

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

BENMEHIDI Nour Elhouda et BENNANI Bedra

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

THÈME

**CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET
MICROBIOLOGIE DE QUELQUES SOUCHES
LACTOBACILES ISOLÉS DE PRODUITS
TERROIR.**

Devant le jury

Président :	ARABI Abed	M.C.B	U.Mostaganem
Encadreur :	BENBOUZIANE Bouasria	M.C .A	U.Mostaganem
Co – encadreur :	BENTAHAR Mohamed Chérif	Doctorant	U.Mostaganem
Examineur :	BENNAMA Rabha	M.C .B	U.Mostaganem

REMERCIEMENTS

Au début et avant tout, nos remerciements et louanges à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage et la santé pour finaliser ce travail.

Nous tenons à remercier exceptionnellement notre professeur et notre encadreur Monsieur BENBOUZIANE Bouasria et Co- encadreur BENTAHAR Mohamed Chérif pour leurs soutien permanent, pour leurs conseils, leurs orientations, leurs aide et surtout pour leurs patience énorme.

Nos vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

** Monsieur Arabi : un grand remerciement d'avoir accepté de présider le jury.*

** Madame Bennaama : un grand remerciement d'avoir accepté d'examiner notre travail et l'enrichir par ces propositions.*

Un grand merci à nos parents, vous nous avez soutenu et encouragé tout au long de nos études et permis d'arriver jusque-là... sans vous rien n'aurait été possible.

Tous nos enseignants trouveront ici l'expression de notre profond respect.

Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien de nos familles et de nos amis, merci pour tout.

DEDICACE

*Nous remercions Dieu avant tout de nous avoir donné la force et la détermination de
faire ce travail.*

*Nous dédions cette thèse à nos chers parents.
À celle qui nous a donné le goût et le sens de la vie
Responsabilité..... Merci maman.*

À celui qui a toujours été une source de courage..... Merci papa.

À nos frères et sœurs : Avec nos meilleurs vœux de succès et de bonheur

À toute la famille BENNANI et BENMEHID .

Table des matières

INTRODUCTION :	1
1. CHAPITRE I : GENERALITES	3
1.1. Définition	3
1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques	4
1.3. Taxonomie des bactéries lactiques	5
1.4 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	7
1.4.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	7
1.4.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	8
1.4. 3. Le genre <i>Streptococcus</i>	8
1.4. 4. Le genre <i>Enterococcus</i>	8
1.4.5 Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	8
1.4.6. Le genre <i>Pediococcus</i>	9
1.4.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	9
1.4.8. Le genre <i>Vagococcus</i>	10
2. CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES DES BACTERIES LACTIQUES	11
2.1 Métabolismes des bactéries lactiques	11
2.1.1 Fermentation des glucides	11
2.1.2.Métabolisme du citrate et d'autres substrats carbonés	13
2.1..3. Métabolisme de l'oxygène	14
2.2. lipolyse	16
2.3. Protéolyse	16
3. MATERIEL ET METHODE	19
3.1. L'objectif	19
3.2. Matériels utilisés	19
3.2.1. Origine des souches testé	19
3.2.2. Les milieux de culture pour l'isolement et purification	19
3.3. Repiquage des souches	20
3.4. Vérification de l'identité des souches	20
3.4.1. Caractérisation macroscopique	20
3.4.2. Caractérisation microscopique	20
3.4.2.1 Coloration de Gram	20
3.4.2.2 Test de la catalase	21
3.5. Etudes physiologiques et biochimiques	21
3.5.1. Etude de recherche d'activité hydrolytique des protéines	21
3.5.1.1. hdrolyse de la caséine	21

3.5.1.2.	hdrolyse de la gélatine	22
3.5.1.3.	ODC	22
3.5.1.4.	Test de l'indole.....	22
3.5.2.	Etude de recherche d'activité hydrolytique des lipides.	23
3.5.2.1.	Test de lipase	23
3.5.2.2.	hdrolyse de lécithine.....	23
3.5.3.	Etude de recherche d'activité hydrolytique de glucides	24
3.5.3.1.	Mannitol -mobilité	24
3.5.3.2.	Test ONPG	24
3.5.3.3.	Test Clark et lubs.....	24
3.5.3.4.	TSI	25
3.5.3.5.	Utilisation de citrate.....	25
3.5.3.6.	.Nitrate -réductase	26
4.	RESULTATS	27
4.1.	Examen macroscopique et microscopique	27
4.1.1.	Caractérisation macroscopique	27
4.1.2.	Caractérisation microscopique	27
4.2.	Etudes enzymatiques et biochimiques.....	28
4.2.1.	Etude de recherche d'activité hydrolytique des protéines	28
4.2.2.	Etude de recherche d'activité hydrolytique des lipides	29
4.2.3.	Etude de recherche d'activité hydrolytique des glucides	33
5.	DISCUSSION.....	37
	CONCLUSION	38
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	39
	ANNEXES.....	42
	Les milieux d'isolement	42
	Milieu MRS.....	42
	Milieu caséines	42
	Milieu gélatinase	43
	Milieu lipase.....	43
	Milieu lécithines	43
	Milieu Mannitol	44
	Milieu TSI	44

RESUME

L'étude de principaux caractères morphologiques, biochimiques et microbiologiques des bactéries lactiques présente une variété de réponses ce qui peut dénoter une diversité des genres et d'espèces. Dans notre travail on observe une présence majoritaire de forme lactobacillaires dans les dix souches obtenus à partir de matrices biologiques différentes à savoir blé fermenté, thé fermenté, fromage type kelilla et beur au lait de chèvre.

En effet notre étude montre que l'activité lipolytique chez les isolats de bactéries lactiques est faible, et que l'activité protéolytique par contre est forte chez les isolats de blé fermenté, Kelila et beur au lait de chèvre bien que deux souches de blé fermenté ne possèdent pas d'activité protéolytique néanmoins la totalité des isolats fermentent le mannitol et sont immobiles, que les caractères métaboliques diffèrent selon origine l'espèce et le genre.

Ce qui reste intéressant si on cherche à cribler la banque de souche pour des études probiotiques par exemple ou bien d'isoler de nouvelles souches avec des fonctions technologiques potentiellement applicables dans l'industrie agroalimentaire, malgré la simplicité de ces méthodes si elles sont associées à des techniques de biologie moléculaires.

Mots clés : *Bactéries lactiques, tests biochimiques*

Abstract

THE STUDY OF THE MAIN MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LACTIC ACID BACTERIA PRESENTS A VARIETY OF RESPONSES WHICH MAY INDICATE A DIVERSITY OF GENERA AND SPECIES. IN OUR WORK, WE OBSERVE A MAJORITY PRESENCE OF LACTOBACILLARY FORMS IN THE TEN ISOLATES OBTAINED FROM DIFFERENT BIOLOGICAL MATRICES, NAMELY FERMENTED WHEAT, FERMENTED TEA, KELILLA-TYPE CHEESE AND GOAT'S MILK BUTTER.

INDEED OUR STUDY SHOWS THAT THE LIPOLYTIC ACTIVITY IN ISOLATES OF LACTIC ACID BACTERIA IS LOW, AND THAT THE PROTEOLYTIC ACTIVITY ON THE OTHER HAND IS STRONG IN ISOLATES OF FERMENTED WHEAT, KELILIA AND GOAT'S MILK BUTTER, ALTHOUGH TWO STRAINS OF FERMENTED WHEAT DO NOT HAVE PROTEOLYTIC ACTIVITY, HOWEVER, ALL THE ISOLATES FERMENT MANNITOL AND ARE IMMOBILE, AND THE METABOLIC CHARACTERS DIFFER ACCORDING TO ORIGIN, SPECIES AND GENUS.

THIS REMAINS INTERESTING IF ONE SEEKS TO SCREEN THE STRAIN BANK FOR PROBIOTIC STUDIES FOR EXAMPLE OR TO ISOLATE NEW STRAINS WITH TECHNOLOGICAL FUNCTIONS POTENTIALLY APPLICABLE IN THE FOOD INDUSTRY, DESPITE THE SIMPLICITY OF THESE METHODS IF THEY ARE ASSOCIATED WITH MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES.

Keywords: lactic bacteria, biochemical tests

ملخص

تقدم دراسة الخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية والميكروبيولوجية الرئيسية لبكتيريا حمض اللاكتيك مجموعة متنوعة من الاستجابات التي قد تشير إلى تنوع الأجناس والأنواع. في عملنا ، نلاحظ وجود غالبية أشكال العصيات اللبنية في السلالات العشر من المصفوفات البيولوجية المختلفة ، وهي القمح المخمر والشاي المخمر وجين كيللا وزبدة الماعز.

وبالفعل تُظهر دراستنا أن نشاط تحلل الدهون في عزلات بكتيريا حمض اللاكتيك منخفض ، وأن نشاط التحلل البروتيني قوي من ناحية أخرى في عزلات القمح المخمر وزبدة الكليلا وزبدة الماعز ، على الرغم من أن سلالتين من القمح المخمر ليس لهما خصائص حال للبروتين. ومع ذلك ، فإن جميع العزلات تخمر مانيتول وهي غير متحركة ، وتختلف الصفات الأيضية حسب المنشأ والنوع والجنس.

يظل هذا مثيرًا للاهتمام إذا سعى المرء إلى فحص بنك السلالات لدراسات الكائنات الحية المجهرية ، على سبيل المثال ، أو لعزل سلالات جديدة ذات وظائف تكنولوجية يحتمل أن تكون قابلة للتطبيق في صناعة الأغذية ، على الرغم من بساطة هذه الأساليب إذا كانت مرتبطة بالبيولوجيا الجزيئية.

الكلمات الرئيسية: بكتيريا اللاكتيك ، الاختبارات الكيميائية الحيوية

LISTE D'ABREVIATIONS

BL	:	bactérie lactique
PTS	:	système phosphotransferase phosphoénolpyruvate dépendant
EMP	:	Embden-Meyerhof-Parnas
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ATP	:	Adénosine triphosphate
G+C	:	Guanine et Cytosine
C°	:	Degré Celsius
T°	:	Température
Lb	:	<i>Lactobacilles</i>
MRS	:	Milieu de Man Rogosa et Sharpe
Ph	:	Potentiel hydrogène
St	:	<i>Streptocoques</i>
ODC	:	l'ornithine-décarboxylase
ONPG	:	l'O-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside
RM	:	rouge de méthyle
VP	:	Voges-Proskauer

LISTE DES FIGURES

Figure01	: Arbre phylogénétique schématique non raciné des bactéries lactiques, y compris certains gram positifs aéro-anaérobies facultative de la subdivision à faible G+C.	06
Figure02	: <i>Bifidobacterium sp.</i>	10
Figure03	: Voies homo fermentaire, hétéro fermentaire et bifide de la dégradation du glucose	12
Figure04	: Production d'acide lactique par lactobacillus	13
Figure05	: principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (Drider, 2009)	14
Figure06	: Principales voies de la lipolyse .	16
Figure 07	: système protéolytique Chez la bactérie lactique	17
Figure08	: Évolution de la structure de la caséine au cours de la coagulation acide à 30 °C	17
Figure09	: Aspect circulaire de couleur blanche des colonies lactobacilles sur milieu MRS agar après incubation 30 °C pendant 48 h.	27
Figure10	: Aspect microscopique des souches (53, TF-04, 110) au grossissement x 100.	27
Figure11	: Résultats de test gélatinase.	28
Figure12	: Aspect d'activité enzymatique positive de caséine chez les souches (TF-04, TF-17, 12-a, KL14).	29
Figure13	: Aspect d'activité enzymatique négative de caséine chez les souches (91,110, 64).	30
Figure14	: Test de ODC des isolats sur milieu moeller à l'ornithine (a), Témoin (b).	31
Figure15	: résultats test d'indole des isolats.	31
Figure16	: Aspect de résultats de lécithinase. Chez les souches (110, TF-17, DC-01A).	31
Figure17	: Aspect de résultats de test lipase chez dix souches	32
Figure18	: résultats de test de ONPG (A) et (B).	33
Figure19	: résultats test citrate de Simmons	34
Figure20	: Résultats de TSI	34
Figure21	: résultats de test mannitol	35
Figure22	: Aspect de résultats de test Clark and lubs (c) contient vp1 et vp 2 (d) contient rouge de méthyle	35
Figure23	: Résultat test de nitrate des isolats	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques.	04
Tableau 2	: Bactéries lactiques caractéristiques des principaux genres bactéries lactiques.	07
Tableau 3	: Le soucier de l'étude	09
Tableau 4	: Critère morphologique, le Gram et le test catalase des souches présumés bactérie lactique.	28
Tableau 5	: Résultats de test caséinase.	30
Tableau 6	: Résultats de recherche des enzymes chez dix souches.	34
Tableau 7	: Récapitulatif des trois tests citrate TSI et mannitol.	35
Tableau 8	: Les résultats de trois tests (, nitrate, Clark & lubs).	37

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettent de fabriquer et de conserver un nombre très important d'aliments, ces bactéries sont déjà reconnues par la production des acides organiques qui abaissent le **pH** des aliments ce qui empêche la prolifération des germes nuisibles. La production du **CO₂** par les bactéries lactiques réduit le potentiel d'oxydoréduction et inhibe les germes aérobies tels que les moisissures **(Desmareaud., 1992)**.

Les techniques de biologie moléculaires ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente de treize genres : Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella, Aerococcus, Bifidobacterium **(Carine et al., 2009)**.

En agroalimentaire, les bactéries lactiques sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et les qualités des produits alimentaires fermentés (lait fermenté, beurre, olive, choucroute, différents types de fromage, dans certains cas de charcuterie et dans l'ensilage) **(Ganzele et al., 2000 ; Delgado et al., 2001)**.

Ces bactéries sont utilisées en particulier dans l'industrie agroalimentaire car elles jouent un rôle très important dans plusieurs processus tel que le traitement des matières premières, dans la fabrication des additifs alimentaires, et dans d'autres procédés comme la production de vinaigres **(Singleton, 2005)**.

L'objectif visé par cette étude est : caractériser les activités biochimiques de 10 souches en culture pure.

PARTIE I

<BIBLIOGRAPHIE

1. CHAPITRE I : GENERALITES

1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, Gram positifs, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, jamais sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles (**Tailliez, 2001**). Les bactéries lactiques encore appelées bactéries de l'acide lactique sont caractérisées par leur aptitude à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique.

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes anaérobies qui tolèrent l'oxygène dans une certaine mesure. L'oxygène affecte leur métabolisme mais aussi leur croissance, leur survie et l'intégrité de leur ADN. Les bactéries lactiques possèdent deux types d'oxydases à NADH, ces enzymes catalysent la réduction de O_2 en H_2O_2 ou de O_2 en H_2O (**Ammor et al., 2006**).

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes pour des acides aminés, les peptides, les sels, les vitamines, les acides gras, les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994**). Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux milieux naturels, allant du sol, des plantes en décomposition, aux animaux. Chez ces derniers, on les trouve dans les cavités buccales et vaginales, les fèces et le lait. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella*.

Elles ont été utilisées par l'homme depuis le néolithique pour fabriquer des aliments fermentés. Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le substrat et par là d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des modifications organoleptiques. La fermentation améliore la conservation et modifie la saveur des aliments. On trouve des bactéries lactiques dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain (tableau1) (**spinnler, 1998**).

Tableau 1 : principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Spinnler., 1998).

Famille	Genre	Substrat	Exemples
<i>Lactobacillaceae</i>	<u><i>Lactobacillus</i></u>	Lait	laits fermentés, yaourts, kéfirs, la plupart des fromages
		Viande	saucissons secs, jambons secs
		Poissons	nuoc mam
		Végétaux	choucroute, olives, « yaourts » au lait de soja
	<u><i>Pediococcus</i></u>	Céréales	pain au levain, bières
		Végétaux	choucroute, ensilage
		Viande	saucisses semi-séchées, saucissons secs
		Poissons	nuoc mam
<i>Streptococcaceae</i>	<u><i>Lactococcus</i></u>	Lait	fromages blancs, à pâte molle ou pressée non cuite, kéfirs
	<u><i>Streptococcus</i></u>	Lait	yaourts, laits fermentés, fromages à pâte pressée cuite
	<i>Enterococcaceae</i>	<u><i>Tetragenococcus</i></u>	Végétaux
Poissons			saumure d'anchois, sauce de poisson,
<i>Leuconostocaceae</i>	<u><i>Leuconostoc</i></u>	Végétaux	choucroute, olives, vin, cidre
		Lait	fromages, kéfirs
	<u><i>Oenococcus</i></u>	Végétaux	Vin
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<u><i>Bifidobacterium</i></u>	Lait	laits fermentés

1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Très ubiquistes, les bactéries lactiques colonisent de nombreux habitats. Toutefois, il semble que chaque espèce ou groupe d'espèces ait un métabolisme bien adapté à son environnement. Les bactéries lactiques se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples (**leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001 ; Mechai, 2009**). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, dans un

écosystème comme le tractus gastro –intestinal ou génital des mammifères (**Makhloufi, 2011**). Par exemple, dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, . . .). Elles peuvent aussi vivre en symbiose entre elles et avec un hôte dans la bouche, les régions gastro – intestinales et urogénitales des humains et des animaux (**Lopez — Diaz et al, 2000 ; et Mathara et al., 2004**).

Le tractus gastro- intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *bifidobacterium*, *lactobacillus*, *leuconostoc* et *weisseilla*. L'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *trichomonas vaginalis*, pathogène responsable de la *Trichomonase* vaginale (**Bjorkroth et Holzapfel, 2006 ; Ruiz et al, 2009**) et *Candida albicans* à l'origine de la vulvo –vaginite (**Makhloufi, 2012**). Les bactéries lactiques peuvent aussi être associées aux plantes (fruits, légumes et céréales) (**Konig et Frohlich, 2009**).

1.3. Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont parfois classifiées en fonction de leur température optimale de croissance : 20 à 30 °C pour les mésophiles, 40 à 45 °C pour les thermophiles. Ces deux grandes familles de bactéries n'ont pas également les mêmes métabolismes azotés : on considère que les mésophiles ne sont protéolytiques qu'après leur lyse, alors que les thermophiles sont protéolytiques durant leur croissance. (**Joubert, 2016**)

La classification peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires (figure 01). Cependant, la caractérisation phénotypique/biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les carbohydrates, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme et al, 1996**).

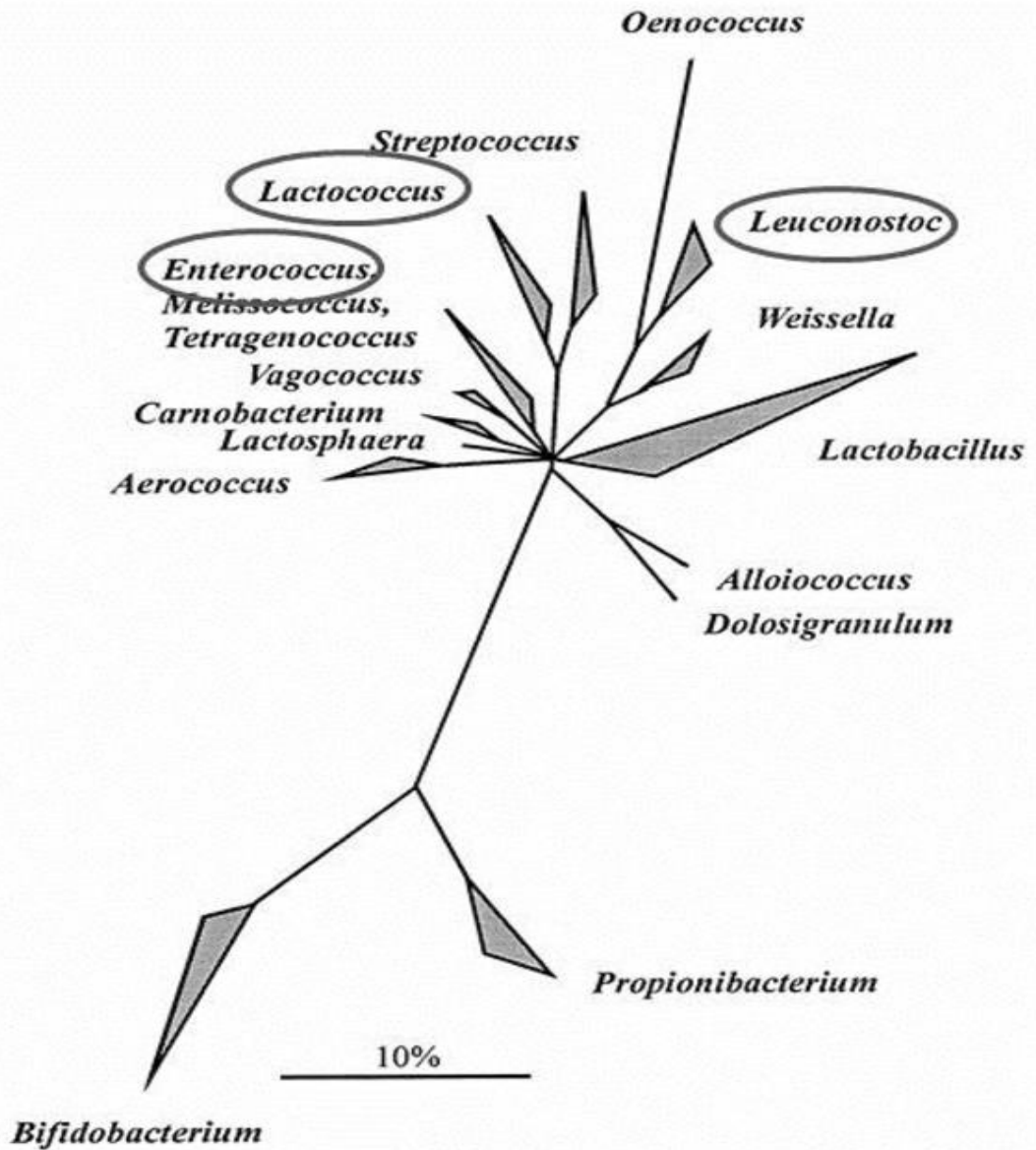


Figure 01 : arbre phylogénétique consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences du gène ARNr 16 S montrant que la majorité de groupe phylogénétique des bactéries lactiques à faible pourcentage molaire dans leurs ADN en guanine et cytosine (mole % G+C) et les genres de Gram positive non reliés *bifidobacterium* et *propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

La classification des bactéries lactiques suggère la subdivision de groupe lactique en plusieurs genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (Axelsson, 1998), La différenciation entre ces genres est basée sur des critères physiologiques, biochimiques et morphologiques regroupés dans (tableau 02).

Tableau 02 : bactéries lactiques caractéristiques des principaux genres bactéries lactiques (Von Wright et Axelson, 2012).

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragonococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C		C		C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-		-		+	-	+	-
Croissance à 10 °C	+	+/-	+	+	+		+/-		+/-	+	-	+
Croissance à 45 °C	-	+/-	-	+	-		-		+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	Nd	+/-	-	+	+/-		+/-		+	+	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-		-		-	-	+	-
Croissance à 6,5 % Na Cl	Nd	+/-	+	+	-		+/-		+	-	+	+/-
Croissance à 18 % Na Cl	-	-	-	-	-		-		-	-	+	-
Production de CO₂	-	+/-	-	-	-		+			-	-	
Production d'acide lactique	L	l/DL	L	L	L		D		/DL	L	L	+/-

1.4 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

1.4.1 Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, a sporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40 °C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990**).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par ORLA — JENSEN en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**GUIRAUD et ROSEC, 2004**) :

- **Groupe 1 « *Thermobacterium* »** : comprend les lactobacilles homo fermentaires thermophiles qui se développent à 45 °C mais pas à 15 °C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb helveticus*, *Lb delbrueckii*, *Lb acidophilus*.

- **Groupe 2 « *Streptobacterium* »** : regroupe les lactobacilles homo fermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétéro fermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb casei*, *Lb curvatus*, *Lb sake* et *Lb plantarum*.
- **Groupe 3 « *Betabacterium* »** : ce sont des lactobacilles hétéro fermentaires. Il comporte espèces *Lb fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb sanfransisco*.

1.4.2. Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homo fermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+), seul *Lactococcus lactis ssp. lactis bivar, di acétyle* produit le di acétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30 °C, capable à ce de développer à 10 °C mais pas à 45 °C. Quelques espèces produisent des exo polysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables à se développer à 3 % de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**).

Elles se développent généralement à 4 % de Na Cl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (**ZHANG et al, 2017**).

1.4. 3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours vaste et sa classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plupart des espèces sont pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius* et *St. bovis*) et les autres streptocoques qui sont rencontrés dans les aliments tel que l'espèce *Streptococcus thermophilus* qui se différencie par son habitat (produit laitiers) et son caractère non pathogène. Ces genres partagent les caractères suivants : anaérobies facultatifs, chimio -organotrophes, homo fermentaire, catalase négative, leur température de croissance est située entre 25 et 45 °C. (**PILET et al., 2005**).

1.4. 4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobile, homo fermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10 °C et 45 °C. (**ZHANG et al ,2014**).

1.4.5 Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétéro fermentaire marqué, avec production de l'acide lactique.

Le genre *Leuconostoc* inclus des coccobacilles hétéro fermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniac à partir de l'arginine. En général, les *Leuconostocs* sont utiles dans différents types de fromages. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln. mesenteroides* et *ssp. cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (blé, olive, choucroute... etc). **(GUIRAUD ,2003).**

1.4.6. Le genre *Pediococcus*

Les *pediococcus* sont des coques homo fermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus* ; renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18 % de Na cl **(Pilet et al, 2005).**

Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries **(Tosukhowong et al., 2005).**

1.4.7. Le genre *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C supérieur à 50 % et affecté au phylum des *Actinobacteria*. **(Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy et al., 2005).**

les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal **(Klein et al., 1998).**

Elles ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6,5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37 °C et 41 °C. Elles ont la forme irrégulière d'un « V » ou une morphologie bifide en forme d'Y (figure 02). Elles sont hétéro fermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique **(Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy et al., 2005).**

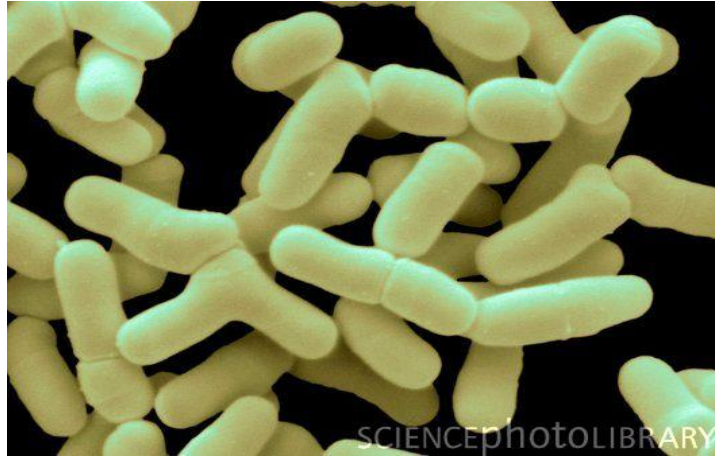


Figure 02 : *Bifidobacterium sp.* (Wallace *et al.*, 2003).

1.4.8. Le genre *Vagococcus*

le genre *Vagococcus*, phylogénétique ment proche des genres *Enterococcus* et *Carnobacterium*. Initialement, le genre *Vagococcus* comprenait une seule espèce, *Vagococcus fluvialis*. Ultérieurement, cinq nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre sur la base d'études phylogénétiques et/ou des hybridations ADN/ADN : *Vagococcus carniphilus*, *Vagococcus elongatus*, *Vagococcus fessus*, *Vagococcus lutrae* et *Vagococcus salmoninarum* (Aguirre et Collins, 1993).

Les souches mobiles de *Vagococcus ssp* se différencient des entérocoques mobiles (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus gallinarum*) par leur incapacité à acidifier le L-arabinose et le raffinose. Les espèces de ce genre récemment décrites se confondent facilement avec les lactocoques et se distinguent principalement par leur composition en acides gras et leur mobilité (Collins *et al.*, 1993).

2. CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES DES BACTERIES LACTIQUES

2.1 Métabolismes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent des micro-organismes appartenant à plusieurs genres ayant la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Les sucres peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols ou des pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). La capacité à métaboliser les sucres est fonction des souches considérées (**Axelsson, 2004**).

2.1.1 Fermentation des glucides

Les bactéries lactiques étant incapables d'obtenir leur énergie par la respiration, elles pour être métabolisés, les sucres du milieu extérieur doivent d'abord franchir la membrane cellulaire. Il existe deux systèmes de transport actif des sucres :

1. Un système qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade) nommé le « système phospho — transférase phospho énoypyruvate dépendant » PTS. L'entrée d'un sucre est couplée à celle d'un proton. Le sucre est ensuite phosphorylé dans la cellule par des kinases.
2. Un système qui fait pénétrer les glucides sous forme libre dite système « **perméase** énergie dépendante ». C'est un système de translocation de groupe qui phosphoryle le substrat tout en lui faisant traverser la membrane.

les sucres sont ensuite catabolisés suivant une des trois voies différentes (figure 03).

2.1.1.1. La voie homo fermentaire :

Transforment tout le glucose en excès en acide lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffèrent selon les espèces. Elles utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse, convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du NAD^+ à partir du NADH formé auparavant. Dans cette dernière étape, les bactéries font intervenir une lactate-déshydrogénase (**Bekhouche, 2006**).

2.1.1.2. La voie hétéro fermentaire :

Ce groupe de LB utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6 — phosphogluconate) qui consiste à phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate qui suit la voie de la glycolyse une déshydrogénation du glucose, après ça donnant l'acide lactique et l'acétyle phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de

la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétéro lactique (Djellouli, 2018).

2.1.1.3. La voie fermentaire bifide :

Ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase FPC 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.

Les hexoses autres que le glucose (mannose, galactose, fructose) rejoint en général les voies précédentes après différentes étapes d'isomérisations et de phosphorylation en glucose-6-P et fructose-6-P. Le lactose entre dans la cellule par le système PTS, puis est phosphorylé en lactose-6-phosphate et hydrolysé à l'intérieur de la cellule en glucose et galactose-6-phosphate. Il rejoint finalement la glycolyse au niveau des trioses-phosphate. Les pentoses consommés (ribose, arabinose, xylose) sont convertis en xylulose-5-phosphate par des réactions de phosphorylation et d'isomérisation ou d'épimérisation. Les bifidobactéries sont le seul groupe qui utilise la voie « Bifidus » (Djellouli, 2018)

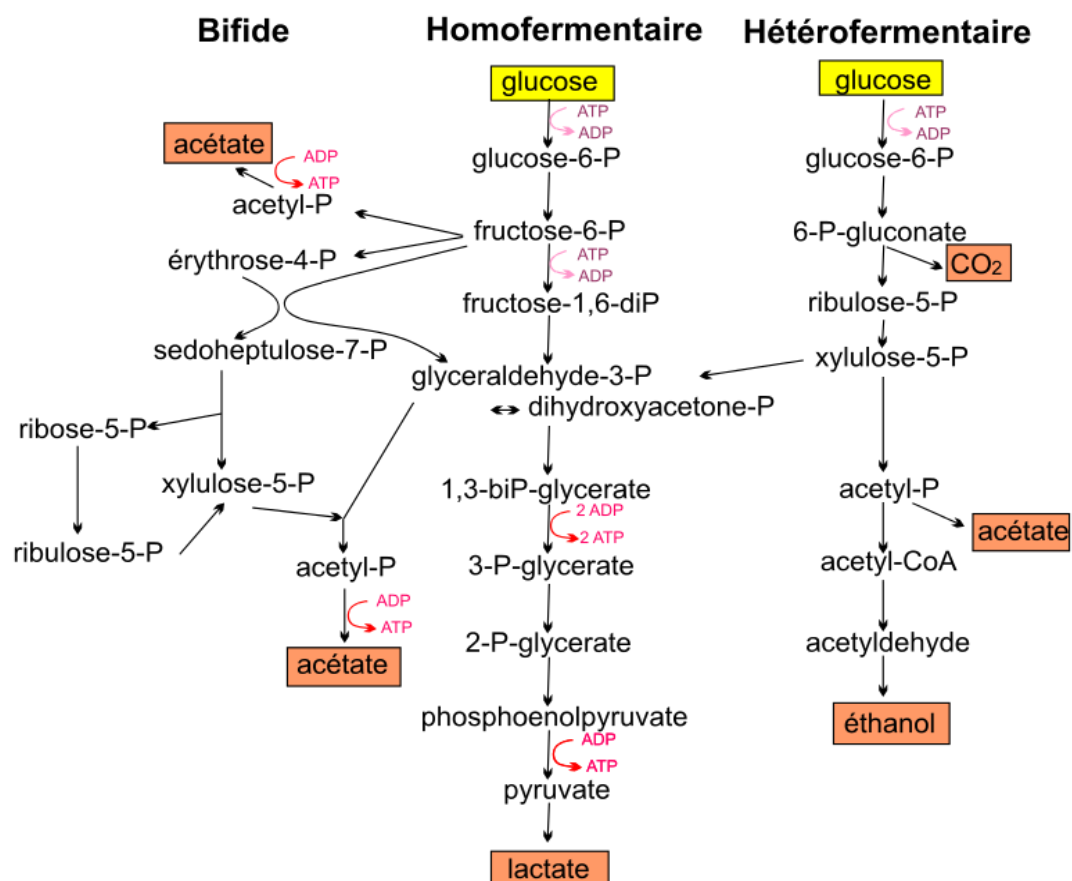


Figure 03 : Voies homo fermentaire, hétéro fermentaire et bifide de la dégradation du glucose (Drider, 2009).

2.1.1.4. Métabolisme du lactose

Les voies du catabolisme du lactose dépendent de la forme sous laquelle il se trouve dans la cellule : phosphorylée ou non. le lactose-6-P est hydrolysé en glucose et en galactose-6-P par la phospho-β galactosidase (Konings *et al.*, 1994) alors que le lactose est hydrolysé en glucose et en galactose par une autre β galactosidase dont l'activité est plus faible (Desmazeaud et De Roissart, 1994). Les produits formés à travers l'action de ces deux enzymes sont dégradés via différentes voies. Ainsi, le glucose est dégradé dans la voie glycolytique d'Emden Meyerhoff-Parnas (EMP) (Thompson et Gentry-Weeks, 1994), le galactose-6-phosphate emprunte la voie du D-tagatose-6-phosphate qui rejoint la voie d'EMP au niveau du glyceraldéhyde-3-phosphate, à la suite de l'action de trois enzymes (Figure 08) et le galactose est métabolisé suivant la voie de Leloir (Crow et Thomas, 1984 ; Grossiord *et al.*, 1998 ; Grossiord *et al.*, 2003) avant de rejoindre la voie d'EMP au niveau du glucose-6-P. Le produit final principal de la fermentation du lactose est l'acide lactique.

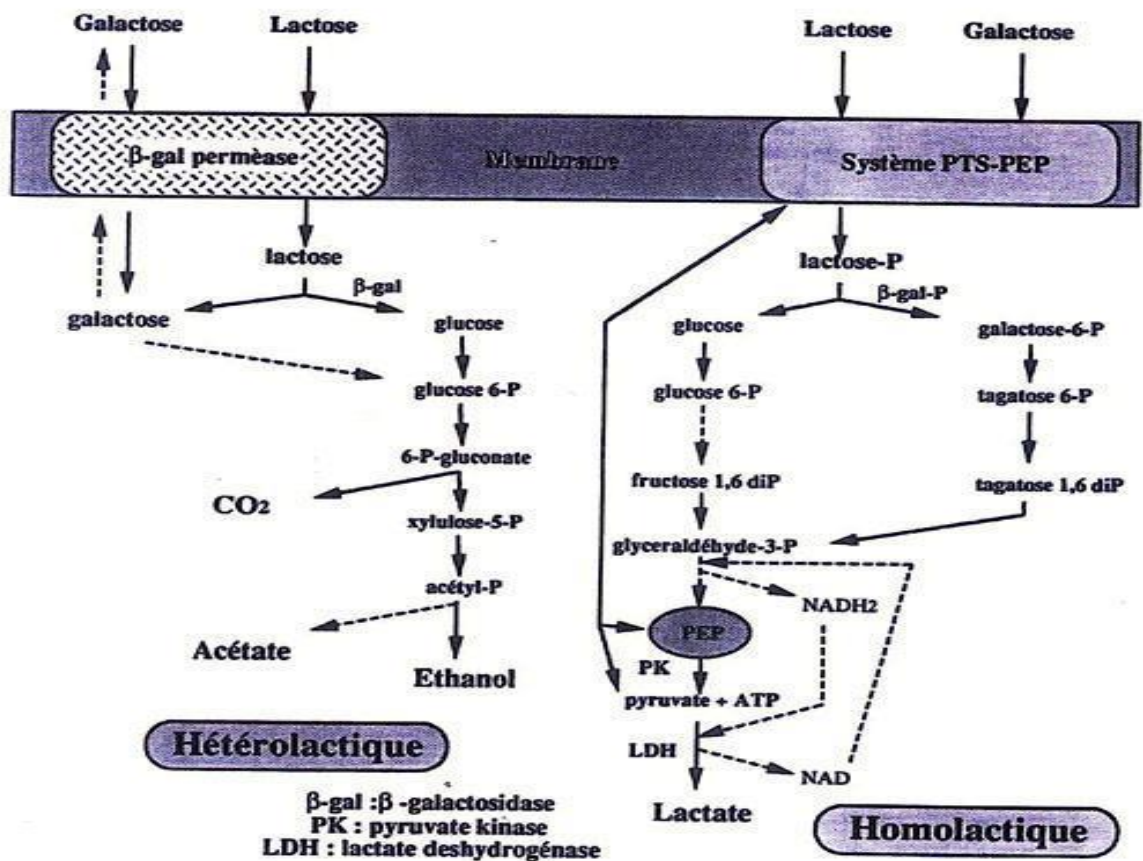


Figure 04 : production d'acide lactique par lactobacillus (ROIS SART, 1986).

2.1.2 Métabolisme du citrate et d'autres substrats carbonés

Les bactéries lactiques, en plus de leur pouvoir fondamental d'acidification et d'assainissement, sont aussi utilisées pour leur capacité à produire des composés aromatisants. Les milieux naturels des

bactéries lactiques renferment souvent de l'acide citrique, mais aussi, pour certains végétaux, de l'acide malique, tartrique ou du glycérol. L'acide citrique peut être utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* pour la production d'arôme.

Dans les produits laitiers fermentés, le co-métabolisme, sucre fermentescible/acide citrique est considéré comme le principal précurseur de l'arôme du beurre (le di acétyle). En œnologie, on attribue aussi la formation d'acétate, d'acétone et de di acétyle au catabolisme de l'acide citrique (**De Roissart et Luquet, 1994**). Par ailleurs, le pyruvate peut aussi être hydrolysé par le pyruvate formiate lyase en acétate et formiate *Bifidobacterium*. *Pediococcus halophilus* produit uniquement de l'acide formique et de l'acide acétique à partir du pyruvate. L'acide citrique est aussi métabolisé par cette voie par *Lactobacillus brevis*, *Lb casei* et *Lb plantarum*. Un petit nombre de bactéries lactiques fermentent le glycérol. C'est le cas de *Pediococcus halophilus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lb helveticus* ou *Lb reuteri*. Ce dernier dégrade le glycérol en formant des quantités égales de tri méthylène glycol et d'acide B — hydroxypropionique. Ce schéma métabolique, présente les principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (figure 04).

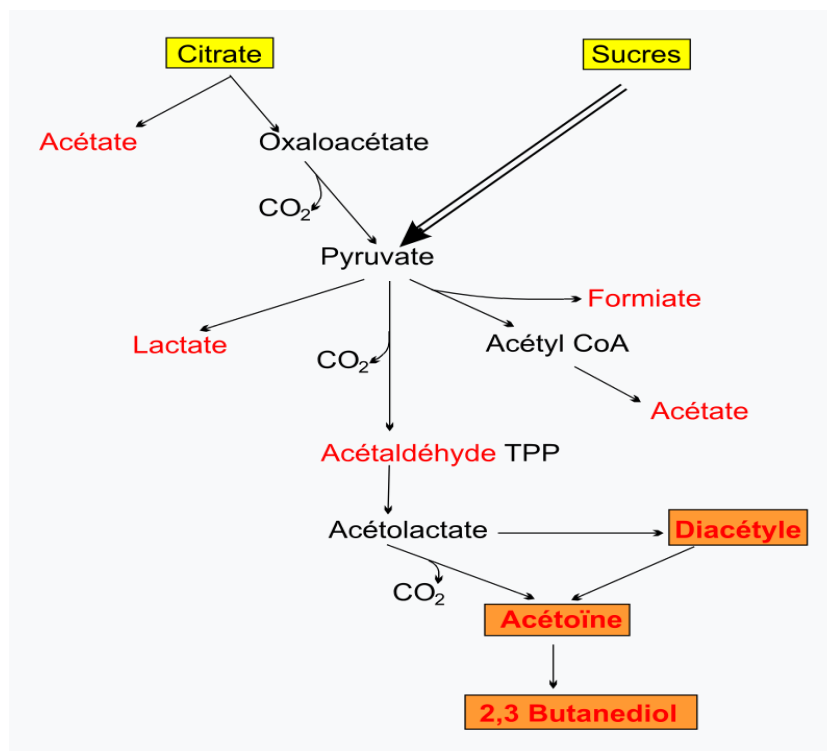


Figure 05 : principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (Drider, 2009).

2.1.3. Métabolisme de l'oxygène

L'oxygène est à l'origine de deux effets antagonistes : un effet positif, qui résulte de la présence d'un accepteur d'électrons supplémentaire qui va contribuer au métabolisme cellulaire (**Condon, 1987** ;

Duwat et al., 2001). Un effet négatif, qui résulte de la formation ou de l'activation par l'oxygène d'espèces toxiques (**Condon, 1987**).

2.1.3.1. Effet positif du métabolisme de l'oxygène

Chez la bactérie lactique, la NADH : H₂O₂ oxydase (**Anders et al., 1970**) et la NADH : H₂O oxydase (**Bruhn et Collins, 1970**), sont présentes et entrent en compétition avec d'autres enzymes du métabolisme carboné, telle la LDH, pour les molécules de NADH. Par conséquent, la production d'acide lactique est réduite et le flux de pyruvate est redirigé vers une fermentation acide mixte sous l'action de la PDH et comme la PFL est inhibée par la présence d'oxygène (**Melchiorsen et al., 2000**) ; la voie des C₄ est alors préférentiellement empruntée par le pyruvate, ce qui permet d'améliorer la production en di acétyle (**Bassit et al., 1994 ; Boumerdassi et al., 1996 ; Boumerdassi et al., 1997a ; Nordkvist et al., 2003**).

Par ailleurs, comme l'oxygène favorise la décarboxylation oxydative de l' α acétolactate, il est possible d'accroître la production de diacétyle par un facteur de 5 à 15 par la simple aération du milieu de culture (**Serebrennikov et al., 1998**). Néanmoins, l'aération n'augmente pas systématiquement la production de di acétyle. En effet, des souches mutantes de *Lactobacillus* productrices d' α acétolactate n'ont pas produit plus de di acétyle par aération du milieu (**Monnet et Corrieu, 1998**).

2.1.3.2. Effet négatif du métabolisme de l'oxygène

Le métabolisme de l'oxygène conduit à la formation de composés toxiques comme l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène responsables de la toxicité cellulaire (**Storz et Imlay, 1999 ; Miyoshi et al., 2003**). Leur accumulation peut induire une inhibition de la croissance et la production d'acide (**Condon, 1987**). Néanmoins, si le système enzymatique cellulaire fonctionne correctement, des voies de détoxification sont disponibles au travers de la catalyse par les enzymes super oxyde dismutase et NADH peroxydase (**Britton et al., 1978**).

2.2. Lipolyse

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la saveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de métylacétones, alcools, lactones et esters (**McSweeney et Sousa, 2000**). La Figure 06 présente les principales voies de la lipolyse.

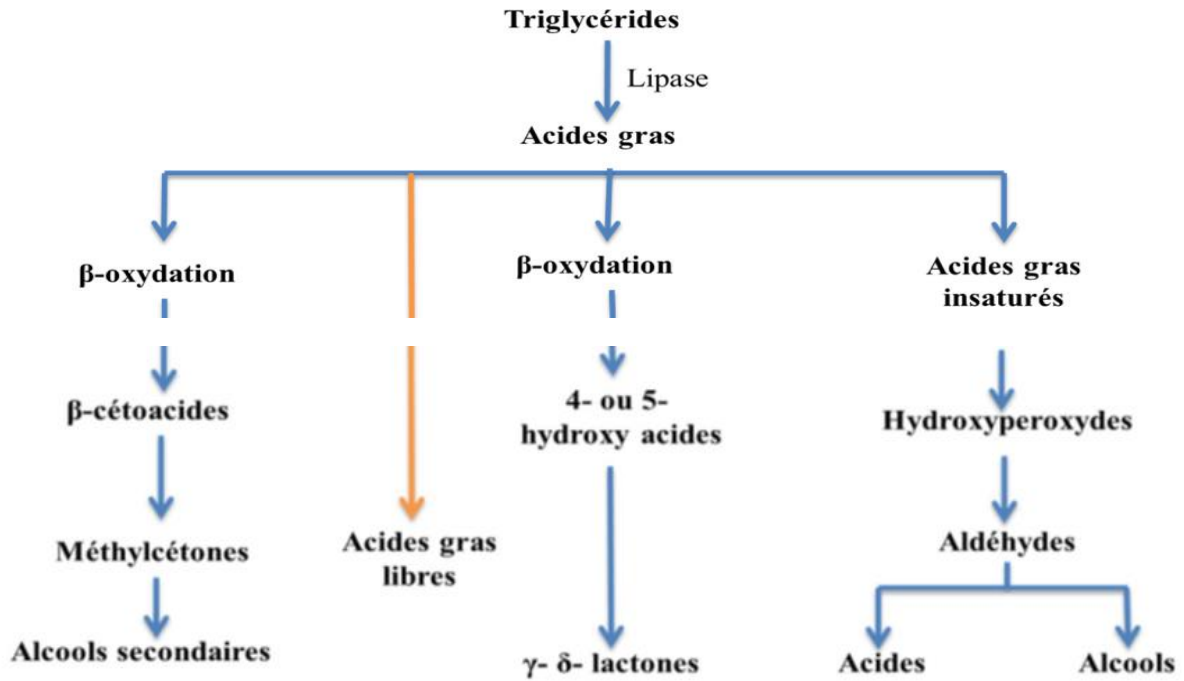


Figure 06 : principales voies de la lipolyse (SIEGUMFELDT *et al.*, 2000).

Tel que rapporté par **Talon et Montel (1994)**, les estérases et lipases microbiennes sont des enzymes intracellulaires dont les activités sont maximales pendant la phase exponentielle de croissance et dépendent des milieux de culture. Il a été observé que les milieux à base de lait stimulaient la production de ces enzymes chez les lactocoques et que l'addition de glutathion augmentait l'activité estérasique des sous espèces *lactis* et *cremoris*. Cette dernière démontrait une plus grande activité estérasique que la sous espèce *lactis*.

2. 3. Protéolyse

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse initiale des protéines en peptides. Ces peptides sont ensuite dégradés par des endo peptidases ou exopeptidases en acides aminés et oligopeptides facilement transférables à travers les parois cellulaires. (**Belkheir, 2016**). Figure 07 représente système protéolytique chez la bactérie lactique.

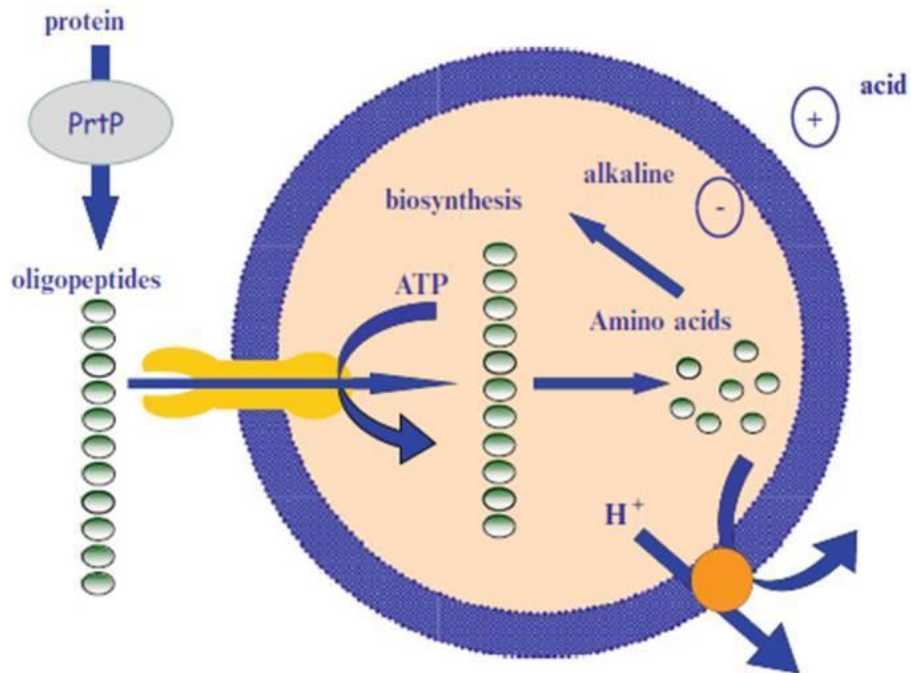


Figure 07 : système protéolytique Chez la bactérie lactique (KUNJI *et al.*, 1996).

Dans le lait, la dénaturation des caséines laitières conduit à leur précipitation en petits flocons puis en caillé conduisant à la coagulation du lait (figure 08). La protéolyse dans les produits alimentaires est assurée surtout par les enzymes microbiennes des starters initiaux mésophiles (*Lactococcus lactis* et *Leuconostoc*) ou thermophiles (*Lb delbrueckii*, *Lb helveticus* et *Streptococcus thermophilus*). Cependant la grande partie de l'activité protéolytique est le résultat des enzymes tardives libérées dans les fromages par la flore additive homo fermentaire stricte (*Lb farciminis*), hétéro fermentaire facultative (*Lb casei*, *Lb paracasei*, *Lb plantarum*, *Lb pentosus*, *Lb curvatus* et *Lb rhamnosus*) ou hétéro fermentaire stricte (*Lb fermentum*, *Lb buchneri*, *Lb parabuchneri* et *Lb brevis*) (Belkheir, 2016).

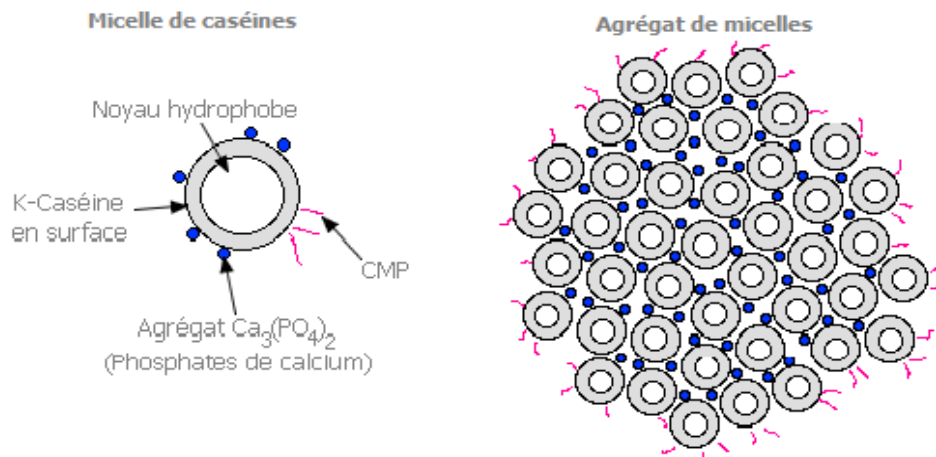


Figure 08 : Évolution de la structure de la caséine au cours de la coagulation acide à 30 °C (Belkheir, 2016).

PARTIE II

EXPERIMENTALE

3. MATERIEL ET METHODE

3.1.L'objectif

Notre travail consiste à étudier l'activité biochimique chez des souches lactiques isolées à partir d'environnement varier, à savoir produits de terroir.

3.2.Matériels utilisés

3.2.1. Origine des souches

Nous avons sélectionné 10 souches de bactéries lactiques qui sont de type bacille à partir d'une banque de souche(laboratoire de biochimie 1), listées dans le tableau suivant :

Tableau 03 : le soucier de l'étude

SOUCHE	ORIGINE
12a	
53	
64	Blé fermenté de la région de Tiaret
91	
110	
DC 01-A	Beurre de lait de chèvre
DC 04	
TF-4	Thé vert commercial fermenté
TF17	
KL-14	Fromage type klila, région de Naama

3.2.2. Les milieux de culture pour l'isolement et purification

Les différents milieux de culture utilisés dans l'étude pour la propagation et la conservation des souches sont :

- Milieu MRS (**Man, Rogosa et Sharpe**) avec un **pH=6.4 + 0.1** : utilisé pour la réactivation et entretien des Lactobacilles (**De Man et al., 1960**).
- Milieu MRS Agar : utilisé pour favoriser la culture des bactéries lactiques du Genre Lactobacilles (**De Man et al., 1960**) La composition de milieu MRS est donnée dans l'annexe.

3.3.Repiquage des souches

Les souches ont été réactivées et maintenues vivantes par un repiquage successif sur milieu MRS, à partir des tubes inclinés conservé à 4 °C. on prélève des colonies à l'aide d'une anse de platine, ensuite on l'ensemence dans un tube contenant 5 ml MRS liquide , incubé ensuite à 37 °C pendant 24 à 48 H.

Après la croissance des bactéries qui se manifeste par l'apparition d'un trouble dans le milieu MRS, un prélèvement a été réalisé à l'aide d'une anse de platine afin d'effectuer un ensemencement par stries sur boîte de Pétri contenant de la gélose MRS a été effectué. Les boîtes ainsi obtenues sont ensuite incubées en anaérobioses à 37 °C pendant 24-48H en utilisant une jarre et une bougie afin d'éliminer l'oxygène et de fournir ainsi au cultures un environnement anaérobique .

3.4.Vérification de l'identité des souches

L'orientation de l'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques, phénotypiques et biochimiques (**Lamouliatte et al., 1992**). En effet avant de procéder aux cultures, les souches bactériennes utilisées ont été sujettes à une coloration de Gram et un test de la catalase. Les souches à Gram+/catalase — sont retenues pour l'étude.

3.4.1. Caractérisation macroscopique

Une observation macroscopique sous une loupe binoculaire permet de déterminer l'aspect des colonies obtenues sur milieu MRS solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité, couleur)

3.4.2. Caractérisation microscopique

3.4.2.1.Coloration de Gram

L'observation microscopique avec l'objectif à immersion (**G x 100**) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (amas, chaînette, tétrade) (**Joffin et Leyral, 1996**).

3.4.2.1.1.Préparation du frottis

- La lame est préalablement flambée sur le bec Bunsen afin de la dégraisser
- Déposer une goutte d'eau distillée sur la lame.
- Prélever une colonie isolée à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Diluer et étaler la colonie dans la goutte d'eau et laisser sécher à l'air pour obtenir un frottis.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur

3.4.2.1.2.La coloration

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (ou cristal violet) sur le frottis fixé et laisser agir 1 minute.

- Jeter l'excès de colorant et rincer à l'eau de robinet
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis et laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol et rincer à l'eau de robinet
- Déposer quelques gouttes d'un mélange acétone éthanol (1 : 1) pendant 15 secondes. et rincer à l'eau de robinet
- contre-colorer en recouvrant la lame avec une solution de safranine pendant 1 minute. Rincer abondamment à l'eau
- laisser sécher à l'air avant d'observer au microscope grossissement (G x 100) avec une goutte d'huile à immersion.

3.4.2.2 Test de la catalase

3.4.2.2.1 Principe

La catalase est une enzyme retrouvée chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. En effet, en présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée qui est un composé cellulaire toxique, l'enzyme agit de telle sorte afin d'empêcher l'accumulation de cette eau oxygénée en la décomposant en eau et en oxygène (**DELARRAS, 2007**). La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz selon la réaction suivante :



3.4.2.2.2 Technique

Le teste consiste à déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée dans laquelle sera dissocié une colonie isolée de la souche à étudier.

3.5. Études physiologiques et biochimiques

Les études physiologiques et biochimiques sont divisés en trois :

3.5.1. Étude de recherche d'activité hydrolytique des protéines

3.5.1.1. hydrolyse de caséine

3.5.1.1.1 Principe

Certains micro-organismes ont la capacité de dégrader la protéine de caséine en produisant une exo enzyme protéolytique, appelée protéinase (caséines). L'hydrolyse de la caséine se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des touches (spots) (**Veuillemard, 1986**). Le diamètre des zones observées est mesuré en millimètre (**Franciosi et al., 2009**).

3.5.1.1.2. Techniques

Après l'incubation des boîtes pétri contenant le milieu caséines, et à l'aide d'une micropipette, on prélève 10 µl de chaque souche, mettre cette quantité dans les boîtes pétri (chaque boîte pétri contenant deux gouttes de deux souches différentes), laissez les gouttes sécher et incubez les boîtes à 37 °C pendant 24 h jusqu'à 48 h.

3.5.1.2. hydrolyse de gélatine

3.5.1.2.1 Principe

Ce test est utilisé afin de déterminer la capacité d'un organisme à produire des enzymes protéolytiques extracellulaires (gélatinases), la présence de gélatinase est synonyme d'une liquéfaction, celle — ci est recherchée par des lectures quotidiennes pendant une semaine (**Marchel et al., 1982**).

3.5.1.2.2 Technique

À l'aide d'un fil de platine, on prendre un prélèvement bactérienne et ensemencé le milieu à la gélatine dans la masse par piqûre centrale , Incuber à 37 °C pendant 24 h à 72 h .

3.5.1.3 . Test ODC

3.5.1.3.1.Principe

Principe de ce test est recherche d'enzyme ornithine décarboxylase est une enzyme clé pour la caractérisation des bactéries lactiques (**Guillaume, 2004**).

3.5.1.3.2. Technique

Prélever une colonie et ensemencé dans un tube qui contient 5 ml d'eau physiologique ,Incuber à 37 °C pendant 24 h .

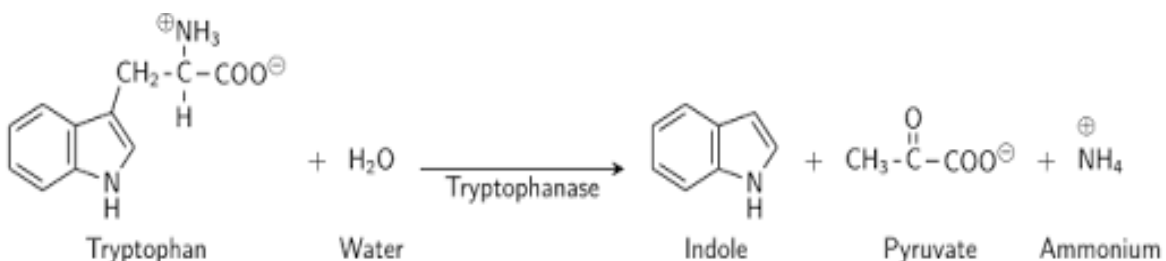
Remplir les tubes de Eppendorf par milieu ODC à l'aide d'une seringue stérile , Puis on ajoute la suspension bactérienne environ 2 gouttes .

Incubation à 37 °C pendant 24 h.

3.5.1.4. Test de l'indole

3.5.1.4.1.Principe

Le **test d'indole** détermine la capacité d'un organisme à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane. Le tryptophane est hydrolysé par la tryptophanase pour produire trois produits possibles : l'indole, pyruvate et l'ion ammonium :



La couche alcoolique se sépare de la couche aqueuse et se colore alors en rouge : le test est indole +, sinon, elle est de couleur jaune (couleur de réactif) : le test est indole . **(Dellaras, 2014)**.

3.5.1.4.2. Technique

À un tube d'eau peptonée ensemencé avec la suspension bactérienne , Après l'incubation du 24 h On ajoute 4 à 5 gouttes de réactifs Kovac .

La réaction indole positive se manifeste par la formation d'un anneau rouge en surface.

3.5.2. Étude de recherche hydrolytique des lipides

3.5.2.1. Test de lipase

3.5.2.1.1. principe

Les micro-organismes qui possèdent l'enzyme lipase hydrolysent les graisses libres présentes dans le milieu pour former du glycérol et des acides gras libres. Par conséquent, la libération d'acides gras libres insolubles entraîne la formation d'un éclat irisé (huile sur eau) visible lorsque la boîte est inclinée par rapport à une source lumineuse. L'activité lipolytique se traduit alors par l'apparition d'un halo autour de la colonie **(Guidraud et Galzy, 1980)**.

3.5.2.1.2. Technique

Après l'incubation des boîtes pétri contenant le milieu lipase, et à l'aide d'une micropipette, on prélève 10 µl de chaque souche, mettre cette quantité dans les boîtes pétries (chaque boîte pétri contenant deux gouttes de deux souches différentes), laissez les gouttes sécher et incubée à 37 °C pendant 24 h jusqu'à 72 h.

3.5.2.2. hydrolyse de lécithine

3.5.2.2.1 Principe

La gélose au jaune d'œuf est un milieu enrichi et différentiel utilisé pour l'isolement et la différenciation présumée de différentes espèces sur la base de leur activité lécithinase. La lécithine est un composant normal du jaune d'œuf.

Ensemencés sur une gélose au jaune d'œuf, les micro-organismes qui possèdent une lécithinase décomposent la lécithine en diglycéride insoluble et en phosphorylcholine, bien qu'il soit expressément pour la mise en évidence de la lécithinase, il permet une appréciation d'une lipase et lipoprotéines **(Marchel et al., 1982)**. La présence d'une lécithinase se traduit par un halo blanc – jaunâtre à bordure nette autour de la colonie

3.5.2.2.2 Technique

à l'aide d'une micropipette, on prélève 10 µl de milieu MRS qui contient les souches, mettre cette quantité dans les boîtes pétri (chaque boîte pétri contenant deux gouttes de deux souches différentes)

Laissez les gouttes sécher et Incubez à 37 °C pendant 24 h jusqu'à 72H .

3.5.3. Étude de recherche hydrolytique des glucides

3.5.3.1. Mannitol Mobilité

3.5.3.1.1 .Principe

Ce test, réalisé sur milieu mannitol mobilité, permet de rechercher la fermentation du mannitol et de vérifier la mobilité du germe. Le mannitol est un produit de réduction du mannose. La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation du fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (**Guillaume., 2004**).

3.5.3.1.2. Technique

Des tubes de milieux gélose mannitol mobilité sont ensemencés par piqûre centrale à partir des souches fraîche et pure de 24 h ,Puis incuber à 37 °C pendant 48 H.

3.5.3.2. Test ONPG

3.5.3.2.1. principe

L'enzyme β - galactosidase (β -gal) catalyse le lactose en glucose et galactose ; le mécanisme de transport du lactose n'a pas été totalement élucidé, un système de force motrice peut-être certaines souches de *Lb lactis* peut métaboliser le galactose en utilisant la voie de **Le loir** (le galactose est phosphorylé au galactose-LP, transformé en glucose-LP, puis au glucose-6-P, puis il entre dans la voie de la glycolyse). Les bactéries lactiques thermophiles produisent protonique ayant été postulé pour *S. Thermophiles* seulement *Lb helvétiques* (et également différents isomères du lactate (**STANLEY, 1998**).

La coloration jaune traduit l'hydrolyse d'ONPG après incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h (**GUIRAUD, 2003**).

3.5.3.2.2. Technique

Prélever une colonie pure puis ensemencé dans un tube qui contient 5 ml d'eau physiologique

Incuber à 37 °C pendant 24 h .

Après l'incubation mettre un disque d'ONPG dans chaque tubes (10 tubes)

Les organismes à forte activité bêta-galactosidase peuvent produire une réaction positive quelques minutes après l'ensemencement du milieu ONPG ; d'autres organismes peuvent prendre jusqu'à 24 heures.

3.5.3.3. Test Clark et Lubs

3.5.3.3.1. Principe

Le milieu Clark et Lubs, qui contient l'acide pyruvique, permet d'étudier les produits de fermentation du glucose ; la différenciation entre la formation d'acide formique et d'acide acétique (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**).

3.5.3.3.2. Technique

Bouillon Clark et Lubs est inoculé par une goutte d'une suspension trouble de bactéries, Après incubation de 24 h à 37 °C, on divise le bouillon dans 2 tubes stériles Chaque tube sert à révéler une des 2 voies :

Voie des Acides mixtes : Addition deux gouttes de rouge de méthyle (test au RM)

Test RM (rouge de méthyle) ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation du glucose en acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé.

Voie Butylène-Glycolique : on ajoute trois gouttes de réactif VP1 et même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6 % dans l'alcool à 95°). On agite soigneusement les tubes et on attend un temps maximum de 10 min.

Une teinte rouge cerise (anneau) indique une réaction VP positive.

3.5.3.4. TSI

3.5.3.4.1. principe

Ce test réalisé sur milieu TSI (Triple Sugar Iron.) permet de mettre en évidence, d'une part la fermentation des 3 sucres : lactose, saccharose et glucose avec ou sans production de gaz et d'autre part, la production d'hydrogène sulfureux (H₂S) (**Marchal et al., 1991**).

3.5.3.4.2. Technique

Prélever une culture fraîche et pure, en utilisant une anse de platine Pointue, ensemencé la pente de la gélose TSI inclinée en stries puis par une piqûre centrale du culot de la gélose TSI.

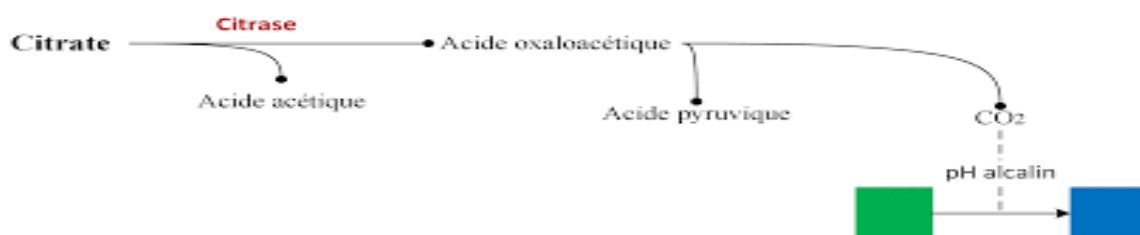
Incubez les tubes dans l'étuve à 37 °C pendant 24 h à 72 h.

Un changement de couleur vers le jaune au niveau de la pente et le culot traduit la fermentation des 3 sucres, le noircissement indique la production d'H₂S. Des fissures dans la gélose ainsi qu'un décollement du culot indiquent la production du gaz CO₂. (**Harley et Prescott, 2002**).

3.5.3.5. Utilisation de citrate

3.5.3.5.1. Principe

La recherche d'enzyme citratase a été mise en évidence par culture sur gélose appelée Citrate de Simmons (Kempner et Mc Kay., 1980), la réaction positive se traduit par le virage au bleu de l'indicateur.



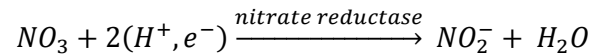
3.5.3.5.2. *Technique*

La pente du milieu est ensemencée sous forme de strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30 °C pendant 24 h à 72 h. En cas de réaction négative, ré incubé encore 24 h.

3.5.3.6. Nitrate réductase

3.5.3.6.1. *Principe*

Ce test permet de mettre en évidence la production d'une enzyme respiratoire (Nitrate réductase), qui réduit le nitrate en nitrite par la bactérie à testé (**GUIRAUD, 2003 ; DELARRAS, 2007**).



La mise en évidence de la réduction des nitrates se base sur la recherche des nitrites formés en fin de réaction en utilisant les réactifs NR1 et NR2.

3.5.3.6.2. *Technique*

Dans un tubes contenant bouillon nitraté ensemencé avec la suspension bactérienne , Après l'incubation de 24 h on ajoute une goutte d'acide sulfanilique suivie d'une autre d'alpha naphtylamine ,Mélanger bien à l'aide de vortex .

L'apparition immédiate de la coloration rouge nous informe sur la réduction de nitrate en nitrite (NR+) Dans le cas contraire, on ajoute un peu de poudre de zinc (réducteur de nitrate) ,Puis on chauffe légèrement sur une flamme.

Laisser agir pendant 5 min

4. RESULTATS

4.1. Examen macroscopique et microscopique

4.1.1. Caractérisation macroscopique

Un total de dix souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS. La caractérisation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides MRS après 48 h d'incubation à 30 ° C et déterminer les critères relatifs aux colonies des bactérie lactique, dont les colonies des lactobacilles en particulier. En effet les colonies observées sont blanchâtres et crémeuses à l'exception de quelques une qui sont gluantes (figure09).

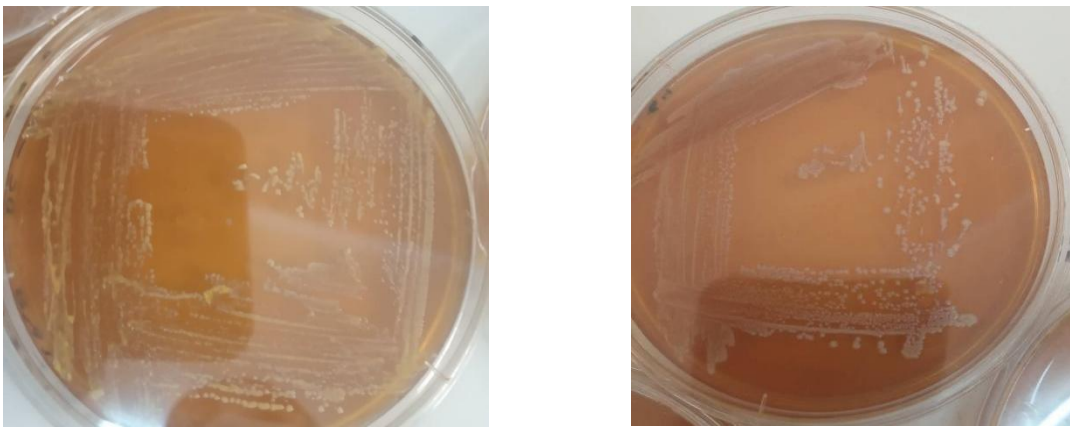


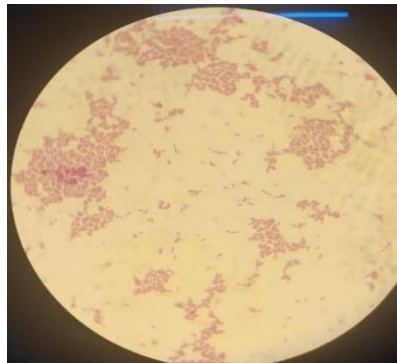
Figure 09 : Aspect circulaire de couleur blanche des colonies lactobacilles sur milieu MRS agar après incubation 30 °C pendant 48 h.

4.1.2. Caractérisation microscopique

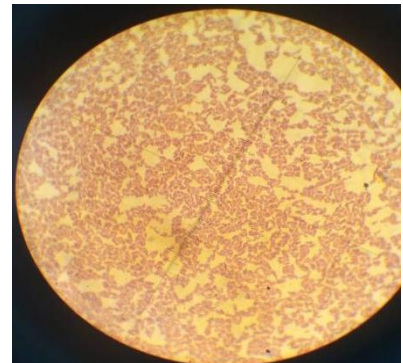
L'observation microscopique a révélé des cellules de forme bacillaire et de différentes tailles. Ces bacilles sont disposés en paire, en grappe ou en chaînettes plus ou moins longues. La coloration de Gram a montré que toutes les souches sont de gram positive (figure 10) et catalase négative . Ces caractéristiques permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques. Les résultats de la caractérisation microscopique sont résumés dans le tableau 4.



53



TF14



110

Figure10 : Aspect microscopique des souches (53, TF-04, 110) au grossissement x 1800.

Tableau 4 : critère morphologique, le Gram et le test catalase des souches présumés bactérie lactique.

Souches	Gram	Catalase	Forme
53	+	-	Bacille
64	+	-	Bacille
91	+	-	Bacille
110	+	-	Bacille
DC-01-A	+	-	Bacille
DC-04	+	-	Bacille
12-a	+	-	Bacille
TF-04	+	-	Bacille
TF-17	+	-	Bacille
KL14	+	-	Bacille

4.2. Études physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches sont présentées dans les tableaux 5 jusqu'à 8 et figures 11 jusqu'à 23 .

4.2.1. Étude de recherche hydrolytique des protéines

4.2.1.1. Hydrolyse de gélatine

Résultats de l'activité de la gélatinase observés sur les dix souches, a révélé la présence d'une liquéfaction au niveau du milieu ce qui se montre que tous les souches sont positive au (présence de la gélatinase) (figure 11).



Figure11 : Résultats de test gélatinase.

4.2.1.2. Hydrolyse de caséine

Les résultats observés de dégradation de lait présent dans le milieu, montrent la présence d'activité enzymatique lié à la caséinase chez les souches : **53, 12-a, TF-04, TF-17, KL-14, DC 01-A, DC -04**. Par contre chez les souches : **64, 91, 110** il n'y a pas eu d'activité enzymatique traduite par une absence halo dans le milieu (figure13). Les résultats de tests sont résumés dans le tableau 5. Il en ressort que les souches qui possède activité enzymatique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des disques (figure12) (**Veuillemard, 1986**) ;

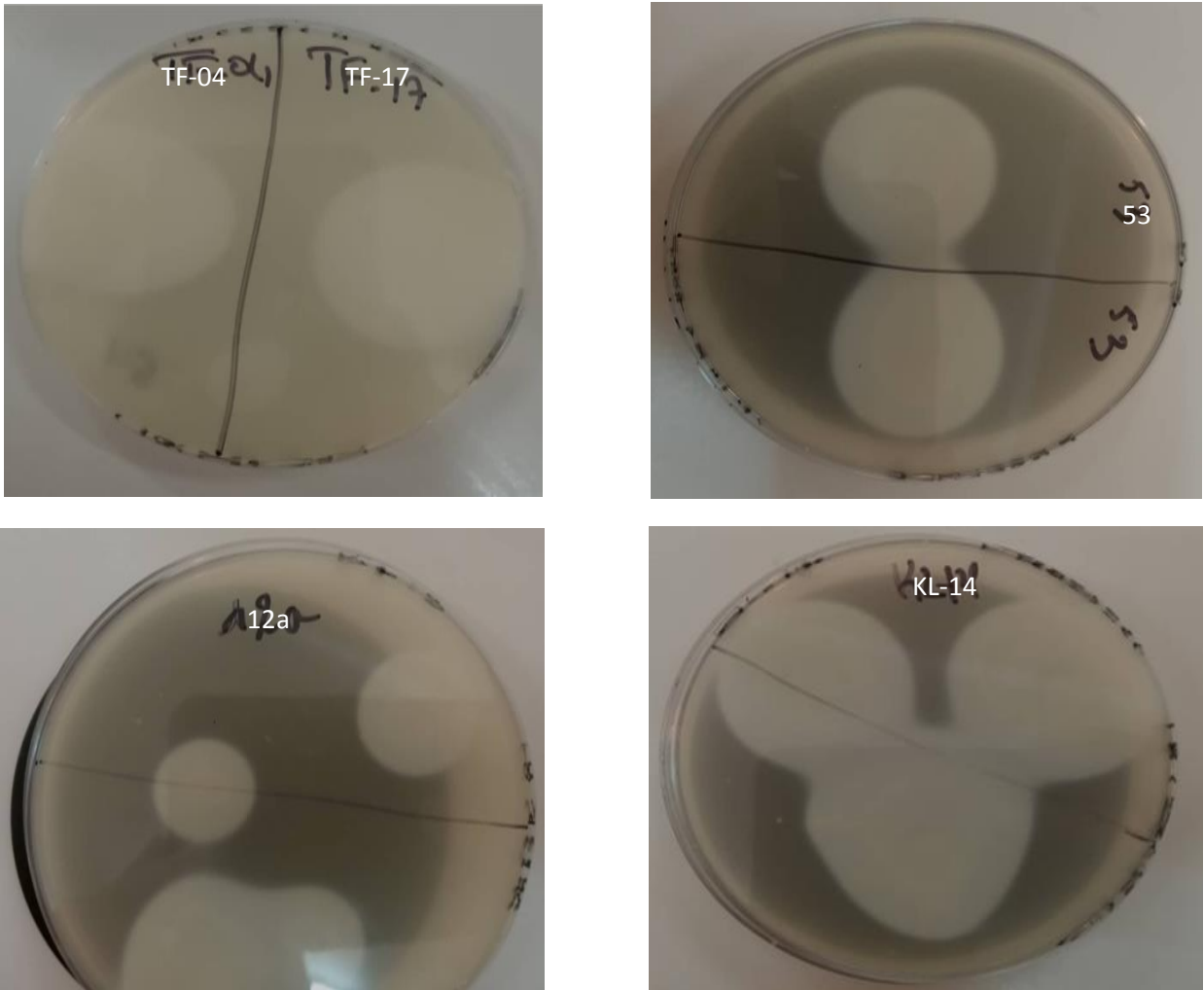


Figure12 : Aspect d'activité enzymatique positive de caséine chez les souches (TF-04, TF-17, 12-a, KL14).

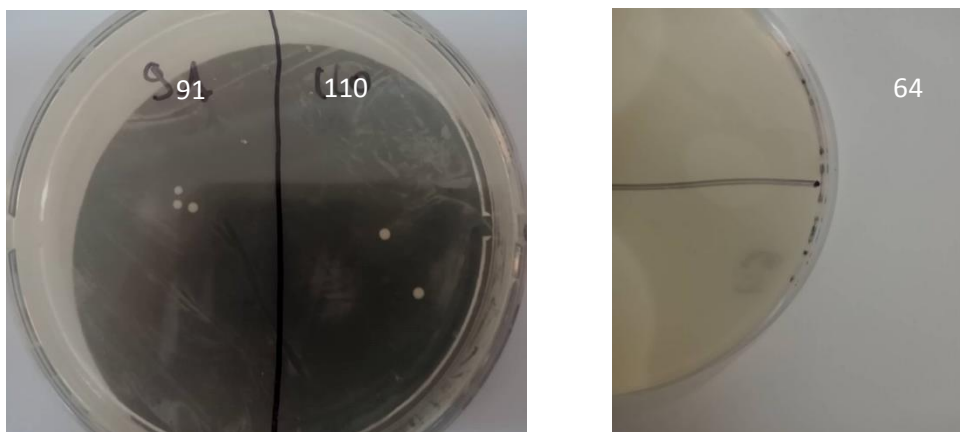


Figure13 : Aspect d'activité enzymatique négative de caséine chez les souches (91,110, 64).

D'après les résultats obtenus l'activité enzymatique chez les souches (**53, 12 a, TF17, KL14, DC 01-A, DC - 04**) est forte avec un diamètre observé entre 16 et 26 mm, par contre chez la souche **TF-04** l'activité est moyenne avec un diamètre de 14,5 mm. Le reste des souches ne montre pas d'activité notable (moins de 10 mm).

Tableau 5 : résultats de hydrolyse de caséine.

Les souches	Caséinase	Diamètre
53	+	16 mm
64	-	10 mm
91	-	10 mm
110	-	10 mm
12a	+	20,4 mm
DC-01-A	+	23 mm
DC-04	+	25 mm
TF-04	+	14,5 mm
TF-17	+	21,7 mm
KL 14	+	26 mm

Résultats négative : — résultats positive : +

4.2.1.3. ODC

Les résultats du test ODC montrent la présence d'activité de l'enzyme l'ornithine-décarboxylase chez les souches : **64 ,91, 110** (figure 14), donc **ODC** positive, alors que le reste des souches : **53,12 — a, DC-O1A, DC-04, TF-04, TF-17, KL14** sont **ODC** négative (figure14).

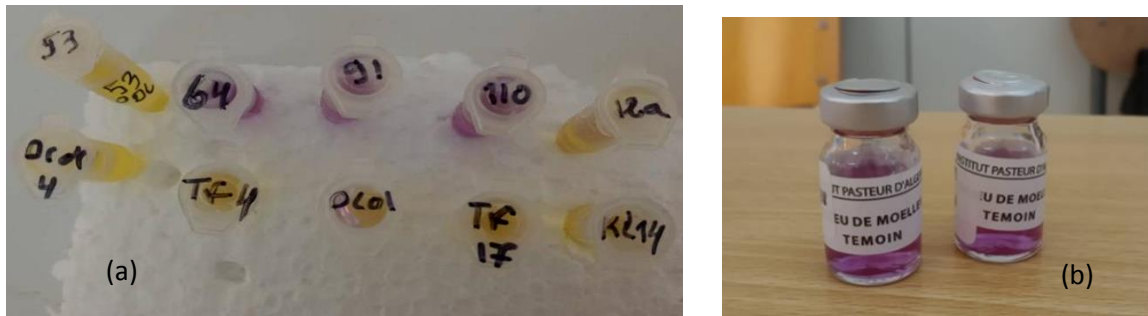


Figure14 : Test de ODC des isolats sur milieu moeller à l'ornithine (a), Témoin (b).

4.2.3.2. Test indole

En ce qui concerne les résultats de indole , tous les souches négative (figure 15) .



Figure 15 : résultats test d'indole des isolats.

4.2.2. Étude de recherche hydrolytique des lipides

4.2.2.1. hydrolyse de lécithine

On observe le milieu de lécithinase une turbidité qui se traduit par l'absence d'activité enzymatique de l'enzyme lécithinase dans tous les souches (figure16). Les résultats de ce teste est reporté dans le tableau 6 .

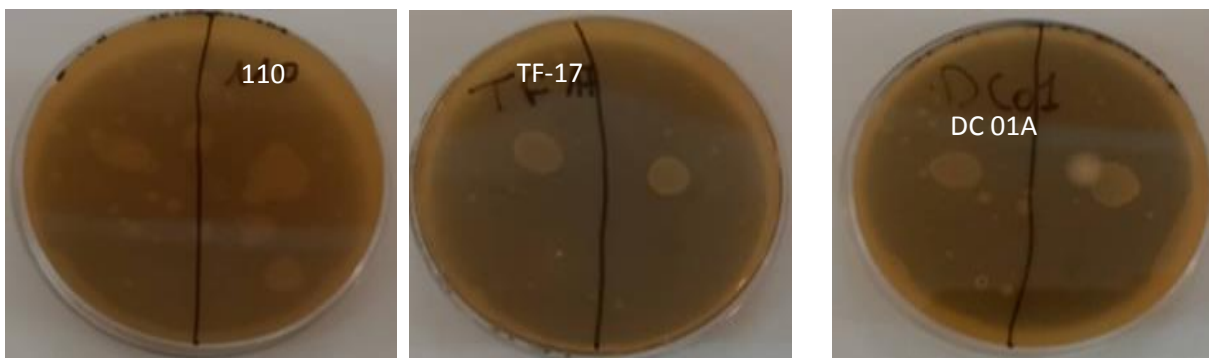


Figure16 : Aspect de résultats de lécithinase. Chez les souches (110, TF-17, DC-01A).

4.2.2.2. lipase

En ce qui concerne les résultats de lipase, il n'y a pas d'activité notable d'enzyme lipase, on peut affirmer alors que toutes les souches sont lipase négative (figure 17). Les résultats de ce teste est reportés dans le tableau 6.

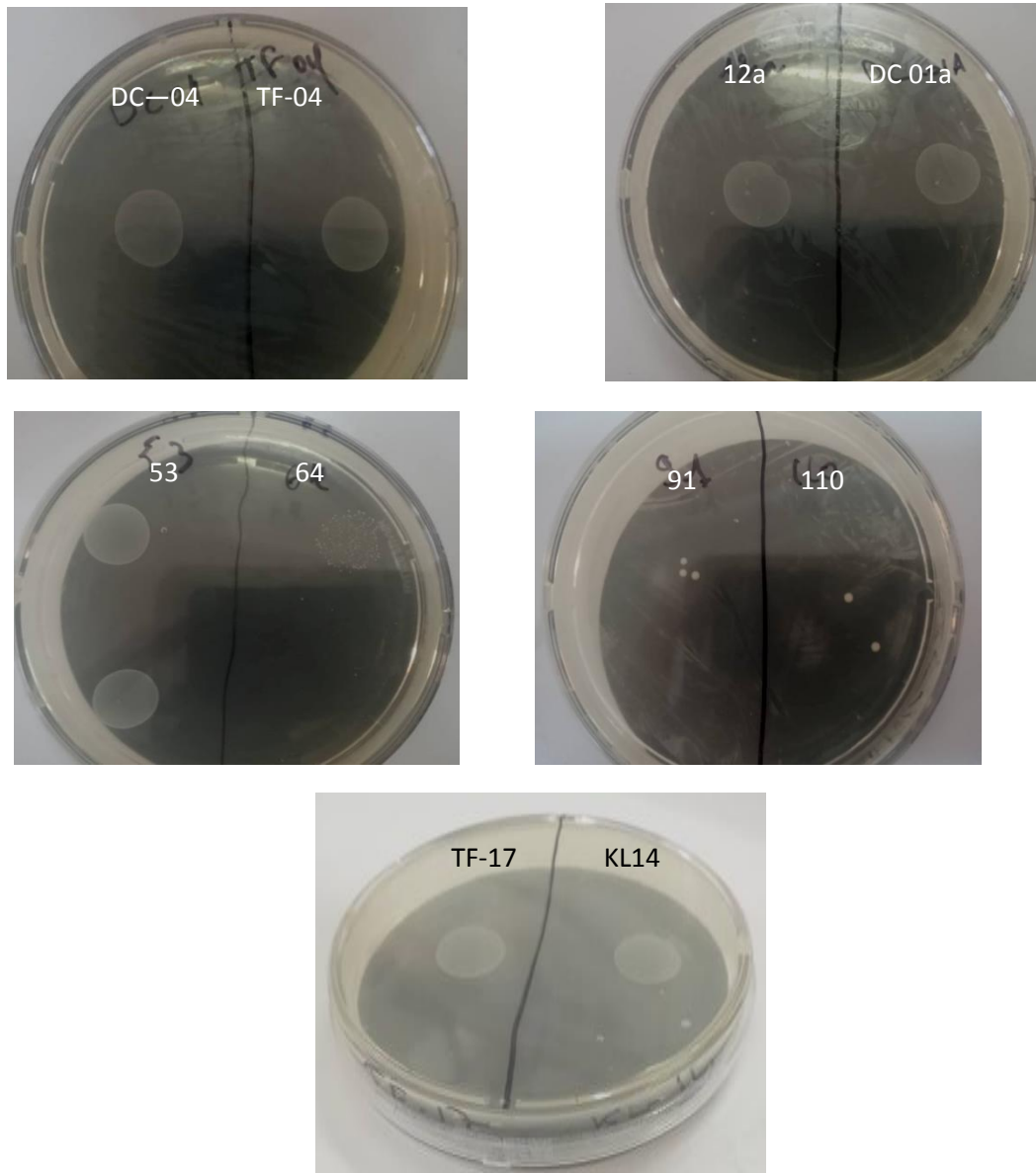


Figure17 : Aspect de résultats de test de lipase chez dix souches.

Tableau 6 : résultats de recherche des enzymes chez dix souches

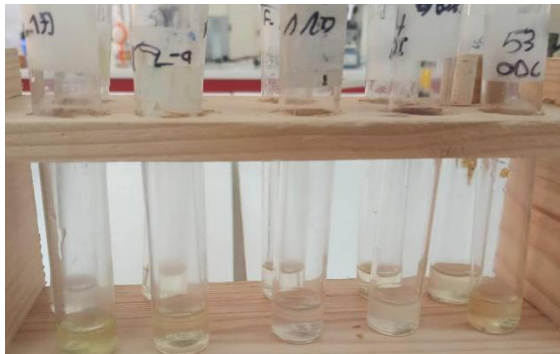
Souches	lécithinase	Lipase
53	-	-
64	-	-
91	-	-
110	-	-
12-a	-	-
DC-O1A	-	-
DC-04	-	-
TF-04	-	-
TF-17	-	-
KL14	-	-

Résultats négative : — résultats positive : +

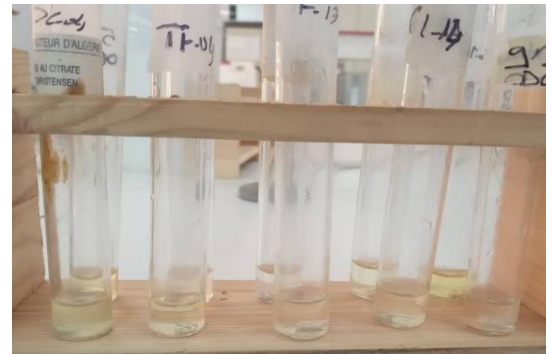
4.2.3. Étude de recherche hydrolytique des glucides

4.2.3.1. ONPG

Les résultats du test ONPG montrent la présence d'activité de l'enzyme β -galactosidase chez les souches : **53, 91, 12 - a, DC-O1A, DC-04, TF-04, TF-17** (figure18), alors que le reste des souches : **64, KL-14, 110** sont **ONPG** négative (figure18).



A



B

Figure18: résultats de test de ONPG (A) et (B).

4.2.3.3. Utilisation de citrate , TSI et Mannitol

On observe dans le milieu citrate de Simmons une absence de changement de couleur pour toutes les souches étudiées, avec une croissance visible (figure19).

Même résultats observés sur le milieu **TSI** on peut alors en déduire il y a fermentation l'un des sucres mais pas visible (figure20).

Par contre dans le milieu mannitol-mobilité il y a eu changement de couleur du rouge au jaune ce qui peut se traduire par la dégradation du mannitol (figure21) cependant il n'y a pas eu de diffusion de souche dans le milieu à partir de la piqûre centrale donc aucune mobilité pour toutes les souches. Les résultats de trois tests sont résumés dans tableau7.



Figure19 : résultats test citrate de Simmons



Figure20 : résultats test de TSI

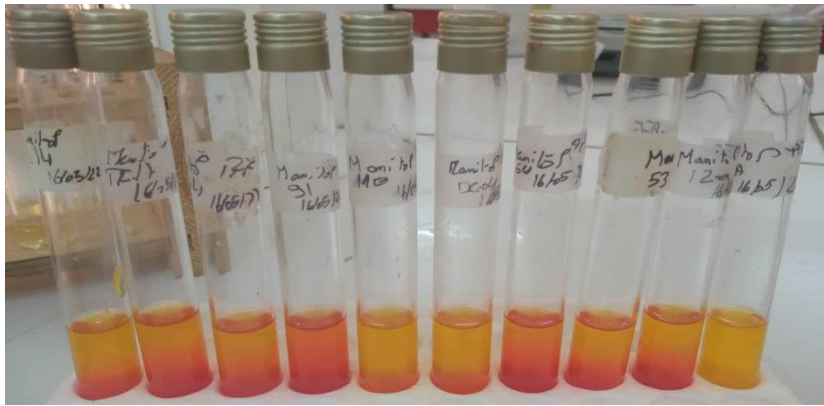


Figure 21 : résultats de test mannitol

Tableau 7 : récapitulatif des trois tests citrate, TSI et mannitol

Souches	Citrate	TSI	Mannitol Mobilité
53	-	+	+ -
64	-	+	+ -
91	-	+	+ -
110	-	+	+ -
12-a	-	+	+ -
DC-01A	-	+	+ -
DC-04	-	+	+ -
TF-04	-	+	+ -
TF-17	-	+	+ -
KL14	-	+	+ -

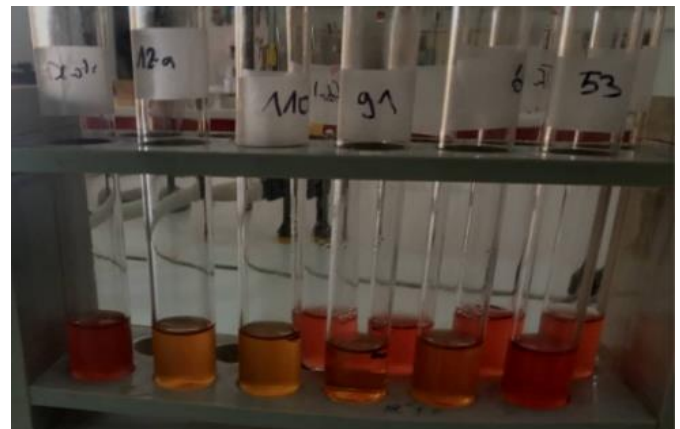
résultats positive : + résultats négative : -

4.2.3.4. Tests, nitrate et Clark & Lubs

Les résultats de trois tests sont résumés dans tableau 8 et figures (22, 23) suivant :



C



D

Figure 22 : Aspect de résultats de test Clark and lubs (c) contient vp1 et vp 2 (d) contient rouge de méthyle

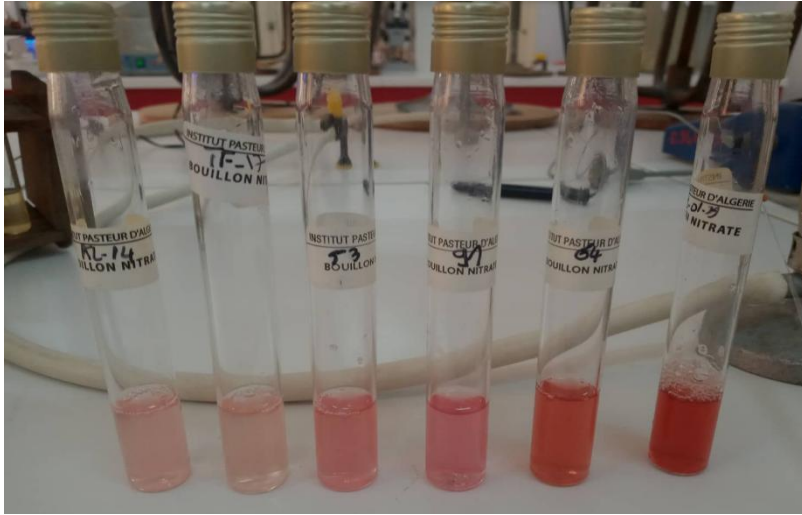


Figure23: résultats test de nitrate des isolats.

Tableau 8 : les résultats de trois tests (, nitrate, Clark & lubs).

Souches	Nitrate	Clark & lubs	
		RM	VP
53	+	+	-
64	+	+	-
91	+	+	-
110	+	+	-
12-a	+	+	-
DC-01A	+	+	-
DC-04	-	+	-
TF-04	-	+	-
TF-17	+	+	-
KL14	+	+	-

Résultats positive : +

résultats égative : —

RM: rouge méthyle

VP : Vogues — Proskauer.

5. DISCUSSION

L'étude de principaux caractères morphologiques, biochimiques et microscopiques des bactéries lactiques présente une variété de réponses ce qui peut dénoter une diversité des genres et d'espèces. Dans notre étude on observe une présence majoritaire de forme lactobacillaires dans les dix isolats obtenus à partir de matrices biologiques différentes à savoir blé fermenté, thé fermenté, fromage type kelilla et beur au lait de chèvre.

Les résultats du hydrolyse de la caséine montre que les isolats **TF04 TF17** et **DC01** ont une activité protéolytique forte (hydrolyse de caséine) contrairement au isolats **64** et **91** probablement ces dernières ne possède pas d'enzyme qui leur permet l'hydrolyse de la caséine du milieu. Ces résultats nous permettent de confirmer le caractère protéolytique des bactéries lactiques chez nos souches, comme il a été rapporté par les travaux de (**Shirai et al., 2001 ; François et al., 2007**), et selon lesquels les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais grâce à un système protéolytique bactérien complexe, elles sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres comme le lait.

Les résultats de teste de lipase et hydrolyse de lécithine montré quant à lui, l'absence d'activité lipolytique chez les dix isolats, En effet si on se réfère aux résultats cités par (**Mehamedi, 2015**) les souches partagent la propriété de ne pas avoir un pouvoir lipolytique remarquable, Les bactéries lactiques sont considérées comme négative lipolytiques (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Les souches **64** et **91** et **110** produisent l'ornithine décarboxylase et d'acétoïne. Contrairement au reste des souches, en effet les bactéries lactiques ne produisant pas toutes d'ornithine décarboxylase et d'acétoïne ce qui nous permet de les distingués (**GUIRAUD, 1998**)

Les résultats de test mannitol montrent cependant que tous les isolats fermentent le mannitol et sont immobile, ce qui correspond en générale aux caractéristiques de certains groupes de lactobacille tels que *Lb.plantarum* (**Fasoli et al., 2003 ; Syndifrais, 2005**)

La totalité des souches étudiées ne produisant pas indole, de citratase et d'H₂S mais fermentent au moins un des trois sucres du milieu TSI (glucose, saccharose, lactose). Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté précédemment par (**HAMMES W.P. et HERTEL C., 2006 ; IBRAHIM, 2015**) ce qui confirme les caractéristiques métaboliques chez certaines bactéries lactiques.

Deux souches **DC-04** et **TF-04** sont négative au test de nitrate réductase alors que le reste des souches sont positives ce qui est en accord avec les résultats rapportés par (**Sadi et al. 2017**).

KL14 et **110** et **64** sont **ONPG** négative ce qui se traduit par l'absence d'enzyme β — galactosidase, le reste des souches sont par contre positives donc on peut en déduire qu'il y a présence de la β — galactosidase ce qui leur permet ainsi de métaboliser le lactose.

CONCLUSION

Notre objectif à travers cette étude est de caractériser l'activité biochimique de dix souches en culture pure obtenus à partir d'environnement varier à savoir : blé fermenté traditionnel appelé « Hamoum », « kelilla », « thé fermenté » et « beurre de lait de chèvre ». Au cours de ce travail nous avons réalisé une identification classique à l'aide d'une étude morphologique, biochimique et physiologique. En effet 10 souches étaient Gram positifs et catalase négatives et sont considérés comme étant des lactobacilles.

Les résultats de tests biochimiques nous montrent que l'activité lipolytique de nos isolats lactique est négative , alors activité protéolytique est forte chez certaines souches de blé fermenté, kelilla et beur lait au chèvre sauf pour 2 souches de blé fermenté et que certains bactérie lactique produisent de l'acétone et possèdent une ornithine décarboxylase par exemple ce qui indique une nature varié en terme de réponse aux tests ainsi conduisant à conclure que cette variabilité décolle d'une différences de genre et d'espèces entre les isolats étudiés. Les résultats montrent aussi que les bactéries lactiques de différentes sources ne possèdent pas les mêmes profil biochimique (kelilla et beurre de chèvre et thé fermenté) et certaines bactéries lactiques de même source ne possède pas même caractéristiques biochimiques (blé fermenté).

Ce qui peut être intéressant si on cherche à cribler la banque de souche pour des études probiotiques ou bien d'isoler de nouvelles souches avec des fonctions technologiques potentiellement applicables dans l'industrie agroalimentaire, malgré la simplicité de ces méthodes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

A

Axelsson L. (2004). Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

Aly savadogo., (2004). Caractérisation Biochimique et moléculaire des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina — faso. » Thèse de doctorat, Université OUAGADOUGOU — Burkina — Faso, faculté sciences biologiques appliquées, p 143.

Ammor M., Mayo B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Méat Science*.76:138-146

B

Bechachha, K., & Boudershem, R. (1945). Les bactéries lactiques : Rôles et intérêts. » *Mémoire de master*. Université 8 Mai 1945 Guelma Faculté des sciences de la nature et de vie, 89p.

BOUDIFI, H & HOCINE, Z., (2019). Isolement et Identification des bactéries lactiques à partir de blé fermenté type HAMOUM. Mémoire de master. Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Science Alimentaire, p 76.

Belkheir, K., Centeno, J.A., Zadi-Karam, H., Karam, N.-E. et Carballo, J. (2016). Potential technological interest of indigenous lactic acid bacteria from algerian camel milk . *Ital. J. Food Sci.*, 28 : 598-610.

C

COLLINS M.D., SAMELIS J., METAXOPOULOS J. and WALLBANKS S., (1993). Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organism from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc* paramesenteroides group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (75): 595-603.

D

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., & Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques*, 1, 25-116.

Diane G., (2006). Formulation et Propagation de Ferments Lactiques Mésophiles à Haut Caractère Aromatique. Mémoire de master. Université Laval Québec, Faculté des sciences de L'Agriculture et de L'alimentation .P 163.

Desmareaud, M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers agricultures*, 5 (5), 331-343.

Delgado, A., Brito, D., Feveiro, P., Peres, C., & Marques, J. F. (2001). Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Le lait*, 81 (1-2), 203-215.

DRIDER D., FIMLAND H.Y., MCMULLEN L. and PREVOST H. (2006). The continuing story of class II a bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 32, 101-107.

De Roissart, H. B. Sharpe, E. M., 1994. Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. Vol. Bactéries lactiques (tome 1). Edit. Lorica (Chemain de saint-gorges). France. P: 25-204.

F

Sadi, F., Bouras, A. D., Ghomari, F. N., Hallouz, F., & Noui, A. (2017). Phenotypic, molecular and technological characterization of autochthonous lactobacilli strains isolated from cow's milk and goat of Algerian populations. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(1), 339-353.

Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzappel W.H. (2003). Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects.* vol. 88,105-122.

G

Ganzle, M. G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G., & Hammes, W. P. (2000). Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4325-4333.

GUIRAUD J.P. et ROSEC J.P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.

Gomez A.M.P and Malcata F.X. (1999). Bifidobacterium sp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological, biochemical and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trends in Food Science&Technology* 10: 139-157

H

HAMMES W.P. et HERTEL C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*; in: « the prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria volume 4: bacteria: firmicutes, cyanobacteria » 3ème éd., Springer, New York, USA, 4, 320-403.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. et Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S–73S.

Hassan, A.N. et Frank, J.F., (2001). Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151- 205.

M

MOELLER V., (1955). Simplified tests for some amino acid de carboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 36:158-172

MC CURK, F PELADAN, JC HUBERT. (1993). Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Le Lait*, INRA Editions, 1993, 73 (2), pp.215-231. Hal — 00929330.

Mechai, A. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar — Annaba, Algérie.

Makhloufi, K.M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, France.

K

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G., (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 103-125.

KHALID N.M. and MARTH E.H., (1990). Lactobacilli, their enzymes and role. In: *Ripening and spoilage of cheese.* *Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.

L

Leveau J. Y., Boiux M. et De Roissart H.B. (1991). La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 240 P.

P

Patterson. (2008). Probiotiques : bien faits au — delà des fonctions nutritionnelles de base .AAFC.1-4.

PILET M.F., MAGRAS C. et FEDERIGH M., (2005). Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

T

Tamime, A.Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications-a review. *Eur J Clin Nutr.* 56 (4):1 – 15

Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 348–359

V

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Ghent, Belgium* p.407-438

W

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., ... Li, W. (2017). Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521

Z

Zhang, Y., Hu, P., Lou, L., Zhan, J., Fan, M., Li, D., & Liao, Q. (2017). Antioxidant Activities of Lactic Acid Bacteria for Quality Improvement of Fermented Sausage. *Journal of Food Science*, 82(12), 2960–2967

ANNEXES

Les milieux d'isolement

Milieu MRS

Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharp, 1960)

Pour 1 litre de milieu :

COMPOSITION

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Acétate de Na	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄	0.25 g
MnSO ₄	0.058 g
Tween 80	1 ml
Agar	18 g
Eau Bi distillée	QSP 1L

pH = 6,8 ± 0,1 Autoclave 120° pendant 20 min

Milieu caséinase

Composition

Tryptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
Eau bi distillée	QSP 1L

pH =7

l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Milieu gélatinase

Extrait de viande	1.5g
Peptone	2.5g
Gélatine	60g
Eau bi distillée	QSP 1L

Ph =6.8

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minute

Milieu lipase

K ₂ HPO ₄	0, 8g/l
KH ₂ PO ₄	6g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0, 2g/l
CaCL ₂	0,05g/l
Na CL.....	3g/l
FeSO ₄	0, 001 g/l
Emulsion de l'huile d'olive.....	1 %

Ph = 7

Eau bi distillée QSP 1 L

L'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Milieu lécithinase

Composants

Tryptone	40 g
Na ₂ HPO ₄	5 g
Na cl	2 g
MgSO ₄	0.01 g
Agar	10 g
Glucose	2 g
Eau bi distillée	QSP 1L

Ph= 7,6

l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Milieu Mannitol

Hydrolysate trypsique de caséines	10 g	
Nitrate de potassium	1 g	
Mannitol	7,5 g	
Rouge de phénol	40 mg	
Agar	3,5 g	
Eau bi distillée QSP		1 L

Ph =7,6

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

milieu TSI

Peptone	20 g
Agar	12 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Na Cl	5 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Glucose	1 g
Citrate ferrique	0.3 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0.3 g
Rouge de phénol	0.025 g
Eau bi distillée	QSP 1L

pH 7.4 Autoclavage à 120°C pendant 20min