GKS**, sur les souches test choisies.

Grain	Souches test									
	bactéries						mycètes			
	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>A.flavus</i>		<i>C.albicans</i>	
	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)	résultats	Diamètre (cm)
GK	+	0.7	+	0.1	+	0.53	-	-	+	1.76
	+	1.05	+	0	+	0.13	+	2	+	1.4
GKS	+	0.3	+	3	+	3	+	2	+	3.3

4.3.3- Test d'antagonisme à partie des souches isolées du kéfir et des grains de kéfir GK

Parmi les trente et une souches isolées du Kéfir et des grains de Kéfir, *E.coli* a été sensible envers **20** souches, *S.aureus* envers **17** souches, *B.subtilis* envers **13** souches, *C.albicans* envers **17** souches et *A.flavus* envers **9** souches. La plus grande zone d'inhibition observée était d'un diamètre de 4.75cm, manifestée par une bactérie acétique isolée à partir de bouillon de Kéfir « **BK** » contre *Aspergillus flavus*. Par ailleurs, les plus grandes zones d'inhibition ont été observées en testant les souches isolées à partir des grains.

En effet, les résultats récapitulés dans le tableau 6 montrent que plusieurs souches isolées à partir du Kéfir et les grains du Kéfir **GK** ont permis l'obtention de zones d'inhibition importantes, surtout par rapport à *Candida Albicans* avec un diamètre allant de 0.3cm à 1.5cm. En revanche, il semble que *Bacillus subtilis* résiste à la plupart de ces microorganismes, même à ceux qui ont permis l'obtention de zones de lyses très importantes sur les autres souches pathogènes. Ceci révèle que *B.subtilis* est le moins sensible.

Tableau 6 : résultats du test d'antagonisme des souches isolées du Kéfir et de grains du Kéfir **GK** sur les microorganismes test.

	L 10 ⁻² MS	L10 ⁻³ MS	L ₁ MY	L ₂ MY	L ₃ MY	L ₁ PC	L ₂ PC	L ₁ 10 ⁻² PM	L ₂ PM	l ₁ YG	L ₂ YG	GK MS	GK MY	BKPM	BK ₁ YG	BK ₂ YG
<i>Souches test</i>	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)
<i>E.c.</i>	-	-	-	-	+0.3	+0.6	-	+0.9	-	+0.7	+0.6	+0.3	+0.1	+0.6	+0.6	+0.5
<i>S.a.</i>	+0.6	-	-	+0.8	-	-	+0.9	+0.7	+0.9	-	+0.6	+0.6	-	+0.6	-	+1.5
<i>B.s.</i>	-	+0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1.2	-	-	-	-
<i>A.f.</i>	-	-	-	+0.1	-	-	-	cassures	-	-	+0.1	-	-	4.75*	-	-
<i>C.a.</i>	+0.9	-	-	+0.5	-	-	+1	+1.5	+0.3	+1	+1.5	-	-	+1	+1.2	+1.5

4.3.4- Test d'antagonisme à partir des souches isolées du kéfir et des grains de kéfir GKS

Cette étape a permis l'observation de la plus grande zone de lyse vis à vis *Aspergillus flavus* (4cm), développée par des souches isolées à partir des grains GKS, alors que les souches isolées à partir du lait fermenté issu du sac n'ont pas révélé une activité antifongique contre ce mycète. Contrairement aux résultats du lot précédent (souches isolées à partir de kéfir et de grains acquis GK, des zones de lyse bien visibles ont été aperçues envers *B.subtilis*, ainsi le reste des microorganismes test. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 7.

En concluant, les résultats du test d'antagonisme montrent que le Kéfir et les grains reproduits dans le sac ont une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches classées pathogènes, plus importante que celle de Kéfir et des grains acquis. Ce qui est considéré comme un résultat prometteur et original.

Tableau 7 : résultats du test d'antagonismes des souches isolées du Kéfir et de grains de Kéfir GKS sur les microorganismes test

	S ₁ 10 ⁻³ MS	S ₂ 10 ⁻³ MS	S ₃ 10 ⁻³ MS	S10 ⁻³ MY	S 10 ⁻² MY	S ₂ PC	S ₁ 10 ³ PC	S10 ⁻³ PM	S10 ⁻¹ PM	S ₂ 10 ⁻³ YG	S ₁ 10 ⁻³ YG	GS ₂ MS	GS ₁ MS	GS ₁ ATB	GS ₂ ATB
<i>Souches test</i>	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)	Diamètre (cm)
<i>E.c.</i>	-	+0.6	+1.5	+0.5	+0.6	-	+0.5	+0.6	-	+0.6	-	-	+0.1	+1.5	+2
<i>S.a.</i>	+0.1	+1.5	+0.9	+1	-	+0.2	+0.6	-	-	-	+0.6	-	-	+0.6	-
<i>B.s.</i>	-	+1.5	-	+1.2	-	-	+1	+0.5	-	-	-	-	2	-	0.7
<i>A.f.</i>	-	-	cassures	-	-	-	-	-	-	+0.3	-	+4	-	+4*	+1.5
<i>C.a.</i>	+0.1	-	-	-	-	+0.2	+1	-	+0.7	-	-	+1.5	-	+0.9	+1.5



Discussion

5- Discussion

Le présent travail s'intéresse essentiellement à tester la sensibilité de quelques souches dotées d'un pouvoir pathogène à deux types de grains de Kéfir, un grain déjà formé et un grain produit au laboratoire, ainsi à leurs laits fermentés.

Selon la littérature, la population microbienne trouvée dans les grains du Kéfir se manifeste essentiellement par une microflore banale, composée de bactéries lactiques et de levures, accompagnées généralement de bactéries acétique et/ou de microcoques. En général les bactéries lactiques sont plus abondantes (10^8 – 10^9) que les levures (10^5 – 10^6) et les bactéries acétiques (10^5 – 10^6), (Koroleva, 1991; Garrote *et al.*, 2001).

les bactéries lactiques, parmi lesquelles les lactobacilles, les pédiocoques, et les leuconostocs ; les bactéries acétiques, les microcoques et les levures ont été identifiées dans cette étude en employant des milieux de culture sélectifs.

Le choix du milieu MRS a été basé sur les travaux de De Man, Rogosa et Sharpe (1960) qui ont pu mettre en évidence un milieu spécialement adapté aux cultures des lactobacilles provenant de produits laitiers. En effet, l'utilisation de ce milieu a permis l'isolement de six souches de lactobacilles.

D'autre part, la croissance exclusive des pédiocoques a été ciblée par l'ajout de vancomycine au milieu proposé par la fédération internationale de laiterie « la FIL » (Ninane, 2008). Ainsi supplémenté, le milieu MRS, conduit au recouvrement par diverses espèces de pédiocoques associées à des produits laitiers (Garvie, 1986), tout en inhibant la croissance de nombreux lactobacilles et coques lactiques (Simpson *et al.*, 2006). Ceci a permis d'isoler deux genres de pédiocoques sur ce milieu.

Par ailleurs, d'après Garvie (1984), Les leuconostocs des produits laitiers se développent bien sur milieu contenant du saccharose ; la mise au point du milieu Mayeux a permis la recherche des Leuconostocs dans le lait (Mayeux *et al.*, 1962). Effectivement, ce milieu a permis l'isolement de six souches de Leuconostocs .

En outre, divers milieux de culture ont été recensés pour l'isolement des microcoques à partir de matrices alimentaires (Denis *et al.*, 2001). Le milieu de base choisi, étant le PCA au lait écrémé, additionné de NaCl préparé par Mounier *et al.* (2005) répond

parfaitement aux exigences des microcoques. Les résultats d'isolement réalisés sur ce milieu ont mis en évidence quatre souches de microcoques.

Le milieu APM (Acetobacter Peroxydans Medium) a été aussi choisi, et ce, afin de sélectionner des bactéries acétiques (DSMZ, 2001). Cette sélectivité repose sur leur capacité à utiliser l'alcool comme source de carbone (De Ley *et al.*, 1984), conformément à ceci, on a pu isoler au laboratoire cinq souches de bactéries acétiques en se servant de ce milieu.

Enfin, le milieu YGC (gélose Glucosée à l'Extrait de Levure et au Chloramphénicol) a été également utilisé et d'après la FIL, ce milieu est recommandé pour le dénombrement des levures et moisissures dans le lait et les denrées alimentaires (ISO 6611 FIL-IDF 94: 2004). Les résultats obtenus ont montré le développement de colonies levuriennes sur ce milieu ainsi, l'isolement de six souches de levure.

Les résultats d'ensemencement obtenus sur ces différents milieux, ont confirmé ce qui a été rapporté dans la littérature, car tous ces milieux ont mené à un développement microbien.

Dans cette étude, on a pu isoler différentes souches à partir des grains ainsi qu'à partir de lait fermenté, cela correspond au résultat d'Edward (2005), qui affirme que les profils microbiens des grains et le produit final (la boisson du Kéfir) ne sont pas les mêmes, le breuvage final ne contient pas le nombre ni la totalité des microorganismes des grains. Kandler et Kunath (1983) rapportaient des résultats similaires quand ils comparaient la microflore des grains de Kéfir à celle de la boisson obtenue après fermentation.

Au fait, il faut signaler que les *Leuconostocs* et les bactéries acétiques, ne figurent toujours pas sur les listes des microorganismes caractéristiques des grains de Kéfir étudiés auparavant, mais cela n'a pas empêché leur isolement à partir de grains de Kéfir par quelque auteurs (Ottogali *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Garrote *et al.*, 2001). Tandis que pour les lactobacilles et les levures, ils représentent la microflore typique des grains de kéfir (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002). Par ailleurs, d'après la littérature consultée, les pédiocoques constituent le groupe le moins présent par rapport aux levures et les lactobacilles; peu d'auteurs ont déclaré les avoir isolés à partir des grains de Kéfir (Angulo *et al.*, 1993).

Effectivement, les grains de Kéfir étudiés, ont dévoilé une grande variété microbienne. En effet, la composition microbienne peut évoluer selon l'origine des grains, le substrat utilisé dans le processus de fermentation et la méthode de maintenance de la culture (Prado *et al.*, 2015), cela peut expliquer toutefois, la diversité des aspects morphologiques rencontrés lors de cette expérience .

Le développement microbien observé sur tous les milieux sélectifs inoculés par les grains produits GKS, peut quand même annoncer une bonne concordance du lait de vache utilisé comme substrat de fermentation , cela coïncide avec le choix des anciens consommateurs du Kéfir, qui recommandaient le plus souvent l'usage du lait de vache, jusqu'à ce que des recherches viennent le confirmer, on a montré que comparé à d'autres types de lait ,le lait de vache a permis un développement meilleur de bactéries lactiques des grains de Kéfir (Liu et Lin , 2000) ainsi , la réplique des grains a été meilleure dans ce substrat (Liu *et al.*, 2002) .

Ce travail a envisagé parallèlement la production d'un grain de Kéfir par fermentation, Le mécanisme de formation des grains reste toujours méconnu les grains de Kéfir sont exclusivement formés au Caucase, nulle part ailleurs un grain de kéfir n'a, à ce jour, été constitué (Ninane, 2008 ; Pop *et al.*, 2014). La reproduction des grains, se fait à partir d'un grain ou un segment de grain déjà formé (Koroleva, 1982; Halle' *et al.*, 1994; Tamime *et al.*, 1999) qui grossit au fil des heures pour fournir à son tour de petits grains. D'après la description de la formation des grains de kéfir *in situ*, le kéfir traditionnel était produit dans des sacs faits peaux, qui étaient accrochés proche d'une porte afin que chaque personne qui passait devant, devait bien le mélanger (Prescott *et al.*, 2007). Beijerinck (1889) ajoute que pour éviter les altérations qui se présentaient fréquemment, l'emploi de caillettes de veau ou de mouton a ensuite été reconnu d'être le seul moyen capable de provoquer la fermentation voulue qui conduisait à la formation de petits fragments de ferments.

Dans cette étude, des conditions expérimentales identiques aux conditions de formation de grain *in situ*, ont abouti à la formation de structures distinctes plus ou moins aux grains GK, elles étaient de taille plus petite que les grains connus, par contre elles avaient presque la même couleur et une consistance élastique comme celle du grain GK. Par ailleurs, dans des études ou des conditions expérimentales simulant les conditions de formation de grain *in situ*, le consortium microbien d'un

grain de kéfir déjà formé ne formait pas de structures microbiennes s'apparentant à des grains (Ninane, 2008) cependant il était capable de former des structures microbiennes qui se présentaient sous la forme de biofilms souples.

En effet, par définition, les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules, enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface, Ils se forment communément dans les milieux aquatiques (Costerton *et al.*, 1999 ;Stoodley *et al.*, 2009). Après, les cellules se détachent et s'adhèrent à de nouvelles surfaces (Kaplan *et al.*, 2010). Tel est le cas dans les grains de Kéfir, qui représentent un rassemblement de petits amas de microorganismes (Köt-Taşet *et al.*, 2013) où la cohésion provient des relations symbiotiques au sein de sa matrice unique d'exopolysaccharides hydrosoluble nommé *kéfiran* (Zourari, 1988), sauf que après avoir eu leur conformation irrégulière dite de chou-fleur, les grains ne colonisent pas le support, leur EPS emprisonne la partie majeure des microorganismes (Prado, 2015), et l'apparition éparpillée des grains et de manière irrégulière contrarie donc le processus de formation de biofilm, cela a été nettement observé lors de la récolte des grains de Kéfir produits GKS , car cela a nécessité une longue séance d'examen méticuleux afin de pouvoir récolter les grains de part et d'autre dans le sac.

Suivant ces constatations, on peut dire que le procédé de formation des grains se fait de manière semblable à celle de formation de biofilm ; cependant à un moment donné ce prolongement se freine, et la dernière étape de détachement ne se déroule pas il se peut que la diversité des microorganismes qui participe à la conformation globale des grains aura un quelconque rapport avec cet incident, puisque il ne s'agit pas seulement de bactéries mais aussi de levures.

Si on tente de l'expliquer ainsi, et même si d'après Bottazzi et Bianchi (1980), l'observation des grains à l'aide de microscope électronique a révélé que la partie périphérique du grain était peuplée presque exclusivement de bactéries tandis que les levures prédominent au centre ; confirmé par les travaux de Molska *et al.* (1980) ; Marshall et Cole (1984) ; Guzel-Seydim *et al.* (2005).

Des relations structurales de ce genre, entre les différents types de microorganismes recensés à partir de grains de Kéfir n'ont encore pas démontrées, vu qu'un éventuel agencement structural entre les bactéries et les levures est absolument absent, puisque

plusieurs autres auteurs observaient une répartition toute à fait contraire à celle proposée avant (Duitschaever *et al.*, 1988). Rea *et al.* (1996) sont allés jusqu'à affirmer que cette différence de répartition entre grains existe aussi au sein d'un même grain. Globalement, si les interactions symbiotiques entre la microflore de grain de Kéfir auraient un rôle primordiale dans l'élaboration de son structure, cela ne peut être lié au positionnement des groupes microbiens envers des autres ; mais fort probable que cela aura un rapport avec L'EPS qu'il les englobe et qui n'a été trouvé que dans les grains de kéfir. Zourari *et al.* (1988) rapporte que les microorganismes se situent dans la matière spongieuse du grain qui semble les soutenir et qui se présente sous forme d'une matrice lamellaire fortifiée par des cordons plus denses.

L'observation macroscopique des grains de Kéfir au laboratoire a montré clairement que la structure des grains de Kéfir est loin d'être un biofilm, donc même s'il arrive que les microorganismes ne se détachent pas de ce dernier, cela reste insuffisant. Il est évident, qu'un facteur stimulant le regroupement de la microflore sous forme de grain, manquait.

Il se peut que cette particularité de cohésion de la matrice microbienne, provienne de la présence d'un ou d'un ensemble de micro-organismes qui amorcent la formation de la structure microbienne, et qui ne persistent pas dans le grain de Kéfir mature. Ce processus de colonisation séquentielle des surfaces, amorcé par un petit nombre d'espèces bactériennes pionnières puis colonisé par d'autres, est connu, notamment dans le milieu marin (Compère, 1999).

Suivant cette conjecture, les grains GKS produits contiennent probablement cette communauté microbienne. En revanche, la différence flagrante de taille, reste toujours un point à élucider, il pourrait être interprété par le rôle de cette association de microorganismes promoteurs qui n'était pas assez complète ou d'une charge insuffisante ou encore pas tout à fait fonctionnelle.

Dans les milieux aquatiques, la formation de certaines structures microbiennes est décrite comme un processus impliquant une mobilité microbienne (Filloux et Vallet, 2003 ; Dingding *et al.*, 2006 ; Piciooreanu *et al.*, 2007) surtout dans la phase d'adhésion initiale à la surface solide, l'observation de la structure compacte des grains GK et GKS écarte toute possibilité que des germes mobiles s'y trouvent. Il est

fort probable que le facteur d'agitation joue un rôle considérable dans le regroupement des microorganismes avant qu'ils ne soient enveloppés du caillé.

Au laboratoire, la récupération des morceaux de caillé formés et leur rinçage a permis la récolte de quelques grains produits GKS en plus de ceux collectés directement des parois. Selon Lacrosse (1981), la croûte spongieuse formée *in situ* sur les parois constitue, après séchage et morcellement, des grains de kéfir séchés, cela suppose que des ébauches de grains aient été emportées avec les fragments séchés de croûte spongieuse. L'ajout des morceaux de caillette a impliqué la présence de la présure dont le rôle est la coagulation du lait et la formation du caillé, cela peut expliquer le fait que les grains ne colonisent pas les supports physiques ainsi la répartition irrégulière de la microflore, car les microorganismes sont immobilisés dans les caillés.

D'autres conditions d'incubation peuvent éventuellement influencer ce processus de structuration, entre autre le facteur temps ; d'après Ninane (2008), les repiquages successifs des caillés devaient permettre aux ébauches de grain d'acquérir une taille suffisante pour être décelées dans les caillés. Un seul repiquage appliqué dans cette étude, n'était pas peut être suffisant pour acquérir une taille plus grande, selon Beijerinck (1889), l'accroissement des grains est un processus lent. C'est un processus qui varie d'un grain à l'autre et en fonction des conditions de culture (Kuo et Lin, 1999 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Ninane, 2002 ; Schroevers et Britz, 2003).

La dernière étape de notre approche expérimentale consistait à tester l'activité antimicrobienne des grains. En effet, Le Kéfir a une longue tradition d'offrir des bienfaits pour la santé spécialement à l'Europe de l'est (Halle' *et al.* 1994), il contient plusieurs composants capables d'avoir des propriétés bioactives. Plusieurs études sont investies dans la recherche des différents bienfaits de Kéfir, y compris ses propriétés antitumorales et antistress et ses fonctions Immunomodulatrices et hypocholestérolémiques chez les animaux (Saloff-Coaste, 1996 ; Wheeler *et al.*, 1997 ; Meydani et Ha, 2000 ; Rodrigues *et al.*, 2005 ; Vinderola, 2005 ; Gaware *et al.*, 2011). Peu d'études et peu d'informations sur les propriétés antibactériennes et antifongiques du Kéfir ont été publiées. Les suspensions fermentées à partir des grains de Kéfir sont prétendues avoir des effets cliniques sur différentes maladies comme les maladies diarrhéiques, les infections urinaires, les infections par les salmonelles,

Streptocoques et *Helicobacter pylori* (Schneedorf, 2004 ; Speroni *et al.*, 2002 ; Roos *et al.*, 2000 ; Sullivan, 2002).

Il est connu que le lait fermenté par les grains de Kéfir contient un polysaccharide hydrosoluble, des microorganismes ainsi que les nutriments du lait (Toba *et al.*, 1990) il contient aussi des acides aminés essentiels ,des vitamines et des minéraux ; il est riche en vitamine B1, B12 , la vitamine K, le calcium, les acides aminés, l'acide folique , et une bonne source de biotine (Ot-es et Cagindi , 2003).

Si on compare les résultats obtenus du test de lactosérum issu du lait fermenté par les grains de Kéfir **Gk** et celui du lait fermenté dans le sac, on constate pratiquement les mêmes réponses vis-à-vis le développement des souches test. A ce niveau-là on ne peut rien reprocher à la composition du lactosérum du sac.

Par ailleurs, cette étape a permis d'obtenir des résultats prometteurs concernant la levure *Candida albicans*, avec des zones de lyse importantes .cela confirme ce qui a été rapporté dans la littératures, sans pour autant mentionner les valeurs des diamètres des éventuelles zones d'inhibition obtenus, en ce qui concerne la sensibilité de *C.albicans* (Rodrigues *et al.*, 2005 ; Cevikbas *et al.*, 1994).

En revanche, on a trouvé qu'une préparation de Kéfir (lait fermenté) d'un pH de 5.5 permettait d'avoir une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et une faible activité sur *E.coli* (Rodrigues *et al.*, 2005 ; Cevikbas *et al.*, 1994). En ce qui concerne nos résultats, une zone d'inhibition très réduite a été observé dans le cas d'*Ecoli*, alors que pour *S.aureus* et *B.subtilis*, celle-ci, a été quasiment absente ; Il faut signaler que la manipulation adoptée dans ce travail, élimine toute sorte de microorganismes qui pourraient se trouver dans les lactosérums récupérés, cela peut expliquer les résultats obtenus vis-à-vis ces bactéries test, et que cette activité est directement liée à la présence de quelques microorganismes dans la boisson du Kéfir. Par conséquent, notre travail montre bien que l'activité antimicrobienne du Kéfir sur *C.albicans* est liée considérablement aux substances exocellulaires.

En dehors du rôle de microorganismes, considérant que le surnageant du Kéfir contient divers métabolites et composés inhibiteurs comme les acides organiques, les peroxydes d'hydrogène, l'éthanol, les diacetyles, les peptides et des éventuelles

bactériocines, il pourrait être possible que ces composés interagissent pour améliorer ou contrarier leurs effets antimicrobiens (Kim *et al.*, 2015). Autrement dit, l'activité antimicrobienne peut également être bloquée par l'accumulation des acides organiques ou par les dégradations enzymatiques (Joshi *et al.*, 2006). On peut donc déduire, qu'à chaque phase de fermentation, cette activité peut être due à un composé différent. En se reposant sur cette hypothèse, la phase de fermentation choisie pour la récupération des lactosérums, n'était pas une phase où une bonne quantité de substances antibactériennes pouvait être présente.

D'autre part, et dans une démarche où les microorganismes de la suspension de fermentation ont été éliminés par centrifugation, celle-ci (la suspension) a pu ralentir le développement d'*Aspergillus flavus* proportionnellement avec l'abaissement du pH du milieu de culture (Londero *et al.*, 2014 ; Gamba *et al.*, 2016). Les lactosérums issus de la fermentation du lait par les grains GK et GKS n'ont développé aucune zone de lyse dans les boîtes inoculées par *A.flavus* ; Des études précédentes ont mis le point sur la relation entre le pH final de la fermentation et les formes non dissociées d'acides lactiques et acétiques sur l'inhibition d'*A.flavus* ; le mélange des deux acides lactique et acétique agit en synergie pour générer l'effet antifongique, l'acide lactique joue un rôle principal dans l'abaissement du pH qui aller jusqu'à 3.5 et 3.3 ; à ce stade, l'acide acétique sera à un état très avancé de non dissociation ce qu'il lui permet de pénétrer facilement dans la membrane du champignon et exerce son effet antifongique (Gamba *et al.*, 2015; León *et al.*, 2012). En se basant sur ces études, et même si dans les deux lots de grains Gk et GKS utilisés, des bactéries lactiques et acétiques s'y présentaient, ce résultats ne pourrait pas être obtenu si le pH final du lait fermenté n'atteint pas des valeurs plus basses, car cela peut entraver le rapport pH/ acides non dissociés, qui est à l'origine de ce pouvoir antifongique. Gamba *et al.* (2016) affirment que même si les produits de fermentation inhibent le développement fongique, les nutriments du lait qui reste après la fermentation peuvent gêner cette inhibition par une stimulation marginale de la croissance fongique, c'est la forte concentration des produits de la fermentation à des pH de 3.5 et 3.3 qui assure l'inhibition fongique.

Chifiriuc *et al.* (2011) à son tour, a rapporté que le Kéfir inhibe *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, par contre il n'avait aucun effet sur *C.albicans*. Plusieurs auteurs ont reconnu

que les laits fermentés issus des grains de Kéfir d'origines différentes ont différents spectres d'activité antimicrobienne (Kim *et al.*, 2016 ; Anderson et Gilliland, 1999; Pintado *et al.*, 1996) ce qui corrobore à nos résultats .

L'effet antimicrobien des grains de Kéfir à part entière est bien plus grand que celui des suspensions fermentées (Cevikbas *et al.*, 1994) . Dans cette étude, les grains de Kéfir ont développé des zones de lyse envers toutes les souches test, Les grains GKS ont montré une activité encore plus remarquable que celle des grains GK. Les valeurs de diamètres des zones d'inhibition sur les boîtes des grains GKS, étaient de deux à trois fois plus grandes pour les bactéries *E.coli* et *B.subtilis* déjà testé par des grains de Kéfir par Cevikbas *et al.* (1994). Tandis que pour l'activité antifongique, manifestée par les grains surtout ceux produits au laboratoire, de tels résultats n'ont pas été rapportés dans la littérature consultée.

l'activité antimicrobienne des grains de Kéfir étant liée à la microflore des grains (Otes et Cagindi., 2003 ;Prado *et al.*, 2015) ,aux EPS (Suresh Kumar *et al.*, 2008; Bensmira *et al.*, 2010; Piermaria *et al.*, 2010), à l'abaissement du pH (Kim *et al.*, 2016) et aux produits de fermentation (Kim *et al.*, 2015) .Si on écarte les deux derniers facteurs qui sont associés au processus de fermentation, l'effet inhibiteur des grains sera forcément lié aux EPS ainsi qu'aux microorganismes qui s'y présentent, ce qui prouve que les grains GKS produits sont dotés de ces deux propriétés caractéristiques des grains de Kéfir connus et qui s'expriment distinctement.

Conformément à ce qui a été développé, une activité antimicrobienne de quelques souches isolées à partir des grains de Kéfir a été rapportée par (Schneedorf, 2004).

En d'autre part, les souches isolées dans notre étude, ont manifesté un effet antimicrobien divergent, les souches isolées à partir des grains ont montré un effet inhibiteur plus important que celles isolées à partir du lait fermenté ; Un pouvoir antifongique considérable été observé chez quelques souches isolées à partir des grains, surtout des grains produits GKS, des zones d'inhibition importantes inhibant le développement d'*Aspergillus flavus* sont observées pour la première fois, la littérature consultée n'annonçait pas un tel résultat.

Bien que quelques souches isolées aient exprimé une bonne activité microbienne, d'autres n'en n'avait vraiment pas. Koroleva (1991) a déclaré que les bactéries et les levures du Kéfir séparées en cultures pures ne se développent pas dans du lait ou elles avaient une activité biologique réduite ; chose qui a compliqué encore l'étude de la microflore des grains. Si on compare les trois résultats concernant la microflore des grains de Kéfir obtenus dans cette étude, on trouve que les plus grandes zones d'inhibition sont obtenues par la contribution totale des grains de Kéfir, suivi par l'emploi des souches isolées à partir des grains et enfin les moins importantes zones sont aperçues avec l'application des souches isolées à partir du lait.

En effet, la population microbienne des grains de Kéfir a été considérée depuis toujours, comme un exemple d'une communauté symbiotique (Margulis, 1995); cela a rendu toute étude de la composition microbienne des grains de Kéfir difficile. Divers milieux ont été proposés pour l'isolement et l'identification des bactéries de grain de Kéfir (Kojima *et al.*, 1993) . Linossier et Dousset (1994) ont montré que *Lactobacillus kefir* se développe mieux lorsque la levure *Candida kefir* est ajoutée au lait. Les conditions donc du développement des microorganismes au sein du grain sont probablement différentes à celles fournies *in vitro*, plus les liens avec le grain sont réduits, l'activité antimicrobienne des souches est réduite ,ce qui explique ce gradient de concentration du pouvoir antimicrobien.

Il a été observé que, le lait fermenté par les grains GKS a présenté des souches bien mieux actives que celles obtenues à partir des grains GK ; ces résultats en faveur des grains GKS se sont protestés à toutes les étapes de cette recherche, ce qui est considéré comme prometteur et original.

On peut donc déduire, que le petit grain GKS obtenu dans le sac, représente une ébauche de grain, qui mène certainement à l'obtention d'un vrai grain de Kéfir, et qui par conséquent, non seulement bannit finalement la genèse qui relie la formation des grains de Kéfir à l'environnement microbien de sa région d'origine, mais il peut conduire à la production des grains de Kéfir encore plus efficaces et bénéfiques que ceux déjà trouvés.



Conclusion

6- Conclusions et perspectives

Dans cette étude, une approche expérimentale visant la reconstitution et la production d'un grain de Kéfir par fermentation est abordée. Ce travail s'est intéressé également au pouvoir antimicrobien alloué au Kéfir. La stratégie élue reposait sur l'établissement d'une étude comparative analysant trois sources, à savoir : le Kéfir, les grains et les souches isolées à partir du lait et des grains.

L'isolement des microorganismes, à partir du Kéfir et des grains de Kéfir, sur des milieux sélectifs a permis d'isoler différents groupes bactériens, en l'occurrence : des lactobacilles, des pédiocoques, des leuconostocs, des microcoques et des bactéries acétiques, ainsi que des levures. Il était bien clair, que même les groupes microbiens jugés de présence facultative, se présentaient dans les grains étudiés ; et même si le facteur origine joue un rôle primordiale dans la diversité microbienne du grain **GK**, celle du grain produit **GKS** sera certainement liée aux facteurs et conditions de croissances adéquats fournis dans ce cas, par le lait de vache de la région d'Est Algérien.

Après la fermentation, le Kéfir final contient différents ingrédients bioactifs. Des stades très avancés de la fermentation n'ont pas permis leur bonne récupération, dans les lactosérums, une hypothèse de facteur limitant s'impose. En revanche, les grains de Kéfir surtout ceux produits **GKS** étaient plus actifs, des zones d'inhibition plus ou moins importantes sont observées vis-à-vis toutes les souches testées, le pouvoir d'inhibition du grain est lié principalement aux interactions symbiotiques de la microflore, c'est d'ailleurs le facteur majeur qu'il le qualifié « peu sensible » à toute sorte de contamination. Conformément à ceci, la plus part des souches isolées étaient dotées d'une activité antimicrobienne, ainsi des souches isolées du grain **GKS** étaient hautement résistantes à *A.flavus*. Ces tests confirment ce qui a été rapporté brièvement dans la littérature à propos de l'activité antibactérienne et représentent une première en ce qui concerne l'activité antifongique.

Malgré la longue histoire du Kéfir liée à la santé humaine; il reste tout de même un sujet méconnu par plusieurs. Les connaissances actuelles, mettent en évidence l'intérêt de ce lait fermenté ; les résultats obtenus, montrent qu'une production locale de grains de Kéfir d'une qualité bien meilleure, est possible ; l'industrie laitière ne doit pas

passer à côté de cette opportunité surtout pour l'amélioration des divers produits dérivés du lait (fromage et yaourt issu du Kéfir), et faire partie de l'actualité dans ce domaine, qui ne cesse d'alimenter le marché par des produits laitiers dits « probiotiques ».

A la lumière des résultats obtenus, de nouvelles perspectives sont insufflées :

- L'étude du développement de la microflore lors du processus de formation d'un grain de Kéfir.
- Identification moléculaire et biochimique des souches isolées à partir du grain de Kéfir.
- une analyse poussée dans le sens d'identifier des groupes microbiens et les conditions favorables à la production du *Kéfiran*.
- Etude des souches microbiennes résistantes à *Aspergillus flavus*.
- Recherche des facteurs clés pour la croissance de la microflore du grain de Kéfir, parmi les différents composés du lait de vache.
- Etude de l'effet antimicrobien du Kéfir Sur *Candida albicans*.
- Optimisation de la production du Kéfir dans l'industrie laitière par l'amélioration de la conception microbiologique des levains.

7- Abstract

Kefir is a fermented milk product produced by a mixture of lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast.

The microflora of some acquired grains and produced ones ,was isolated and purified on selective media, which allowed the isolation of various bacterial groups, such as: lactobacilli, pediococci, leuconostocs, micrococci and Acetic bacteria, as well as yeasts.

Also , the possibility of producing Kefir in laboratory was contemplated by providing favorable conditions for its constitution, which led to the formation of a few small structures similar to the acquired kefir grains.

The antimicrobial activity of isolated strains from Kefir, as well as from grains and their whey, was demonstrated on pathogenic strains: *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Indeed, it has been shown that the optimum of antibacterial and anti-yeast activity is obtained by the application of the hole grain, whereas the optimum of the antifungal activity is obtained by the application of isolated strains. However, the produced grain in the laboratory, although they appear to be small, the results confirmed that they have much better antimicrobial activity than the acquired grains.

Keywords : Kefir, lactic acid bacteria, fermented milk, antimicrobial activity.

8- ملخص

الكفير(او الفطر الهندي) هو منتج الألبان المخمرة التي تنتجها خليط من بكتريا الحليبية ، البكتيريا الحمضية والخمائر.

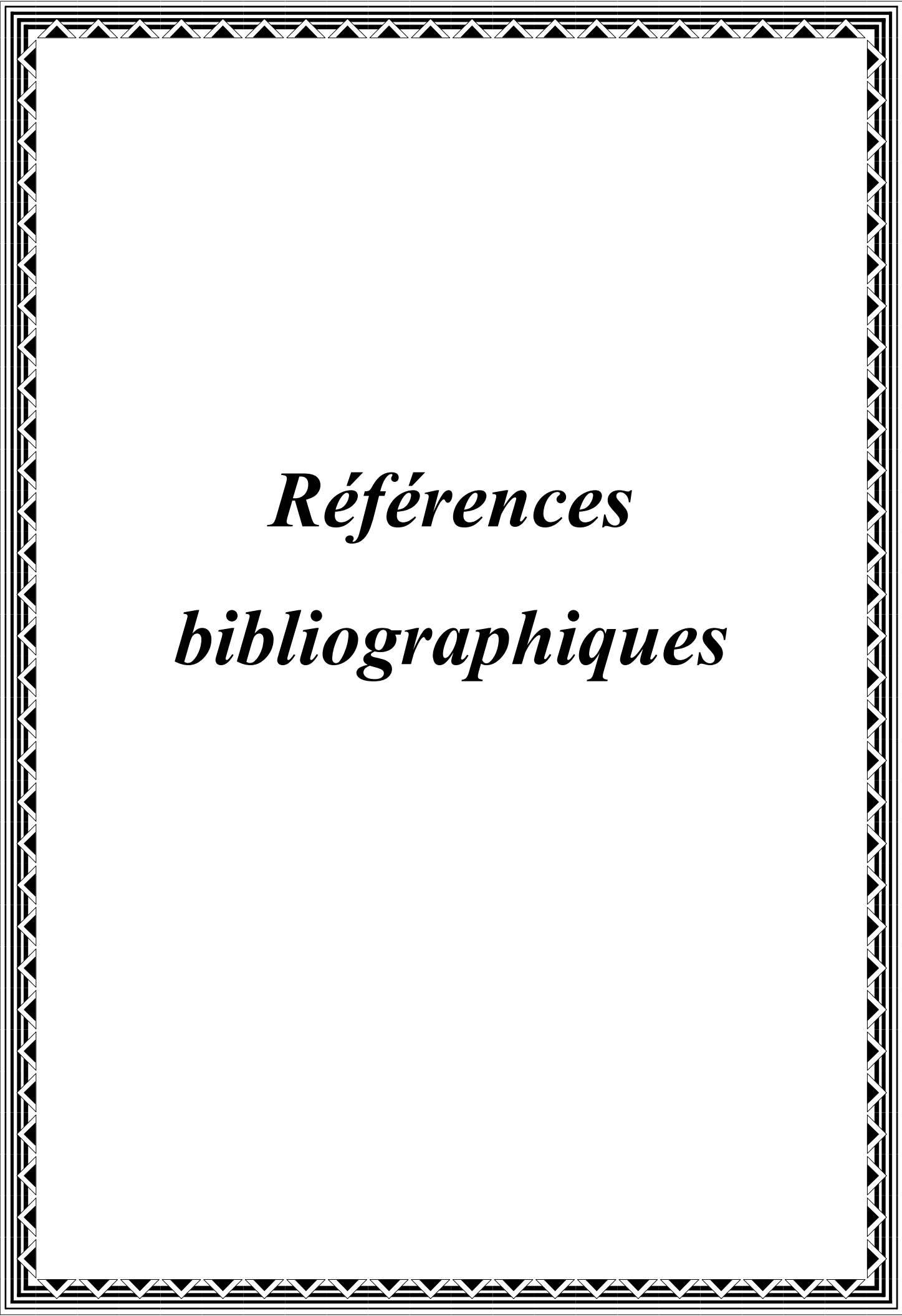
تم عزل هاته البكتيريا و تنقيتها من خلال حبيبات كفير متحصل عليها و هي مكتملة النمو و حبيبات منتجة في المخبر و ذلك في أوساط انتقائية ، و قد تم بذلك عزل جماعات بكتيرية مختلفة منها : البكتيريا العصوية اللكتيكية و بكتيريا حمض الخل و البكتيريا الكروية , leuconostocs, pédiocoques, و كذلك الخمائر.

تم اجراء محاولة إنتاج حبيبات الكفير في المخبر من خلال توفير شروط تكونها و أدى ذلك إلى تكون بعض الهياكل الصغيرة تشبه حبيبات الكفير المكتسبة.

فحص نشاط مضادات الميكروبات للسلاطات المعزولة من الكفيرو كذلك من الحبيبات و مصل اللبن على السلاطات المسببة للأمراض : *Candida albicans, Aspergillus flavus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis*. بالفعل بين أن النشاط المضاد للبكتيريا و الخمائر الأمثل تم الحصول عليه عن طريق الحبيبات ، في حين تم الحصول على نشاط مضاد للفطريات من قبل السلاطات المعزولة.

اما بالنسبة للحبيبات المنتجة في المختبر على الرغم من انها تبدو صغيرة إلا ان النتائج اكدت ان نشاطها المضاد للميكروبات افضل من نشاط الحبيبات المكتسبة.

الكلمات المفتاحية: الكفير، الحليب المخمر، نشاط مضاد للميكروبات، البكتيريا اللبنية و بروبيوتيك.



*Références
bibliographiques*

9- Références bibliographiques

Anderson J. W. and Gilliland S. E. (1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus L1* on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 18, 43-50.

Angulo L., Lopez E. & Lema C. (1993). Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *J. Dairy Res.* 60, 263-267.

Beijerinck M.W. (1889). Sur le kéfir. Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles. Volume 23

Bensmira M., Nsabimana C., Jiang B. (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *Food Sci. Technol.* 43 1180–1184.

Bottazzi V. and Bianchl F. (1980). A note on scanning electronmicroscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *J. App/. Bacteriol.*, 48, 265-268.

Bonnefoy C. and Guillet F. (2002). Microbiologie et qualité dans l'industrie agroalimentaire. *Biosciences et technique.*

Cevikbas A., E. Yemni, F. W. Ezzedenn and Yardimici T. (1994). Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother. Res.*, 8: 78-82.

Chaitow L. and Trenev N. (2002). Probiotics. Natasha Trenev Website. www.Natren.com.

Chifiriuc M. C., Cioaca A. B. and Lazar V. (2011) *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe* 17, 433-435.

Compère C. (1999). Biofilms en milieu marin. *Tec. Sci. Méthodes* 11, 48-54

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999;284: 1318–1322.

- De Ley J., Gillis M. & Swings J.** (1984). Family VI. Acetobacteraceae Gillis and De Ley 1980. In Krieg N.R. & Holt J.G., eds. *Bergey's manual of system atic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 267-278.
- De Man, J.C., Rogosa M. and Sharpe M.E.** (1960). A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. App. Bacteriol.*, 23, (1):130-135.
- Denis C., Gueguen M., Henry E. & Levert D.** (2001). New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81, 365-379.
- Dingding A., Danhorn T., Fuqua C. & Parsek M.R.** (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *PNAS* 103, 3828-3833
- DSMZ** (2001). Acetobacte rperoxydan smedium: medium 254. Deutsche Sammlung vonmikroorg anismenund Zelkulturen Gm BH. Germany: Braunschweig.
- Duitschaeverc L., Kemp N. and Emmons D.,** (1987). Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milch wissens chaft*, 42, 80-82.
- Edward R. and Farnworth.** (2005). Kefir – a complex probiotic. food science and technology.
- Filloux A. & Vallet I.** (2003). Biofilms : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Med. Sci.* 19, 77-83
- Furukawa N., Matsuoka A. and Yamanaka Y.** (1990). Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J. Japan. Soc. Nutr. Food Sci.*, 43: 450-453.
- Furukawa N., Matsuoka A., Takahashi T. and Yamanaka Y.,** (1991). Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival day in mice bearing Meth-A. *Anim. Sci. Tec.*, 62:579-585.
- Gamba R.R., Colo C., Correa M., Astoreca A., Alconada T., De Antoni G., Peláez A.L.** (2015). Antifungal Activity against *Aspergillus parasiticus* of Supernatants from Whey Permeates Fermented with Kefir Grains. *Adv Microbiol.* 5, 479-492.

Gamba R.R., De Antoni G., León Peláez A., (2016). Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*. *J Dairy Res.* 83 (02), 249-255.

Garrote G.L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. (2001). Chemical and microbial characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.* 68, 639-652

Garvie E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.* 16, 147-178

Garvie E.I.(1986). Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In Sneath P.H.A., ed. *Bergey's manual of system atic bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1075-1082.

Gaware V., Kotade K., Dolas R., and Dhamak K. (2011) The magic of kefir: A review. *Pharmacol. Online* 1, 376-386.

Guzel-Seydim Z., Wyffels J.T., Seydim A.C., Greene A.K. (2005). Turkish kefir and kefir grains :microbial enumeration and electron microscobic observation. *J Dairy Technol.* 2005;58:25–29.

Guzel-Seydim Z. B., Kok-Tas T., Greene A. K., & Seydim A. C.(2011). Review: functional properties of kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 261-268.

Hallé C., Leroi F., Dousset X. and Pidoux M. (1994). Les kéfirs. Des associations bactéries lactique-levures, **In:** de Roissart H. and Luquet F.M., editors. *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques* Vol 2: 169-182. Uriage, France.

Hall-Stoodley L., Stoodley P. and Evolving. (2009). concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;11:1034–1043.

Hencké Stéphanie (2002). Utilisation alimentaire des levures. Thèse de doctorat. Faculté de Pharmacie. Université henripoincare, nancy.

ISO 6611 FIL-IDF 94: 2004. Lait et produits laitiers. Dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou moisissures. Comptage des colonies à 25°C.

- Joshi V. K., Sharma S. and Rana N. S.** (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 435-439.
- Kandler O. and Kunath P.** (1983). *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *System. Appl. Microbiol.* 4, 286-294
- Kaplan J.B.** (2010). Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 2010;89:205–218.
- Kim D. H., Chon J. W., Kang I. B., Kim H., Kim H. S., Song K. Y. and Seo K. H.** (2015). Growth inhibition of *Cronobacter akazakii* in experimentally contaminated powdered infant formula by kefir supernatant. *J. Food Prot.* 78, 1651-1655.
- Kojima S., Takizawa S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. and Nakase T.** (1993). An improved medium for the isolation of *Lactobacilli* from kefir grains. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 199-120.
- Kök-Taş T.** (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science.* 6(2) :780-89.
- Koroleva N.S.** (1982). Special products (kefir, koumyss, etc.). *Proceedings XXI International Dairy Congress, Moscow 2: 146-151.*
- Koroleva N. S.** (1988). Technology of kefir and kumys. *IDF Bull.*, 227: 96-100.29.
- Koroleva N.S.** (1991). Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K., editor. Therapeutic properties of fermented milks: 159-179. *Elsevier Applied Sciences Publishers, London, UK.*
- Kuo C.Y. & Lin C.W.** (1999). Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 54, 19-23.
- Lacrosse R.** (1981). Le kéfir, boisson lactée fermentée. *Lait Nous* 4, 7-9.

- León A., Quintero E., Serna A., Gamba R., De Antoni G., Giannuzzi L.,** (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*. 24, 177-183.
- Linossier J.P. and Dousset X.** (1994). Stimulation de la croissance et du métabolisme de *Lactobacillus kefir* par *Candida kefir*. *Microbiologie Aliments Nutrition* 12: 341-351.
- Liu J-R. and Lin C-W.** (2000). Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose or sucrose. *Journal of Food Science* 65: 716-719.
- Liu J-R., Wang, S-Y., Lin, Y-Y. and Lin, C-W.** (2002). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer* 44: 182-187.
- Londero A., León A. Diosma G., De Antoni G., Abraham A., Garrote G.,** (2014). Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination. *J Sci Food Agr*. 94, 3189-3194.
- Margulis L.** (1995). From kefir to death. In: Brockman, J. and Matson, K., editors. How things are: 69-78. William Morrow and Co., New York, USA.
- Mariani-Kurkdjian P. and Bingen É.** (2012). Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation* (2012) 21:268-279.
- Marshall V.M., Cole W.M.** (1984). Studies on kefir. *IDF Bull.*, 179, XIII.
- Mayeux J.V., Sandine W.E., Elliker P.R.** (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *J.DairySci.*45, 655–656.
- Meydani S. N. and Ha W. K.** (2000). Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 861-872.
- Molska I., Kocon J., Zmarlicki S.** (1980). Electron microscopic studies on structure and microflora of kefir grains. *Acta. Aliment. Pol.*, 6, 145-154 (OSA 1981, n° 7063).
- Mounier J., Gelsomino R., Goerges S., Vancanneyt M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Scherer S., Swings J., Fitzgerald G.F. & Cogan T.M.** (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6489-6500.

Ninane V. (2002). Le kéfir : procédés de fabrication et caractérisation du consortium de micro-organismes. Mémoire de fin d'études. Faculté des Sciences Agronomiques. Universitaire de Gembloux.

Ninane V. (2007). Caractérisation du consortium microbien d'un grain de kéfir. Thèse de doctorat. Faculté des sciences agronomiques. Universitaire de Gembloux.

Ottogalli G., Galli A., Resmini P. & Volonterio G. (1973). Composizione microbiologica, chimica ed ultra struttura dei granuli di kefir. *Ann. Microbiol.* 23, 109-

Ot-es Semih and Cagindi Oz-em . (2003). Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects ; *Pakistan Journal of Nutrition* 2 (2): 54-59.121.

Pascal Auger. (2015). Activité anti-cancéreuse d'une parasporine de *bacillusthuringiensis* 4r2. Université du Québec. Canada

Picioeanu C., Kreft J.U., Klausen M., Haagenen J.A.J., Tolker-Nielsen T. & Molin S. (2007). Microbial motility involvement in biofilm structure formation – a 3D modelling study. *Water Sci. Technol.* 55, 337-343

Piermaria J., Bosch A., Pinotti A., Yantorno O., Garcia M. A., Abraham A. G. (2010). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocoll.* 25 1261–1269.

Pintado M. E., Lopes Da Silva J. A., Fernandes P. B., Malcata F. X. and Hogg, T. A. (1996). Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *Int. J. Food Sci. Technol.* 31, 15-26.

Pop Carmen, Apostu Sorin, Salanț Liana, Ancuța M. Rotarl, Sindic Marianne, Mabon Nicolas , Socaciu Carmen. (2014). Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*

Prado M., Blandón L.M., Vandenberghe Luciana L.P.S., Rodrigues C., Guillermo R. Castro, Soccoll V.T. and Soccoll C.R. (2015) Milk kefir : composition , microbial cultures , biological activities, and related products. *frontiers in microbiology .*

Prescott, Harley, Klein Wiley, Sherwood Woolvverton. (2010). Microbiologie .3^{ème} édition. Debeok. Paris. P.631-822.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2007). Microbiology. *Edition de Mc Graw-Hill Science Engineering.*

Racotta V., Humbert G. and Lorient D. (1978). Procédé de valorisation des protéines du lactosérum de fromagerie par thermocoagulation. Composition, digestibilité et valeur nutritive des produits obtenus. Volume 58, Number 579-580

Rea M.C., Lennartsson T., Dillon P., Drinan F.D., Reville W.J., Heapes M., Cogan T.M., (1996). Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 83e94.

Richard D'ari, Guennadi Sezonov. Les organismes modèles : Biologie et génétique d'*Escherichia coli*. Belin. Paris. France.

Rodrigues K. L., Carvalho J. C. and Schneedorf J. M. (2005). Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammo pharmacology* 13, 485-492.

Roos N.M., Katan M.B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipidmetabolism, and carcinogenesis. A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000;71:405–11.

Saloff-Coaste C. (1996). Kefir. Danonne. *Newslett.* 11, 1-11.

Schneedorf J.M., Anfiteatro D. O. (2004) quefir e inflamacao. In: Carvalho JCT, editor. Fitoterapicos anti-inflamatorios: aspectos quimicos, farmacologicos e aplicac, oesterapeuticas. Sao Paulo: Tecmedd.

Schroevens A. & Britz T. (2003). Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *Int. J. Dairy Technol.* 56, 183-187

Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G. & Spasov Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 1–6

Simpson P.J., Fitzgerald G.F., Stanton C. & Ross R.P. (2006). Enumeration and identification of pediococci in powder-based products using selective media and rapid PFGE. *J. Microbiol. Methods* 64, 120-125

Souhila Boubrit et Nafaa Boussad. (2007). Détermination *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Ingénieur d'état en biologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou -

Speroni E., Govoni P., Guizzard S. et al. (2002). Anti-inflammatory and cicatrizing activity of Echinacea apallida Nutt. root extract. *J Ethnopharm* 2002;79:265–72.

Sullivan A., and Nord C.E. (2002). Probiotics in human infections. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:625–7.

Suresh Kumar A., Mody K., Jha B. (2008). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol.* 47 103–117. 10.1002.

Tamai Y., Yoshimitsu N., Watanabe Y., Kuwabara Y. and Nagai S. (1996). Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *J. Ferment. Bioeng.*, 81: 181-182.

Tamime A.Y., Muir D.D. and Wszolek M. (1999). Kefir, koumiss and kishk. *Dairy Industries International* 64: 32-33.

Tamime. A.Y., (2006). Fermented milks; édition : Blackwell science ; chapitre 8 page

Toba T., Arihara K., and Adachi S. (1990). Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 219-224.

Tremblay Yannick D.N., Hathroubi Skander, Jacques Mario . (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research.*

Vinderola C. G., Duart J., Thangavel D., Perdigon G., Farnworth E. and Matar C. (2005). Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response. *Eur. J. Inflamm.* 3, 63-73.

Wheeler J. G., Shema S. J., Bogle M. L., Shirrell M. A., Burks A. W., Pittler A. and Helm R. M. (1997). Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 79, 229-233.

Yoshida Y., Palmer R.J., Yang J., Kolendrander P.E. & Cisar J.O. (2006). Streptococcal receptor polysaccharides: recognition molecules for oral biofilm formation. *BMC Oral Health* 6, S12.

Zacconi C., Parisi M. G., Sarra P. G., Dallavalle P. and Bottazzi V. (1995). Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 12: 387-390.

Zourari A. & Anifantakis E.M. (1988). Le kéfir - Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de production. Lait* 68, 373-392 .

9.1- Références électroniques

01/ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202530> consulté le 02/04/2017

02/ https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis consulté le 24/04/2017

03/ <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/candidoses> consulté le 27/04/2017

04/ <https://www.consommerdurable.com/2009/09/comment-preparer-du-kefir-kephir/> consulté le 22/03/2017

05/ <http://www.mr-plantes.com/2014/03/boisson-miracle/> consulté le 03/05/2017



Annexe

10- Annexe

➤ Composition des milieux de cultures

• Milieu MRS (DE Man, Rogosa et Sharpe)

Peptone	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	4g
Glucose	20 g
Acétate de sodium	0.2 g
Sulfate de magnésium.....	0.05 g
Phosphate bi potassique.....	2 g
Tween 80	1 ml
Agar	14 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH $6,2 \pm 0,2$ a 25°C

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes.

• Milieu de Mayeux, Sandine et Elliker – MSE

Tryptone.....	10 g
Gélatine.....	2.5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,9 \pm 0,2$.

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes.

- **Milieu PCA (Plate Count Agar)**

Tryptone.....	6.5 g
Extrait de Levure.....	2.5 g
Glucose.....	1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7 \pm 0,2$.

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes.

- **Milieu AMP (Acetobacter Peroxydans Medium)**

Extrait de Malt.....	15 g
Extrait de Levure.....	5 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	940 ml

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes.

Après stérilisation ajouter 60 ml d'éthanol (50% v/v), stérilisé par filtration.

- **Milieu YGC (Gélose Glucosée-Extrait de Levure-Chloramphénicol)**

Extrait de Levure.....	5 g
Glucose.....	20 g
Chloramphénicol.....	0.1 g
Agar.....	14.9 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH: 6.6 ± 0.2 a 25 °C.

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes.

- **Milieu YPG (Yeast , Peptone, Glucose)**

Extrait de Levure	10 g
Glucose	20 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,9 \pm 0,2$.

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes

- **Milieu Sabouraud plus chloramphénicol**

Peptone pepsique de viande	10 g
Glucose	20 g
Chloramphénicol.....	0.5 g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000 ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,9 \pm 0,2$.

Stérilisation a 120°C pendant 15 minutes.

- **Milieu de dilution**

NaCl.....	9 g
Eau distillée.....	1000 ml
Chloramphénicol.....	0.1 g

Autoclavage durant 15 min à 121°C.

Etudiantes : BRIHMETTE Radja CHAOUA Samah	Date de soutenance : 06/07/2017
Thème Kéfir : Production des grains et mise en évidence de l'activité antimicrobienne.	
Résumé <p>Le Kéfir est un produit laitier fermenté produit par un mélange de bactéries lactiques, de bactéries acétiques et de levures.</p> <p>Cette microflore a été isolée et purifiée sur des milieux sélectifs, à partir des grains acquis et des grains produits au laboratoire, ce qui a permis d'isoler différents groupes bactériens, à savoir : des lactobacilles, des pédiocoques, des leuconostocs, des microcoques et des bactéries acétiques, ainsi que des levures.</p> <p>Une tentative de production des grains de Kéfir au laboratoire a été effectuée en réunissant les conditions favorables à leur constitution, ce qui a conduit à la formation de quelques petites structurations ressemblant aux grains de kéfir acquis.</p> <p>L'activité antimicrobienne des souches isolées de Kéfir, ainsi que celle des grains et de leurs lactosérums, a été mise en évidence sur des souches pathogènes: <i>Candida albicans</i>, <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Bacillus subtilis</i>. En effet, il a été montré que l'optimum de l'activité bactérienne et levurienne est obtenu par les grains, alors que celui de l'activité antifongique est obtenu par les souches isolées. Quant aux grains produits au laboratoire, bien qu'ils semblent de petite taille, les résultats ont confirmé qu'ils sont dotés d'une activité antimicrobienne bien meilleure que celle des grains acquis.</p>	
Mots clés : Kéfir, lait fermenté, activité antimicrobienne, probiotique, bactéries lactiques.	
Laboratoire de recherche : laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des frères Mentouri, Constantine.	
Jury de soutenance Présidente du jury : Mme.MIHOUBI I. Prof.Univ.Mentouri,Constantine Encadreur : Mr. KACEM CHAOUICHE N. Prof. Univ.Mentouri,Constantine Examinatrice : Mme.Cherfia R. MAA.Univ.Mentouri,Constantine Tutrice : Mme. Benhassine S. Dr. Univ.Mentouri,Constantine	