

## Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir

S. LAIRINI<sup>1\*</sup>, N. BEQQALI<sup>1</sup>, R. BOUSLAMTI<sup>1</sup>, R. BELKHOUCHE<sup>1</sup> et F. ZERROUQ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments (LASSA), Université Sidi Mohammed Ben Abdallah, Ecole Supérieure de Technologie, Fès, Maroc

<sup>2</sup> Unité QHSE-RG, Laboratoire LCME, Ecole Supérieure de Technologie, Université SMBA de Fès, Maroc

\* Correspondance, courriel : [lairinisanaa@yahoo.fr](mailto:lairinisanaa@yahoo.fr)

### Résumé

Les bactéries lactiques par leur biodiversité sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire. L'objectif de cette étude est donc l'isolement des bactéries lactiques à partir de lben et jben marocains, l'étude de la vitesse d'acidification des isolats en culture pure et en culture mixte afin de trouver la meilleure combinaison à caractère acidifiant très rapide et très élevé et son utilisation pour formuler une boisson lactée fermentée proche du Kéfir. Les résultats montrent que les isolats obtenus appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*, que les *Lactobacillus* et les *Lactococcus* isolés en culture pure provoquent tous une diminution du pH du lait de 6,5 à 4,2 au bout de 24 heures de fermentation et que la souche Lb4 du genre *Lactobacillus* possède une forte propriété acidifiante. Cette souche a été utilisée en combinaison avec les *Leuconostoc* et les *Lactococcus* (CM1, CM2, CM3) et a donné une vitesse d'acidification plus rapide et un pH plus bas. Une boisson lactée fermentée proche du Kéfir qui est une boisson très reconnue par ses effets sanitaires et thérapeutiques est alors produite grâce à cette dernière combinaison et à l'ajout des levures (*saccharomyces cerevisiae*) et des bactéries acétiques (*Acetobacter*). Le résultat de ce travail a noté une bonne appréciation du nouveau produit par le jury de dégustation et une forte ressemblance au Kéfir qui est un produit d'origine Russe.

**Mots-clés :** *bactéries lactiques, Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Lben, Jben, Kéfir.*

### Abstract

**Isolation of lactic acid bacteria from traditional Moroccan dairy products and formulation of a loved fermented milk Kefir**

Lactic acid bacteria for their biodiversity and their therapeutic properties are widely used in the food industry. the interest of this study is the isolation of lactic acid bacteria from Lben and Jben Moroccan studying the acidification rate of isolates in pure culture and in mixed culture in order to find the best combination for fast acidifying character and very expensive and its use to make a fermented milk close Kefir . The results show that the isolates belong to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and the isolated pure culture *Lactococcus* all cause a decrease in pH of the milk to 6.5 to 4.2 after 24 hours fermentation and the LB4 strain of *Lactobacillus* has a strong acidifying property.

This strain was used in combination with *Lactococcus* and *Leuconostoc* (CM1, CM2, CM3) gave a faster speed of acidification and a low pH. A fermented milk drink close Kefir is a highly recognized by its health and therapeutic effects beverage is then produced by the latter combination and the addition of yeast (*saccharomyces cerevisiae*) and acetic acid bacteria (*Acetobacter*). The result of this work has been a good appreciation of the new product by the tasting panel and a strong resemblance to Kefir is a Russian original product.

**Keywords :** *lactic acid bacteria, Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Lben, Jben, Kefir.*

## 1. Introduction

Les bactéries lactiques par leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait et leurs propriétés pro-biotiques sont très utiles à la santé, en effet, elles améliorent les fonctions digestives et ont un effet très positif sur la microflore intestinale [1]. Les produits dérivés issu d'une fermentation lactique traditionnelle connaissent depuis quelques années un développement considérable grâce, à l'intérêt que trouvent les consommateurs sur le plan organoleptique, nutritionnel, thérapeutique, voire hygiénique en raison de leur acidité. La biodiversité de ces bactéries lactiques impliquées dans ce processus est un facteur fondamental pour la préservation de la typicité et des caractéristiques originales des produits [2] et sans inconvénients pour les consommateurs intolérants au lactose. Le kéfir qui est un produit originaire du Caucase, est issu d'une fermentation à dominance lactique (*Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc*) accompagné d'une légère fermentation alcoolique en présence de levures (*saccharomyces, candida*, etc.). Grâce à sa composition riche et diversifiée, le kéfir a des effets thérapeutiques très intéressants et une consommation régulière de ce produit peut avoir un effet anti cancérigène [3], antimicrobien [4], immunologique très important [5] grâce à son pH final très faible compris entre 4.3 et 4.4 [6,7] sans oublier l'effet bénéfique sur le tractus intestinal [8].

Afin d'améliorer la qualité et d'éviter la disparition à plus ou moins longue échéance [9] des produits laitiers traditionnels, ces derniers méritent un transfert de production à l'échelle semi-industrielle ou industrielle pour être connus et commercialisés à plus grande échelle. Ceci permettra de standardiser les différentes étapes de leur processus de production, de mieux maîtriser leur qualité et de renforcer la valeur ajoutée de leurs propriétés. D'où l'idée d'isoler des bactéries lactiques à partir des produits traditionnels car l'intérêt de ces souches réside, dans leur capacité à produire des métabolites spécifiques, notamment ceux responsables de la saveur, qui peuvent être différents de ceux produits par les souches industrielles [10]. Ensuite les utiliser dans un procédé semi industriel pour obtenir d'autres produits fermentés avec une meilleure qualité hygiénique et à caractère thérapeutique très poussé, surtout que ces dernières années; des recherches se sont accentuées pour trouver des voies de thérapies à base des probiotiques pour le traitement de diverses maladies chroniques [11].

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Isolement et purification des souches

L'isolement des microorganismes a été réalisé à partir des échantillons de deux produits laitiers qui ont été achetés dans les laiteries de Fès : le leben et le Jben Trois genres de bactéries lactiques ont été isolés : *Lactobacillus* (Lb), *Leuconostoc* (Leuc) et *Lactococcus* (Lc), respectivement sur les milieux MRS, MSE et M17, plusieurs repiquages successifs ont été effectués successifs sur milieu solide jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de stries [12] suivi d'une observation microscopique.

## 2-2. Identification et conservation

L'identification des souches purifiées est établie pour les bactéries lactiques en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques (forme, coloration de Gram, catalase, croissance à différentes température, sensibilité au NaCl, fermentation des sucres, production de CO<sub>2</sub>). Ensuite Pour assurer une bonne continuité du travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates

## 2-3. Préparation de la pré-culture

Des dilutions décimales ont été réalisées à partir de 1ml du bouillon contenant la souche activée. Après une nuit d'incubation, le premier tube pour lequel la coagulation du lait n'est pas très accentuée est sensé contenir les bactéries en phase exponentielle de croissance. Le lait contenu dans ce tube est utilisé comme pré-culture.

## 2-4. Test d'acidification du lait en culture pure

L'inoculation des souches pures de bactéries lactiques se fait à raison de 2% dans le lait et l'incubation à 37°C. La mesure du pH a été faite à l'aide d'un pH-mètre.

## 2-5. Caractérisation des isolats à partir de la variation de pH lors de la fermentation

La détermination de la variation de pH ( $\Delta pH = pH_{\text{lait } t=0} - pH_{\text{lait } t \neq 0}$ ) [13], permet de classer les bactéries lactiques acidifiantes en fonction de leur vitesse d'acidification pendant les 6 premières heures, ainsi les souches sont qualifiées de : Souches à grande vitesse d'acidification si la variation de pH atteint une valeur de 0,4 unité pH en moins de 3heures ; Souches à vitesse moyenne d'acidification si cette valeur est atteinte entre 3 et 5heures ; Souches à faible vitesse d'acidification si la valeur de 0,4 est atteinte après 5 heures.

## 2-6. Cinétique d'acidification par les combinaisons des différents groupe microbiens

Dans le but de déterminer la combinaison de Bactéries lactiques adéquate pour la production d'un lait fermenté, nous avons étudié la cinétique d'acidification de différents mélanges des Lb, des Leuc et des Lc que nous avons isolés tout en variant la proportion de chaque genre. Les différentes combinaisons réalisées sont les suivantes :

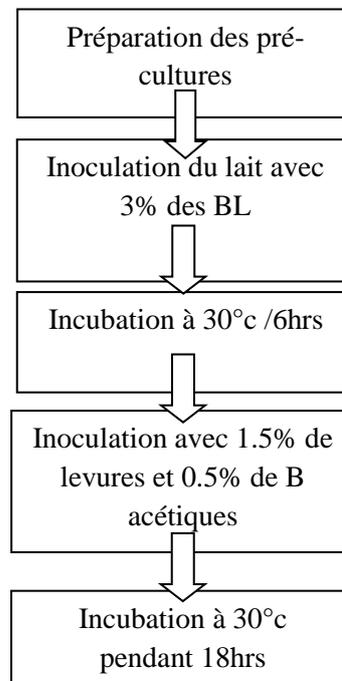
- CP correspond à 100% de (Lb)
- CM1 correspond à 75% (Lb) et 25% (Leuc)
- CM2 correspond à 75% (Lb) et 25% (Lc)
- CM3 correspond à 75% (Lb) et 25%(Leuc+Lc)
- CM4 correspond à 75% (Leuc+Lc) et 25% Lb

Les souches identifiées en genre obtenues ont étéensemencées en culture pure (CP) et en culture mixte (CM1, CM2, CM3, CM4). Les mélanges des souches de chaque genre ont été préparés à partir des pré-cultures de chaque souche et ont été inoculés au lait UHT entier à la concentration de 2%, suivie d'une incubation à 37°C.

## 2-7. Production de lait fermenté

La fabrication du lait fermenté a été appliqué selon le protocole de préparation du Kéfir citée ci-dessous (**Figure 1**) [14] mais en utilisant la combinaison des souches de bactéries lactiques Marocaines bien sélectionnées : CM1, CM2 ou CM3, et en ensemencant par des levures *Saccharomyces cerevisiae* et des bactéries acétiques *Acetobacter*.

Le produit obtenu P et le témoin acheté du commerce « Kéfir » ont fait l'objet d'une étude organoleptique, dont l'évaluation sensorielle a été réalisée en utilisant un panel de dégustation. Les attributs reconnus par le panel comme décrivant les propriétés sensorielles du lait fermenté et du Kéfir sont : la couleur, le goût, l'odeur, la saveur, l'aspect et la texture. Tous ces paramètres ont été évalués sur une échelle de score allant de 1 à 8.



**Figure 1 :** Organigramme de la Production d'un lait fermenté proche du Kéfir » par des souches Marocaines selon [14]

### 3. Résultats

#### 3-1. Isolement et purification des microorganismes

L'isolement et purification des microorganismes sur des milieux sélectifs à partir du petit lait et du Jben a permis l'obtention de neuf isolats dont neuf correspondent à des bactéries lactiques.

#### 3-2. Identification des bactéries lactiques et conservation

Les neuf isolats de Bactéries lactiques obtenus ont été identifiés selon des critères morphologiques et biochimiques. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1 : Tests d'identification des isolats de bactéries lactiques**

Souches		Lb1	Lb2	Lb3	Lb4	Lb5	Leuc1	Leuc2	Lc1	Lc2
Tests										
Gram		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morphologie		Bacille	Cocobacil	Bacille	Bacille	Bacille	Coque	Coque	Coque	Coque
Catalase		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de CO2		-	-	-	-	-	+	+	+	+
Température	4°C	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	-	-	+	-	-	+	+	-	-
NaCl	2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4%	+	+	-	+	+	+	-	+	+
	6,5%	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Fermentation des sucres	Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	saccharose	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	Ribose	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+

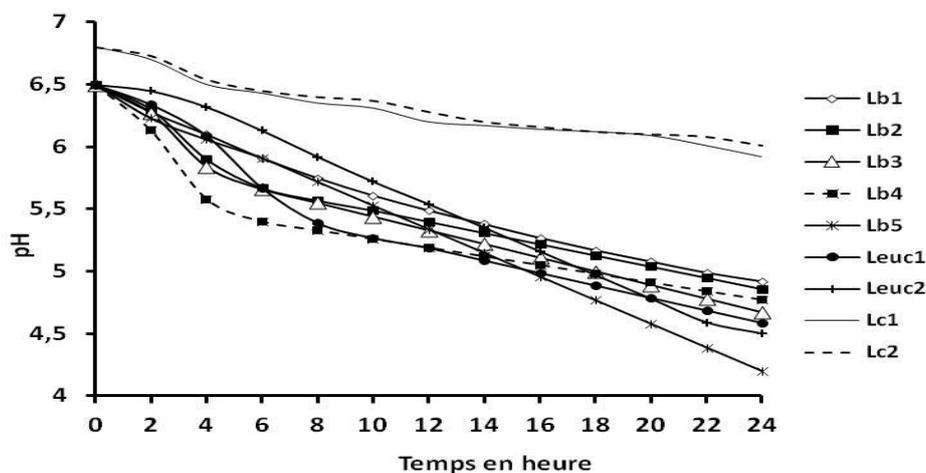
En se basant sur ces tests d'identification, on a pu classer ces bactéries lactiques en 4 groupes :

- ✓ Groupe 1 : Lb1, Lb2, Lb4, Lb5 sont des (Lb) mésophiles et homofermentaires facultatifs.
- ✓ Groupe 2 : Lb3 : sont des (Lb) thermophile homofermentaires
- ✓ Groupe3 : Leuc1, leuc2 : sont des (Leuc) thermophiles hétérofermentaires.
- ✓ Groupe4 : Lc1, Lc2 : sont des (Lc) thermophiles hétérofermentaires.

Les isolats identifiés ont été conservés par congélation à -20°C en présence de glycérol (25 à 30%) et par lyophilisation. Cette dernière technique a été réalisée au CNESTEN à Rabat.

### 3-3. Test d'acidification du lait en culture pure

Le suivi du pH pendant 24 heures du lait ensemencé à 2%V/V par les isolats de bactéries lactiques est représenté sur la **Figure 1**. Les valeurs représentées sur la **Figure** sont la moyenne de deux répétitions.

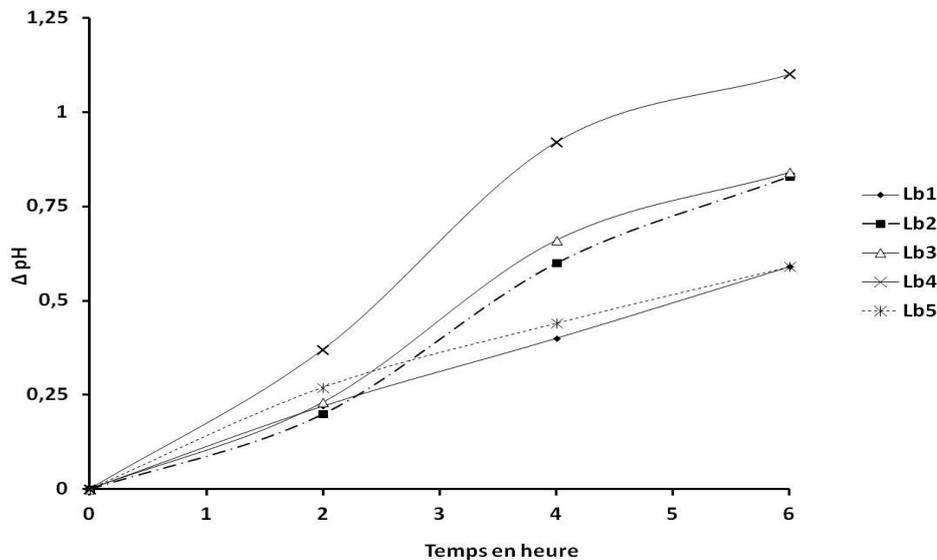


**Figure 2 : Evolution du pH du lait lors de la fermentation par les souches de bactéries lactiques**

Les valeurs représentées sur la figure 2 sont la moyenne de deux répétitions. Les résultats obtenus montrent que tous les *Lactobacilles* isolés (Lb1, Lb2, Lb3, Lb4 et Lb5) et les *Lactococcus* (Lc1, Lc2) provoquent une diminution du pH du lait de 6,5 au 4,2 au bout de 24 heures de fermentation. Parmi ces bactéries, la souche Lb4 a montré une forte diminution de pH du lait dès les 6 premières heures d'inoculation. Tandis que Le lait ensemencé par les *Leuconostoc* (Leuc1 et Leuc2) montre une très faible diminution du pH.

### 3-4. Caractérisation des isolats à partir de la variation de pH lors de la fermentation

La variation du pH de la fermentation du lait par les souches fortement acidifiantes (de Lb1 jusqu'à Lb5) a été étudié pendant les 6 premières heures (*figure2*) afin de sélectionner la ou les souches à grande vitesse d'acidification.



**Figure 3 :** Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures des isolats du genre *Lactobacillus*

En projetant la valeur de 0,4 unité pH sur les courbes de variation puis sur l'axe des abscisses (temps) (*figure 3*), nous remarquons que : Les souches Lb2, Lb3 et Lb4 ont diminué le pH du lait de 0,4 unité pH en moins de trois heures; ce sont donc des souches à grande vitesse d'acidification. De plus, la vitesse d'acidification de la souche Lb4 est supérieure à celle de la souche Lb3 qui est aussi supérieure à celle de la souche Lb2. Les souches Lb1, Lb5 ont diminué le pH du lait de 0,4 unité pH pour  $3 < t \leq 5$  heures. Ces souches ont une vitesse moyenne d'acidification du lait. La vitesse d'acidification de la souche Lb5 est plus grande que celle des souches Lb1.

### 3-5. Test d'acidification en culture mixte et sélection de levains

Le pH des combinaisons sélectionnées a été étudié pendant 24 heures et le résultat obtenu est représenté sur la courbe suivante (*figure 4*) :

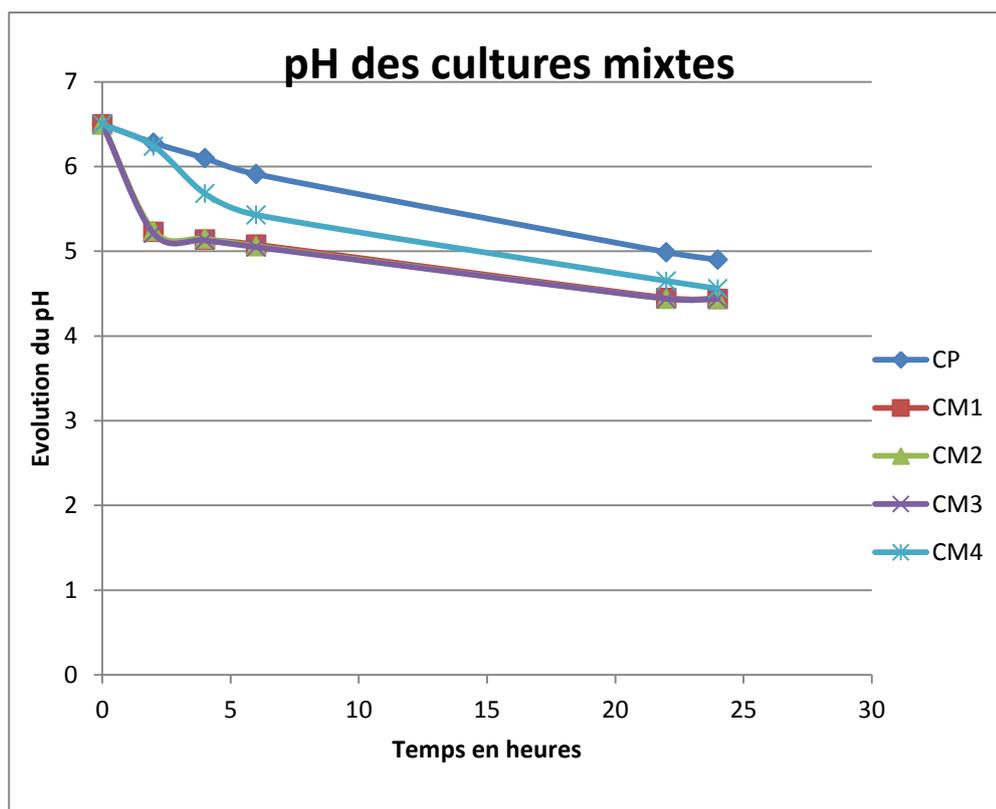
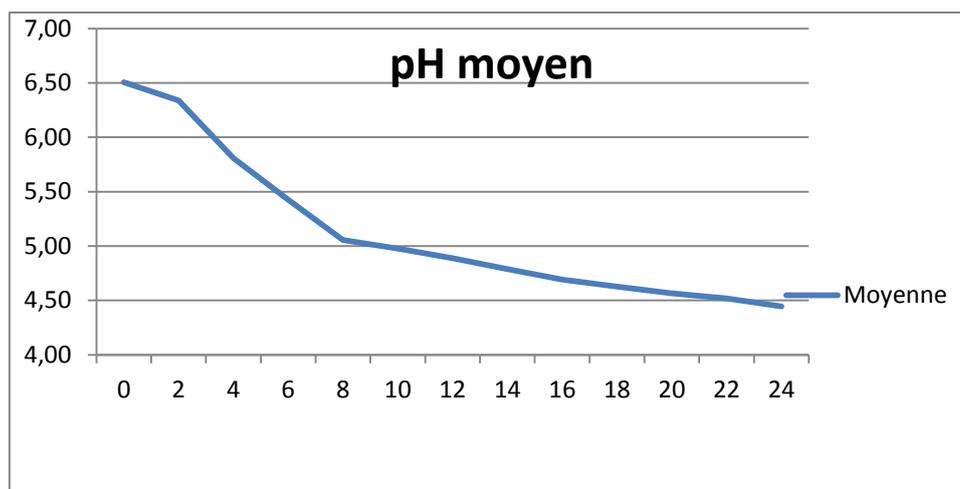


Figure 4 : Evolution du pH des cultures mixtes en fonction du temps

Les profils d'acidification du lait diffèrent selon les combinaisons utilisées. La culture pure CP constituée uniquement de lactobacilles (Lb4) acidifie le lait jusqu'à  $\text{pH} = 4,4$  avec une fermentation lente au début. Les cultures mixtes CM1, CM2 et CM3 constituées respectivement de 75% de lactobacilles et 25% de Leuc, 75% de lactobacilles et 25% de Lc, 75% de Lb et 25% de Leuc et Lc. Le profil d'acidification est presque le même, avec une acidification rapide au début de la fermentation et un  $\text{pH} = 4,4$  après 24 heures de fermentation. Pour la combinaison CM4 (25% du mélange de Lb+ 75% du mélange des deux souches de Leuc et Lc), on remarque une faible et lente acidification avec une diminution du pH du lait à 4,56 après 24 heures de fermentation.

### 3-6. Production du lait fermenté et étude organoleptique

L'inoculation 2.5% des bactéries lactiques à  $t = 0$  suivi de 2.5% de levure et 0.5% de bactéries acétiques après 6 heures de fermentation lactique a abouti à l'obtention d'un produit dont l'évolution du pH est représentée dans la Figure suivante (Figure 5). On remarque une diminution très rapide du pH lors des six premières heures de fermentation essentiellement lactique. La deuxième phase de fermentation à la fois lactique et alcoolique est caractérisée par une diminution lente de pH qui se stabilise après 18hrs de fermentation



**Figure 5 :** Evolution du pH lors de la production du lait fermenté

Le résultat de l'évaluation sensorielle du produit obtenu est représenté ci-dessous

**Tableau 2 :** Moyenne des notes de 1 à 8 données par le panel de dégustateurs aux produit Témoin: le Kéfir et le Lait fermenté

Attributs		Produits	
		Kéfir	Boisson lacté fermenté
Odeur	Intensité	5,5	5
	Lactée	6,5	6
	Levures	6	5,5
	Acide/piquante	6	6,5
	Fermentée	5	3
Arôme	Intensité	5,5	4
	Doux	7	5
	Acide/piquant	5,5	4,5
Texture et gout	Viscosité	5,5	5,3
	Couleur	8	8
	Séparation du sérum	7	6,8
	Effervescence	2	2
	Acide	6,5	6
	Aigre/amer	2	1,5
	Lacté	7	7
Acceptabilité totale		85	76,7

L'étude organoleptique du produit obtenu (**Tableau2**) a révélé la présence d'arôme levuré, caractéristique de la production d'alcool. L'analyse sensorielle a également fait cas de l'acidité des produits. En effet, le produit est jugé par le groupe de panélistes comme étant suffisamment acide. Son odeur piquante est sans doute liée à l'activité des bactéries acétiques qui auraient produit de l'acide acétique. En le comparant avec le témoin « Kéfir », le jury de dégustation a remarqué une forte ressemblance entre les deux produits.

#### 4. Discussion

D'après leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques, toutes les bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de Lben et du Jben appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Ce qui confirme que les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*) sont les principaux agents responsables de l'acidification et de la conversion du lait en Lben et Jben comme l'ont démontré Tantaoui-Elarakiet El Marrakchi [15] lors d'une étude sur les produits laitiers traditionnels marocains. Les mêmes auteurs ont démontré la présence de différentes espèces de bactéries lactiques appartenant aux deux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* dans les produits précédents. Les mêmes espèces ont été identifiées dans le kéfir par une multitude de chercheurs dont l'intérêt s'est porté sur la composition microbiologique du kéfir. Ce rapprochement est d'une importance majeure dans ce sens que les bactéries lactiques isolées du Lben et du Jben peuvent être exploitées pour la production du kéfir.

Dans cette étude, les lactobacilles ont montré une forte activité acidifiante bien que les souches des *Lactococcus* et des *Leuconostoc* peuvent diminuer le pH du lait jusqu'à 4,5. Ces souches ne peuvent pas être considérées comme des souches acidifiantes à cause de leur faible vitesse d'acidification pendant les premières 6 heures de la fermentation, elles peuvent donc être utilisées pour la production des saveurs et pour les opérations de post-acidification. Selon Cogan et al. [16], les bonnes bactéries lactiques acidifiantes sont celles qui sont capables de réduire le pH du lait de sa valeur initiale d'environ 6,6 à 5,3 sur une durée de 6 heures. Sur cette base, une seule souche de *Lactobacillus* Lb4 sur l'ensemble des isolats peut être considérée comme une bonne souche acidifiante. Toutefois, la technique de variation de pH ( $\Delta$ pH) appliquée à notre étude nous a permis de classer les isolats en souches rapidement acidifiantes, à vitesse moyenne d'acidification et à faible vitesse d'acidification. Les souches rapidement acidifiantes appartiennent au genre *Lactobacillus* et celles à faible vitesse d'acidification appartiennent au genre *Leuconostoc*. Dans notre expérience, les conditions de fermentations étaient les mêmes pour tous les isolats. Par conséquent, les différences des propriétés acidifiantes dépendent de la spécificité de chaque souche et des espèces, comme il a été rapporté dans plusieurs études [17-19].

Les études de combinaisons des souches pour l'acidification nous ont permis de dégager une relation de coopération entre les souches de *Leuconostoc* et de *Lactobacillus* isolés. En effet, en présence de *Leuconostoc*, la vitesse d'acidification du lait par les lactobacilles augmente de façon considérable. Diks et al. [20] ont démontré que certaines espèces de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc* sont en étroite relation. A partir des combinaisons de souches sélectionnées, nous avons pu produire une boisson lactée fermentée avec des caractéristiques proches du kéfir [21], le pH du produit obtenu (4,4 et 4,5) est en parfaite corrélation avec les données de la littérature. En effet, Odet [22] a montré que le pH du kéfir se situe entre 4,2 et 4,6. Cette étude a également montré l'odeur d'alcool caractérisé par l'arôme levuré dans le produit. Assadi et al. [23] ont trouvé que le titre alcoolique du kéfir était très faible, aussi l'aptitude texturante du produit obtenu très proche du témoin cela s'explique probablement par la production des exopolysaccharides par les *Leuconostoc* comme a été déjà montré dans notre étude [24], nous pouvons déduire alors que notre produit fermenté répond aux critères généraux d'acceptabilité.

#### 5. Conclusion

Les bactéries lactiques sélectionnées à partir des produits dérivés traditionnels du lait ont permis l'obtention d'un lait fermenté à caractère acidifiant très proche de celui acheté (Kéfir) le goût, l'odeur, l'aspect et la texture ont montré également satisfaisant.

En plus de l'agroalimentaire, Cette boisson pourra jouer un rôle très important dans le domaine de la santé pour toutes les propriétés thérapeutiques et nutritionnelles des bactéries lactiques, afin de Pouvoir concrétiser ce produit, d'autres études doivent être menées à savoir l'identification des différentes espèces qui ont participé à cette fermentation, l'étude approfondie des caractères organoleptiques du produit et l'étude de sa qualité hygiénique afin d'évaluer sa durée de conservation.

### Références

- [1] - S.L. GORBACH, The discovery of L. GG. *Nutrition Today*, 31 (1996) 2S-4S.
- [2] - E.H.E. AYAD et al., Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21 (2004) 715–725.
- [3] - T. NAGIRA et al., Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, kefir, *Cytotechnology*, 40 (2002) 125-137.
- [4] - A. SANTOS, M. SAN MAURO, M.SANCHEZ, J.M. TORRES and D. MARGUINA , The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir, *System and Applied Microbiology*, 26 (2003) 434-437.
- [5] - C. G. VINDEROLA et al., Immunomodulating capacity of kefir, *Journal of Dairy Research*, 72 (2005) 195-202.
- [6] - G. FONTAN, S. MARTINEZ, I. FRANCO, J. CARBALLO, Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture, *International Dairy Journal*, 16 (2006) 762-767.
- [7] - H.S. KWAK, S.K. PARK, D.S. KIM, Biostabilization of kefir with a nonlactose-Fermenting Yeast. *Journal of Dairy Science*, Vol.79 (1996) N°6.
- [8] - J. URDANETA, P. BARRENETXE, A. ARANGUREN, F. IRIGOYEN, F. MARZO, C. IBÁÑEZ, Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats, *Nutrition Research*, 27 (2007) 653-658.
- [9] - N. BENKERROUM et A.Y. TAMIME, Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale, *Food Microbiology*, 21 (2004) 399–413.
- [10] - A.H.E. AYAD et al., Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin, *International Dairy Journal*, 9 (1999) 725-735.
- [11] - Z. KATJA et G. ANDREJA, Modelling of batch kefir and bio-products processing, 88 (2010) 55-60.
- [12] - Guiraud .*Microbiologie alimentaire, Techniques d'analyse microbiologiques*, Ed, Dunod (1998).
- [13] - N. ARIBAS, J.M. POVEDA, S.SESENA, LI.PALOP, L.CABEZAS, Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use adjunct starter cultures, *Food control*, 20 (2009) 1092-1098.
- [14] - S. OTLES, O. CAGINDI. KEFI : A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects, *Pakistan Journal of Nutrition* 2 (2003) 54-59.
- [15] - A. TANTAQUI-ELARAKI, M. BERRADA, A.EL MARRAKCHI ET A. BERRAMOU, Etude sur le Iben Marocain, *Le lait* 63 (198)(1983) 230-245.
- [16] - T.M. COGAN, M.BARBOSA, E. BEUVIER, B. BIANCHI-SALVADORI, P.S. COCCONCELLI, I. FERNANDES, J. GOMEZ, R. GOMEZ, G. KALANZOPOULOS, A. LEDDA, M. MEDINA, M.C REA, et RODRIGUEZ, Caractérisation of lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy Research*, 64(1997) 409-421.
- [17] - A. BADIS, D. GUERTRIN, B.MOUSSA- BOUDJEMA, D.E.HENNI, M.E TORNADIJO et M.KIHAL, Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties, *Food Microbiology*, 3(2004) 72-78.
- [18] - HE. SPINLER, G. CORRIEU, Automatic method to quantify starter activity based on Ph measurement, *J Dairy Res*, 56 (1989) 755-764.

- [19] - V. XANTHOPOULOS, D. PETRIDIS, N. TZANETAKIS, Characterization and Classification of Streptococcus Thermophilus and Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Strains Isolated from Traditional Greek Yogurts, Journal of food science, (2001)1365-2621.
- [20] - L. M. DICKS, F. DELLAGLIO ET M.D. COLLINS, Proposal to reclassify Leuconostoc oenos as Oenococcus oeni, Journal of Systematic Bacteriology, 45 (1995)395-397.
- [21] - K. NAMBOU, C. GAO, F. ZHOU, B. GUO, L. AI, Z.J. WU, Anovel approach of direct formulation of defined starter cultures for different Kefir-like beverage production, International dairy journal, 34 (2014)237-246.
- [22] - ODET et al. La maîtrise de la qualité du lait stérilisé UHT, Edition APRIA (1995).
- [23] - M.M. ASSADI, R. POURAHMAD and N.MOAZAMI, Use of isolated kefir starter cultures in kefir production, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16 (2000)541-543.
- [24] - N. BEKKALI, S. LAIRINI, R. BELKHOUCHE, Production d'acide lactique et d'exopolysaccharides par des souches de Lactococcus isolées à partir de Lben traditionnel Marocain, Microbial Hyg Alim, Vol 24 n°70 (2012) 48-53.
- [25] - R. DAJOZ, Précis d'écologie. Ed. Bordas, Paris, (1985) 505 p.
- [26] - L. GERMAIN, Mollusques terrestres et fluviatiles. Kraus, Nendeln, Liechtenstein, 21, (1969<sub>a</sub>) 477 pp.
- [27] - L. GERMAIN, Mollusques terrestres et fluviatiles. Kraus, Nendeln, Liechtenstein, 22, (1969<sub>b</sub>) 240 pp.
- [28] - A. MEBAREK, Contribution à l'étude bio-écologique de la faune des Invertébrés dans trois stations de Ciste- *Cistus monspeliensis* L. (Cistacées) dans la région de Nedroma (Wilaya de Tlemcen). Mem. Ing. Ecologie animale. Dép. d'Ecol. Envir. Faculté S.N.V/S.T.U Univ. Tlemcen, (2013). 98p.
- [29] - A. DAMERDJI, L. LADJMI, S. DOUMANDJI, « Malacofaune associée à *Rosmarinus officinalis* L. (*Labiatae*): Inventaire et aperçu bioécologique près de Mansourah (Tlemcen, Algérie) ». *Revue sciences et technologie, Constantine, Algérie*. C – N° 23, juin (2005). pp. 11-20.
- [30] - A. DAMERDJI, Bioécologie de la malacofaune retrouvée dans 2 stations (Hafir et Zarifelt) des Monts de Tlemcen. Colloque méditerranéen sur la gestion durable des espaces montagnards. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, (2004<sub>a</sub>) 10 et 11 octobre 2004.
- [31] - A. DAMERDJI, Répartition des Mollusques Gastéropodes terrestres du littoral vers la steppe dans la région de Tlemcen. Colloque méditerranéen sur la gestion durable des espaces montagnards. Université Aboubekr BELKAID, Tlemcen, (2004<sub>b</sub>) 10 et 11 Octobre 2004. 14 pp.
- [32] - L. BIGOT, Essai d'Ecologie quantitative sur les Invertébrés de la Sansouire camarguaise. Imprimerie M. DECLUME, Lons-Le-Saunier, (1965).100 pp.
- [33] - A. DAMERDJI, Impact des facteurs abiotiques et biotiques sur la taille des coquilles de *Sphincterochila candidissima* (Mollusca- Sphincterochilidae) dans la région de Tlemcen (Algérie). *Revue I.N.R.A.A.*, 9, (2001)101-109.
- [34] - P. AGUESSE et L. BIGOT, Complément à l'inventaire de la faune camarguaise : les Mollusques terrestres et des eaux douces et saumâtres. (5<sup>ème</sup> note). Extrait de Terre et Vie, 1, (1962). 82-90.
- [35] - J. ALTES, Sur le polymorphisme de la coquille de *L. candidissima*, modalités et déterminisme. *Bulletin Muséum d'Histoire Naturelle*, Marseille, 16, (1956),53-67.
- [36] - H. ENGEL, Okologisch — faunistische Studien im Rhône — Delta, unter besonderer Berücksichtigung der Mollusken. *Bon. Zool. Beitr.*; (1957) VIII (1): 5-55.
- [37] - L. BIGOT, Un microclimat important de Camargue : les coquilles vides de Mollusques. *Terre et Vie*, (1957)253-258.
- [38] - C.F. SACCHI, Ecologie comparée des Gastéropodes Pulmonés des dunes méditerranéennes et atlantiques. *Natura*, Milan, 62, (1971) 277-358.