



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Melle BENMOHAMMED IMENE

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et Transformation laitière

THÈME

**Caractérisation des activités protéolytiques des
souches autochtones de *Lb. plantarum*,
Lb. acidophilus et *Lb. casei* pour l'élaboration d'un
ferment à haute aptitude fromagère**

DEVANT LE JURY

| | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|------------|----------------------|
| Président | M. DAHOU Abdelkader. El-Amine | MCB | U. Mostaganem |
| Examinatrice | Mme RECHIDI SIDHOUM Nadra | MCB | U. Mostaganem |
| Directeur de mémoire | Mme TAHLAITI Hafida | MCB | U. Mostaganem |

2019- 2020

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail

A mes chers adorables parents qui m'ont soutenus toute au long de ma vie.

A mes très chères frères / Sofiane et Karim

A mes petits anges Khouloud et Inès,

A toute ma famille, mes cousins et cousines, mes oncles et mes tantes

A mes chères amies Rania, Chafika, Ferial et Houria.

Ainsi qu'à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Remerciements



*Après avoir rendu grâce à **Dieu**, le tout puissant et miséricordieux.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de mémoire, Madame : **TAHLAITI Hafida**, Maitre de conférence **B** à l'Université de Mostaganem, pour ses judicieux conseils et sa constante disponibilité. C'est grâce à sa compétence et son indulgence que ce travail a pu être réalisé.*

*Mes remerciements vont aussi aux membres du jury, **M DAHOU Abdelkader El-Amine**, Maitre de conférence **B** à l'Université de Mostaganem et président du jury, Mme **RECHIDI Sidhoum Nadra**, Maitre de conférence **B** à l'Université de Mostaganem et examinatrice, pour avoir accepté d'évaluer et de juger ce travail.*

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à tous les enseignants de l'université de Mostaganem, qui ont contribué à notre formation ainsi qu'aux techniciens et techniciennes des laboratoires de production et transformation laitière et de microbiologie, qui ont su apporté leur soutien morale et intellectuel.

Pour finir, mes remerciements vont aussi à mes chers parents, source de vie, de tendresse et de bonheur.

MLLE IMENE

Liste des tableaux

| N° du tableau | Titre | N° de page |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tableau 1 | Familles et principaux genres de bactéries lactiques (Brenner, 2005). | 5 |
| Tableau 2 | Peptidases des bactéries lactiques (Roudj, 2011) | 18 |
| Tableau 3 | Résultats de l'activité protéolytique des trois espèces de bactéries lactiques (<i>Lb. Plantarm</i> , <i>Lb. Acidophilus</i> et <i>Lb. Casei</i>) (Moslehichad, 2013) | 37 |

Liste des figures

| N° de figure | Titre | N° de page |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figure 1 | Fermentation homolactique (ou voie homofermentaire) (Goy <i>et al.</i> , 2015) | 7 |
| Figure 2 | Fermentation hétérolactique (ou voie hétérofermentaire) (MNHN, 2019) | 8 |
| Figure 3 | Les protéases extracellulaires chez les bactéries lactiques (Savijoki, 2006). | 15 |
| Figure 4 | Le système protéolytique chez la bactérie <i>Lactococcus lactis</i> (Savijoki, 2006). | 19 |
| Figure 5 | Présentation schématique de la régulation du système protéolytique de <i>L. lactis</i> (Guedon, 2001; Doeven, 2005 ; Savijoki, 2006). | 20 |
| Figure 6 | Schéma général du catabolisme microbien des acides aminés (Algaron et Yvon, 1998). | 21 |
| Figure 7 | Aspect macroscopique d'une culture de <i>Lb. plantarum</i> sur milieu MRS (Binhelal, 2018). | 35 |
| Figure 8 | Aspect microscopique d'une culture de <i>Lb. casei</i> sous microscope après coloration de Gram (GCM-catalogue, 2009). | 36 |

Liste des abréviations

| | | |
|-----------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------|
| FAO | : | Food and Agriculture Organization |
| HCl | : | Acide chlorhydrique |
| H₂O₂ | : | Peroxyde d'hydrogène |
| K | : | Kappa |
| NaOH | : | Hydroxyde de sodium |
| OFIMER | : | Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture |
| UFC | : | Unité Formant Colonie |

Table des matières

| | |
|------------------------|--|
| Dédicaces | |
| Remerciements | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des figures | |
| Liste des abréviations | |

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. Généralités sur les bactéries lactiques | 4 |
| 1.1. Définition et principales caractéristiques | 4 |
| 1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques | 4 |
| 1.3. Taxonomie des bactéries lactiques | 4 |
| 1.4. Principaux genres de bactéries lactiques | 5 |
| 1.4.1. Genre <i>Lactobacillus</i> | 5 |
| 1.4.2. Genre <i>Lactococcus</i> | 6 |
| 1.4.3. Genre <i>Streptococcus</i> | 6 |
| 1.4.4. Genre <i>Leuconostoc</i> | 7 |
| 1.5. Métabolisme des bactéries lactiques | 7 |
| 1.5.1. Principales voies fermentaires | 7 |
| 1.5.1.1. Voie homofermentaire | 7 |
| 1.5.1.2. Voie hétérofermentaire | 8 |
| 1.5.1.3. Voie fermentaire bifide | 9 |
| 1.6. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques | 9 |
| 1.6.1. Activité protéolytique | 9 |
| 1.6.2. Activité lipolytique | 9 |
| 1.6.3. Activité acidifiante | 10 |
| 1.6.4. Pouvoir aromatisant | 10 |
| 1.7. Applications technologiques des bactéries lactiques | 10 |

Chapitre 2 : L'activité protéolytique

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 2. L'activité protéolytique | 13 |
| 2.1. Système protéolytique des bactéries lactiques | 13 |
| 2.2. Les principales étapes de l'activité protéolytique | 14 |
| 2.2.1. Protéolyse primaire | 14 |
| 2.2.2. Protéolyse secondaire | 14 |
| 2.3. Système protéolytique enzymatique | 14 |
| 2.3.1. Les protéases de la paroi (protéolyse extracellulaire) | 15 |
| 2.3.2. Le système de transport | 16 |
| 2.3.2.1. Système de transport des acides aminés | 16 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2.2. Transport des di- et tri- peptides (DtpT) | 16 |
| 2.3.2.3. Transport des oligopeptides (Opp) | 16 |
| 2.3.3. Les peptidases | 17 |
| 2.4. Régulation du système protéolytique | 19 |
| 2.5. Intérêt technologique de l'activité protéolytique des bactéries lactiques en industrie fromagère | 21 |

Chapitre 3 : Ferments lactiques et production fromagère

| | |
|-------------------------------------------------------|----|
| 3. Les ferments lactiques | 23 |
| 3.1. Définition | 23 |
| 3.2. Rôle des ferments | 23 |
| 3.3. Types de ferments | 23 |
| 3.4. Critères de sélection des ferments | 24 |
| - Critère de sécurité | 24 |
| - Fonctionnalités technologiques | 25 |
| - Performance | 26 |
| - Propriétés probiotiques | 26 |
| 3.4. Ferments lactiques et production fromagère | 27 |

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Matériel et méthodes | 30 |
| 1.1. Objectif de l'étude | 30 |
| 1.2. Origine des souches lactiques étudiées | 30 |
| 1.3. Milieux de cultures | 30 |
| 1.4. Revivification et vérification de la pureté des souches | 31 |
| 1.5. Tests confirmatifs de l'identité des souches | 31 |
| 1.5.1. Examen macroscopique | 31 |
| 1.5.2. Examen microscopique | 31 |
| 1.5.3. Tests biochimiques | 32 |
| 1.5.3.1. Test de catalase | 32 |
| 1.6. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques | 32 |
| 1.5.1. Étude de l'activité protéolytique des souches individuellement | 32 |
| 1.5.2. Étude de l'activité protéolytique du ferment | 32 |
| 1.6. Utilisation du ferment pour la production d'un fromage | 33 |

Résultats et Discussion

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Résultats et discussion | 35 |
| 1.1. Résultats de revivification et vérification de la pureté des souches | 35 |
| 1.2. Résultats des tests confirmatifs de l'identité des souches | 35 |
| 1.2.1. Examen microscopique | 35 |
| 1.2.2. Tests biochimiques | 36 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3. Résultats de détermination de l'activité protéolytique des bactéries lactiques..... | 36 |
| 1.3.1. Résultats et discussion de l'article rapporté par (Prabu et Natarajan, 2012) | |
| Conclusion | 40 |
| Références bibliographiques | 42 |
| Annexes | |

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentation. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques tel que le diacétyl, l'acétaldéhyde et l'acétate et ce à partir du citrate. Elles participent au développement des propriétés organoleptiques des produits laitiers fermentés grâce aux diverses aptitudes technologiques qu'elles offrent dont l'activité protéolytique, considéré ici comme l'un des traits physiologiques important attribuée à ces microorganismes (Lairini et *al.*, 2014).

Les bactéries lactiques déploient ce système protéolytique pour la dégradation de la caséine (protéine majoritaire du lait) fournissant ainsi des peptides bioactifs et acides aminés libres via un processus biochimique complexes mais probablement aussi le plus important dans les phases de maturation et d'affinage d'une grande variété de dérivés laitiers tel que le fromage.

C'est dans ce contexte d'activité que nous nous sommes fixé comme objectif dans cette étude de caractériser l'activité protéolytique de certaines souches lactiques autochtones issus du lait de vache, appartenant au genre *Lactobacillus*, à savoir (*Lb Plantarum*, *Lb acidophilus* et *Lb casei*) pour l'élaboration d'un ferment à haute aptitude fromagère.

La première partie de ce manuscrit, consacrée à l'étude bibliographique est divisée en trois chapitres, portant sur des généralités sur les bactéries lactiques, l'activité protéolytique et l'utilité des ferments lactiques en production fromagère.

La partie expérimentale, sera quant à elle, traitée par l'introduction d'un protocole expérimental dans la partie matériel et méthodes, suivi des résultats et discussion et enfin d'une conclusion.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Les bactéries lactiques

1. Généralités sur les bactéries lactiques

1.1. Définition et principales caractéristiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes, rassemblant un certain nombre de genres et espèces, ayant pour caractère communs la capacité de production d'acide lactique à partir de sucres fermentescibles, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂, ...) (Brahimi, 2015).

Découvertes pour la 1^{ère} fois par Orla –Jensen en 1919, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples et peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de certains produits végétaux, ensilage et quelques produits carnés (Gary et Le Guern, 1999).

Ce sont des microorganismes à Gram positif, asporulées, immobiles, anaérobies mais aérotolérants et ne possédant ni catalase, ni oxydase. Elles ont souvent des exigences nutritionnelles complexes en termes d'acides aminés, de peptides et de vitamines (Baliarda, 2003).

1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat, allant du sol et des plantes en décomposition jusqu'aux animaux et mammifères.

Présentes dans de nombreux milieux naturels, associées à d'autres microorganismes dans plusieurs produits de fermentation (boissons, fourrage, lait et viandes), elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire (Matamoros, 2008).

Certaines espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leur milieu spécifique (Nehal, 2007).

1.3. Taxonomie des bactéries lactiques

Actuellement et suite à plusieurs révisions taxonomiques, le groupe des bactéries lactiques compte plusieurs genres qui appartiennent tous au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*.

Ils sont représentés par plusieurs familles. Chaque famille compte plusieurs genres et espèces (voir tableau 1).

Tableau 1. Familles et principaux genres de bactéries lactiques (Brenner *et al.*, 2005).

| Familles | Principaux genres |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i> |
| <i>Leuconostocaceae</i> | <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Weissella sp.</i> |
| <i>Streptococcaceae</i> | <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i> |
| <i>Carnobacteriaceae</i> | <i>Carnobacterium sp.</i> |
| <i>Enterococcaceae</i> | <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Tetragenococcus sp.</i> , <i>Vagococcus sp.</i> |
| <i>Aerococcaceae</i> | <i>Aerococcus sp.</i> |

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont parfois considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de leurs propriétés physiologiques et biochimiques et à leur présence dans le même habitat écologique. Cependant, elles sont aujourd'hui incluses dans le phylum des *Actinobacteria* et sont donc phylogénétiquement éloignées de leur prédécesseur (Léonard, 2015).

1.4. Principaux genres de bactéries lactiques

1.4.1. Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Il comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues, qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Bahri, 2014).

Ils sont subdivisés selon leur type fermentaire en trois groupes :

- ✓ **Le groupe I** (ou *Thermobacterium*): Se développant à 45°C, ce groupe, comprend des espèces homofermentaires obligatoires, qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Il est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'Homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme, comme : *L. acidophilus* et *L. helveticus* et *L. lactis*.
- ✓ **Le groupe II** (ou *Streptobacterium*) : Comprend des espèces mésophiles, à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Les espèces du groupe utilisent la voie homofermentaire, mais elles sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions (concentration de glucose limitée). Parmi les espèces de ce

groupe, on cite : *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus* et *L. plantarum* (Benaïssa et Mellal, 2017).

- ✓ **Le groupe III (ou *Betabacterium*)** : Comprend les espèces hétérofermentaires stricts qui forment des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et / ou d'éthanol.

Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la voie de la phosphocétolase puisque ces bactéries possèdent une phosphocétolase mais pas d'aldolase. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'Homme et participent à l'équilibre de la flore intestinale. Exemple : *L. brevis* et *L. fermentum* (Bahri, 2014).

1.4.2. Genre *Lactococcus*

Les lactocoques font partie des bactéries lactiques, largement utilisées dans l'industrie alimentaire comme levain ou « *starter* » dans la production des fromages et des laits fermentés (Dworkin, 2006).

Mésophiles, de forme cocci (en paires ou en chainettes), à gram positif, et sans activité catalase, elles métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire (un caractère qui peut servir à distinguer les lactocoques des deux autres genres : *Leuconostoc* et *Pediococcus*) (Metlef, 2008).

Grâce à leurs équipements enzymatiques, elles participent à la protéolyse de la caséine en acides aminés précurseurs de nombreuses molécules aromatiques (Eck et Gillis, 2006).

1.4.3. Genre *Streptococcus*

Ce genre regroupe des bactéries à Gram positif, dépourvues d'activité catalase, homofermentaires et à bas pourcentage en bases G+C.

La seule espèce de ce groupe qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. C'est une espèce que l'on trouve normalement associée à un ou plusieurs lactobacilles homofermentaires dans les levains thermophiles utilisés par l'industrie laitière tant dans la fabrication du yoghurt que dans celle des fromages à pâte cuite. A ce titre il joue un rôle déterminant dans la fermentation lactique au cours de la fabrication de ces produits (Hemme *et al.*, 1980).

1.4.4. Genre *Leuconostoc*

Les leuconostoques sont des coques hétérofermentaires, marqués par la production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol.

Mésophiles, aérobies facultatifs et exigeants d'un point de vue nutritionnel, ils se regroupent en paires ou en chainettes. Les autres caractéristiques d'hydrolyse de l'esculine, de formation de dextrane et de croissance à différents pH et températures permettent la différenciation entre eux et le groupe des *Weissella* (Ho *et al.*, 2007).

Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production d'exopolysaccharides.

Comprenant plusieurs espèces, les leuconostoques (principalement, *Ln mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. lactis*) sont utilisés comme ferment en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière (Ogier *et al.*, 2008).

1.5. Métabolisme des bactéries lactiques

1.5.1. Principales voies de fermentation

1.5.1.1. Voie homofermentaire

C'est une voie qui utilise la glycolyse dans sa totalité (du glucose au pyruvate au lactate). En conditions optimales de croissance, cette voie produit deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (voir figure 1).

Divers hexoses (glucose, fructose, mannose, galactose, lactose ou saccharose) peuvent être oxydés par cette voie, réalisée par des bactéries dites homofermentaires, appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* (*L. lactis*, *L. Caucasicus*, *L. Bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*) et *Streptococcus*.

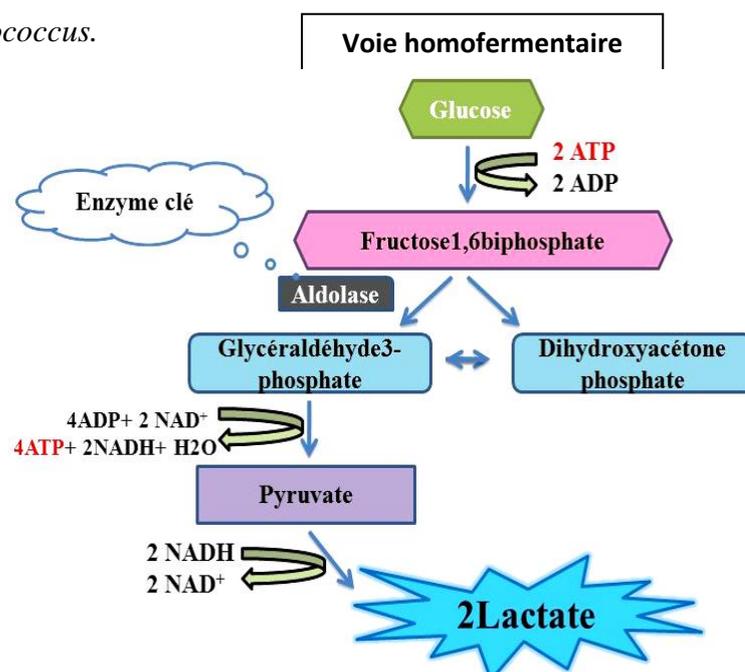


Figure 1. Fermentation homolactique (ou voie homofermentaire) (Goy *et al.*, 2015).

1.5.1.2. Voie hétérofermentaire

Dans cette voie de fermentation, appelée aussi voie des transcétolases, il y'a production de métabolite secondaires en plus de l'acide lactique, tels que le CO₂ et l'éthanol, et en plus faible proportion selon le substrat initial oxydé, l'acide acétique et le glycérol. Des hexoses, voire certains pentoses (glucides à 5 carbones), peuvent être utilisés comme substrat initial. La fermentation hétérolactique à partir du glucose apporte un gain net d'une seule molécule d'ATP (voir figure 2).

Les bactéries dites hétérofermentaires, appartenant aux genres *Lactococcus* ou *Leuconostoc*, réalisent la fermentation hétérolactique (Goy *et al.*, 2015).

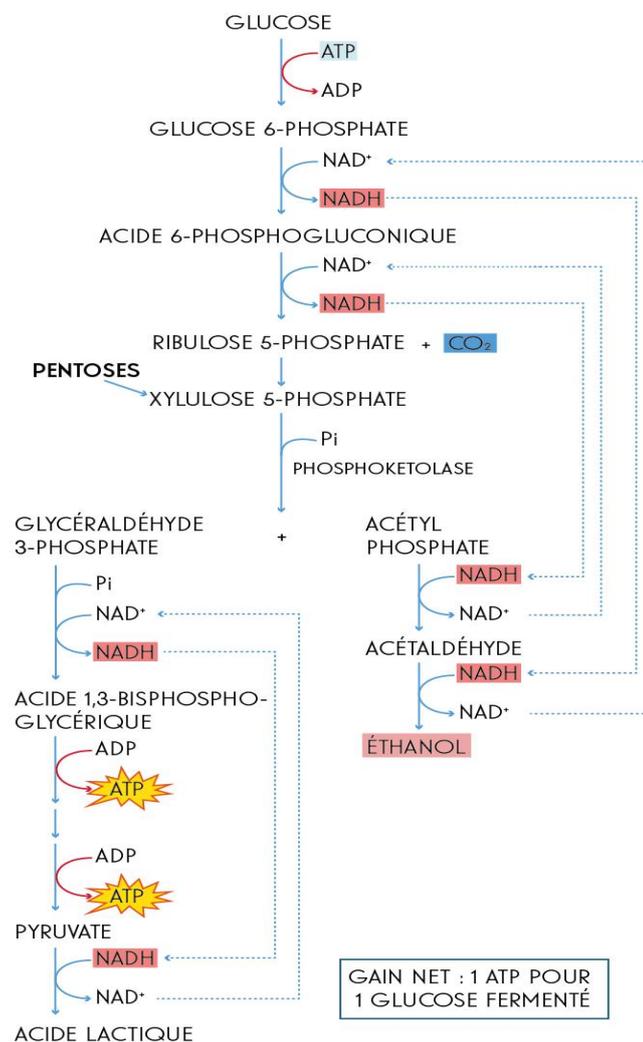


Figure 2. Fermentation hétérolactique (ou voie hétérofermentaire) (MNHN, 2019).

1.5.1.3. Voie fermentaire bifide

La voie bifide est la voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*.

Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP (Vandamme *et al.*, 1996).

D'autres voies métaboliques fermentaires, comme la voie du citrate, sont à l'origine de composés carbonés volatils conférant un arôme particulier aux aliments fermentés.

1.6. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques

1.6.1. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques sont des microorganismes exigeants, qui nécessitent une source exogène d'acides aminés ou de peptides. Ils sont fournis par la protéolyse de la principale source de protéine dans le lait, la caséine (Savijok *et al.*, 2006).

Dans les processus de fermentation, le système protéolytique des bactéries lactiques joue donc un rôle clé permettant à ces bactéries de se développer, assurant ainsi une fermentation réussie.

Dans ce sens les bactéries lactiques possèdent des protéases et des peptidases, enzymes protéolytiques responsables de la dégradation des protéines du lait en peptides bioactifs et acides aminés. Ceux-ci peuvent être transformés en alcools et acides (composés aromatiques volatiles), jouant un rôle important dans la promotion des caractéristiques organoleptiques (saveur et texture) finales du produit fermenté (Motta et Dasilva, 2015).

1.6.2. Activité lipolytique

Il est connu que la présence de bactéries lactiques autochtones dans les aliments fermentés interfère avec la détermination des propriétés sensorielles du produit. Dans ce contexte, plusieurs activités contribuent à promouvoir ces propriétés (Goût, odeur et arôme) est l'une d'entre elles est l'activité lipolytique (une des plus recherchées dans les aliments). Sa perception dépend de la texture du produit (Smit *et al.*, 2005).

L'hydrolyse des triglycérides est la principale transformation lors du catabolisme des graisses. Les acides gras libres (AGF) libérés contribuent à l'arôme et à la saveur de certains aliments, en particulier le fromage.

Yadav *et al.*, (2007) ont déclaré que l'ajout de bactéries lactiques autochtones sur les produits laitiers contribue à la production d'acides gras libres et d'acide linoléique à partir de la lipolyse des graisses du lait, procurant un effet hypolipidémique (Fadda, 2004).

1.6.3. Activité acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par l'hydrolyse du lactose grâce à la β -galactosidase pour produire le glucose et le galactose. Généralement le glucose provenant de cette hydrolyse sera fermenté pour produire des composés acides, du gaz carbonique ou de l'alcool. Cette production de composés acides va entraîner une baisse de pH et induire des odeurs et des goûts particuliers. De plus, l'acidification limite les risques de développement de flores pathogènes au cours de la croissance (Boullouf, 2016).

1.6.4. Pouvoir aromatisant

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés aromatiques qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart de ces composés sont issus du métabolisme du citrate (l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants) (Slamnia et Saddouk, 2018).

Les lactobacilles (*Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*) synthétisent de l'acétaldéhyde. Sa teneur est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation.

Les *Leuconostocs* hétérofermentaires sont souvent associés aux lactocoques dans la production de composants aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) (Boullouf, 2016).

1.7. Applications technologiques des bactéries lactiques

Les activités métaboliques diversifiées que présentent les bactéries lactiques et leur capacité d'adaptation à différents environnements, sont parmi les principales caractéristiques de leur large gamme d'application à l'échelle industrielle (Streit *et al.*, 2007).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale (Mofradj et Dechache, 2014).

L'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres. La fermentation du lait par les bactéries lactiques est à l'origine d'un nombre important de

produits différents, chacun possédant des caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité.

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (pour le traitement des dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exo polysaccharides et de mannitol) (Wisselink *et al.*, 2002).

Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (Rodriguez *et al.*, 2003), et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (Langella *et al.*, 2001).

Chapitre 2

L'activité protéolytique

2. L'activité protéolytique

2.1. Système protéolytique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ne sont pas capables de synthétiser les acides aminés nécessaires pour leur survie, elles ont donc besoin d'un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law et Haandrikman, 1997).

Dans le lait, la concentration en acides aminés libres utilisées par les bactéries lactiques, ne permet qu'une croissance de 2% des cellules ce qui démontre que les acides aminés libres du lait ne jouent qu'un rôle mineur dans la croissance des bactéries lactiques. Exigeantes d'un point de vue nutritionnel et auxotrophes pour certains acides aminés, elles doivent donc trouver une source d'azote complémentaire à partir des peptides et caséines du lait (Juillard *et al.*, 1995).

Les caséines sont les protéines les plus abondantes dans le lait. Leur structure organisée en micelles est constituée de particules sphériques formées par l'association des caséines, de quelques fragments peptidiques et de composants minéraux, (principalement du calcium et du phosphate). Elles contiennent de nombreux résidus proline qui empêche la formation de l'hélice et du feuillet, permettant ainsi une structure moléculaire ouverte, sensible à l'action des protéases et leur utilisation (Savijoki *et al.*, 2006).

L'utilisation des caséines requiert donc l'intervention de plusieurs enzymes pour leur dégradation en acides aminés et en oligopeptide pour être transportée par la suite à l'intérieur de la cellule microbienne (Christensen *et al.*, 1999).

En bref, le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention de ces acides aminés libres à partir de caséines (Savijoki *et al.*, 2006).

La quantité globale de ces composés est mesurée par le fractionnement des matières azotées et leurs proportions sont évaluées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La protéolyse a été étudiée de façon très approfondies chez les lactocoques, plus particulièrement chez l'espèce *Lactococcus lactis*, bactérie très utilisée en industrie (Kunji *et al.*, 1996).

2.2. Les principales étapes de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique peut être subdivisée en deux principales étapes :

2.2.1. Protéolyse primaire

Kalit et coll., 2005, montrent que la protéolyse primaire est une hydrolyse spécifique des caséines ; elle représente l'étendue de la dégradation des caséines natives en gros peptides, liée essentiellement à l'action des protéases contenues dans la présure.

La protéolyse primaire est évaluée par les électrophorèses (Pavia *et al.* 2000).

2.2.2. Protéolyse secondaire

La protéolyse secondaire, correspond à l'hydrolyse des gros peptides par l'action des protéinases et des peptidases des bactéries lactiques, donnant lieu à des peptides plus courts et des acides aminés libres (Pavia *et al.*, 2000). Cette dégradation a pour conséquences deux actions principales :

- Une modification de la texture de la pâte : La pâte fromagère devient plus molle et plus onctueuse.
- Une action sur la saveur : il y a production de métabolites qui confèrent un arôme et une saveur particulière au fromage (Eck et Gillis, 2006).

2.3. Système protéolytique enzymatique

La machinerie protéolytique des bactéries lactiques est constituée d'un ensemble d'enzymes qui se divisent en trois groupes majeurs : les protéases de paroi, les systèmes de transport et les peptidases intracellulaires.

Les protéases et les peptidases peuvent être classées selon trois critères différents :

- La nature de leur site catalytique
- La spécificité du clivage
- Leur besoin en ATP (adénosine triphosphate) (Lopez, 2008).

Les protéases pariétales qui peuvent être des mono-peptidases, dipeptidases ou tripeptidases, situées au niveau du cytoplasme ou associées à la paroi cellulaire (Law et Haandrikman, 1997) hydrolysent les protéines en peptides, qui sont alors pris en charge par des systèmes de transport au travers de la membrane plasmique de la cellule bactérienne et enfin, une série de peptidases intracellulaires hydrolysent ou dégradent ces peptides en acides aminés libres (Dridier et Prévost, 2009).

2.3.1. Les protéases de la paroi (protéolyse extracellulaire)

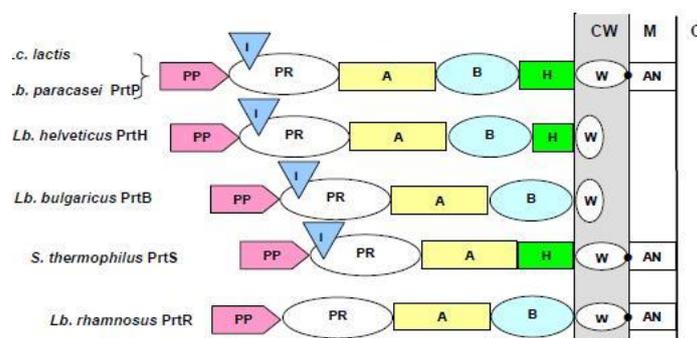
Le départ de la protéolyse chez les souches starters commence par l'action des sérines protéinases, localisées au niveau de la paroi cellulaire, pivot de la protéolyse des caséines. Elles se lient de manière covalente à la paroi et hydrolyse les caséines en oligopeptides qui peuvent ensuite être transportés à l'intérieur de la bactérie (Tahiri, 2017).

Certaines souches de bactéries lactiques ne possèdent pas de protéases et sont dépendantes alors de l'action de la protéase présentée chez les autres souches pour se développer dans le lait (Savijoki et al., 2006).

Cinq types de protéases de paroi appartenant à la même famille (mais présentant certaines différences) ont été caractérisées chez plusieurs bactéries lactiques. Il s'agit de : Prt P chez *Lc. Lactis* et *Lb. paracasei*, PrtH chez *Lb. Helveticus*, PrtR chez *Lb. rhamnosus*, PrtS de *S. thermophilus* et Prt B chez *Lb. Bulgaricus* (Paster et al., 2003).

Les CEPs (Cell Envelop Proteinase) des bactéries lactiques sont synthétisés comme pré-protéines d'environ 200 résidus. Elles sont composées de plusieurs domaines fonctionnels distincts :

- Les domaines correspondant au peptide signal (PP) ;
- Un domaine catalytique des protéases à sérine (PR) ;
- Un domaine d'insert (I) qui régule probablement leur spécificité ;
- Un domaine (A) de fonction inconnue ;
- Un domaine B participant probablement à la stabilité ;
- Les domaines hélix (H) qui positionne (A) et (B) à l'extérieur de la cellule ;
- Un domaine hydrophobe (W) (Hassaine, 2013).



CW : paroi cellulaire, M : membrane cytoplasmique, C : cytoplasme.

Figure 3. Les protéases extracellulaires chez les bactéries lactiques (Savijoki et al., 2006).

2.3.2. Le système de transport

Chez les bactéries lactiques, il semblerait que trois modes de transport différents sont impliqués dans la translocation des acides aminés et des peptides.

2.3.2.1. Système de transport des acides aminés

Trois systèmes ont été isolés et décrits chez le genre *Lactococcus* (Kunji *et al.*, 1996) :

- *Transport couplé à une force motrice* : ce système utilise une force promotrice (PMF) générée par un potentiel électrique et un gradient chimique de protons H^+ à travers la membrane. Il est spécifique au transport des acides aminés Leu, Thr, Ile, Ala, Val, Gly et Met.
- *Transport par échange (type antiport)* : ce type de transport est surtout décrit pour le couple d'acides aminés ornithine / arginine, son mécanisme dépend de la concentration de l'un des deux acides aminés dans le milieu (Konings *et al.*, 1989).
- *Transport ATP dépendant* : l'hydrolyse des liaisons phosphates de l'ATP fournit l'énergie nécessaire au transport spécifique des acides aminés Glu, Gln, Asp, Pro et glycine-bétaine (Poolman, 1993).

2.3.2.2. Transport des di- et tri- peptides (DtpT)

En général il s'agit d'un transport lié à une force promotrice. C'est un système spécifique aux di- et tri- peptides hydrophiles (Hagting *et al.*, 1997).

Un second système pour les di- et tripeptides hydrophobes a été mis en évidence chez des mutants de *Lc. lactis* (Foucaud *et al.*, 1995).

Le transport des di- et tripeptides, indispensable à la croissance en présence de caséines, est réalisé par le système DtpT couplé à la PMF (Kunji *et al.*, 1996).

2.3.2.3. Transport des oligopeptides (Opp)

Le système de transport des oligopeptides est particulièrement important pour la croissance en lait, car l'incapacité à transporter ces peptides entraîne une lente coagulation du lait, même en présence de la protéase PrtP (Tynkkynen *et al.*, 1993).

Ce système, lié au transport des peptides comportant 4 à 35 résidus, est ATP dépendant.

Le gène *Opp* comporte cinq cadres de lecture ouverts. Les gènes *OppDFBCA* sont organisés en opéron avec le gène *pepO* et codent pour les cinq composants du transporteur. La

protéine OppA est extracellulaire et lie l'oligopeptide à transporter, OppB et OppC sont des protéines intra-membranaires responsables de la translocation du peptide, alors que OppD et OppF, qui sont intracellulaires, sont impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP fournissant ainsi l'énergie au transport (Tynkkynen *et al.*, 1993).

La spécificité du transport est régie par la protéine OppA qui lie spécifiquement et emprisonne les 6 premiers résidus du peptide à transporter alors que les autres interagissent avec la surface de la protéine (Detmers *et al.*, 2000). L'affinité de ce système est optimale pour les nanomères et les peptides contenant des résidus basiques et hydrophobes, alors que le transport des peptides acides de taille importante est impossible (Juillard *et al.*, 1998).

2.3.3. Les peptidases

Les peptides, une fois internalisés par les systèmes de transport appropriés, sont hydrolysés par diverses peptidases différentes selon leur spécificité de clivage. En effet, on a démontré la présence d'endopeptidases, d'aminopeptidases, de tri et dipeptidases ainsi que des peptidases spécifiques à la proline (Roudj, 2011).

Toutefois, ces enzymes seraient localisées à l'intérieur de la bactérie et sont aussi une partie vitale du mécanisme de protéolyse car elles permettent l'apport en acides aminés libres.

Une nomenclature a été proposée pour les peptidases, elles sont nommées Pep lorsque le gène correspondant a été caractérisé, suivie d'une lettre capitale indiquant soit la spécificité de l'enzyme ou l'origine bactérienne, par exemple PepS (pour Streptocoques), PepN (pour indiquer la spécificité de l'enzyme) etc. (Tan *et al.*, 1993).

Une grande variété de peptidases différant par leur nature et leur spécificité a été caractérisée chez les bactéries lactiques. Les peptidases sont classées selon leurs spécificités de substrats :

- Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités amino (N-) ou carboxy (C-) terminales de chaînes polypeptidiques et permettent de libérer un à deux acides aminés. Elles sont désignées aussi aminopeptidases et carboxypeptidases respectivement. Aucune carboxypeptidase n'a été identifiée chez les lactocoques (Mierau *et al.*, 1996) ni chez les lactobacilles (Khalid et Elmer, 1990).
- Les dipeptidases ou tripeptidases sont des exopeptidases de type aminopeptidases,
- Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de l'oligopeptide. Sur la base de leur spécificité, on distingue les endopeptidases générales dont la spécificité est large (PepN, PepC, PepV et PepD) et les endopeptidases spécifiques

dont la spécificité de substrat est plus étroite (PepS, PepL, PepG, PepW et PepT) voire spécifique d'un acide aminé comme de la proline (PepX, PepI, PepQ et PepR) ou des acides aminés acides (PepA) (Tableau 2).

Tableau 2. Peptidases des bactéries lactiques (Roudj, 2011)

| Peptidase | Abréviation | Spécificité de substrat |
|--------------------------------|-------------|-------------------------|
| Aminopeptidase A | PepA | Glu/Asp↓(X)n |
| Aminopeptidase C | PepC | X↓(X)n |
| Aminopeptidase L | PepL | Leu↓X ou Leu↓X-X |
| Aminopeptidase N | PepN | X↓(X)n |
| Aminopeptidase P | PepP | X↓Pro-(X)n |
| Aminopeptidase X | PepX | X-Pro↓(X)n |
| Pyrrolidone carboxyl peptidase | PCP | Glu↓(X)n |
| Dipeptidase V | PepV | X↓X |
| Dipeptidase D | PepD | X↓X |
| Tripeptidase T | PepT | X↓X-X |
| Proiminopeptidase | PepI | Pro↓X-(X)n |
| Prolidase | PepQ | X↓Pro |
| Prolinase | PepR | Pro↓X |
| Endopeptidase F | PepF | (X)n-X-X↓X-(X)n |
| Endopeptidase O | PepO | (X)n-X ↓ X-(X)n |
| Endopeptidase E | PepE | (X)n-X ↓ X-(X)n |
| Endopeptidase G | PepG | (X)n-X ↓ X-(X)n |

La plupart des peptidases isolées des lactocoques ont également été décrites chez les lactobacilles (Christensen *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2003) à l'exception des peptidases PepA et PepP ou aminopeptidase P (Sridhar *et al.*, 2005).

Dako *et al.*, (1995) et Sazaki *et al.*, (1995) ont rapporté un spectre d'activité peptidasique plus large chez *Lactobacillus* comparativement aux lactocoques. De même, Takafuji *et al.*, (1995) ont observé une différence significative dans la mobilité électrophorétique des peptidases des lactocoques et des lactobacilles ce qui les a conduit à suggérer que les enzymes protéolytiques des lactobacilles sont différentes de celles des lactocoques.

En général, les aminopeptidases sont subdivisées en trois groupes selon la structure de leur site actif ou de leur mécanisme de catalyse : métallo-aminopeptidases, cystéine-aminopeptidases et sérine-aminopeptidases.

La Figure 4, illustre une représentation schématique du système protéolytique chez *Lactococcus lactis* (Savikoji *et al.*, 2006).

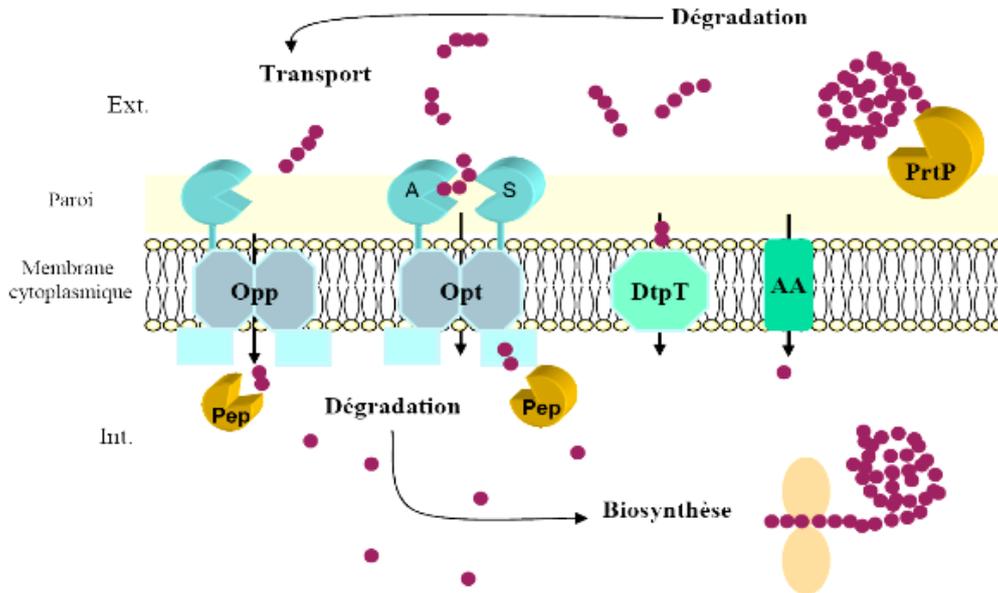


Figure 4. Le système protéolytique chez la bactérie *Lactococcus lactis* (Savikoji *et al.*, 2006).

2.4. Régulation du système protéolytique

Il a été démontré chez *L. lactis*, que l'expression des gènes de plusieurs peptidases (PepX, PepN, PepC), de la protéase de paroi PrtP ainsi que de l'opéron Opp-PepO était dépendante du contenu en peptides du milieu de culture, ces gènes sont réprimés par des dipeptides contenant des acides aminés à chaîne latérale ramifiée (valine, isoleucine et leucine) (voir figure 5). Après leur internalisation et leur hydrolyse, ces dipeptides exercent leur effet répresseur. En effet, les mutants pepQ incapables de dégrader les dipeptides de type X-Pro, ne présentent plus de signal de répression en présence des peptides Leu-Pro et Val-Pro (Guedon *et al.*, 2001).

La protéine CodY est un régulateur transcriptionnel qui possède un motif de fixation à l'ADN dans sa région C-terminale. Il a été démontré qu'elle interagissait directement avec la région promotrice de l'opéron opp-pepO pour exercer son action répressive. La séquence de fixation de CodY est un palindrome de 15 nucléotides (AATTTTCNGAAAATT) localisée à proximité des boîtes -10 et -35 des promoteurs des gènes régulés, et notamment en amont des opérons *opt* et *opp*. Des analyses transcriptomiques du mutant *cody-* de *L. lactis* ont démontré que ce régulateur agissait sur l'expression de nombreux gènes, principalement ceux impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés (den Hengst *et al.*, 2005).

Le régulon CodY permet donc d'adapter la synthèse de nombreuses protéines en fonction de la disponibilité en nutriments azotés. Dans ce contexte, la fixation d'acides aminés à chaîne latérale ramifiée sur CodY, serait perçue comme un indicateur d'une concentration en acides aminés suffisante pour la croissance, induisant la répression des gènes du régulon dont l'activité n'est plus requise. Il est intéressant de constater que les systèmes *Opp* et *Opt* sont tous deux régulés par CodY (Guedon *et al.*, 2001).

Chez un mutant *cody* les activités peptidolytique et protéolytique ne sont plus réprimées par les peptides issus des caséines. Ces souches pourraient être un avantage lors de la fabrication fromagère. L'augmentation des activités peptidolytique et protéolytique d'une souche pourrait permettre d'améliorer l'affinage de certains fromages et ainsi de modifier leur saveur et leur flaveur (Guedon *et al.*, 2001).

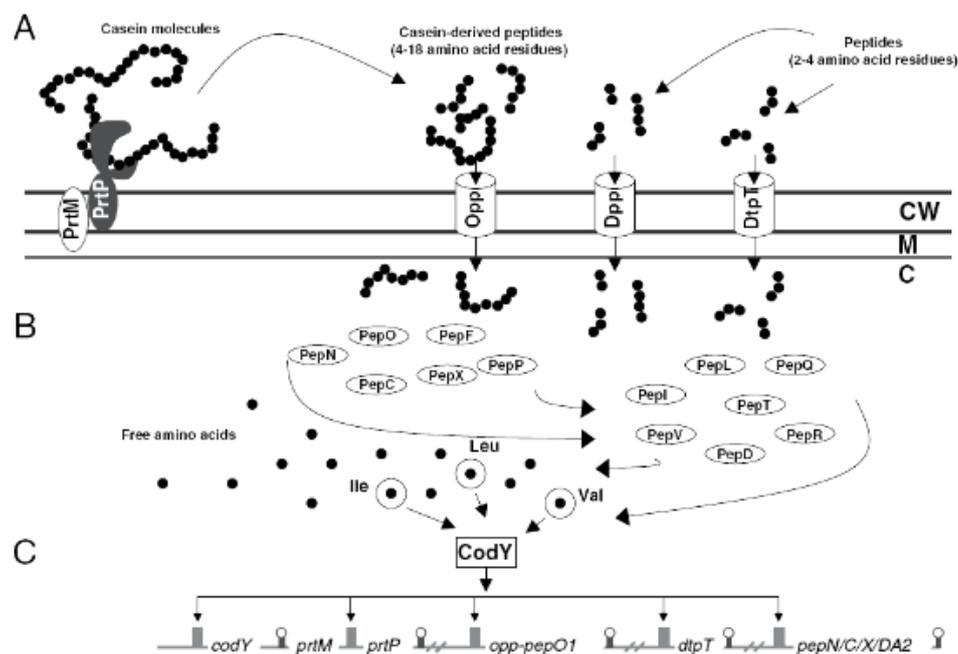


Figure 5. Présentation schématique de la régulation du système protéolytique de *L. lactis* (Guedon *et al.*, 2001; Doeven *et al.*, 2005 ; Savijoki *et al.*, 2006).

2.5. Intérêt technologique de l'activité protéolytique des bactéries lactiques en industrie fromagère

Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques sont importants dans les procédés de maturation qui donnent aux aliments leurs propriétés rhéologiques et caractéristiques organoleptiques (Law et Kolstad, 1983).

Selon Ennadir et *al.* (2014), les bactéries lactiques contribuent à la texture, à la saveur et à la production de composés aromatiques qui participent aux qualités organoleptiques des aliments. L'utilisation de ces bactéries en industrie alimentaire est déterminée par leurs propriétés technologiques (activité protéolytique, lipolytique, acidifiante...etc.).

Durant la fabrication de fromage, la protéolyse de la caséine joue un rôle central. Elle contribue à l'apparition de courts peptides (désignés comme peptides fonctionnels ou encore peptides bioactifs) et acides aminés, qui participent au développement de la texture et de la flaveur des fromages lors de l'affinage. Ils sont les principaux précurseurs d'arômes (dus à la libération d'alcools, d'aldéhydes, d'acides, et d'esters), susceptibles d'exercer des effets souhaitables et désirables chez le consommateur après l'ingestion du produit (Desmazeaud, 1998)

La Figure 6, illustre les principaux produits issus du catabolisme des aminoacides après l'étape de protéolyse.

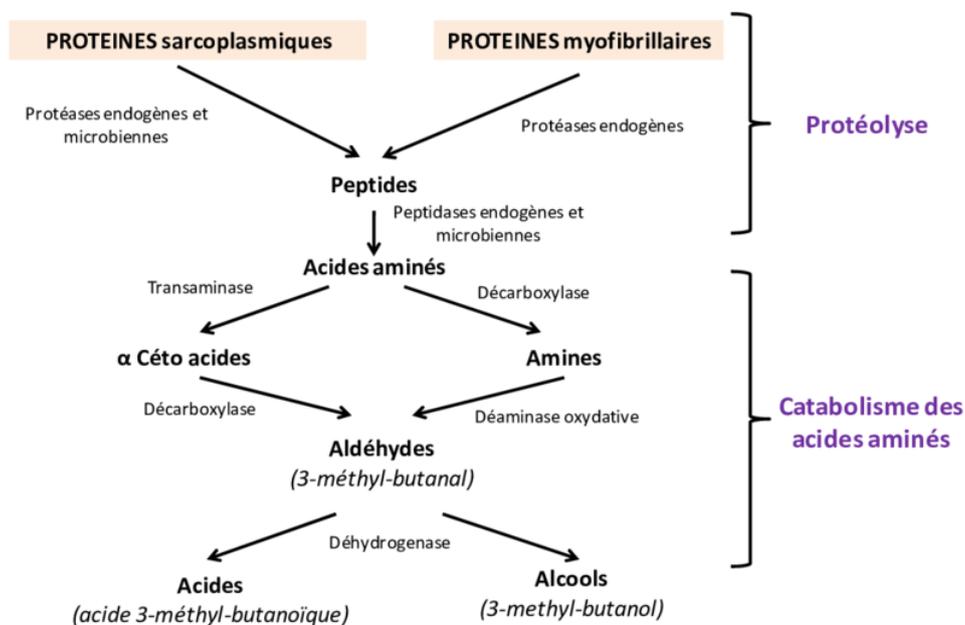


Figure 6. Schéma général du catabolisme microbien des acides aminés (Algaron et Yvon, 1998).

Chapitre 3

Ferments lactiques et production fromagère

3. Les ferments lactiques

3.1. Définition

Un ferment lactique est une préparation comprenant un grand nombre de micro-organismes (une seule espèce ou plusieurs), qui est ajoutée au lait pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son processus de fermentation (Choubaila, 2012).

La production des ferments lactiques est fondée sur la technique de la « culture pure » initialement élaborée par (Robert Koch). Dans une culture pure, chaque colonie microbienne se compose de cellules qui proviennent toutes de la même cellule. Ceci assure que les cultures ne sont pas un mélange de différents microorganismes inconnus et elles peuvent donc être dénombrées et exploitées pour produire les réactions biochimiques prédéterminées (Chamba, 2008).

3.2. Rôle des ferments

Plusieurs rôles peuvent être attribués aux ferments dans une production laitière ou fromagère. Le rôle principal est celui d'initier et de conduire le procédé de fermentation selon les propriétés souhaitées dans le produit fini et contribuer aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sensorielles de ce produit.

Les ferments font aussi office de barrière au développement des germes indésirables (Yildiz, 2010).

L'impact sur la qualité du produit dépend fortement de la souche utilisée et varie entre les souches selon leurs activités et voies métaboliques.

Si le fromager ne fait pas le bon choix des ferments, il risque d'avoir des problèmes d'acidification avec pour conséquences des embarras au niveau de la texture des pâtes (pâte crayeuse), de ressuyage des croûtes (croûtes poisseuses avec mauvaises odeurs), de vieillissement et de conservation, voire de contamination par des agents pathogènes (Choubaila, 2012).

3.3. Types de ferments

Les ferments lactiques sont généralement classés en deux groupes : ferments mésophiles et ferments thermophiles.

- Les ferments thermophiles sont des bactéries lactiques ayant une température de croissance optimale de 40°C à 45°C. Ils ont la particularité de donner une souplesse à

la pâte et son généralement formés *St. thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ou *Lb. delbrueckii* (sous espèces *bulgaricus* ou *lactis*) (Hoier *et al.*, 1992).

- Les ferments mésophiles, majoritairement composés de lactocoques de sous espèces variées, ont une température optimale de croissance entre 20°C et 30°C. Les sous espèces *lactis* et *cremoris* sont essentiellement utilisées pour leur caractéristique d'acidification, alors que le biovar *diacetylactis* et les bactéries du genre *Leuconostoc* sont principalement utilisés pour leur capacité de métaboliser le citrate (Gagnon, 2006).

Les ferments lactiques peuvent aussi être produits de façon mixte, par combinaison prédéfinie de plusieurs microorganismes, ou en culture pure. On distingue trois types de ferments dans l'industrie laitière; les ferments O, qui ne contiennent qu'une flore acidifiante, formée de *L. lactis* ssp. *lactis* et *cremoris*; les ferments D, auxquels sont ajoutés le biovar *diacetylactis*, et les ferments DL, qui contiennent en plus de la flore acidifiante *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Champagne, 1998a).

3.4. Critères de sélection des ferments

Une pléiade de critères sert aux fournisseurs pour sélectionner des cultures à des fins industrielles. Quoique les critères technologiques priment, les critères de sécurité, de performance et les propriétés probiotiques suscitent aujourd'hui un intérêt croissant.

Les ferments doivent évidemment résister aux procédés de fabrication mis en œuvre pour s'implanter dans l'aliment (Zagorec *et al.*, 2012).

- Critère de sécurité

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent pas évidemment présenter des caractères pathogènes et/ ou générer des substances toxiques. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*), à l'exception de certains entérocoques. Les préparations de ferments commerciaux doivent, en outre, être exemptées de substances infectieuses ou susceptibles de provoquer des problèmes d'hygiène. Elles ne doivent pas contenir de contaminants tels que des coliformes, des levures ou des moisissures (Corrieu et Luquet, 2008).

- Fonctionnalités technologiques

Les fonctionnalités technologiques des ferments lactiques relèvent les propriétés suivantes :

- *Activité acidifiante* : Il s'agit, pour un ferment donné, de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Ce niveau d'acidité finale dépend des spécificités du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Corrieu et Luquet, 2008).
- *Métabolisme des sucres* : Le choix d'un ferment est conditionné par son aptitude à produire, soit de l'acide lactique presque exclusivement (métabolisme homofermentaire), soit de l'acide acétique et d'autres produits finaux tels que l'éthanol et le CO₂ (métabolisme hétérofermentaire) (Corrieu et Luquet, 2008).
- *Propriétés protéolytiques et peptidasique* : Les bactéries démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée (Roudj et al., 2009).
- *Propriétés lipolytiques* : Généralement faibles chez les bactéries lactiques, elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères ;
- *Activité gazogène* : Certains ferments lactiques sont capables de produire du CO₂ à partir d'une source de carbone, participant ainsi à la formation d'ouvertures dans les fromages (Choubaila, 2012).
- *Production de composés d'arômes* : Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurres, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Cholet, 2006).
- *Production de polysaccharides exocellulaires* : Il s'agit de sélectionner des ferments capables de produire, en quantité et en qualité, des exopolysaccharides qui vont accroître la viscosité du produit (cas des yaourts brassés par exemple) (Corrieu et Luquet, 2008).
- *Activité antimicrobienne* : Certains ferments sont capables de produire des bactériocines ou d'autres inhibiteurs de microorganismes indésirables. Ces molécules sont particulièrement intéressantes pour l'élaboration de produits à partir de lait cru, donc susceptibles de contenir des microorganismes indésirables, voire pathogènes (Kihal et Mami, 2019).
- *Post-acidification* : Le choix de souches faiblement post-acidifiantes permet, lors de la fabrication des laits fermentés, de limiter les phénomènes d'acidification qui peuvent

intervenir lors de leur stockage à basse température (4 à 6°C), modifiant ainsi leur qualité organoleptique (Corrieu et Luquet, 2008).

- Performance

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries. Ainsi, quelle que soit la (ou les) propriétés fonctionnelles retenues, les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes :

- Résistance aux bactériophages ;
- Tolérance aux inhibiteurs de croissance, tels que les antibiotiques ;
- Résistance aux traitements mécaniques (centrifugation, ultrafiltration) ;
- Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation ;
- Aptitude à la conservation (congelée ou lyophilisée) pendant plusieurs mois ;
- Tolérance au chlorure de sodium (pour les productions fromagères) ;
- Tolérance au saccharose (cas des laits fermentés sucrés) ;
- Tolérance à l'acidité ;
- Croissance à des températures non optimales (pour certaines fabrications fromagères).
- Tolérance aux températures élevées (fabrications fromagères thermophiles) ;
- Compatibilité avec d'autres souches (Branger *et al.*, 2007).

- Propriétés probiotiques

Outre les caractéristiques précédemment citées, il faut prendre en considération certaines spécificités liées aux caractéristiques probiotiques des ferments. Ces spécificités correspondent essentiellement à des propriétés de résistance lors du passage dans l'estomac, dans le duodénum et dans l'intestin.

Selon Drouault et Corthier (2000), les principales propriétés recherchées sont les suivantes :

- La résistance aux acides (acides gastriques) ;
- La résistance aux sels biliaires ;
- La stabilité en milieu acide ;
- L'aptitude à adhérer aux parois intestinales ;
- La production de substances antimicrobiennes (bactériocines) ;
- L'activité immunostimulante ;
- Et l'activité antioxydante (Corrieu et Luquet, 2008).

3.4. Ferments lactiques et production fromagère

Présure et ferments lactiques sont les clés de la fabrication et de la diversité des fromages. Ce sont précisément les deux principales substances utilisées pour la coagulation ou le caillage du lait (Milk Planet, 2017).

Pendant cette étape, le lait coagule et se transforme en un gel homogène et lisse, sous l'action d'un ferment (mélange de bactéries lactiques), de présure (coagulant naturel de source animale ou végétale) ou d'une combinaison des deux.

Tout l'art du fromager consiste à équilibrer la quantité de présure et de ferments lactiques, indispensables pour le goût, tout en maîtrisant chaque détail lors la fabrication (températures, durée des différentes étapes, affinage...). « Les combinaisons sont infinies, ce qui explique pourquoi on peut obtenir autant de fromages différents à partir d'une même matière première » (Milk Planet, 2017).

A partir de là, s'en suit toutes les autres étapes de production du fromage (égouttage, salage, affinage...) qu'on ne va pas détailler, puisque toutes sont mentionnées dans plusieurs bibliographies et pour chaque type de fromage (Milk Planet, 2017).

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Matériel et méthodes

1.1. Objectif de l'étude

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et la valorisation du potentiel technologique des bactéries lactiques, à travers les multiples aptitudes technologiques qui leur sont attribuées et essayer de créer de nouvelles formules (ou de nouveaux ferments) qui pourraient constituer dans le futur une valeur ajoutée dans le secteur agroalimentaire et plus spécialement en industrie laitière et fromagère.

Dans cette étude, l'idée d'élaboration d'un nouveau ferment constitué d'une combinaison de trois (03) souches autochtones de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum* – *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*) constitue notre principal objectif.

Le but consiste dans un premier lieu, à essayer de déterminer l'activité protéolytique de chaque souche individuellement puis en combinaison, afin d'élaborer dans un second temps un ferment à haute aptitude fromagère.

Cette étude, qui devrait normalement être réalisée au niveau du laboratoire de production et de transformation laitière (au niveau de l'exploitation agricole de Hassi Mamèche, affiliée à l'université de Mostaganem), n'a pas eu lieu, et ce vu l'état de confinement drastique lié à la pandémie de la 'Covid-19' qui a fait que l'expérimentation soit annulée et sera remplacée par des protocoles explicatifs en relation avec l'objectif assigné.

1.2. Origine des souches lactiques étudiées

Les 03 souches utilisées dans cette étude (*Lb. plantarum* – *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*) proviennent de la collection de M. DAHOU Amine, Docteur et maître de conférences (B) à l'Université de Mostaganem.

Elles ont été toutes isolées à partir du lait de vache, et identifiées par la spectrométrie de masse ((MALDI TOF / MS).

1.3. Milieux de cultures

Dans cette étude, différents milieux de cultures devront être utilisés pour la revivification, la purification et l'étude de l'activité protéolytique des souches isolées. Parmi ces milieux, on cite :

- ✓ Le milieu MRS en bouillon pour la revivification des souches ;
- ✓ Le milieu MRS solide pour la purification et la mise en évidence des interactions ;

- ✓ Et le milieu PCA (Plate Count Agar) additionné de lait écrémé à différents pourcentage pour la détermination de l'activité protéolytique.

1.4. Revivification et vérification de la pureté des souches

Les trois souches lactiques (S1, S2, S3 correspondant respectivement à *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, et *Lb. acidophilus*) seront repiquées dans le bouillon MRS et incubées à différentes températures (15°C pour *Lb. plantarum*, entre 25°C et 35°C pour *Lb. casei* et entre 35°C et 45°C pour *Lb. acidophilus*) pendant 24h. Chaque souche étudiée à sa température de croissance optimale.

La revivification sera suivie par une vérification de la pureté des souches. Cette pureté est confirmée par des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec incubation à ces différentes températures pendant 24h à 48h, jusqu'à l'obtention d'un aspect macroscopique pure.

La coloration Gram et le test de catalase seront réalisés pour compléter cette vérification de la pureté.

1.5. Tests confirmatifs de l'identité des souches

1.5.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet d'observer visuellement sur gélose MRS : la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies de bactéries lactiques.

1.5.2. Examen microscopique

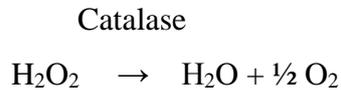
L'examen microscopique des colonies sera effectué par des frottis, auparavant colorés par une coloration différentielle (coloration Gram), qui permet de différencier les bactéries Gram positives de celles à Gram négatives, et apprécier la forme et le mode de regroupement des cellules.

La coloration est faite selon la méthode classique et l'observation des cellules est réalisée par microscope optique (Grossissement x100).

1.5.3. Tests biochimiques

1.5.3.1. Test de catalase

Le test de catalase, met en jeu une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H₂O et ½ O₂.



Le protocole de ce test consistera à mettre en contact, une culture fraîche (de moins de 24 heures) d'une souche lactique avec une solution d'eau oxygénée à 10 volumes.

La lecture du résultat est immédiate : s'il y a effervescence, signe d'un dégagement gazeux d'oxygène, la souche testée est dite catalase +, sinon elle est considérée comme étant catalase – (Delarras, 2007).

1.5. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques

Les tests seront effectués en triplicata pour la confirmation des résultats.

1.5.1. Étude de l'activité protéolytique des souches individuellement

Pour la détermination de l'activité protéolytique des souches individuellement, nous allons utiliser la méthode des spots sur milieu PCA supplémenté par différentes concentrations de poudre de lait écrémé (1%, 2%, 4%, 5% et 8%).

Des disques de papiers Wattman stériles seront par la suite déposés à la surface de la gélose pour recevoir un volume de 5µl d'une culture jeune de chaque souche.

La lecture des résultats sera effectuée après une incubation à 30°C pendant 24 et 48 heures. Une zone d'inhibition limpide, apparaîtra autours des colonies positives à la protéolyse. Le diamètre des zones d'inhibition sera mesuré en millimètre en utilisant un micromètre numérique ou un pied à coulisse (Franciosi et *al.*, 2009).

1.5.2. Étude de l'activité protéolytique du ferment

Pour comparer l'activité protéolytique des souches lactiques (individuellement) et du ferment (souches en combinaison), nous allons suivre le même protocole d'étude précédemment cité. Ici les disques de papier Wattman stériles déposés à la surface de la

gélose vont recevoir un volume de 5µl de la communauté ou du ferment et non pas des souches individuellement.

La lecture des résultats sera aussi effectuée après une incubation de 24 à 48 heures.

1.6. Utilisation du ferment pour la production d'un fromage

La combinaison des 3 souches autochtones vont servir dans cette partie comme ferment pour un essai de fabrication d'un type de fromage.

Le principe consiste ici à apprécier les caractéristiques organoleptiques du produit après une analyse sensorielle et discuter le résultat pour une meilleure approche touchant en quelque sorte la haute aptitude fromagère du ferment.

Habituellement la fabrication du fromage comprend trois étapes : La formation d'un gel de caséines, c'est la coagulation du lait ; la déshydratation partielle du gel, c'est l'égouttage qui aboutit à un caillé et le salage. Ces étapes concernent les fromages frais. Le reste des fromages subissent en plus une étape d'affinage, ce sont les fromages affinés (Camembert, Roquefort, Gouda, Tulum,...).

Résultats et Discussion

1. Résultats et discussion

1.1. Résultat de revivification et vérification de la pureté des souches

La revivification des souches lactiques sur bouillon MRS va être apprécié par l'apparition d'un trouble et ce après 24 heures d'incubation à différentes températures, (correspondantes à la température optimale de croissance de chaque souche).

L'étape de purification qui suivra la revivification doit révéler dans la plupart des cas (examen macroscopique) : des colonies visibles, de petites tailles, lisses et brillantes, avec une couleur blanchâtre à jaunâtre (cas de *Lactobacillus plantarum*).

La figure 7, montre l'aspect macroscopique de l'une des 3 souches lactiques (*Lb. plantarum*) sur milieu MRS fournie par la revue scientifique (Technologie de laboratoire).

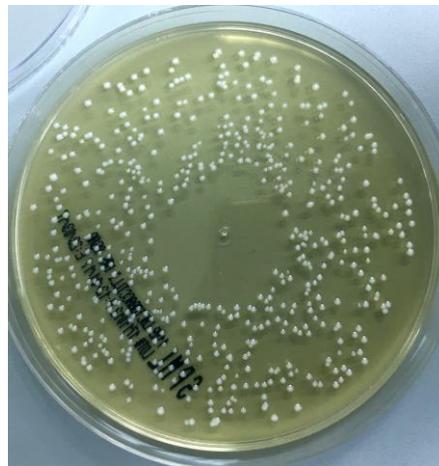


Figure 7. Aspect macroscopique d'une culture de *Lb. plantarum* sur milieu MRS (Binhelal, 2018).

1.2. Résultats des tests confirmatifs de l'identité des souches

1.2.1. Examen microscopique

La coloration de Gram qui s'avère être un autre paramètre important de pré-identification, va permettre de confirmer la pureté des souches lactiques sélectionnées.

Elles doivent toutes être à Gram positives, non flagellés, asporogènes et immobiles, avec une forme bâtonnet à extrémité arrondie. Elles apparaîtront soit isolés, associées en paires ou en courtes chaînes.

La figure 8, indique la couleur et l'apparence de l'une des souches lactiques (*Lb. casei*) après coloration de Gram, établie du catalogue des souches lactiques (GCM-catalogue, 2009).

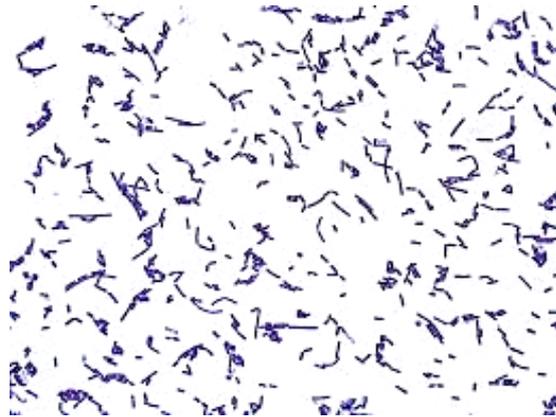


Figure 8. Aspect microscopique d'une culture de *Lb. casei* sous microscope après coloration de Gram (GCM-catalogue, 2009).

1.2.2. Tests biochimiques

- **Test de catalase**

Les résultats de plusieurs travaux de recherches sur les 3 espèces lactiques (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*) comprenant aussi bien le test de catalase, vont montrer l'absence de cette enzymes chez les 3 espèces de bactéries lactiques précédemment citées.

Les bactéries lactiques n'ayant pas cette enzyme (catalase -) montrent leur incapacité de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2).

La caractérisation par le test de catalase est aussi un autre paramètre clé pour la détermination de l'identité des souches lactiques.

1.3. Résultats de détermination de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

1.3.1. Résultats et discussion de l'article rapporté par (Moslehichad *et al.*, 2013), portant sur : L'activité protéolytique de certaines bactéries lactiques dans la fermentation du lait de vache et de chamelle et les caractéristiques sensorielles résultantes des produits) *In International Journal Of Dairy Technology*.

Dans cet article, L'activité protéolytique des bactéries lactiques sélectionnées a été déterminée en utilisant trois méthodes : un test de culture ponctuelle dans des conditions enrichies en CO_2 ; un test de culture ponctuelle en conditions anaérobies; et un test de diffusion sur milieu gélosé.

A notre échelle l'activité protéolytique a été évaluée par une seule technique, celle de diffusion. Elle a été évaluée en fonction de la capacité de produire une zone claire sur la gélose au lait écrémé (Nemeckova *et al.* 2009).

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau N°3.

Tableau 3. Résultats de l'activité protéolytique des trois espèces de bactéries lactiques (*Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*) (Moslehichad *et al.*, 2013)

| Lactic acid bacteria | Proteolytic activity | | |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Supernatant | Anaerobic | Enriched CO ₂ |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. PTCC 1403 | – | 10.66 ± 0.89 ^{dcA} | 6.71 ± 1.16 ^{dcB} |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> PTCC 1426 | 4.12 ± 0.62 ^{bcA} | 5.79 ± 0.64 ^{fgB} | 6.08 ± 0.07 ^{dcB} |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> PTCC 1602 | 4.69 ± 0.29 ^{abA} | 4.21 ± 0.15 ^{fgA} | 4.43 ± 0.35 ^A |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> PTCC 1424 | 5.53 ± 0.38 ^{aA} | 4.11 ± 0.09 ^{gB} | 4.57 ± 0.26 ^B |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> PTCC 1638 | 3.11 ± 0.08 ^{cdA} | 19.96 ± 2.26 ^{bcB} | 24.26 ± 4.79 ^{abB} |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> PTCC 1655 | 2.58 ± 0.31 ^{dcA} | 8.26 ± 0.06 ^{cdB} | – |
| <i>Lactobacillus leichmannii</i> PTCC 1057 | 0.76 ± 0.07 ^{EA} | 12.02 ± 0.49 ^{dcB} | – |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> PTCC 1058 | 4.43 ± 0.32 ^{abA} | 23.87 ± 1.63 ^{bB} | 20.35 ± 1.91 ^{bcC} |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> PTCC 1643 | 2.93 ± 0.43 ^{dcA} | 12.47 ± 2.23 ^{dB} | 8.04 ± 0.21 ^{dcC} |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> PTCC 1333 | 4.31 ± 0.26 ^{bcA} | 18.69 ± 2.31 ^{cb} | 23.00 ± 1.83 ^{bB} |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> PTCC 1637 | 4.50 ± 0.21 ^{abA} | 28.79 ± 2.25 ^{abB} | 28.58 ± 0.88 ^C |
| <i>Lactobacillus casei</i> PTCC 1608 | 2.84 ± 0.78 ^{dcA} | 23.30 ± 0.36 ^{bB} | 17.14 ± 3.24 ^{dB} |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> PTCC 1738 | – | 9.67 ± 0.80 ^{dcB} | 9.69 ± 1.26 ^{dB} |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> PTCC 1737 | 1.90 ± 0.04 ^{cA} | 18.32 ± 2.01 ^{cb} | 8.55 ± 0.07 ^{dcC} |

Negative (–), no proteolytic activity was detected.
 Values with different small letters in a column and with different capital letters in a row are statistically significant at $P < 0.05$.

Comme il est montré dans le tableau N°3, les deux souches (*Lb. plantarum* et *Lb. casei*) ont révélé un niveau élevé d'activité protéolytique (production élevée de protéases) par rapport à la souche *Lb. acidophilus*.

Les données suggèrent que la libération de protéase dans un milieu, est influencée par les conditions de culture. Il a été précédemment rapporté que les conditions de culture telles que la période d'incubation, le pH et la température ambiante sont préjudiciables à l'activité protéolytique des bactéries parmi les souches testées.

Ce qui est à retenir de cet article et à partir des résultats de protéolyse, de telles souches pourrait être recommandé pour le développement de lait fermenté de vache.

D'autres études devraient confirmer la possibilité d'appliquer ces bactéries lactiques protéolytiques comme nouvelle approche pour générer des produits laitiers fermentés riches en peptides bioactifs.

Plusieurs recherches ont été mené pour trouver d'autres articles scientifiques ayant une relation avec l'activité protéolytique de ces trois souches autochtones en combinaison, mais en vain, car la plupart d'entre elles n'éditent que des travaux sur des combinaisons entre souches de genres différents, tels que des communautés de lactocoques et de lactobacilles ou autres, composées de lactocoques, leuconostocs et lactobacilles.

Nous nous sommes trouvés limiter du point de vue résultats, ce qui interrompra l'appréciation de l'activité protéolytique de ces trois souches en communauté et par conséquent, l'essai du ferment pour une préparation fromagère reste à vérifier dans des prochaines études.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a été conduite dans le but de connaître une des propriétés technologiques attribuées aux bactéries lactiques, à savoir l'activité protéolytique.

Trois (03) souches autochtones appartenant au genre *Lactobacillus* ont été sélectionnés (*Lb plantarum*, *Lb acidophilus* et *Lb casei*) pour ce test (individuellement et en combinaison) et les résultats obtenus à travers l' 'étude de différents articles scientifiques ont montré un niveau élevé de protéolyse des souches via le test de diffusion sur milieu gélosé.

Le pouvoir protéolytique par conséquent de ces bactéries, peut orienter à la possibilité de les appliquer en tant que ferment en industrie fromagère.

On aurait bien aimé trouver plus de résultats confirmant cette activité de protéolyse des 03 souches étudiées en communauté, pour une évaluation concrète, et ce pour poursuivre vers un essai de fabrication d'un type de fromage qui utilise ce ferment comme culture starter.

Hélas, l'état de confinement lié à la pandémie de la covid – 19 ne nous a pas permis d'expérimenter l'idée et qui restera comme une future perspective dans des recherches ultérieures.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- ✓ **ALGARON F R., YVON M., (1998).**, Le catabolisme des Acides Aminés Aromatiques et des Acides Aminés à Chaîne Ramifiée chez *Lactococcus lactis*. Le Lait, INRA Editions, 78 (1), pp.23-30.
- ✓ **BAHRI F., (2014).** Isolement et Caractérisation des Souches de Lactobacilles à Caractères Probiotiques à partir de Selles d'Enfants, Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, p 5 -9.
- ✓ **BALIARDA A., (2003).** Evaluation de la Réponse au Stress chez les Bactéries Lactiques Appartenant aux Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* / Approches Physiologiques et Génétiques, Thèse présentée à l'Université Bordeaux 1, Ecole Doctorale de Sciences du Vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement, p18.7
- ✓ **BENAISSA DJ., MELLAL S., (2017).** Effets Antimicrobiens de l'Extrait au Méthanol de *Thymus vulgaris* (Thym) Récolté dans la Région de Naama sur la Croissance des Germes Spécifiques du Yaourt: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, p 16,17.
- ✓ **BINHELAL B., (2018).** Revue Scientifique, technologie de laboratoire.
- ✓ **BOULOUF A., (2016).** Etude du Pouvoir Technologique de Quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel «Bouhezza», mémoire de Magister en Technologie alimentaire, Université des frères mentouri, Constantine, p135.
- ✓ **BRAHIMI S, (2015).** Isolement et Caractérisation Biotechnologiques des Bactéries Lactiques Isolées à Partir des Margines d'Olives «AMOREDJ» Fermentés. Mémoire de Magister, Spécialité : Biodiversité des microorganismes, Université D'Oran 1 Ahmed Ben Bella, p, 3-4.
- ✓ **BRANGER A., RICHER M.M., ROUSTEL S. (2007).** Microbiochimie et Alimentation, Ouvrage collectif, Edition Laurence Audenet-verrier, 344p.
- ✓ **BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., GARRITY, G.M., ET STALEY, J.T., (2005).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The proteobacteria Springer.
- ✓ **CHAMBA J.F., (2008).** Application des Bactéries Lactiques lors des Fabrications Fromagères, In : Bactéries lactiques De la génétique aux ferments (Corrieu, G., Luquet, F.M.). Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
- ✓ **CHAMPAGNE CP., (1998).** Production de Ferments Lactiques dans l'Industrie Laitière. La Fondation des Gouverneurs et Edisem (ed), Sainte - Hyacinthe, Canada.
- ✓ **CHEN Y.S., CHRISTENSEN J.E., BROADBENT J.R., STEELE J.L., (2003).** Identification and Characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, An Endopeptidase with Postproline Specificity. Appl. Environ. Microbiol. 69:1276-1282.

- ✓ **CHOLET O., (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- ✓ **CHOUBAÏLA L., (2012).** Caractérisation et Contrôle de la Qualité de Ferments Lactiques Utilisés dans l'Industrie Laitière Algérienne, Diplôme de Magistère en : Sciences Alimentaires, Option : Biotechnologie Alimentaire, Université MENTOURI de Constantine, p14.
- ✓ **CHRISTENSEN J.E., DUDLEY E.G., PEDERSON J.A., STEELE J.L., (1999).** Peptidases and Aminoacid Catabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*.76:217-246.
- ✓ **CORRIEU G., LUQUET F M., (2008).** Bactéries lactiques : De la Génétique aux Ferments, Edition : Tec Et Doc, Lavoisier, 245p.
- ✓ **DAKO E., EL SODA M., VILLEUMARD J C., SIMARD R E., (1995).** Autolytic Properties and Aminopeptidase Activities of Lactic Acid Bacteria, Article Published by Elsevier, Science Direct Journal.
- ✓ **DELARRAS C., (2007).** Microbiologie Pratique pour le Laboratoire. Paris : Editions TEC & DOC, 476 p.
- ✓ **DESMAZEAUD M., (1998).** Les Bactéries Lactiques dans : L'alimentation Humaines : Utilisation et Innocuité. Cahiers Agricultures, 5, pp: 331-343.
- ✓ **DETMERS F.J.M., LANFERMEIJER F.C., ABELE R., JACK R.W., TAMPE R., KONINGS W.N., POOLMAN B., (2000).** Combinatorial Peptide Libraries Reveal the Ligand-Binding Mechanism of the Oligopeptide Receptor Opp A of *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*97:12487-12492.
- ✓ **DOEVEN, M.K, KOK J., POOLMAN B., (2005).** Specificity and Selectivity Determinants of Peptide Transport in *Lactococcus lactis* and Other Microorganisms. *Molecular Microbiology*. 57:640–649.
- ✓ **DRIDER DJ., PREVOST H., (2009).** Bactéries lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, édition ECONOMICA, France, p1, 35, 36, 51, 53, 99.
- ✓ **DROUAULT S., CORTHER G., (2000).** Effet des Bactéries Lactiques Ingérées avec des laits Fermentés sur la Santé, Article de Synthèse, *Vet. Res.* 32 (2001) 101-117, INRA, EDP Sciences.
- ✓ **DWORKIN M., (2006).** The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: *Firmicutes*, Cyanobacteria 4, 4, New York, Springer-Verlag New York Inc.
- ✓ **ECK A., GILLIS J.C., (2006).** Le fromage, De la Science à l'Assurance-Qualité, *TEC&DOC*, Lavoisier, 891 p. (ISBN 978-2-7430-0891-8), Chap. 10 (« Les phénomènes Microbiens par C. Choisy, Desmazeaud, Gueguen, Lenoir, Schmidt, Tourneur »).

- ✓ **FADDA M.E., (2004).** Occurrence and Characterization of Yeasts Isolated From Artisanal Fiore Sardo Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, n. 1, p. 51-59.
- ✓ **FOUCAUD C., KUNJI E.R.S., HAGTING A., RICHARD J., KONINGS W.N., DESMAZEAUD M., POOLMAN B., (1995).** Specificity of Peptide Transport Systems in *Lactococcus lactis* : Evidence for a Third System which Transports Hydrophobic di- and Tripeptides. *J. Bacteriol.* 177: 4652-4657.
- ✓ **FRANCIOSI E., SETTANI L., COLOGNA N., CAVAZZA A., (2009).** Microbial Analysis of Raw Cows' Milk Used for Cheese-making: Influence of Storage Treatments on Microbial Composition and Other Technological Traits, ResearchGate Article.
- ✓ **GAGNON D., (2006).** Formulation et Propagation de Ferments Lactiques Mésophiles à Haut Caractère Aromatique, Mémoire présenté à la Faculté des Etudes Supérieures de l'Université Laval dans le Cadre du Programme de Maîtrise en Sciences et Technologie des Aliments pour l'Obtention du Grade de Maître-ès Sciences (m.se.), Université Laval, Québec.
- ✓ **GARRY P, LEGUERN L, (1999),** Les bactéries Lactiques, Volume 9, N° 06, p423.
- ✓ **GOY A., JAKOB E., HALDEMANN J., (2015).** Les fermentations Lactiques, Revue scientifique : Denrées alimentaires, Agroscope Transfer | N° 59.
- ✓ **GUEDON E., RENAULT P., EHRLICH S.D., DELORME C., (2001).** Transcriptional Pattern of Genes Coding for the Proteolytic System of *Lactococcus Lactis* and Evidence for Coordinated Regulation of Key Enzymes by Peptide Supply. *J. Bacteriol.*183:3614-3622.
- ✓ **HAGTING A., KNOL J., HASEMEIER B., STREUTKER M.R., FANG G., POOLMAN B., KONINGS W.N., (1997).** Amplified Expression, Purification and Functional Reconstitution of the Dipeptide and Tripeptide Transport Protein of *Lactococcus lactis*. *Eur. J. Biochem.* 247:581-587.
- ✓ **HEMME D., WAHL D., NARDI M., (1980).** Variation de l'Equipement Enzymatique de *Streptococcus thermophilus*, *Le lait*, LX, 111-129.
- ✓ **HO T N T., TUAN N., DESCHAMPS A., CAUBET R. (2007).** Isolation and Identification Of Lactic Acid Bacteria (LAB) of the Nem Chua Fermented Meat Product of Vietnam. *Int. Worh shop Food Safety Processing Technol.*134-142.
- ✓ **HOIER E., (1992).** Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia*44, 418–420.
- ✓ **JUILLARD V., GUILLOT A., LE BARS D., GRIPON J.C., (1998).** Specificity of Milk Peptide Utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1230-1236.
- ✓ **KHALID N.M., ELMER H.M., (1990).** Lactobacilli, their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese. A Review. *J. Dairy. Sci.*73:2669-2684.

- ✓ **KIHHEL M., MAMI A., (2019).** Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* : Le Bio-contrôle des Bactéries d'Altération alimentaire par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, Publisher : Editions universitaires européennes, 77p.
- ✓ **KONINGS W.N., POOLMAN B., DRIESSEN A.J.M., (1989).** Bioenergetics and Solute Transport in Lactococci. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*16 : 419-476.
- ✓ **KUNJI E.R., MIERAU I., HAGTING A., POOLMAN B., KONINGS W.N., (1996).** The Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 187-221.
- ✓ **LANGELLA P., NOUAÏLLE S., COMMISSAIRE J., BOLOTINE A., GRUSS A., et LE LOIR Y., (2001).** Characterization of Host Factors Affecting Heterologous Protein Secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, pp.19-28.
- ✓ **LAIRINI S., BEQQALI N., BOUSLAMTI R., BELKHOUE R., ET ZERROUQ F., (2014).** Isolement des Bactéries Lactiques à Partir des Produits Laitiers Traditionnels Marocains et Formulation d'un lait Fermenté Proche du Kéfir. *Afrique Science.*10 (4) :267-277.
- ✓ **LAW B.A., ET KOLSTAD J., (1983).** Proteolytic Systems in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*49:225-245.
- ✓ **LAW J., HANDRIKMAN A., (1997).** Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy.J.*7:1-11.
- ✓ **LEONARD L., (2015).** Évaluation du Potentiel Bioprotecteur de Bactéries Lactiques Confinées dans une Matrice Polymérique, Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Discipline : Sciences de l'Alimentation, p9.
- ✓ **LOPEZ L K., (2008).** Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence à partir de données hétérogènes et incomplètes. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- ✓ **MATAMOROS S., (2008).** Caractérisation de Bactéries Lactiques Psychrotrophes en vue de leur Utilisation dans la Biopréservation des Aliments. Etude Physiologique et Moléculaire des Mécanismes d'Adaptation au Froid, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nantes, p17.
- ✓ **METLEF S., (2008).** Effet Antagoniste de *Lactococcus lactis*, Souches Extrêmophiles locales, sur des Espèces de la Flore Intestinale Résidente, Mémoire de Magister en Biologie, Option : Sciences Alimentaires, Université de Hassiba ben Bouali, Chlef, p24.
- ✓ **MNHN., (2019).** Muséum Moodle (<http://edu.mnhn.fr>), site de formation
- ✓ **MOFRADJ Z., DECHACHE A., (2014).** Contribution à l'Etude de Conservation d'une Souche de Lactocoques Isolée à partir du Lait Caprin, Mémoire de Master Académique, Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie, Filière: Biologie, Spécialité : Microbiologie Appliquée, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- ✓ **MILK PLANET., (2017).** <https://www.produits-laitiers.com/milk-planet/>

- ✓ **MOSLEHISHAD M., MIRDAMADI S., EHSANI M R., EZZATPANAH H., MOOSAVI-MOVAHEDI A., (2013).** The Proteolytic Activity of Selected Lactic Acid Bacteria in Fermenting Cow's and Camel's Milk and the Resultant Sensory Characteristics of the products. Article, International Journal Of Dairy Technology, Original Research.
- ✓ **MOTTA A.D.Z., DA SILVA M.M.G., (2015).** Technological and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria : The Importance of these Microorganisms Food Propriedad estecnológicae funcionais de bactérias lácticas : Importância Destes Microrganismos Para Alimentos da s. m.rev. inst. laticínios cândido tostes, juiz de fora, v. 70, n. 3, p. 172-184.
- ✓ **NEHAL F., (2007).** Isolement et Caractérisation des Souches de *Lactococcus lactis* à partir de Différents Laits dans le Périmètre du moyen Cheliff, Mémoire de Magister, Université Hassiba ben bouali, Chlef, p11.
- ✓ **OGIER JC., CASALTA E., FARROKH C., SAÏHI A., (2008).** International journal of food ..., Elsevier.
- ✓ **PASTER I., TONIC I., GOLIC N., KOJIC M., VAN KRANENBURG R., KLEERE BEZEM M., TOPISIROVIC L., JOVANOVIC G. (2003).** Identification And Genetic Characterization Of A novel Proteinase, Prtr, From The Human Isolate *Lactobacillus Rhumnosus* BGTIO. Appl. Environ.Microbiol.69: 5802-5811.
- ✓ **PAVIA M., TRUJILLO A. J., GUAMIS B., FERRAGUT V., (2000).** Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. Journal of Dairy Science. 83 :1441–1447.
- ✓ **POOLMAN B., (1993).** Energy Transduction in Lactic Acid Bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 12: 125-147.
- ✓ **ROUDJ S., (2011).** Protéolyse chez *Lactobacillus* : Purification et Caractérisation de Protéases et Aminopeptidase, Thèse de Doctorat d'Etat es-sciences, Option : Biochimie Microbienne, Université d'Oran.
- ✓ **ROUDJ S., BELKHEIR K., ZADI-KARAM H. ET KARAM N.E., (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. European. J. Sci. Res. 34 (2) : 218-227.
- ✓ **SASAKI M., BOSMAN B W., TAN P S T., (1995).** Comparison of proteolytic activities in various *lactobacilli* - Journal of Dairy Research, Published online by Cambridge University 2009.
- ✓ **SAVIJOKI K., INGMER H., VARMANEN P., (2006).** Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 71, n. 4, p. 394-406.
- ✓ **SMIT G., SMIT B.A., ENGELS W.J.M., (2005).** Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and biochemical flavour, profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews, v. 29, n. 3, p. 591-610.

- ✓ **SRIDHAR V.R., HUGHES J.E., WELKER D.L., BROADBENT J.R., STEELE J.L., (2005).** Identification of Endopeptidase Genes from the Genomic Sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the Role of these Genes in Hydrolysis of Model Bitter Peptides. Appl. Environ. Microbiol. 71:3025-3032.

- ✓ **TAHIRI N., (2017).** Caractérisation des Activités Protéolytiques et Autolytiques des Souches de *Lactococcus lactis ssp.cremoris* pour l'Elaboration d'un Ferment à Haute Aptitude Technologique, Maîtrise en Sciences et Technologie des Aliments, Maître ès sciences (M.Sc.), Université LAVAL, Canada, 73p.

- ✓ **TAN P.S.T., POOLMAN B., KONINGS W.N., (1993).** Proteolytic Enzymes of *Loctococcus lactis*. J. Dairy Res.60:269-386.

- ✓ **TYNKKYNNEN S., BUIST G., KUNJI E., KOK J., POOLMAN B., VENEMA G., HAANDRIKMAN A. (1993).** Genetic and Biochemical Characterization of the Oligopeptide Transport System of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol.175:7523-7532.

- ✓ **VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DEVOS P., KERSTERS K., SWINGS G., (1996).** Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiol. Rev.60 :407.

- ✓ **WISSELINK H.W., WEUSTHUIS R.A., EGGINK G. HUGENHOLTZ J. GROBBEN G.J., (2002).** Mannitol Production by Lactic acid Bacteria : A Review. International Dairy Journal, 12, pp.151-161.

- ✓ **YILDIZ F., (2010).** Developpement and Manufacture of Yougurt and Other Dairy Products, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 435 p.

- ✓ **ZAGOREC M., CHAMPOMIER-VERGES M., RENAULT P., VALENCE F., LELOIR Y., MONTEL M C., (2012).** Ecosystèmes Microbiens et Préservation des Aliments, Innovations Agronomiques24 (2012), 57-77.

Annexes

Milieux de culture

MRS (GELOSE) (De Man, Rogosa, Sharpe)

Version solide du bouillon MRS pour la culture des bactéries lactiques.

| COMPOSITION | (grammes/litre) |
|-----------------------------------------|-----------------|
| Peptone | 10,0 |
| Extrait de viande de bœuf | 8,0 |
| Extrait de levure | 4,0 |
| Glucose | 20,0 |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2,0 |
| Acétate de sodium 3 H ₂ O | 5,0 |
| Citrate d'ammonium | 2,0 |
| Sulfate de magnésium 7 H ₂ O | 0,2 |
| Sulfate de manganèse 4 H ₂ O | 0,05 |
| Agar | 10,0 |
| pH 6,2 ± 0,2 | |

Milieu MRS Liquide

| COMPOSITION | (grammes/litre) |
|-----------------------------------------|-----------------|
| Peptone | 10,0 |
| Extrait de viande de bœuf | 8,0 |
| Extrait de levure | 4,0 |
| Glucose | 20,0 |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2,0 |
| Acétate de sodium 3 H ₂ O | 5,0 |
| Citrate d'ammonium | 2,0 |
| Sulfate de magnésium 7 H ₂ O | 0,2 |
| Sulfate de manganèse 4 H ₂ O | 0,05 |
| pH 6,2 ± 0,2 | |

Milieu PCA

- tryptone:5,0 g
- extrait de levure:2,5 g
- [glucose](#):1,0 g
- agar:15,0 g
- pH = 7.0

Eau qsp 1L

Coloration Gram

Principe de la coloration

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -).

L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide et médicalement importante.

La coloration de Gram est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration. Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet ou mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau, les corps cellulaires des bactéries à Gram négatif.

Mode opératoire

A partir des boîtes de pétri:

Vous recevez 5 boîtes de pétri contenant 5 souches de bactéries différentes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*, Observer l'aspect, la couleur et la forme des colonies.

a) Faire un frottis:

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une pointe jaune ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

b) Coloration et explications: (attention aux éclaboussures, mettez des gants)

- Déposer quelques gouttes de solution de **violet de gentiane** (cristal violet) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 minute. *Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.*
- Jeter l'excès de colorant dans un bécher.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de **lugol** sur le frottis. *Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.*
- Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'H₂O comme précédemment décrit.
- Décolorer en faisant couler la solution de **décoloration** sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes). *La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette.*

- Rincer à l'H₂O.
- Contre-colorer en déposant la solution de **safranine** (rose) pendant 1 minute. *Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.*
- Rincer à l'H₂O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x).

إن الهدف من هذه الدراسة هو محاولة تبيان نشاط التحلل البروتيني لثلاث (03) سلالات أصلية تتمثل في *Lb. plantarum* و *Lb. acidophilus* و *Lb. casei*، والتي تم الحصول عليهما من حليب البقر، وهذا بغرض تطويرها كخميرة ذات إمكانات عالية في صناعة الأجبان. سيتم تقييم نشاط التحلل البروتيني لهاته السلالات الحليبية (بصفة منفردة ومجمعة مع بعضها) في المختبر عن طريق اختبار الانتشار على وسط صلب (PCA: أجار) وسيتم تقدير كفاءتها العالية في تحويل الحليب الى جبن باستخدامها كمخمر في تجربة صناعة الجبن انطلاقا من حليب البقر. لكن حالة الاحتواء المرتبطة بجائحة كورونا (كوفيد-19) تسببت في إلغاء هذه التجارب واستبدالها بدراسة مقالة علمية لها صلة بالموضوع. أظهرت النتائج التي تم العثور عليها وإثباتها من خلال الاختبارات المختلفة التي أجريت في هذه المقالة، أن سلالات حمض اللاكتيك الثلاثة تتوفر على نشاط بروتيني معتبر يمكن استخدامه كخميرة في صناعة الأجبان، ما يجلب خصائص جديدة (حسية) لهاته المنتجات.

الكلمات المفتاحية: *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*، التحلل البروتيني، الخميرة، الكفاءة في صناعة الأجبان

Résumé

L'objectif de cette étude, consiste à essayer de caractériser l'activité protéolytique de trois (03) souches autochtones de *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, issues du lait de vache, pour l'élaboration d'un ferment à haute aptitude fromagère. Le pouvoir protéolytique des souches lactiques (individuellement et en combinaison), sera évalué *in vitro* par le test de diffusion sur milieu solide (PCA : plate count agar) et l'appréciation de la haute aptitude fromagère du ferment sera effectuer en l'utilisant comme culture starter dans un essai de fabrication d'un fromage à partir du lait de vache. Cependant, l'état de confinement lié à la pandémie du (Covid – 19) a fait que l'expérimentation soit annulée et sera remplacé par l'étude d'un article scientifique en rapport avec le thème. Les résultats trouvés et prouvés par les différents tests effectués dans cet article, ont montré que les 3 souches lactiques possèdent une activité protéolytique conséquente pouvant ainsi être utilisées comme ferment, apportant de nouvelles propriétés (organoleptiques) aux produits élaborés.

Mots clés : *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, Activité protéolytique, Ferment, Aptitude fromagère.

Abstract

The objective of this study is to try to characterize the proteolytic activity of three (03) indigenous strains of *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* and *Lb. casei*, obtained from cow's milk, for the development of a ferment with high cheese potential. The proteolytic power of lactic acid strains (individually and in combination) will be evaluated *in vitro* by the diffusion test on solid medium (PCA: plate count agar) and the appreciation of the high cheese capacity of the ferment will be carried out using it as starter culture in a trial of making a cheese from cow's milk. However, the state of containment linked to the (Covid - 19) pandemic caused the experiment to be canceled and will be replaced by the study of a scientific article related to the theme. The results found and proven by the various tests carried out in this article have shown that the 3 lactic acid strains have a significant proteolytic activity that can thus be used as a ferment, bringing new properties (organoleptic) to the products produced.

Key words : *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, Proteolytic activity, Ferment, Cheesy aptitude.