

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DELA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



THESE

Présentée à L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem



Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Nutrition et Santé

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR EN SCIENCES
De l'université de Mostaganem

Par

Nawal Boukezzoula

Isolement et sélection de souches lactiques (*Lactobacillus* sp.)
productrices de β -galactosidase.

Soutenu le 21/10/ 2020 devant le jury d'examen composé de :

- Président :** Mr Cheriguen Abderrahim, Professeur à l'univ. Mostaganem.
- Rapporteur :** Mr Riazi Ali, Professeur à l'univ. Mostaganem.
- Examineurs :** Mr Slimani Miloud, Professeur à l'univ. Saida.
Mr Ait Saada Djamel, Maitre de conférences à l'univ. Mostaganem.
Mme Youcefi Fatima, Maitre de conférences à l'univ. Tlemcen.
Mme Benhamed Nadjia, Maitre de conférences à l'univ. USTO, Oran.

Année Universitaire : 2019/2020

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail tout d'abord à mes très chers parents qui ont fait de moi ce que je suis maintenant..., à ma chère sœur et mes chers frères.

A mon cher mari Dr A. CHAALEL qui m'a encouragé et soutenue dans le pire et le meilleur, merci pour ta patience et ton soutien sans lesquels je n'en serais pas là.

A mes chères jumelles Ghozlène, Nesrine et mon petit cœur Mayssa.

A toutes et tous ceux qui me sont proches.

N. BOUKEZZOULA
Septembre 2020

Avant-propos

La présente thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem dirigé par le Pr Ali Riazi.

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, Mr Ali Riazi, Professeur à l'université de Mostaganem, un homme scientifique distingué, méticuleux et qui m'a forgée tout au long de mon parcours scientifique, je ne saurais exprimer à quel point je suis reconnaissante envers vous pour votre soutien, vos conseils, votre enseignement et votre confiance.

En dépit de la grande responsabilité scientifique et administrative qu'il assure, le Professeur Cheriguen Abderrahim de l'université de Mostaganem, a accepté de présider mon jury de soutenance ; qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Mes vifs remerciements sont également adressés au Professeur M. Slimani, de l'université du Dr Moulay Tahar de Saida, pour avoir accepté de prendre part à mon jury d'examen.

J'exprime ma gratitude au Dr D. Ait Saada, Maître de conférences classe A à l'université de Mostaganem pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je tiens à remercier le Dr F. Youcefi, Maître de conférences classe A de l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mes remerciements sont également adressés au Dr Benhamed Nadjia, Maître de conférences de classe A à l'université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf El Mnaouar, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Je tiens à remercier également le Dr Philippe Gérard, directeur de l'équipe AMIPEM (Alimentation, Microbiote Intestinal, Pathologies Encéphaliques et Métaboliques) au sein de l'institut MICALIS de Jouy-en-Josas, INRA, France, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et m'avoir permis d'effectuer mes manipulations d'identification des souches.

Je n'oublierais pas de remercier tous mes collègues du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université de Mostaganem.

Un grand merci est, également, adressé à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien ce travail.

N. Boukezzoula

Septembre 2020

Résumé :

Le but de cette étude était d'isoler et de caractériser de nouvelles souches de *Lactobacillus* à haut potentiel producteur de β -galactosidase. Au total, 28 souches ont été isolées à partir de laits de chamelle et de chèvre collectés du Sahara Algérien. Ces souches ont été identifiées par la technique de la polymérase en chaîne (PCR) du gène de l'ARNr 16S. Leur capacité à hydrolyser le 0-nitrophényl- β -D galactopyranoside (ONPG) a été déterminée. Un procédé de lyse cellulaire impliquant un traitement par sonication et par lysozyme a été utilisé pour la libération de β -galactosidase à partir des souches isolées. L'analyse de leurs séquences de gènes d'ARNr 16S a révélé que les souches appartiennent au genre *Lactobacillus*. C'est ainsi que 17 isolats ont été identifiés comme étant *L. plantarum*, 10 isolats comme *L. herbarum* et un isolat comme *L. brevis*. Les meilleures activités β -galactosidasiques intracellulaires obtenues par ordre décroissant sont 14.84 (*L. plantarum* P4), 14.60 (*L. plantarum* P17), 14.33 (*L. plantarum* P12), 14.10 (*L. plantarum* P10), 13.49 (*L. plantarum* P6), 12.13 (*L. herbarum* H10) et 11.27 (*L. plantarum* P7) U / mL ; alors qu'un très faible niveau de cette activité a été mesuré chez *Lactobacillus brevis* B1 (0.16 U / mL). La cinétique de consommation de lactose contenu dans du lactosérum après incubation des 28 souches isolées pendant 12h nous a permis classer les meilleures souches consommatrices de lactose selon l'ordre suivant : *Lactobacillus plantarum* P4 (41.09%), *Lactobacillus plantarum* P17 (40.5%), *Lactobacillus plantarum* P10 (31.97%), *Lactobacillus plantarum* P12 (34.64%), *Lactobacillus plantarum* P6 (26.89%), *Lactobacillus herbarum* H10 (18.87%), *Lactobacillus herbarum* H7 (16.43%), *Lactobacillus plantarum* P9 (16.40%), *Lactobacillus plantarum* P7 (16.13%), *Lactobacillus plantarum* P13 (15.96 %) et *Lactobacillus plantarum* P2 (15.59%).

L'ensemble de ces résultats plaident en faveur de l'utilisation de ces lactobacilles isolés dans l'industrie laitière afin de réduire le problème de l'intolérance au lactose.

Mots clés : Lait de chamelle, lait de chèvre, screening, *Lactobacillus* sp., β -galactosidase, intolérance au lactose.

Abstract :

The aim of this study was to isolate and characterize new strains of *Lactobacillus* with high potential producing β -galactosidase. A total of 28 strains were isolated from camel and goat milk collected from the Algerian Sahara. These strains were identified by the polymerase chain reaction (PCR) technique of the 16S rDNA gene. Their ability to hydrolyze 0-nitrophenyl- β -D galactopyranoside (ONPG) has been determined. A cell lysis process involving sonication and lysozyme treatment was used for the release of β -galactosidase from the isolated strains. Analysis of their 16S rDNA gene sequences revealed that the strains developed in the genus *Lactobacillus*. Seventeen isolates were identified as *L. plantarum*, 10 isolates as *L. herbarum* and one isolate as *L. brevis*. The best intracellular β -galactosidase activities obtained in descending order are 14.84 (*L. plantarum* P4), 14.60 (*L. plantarum* P17), 14.33 (*L. plantarum* P12), 14.10 (*L. plantarum* P10), 13.49 (*L. plantarum* P6), 12.13 (*L. herbarum* H10) and 11.27 (*L. plantarum* P7) U / mL; whereas a very low level of this activity was measured in *Lactobacillus brevis* B1 (0.16 U / mL). The kinetics of consumption of lactose contained in the whey after incubation of the 28 isolated strains for 12 hours allowed us to classify the best lactose consuming strains according to the following order: *Lactobacillus plantarum* P4 (41.09%), *Lactobacillus plantarum* P17 (40.5 %), *Lactobacillus plantarum* P10 (31.97%), *Lactobacillus plantarum* P12 (34.64%), *Lactobacillus plantarum* P6 (26.89%), *Lactobacillus herbarum* H10 (18.87%), *Lactobacillus herbarum* H7 (16.43 %), *Lactobacillus plantarum* P9 (16.40%), *Lactobacillus plantarum* P9 (16.40) (16.13%), *Lactobacillus plantarum* P13 (15.96%) and *Lactobacillus plantarum* P2 (15.59%). All of these results support the use of these isolated lactobacilli in the dairy industry to reduce the problem of lactose intolerance.

Key words :

Camel milk, goat milk, screening, *Lactobacillus* sp., β -galactosidase, lactose intolerance.

خلاصة:

كان الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتوصيف سلالات جديدة من اکتوباکیلوس مع potential-galactosidase ذات الإمكانات العالية المنتجة. تم عزل ما مجموعه 28 سلالة من حليب الإبل والماعز التي تم جمعها من الصحراء الجزائرية. تم التعرف على هذه السلالات بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لجين الرنا الريباسي 16S. لقد تم تحديد قدرتها على تحلل 0-نتروفينيل β-D ga-lactopyranoside (ONPG). تم استخدام عملية تحلل الخلايا التي تتضمن صوتنة ومعالجة الليزوزيم لإطلاق release-galactosidase من السلالات المعزولة. وكشف تحليل تسلسل الجينات الرنا الريباسي 16S أن السلالات تنتمي إلى جنس لاكتوباسيلوس. تم التعرف على سبعة عشر عزلة على أنها

L. plantarum، و 10 عزلات على أنها *L. herbarum* وعزل واحد باسم *L. brevis*. أفضل أنشطة

β-galactosidasic داخل الخلايا التي تم الحصول عليها بالترتيب التنازلي هي 14.84 (*L. plantarum*P4) ، 13.49 (*L. plantarum* P17) ، 14.60 (*L. plantarum* P12) ، 14.33 (*L. plantarum* P10) ، 14.10 (*L. plantarum* P10) ، 13.49 (*L. plantarum*P6) ، 12.13 (*L. herbarum* H10) و 11.27 U / MI (*L. plantarum* P7) ؛ في حين تم قياس مستوى منخفض للغاية من هذا النشاط في 0.16 U / (*Lactobacillus brevis* B1 مل). حركتنا استهلاك اللاكتوز الموجودة في مصل اللبن بعد حضانة 28 سلالة معزولة لمدة 12 ساعة سمحت لنا بتصنيف أفضل سلالات استهلاك اللاكتوز وفقا للترتيب التالي (41.09) *Lactobacillus plantarum* P4 ؛ *Lactobacillus plantarum* P17 (31.97%) (40.5%) *Lactobacillus plantarum* P12 (34.64%) ؛ *Lactobacillus plantarum* P10 (26.89%) *Lactobacillus herbarum* H10 (18.87%) ؛ *Lactobacillus plantarum* P6 (16.13%) *herbarum*H7 (16.43%) *Lactobacillus plantarum* P13 (15.96%) ؛ *Lactobacillus plantarum* P7 (15.59%) *plantarum* P2 (15.59%).

كل هذه النتائج تدعم استخدام هذه العصيات اللبنية المعزولة في صناعة الألبان لتقليل مشكلة عدم تحمل اللاكتوز.

الكلمات المفتاحية: حليب الإبل ، حليب الماعز ، الفحص ، لاكتوباسيلوس س، غالاکتوزیداز ، لاکتوز اللاکتوز.

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

BET: Bromure d'éthidium

Da : Dalton

dd H₂O: Eau purifiée

dNTPS : Nucléotides triphosphates contenant le désoxyribose

DO: Densité optique

EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique

g : Gramme

h: Heure.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄: Acide sulfurique.

HCl: Chlorure d'hydrogène.

HDL: High Density Lipoprotein

HPLC: High performance liquid chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)

kDa: Kilodalton

kg: Kilogramme

l : Litre

log: Logarithme.

mg: Milligramme

min: Minute

ml: Millilitre

mm: Millimètre

mM: Millimolaire

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nm: Nanomètre.

OH: Ion hydroxyde.

P/V: Poids / volume.

pb: Paire de base

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

pH: Potentiel d'hydrogène.

QSP: Quantité suffisante pour

RNA: Acide ribonucléique

RNase: Ribonuclease

rpm: Tour par minute

rpm: Rotation Par Minute.

sec: Seconde

TAE: Tris, Acétate, EDTA

TFA : Acide trifluoro-acétique

Tris: Tris hydroxyméthylaminométhane

UFC: Unité Formant Colonie

UV: Ultra-Violet.

V/V: Volume / volume.

λ : Longueur d'onde

μ l: Microlitre

GRAS: Generally Recognized As Safe

ACE: Enzyme de conversion de l'angiotensine

PEP-: Phosphoénolpyruvate

PTS : Phosphotransférase

P- β -gal: Phospho- β -galactosidase

PK: Phosphokinase

BCP: Pourpre de bromocresol

ADH: Arginine dihydrolase

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Partie bibliographique

Tab. 1	Teneur en lactose pour 100g d'aliment (Schlienger, 2017).	19
Tab.2	Aliments à éviter en cas d'intolérance au lactose, en fonction de degré de l'insuffisance en lactase (Schlienger, 2017).	21
Tab. 3	Organismes producteurs de β -galactosidase.	25
Tab. 4	Différentes propriétés des β -galactosidases (Gikas and López-Leiva 1985).	26
Tab. 5	Préparations commerciales de β -galactosidases (Gikas and López-Leiva 1985).	26
Tab. 6	Teneur en calcium et en lactose de certains fromages et laits (Santé Canada, 2010).	30

Partie expérimentale

Partie matériels et méthodes

Tab.7	Programme du thermocycleur pour la réaction PCR.	45
Tab.8	Liste des amorces utilisées.	46
Tab.9	Mélange réactionnel pour le séquençage d'ADN.	47
Tab.10	Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage.	48

Partie résultats et discussion

Tab. 11	Croissance des souches isolées à différentes températures et dans un milieu à 4% de NaCl.	57
Tab. 12	Profil fermentaire et test d'hydrolyse de l'arginine des souches isolées.	59
Tab.13	Prévalence des <i>Lactobacillus</i> isolées des laits de chèvres et de chamelle.	61
Tab.14	Classement des souches améliorées par la présence du lactose dans le milieu de culture.	81
Tab.15	Composition biochimique du lactosérum acide entier et déprotéiné.	88
Tab.16	Classement des souches par ordre décroissant en fonction du taux de lactose consommé dans le lactosérum.	105

Listes des figures

Partie bibliographique

Fig. 1	Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose.	5
Fig. 2	Mécanismes de maldigestion du lactose (Burgain <i>et al.</i> , 2012).	13
Fig. 3	Processus de délactosage du lait (Lait plaisir, 2018).	18
Fig. 4	Mécanisme proposé de l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase. (Richmond <i>et al.</i> , 1981).	27
Fig. 5	Mécanisme proposé pour la réaction de transfert de β -galactosyle par la β -galactosidase (Richmond <i>et al.</i> 1981).	28
Fig. 6	Transport de sucres à ATPase et métabolismes multiples (Poolman, 1993).	32
Fig. 7	Voie Leloir : Symport Galactoside-H ⁺ (Poolman, 1993).	34
Fig. 8	Diagramme représentant le lactose-PTS et le cycle de glycolyse in <i>S. lactis</i> . (Thomson, 1987).	36

Partie expérimentale

Partie matériels et méthodes

Fig. 9	Diagramme d'extraction de l'ADN génomique avec le Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).	44
Fig. 10	Diagramme de purification des produits de séquençage.	48
Fig. 11	Diagramme de déprotéinisation du lactosérum (Moulin <i>et al.</i> , 1976).	52
Fig. 12	Protocole de préparation des précultures.	53

Partie résultats et discussion

Fig. 13	Purification des souches isolées par la méthode des stries.	56
Fig. 14	Observation au microscope optique après la coloration de Gram (Bacilles à Gram +, grossissement 10).	56
Fig. 15	Amplification des séquences 16S rDNA réalisée avec de l'ADN génomique. Les puits à partir de 1 à 28, représentent les souches isolées.	60
Fig. 16	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P1 en présence et en absence de lactose.	63

Fig. 17	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P3 en présence et en absence de lactose.	64
Fig. 18	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P4 en présence et en absence de lactose.	64
Fig. 19	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P5 en présence et en absence de lactose.	65
Fig. 20	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P6 en présence et en absence de lactose.	65
Fig. 21	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P8 en présence et en absence de lactose.	66
Fig. 22	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P9 en présence et en absence de lactose.	67
Fig. 23	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P11 en présence et en absence de lactose.	67
Fig. 24	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P12 en présence et en absence de lactose.	68
Fig. 25	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P13 en présence et en absence de lactose.	68
Fig. 26	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P14 en présence et en absence de lactose.	69
Fig. 27	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P15 en présence et en absence de lactose.	69
Fig. 28	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P16 en présence et en absence de lactose.	70
Fig. 29	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P17 en présence et en absence de lactose.	70
Fig. 30	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P2 en présence et en absence de lactose.	71
Fig. 31	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P7 en présence et en absence de lactose.	71
Fig. 32	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H1 en présence et en absence de lactose.	72
Fig. 33	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H4 en présence et en absence de lactose.	73
Fig. 34	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H6 en présence et en absence de lactose.	73
Fig. 35	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H7 en présence et en absence de lactose.	74
Fig. 36	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H8 en présence et en absence de lactose.	75
Fig. 37	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H9 en présence et en absence de lactose.	75
Fig. 38	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> P10 en présence et en absence de lactose.	76
Fig. 39	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H3 en présence et en absence de lactose.	77
Fig. 40	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H5 en présence et en absence de lactose.	78
Fig. 41	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H10 en présence et en absence de lactose.	78
Fig. 42	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus herbarum</i> H2 en présence et en absence de lactose.	79
Fig. 43	Cinétique de croissance <i>Lactobacillus brevis</i> B1 en présence et en absence de lactose.	80
Fig. 44	L'activité β -galactosidase (U/ ml ; N=3 \pm ecartypes) des souches <i>Lactobacillus</i> isolées.	83

Fig. 45	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P1 dans le lactosérum.	89
Fig. 46	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P2 dans le lactosérum.	89
Fig. 47	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P3 dans le lactosérum.	90
Fig. 48	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P4 dans le lactosérum.	90
Fig. 49	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P5 dans le lactosérum.	91
Fig. 50	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P6 dans le lactosérum.	91
Fig. 51	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P7 dans le lactosérum.	92
Fig. 52	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P8 dans le lactosérum.	92
Fig. 53	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P9 dans le lactosérum.	93
Fig. 54	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P11 dans le lactosérum.	93
Fig. 55	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P12 dans le lactosérum.	94
Fig. 56	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P13 dans le lactosérum.	94
Fig. 57	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P14 dans le lactosérum.	95
Fig. 58	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P15 dans le lactosérum.	95
Fig. 59	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P16 dans le lactosérum.	96
Fig. 60	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P17 dans le lactosérum.	96

Fig. 61	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H1 dans le lactosérum.	97
Fig. 62	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H4 dans le lactosérum.	98
Fig. 63	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H6 dans le lactosérum.	98
Fig. 64	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H7 dans le lactosérum.	99
Fig. 65	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H8 dans le lactosérum.	99
Fig. 66	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H9 dans le lactosérum.	100
Fig. 67	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> P10 dans le lactosérum.	101
Fig. 68	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H3 dans le lactosérum.	101
Fig. 69	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H5 dans le lactosérum.	102
Fig. 70	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H10 dans le lactosérum.	102
Fig. 71	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus herbarum</i> H2 dans le lactosérum.	103
Fig. 72	Cinétique de dégradation du lactose par la souche <i>Lactobacillus brevis</i> B1 dans le lactosérum.	104

Sommaire

« Isolement et sélection de souches lactiques (*Lactobacillus sp.*) productrices de β -galactosidase.»

Dédicace

Avant-propos

Résumé

ABSTRACT

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Table des matières

Partie bibliographique	Pages
Chapitre I : Les bactéries lactiques	4
I.1. Les bactéries lactiques : Un groupe bactérien de première importance	4
I.1.1. Définition	4
I.1.2. Classification et principaux genres de bactéries lactiques	6
I.1.3 Intérêt des bactéries lactiques sur la santé humaine	6
I.1.4. Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	6
I.1.4.1. Les glucides	7
I.1.4.2. L'azote	7
I.1.4.3. Les vitamines	7
I.1.4.4. Les minéraux	7
I.1.4.5. L'oxygène	8
I.1.5. Principales propriétés d'intérêt des bactéries lactiques et leurs applications	8
I.1.5.1. La synthèse d'acide organiques et son exploitation dans l'industrie laitières et la conservation des viandes (Rigor Mortis)	9
I.1.5.2. Le CO ₂ de fermentation et la structure alvéolaire de certains aliments	9
I.1.5.3. La synthèse de substances aromatiques	10
I.1.5.4. L'activité protéolytique	11
I.1.5.5. La synthèse d'exopolysaccharides et viscosité des aliments fermentés	11
I.1.5.6. La synthèse de bactériocine et la compétitivité trophique	11
I.2. L'intolérance au lactose	12
I.2.1. Prévalence ethnique et géographique de l'intolérance au lactose dans le monde	12
I.2.2. Symptômes et mécanismes de l'intolérance au lactose	13

I.2.3. Cohérence entre l'arrêt graduel de synthèse de lactase après le sevrage et l'apparition de l'intolérance au lactose chez l'homme adulte	14
I.2.4. Origine de l'intolérance au lactose	14
I.2.4.1. La prédisposition génétique	14
I.2.4.2. Autres origines	14
I.2.5. Moyens de lutte contre l'intolérance au lactose	15
I.2.5.1. Le lait délactosé (technique de fabrication, valeur alimentaire comparée à celle du lait normal, indiquer le seuil maximal de lactose toléré par la législation)	17
I.2.5.2. Les laits fermentés et autres produits contenant du lactose	18
I.2.5.3. Les compléments alimentaires anti-intolérance au lactose	20
I.2.5.4. Les régimes diététiques réducteurs de l'inconfort digestif	20
I.2.5.5. La consommation de probiotiques	22
I.3. La lactase	22
I.3.1. Nomenclature internationale et structure	23
I.3.2. Processus de synthèse intestinale de lactase et son évolution selon l'âge	23
I.3.3. Production industrielle de lactase (espèce de microorganismes concernés)	24
I.3.4. Mécanisme d'action de la lactase	27
I.3.4.1. Le substrat de la lactase : le lactose (structure)	28
I.3.4.2. Formation d'oligosaccharides	28
I.4. Effet des bactéries lactiques sur l'intolérance au lactose	29
I.4.1. Effet des ferments lactiques du yaourt	29
I.4.2. Effet des ferments lactiques des fromages	30
I.4.3. Système de transport du lactose par les ferments lactiques	31
I.4.3.1. Système de transport primaire	32
I.4.3.2. Système de transport secondaire	33
I.4.3.3. Système de phosphotransférase dépendant de la phosphoenolpyruvate (PEP-PTS)	34
I.4.4.1. La concentration minimale des ferments lactiques dans l'aliment véhicule	37
I.4.4.2. La barrière acide gastrique	38
I.4.4.3. Les conditions physiologiques intestinales (pH, sécrétions digestives, bile, etc.)	39

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Isolement des souches à partir de lait de chèvre et chamelle	40
II.1.1. Collecte et préparation des échantillons de lait pour l'isolement des souches	40
II.1.2. Isolement, purification et conservation des souches	40
II.2. Caractérisation phénotypique des souches isolées	41
II.2.1. Examens macroscopique et microscopique des cultures	41
II.2.2. Coloration de Gram	41
II.2.3. Recherche de la catalase	41
II.2.4. Détermination du profil fermentaire des souches isolées	42
II.2.5. Croissance des souches isolées en présence de 4% NaCl	42
II.2.6. Croissance à différentes températures (15, 37 et 45°C)	42
II.2.7. Hydrolyse de l'Arginine (ADH)	42
II.3. Caractérisation génétique des souches	43
II.3.1. Extraction de l'ADN génomique des souches	43
II.3.2. Identification des souches par séquençage 16S ADN ribosomal	45
II.3.2.1. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	45
II.3.2.2. Electrophorèse des acides nucléiques	46
II.3.2.3. Purification des produits PCR sur cellule microcon-Y 100	47
II.3.2.4. Réaction de séquençage	47

II.3.2.4.1 Programme d'amplification	48
II.3.2.4.2 Purification des produits de séquençage	48
II.4 Etude de L'activité β -galactosidique des souches identifiées	49
II.4.1 Cinétique de croissance des souches identifiées sur milieu MRS et MRS lactosé	49
II.4.2 Etude de l'activité β -galactosidase	49
II.4.2.1 Extraction de l'enzyme	49
II.4.2.1.1. Traitement au lysozyme EDTA	49
II.4.2.1.2. Sonication	50
II.4.2.2 Mesure de l'activité enzymatique β -galactosidase	50
II.5. Capacité de dégradation de lactose par les différentes souches cultivées sur lactosérum	50
II.5.1 Réactivation des souches	50
II.5.2 Origine et déprotéinisation du substrat lactosérum	50
II.5.3. Mise en culture	53
II.5.4. Mesure de la croissance	53
II.6. Analyse statistique	54
II.5.3 Traitement de lactosérum (déprotéinisation)	42
II.5.4 Mise en culture	44
II.5.5 Mesure de la croissance	44

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Isolement et identification des souches lactiques	55
III.1.1 Identification phénotypique	55
III.1.2 Identification génétique	60
III.2. Résultat de croissance des souches isolées sur les deux milieux MRS et MRS lactosé	63
III.2.1. Croissance des souches <i>L. plantarum</i> issues de lait de chamelle	63
III.2.2. Croissance des souches <i>L. herbarum</i> issues de lait de chamelle	73
III.2.3. Croissance de la souche <i>L. plantarum</i> issue de lait de chèvre	78
III.2.4. Croissance des souches <i>L. herbarum</i> issues de lait de chèvre	79
III.2.5. Croissance de la souche <i>L. brevis</i> issue de lait de chèvre	81
III.3. Résultat de l'activité β -galactosidase des souches isolées	84
III.4. Résultats de la fermentation du lactose par les lactobacilles isolés et cultivés sur lactosérum	90
III.4.1. Caractéristiques physicochimiques du substrat « lactosérum déprotéiné »	90
III.4.2. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches <i>L. plantarum</i> issues de lait de chamelle	91
III.4.3. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches <i>L. herbarum</i> issues de lait de chamelle	100
III.4.4. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches <i>L. plantarum</i> issues de lait de chèvre	103
III.4.5. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches <i>L. herbarum</i> issues de lait de chèvre	104
III.4.6. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose de la souche <i>L. brevis</i> issue de lait de chèvre	106
Conclusion	107
Références bibliographiques	109

INTRODUCTION

Introduction

Les lactobacilles sont des membres du groupe des bactéries lactiques. La plupart des espèces sont homofermentaires, mais certaines sont hétérofermentaires (Madigan and Martinko, 2007), ils sont strictement fermentatifs et nécessitent des nutriments complexes. Les lactobacilles appartiennent à la flore muqueuse normale de la bouche et de l'intestin.

Ces bactéries sont considérées comme les probiotiques les plus importants et sont convoitées pour faire partie de la microflore intestinale (Nsofor *et al.*, 2014). Le statut taxonomique actuel basé sur 718 génomes du genre *Lactobacillus*, le plus grand groupe de bactéries lactiques, disponible au public, représente plus de 180 espèces connues (Tanizawa *et al.*, 2017). Elles sont naturellement présentes ou ajoutées intentionnellement, pour des raisons technologiques ou pour générer des bénéfices santé chez le consommateur (Stiles et Holzapfel, 1997).

Les probiotiques sont définis comme des compléments alimentaires microbiens vivants, qui profitent à la santé des consommateurs en maintenant ou en améliorant l'équilibre de leur flore intestinale (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

La déficience en enzyme lactase (β -galactosidase) chez certaines populations les expose à une intolérance au lactose dont l'ingestion engendre un inconfort digestif majeur. Chez les individus intolérants au lactose, une petite quantité de lactose sera habituellement bien tolérée. Les yogourts et autres produits fermentés sont mieux tolérés que le lait frais. Plusieurs fromages contiennent peu ou pas de lactose. Si la lactase est produite en quantité insuffisante, le lactose n'est pas complètement digéré et parvient dans le colon où il est fermenté par des bactéries. Cette fermentation provoque la production de gaz (hydrogène et méthane) dans le gros intestin et crée un appel d'eau dans l'intestin grêle. Il en découle une accélération du transit intestinal avec diarrhées, gaz et douleurs.

L'intolérance au lactose se développe avec l'âge, elle touche une grande partie de la population adulte, à divers degrés. La baisse de la production de lactase à l'âge adulte est la plus fréquente en Asie de l'Est ou en Afrique équatoriale, où le lait est traditionnellement moins consommé. À l'inverse, cette baisse est plus rare en Europe, dans les Amériques (du

fait de l'origine européenne d'une part importante de la population), en Inde, au Moyen-Orient, en Afrique de l'Est et au Sahel, où le lait a été anciennement inclus dans l'alimentation. Ainsi, en Europe du Nord, environ 5 % des adultes seulement connaissent une baisse de leur production de lactase alors que, dans certains pays d'Asie de l'Est, elle concerne plus de 90 % de la population (Bulhões *et al.*, 2007 ; Ingram *et al.*, 2009).

La β -galactosidase est largement utilisée dans l'industrie laitière pour l'hydrolyse du lactose dans le lait et le lactosérum, ce qui facilite la digestibilité et améliore les caractéristiques technologiques et sensorielles des produits laitiers sucrés, condensés et surgelés (Husain, 2010 ; Panesar *et al.*, 1997). De plus, dans le traitement des aliments, la β -galactosidase est un biocatalyseur précieux pour la biotechnologie environnementale, à condition de résoudre le problème de l'utilisation et de l'élimination du lactosérum (Illanés, 2011).

La β -galactosidase est une enzyme commune que l'on peut trouver dans les plantes, les organes d'animaux et les microorganismes. Ces derniers sont les sources les plus appropriées de cette enzyme, en raison de la facilité de production, des activités élevées et de la bonne stabilité de l'enzyme. Cette enzyme est un tétramère de poids moléculaire de 520 KDa, composé de quatre sous-unités identiques de poids moléculaire 130 000 Daltons, chacune avec un site actif indépendant (Tenu *et al.*, 1972).

En raison du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) qui caractérise les bactéries lactiques, leur utilisation directe ou l'utilisation de leur extrait enzymatique brut dans les produits laitiers est possible, sans qu'il soit nécessaire de procéder à des protocoles de purification fastidieux (Park et Oh, 2010).

Les préparations enzymatiques utilisées dans les produits sans lactose sont des protéines hautement purifiées. Plus la protéine est purifiée, plus son coût devient élevé. Par conséquent, le coût du lait à teneur réduite en lactose est environ 80% supérieur à celui du lait ordinaire non hydrolysé (Bury et Jelen, 2000). Il a été démontré que la lyse cellulaire par sonication amplifie plusieurs fois l'activité de la β -galactosidase (Shah et Jelen, 1991; Wang et Sakakibara, 1997; Feliu *et al.*, 1998).

L'hydrolyse enzymatique du lactose par la β -galactosidase est l'une des technologies les plus appréciées pour produire du lait et des produits laitiers appauvris en

lactose, destinés à être consommés par les personnes intolérantes au lactose (Ladero *et al.*, 2000 ; Sener *et al.*, 2006 ; Haider et Husain, 2008).

Shah et Jelen (1991) ont proposé l'utilisation des cultures lactières traitées aux ultrasons pour produire une source relativement impure de β -galactosidase pour un processus potentiellement plus économique d'hydrolyse du lactose.

Le but de la présente étude isoler et identifier les lactobacilles dans le lait de chèvre et de chamelle du Sahara Algérien et d'évaluer leur activité β -galactosidase.

La présente étude est une opération de screening de nouvelles souches locales de lactobacilles à haut potentiel producteur de β -galactosidase à partir de laits de chamelle et de chèvre venant du cheptel algérien. Il s'agit d'une recherche de nouveaux génomes bactériens du terroir pouvant être valorisés par ce biais de production accrue d'enzyme et exploités dans le secteur de l'industrie laitière.

Cette thèse est structurée en trois chapitres dont le premier est consacré à un bref rappel bibliographique traitant les bactéries lactiques et leur effet sur l'inconfort digestif dû à l'indigestion du lactose, l'intolérance au lactose et l'enzyme lactase. Le second chapitre est consacré à la méthodologie utilisée dans l'exécution du protocole expérimental. Un troisième et dernier chapitre présente les résultats obtenus qui sont discutés et confrontés à ceux d'autres auteurs.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. : Rappel bibliographique

I.1.Les bactéries lactiques : Un groupe bactérien de première importance

I.1.1.Définition

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram-positif qui regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Bourgeois et Larpent, 1996). Le caractère commun de ces bactéries est la production d'acide lactique par fermentation de glucides (Labioui *et al.*, 2005).

Ce sont des cellules immobiles qui ne sporulent pas, et qui sont catalase négative, oxydase négative, n'ayant ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase, ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux ; seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine.

Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance : acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, vitamine B, acides gras, sels et glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Gonzalez *et al.*, 2007). C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Bourgeois et Larpent, 1989 ; Novel, 1993).

Certaines de ces bactéries sont dites homofermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général) (Fig.1).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif. Elles sont utilisées dans l'alimentation et sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995; Salminen *et al.*, 1998). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Aguire et Collins, 1993).

Les bactéries lactiques qui ont un métabolisme homofermentaire sont des *Lactocoques*, *Pédiocoques* et quelques *Lactobacilles*; alors que celles dont le métabolisme est hétérofermentaire sont représentées par le genre *Leuconostoc* et par la plupart des *Lactobacilles* (Fig.1).

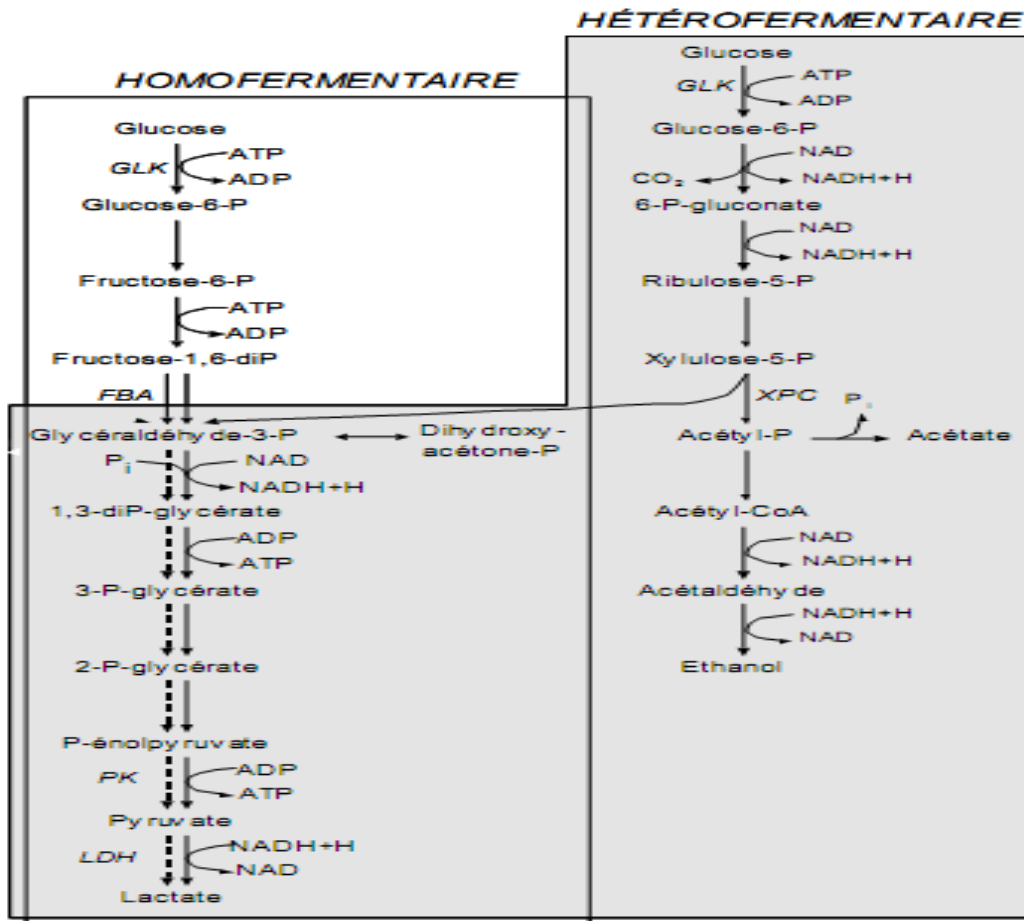


Figure 1: Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose. Les principales enzymes sont : **GLK** : Glucokinase, **FBA** : Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, **XPC** : Xylulose-5-phosphate phosphocétolase, **PK** : Pyruvate kinase, **LDH** : Lactate déshydrogénase (Raynaud, 2006).

I.1.2. Classification

La première classification des bactéries lactiques basée sur les caractéristiques observables comme celles liées à leur morphologie, biochimie et physiologie a été établie en 1919 par **Orla-Jensen**. Les marqueurs chimio-taxonomiques tels que la composition en acides

gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été aussi utilisés pour la classification (Krieg, 2001). Les nouvelles techniques pour l'indentification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment en cause et/ou complètent les approches phénotypiques anciennement utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres (Garrity *et al.*, 2008 ; Vandamme *et al.*, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho *et al.*, 2007).

I.1.3. Les principaux genres des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.

I.1.4. Intérêt des bactéries lactiques en santé humaine

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, après ingestion en quantité adéquate, produisent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (FAO, OMS, 2001). Un intérêt considérable s'est développé ces dernières années autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets « probiotiques » (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées sont choisis comme vecteurs privilégiés des cultures probiotiques.

I.1.5. Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Si les bactéries lactiques sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnel, c'est parce qu'elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments qui jouent le rôle de coenzyme (Luquet, 1986).

I.1.5.1. Les glucides

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes dont le transport du sucre à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire, puis son catabolisme intracellulaire et enfin la formation et l'expulsion

extracellulaire des métabolites terminaux généralement acides (Monnet *et al.*, 1994). Deux types de métabolismes fermentaires sont rencontrés. Un métabolisme homofermentaire qui aboutit de façon quasi-exclusive à la production d'acide lactique et un métabolisme hétérofermentaire produisant de l'acide lactique, mais également de l'éthanol et de l'acide acétique suivant les conditions de cultures (Renouf *et al.*, 2005).

I.1.5.2. L'azote

Les bactéries lactiques exigent aussi l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapables, pour la plupart, d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple (Desmazeaud, 1983).

Elles ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres, ou des peptides courts (peptidases, dipeptidases). Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grosses protéines du lait, et notamment les caséines, par des protéases situées dans la paroi extérieure de la cellule (Desmazeaud, 1998).

I.1.5.3. Les vitamines

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme. Les bactéries lactiques sont, à quelques exceptions près, incapables de synthétiser des vitamines (Desmazeaud et De Roissart, 1994), d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996).

I.1.5.4. Les minéraux

La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (Novel, 1993).

Du point de vue transport, le fer est un élément important puisqu'il a des affinités pour un grand nombre de molécules chélatrices. Il augmente la croissance et la production d'acide lactique chez les bactéries lactiques (Boyaval *et al.*, 1988).

Le potassium, quant à lui, est un cofacteur pour plusieurs enzymes bactériennes et sa forte concentration dans le cytoplasme est nécessaire pour la synthèse protéique. De plus, le potassium est également impliqué dans le contrôle du pH cytoplasmique (Desmazeaud, 1983).

I.1.5.5. L'oxygène

Les bactéries lactiques sont communément appelées micro-aérophiles car elles tolèrent de petites quantités d'oxygène. La relation des bactéries lactiques avec l'oxygène a probablement un lien avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit dans la cellule en présence d'air et dont l'accumulation est toxique, son élimination est obligatoire (Desmazeaud, 1996).

I.1.6. Principales propriétés d'intérêt des bactéries lactiques et leurs applications

Les principaux aliments fermentés produits en utilisant des bactéries lactiques sont des aliments à base de lait. Traditionnellement, le lait est soumis à une fermentation grâce à des bactéries lactiques, naturellement présentes à la surface de la peau des mammifères, donc sur les mamelles. Les bactéries contaminent le lait lors de la traite du lait, ce qui lui permet d'être fermenté quand certaines conditions soient favorables, pourvu qu'il soit conservé dans des conditions favorisant la croissance des bactéries lactiques (Dridier and Prevost, 2009).

Le lait est un milieu riche particulièrement favorable à la croissance des bactéries lactiques, qui contient des lipides et des acides gras, des protéines, et un glucide majoritaire, le lactose. Le lactose, un disaccharide, est internalisé par les bactéries lactiques puis clivé dans le cytoplasme bactérien en glucose et galactose, deux hexoses pouvant être oxydés par fermentation lactique.

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 (Dridier and prevost, 2009).

Pour préserver la qualité nutritionnelle du lait et créer une valeur ajoutée à ses dérivés, l'industrie laitière utilise différentes espèces et variétés de bactéries lactiques pour donner au lait transformé des qualités organoleptiques nouvelles et recherchées par le consommateur (texture, goût, odeur, etc.).

I.1.6.1. La synthèse d'acide organiques et son exploitation dans l'industrie laitières et la conservation des viandes (Rigor Mortis)

L'installation de la rigidité cadavérique (ou rigor mortis) est directement perceptible sur la carcasse : la musculature devient progressivement raide et inextensible dans les heures

qui suivent la mort de l'animal. Ce phénomène résulte de l'épuisement du composé qui permet au muscle vivant de conserver son élasticité et qui par ailleurs fournit l'énergie nécessaire au travail musculaire, l'adénosine triphosphate (ATP).

Après l'abattage et la saigné, en l'absence d'oxygène, divers mécanismes de resynthèse s'opposent à la dégradation de l'ATP. Le premier est constitué par la réaction catalysée par la créatine kinase et intervient également la myokinase. Mais la réaction la plus importante, car elle conditionne l'évolution du pH et des caractéristiques physicochimiques pendant l'établissement de la rigidité, est la lyse du glycogène en glucose. Le pH est habituellement classé parmi les caractéristiques technologiques parce qu'il influence de façon très importante sur l'aptitude à la conservation et à la transformation des viandes (Hofmann, 1988).

La valeur du pH est importante pour l'industrie de la viande. Dans le secteur de la viande, le pH est une notion bien connue affectant la couleur, la tendreté, la saveur et le pouvoir de rétention d'eau. La valeur pH du muscle est légèrement supérieure au point neutre (pH=7,2). Après l'abattage (post mortem), un processus de décomposition biochimique de la viande commence, ainsi, la source d'énergie du muscle, le glycogène, est transformée en acide lactique, sous l'effet des diverses enzymes (Hofmann, 1988).

I.1.6.2. Le CO₂ de fermentation et la structure alvéolaire de certains aliments

Pendant le processus de la fermentation lactique hétérofermentaire, la production de CO₂ peut induire la formation d'ouverture dans le fromage. Les bactéries hétérofermentaires peuvent non seulement fermenter le lactose mais en partie également le citrate (acide citrique) (Goy *et al.*, 2015).

Les *Leuconostoc* peuvent, en plus de la production d'acide lactique participer à la formation de l'ouverture et produire des agents aromatisants tels que du diacétyle et de l'acétoïne. Ils sont donc des composants importants des cultures beurrières. Dans la production de fromages à pâte mi-dure, ils peuvent participer à la formation de la structure alvéolaire.

Les lactobacilles hétérofermentaires tel que *Lb casei*, *Lb rhamnosus* et *Lb plantarum* sont particulièrement intéressants du fait de leur capacité d'utiliser le lactose ainsi que le citrate comme source d'énergie. Grace à leur capacité d'utiliser le citrate, ces bactéries peuvent se multiplier dans le fromage même si les sucres sont complètement consommés (Goy *et al.*, 2015).

Dans la fabrication de l'Emmental, la consommation du citrate par les lactobacilles hétérofermentaires se déroule principalement après 2-3 semaines d'affinage. L'ajout de ce type de bactéries a pour but de diminuer les fermentations secondaires.

- Dans les fromages à pâte mi-dure (Tilsiter, Appenzeller), l'emploi de lactobacilles hétérofermentaires sert à la formation de structure alvéolaire.
- Dans le Gruyère, l'utilisation de ces bactéries n'est pas recommandée, car elle peut provoquer un goût atypique ou de l'ouverture indésirable. Cependant, des études ont montré que Lb hétérofermentaires de la flore du lait cru jouent un rôle essentiel lors de l'affinage du Gruyère (Goy *et al.*, 2015).

Pendant le processus de panification, la fermentation est une étape essentielle pour établir la structure alvéolaire du pain. Elle est caractérisée essentiellement par une expansion et de la production du CO₂. Pendant la panification, la porosité de la pâte à pain s'accroît de 10 à 70% et les alvéoles gazeuses croissent et se connectent sans que la pâte à pain ne s'effondre. Ce phénomène, essentiel pour la texture finale de la mie du pain, est étroitement associé à la présence de films liquides dont les propriétés rhéologiques favorisent le maintien des alvéoles (Peighambardous *et al.*, 2010).

I.1.6.3. La synthèse de substances aromatiques

Au cours des différentes transformations du lait par fermentation, certaines bactéries lactiques peuvent produire des substances procurant des arômes tels que : l' α -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butane diol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, car elle contribue à l'amélioration des qualités organoleptiques des dérivés laitiers tels que les fromages frais, crèmes et beurre (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006).

I.1.6.4. L'activité protéolytique

Le système protéolytique représente un rôle important dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acides aminés à partir des caséines (Savijoki *et al.*, 2006 ; Toe *et al.*, 2019). Les bactéries lactiques provoquent une augmentation des protéines solubles dans le

milieu et l'apparition des produits de leur dégradation qui sont des peptides et d'acides aminés qui outre le fait qu'ils stimulent la croissance des microorganismes, interviennent dans la formation de certains composés aromatiques (Savijoki *et al.*, 2006). Ces bactéries sont responsables d'une activité protéolytique qui est le phénomène dominant lors de l'affinage. Cette activité conduit à l'apparition des courts peptides et acides aminés, précurseurs de nombreuses molécules riches en arômes et en saveurs.

Les aminopeptidases ont l'activité la plus forte en hydrolysant pratiquement la totalité des courts peptides hydrophobes responsables de l'apparition du goût des fromages (Desmazeaud, 1998). Une fraction de ces peptides est susceptible d'exercer des effets bénéfiques chez le consommateur après l'ingestion de ce lait fermenté. Ces peptides sont désignés peptides fonctionnels ou encore peptides bioactifs.

Un grand nombre de ces peptides exerce des effets bénéfiques sur la santé, d'où leur attribution du nom de peptides bioactifs, exerçant plusieurs actions positives à savoir les effets inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), antimicrobiens, immunomodulateurs, opioïdes, liants minéraux, antioxydants et antithrombotiques (Ebner *et al.*, 2015).

I.1.6.5. La synthèse d'exopolysaccharides et viscosité des aliments fermentés

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exo-cellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini (Dupont, 1998). En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yaourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (Desmazeaud, 1983).

I.1.6.6. La synthèse de bactériocine et la compétitivité trophique

Les bactériocines sont des substances bactériennes de nature protéique dotées d'un pouvoir antibactérien dirigé contre des bactéries taxonomiquement proches du microorganisme producteur.

Ces peptides antibactériens ont une action contre les bactéries à Gram positif responsables de l'altération de la qualité hygiénique des aliments et à certaines pathologies humaines (Klaenhammer, 1994 ; Chaalel *et al.*, 2015 ; Chaalel *et al.*, 2017). D'autres agents

antimicrobiens sont également produits : le dioxyde de carbone, l'acide acétique, le diacétyle et l'acétaldéhyde (Drider, 2009).

I.2. L'intolérance au lactose

I.2.1. Prévalence ethnique et géographique de l'intolérance au lactose dans le monde

L'intolérance au lactose concerne environ 70% de la population adulte mondiale, alors que sa prévalence aux pays occidentaux varie de 4 à 50%, tandis que dans certains pays comme le Pakistan, elle est d'environ 60% (Priebe *et al.*, 2002).

L'intolérance au lactose touche entre 70 à 90% des Grecs des, arabes des africains, des japonais, des thaïlandais, mais seulement 15% des occidentaux souffrent d'intolérance au lactose (Emond, 2004).

La perte d'expression de l'activité lactasique n'est pas une maladie, mais plutôt une évolution naturelle. En effet, tout mammifère, une fois sevré, perd graduellement sa faculté à digérer le lactose. On estime que l'hypolactasie touche environ 75 % de la population mondiale adulte, avec de grandes différences selon l'origine ethnique des individus. Elle est observée chez 20 % des Européens du Nord, 40 % des Européens méditerranéens, 70 % des Africains et 90 % des Asiatiques (Sahi, 1994).

L'intolérance au lactose a été signalée comme plus fréquente chez les patients ayant une maladie intestinale inflammatoire chronique (40 %) (Zhao *et al.*, 2010), elle pourrait par contre être moins fréquente chez ceux présentant une maladie cœliaque (10 %) (Zhao *et al.*, 2010).

Chez les 31 patients ayant une pullulation microbienne, la prévalence de l'hypolactasie est similaire à celle de la population générale, mais le ressenti des symptômes est nettement supérieur (Zhao *et al.*, 2010).

Les études épidémiologiques ont montré que le statut lactasique était réparti différemment selon les zones géographiques et les ethnies. Les populations présentant les plus grandes proportions de sujets « lactase persistants » sont situées en Europe du Nord, chez leurs descendants d'Amérique du Nord et dans des tribus africaines et bédouines. En France, la fréquence du phénotype « lactase non persistante » est de 20 % dans le Nord et 50 % dans le Sud, cette malabsorption du lactose est donc fréquente (Sibley, 2004).

I.2.2. Symptômes et mécanismes de l'intolérance au lactose

Symptômes :

C'est un ensemble de symptômes gênants provoqués par la difficulté ou l'incapacité à digérer le lactose (« sucre de lait ») à cause de l'absence ou de la diminution de la production par l'organisme d'une enzyme digestive, la lactase.

Les personnes qui n'ont pas assez de lactase pour digérer la quantité de lactose qu'ils consomment peuvent se sentir très mal à l'aise quand ils digèrent les produits laitiers. Les symptômes communs, qui vont de légers à sévères, comprennent nausée, crampes, ballonnement, gaz et diarrhée. Les symptômes commencent à propos de 30 minutes à 2 heures après avoir mangé des aliments contenant lactose. La sévérité des symptômes dépend de nombreux facteurs, y compris la quantité de lactose qu'une personne peut tolérer et l'âge (Fig. 2).

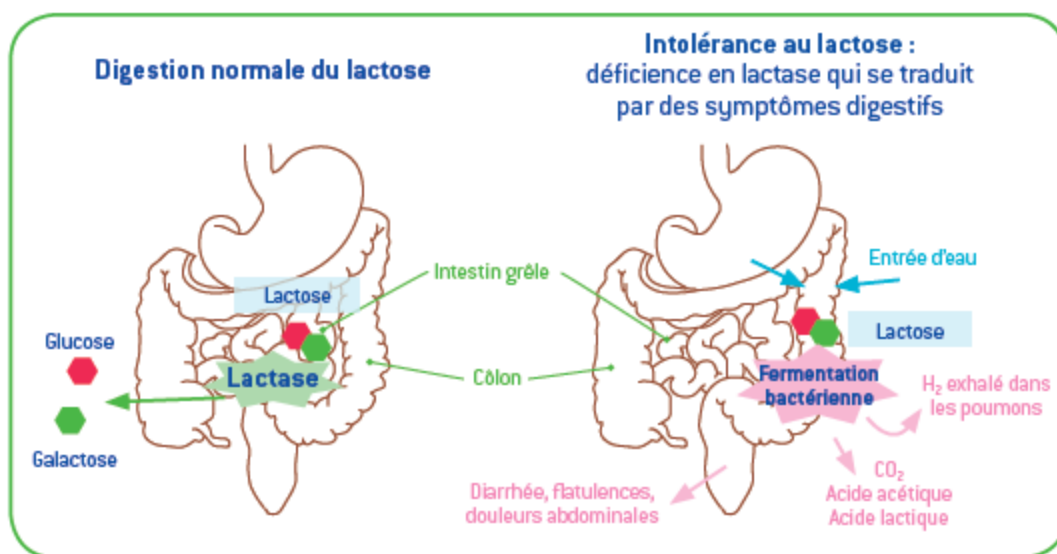


Figure 2 : Mécanismes de maldigestion du lactose (Burgain *et al.*, 2012).

En plus des symptômes digestifs, de l'intolérance au lactose : la fraction de lactose non digéré qui parvient au côlon est fermentée par la flore colique, conduisant à la production de lactate, d'acides gras volatils et de gaz (H₂, CO₂).

L'intolérance sévère au lactose est relativement rare. Généralement, la plupart des intolérants peuvent consommer jusqu'à 12 g de lactose (équivalent à ¼ de litre de lait) sans

troubles particuliers. Certains supportent jusqu'à 50 g de lactose sans aucun symptôme alors que d'autres sont intolérants dès 3 g (Marteau *et Marteau*, 2005).

I.2.3. Cohérence entre l'arrêt graduel de synthèse de lactase après le sevrage et l'apparition de l'intolérance au lactose chez l'homme adulte

Selon Emond, (2004) et Savaino *et al.* (2006) l'activité lactasique de l'intestin de l'embryon est maximale dans le dernier trimestre de la grossesse et à la naissance, au moment de sevrage cette activité diminue progressivement jusqu'à atteindre des valeurs très basses après le sevrage maternel chez 70 à 75% de la population mondiale (Dainese-Plichon *et al.*, 2014), c'est l'hypolactasie (Raul, 2001), la raison de déclin de lactase n'est pas élucidée, ce déficit primaire est considéré selon (Bhatnagar et Aggraval, 2007 ; Lomer *et al.*, 2008) normal physiologiquement.

I.2.4. Origine de l'intolérance au lactose

I.2.4.1. La prédisposition génétique

La déficience congénitale en lactase, est un trouble génétique irréversible très rare (le plus souvent trouvé chez les individus d'origine finlandaise) dans laquelle un enfant est né sans la capacité de pouvoir produire de la lactase. Les bébés touchés par cette forme sont incapables d'allaiter ou de consommer du lait maternisé régulier, requérant une préparation spécialisée sans lactose. Ils sont incapables de développer la capacité de digérer le lactose (Delacour *et al.*, 2017).

I.2.4.2. Autres origines

La déficience primaire en lactase est occasionnée par une diminution de la production de lactase qui débute en petite enfance pendant la transition de la consommation du lait humain à la consommation d'une variété d'aliments. Cette réduction en lactase provoque des symptômes dont la gravité varie et est le type le plus courant d'intolérance au lactose (Dacosta, 2001).

La déficience secondaire en lactase est attribuable à un autre facteur tel qu'une maladie primaire (p. ex., maladie cœliaque, maladie de Crohn ou gastroentérite) une antibiothérapie prolongée, des traitements de radiation ou de chimiothérapie, ou une grave

malnutrition. Cependant, cette affection de nature habituellement temporaire se résorbe souvent avec l'amélioration de la nutrition et de la santé (Raul, 2001).

La carence secondaire en lactase survient lorsque des lésions de l'intestin grêle ou certaines maladies digestives réduisent la quantité de lactase produite, comme la maladie cœliaque, les maladies inflammatoires de l'intestin et la maladie de Crohn (Raul, 2001).

I.2.5. Moyens de lutte contre l'intolérance au lactose

L'hypolactasémie n'est pas considérée comme une maladie, c'est un trait génétique qui concerne plus de la moitié de la population humaine. Cependant elle n'entraîne pas de manifestations cliniques (intolérance au lactose) que lorsqu'elle provoque une malabsorption du lactose. Celle-ci dépend de l'importance du déficit en lactase, des quantités de lactose consommées, de l'environnement alimentaire et du type de produit laitier consommé. Le plus souvent c'est à partir de 12 g de lactose (250 ml de lait) qu'une intolérance apparaît (Schlienger, 2017).

L'insuffisance en lactase est extrêmement fréquente, mais elle ne nécessite un traitement diététique que si elle est symptomatique ce qui est beaucoup moins fréquent. Le degré d'éviction du lactose alimentaire doit être ajusté au niveau d'activité résiduelle de la lactase. Dans les formes secondaires, l'éviction doit être généralement plus rigoureuse que dans les formes acquises à l'âge adulte (Schlienger, 2017).

Un régime d'éviction du lactose ne devrait être commencé qu'après l'établissement et la confirmation d'un diagnostic de certitude. Les autodiagnostic se révèlent souvent faux en raison d'une confusion avec des troubles fonctionnels intestinaux.

La diminution des apports en lactose et *a fortiori* l'éviction du lactose ne doivent pas se faire au détriment de l'équilibre alimentaire. Il faut tenir en compte la satisfaction des besoins calciques en choisissant des eaux calciques. Certains aliments contiennent naturellement du calcium tels que les œufs, moules, huîtres, noix, persil, haricots verts, poireau...). Les suppléments de calcium peuvent aussi se révéler utiles (Schlienger, 2017).

Le lait sans lactose et les produits laitiers exempts de lactose constituent de bonnes alternatives. Ils possèdent la même valeur que les produits traditionnels. Seule différence : la

quantité de lactose a presque été réduite à zéro (teneur résiduelle en lactose $<0,1\%$) à l'aide d'une lactase extraite à partir de levures (*Kluyveromyces fragilis* et *Kluyveromyces lactis*).

En effet, l'enzyme Lactase scinde le lactose en ses deux sucres élémentaires, le glucose et le galactose, qui sont faciles à digérer. Mais comme ceux-ci ont un pouvoir sucrant supérieur, le lait sans lactose a un goût légèrement sucré (Migros, 2019).

En cas d'intolérance au lactose, une seule solution pour faire disparaître ces maux peu agréables: diminuer ou supprimer, en fonction de son propre "seuil de tolérance", la consommation de lactose.

Le seuil de tolérance au lactose est variable en fonction des individus. Il est influencé par plusieurs facteurs tels la quantité de lactase résiduelle, la charge en lactose mais aussi le temps de transit, la sensibilité viscérale et la flore intestinale etc.

Le lait contient naturellement un sucre particulier qui est le « lactose ». Or, pour digérer le lactose, l'organisme doit sécréter la lactase. Celle-ci permet de séparer le lactose en deux molécules bien distinctes : le galactose et le glucose.

Le lait sans lactose peut être :

- Soit un lait dont le lactose a été éliminé ;
- Soit un lait additionné de la lactase qui libère dans le lait du galactose et du glucose : ces molécules, alors absorbées sans aucun problème par les personnes intolérantes au lactose, en leur permettant de digérer le lait sans difficulté.

Le lait délactosé est adapté aux personnes intolérantes au lactose à des degrés différents, ce qui représente plus ou moins 75 % de la population à l'échelle planétaire, des adultes dans la grande majorité des cas. Ce qui est finalement tout à fait logique puisque l'organisme humain (hormis durant les premiers mois de la vie) ne produit pas suffisamment de lactase pour digérer le lait de vache (Schlienger, 2017).

Le lait sans lactose est, dans ces cas précis idéal, car il permet à ces personnes intolérantes au lactose de continuer à consommer du lait et de bénéficier de ses bienfaits pour la santé.

Il faut savoir que le lait dé lactosé est aussi bien bénéfique pour la santé que le lait non dé lactosé :

- Il conserve ses qualités nutritionnelles.
- Il est très digeste.
- Il permet aux personnes intolérantes au lactose d'éviter de nombreux symptômes liés à cette intolérance, à savoir : flatulences, spasmes intestinaux, diarrhées.
- Il peut être consommé au quotidien, soit nature, soit introduit à de nombreuses recettes.

Le lait végétal est une alternative au lait de vache. Il existe une diversité de laits végétaux comme le lait d'amande, de soja, de pois chiche, de noisette, de coco, de pistache, de blé, d'épeautre, de sarrasin... Ils sont réalisés à partir de céréales, de légumineuses, de fruits à coque, de graines ou de tubercules. Ils sont plus digestes et bons pour votre organisme, car ils contiennent des minéraux, des acides gras essentiels et des vitamines (Schlienger, 2017).

Pour ceux qui apprécient leur saveur, il existe des yaourts et autres desserts réalisés avec des laits végétaux. Il est aussi possible de faire soi-même ses laits et yaourts végétaux.

Comparé aux autres laits, le profil nutritif du lait de soja se rapproche le plus de celui du lait de vache." Le lait de soja est une bonne source de protéines, et la plupart des produits à base de soja contiennent des compléments en calcium, riboflavine, et vitamines A, D et B12 (Schlienger, 2017).

I.2.5.1. Le lait dé lactosé (technique de fabrication, valeur alimentaire comparée à celle du lait normal, indiquer le seuil maximal de lactose toléré par la législation)

Le lait dé lactosé est obtenu par un procédé biochimique qui consiste à ajouter une enzyme : la lactase, qui scinde le lactose en deux sucre (glucose et galactose). C'est la même réaction qui se produit dans le corps humain. La lactase est une enzyme obtenue par fermentation bactérienne. Le lait conserve ses qualités nutritionnelles comme le calcium, les protéines et les lipides avec un goût légèrement sucré (Lait plaisir, 2018) (Fig.3).

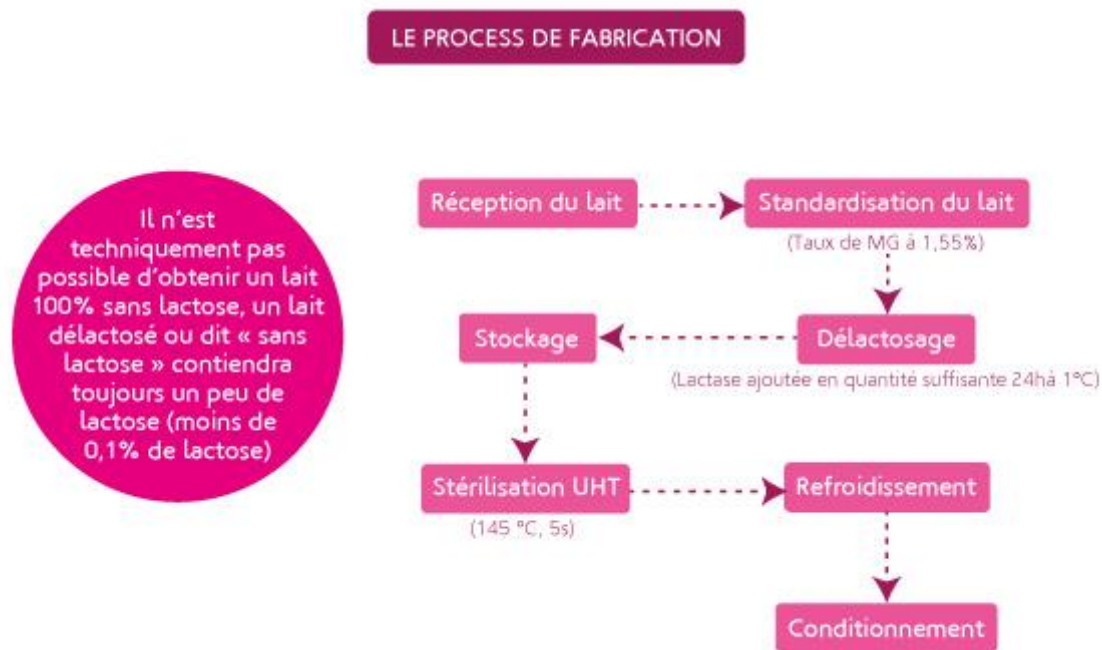


Figure 3 : Processus de dé lactosage du lait (Lait plaisir, 2018).

Le lait dé lactosé et les produits laitiers exempts de lactose sont obtenus par l'utilisation de la lactase afin d'éliminer la majeure portion en lactose qui constitue le lait. Ces produits dé lactosés possèdent la même valeur nutritive du lait normal, ils contiennent du lactose à raison de moins de 0,1% par rapport au lait normal qui contient environ 50 g/l (Schlienger, 2017).

I.2.5.2. Les laits fermentés et autres produits contenant du lactose

Dans le cas d'intolérance au lactose acquise commune, ces individus préservent une certaine activité lactasique et on estime qu'ils conservent une tolérance résiduelle au lactose. La capacité de digestion du lactose est d'au moins 7 g de lactose par prise, soit 150 ml de lait, ce qui peut se décliner en pratique par une éviction limitée aux produits laitiers les plus riches en lactose (Tab. 1).

Tableau 1: Teneur en lactose pour 100g d'aliment (Schlienger, 2017).

Groupe d'aliments	Teneur en lactose (g/100g)
Laits	
Lait entier	4,8
Lait écrémé	5,0
Lait en poudre écrémé	51
Lait en poudre entier	35
Lait condensé sucré	10,2
Lait caillé	4,5
Lait dé lactosé	0,1
Lait maternel	5,0- 9,5
Petit lait en poudre	66
Lait de brebis	4,4
Lait de chèvre	4,2
Lait de chamelle	3,3-5,5
Fromages	
Fromage frais	3,5
Fromage affiné	Traces
Camembert	0,1-1,8
Roquefort	2,0
Emmenthal	0,1
Fromage blanc	2,0-3,5
Fromage de brebis	0,1
Yaourt	
Yaourt nature	3,0
Yaourt nature fait maison	0,0
Yaourt aromatisé	3,0-4,0
Yaourt au lait de chèvre	2,0
Yaourt au lait de brebis	2,2
Divers	
Crème fraîche	2,5
Glace à la crème	5-7
Beurre	0,6
Margarine	0,0-1,0
Kéfir	3,6
Chocolat au lait	9,5
Spaghetti	7,0
Charcuteries	4,0

Certains produits manufacturés contiennent du lactose dont la présence peut ne pas être mentionnée sur l'étiquette comme par exemple dans la charcuterie, pâtisserie, viennoiserie et certaines boissons sucrées. Il ne faut pas oublier que le lactose est un excipient médicamenteux d'utilisation courante.

I.2.5.3. Les compléments alimentaires anti-intolérance au lactose

Le manque de lactase peut, de temps en temps, être compensé par la prise de compléments alimentaires contenant cette enzyme. Consommée juste avant le repas, l'enzyme contenue dans les compléments alimentaires gagne les intestins en même temps que les produits laitiers ou les aliments contenant du lactose, permettant leur assimilation.

La prise de comprimés de lactase permet une meilleure absorption et la diminution ou la disparition des symptômes lors de la consommation d'un aliment contenant du lactose. Ils ne nécessitent pas d'ordonnance et constituent une aide ponctuelle, mais ne remplacent pas le régime.

Il existe dans le marché plusieurs marque de compléments alimentaires anti-intolérance au lactose, on peut citer par exemple : Kérutabs, Lactose OK (revogan), SimilaseLacto (metagenics), Lactozyme (energeticanatura), Lactolérance etc.

Ces compléments alimentaires améliorent la digestion du lactose chez les personnes ayant du mal à le digérer. Il évite les symptômes de l'intolérance au lactose.

I.2.5.4. Les régimes diététiques réducteurs de l'inconfort digestif

Dans le cas d'intolérance complète au lactose, l'éviction des produits laitiers et des produits contenant du lactose est plus rigoureuse (lait et produits laitiers, lactosérum). La liste des aliments autorisés se restreint et le maintien de l'équilibre alimentaire ne peut se faire qu'au moyen de produits de substitution : laits délactosés, eaux riches en calcium, etc. (Tab. 2).

Tableau 2 : Aliments à éviter en cas d'intolérance au lactose, en fonction degré de l'insuffisance en lactase (Schlienger, 2017).

Régime sans lactose strict	Régime pauvre en lactose	Aliments autorisés sans limites
<ul style="list-style-type: none"> - Laits sous toutes les formes - Crème - Riz au lait - Beurre - Yaourt - Fromages non affinés et à pâtes molles - Céréales et boissons de petit déjeuner - Chocolat au lait - Viennoiseries et pâtisseries - Flocons de pommes de terre pour purée instantanée - Plats cuisinés de commerce - Sauces au lait - Protéines animales sans précision - Excipients de lactose (médicaments) 	<ul style="list-style-type: none"> - Lait - Crème - Fromage frais - Crème glacée 	<ul style="list-style-type: none"> - Poisson - Viande - Œuf - Fromage à pâte dure - Lait dé lactosé - Fruits et légumes - Légumineuses - Féculents et céréales natifs - Dérivés de soja - Graines oléagineuses

Les fromages fermentés obtenus après coagulation ne contiennent plus de lactosérum et donc de lactose. Quant aux yaourts, ils contiennent une bêta-galactosidase bactérienne présente dans les ferments lactiques, qui est active tout au long du tractus digestif. Lorsque les laits fermentés sont thermisés cette propriété disparaît. Les laits dé lactosés ont un intérêt chez les sujets intolérants mais pas chez les autres (Lecerf, 2017).

Le régime sans lactose vise à éviter lait d'origine animale, mais aussi crème fraîche ou liquide, beurre, yaourts, faisselle et autres fromages.

Pour remplacer ces produits laitiers, il existe de nombreuses alternatives telles que le " lait végétal " ou boisson végétale à base de soja, d'amande, de noisette, de riz, de coco, d'épeautre, ... Le beurre végétal, les crèmes "soja cuisine" ou "amande cuisine" ainsi que les yaourts au soja ou au riz sont, eux aussi, de plus en plus commercialisés.

Pour répondre correctement aux besoins journaliers recommandés en protéines, en calcium et en vitamine D, il est important de suivre une alimentation variée et équilibrée, comprenant poissons gras, céréales complètes, légumes verts, crucifères, légumineuses et oléagineux (Lecerf, 2017).

I.2.5.5. La consommation de probiotiques

Chez les mammifères, la lactase, enzyme permettant de cliver le lactose en glucose et galactose, est produite par les entérocytes des microvillosités intestinales. Sa synthèse est maximale après la naissance puis diminue progressivement avec le sevrage. Certaines personnes présentent un déficit en lactase, ne leur permettant plus de digérer correctement le lactose, le principal glucide du lait.

Le lactose s'accumulant ainsi dans l'intestin, sera fermenté par les bactéries, provoquant un inconfort intestinal (ballonnements, flatulences, nausées, diarrhée) dont les causes restent mal comprises. La consommation de probiotiques, sous forme de yaourts ou laits fermentés ou complément alimentaire, améliore ces symptômes, en apportant des bactéries lactiques produisant la β -galactosidase, enzyme bactérienne équivalente à la lactase.

De plus, dans les produits laitiers fermentés, le lactose est en grande partie déjà dégradé par les bactéries lactiques, permettant un apport moindre en lactose qu'en consommant du lait. *Bifidobacterium lactis* et *Lactobacillus bulgaricus*, notamment, ont démontré leur efficacité pour soulager les symptômes de l'intolérance au lactose (Oak and Jha, 2019).

I.3. La lactase

I.3.1. Nomenclature internationale et structure

La lactase est une enzyme présente chez les mammifères et certaines bactéries. Sa fonction principale est de permettre la dissociation du lactose en glucose et galactose, ce qui autorise la digestion du lait.

La lactase a pour nom scientifique complet *lactase-phlorizine hydrolase* et fait partie de la famille des β -galactosidases. Elle est constituée de 1927 acides aminés et son poids est de 218603 Da. Sa température optimum est de 37 °C et son pH optimum est de 6,5 (ces données peuvent varier selon les types de lactase) (Montgomery *et al.*, 2007).

Chez l'humain, elle est produite uniquement par la bordure en brosse de l'intestin grêle, ce qui est lié à son rôle digestif (Montgomery *et al.*, 2007).

I.3.2. Processus de synthèse intestinale de lactase et son évolution selon l'âge

La lactase intestinale est une enzyme protéique enzymatique composée de 4 sous-unités semblables deux à deux. Chez l'Homme, cette enzyme est sécrétée dans l'entérocyte et glycosylée par le mannose au niveau de l'appareil de Golgi, elle n'est pas exprimée dans les cellules cryptiques, mais apparaît quand les entérocytes deviennent matures le long des microvillosités intestinales.

Son expression, qui peut être hétérogène d'un entérocyte à l'autre, n'est pas inductible par le lactose ingéré (même pendant longtemps), mais est soumise à un contrôle génétique. Elle est ancrée par une liaison hydrophobe au niveau de la membrane microvillositaire de la bordure en brosse de l'intestin grêle et son activité un pH optimum est de 6 (Coti *et al.*, 2000 ; Montgomery *et al.*, 2007).

La lactase a été identifiée dès 1903 en tant qu'enzyme de type hydrolase, puis plus précisément en tant que bêta-galactosidase, elle est capable d'hydrolyser une liaison osidique portée par un β -galactose (Benkebil et Rouillet, 2007 ; Sahi, 1994), Il a été démontré qu'elle exerçait deux activités enzymatiques distinctes :

- Hydrolyse le lactose en glucose et en galactose,
- Hydrolyse la phlorizine, un hétéroside présent dans l'écorce de certains arbres fruitiers.

C'est de cette double fonction que la lactase tire son nom complet de "lactase-phlorizine hydrolase" ou LPH (Arribas *et al.*, 2000 ; Montgomery *et al.*, 2007 ; Sahi, 1994). Les deux activités enzymatiques sont situées sur la même chaîne polypeptidique, mais sur 2 sites distincts (activité lactase portée par région IV de l'enzyme). La LPH est surtout connue pour sa fonction lactase, c'est-à-dire pour son rôle dans assimilateur du lactose impliquant directement la digestion du lait (Arribas *et al.*, 2000 ; Forsgad, 2019).

Plusieurs mécanismes ont été invoqués dans le déclin physiologique de l'activité lactasique avec l'âge : arrêt de la transcription de l'ARNm de la lactase, erreurs de transfert ou dégradation de l'ARNm hors du noyau, transformation secondaire en une forme inactive, dégradation au niveau de la bordure en brosse par les enzymes digestives, accentuation des mécanismes responsables de l'hétérogénéité des entérocytes quant à leur expression de la lactase sur une même villosité. Jusqu'à présent, on ne connaît pas de moyen physiologique ou thérapeutique pour augmenter l'expression de la lactase intestinale chez l'homme.

Cependant, on peut augmenter la digestion du lactose en ingérant de la lactase par exemple en consommant du yaourt, car les bactéries lactiques vivantes présentes dans cet aliment en contiennent (Marteau *et al.*, 1990).

I.3.3. Production industrielle de lactase (espèce de microorganismes concernés)

De nombreux organismes ont été sélectionnés en raison de leurs niveaux élevés d'activité lactase pour un usage commercial (Tab.3). Même si les levures (enzyme intracellulaire), les champignons ou les moisissures (enzyme extracellulaire) sont connus pour produire de la β -galactosidase (Geikas et Lopez-Leiva, 1985), les sources bactériennes sont préférables en raison de la facilité de fermentation, des activités élevées d'enzyme et bonne stabilité.

Les sources de β -galactosidase exploitées commercialement sont d'origine microbienne, principalement la levure et les moisissures. Les propriétés des lactases de différentes sources sont illustrées sur le tableau 2. Le pH optimal se situe dans la plage de 6,0 à 7.

Les lactases des Champignons ont un pH optimal dans la plage d'acide (2,5 à 4,5) et les lactases bactériennes ont un pH optimal dans la région presque neutre (6,5 à 7,5). Ainsi, les lactases fongiques sont utilisées l'hydrolyse acides du lactosérum, tandis que la levure et les lactases bactériennes conviennent au lait (pH 6,6) et hydrolyse du lactosérum doux (pH 6,1). Les préparations commerciales de lactase sont présentées au tableau 3 (Geikas et López-Leiva, 1985).

En raison des capacités de sécrétion, de la stabilité et de la simplicité de purification de l'enzyme, encore la souche *Bacillus* est l'une des souches les plus utilisées pour la lactase production. Les bacilles les plus couramment utilisés dans l'industrie sont *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis*. Quel que soit l'organisme source, à long terme la stabilité de l'enzyme continue de poser problème (Sani *et al.*, 1999).

Les souches de lactobacilles sont les probiotiques couramment utilisés dans l'industrie. C'est bien connu β -galactosidase est une enzyme intracellulaire, et il n'est pas libéré à l'extérieur de cellules dans des conditions de fermentation conventionnelles (Wang *et al.*, 1997).

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 11842, utilisé dans la production de yaourt, est capable de produisant des niveaux relativement élevés de β -galactosidase intracellulaire par rapport à autres cultures laitières (Bury et Jelen 2000). Il existe un besoin évident d'une β -galactosidase stable à haute et basse température

et pourrait être approuvé comme GRAS pour l'hydrolyse du lactose dans le lait et autres produits laitiers (Kim et Rajagopal, 2000).

Différentes réparations commerciales de β -galactosidases issues de différentes espèces sont fabriquées à travers le monde, le tableau 3 en illustre quelques exemples (Geikas and López-Leiva, 1985).

Tableau 3: Organismes producteurs de β -galactosidase.

Catégorie	Source	Nom du produit	Commentaires
Levures	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces</i> (<i>Saccharomyces</i>) <i>fragilis</i> <i>Kluyveromyceslactis</i>	Neutral Lactase Hydrolact Maxilact	Utilisé pour l'hydrolyse du lactosérum
Organes animaux	Intestin Cerveau et peau		
Bactéries	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus belatericus</i> <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillushelveticus</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Streptococcuslactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Thermus aquaticus</i>	Acidophilas (Wakunaga Probiotics)	Contient l'enzyme Lactase
Champignons	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Curvulariainaqualis</i> <i>Mucor meibei</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Neurospora crassa</i>	Valio Lactase F Amano Enzeco	Utilisé pour l'hydrolyse du lactosérum
Plantes	Amande Abricot Baies de café Grains de kéfir Pêche		

Différentes propriétés des β -galactosidases qui sont en fonction de l'organisme producteur, les tableaux 4 et 5 illustrent quelques exemples de ces β -galactosidases (Geikas and López-Leiva, 1985).

Tableau 4 : Différentes propriétés des β -galactosidases (Geikas and López-Leiva, 1985).

Sources	pH optimum	Temperature optimum	Poids moléculaire (KD)	Activation des ions D'autres remarques
<i>A. niger</i>		55-60	124	
<i>A. oryzae</i>	3,0 -4,0	50-55	90	
<i>K. fragilis</i>	5,0	37	201	
<i>K. lactis</i>	6,9-7,3	35	135	Mn ⁺² , K ⁺
<i>E. coli</i>	7,2	40	540	Mn ⁺² , Na ⁺
<i>L. thermophilus</i>	6,2-7,1	55-57	530	K ⁺ , Na ⁺
<i>C. inaequalis</i>	3,4-4,3	30-55		Haute activité pour le lait écrémé
<i>B. circulans</i>	6,0	60-65		
<i>Bacillus sp.</i>	6,8	65		
<i>L. bulgaricus</i>	6,5-7,5	42-45		
<i>S. Thermophilus</i>		55	500-600	

Tableau 5: Préparations commerciales de β -galactosidases (Geikas and López-Leiva, 1985).

<p><i>Aspergillus niger:</i> Baxter Laboratories, USA Dairy Food Labs, USA</p> <p><i>Kluyveromyces ou Sacchroaromyces lactis:</i> Gist-Brocades, Holland Nutritional Biochemical, USA</p> <p><i>Kluyveromyces ou Sacchroaromyces fragilis:</i> Kyowa Hakko Kogyo, Japan Novo A/S, Denmark (Lactozym)</p> <p><i>Escherichia coli:</i> CF Boeringer GmbH, Mannheim, Germany Worthington Biochemical Corp, USA</p> <p>Les préparations de levures sont fournis par: British Drug House, England DEBI, Italy</p> <p>Préparations fongiques: Miles Laboratories, USA</p>

I.3.4. Mécanisme d'action de la lactase

Le mécanisme d'hydrolyse du lactose a été expliqué en utilisant l'enzyme β -galactosidase obtenue à partir d'*Escherichia coli* (Jacobson, 1994). Wallenfels et Malhotra (1961). En littérature, il est proposé que le site actif de la β -galactosidase contienne des acides aminés comprenant de la cystéine et d'histidine qui fonctionnent comme donneur de proton et accepteur de proton, respectivement.

L'acide aminé cystéine contient le groupe sulfhydryle agissant en tant que donneur de proton et les résidus d'histidine contiennent le groupe imidazole a agi en tant que site nucléophile pour faciliter le clivage de la liaison glycosidique, l'hydrolyse enzymatique (Mahoney, 1998 ; Zhou et Chen, 2001) (Fig.4).

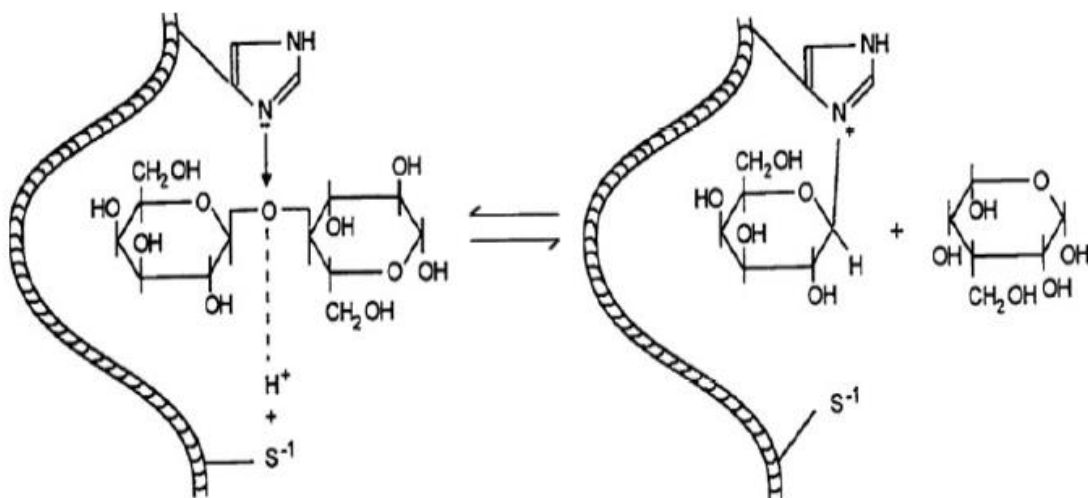


Figure 4: Mécanisme proposé de l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase. (Richmond *et al.*, 1981).

La deuxième réaction qui se produit est appelée réaction de galactosyle (transgalactosyle). Dans cette réaction, la β -galactosidase transfère le fragment galactosyle de l'intermédiaire à un accepteur contenant un groupe hydroxyle (Mahoney, 1998).

Lorsque cet accepteur est de l'eau, du galactose libre est formé par hydrolyse. Cependant, sous certaines conditions, d'autres sucres peuvent agir en tant qu'accepteurs et donner lieu à des la formation d'oligosaccharides (Mahoney, 1998) (Fig. 5).

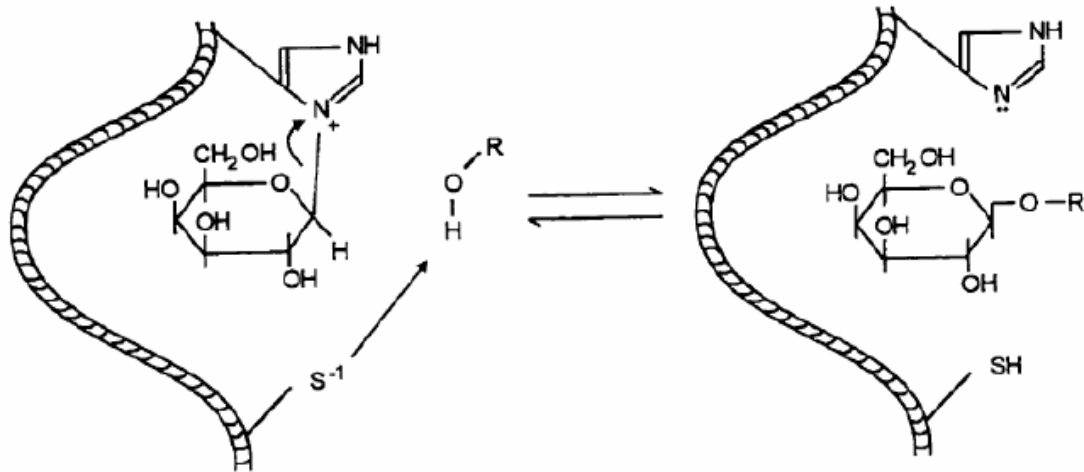


Figure 5: Mécanisme proposé pour la réaction de transfert de β -galactosyle par la β -galactosidase (Richmond *et al.*, 1981).

I.3.4.1. Le substrat de la lactase : le lactose (structure).

I.3.4.2. Formation d'oligosaccharides.

L'hydrolyse enzymatique du lactose s'accompagne d'un transfert de galactosyle vers d'autres les sucres, produisant ainsi des oligosaccharides. Le montant et la nature de la formation d'oligosaccharides par la réaction transgalactosylique dépend principalement de l'enzyme la source et la nature et la concentration du substrat. Le rendement en oligosaccharides peut être augmenté en utilisant un substrat plus élevé et / ou en diminuant la teneur en eau (Mahoney, 1998). Quantitativement, le disaccharide allolactose est l'un des principaux des oligosaccharides produits par la β -galactosidases à pH neutre (Mahoney, 1998).

C'est aussi produit primaire transférase (Huber *et al.*, 1976). Aux fortes concentrations initiales de lactose, la production maximale d'oligosaccharides peut être atteinte entre 30 et 40% du total sucres présents. Cependant, à des niveaux initiaux de lactose plus bas, tels que ceux trouvés dans le lait et lactosérum, l'activité transférase est réduite, où les niveaux maximums d'oligosaccharides peuvent atteindre à 25% (Huber *et al.*, 1976).

Les oligosaccharides sont hydrolysés lentement, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ils peuvent être considérés comme une fibre alimentaire de faible poids moléculaire, non visqueuse, soluble dans l'eau. Elles sont considérées comme des aliments physiologiquement fonctionnels qui favorisent la croissance de bifidobactéries dans le côlon et une grande variété de bienfaits pour la santé ont été revendiqués dans connexion avec cet effet. L'apparition et la disparition des oligosaccharides est ont été étudiés en tenant compte de la cinétique de l'activité transférase (Mohoney, 1998).

I.4. Effet des bactéries lactiques sur l'intolérance au lactose

I.4.1. Effet des ferments lactiques du yaourt

Les bactéries lactiques du yaourt digèrent le lactose au niveau intestinal et améliorent la digestion des personnes qui le digèrent mal. Pour cette raison, bien qu'il contienne 4,6g de lactose pour 100g le yaourt est bien toléré par les populations dont la lactase intestinale est faible. Le yaourt est fabriqué à partir de lait concentré (enrichi en poudre de lait) incubé après ensemencement de souches de *Lactobacillus bulgaricus* (LB) et de *Streptococcus thermophilus* (ST).

A l'issue de sa fabrication, il contient 4,6% de lactose, comme le lait. Pourtant, toutes les populations, y compris non caucasiennes, en consomment et le tolèrent parfaitement. On trouve en effet des « yaourts » (ou laits fermentés) consommés traditionnellement aussi bien en Inde, en Chine, en Mongolie, en Russie ou en Turquie qu'en Europe.

Certaines études montrent que l'activité lactasique persiste dans le duodénum après l'ingestion de yaourt. La paroi des bactéries lactiques protège en fait leur lactase de l'effet des enzymes des milieux gastrique et intestinal, et en cas de consommation de yaourt, ce dernier contribue à cette protection en assurant un effet tampon, ce qui assure la conservation de la lactase produite par les ferments lactiques tout au long du tube digestif. On notera que l'activité lactasique dépend notamment de la concentration en bactéries, qui doit être d'au moins 10^8 par gramme (Savaiano, 2014).

En pratique, le yaourt est bien toléré par tous les individus et même recommandé aux personnes digérant moins bien le lactose (Savaiano, 2014).

I.4.2. Effet des ferments lactiques des fromages

Les fromages sont produits grâce à la fermentation du lait par les bactéries lactiques. Au cours de ce processus, une certaine quantité de lactose est convertie en acide lactique. Par conséquent, le yogourt est généralement bien toléré, particulièrement s'il contient des cultures bactériennes actives qui favorisent la digestion du lactose (Zaitlin *et al.*, 2013 ; Rabot *et al.*, 2010).

De plus, la consistance semi-solide du yogourt ralentit la vidange gastrique et le transit gastro-intestinal, allouant plus de temps pour la digestion du lactose (Bailey *et al.*, 2013 ; Heyman, 2006).

À l'exception des fromages fondus et des fromages frais (cottage, ricotta, fromage blanc...), les fromages affinés contiennent naturellement très peu de lactose. Pendant le processus de fabrication de ces fromages, 80 à 90 % du lactose est éliminé sous forme de lactosérum lors de la fabrication ; le reste se décompose au cours du vieillissement du fromage.

Quelques exemples de fromages qui contiennent très peu de lactose sont la Mozzarella, le Cheddar, le Suisse, le Brie et le Bleu (Tab.6) (Bailey *et al.*, 2013 ; Suchy *et al.*, 2010).

Tableau 6 : Teneur en calcium et en lactose de certains fromages et laits (Santé Canada, 2010).

Produit laitier	Teneur en calcium (mg)	Teneur en lactose (g)
Fromage Cheddar, 50 g	360	0,12
Fromage Suisse Emmental, 50 g	396	0,03
Fromage Mozzarella, 50 g	252	0,04
Fromage Parmesan, 50 g	554	0,08
Lait entier, 1 tasse	291	13,01
Lait partiellement écrémé, 2% M.G., 1 tasse	302	12,92
Lait partiellement écrémé, 1% M.G., 1 tasse	322	13,41
Lait écrémé, 1 tasse	316	13,18

Chez les personnes ayant reçu un diagnostic d'intolérance au lactose, diverses approches peuvent être employées afin de continuer à consommer du lait notamment sous forme de certains produits laitiers fermenté à faible teneur en lactose, comme c'est le cas par exemple des fromages à pâte pressée cuite, tel que le parmesan ou l'emmental, et ceci dans le cadre d'une saine alimentation.

I.4.3. Système de transport du lactose par les ferments lactiques

La plupart des cellules bactériennes ont la capacité d'utiliser plusieurs glucides sous forme de carbone et source d'énergie et possède diverses protéines de transport et enzymes cataboliques pour le métabolisme des différents glucides (Poolman, 2002). Les systèmes par lesquels les molécules de glucides transportées peuvent être subdivisées en 3 classes qui diffèrent dans leur mécanisme de couplage énergétique (Poolman, 1993):

- (a) Systèmes de transport primaires.
- (b) Systèmes secondaire de transport.
- (c) Systèmes de phosphotransférase (PTS).

Celles-ci différents mécanismes de transport ont été observés pour une grande variété de sucres mais seuls ceux qui interviennent dans le transport du lactose (galactoside) par les bactéries lactiques être décrit en détail.

En cas de transport du lactose, les systèmes de transport secondaires et le PEP - PTS sont généralement utilisé dans les bactéries lactiques (Hickey *et al.*, 1986). Ces deux mécanismes utilisent différents enzymes pour catalyser la réaction d'hydrolyse du lactose.

La β -galactosidase est l'enzyme marqueur du système de transport secondaire, d'un autre côté, la β -galactosidase est une enzyme marqueur du phosphoénolpyruvate dépendant système phosphotransférase (PEP-PTS) (Hickey *et al.*, 1986 ; Poolman 2002 ; Postma *et al.*, 1993).

Dans le système de transport secondaire, le lactose n'est pas modifié chimiquement. Mais dans le cas PEP-PTS, la translocation du lactose à travers la membrane cytoplasmique est couplée à la modification chimique de la molécule, à savoir le transport suivi avec phosphorylation du lactose par PTS.

I.4.3.1. Système de transport primaire

Les systèmes de transport primaire utilisent l'énergie tirée de l'hydrolyse d'une liaison chimique riche en énergie (par exemple, ATP); (Fig.6) pour la translocation d'un sucre. Dans les bactéries lactiques, les transporteurs de cassettes de liaison à l'ATP constituent la classe la plus abondante de transporteurs dans les systèmes de transport primaire.

Les transporteurs de cassettes ATP-binding sont utilisés non seulement pour accumuler des substrats et des solutés compatibles, mais aussi pour excréter produits indésirables tels que les médicaments (Poolman, 1993). Le nombre de molécules d'ATP hydrolysé par soluté pris par les ATPases de transport est très probablement 1-2 qui rend ces transporteurs énergiquement coûteux par rapport au transporteur d'ions transporteurs, systèmes d'échange et PTS. En aval de généralement accepté (putatif) les gènes ATPase de transport du lactose de *Lc. lactis*, deux couplés en traduction des gènes (*lacL* et *lacM*) se sont avérés coder pour une galactosidase fonctionnelle (*LacZ*) *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* et *E. coli* (Fig. 6) (Poolman, 1993).

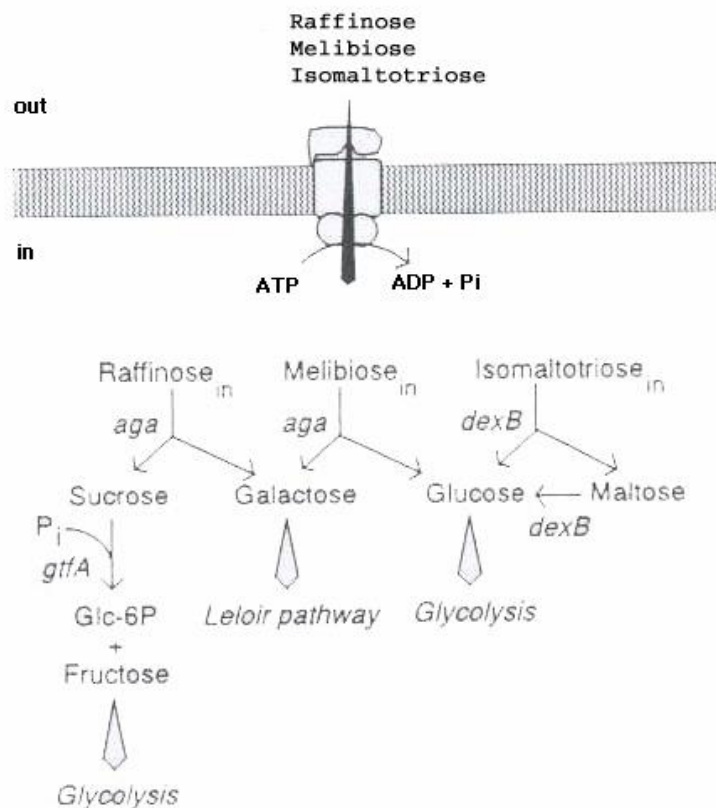


Figure 6: Transport de sucres à ATPase et métabolismes multiples. *aga*, α -galactosidase; *dexB*, dextran glucosidase; *gtfA*, sucrose phosphorylase (Poolman, 1993).

I.4.3.2. Système de transport secondaire

Dans le système de transport secondaire, la translocation d'une molécule de sucre est fournie par le gradient de concentration en sucre, et, si une autre molécule est co ou contre transportée avec l'hydrate de carbone, le gradient (électro) chimique de ce couplage molécule, c'est-à-dire que l'accumulation est obtenue par le mouvement de descente d'une autre molécule (Poolman, 1993) (Fig.7).

Dans *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aussi bien que chez *Streptococcus thermophilus*, on sait que le lactose est transporté par le système de transport secondaire (Delcour *et al.*, 2000 ; Poolman 1993).

Ces transporteurs de lactose s'avèrent spécifiques non seulement du lactose (β -galactoside), mais également pour le mélibiose (α -galactoside), le galactose (monosaccharide) à une moindre ampleur pour le raffinose (trisaccharide).

La perméase LacS agit en opposition avec le galactose (non métabolisable dans la plupart des souches de *Streptococcus*) libérées à l'intérieur de la cellule par le β -galactosidase à partir du lactose, elle agit également (à une efficacité plus faible) en relation avec H^+ (Delcour *et al.*, 2000). Il a été récemment suggéré que le transporteur de galactoside de *S. thermophilus* comme un antiport strict de lactose / galactose n'est pas correct.

Bien que la réaction d'échange lactose / galactose puisse être favorisé dans de nombreuses conditions, le mode d'échange reflète simplement des étapes partielles, réactions en avant et en arrière sans translocation nette de protons, d'un cycle de translocation impliquant l'absorption de sucre et de protons d'un côté et la libération sur l'autre côté de la membrane et la réorientation du substrat chargé et non chargé des sites de liaison.

Les gènes de transport du lactose (*lacS*) de *S. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* sont organisés en un opéron qui contient également le gène de la β -galactosidase (*lacZ*) (Poolman, 1993).

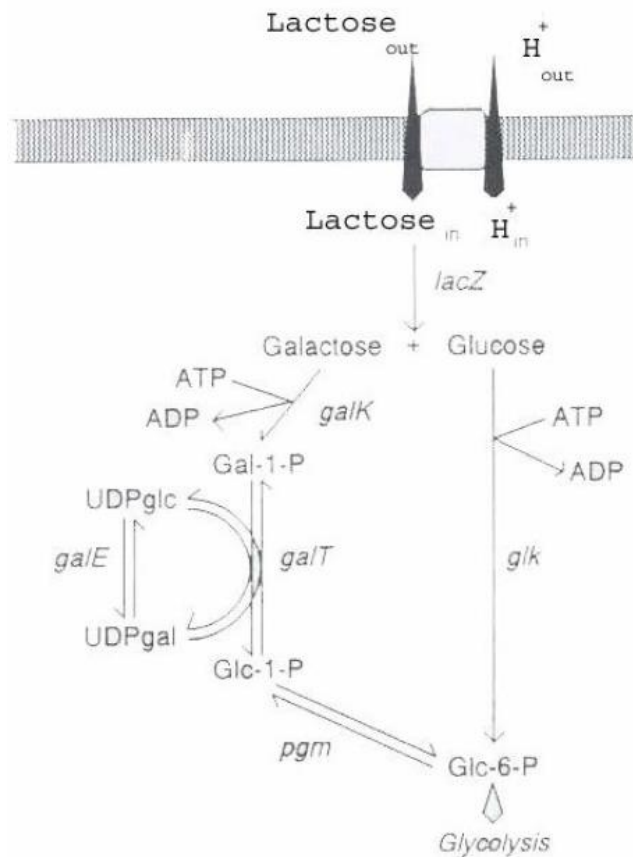
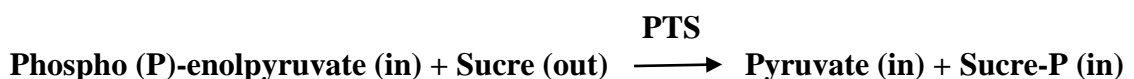


Figure 7: Voie Leloir : Symport Galactoside- H^+ . *lacZ*, β -galactosidase; *galK*, galactokinase; *galT*, UDPglucose: galactose 1-phosphate uridylyltransferase; *galE*, UDPglucose 4-epimerase; *pgm*, phosphoglucomutase; *glk*, glucokinase (Poolman, 1993).

I.4.3.3. Système de phosphotransférase dépendant de la phosphoenolpyruvate (PEP-PTS)

Le système PEP-PTS est impliqué à la fois dans le transport et la phosphorylation d'un grand nombre de glucides (Figure 6). Indépendamment de l'organisme ou des glucides, tous les PTS qui ont été caractérisés catalyser le processus global suivant :



La phosphorylation des glucides est couplée à sa translocation à travers la membrane, l'énergie pour ces processus étant fournie par le PEP intermédiaire glycolytique. Dans la plupart des bactéries gram-positives et dans quelques plasmides contenant des souches

d'entérobactéries, le galactose et le lactose disaccharidique sont des glucides PTS (Postma, 1993). Le lactose spécifique au PTS et la P- β -galactosidase (P- β -gal) ont seulement été décrits chez les bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactobacillus*.

Certaines différences fondamentales se retrouvent entre genres en ce qui concerne leur ordre génique, leurs éléments régulateurs, les gènes qui les accompagnent et la localisation génétique (Gosalbes *et al.*, 1997).

Ce système de phosphotransfert multi composant est constitué des deux systèmes cytoplasmiques généraux : les protéines (enzyme I (IE) et HPr (protéine thermosensible)) et deux protéines spécifiques au sucre.

Une des paires spécifiques au sucre (III_{sugar}) peut être cytoplasmique ou librement associé à la membrane cellulaire, tandis que l'autre est une protéine membranaire intégrale (II_{sugar}) qui reconnaît, lie et facilite la translocation du substrat (Thomson, 1988). Sur la Figure 8, une représentation schématique du cycle lactose, PTS-glycolyse dans *S. lactis* est illustrée (Thomson, 1988).

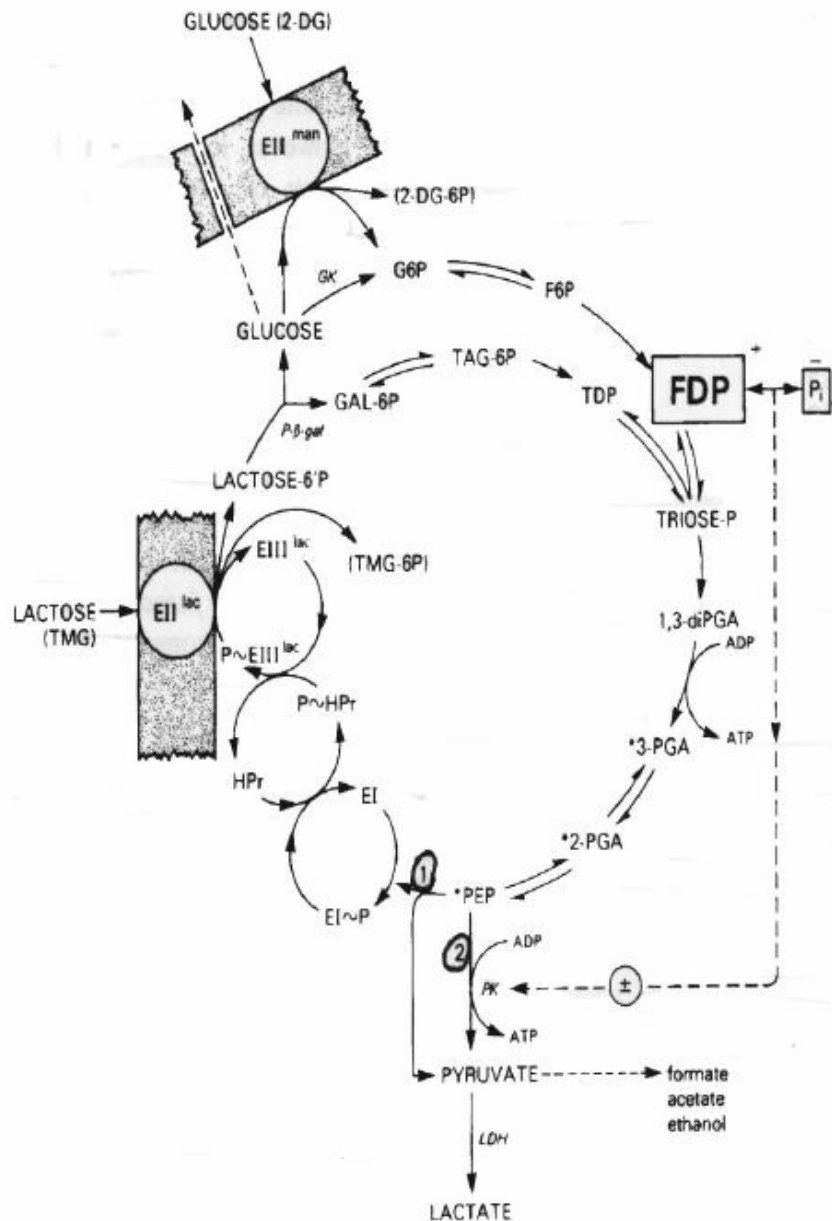


Figure 8: Diagramme représentant le lactose-PTS et le cycle de glycolyse in *S. lactis*. Les numéros 1 and 2, montrent la distribution du PEP au lac-PTS ou à la phosphokinase (PK), respectivement. Les symboles (+) and (-), indiquent les effecteurs positifs et négatifs de la PK ; constituant du potentiel PEP dans les cellules affamées (Thomson, 1987).

I.4.4. Facteurs conditionnant l'expression de l'activité lactasique intestinale des ferments lactiques

Les ferments lactiques des produits laitiers fermentés et notamment ceux du yaourt contiennent naturellement une lactase leur conférant la capacité d'hydrolyser le lactose et par conséquent de se nourrir à partir de ce disaccharide (Greenberg and Mahoney, 1984). La lactase bactérienne est inactive dans le yaourt de pH 4 conservé à + 4 °C, mais devient active dans l'intestin grêle lorsque les ferments lactiques vivants y parviennent, notamment au niveau du duodénum où les conditions physico-chimiques s'approchent des conditions optimales du fonctionnement de cette enzyme (+37 °C, pH = 7) (Kolars *et al.*, 1984).

Le lactose Le yaourt est digéré plus efficacement que d'autres sources laitières de lactose parce que les bactéries inhérentes au yaourt aident à sa digestion. La lactase bactérienne survit aux conditions acides de l'estomac, apparemment protégé physiquement dans les cellules bactériennes et facilité par la capacité tampon du yaourt (Savaiano *et al.*, 2014).

L'augmentation du pH le yaourt entre dans l'intestin grêle et un transit gastro-intestinal plus lent laisser le temps à la lactase bactérienne d'être active, en digérant suffisamment le lactose du yaourt pour prévenir les symptômes chez les personnes intolérantes au lactose.

Comparés aux yaourts sans saveur, les yaourts aromatisés semblent présenter activité de la lactase légèrement réduite, mais sont toujours bien tolérés.

L'autodigestion du lactose par les bactéries contenues dans le yaourt améliore son absorption par rapport aux autres produits laitiers, en cas de déficit en lactase personnes. Le yaourt contient un nombre suffisant de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* (comme dans la plupart des yaourts commerciaux) est très bien toléré par les personnes ayant une déficience dans la digestion de lactose, puisqu'il représente un supplément d'enzyme lactase pour l'intestin des personnes intolérantes au lactose (Savaiano *et al.*, 2014).

I.4.4.1. La concentration minimale des ferments lactiques dans l'aliment véhicule

Lin *et al.* (1991) ont démontré dans une étude réalisée sur plusieurs souches bactériennes et à différentes doses ont été comparées chez des individus intolérants au lactose. Dans cette étude la maldigestion du lactose a été contrôlée en mesurant excrétion d'hydrogène dans l'air expiré des individus étudiés, ils ont noté que la dose standard

de bactéries du yaourt (10^8 /mL) a entraîné une réduction significative de la teneur en hydrogène, cette étude a montré qu'une réduction de 10 fois de la dose de bactéries du yaourt rendait leur activité lactase inefficace.

Il y a peu de différence dans la capacité en lactase de différents yaourts commerciaux, car ils contiennent généralement des ferments composés de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en quantités suffisantes (10^8 bactéries/mL) (Savaiano *et al.*, 2014).

I.4.4.2. La barrière acide gastrique

Il existe différents produits laitiers produites en utilisant les ferments lactiques chaque produit possède un pH spécifique. Cependant, le yaourt se caractérise par sa capacité tampon nécessitant près de 3 fois plus d'acide pour changer son pH de 4,1 à 2,0 que ce qui est nécessaire pour acidifier le lait. Le pH gastro-intestinal est influencé par cette capacité tampon, comme en témoigne le pH gastrique 2,7 restants pendant 3 h après l'ingestion de yaourt.

Cela peut aussi expliquer en partie comment la lactase survit au passage dans l'estomac ; l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne peut également jouer un rôle (Martini *et al.*, 1987).

Dans une autre étude, réalisée par Pochard *et al.* (1989), ont constaté que la lactase n'est pas dégradée pendant au moins 60 min après yaourt ingéré, même si certaines bactéries perdent leur viabilité. L'ingestion de yaourt a affecté le pH duodéal, qui a diminué 15 min après l'ingestion et est resté à une valeur de l'ordre de 5.1. Alors que l'activité de la lactase *in vitro* dans le yaourt était maximale à un pH de 7, il diminue de 80% lorsque le pH est inférieur à 5. Par conséquent, l'activité de la lactase dans le duodénum a augmenté après l'ingestion yaourt frais, puis diminué à mesure que le pH duodéal baisse (Pochard *et al.*, 1989).

Cette étude a montré également qu'après l'ingestion de yaourt frais, les cultures viables starter atteignent le duodénum en exerçant une activité lactase, ce qui a été confirmé précédemment par les résultats obtenus par Kolars *et al.* (1984). Cependant, cela suggère également que le pouvoir tampon du yaourt, qui protège les bactéries du milieu acide gastrique, pourrait avoir un effet inhibiteur sur la lactase microbienne dans le duodénum. Les auteurs ont suggéré que la digestion du lactose par la lactase microbienne pourrait avoir lieu dans le jéjunum ou l'iléon du petit intestin ou moins probablement dans le côlon.

Il a été confirmé par la suite que plus de 90% du lactose dans le yaourt est digéré dans l'intestin grêle, aidé par un ralentissement du temps de transit gastrointestinal (Marteau *et al.*, 1990).

I.4.4.3. Les conditions physiologiques intestinales (pH, sécrétions digestives, bile, etc.

Le pH varie beaucoup tout au long du tractus digestif, étant acide (pH 1–2,5) dans l'estomac et augmentant jusqu'à 6,6 dans l'intestin grêle proximal puis 7,5 dans l'iléon terminal. Cette variabilité du pH affecte l'activité de la lactase *in vivo* du yaourt. À 48 °C et son pH post-fermenté final de 4, le yaourt possède une activité minimale de la lactase (Kolars *et al.*, 1984). Cependant, l'incubation à un pH de 7 et 37°C et la sonication, augmentent sensiblement son activité lactase à 25 U/g, une quantité suffisante pour hydrolyser 95% de la charge de lactose en 4h (Kolars *et al.*, 1984).

D'autres études ont également documenté les effets du pH (Pochard *et al.*, 1989). L'activité lactase du yaourt augmente également en présence de bile, comme indiqué *in vitro*, peut-être en augmentant la perméabilité cellulaire pour permettre à davantage de substrat d'entrer dans les cellules bactériennes (Noh *et al.*, 1994).

Ainsi, l'activité de la lactase dans le yaourt est susceptible de varier selon les sites gastro-intestinaux et devrait montrer une activité maximale à un pH approximativement neutre de 7 ; il n'est donc pas surprenant que l'activité lactase du contenu duodéal ait été rapportée après l'ingestion de yaourt (Kolars *et al.*, 1984).

CHAPITRE II

MATERIELS

ET

METHODES

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Isolement des souches à partir de lait de chèvre et de chamelle

La présente étude utilise des souches bactériennes isolées à partir de laits de chèvre et de chamelle collectés dans le Sud algérien.

II.1.1. Collecte et préparation des échantillons de lait pour l'isolement des souches

Un total de 12 échantillons de lait cru ont été collectés de différentes régions du Sahara algérien (6 échantillons de lait de chèvre dont 3 proviennent de Bechar et 3 d'El-Bayadh et 6 échantillons de lait de chamelle dont 3 proviennent de Tindouf et 3 de Bechar).

La collecte du lait a été réalisée selon les règles d'hygiène et d'asepsie recommandés en microbiologie. Le lait cru a été recueilli dans des flacons stériles étiquetés, après un lavage et rinçage des pis des animaux suivi d'une élimination des premiers jets de lait. Les laits sont immédiatement mis sous froid et acheminés au laboratoire pour analyse.

Dix (10) mL d'échantillon de lait ont été ajoutés à 90 mL de solution saline stérile et après homogénéisation vigoureuse des échantillons, une série de dilutions décimales de (10^{-1} à 10^{-5}) a été réalisée. La suspension a été utilisée pour préparer des dilutions en série appropriées allant jusqu'à 10^{-5} en incorporant 1 mL à 9 mL de solution saline stérile dans des tubes stériles.

Les lactobacilles ont été cultivés sur de la gélose De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (CMO 361 Oxoid England) selon [De Man *et al.* \(1960\)](#).

Une quantité de 15 à 20 mL de gélose MRS stérile (45 à 50°C) a été versée dans des boîtes de Pétrie stériles contenant 1 mL d'échantillon dilué à tester. Les inoculums sont répartis dans tout le milieu par une légère rotation des boîtes dans un sens puis dans le sens inverse.

Les boîtes inoculées ont été laissées pendant 5 à 10 minutes pour se solidifier, puis incubées à 37 °C pendant 48 à 72h.

II.1.2. Isolement, purification et conservation des souches

Seules les boîtes de pétrie contenant moins de dix colonies chacune ont été retenues pour subir des examens macroscopique et microscopique (coloration de Gram) ([Guiraud, 2004](#)).

Les bactéries présentant les caractéristiques des bactéries lactiques ont été transférées dans 10 mL de bouillon MRS approprié, puis purifiées par repiquage en stries répétées sur du MRS solide avant d'être incubées 24h à 37°C. Toutes les souches ont été conservées à -80 °C dans un bouillon de culture contenant du glycérol (40%) et ont été repiquées deux fois avant leur utilisation.

II.2. Caractérisation phénotypique des souches isolées

II.2.1. Examens macroscopique et microscopique des cultures

Ils consistent à observer les aspects macroscopique et microscopique des colonies apparues sur le milieu d'isolement. C'est à partir des colonies blanchâtres caractéristiques aux *Lactobacillus* que l'on réalise une coloration de Gram (Larpent & Larpent-Gourgaud, 1997) pour s'assurer de la présence de cellules à Gram positif et également pour noter leur morphologie et leur mode d'agencement. Une recherche de la catalase (Kandler et Weiss, 1986 ; Sharpe, 1979) est également effectuée.

Ces examens nous permettent de repiquer et purifier seulement les colonies Gram positif et catalase négative sur le milieu MRS.

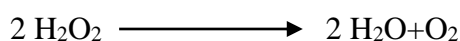
II.2.2 Coloration de Gram

Sur les frottis fixés et préparés précédemment, nous avons ajouté quelques gouttes de gentiane qu'on laisse agir 1 min. Le colorant est éliminé et la préparation est recouverte de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 sec.

Cette préparation est répétée une deuxième fois. Ensuite, la préparation est décolorée à l'alcool 90°. Une fois la décoloration obtenue, la lame est lavée à l'eau distillée. Enfin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1 min. La lame est lavée à l'eau distillée et séchée. L'observation microscopique est faite à l'immersion à l'objectif 100 (Microscope ZEISS, Germany) (Larpent & Larpent-Gourgaud, 1997).

II.2.3 Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme existant chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence d'oxygène, et elle permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée diluée 10 fois, et à dissocier directement un peu de la culture prélevée sur milieu solide (Kandler and Weiss, 1986 ; Sharpe, 1979).

Lecture : Si la souche examinée possède une catalase, un dégagement de bulles gazeuses est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme.

II.2.4 Détermination du profil fermentaire des souches isolées

Une série de tubes de bouillons MRS-BCP dépourvu de sucre, d'extrait de viande et contenant le pourpre de bromocresol (BCP) à raison de 0,04g/l de, puis ajouter aseptiquement le sucre à tester à une concentration finale de 1 % par tube (Tourneur, 1972). Les sucres testés sont (Lactose, sucrose, mannitol, xylose, maltose et tréhalose). Après 48h d'incubation à 37°C, le virage de la couleur au jaune signifie la fermentation de ce sucre.

II.2.5 Croissance des souches isolées en présence de 4% NaCl

Les bactéries sontensemencées dans des tubes de milieu MRS à 4% de NaCl et incubées 24h à 37°C. La croissance de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin.

II.2.6 Croissance à différentes température (15,37 et 45°C)

Ce test permet de différencier les souches mésophiles des thermophiles, il est réalisé dans des tubes de bouillons MRS.

La lecture est appréciée par la présence d'un trouble dans les tubes après une incubation de 24 à 72h en comparaison avec des tubes MRS nonensemencés.

II.2.7 Hydrolyse de l'Arginine (ADH)

La mise en évidence de l'Arginine dihydrolase est réalisé dans le but de mettre en évidence le rôle de cette enzyme dans la libération de l'ammoniac à partir de l'arginine, pour chaque souche isolée on ensemence un tube de bouillon Moeller arginine ainsi qu'un tube témoin (sans arginine), on recouvre les tubes avec l'huile de paraffine stérilisée (V/V).

Le milieu de Moeller à l'arginine contient le bleu de bromocrésol comme indicateur de pH, un résultat positif se traduit par une couleur mauve à jaune pâle-violet, tandis qu'un résultat négatif se traduit par un virage au jaune vif, le tube témoin vire au jaune et garde la couleur (Moeller, 1955 ; Chen *et al.*, 1982).

II.3 Caractérisation génétique des souches

II.3.1 Extraction de l'ADN génomique des souches

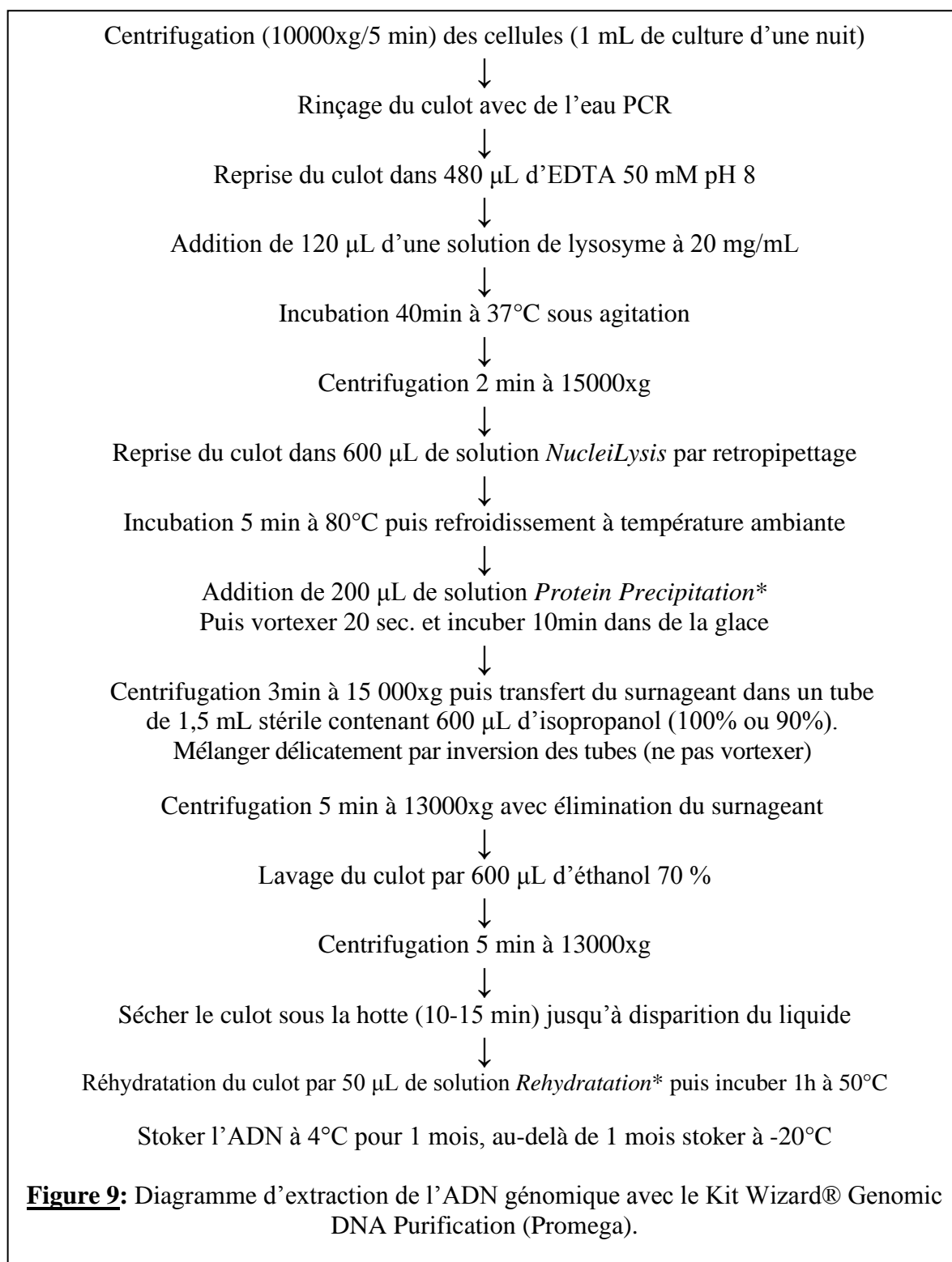
L'ADN total des bactéries lactiques est purifié à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Corp., Appl Microbiol. Biotechnol Madison, USA). Cette méthode rapide permet l'obtention d'acides nucléiques de bonne qualité directement utilisables pour différentes applications de biologie moléculaire.

La culture bactérienne en fin de phase exponentielle est centrifugée à 10000xg pendant 5 min (Eppendorf 5415R, Hamburg, Germany) puis le milieu de culture est éliminé. Le culot cellulaire est repris dans 480 μ L d'une solution d'EDTA 50 mM pH 8 contenant 120 μ L de lysozyme et incubé 40min à 37°C pour permettre la dégradation des parois bactériennes.

Après une nouvelle centrifugation à 15000xg pendant 2 min, le surnageant est éliminé et les protoplastes sont repris délicatement dans 600 μ L de tampon de lyse (NucleiLysis Solution). L'échantillon est alors incubé pendant 5 min à 80°C pour faciliter la lyse des cellules puis ramené à température ambiante. L'ajout de 2 μ L d'une solution de RNase A suivi d'une incubation de 30 min à 37°C permet d'éliminer toute trace d'ARN.

Les débris cellulaires sont précipités par ajout de 200 μ L de solution de précipitation (Protein Precipitation Solution) et par homogénéisation du mélange à l'aide d'un vortex pendant 20 sec. L'échantillon est ensuite placé 5 min dans la glace, puis centrifugé à 15000g pendant 3 min. Le surnageant est transféré dans un tube contenant 600 μ L d'isopropanol, l'ADN est précipité en réalisant plusieurs mélanges par inversion.

Après centrifugation, le culot est lavé avec 600 μ L d'éthanol 70%, et à nouveau centrifugé. Finalement, l'ADN est séché à l'air libre pendant 15 min puis repris dans 50 μ L d'eau bi-distillée et réhydraté pendant une nuit à 4°C (Fig. 9).



II.3.2 Identification des souches par séquençage 16S ADN ribosomal

L'amplification de l'ADN via la technique PCR nécessite que son intégrité soit comprise dans l'intervalle 1.7-2 car elle reflète sa pureté.

II.3.2.1 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne ou " PCR " (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant d'amplifier *in vitro* et de manière exponentielle un fragment d'ADN spécifique. Elle repose sur l'hybridation de deux courtes séquences oligonucléotidiques, appelées " amorces ", sur chacun des deux brins d'ADN du fragment cible, suivie d'une étape d'élongation des amorces par une ADN polymérase, générant ainsi une nouvelle matrice.

La PCR se déroule donc généralement en 3 étapes répétées 30 à 40 fois : dénaturation de l'ADN double brin, hybridation des amorces avec leur séquence complémentaire et élongation par l'ADN polymérase (Tab.7).

La liste des amorces utilisées au cours de l'étude est présentée dans le tableau 8. Dans la suite du document, les couples d'amorces utilisés pour chaque PCR sont indiqués dans le texte.

Tableau 7: Programme du thermocycleur pour la réaction PCR.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	5 min. à 95°C	1
Dénaturation	30 sec. à 94°C	25
Hybridation	30sec. à 48°C	
Extension	45 sec. à 72°C	
Extension finale	4 min. à 72°C,	1
Refroidissement	5 min. à 16°C	

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées.

Amorce	Séquence 5'-3'	Utilisation	Cible
968-GC-f	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCAC GGGGGG AACGCGAAGAACCTTA	PCR	Bactéries
1401-r	CGGTGTGTACAAGACCC	PCR	Bactéries

Ingrédients utilisés pour la PCR

- Buffer 10X (KCl-MgCl₂) : 5 μ L
- Désoxyribonucleotides triphosphates (dNTPS) à 2 mM : 1 μ L
- Primer plb 16s: (FW) à 20 mM : 1 μ L
- Primer mLb 16s: (RW) à 20 mM : 1 μ L
- MgCl₂ à 25 mM : 2 μ L
- Taq Polymérase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen) à 5 μ g/ μ L : 0.25 μ L.
- ADN à analyser.
- H₂O (QSP) : à calculer selon le volume final 25 ou 50 μ L.

Les produits PCR ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%. On dépose dans chaque puit 2 μ L du révélateur : Loding Dye orange + 10 μ L de l'ADN de chaque souche, et enfin 5 μ L de marqueur de poids moléculaire d'ADN : O'GeneRuler100 pb DNA Ladder, Fermentas (au milieu).

II.3.2.2 Electrophorèse des acides nucléiques

L'électrophorèse classique sur gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques selon leur taille grâce à un courant électrique. Les ADN chargés négativement migrent alors vers l'anode selon leur poids moléculaire. L'agarose (1.2% p/v) est dissoute à chaud dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2M, Acétate 1M, EDTA 0,05M pH 8). Un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET) fluorescent sous lumière UV, est ensuite ajouté à 0.2 μ g/mL.

Après polymérisation, le gel est déposé dans une cuve de migration contenant du tampon TAE 1X puis les échantillons d'ADN additionnés de 10% (v/v) de bleu de charge (glycérol 50%, TE 50%, bleu de bromophénol 0.25%) sont déposés dans les puits. La migration se déroule généralement à 90 V pendant 45 min. Les ADN sont révélés par exposition à la lumière UV.

II.3.2.3 Purification des produits PCR sur cellule microcon-Y 100

Cette procédure est indispensable dans le but d'éliminer les d TNPS, la Taq Polymérase et les débris d'ADN (fragments incomplets).

Procédure :

- Transférer dans la cellule le volume de produits PCR qui reste (25, 30 ou 40 μ L).
- Addition de 400 μ L d'eau PCR : dd H₂O.
- Centrifuger à 1000 g pendant 15 min.
- Refaire le lavage une 2^{ème} fois.
- Refaire le lavage une 3^{ème} fois.
- Récupération de l'ADN en inversant la cellule dans de nouveaux Eppendorfs et en déposant une quantité d'eau PCR à 60 °C, par centrifugation à 1000 g pendant 15 min.

Après cette purification, on a procédé à une quantification de l'ADN obtenu par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%, en comparant avec le marqueur de poids moléculaire d'ADN : O'GeneRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas.

II.3.2.4 Réaction de séquençage

Préalablement au séquençage, le produit de la réaction PCR est purifié sur membrane Microcon Y-100 (Millipore) puis quantifié sur gel d'agarose en référence à un marqueur de poids moléculaire, le mélange réactionnel est détaillé dans le tableau 9.

Tableau 9: Mélange réactionnel pour le séquençage d'ADN.

	Vol - (solution mère)	Quantité
Ready mix reaction*	1 μ L	
BigDyesequencing buffer*	2 μ L	
Amorce	3,2 μ L - (1 μ M)	3,2 pmol
ADN	X	5-15 ng
ddH ₂ O	Y	q.s.p 10 μ L
Volume final	10 μ L	

*ABI Prism® Big Dye® terminator v3.1 cycle sequenceng kit (Applied Biosystems)

II.3.2.4.1 Programme d'amplification

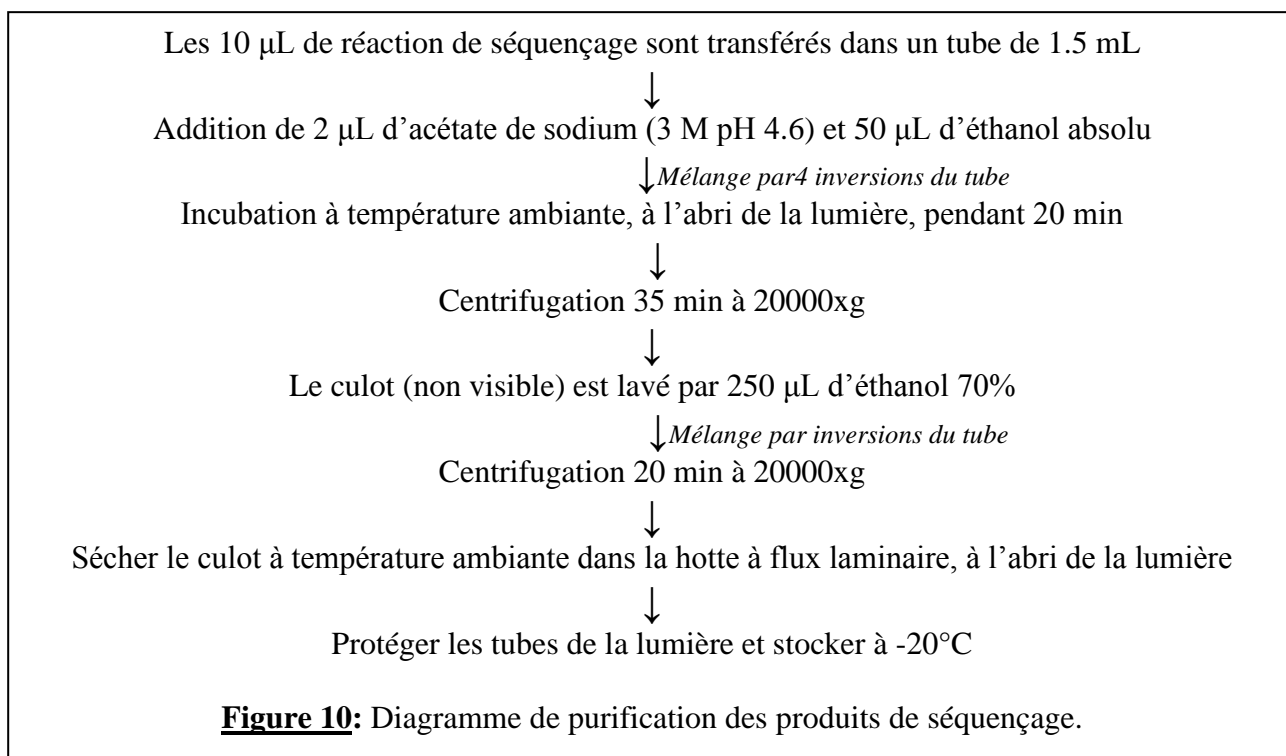
Les conditions PCR utilisées sont détaillées au tableau 10.

Tableau10 : Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	1 min. à 96°C	1
Dénaturation	10 sec. à 96°C	25
Hybridation	5 sec. à 50°C	
Elongation	4 min. à 60°C	
Refroidissement	5 min. à 16°C	1

II.3.2.4.2 Purification des produits de séquençage

Les produits de la réaction de séquençage sont purifiés par précipitation éthanolique selon le diagramme indiqué à la figure 10.



II.4 Etude de L'activité β -galactosidique des souches identifiées

II.4.1 Cinétique de croissance des souches identifiées sur milieu MRS et MRS lactosé

Dans le but de savoir le comportement des souches isolées en présence et en absence de lactose dans le milieu de culture, un suivi de la cinétique de croissance bactérienne a été effectué en microplaque toute une nuit à 37°C. Pour chaque souche, une suspension d'eau physiologique stérile estensemencée à partir des boites pétries.

Après agitation au vortex, 1×10^7 de chaque souche est déposé dans une microplaque contenant au préalable 200 μ L (une série de milieu MRS et une série de milieu MRS lactosé).

II.4.2 Etude de l'activité β -galactosidase

II.4.2.1 Extraction de l'enzyme

Il est connu que la β -galactosidase est une enzyme intracellulaire, en contacte avec la paroi cellulaire. Ainsi, pour avoir une récupération maximale de β -galactosidase, la combinaison de deux techniques (lysozyme EDTA et sonication) a été utilisée dans ce protocole.

Après 18 h d'incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4000 x g pendant 15 min à 4 °C. Le culot a été lavé deux fois avec un tampon phosphate de sodium 0.03 M (pH 6.8) et centrifugé à 4 000 \times g pendant 10 min à 4 °C.

Les culots lavés ont été remis en suspension dans 5 mL de Tampon phosphate 0.2 M (pH 6.8) pour l'extraction de l'enzyme. La mesure du rendement d'extraction de l'enzyme est exprimée en unités d'activité enzymatique.

II.4.2.1.1.Traitement au lysozyme EDTA

Une solution de lysozyme a été préparée en dissolvant 50 mg de lysozyme dans 1.5 mL de Tris- contenant 1 mM d'EDTA et 10 mM de Tris-HCl, ajusté à pH 8.0. La solution de lysozyme a été ajoutée à la suspension cellulaire au taux de 75 μ L par mL, puis ce mélange a

été incubé pendant 30 min à température ambiante, avant d'être maintenu à -20°C jusqu'à mesure de l'activité enzymatique.

II.4.2.1.2. Sonication

Les suspensions cellulaires ont été soniquées 3 fois dans un bain de glace par un sonicateur 150 MSE (MSE Instruments, Crawley, UK) selon la méthode de [Beccerra *et al.* \(2001\)](#), avec un intervalle de 30 sec. L'extrait a ensuite été centrifugé à 10 000 x g et à 4 °C pendant 15 min et le surnageant contenant l'enzyme brute a été conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation pour les dosages enzymatiques.

II.4.2.2 Mesure de l'activité enzymatique β -galactosidase

L'activité de la β -galactosidase a été déterminée selon la méthode décrite par [Hsu *et al.* \(2005\)](#). Le mélange réactionnel composé de 0.5 mL de surnageant contenant l'enzyme extraite et de 0.5 mL d'onicitrophényle β -D-galactopyranosi de (ONPG) 15 mM dans un tampon phosphate de sodium 0.03 M (pH 6.8). Après incubation pendant 10 min à 37 °C, 2mL de carbonate de sodium 0.1 M ont été ajoutés à mélange pour arrêter la réaction.

L'absorbance a été mesurée à 420 nm avec un spectrophotomètre (Modèle Helios R, Unicam Co., Cambridge, UK). Une unité de β -galactosidase a été définie comme la quantité d'enzyme qui a produit une micromole (μ M) d'o-nitrophénol par min.

II.5. Capacité de dégradation de lactose par les différentes souches cultivées sur lactosérum

II.5.1 Réactivation des souches

Les souches bactériennes ont été réactivées avant leur utilisation sur milieu MRS liquide. La première pré-culture est réalisée dans 15 mL de bouillon MRS contenu dans un tube à essaiensemencé par 0.15 mL à partir de la première réactivation, les cultures sont incubées à 37°C pendant 18h ([Dilmibouras, 2002](#) ; [Metlef et Dilmibouras, 2009](#)).

II.5.2 Origine et déprotéinisation du substrat lactosérum

Le lactosérum utilisé est de type acide et provient de la fromagerie de Sidi Saada dans la wilaya de Relizane. Ce lactosérum a été déprotéiné selon le protocole de [Moulin *et al.* \(1976\)](#) et dont le diagramme est indiqué à la figure 11.

Le lactosérum acide nécessite un ajustement de son pH à 4.6 par addition de NaOH (1N), avant d'être chauffé 5 min à 102°C au bain Marie. Il s'ensuit une filtration sur papier Wattman N°4 pour la déprotéinisation et cette opération est répétée 2 ou 3 fois jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide. Le filtrat recueilli est réajusté à pH=7 avec NaOH 1N avant d'être enrichi avec de la peptone, du glucose et de l'extrait de levure, puis stérilisé à 120°C pendant 20 min.

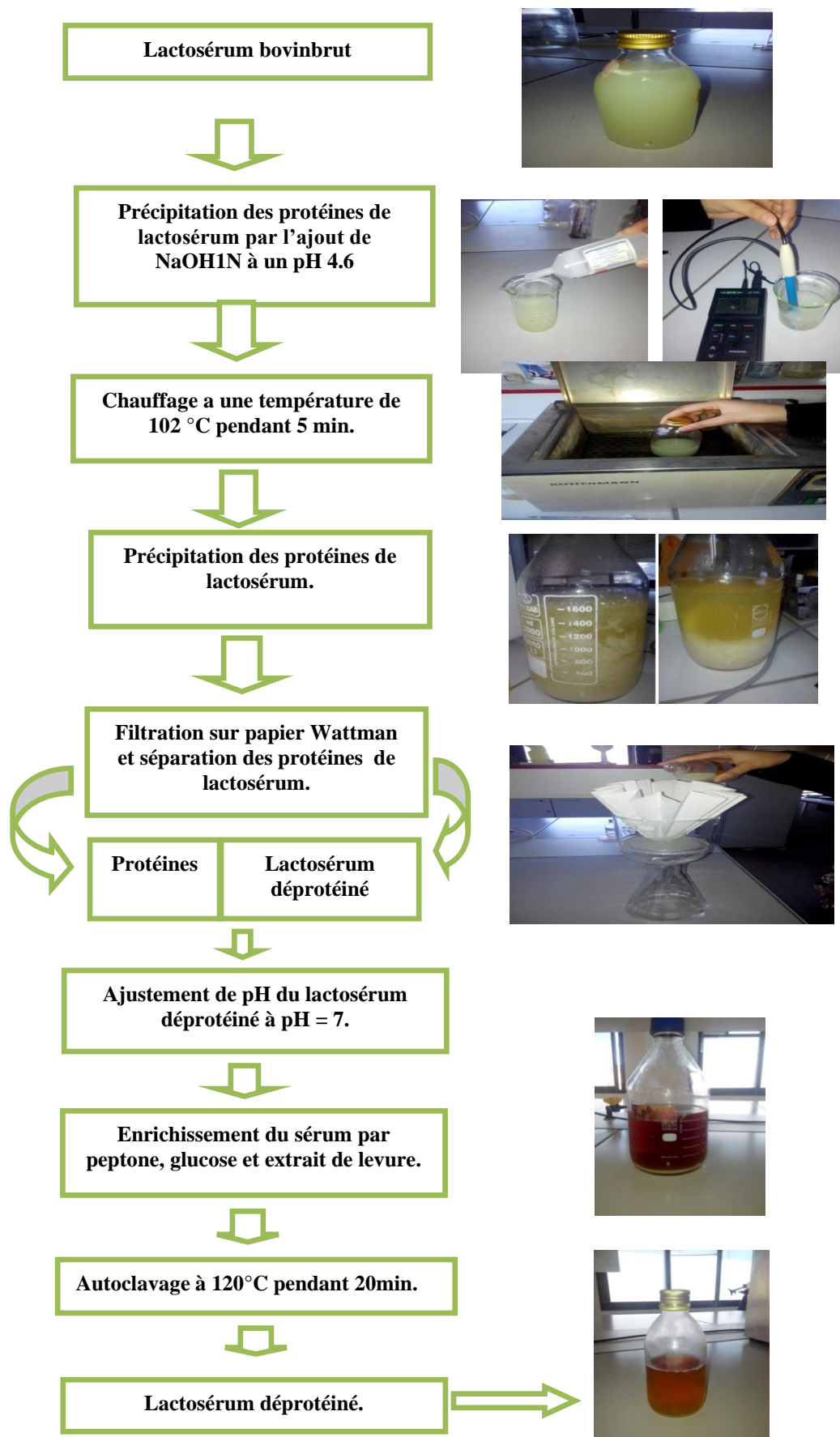


Figure 11: Diagramme de déprotéinisation du lactosérum (Moulin *et al.*, 1976).

II.5.3.Mise en culture

Après réactivation des souches dans du MRS liquide pendant 18h, un ensemencement de 10mL de chaque souche est effectué dans un flacon contenant 100mL de milieu de culture, puis on procède à une répartition de ce mélange (inoculum+ lactosérum) 5 tubes à essais de 22 mL qui sont incubés à 37°C pendant 12h.

II.5.4. Mesure de la croissance

La croissance des souches lactiques isolées a été déterminée indirectement par la mesure du pH et de la quantité de lactose métabolisée (appareillage Lactostar de marque FUNKE GERBER, Berlin, Germany) sur des prélèvements de fermentas effectués toutes les 2h pendant 12h(Fig.12).

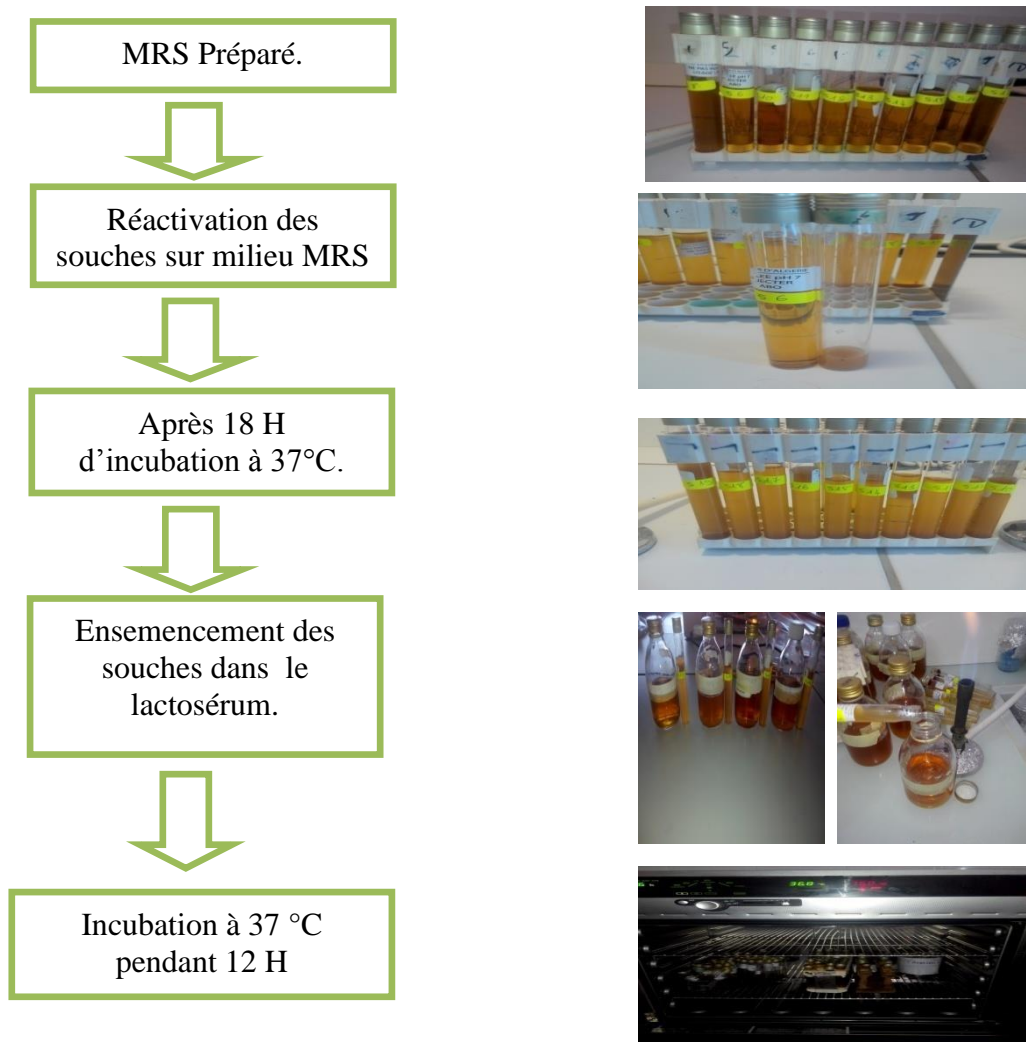


Figure 12 : Protocole de préparation des précultures.

II.6. Analyse statistique

Les résultats ont été traités statistiquement par analyse de variance bifactorielle suivie d'une analyse suivie d'une comparaison de moyenne par le biais du logiciel stat box 6.04 selon le test Newman et Keuls.

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

CHAPITRE III : Résultats et discussion

L'identification phénotypique ou selon le type fermentaire des espèces de microorganismes demeurent une vérité relative et non absolue en raison, parfois, de leur proximité phylogénique ; car un nombre croissant d'espèces diffèrent seulement en fonction d'un petit nombre de caractères biochimiques (Marroki *et al.*, 2011). Néanmoins, le phénotype et le type fermentaire restent un préalable très utilisé comme indices d'orientation de l'expérimentateur ou du manipulateur routinier dans le protocole d'identification des espèces de microorganismes.

C'est ainsi que dans le présent travail, l'identification phénotypique appuyée par celle basée sur le type fermentaire a permis de confondre les souches isolées au genre *Lactobacillus* et à trois espèces de ce genre : *plantarum*, *herbarum* et *brevis*. L'identité absolue de ces espèces a été déterminée selon leur génotype.

III.1 Isolement et identification des souches lactiques

Dans ce travail, nous avons pu isoler 40 souches dont 28 se sont révélés Gram positives et catalase négatives. Ces souches ont été retenues pour subir la suite des tests de confirmation de leur appartenance au genre *Lactobacillus*.

III.1.1 Identification phénotypique

L'examen macroscopique nous a permis d'observer des petites colonies blanchâtres régulières et lisses (Fig.13) et de sélectionner les bacilles qui se colorent positivement à la coloration de Gram et qui sont immobiles (Fig.14).



Figure 13 : Purification des souches isolées par la méthode des stries.

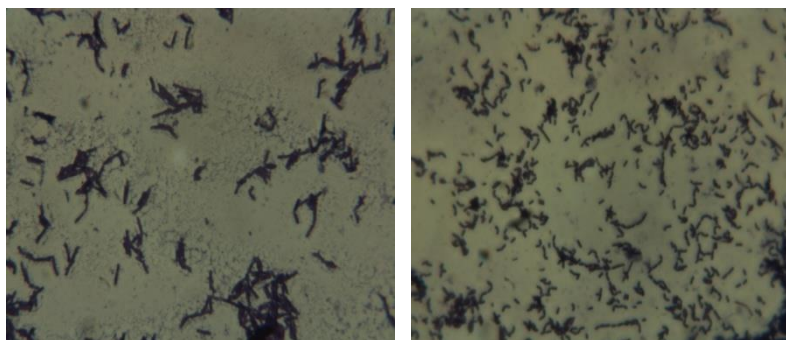


Figure 14 : Aspect microscopique après coloration de Gram (Bacilles à Gram +, grossissement 100).

Les résultats de la caractérisation phénotypique des souches isolées par les tests de croissance à différentes températures et sous NaCl 4% sont reportés dans tableau 12 où il apparaît que toutes les souches isolées affichent une nette croissance aux températures de 15 et 37°C. Lorsque la température du milieu est portée à 45°C, la croissance de toutes les souches n'est pas nette mais plutôt variable, hormis celle de *L. brevis* qui est absente.

Des résultats similaires ont été noté par plusieurs chercheurs où ils constatent que les souches lactiques isolées sont capables à croître aux températures de 15 et 37°C (Samedi et Charles, 2019 ; Alhaag *et al.*, 2019 ; Marroki *et al.*, 2011 ; Roushanzadeh *et al.*, 2014).

Nous avons constaté la croissance de toutes les souches isolées en présence d'NaCl à raison de 4%, ce même résultat a été reporté par plusieurs auteurs à savoir Samedi et Charles. (2019) et Alhaag *et al.*, (2019).

Tableau 11 : Croissance des souches isolées à différentes températures et dans un milieu à 4% de NaCl.

Les souches <i>Lactobacillus</i> Spp.	Croissance à différentes températures			Croissance sous NaCl 4%
	15°C	37°C	45°C	
<i>L. plantarum</i> P1	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P2	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P3	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P4	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P5	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P6	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P7	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P8	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P9	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P10	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P11	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P12	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P13	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P14	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P15	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P16	+	+	V	+
<i>L. plantarum</i> P17	+	+	V	+
<i>L. brevis</i> B1	+	+	-	+
<i>L. herbarum</i> H1	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H2	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H3	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H4	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H5	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H6	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H7	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H8	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H9	+	+	V	+
<i>L. herbarum</i> H10	+	+	V	+

+: Positive, -: Négative, V: Variable.

Le profil fermentaire des sucres nous a permis de confirmer la pré-identification de nos isolats en se basant sur des données bibliographiques établis par (Carr *et al.*, 2002 et Khedid *et al.* (2009).

D'après le profil fermentaire obtenu, toutes les souches isolées y compris *L. brevis* B1 sont capables de fermenter le sucrose et le maltose, cependant les sucres lactose et mannitol sont fermentés par toutes les souches isolées appartenant aux espèces *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus herbarum* mis à part la souche *Lactobacillus brevis* B1 qui a montré un résultat plus ou moins négatif. Concernant le sucre xylose, il a été fermenté uniquement par la souche *Lactobacillus brevis* B1, pour le reste des souches le résultat était négatif.

Le sucre tréhalose a été fermenté par toutes les souches appartenant aux espèces *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus herbarum* à l'exception de la souche *Lactobacillus brevis* B1.

Des résultats similaires du profil fermentaires à travers des galeries de différents sucres ont été reportés par plusieurs auteurs lors de la caractérisation biochimique de souches appartenant au genre *Lactobacillus* (Marroki *et al.*, 2011; Yelnetty *et al.*, 2014 ; Chaalel *et al.*, 2015 ; Thakur *et al.*, 2018 ; Bennani *et al.*, 2017 ; Alhaag *et al.*, 2019).

La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH) est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Le rôle de cette enzyme est de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine, toutes les souches appartenant aux espèces *L. plantarum* et *L. herbarum* se sont révélées ADH négatives *L. brevis* B1 qui a montré un résultat positif, ce résultat reflète que les souches isolées et présentant un résultat négatif n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, car elles ne possèdent pas l'enzyme ADH plusieurs auteurs ont obtenus des résultats similaires lors de la caractérisation biochimique des bactéries lactiques comprenant des espèces du genre *Lactobacillus* (Marroki *et al.*, 2011 ; Thakur *et al.*, 2017 ; Alhaag *et al.*, 2019).

L'unique espèce ayant donné un résultat positif de l'enzyme ADH est *L. brevis*, ce résultat concorde avec celui obtenu par Badis *et al.* (2005).

Tableau 12 : Profil fermentaire et test d'hydrolyse de l'arginine des souches isolées.

<i>Lactobacillus</i> Spp.	Lactose	Sucrose	Mannitol	Xylose	Maltose	Tréhalose	Test d'hydrolyse de l'arginine
<i>L. plantarum</i> P1	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P2	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P3	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P4	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P5	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P6	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P7	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P8	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P9	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P10	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P11	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P12	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P13	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P14	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P15	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P16	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i> P17	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. brevis</i> B1	+/-	+	+/-	+	+	-	+
<i>L. herbarum</i> H1	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H2	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H3	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H4	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H5	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H6	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H7	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H8	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H9	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. herbarum</i> H10	+	+	+	-	+	+	-

+: Positive, -: Négative, V: Variable.

III.1.2 Identification génétique

Après extraction de l'ADN des souches isolées et après son amplification par PCR en utilisant des amorces adéquates, un séquençage nucléotidique de l'ADNr 16S a été effectué. La séquence de l'ADNr 16S déterminée a été comparée directement avec la base de données GenBank (Fig.15). Un haut niveau de similitude des séquences nucléotidiques d'ADN ribosomal 16S (99%) des 28 souches bacilles a été observé avec les séquences de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus herbarum* et *Lactobacillus brevis*.

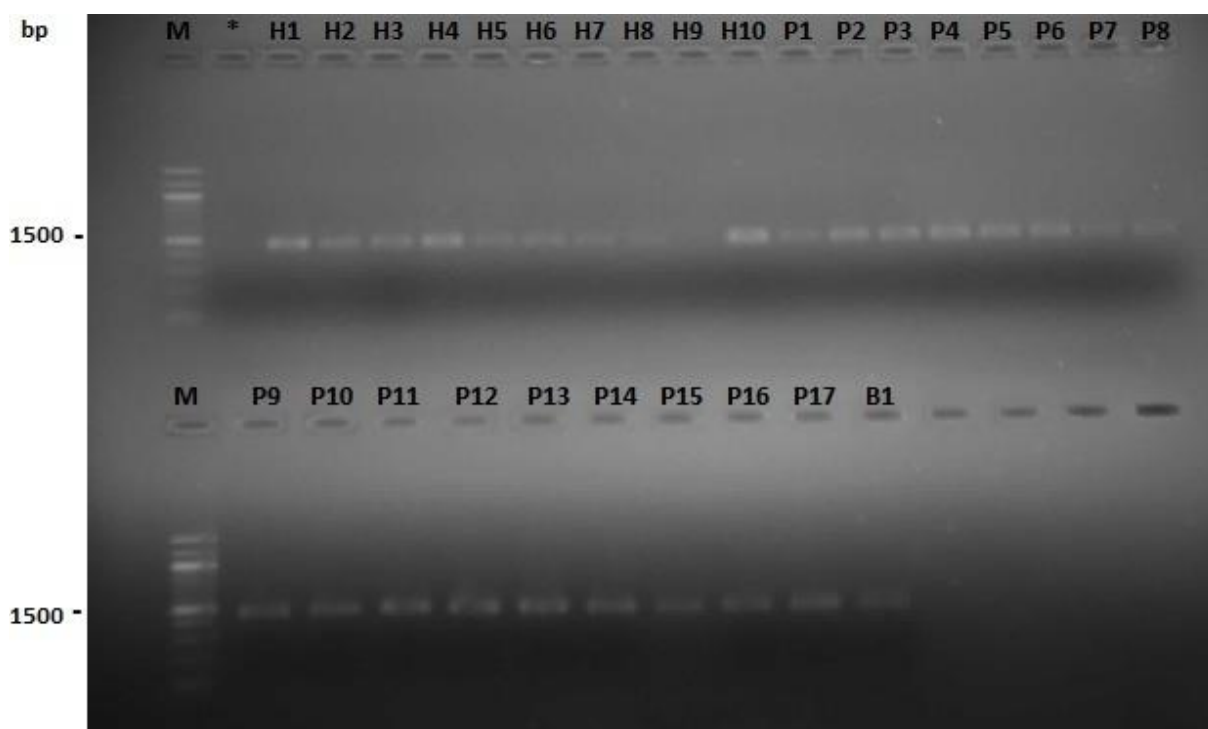


Figure 15: Amplification des séquences de l'ADNr 16S réalisée avec de l'ADN génomique. Les puits 1 à 28 représentent les souches isolées. C'est avec les paires d'amorces 968-GC-f/1401-r, qu'un GeneRuler 100-bp DNA ladder plus (Fermentas) a été utilisé comme marqueur (Puit M). *: Contrôle négatif.

D'après l'identification génétique des souches isolées, on peut résumer l'ensemble des souches identifiées comme suit:

- Un premier groupe de souches représenté par *Lactobacillus plantarum* avec un pourcentage de 69,56% dans le lait de chamelle et 20% dans le lait de chèvre.
- Un deuxième groupe représenté par *Lactobacillus herbarum* avec un pourcentage de 30,43% dans le lait de chamelle et 60% dans le lait de chèvre.
- Un troisième groupe identifié comme étant *Lactobacillus brevis* avec un pourcentage de 20% dans le lait de chèvre.

Sur la base de ces résultats d'identification, on constate la prédominance de *L. plantarum* dans le lait de chamelle et celle de *L. herbarum* dans le lait de chèvre ; alors que l'espèce *L. brevis* n'a été identifiée que dans le lait caprin (Tab. 13).

Tableau 13: Prévalence des *Lactobacillus* isolées des laits de chèvres et de chamelle.

Type d'échantillon	Nombre de souches	Pourcentage	
Lait de Chamelle	23	82%	30,43% <i>L. herbarum</i>
			69,56% <i>L. plantarum</i>
Lait de chèvre	5	17,85%	20% <i>L. brevis</i>
			60% <i>L. herbarum</i>
			20% <i>L. plantarum</i>

Le profil microbiologique du lait de chamelle trouvé dans ce travail (2 souches seulement et à 70% des *L. plantarum*) est quelque peu différent de celui rapporté par [Abbas et Mahasne \(2014\)](#) qui ont isolé plus de deux souches de lactobacilles distribuées à raison de 41% de *L. paracasei* spp. *paracasei*, 23% de *L. plantarum*, 18% de *L. rhamnosus*, 12% de *L. fermentum* ainsi que 6% de *L. brevis*).

Selon la littérature les genres *Enterococcus* et *Lactococcus* semblent être dominants dans le lait de chamelle par rapport aux autres espèces lactiques telle que les *Lactobacillus* ([Ashmaig et al., 2009](#); [Khedid et al., 2009](#); [Rahman et al., 2010](#)).

Dans une étude récente réalisée sur le lait de chamelle par [Toualbia et al. \(2018\)](#), qui ont abouti à l'isolement et l'identification d'une souche appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* douée d'une forte activité antagoniste, cette identification était basée sur une analyse phénotypique suivie par une confirmation génotypique en effectuant le séquençage de l'ADNr16S.

Dans une étude réalisée par [Khedid et al. \(2009\)](#) sur du lait de chamelle, ils ont identifié sur la base des caractéristiques phénotypiques et biochimiques des espèces comprenant *Lactobacillus helveticus* (10%), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (5,8%) et *Lactobacillus plantarum* (5%).

Cette faible diversité microbiologique du lait de chamelle observée dans nos résultats a également été noté dans les travaux rapportés par [Zadi Karam & Karam \(2006\)](#) dans le même lait et qui n'ont détecté qu'une seule espèce lactobacille (i.e *L. plantarum*) présente à raison de 18,5%, les 81,5% des souches qui restaient étaient composées d'entérocoques identifiés à

l'espèce *Enterococcus faecalis* (34,6%) alors que les lactocoques se divisaient en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1,2%), *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* (4,9%) et *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (28,4%). Les espèces du genre *Leuconostoc* étaient *Leuconostoc lactis* (7,4%) et *Leuconostoc dextranicum* (4,9%).

Le lait de chèvre est moins riche en lactobacilles que le lait de chamelle puisque l'ensemble de ces souches ne représentent que 17,85% du total des souches de ce qui a été isolé comme appartenant à ce genre bactérien. Ces lactobacilles sont représentés surtout par *L. plantarum* (60%) : mais comptent parmi eux, à un degré égal (20%), une troisième espèce, *L. brevis*, en plus de *L. herbarum*.

Cette faible représentation des lactobacilles dans le lait de chèvre a également été signalée par Geussas et Kihal (2004), qui avaient utilisé les caractéristiques culturelles, phénotypiques et biochimiques dans leurs analyses, et qui n'ont abouti à l'identification que de deux espèces de lactobacilles quasi minoritaires : *L. plantarum* (9,89%) et *L. brevis* (5,49%).

Dans une étude effectuée sur le lait de chèvre par Viswanathan *et al.* (2015), ils ont pu isoler sur la base des tests microbiologiques et biochimiques à l'isolement de trois espèces appartenant au genre *Lactobacillus*, comprenant *L. casei*, *L. delbrückii* et *L. fermentum*.

Par ailleurs, Maroki *et al.* (2011) ont trouvé que sur 19 isolats de lactobacilles de lait de chèvre, ils avaient identifié par galerie API 50 CHL 13 isolats comme appartenant à l'espèce *L. plantarum*, deux comme étant *L. rhamnosus* et un seizième isolat comme *L. pentosus*. Ils avaient constaté que les 3 isolats restants, identifiés comme des *L. plantarum* par galerie API 50 CHL, se sont révélés être des *L. pentosus* après leur identification par la méthode de séquençage de l'ADN_r16S.

Ces auteurs expliquent cette différence de résultats d'identification concernant ces 3 derniers isolats par les deux méthodes (phénotypique et génétique) en se basant sur les travaux d'Ennahar *et al.* (2003 ; cité par Maroki *et al.*, 2011) qui préconisent que *L. plantarum* et *L. pentosus* possèdent une forte similitude de leurs séquences d'ADN_r16S qui ne diffèrent que par 2 paires de bases. Ces deux espèces (*L. plantarum* et *L. pentosus*) ne peuvent être distinguées que par analyse phyllogénétique des séquences de la plus large région 16S-23S (Hammes et Vogel, 1995).

Nous retiendrons encore une fois à travers les résultats de la présente étude et ceux des travaux de ces autres auteurs cette faible diversité des lactobacilles dans le lait de chèvre.

III.2. Résultat de croissance des souches isolées sur les deux milieux MRS et MRS lactosé

III.2.1. Croissance des souches *L. plantarum* issues de lait de chamelle

En cultivant la souche *L. plantarum*P1 en présence et absence de lactose comme source de carbone dans le milieu MRS, nous avons constaté l'absence de différence significative ($P < 0.05$) dans la cinétique de croissance de cette souche (Fig. 16).

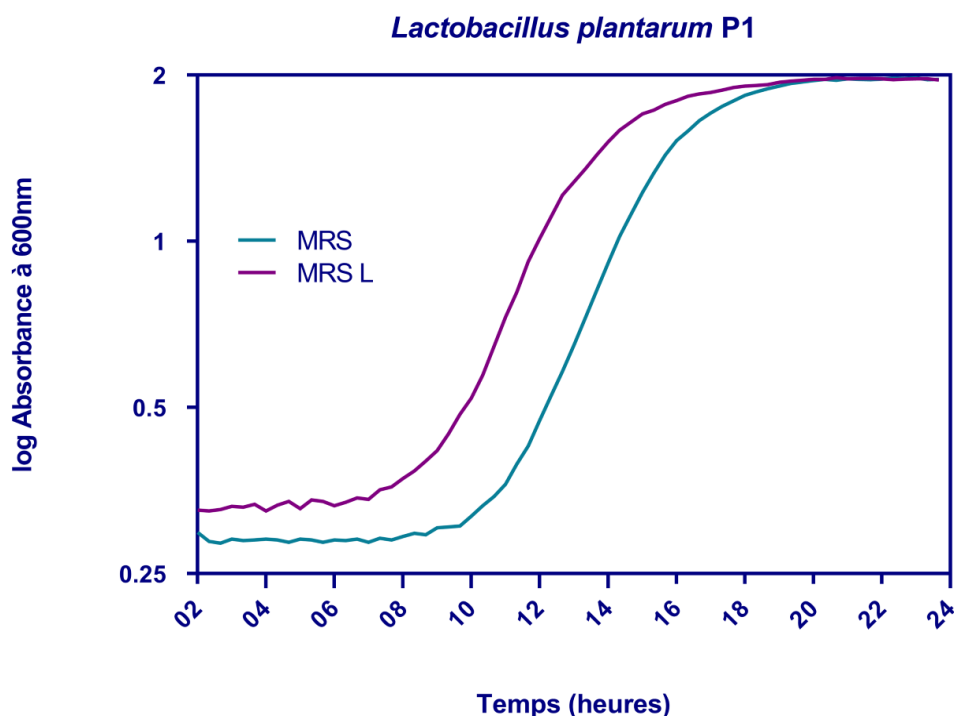


Figure 16 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P1 en présence et en absence de lactose.

L. plantarum P3, P4 et P5 ne montrent pas de préférence pour le lactose par rapport au glucose, et montrent des cinétiques de croissance similaires vis à vis de ces deux sucres dans le milieu de culture (Fig.17, 18 et 19).

Aucune différence significative ($P < 0.05$) n'a été signalé entre les différentes cinétiques.

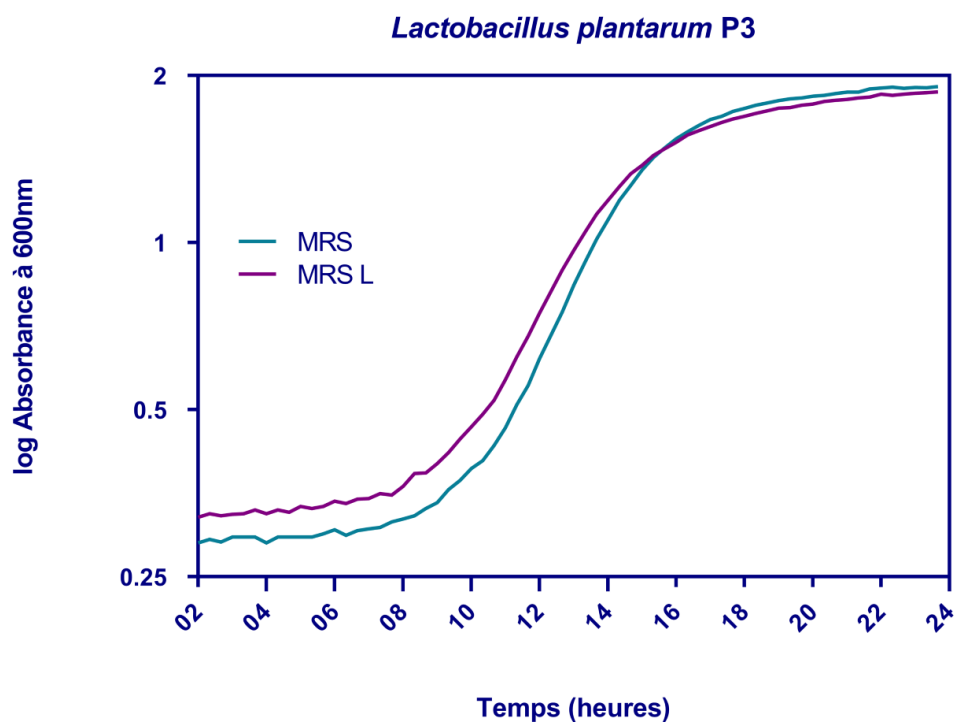


Figure 17 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P3 en présence et en absence de lactose.

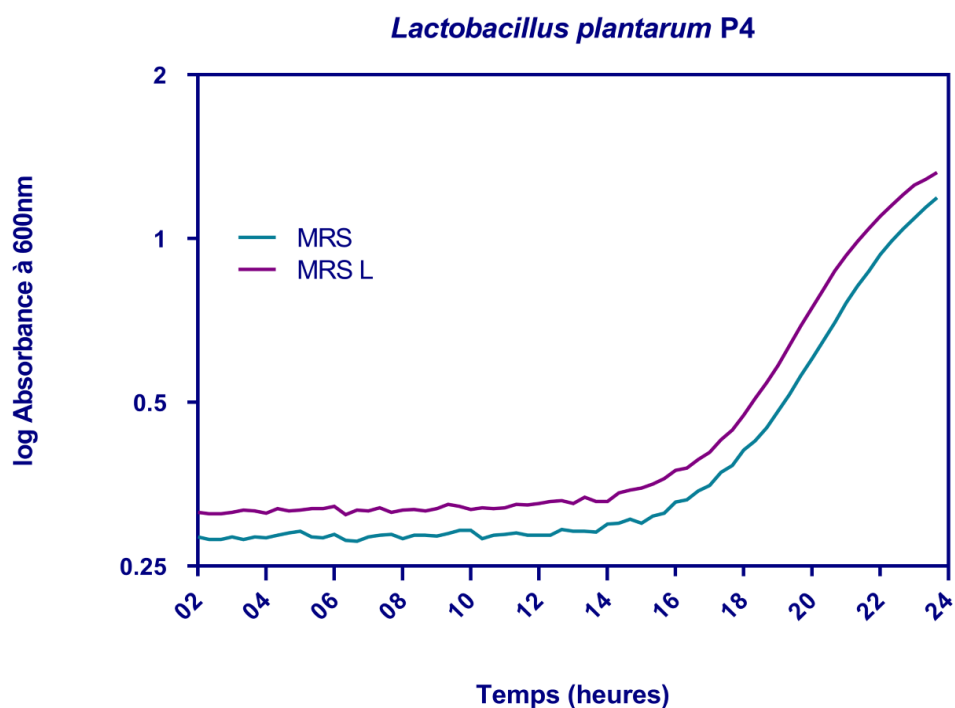


Figure 18 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P4 en présence et en absence de lactose.

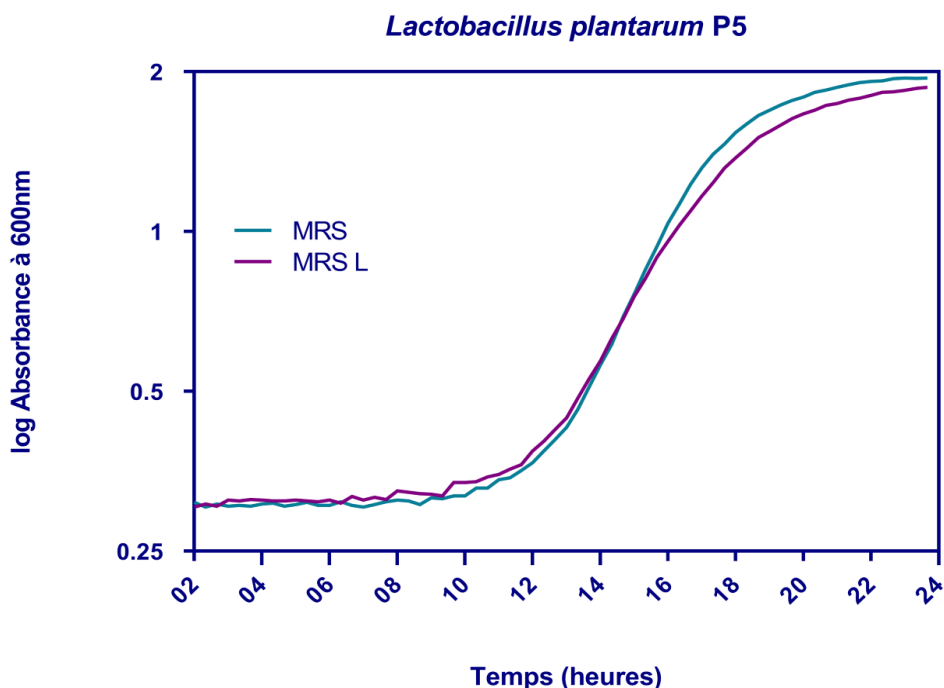


Figure 19 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P5 en présence et en absence de lactose.

Selon la figure 20, *L. plantarum* P6 révèle une préférence pour le lactose, ceci peut être expliqué par le fait qu'elle possède un matériel enzymatique actif capable de dégrader facilement ce sucre, ce qui reflète une amélioration de croissance de l'ordre de 183%.

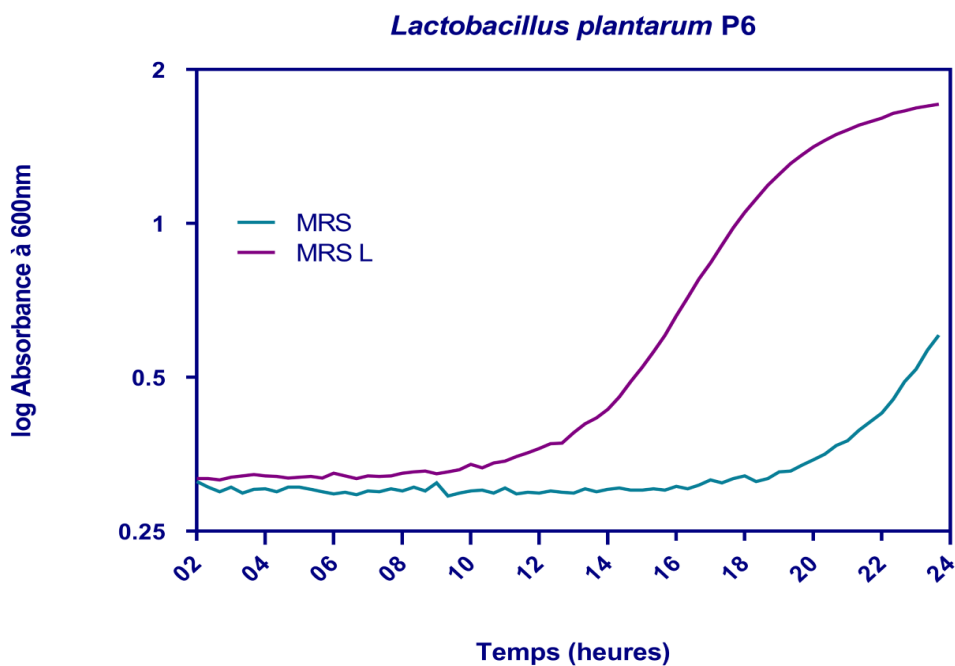


Figure 20 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P6 en présence et en absence de lactose.

La souche *Lactobacillus plantarum* P8, a exprimé une préférence pour le lactose puisque on note une amélioration de la croissance de l'ordre de 10,23% (Fig. 21).

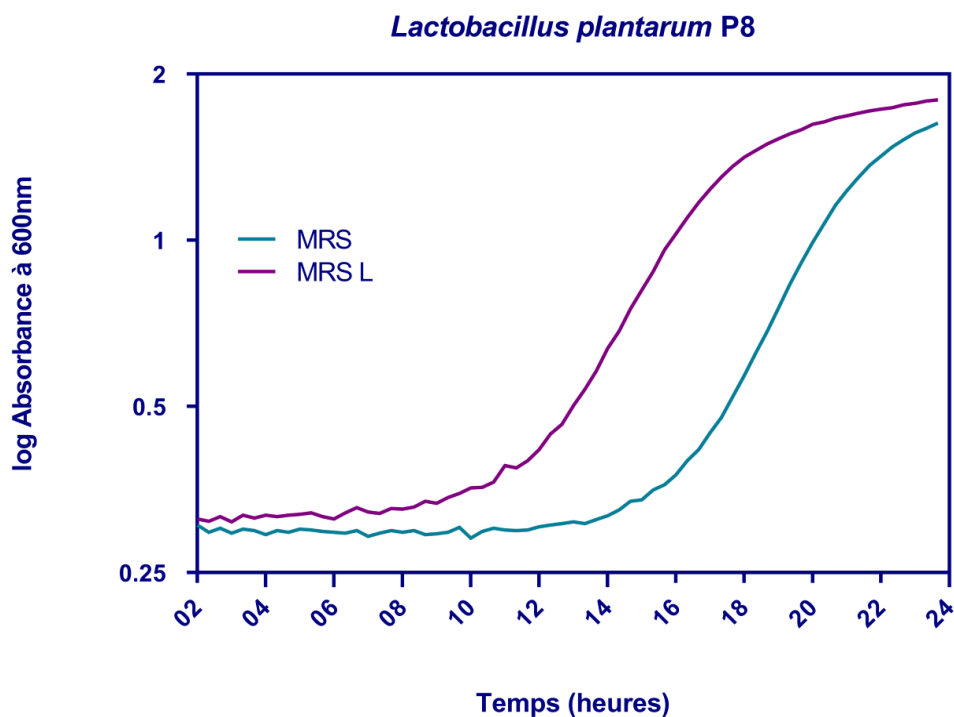


Figure 21 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P8 en présence et en absence de lactose.

La souche *Lactobacillus plantarum* P9, a exhibée une préférence pour le lactose puisque on a enregistré une amélioration de croissance de l'ordre de 122,63% (Fig.22).

Un grand effet stimulateur de la croissance est observé quand le milieu contient du lactose à la place du glucose par la souche *Lactobacillus plantarum* P11, marquée par une augmentation de l'ordre de 169,4% (Fig. 23).

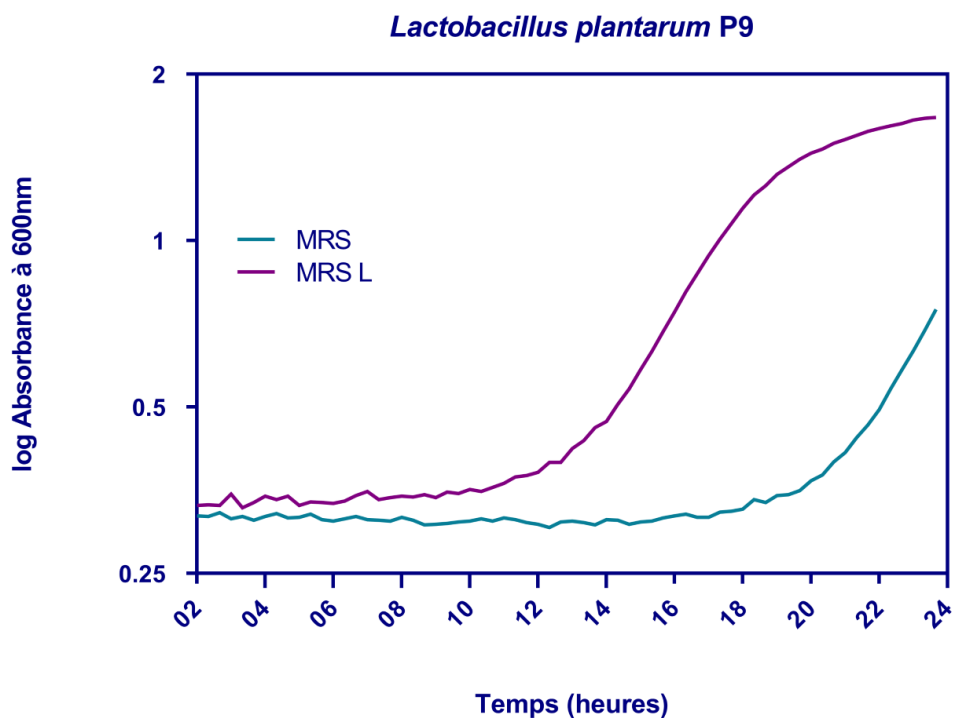


Figure 22 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P9 en présence et en absence de lactose.

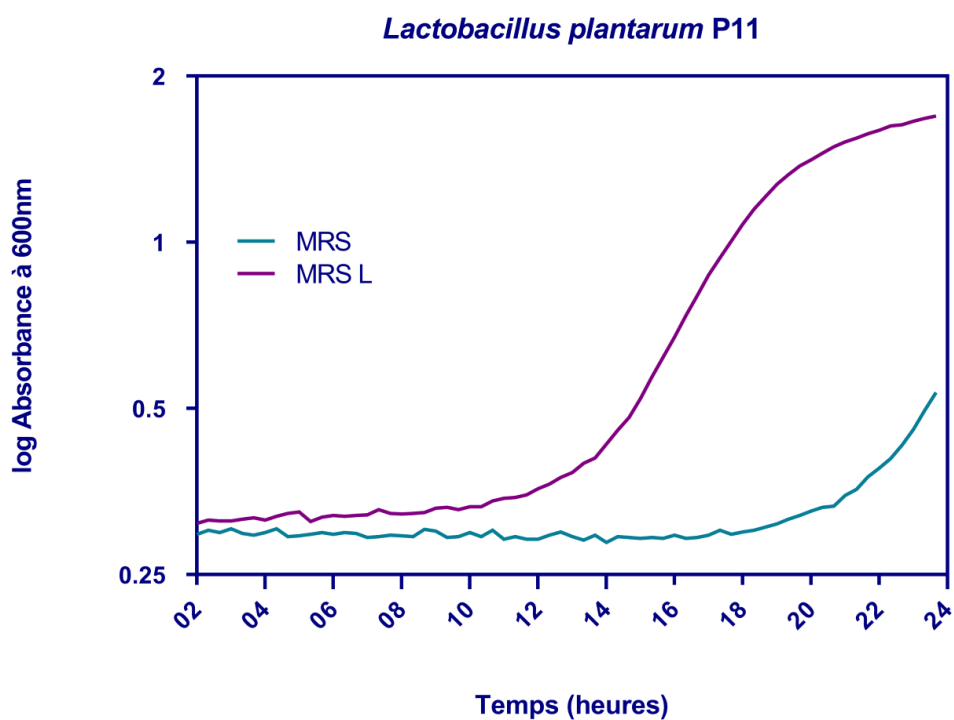


Figure 23 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P11 en présence et en absence de lactose.

Concernant la souche *Lactobacillus plantarum* P12, elle manifeste une augmentation de sa croissance de l'ordre de 36,83% (Fig. 24), par contre la souche *Lactobacillus plantarum* P13 elle ne montre aucune préférence entre le glucose et le lactose dans son milieu de culture (Fig.25).

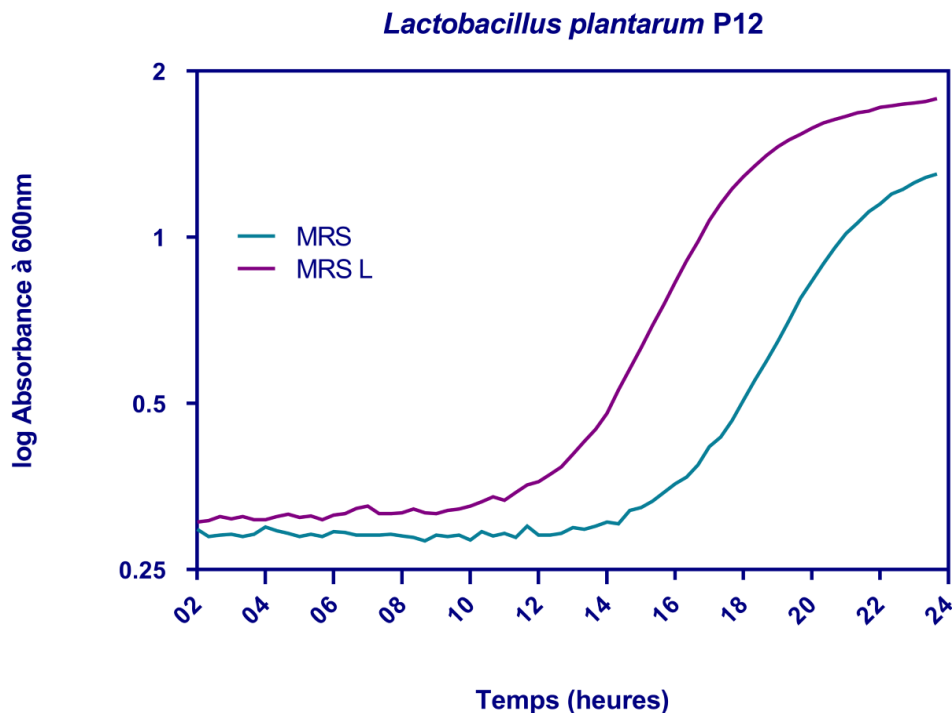


Figure 24 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P12 en présence et en absence de lactose.

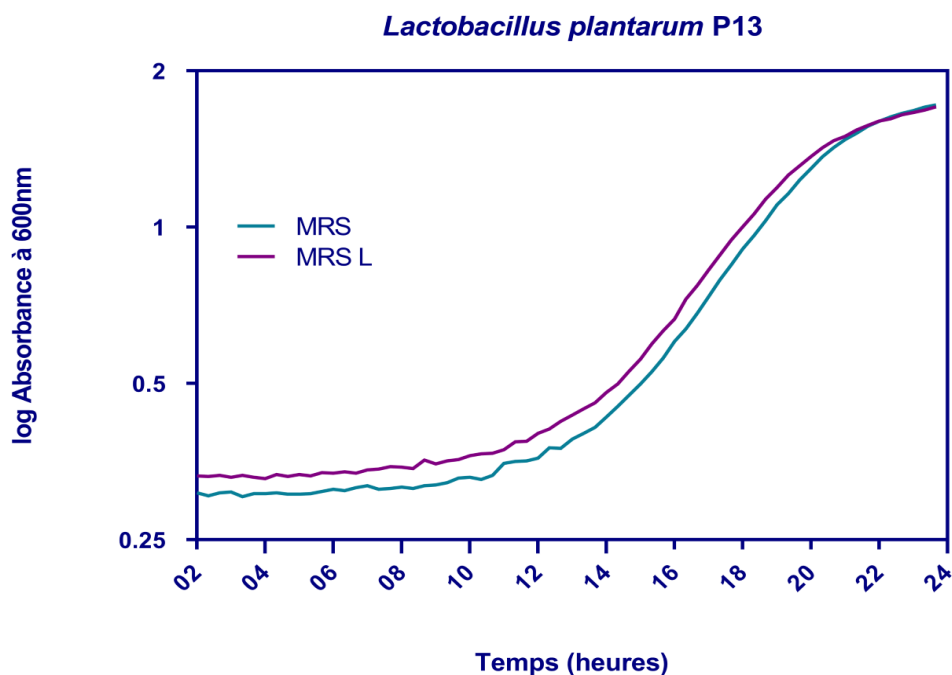


Figure 25 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P13 en présence et en absence de lactose.

Aucune différence entre la croissance en la présence du lactose et son absence dans le milieu de culture des deux souches *Lactobacillus plantarum* P14 et P15 (Fig. 26 et 27).

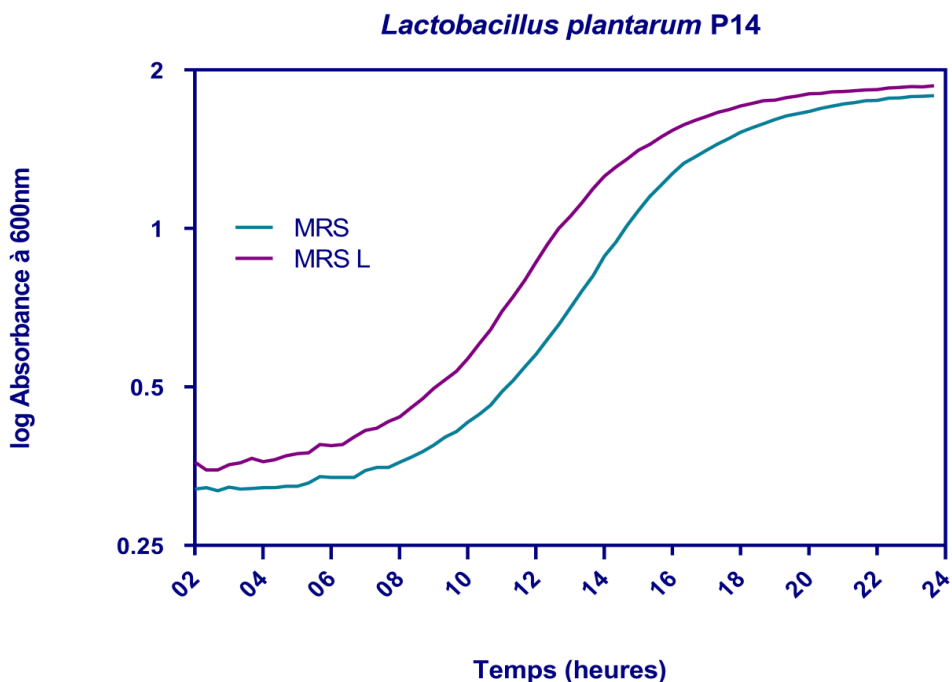


Figure 26 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P14 en présence et en absence de lactose.

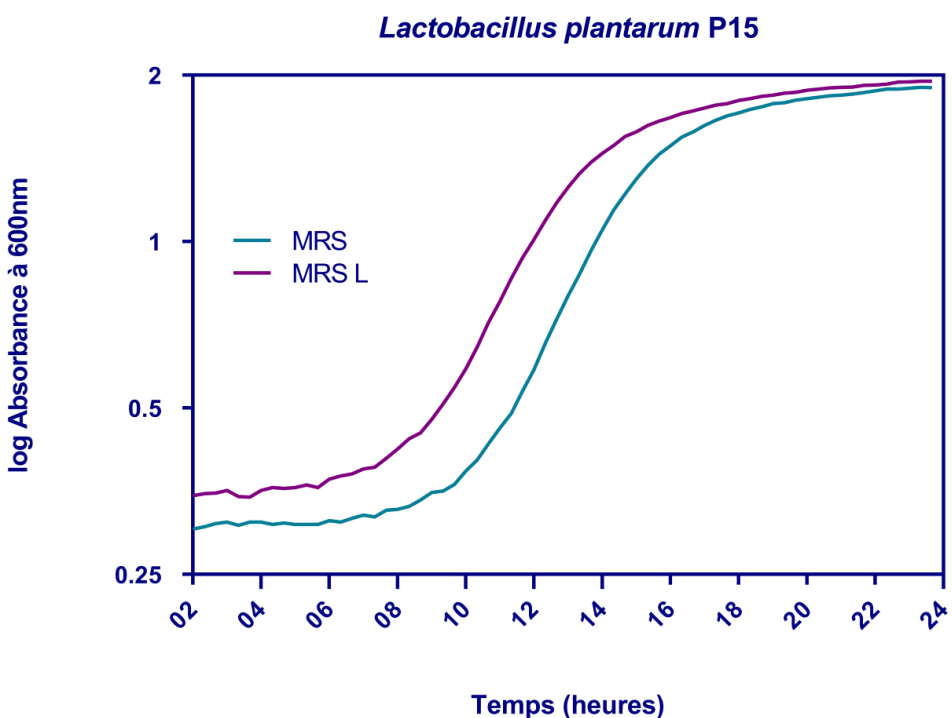


Figure 27 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P15 en présence et en absence de lactose.

On constate un effet positif sur la croissance de la *Lactobacillus plantarum* P16, avec une amélioration de la croissance de l'ordre de 44,32% (Fig.28).

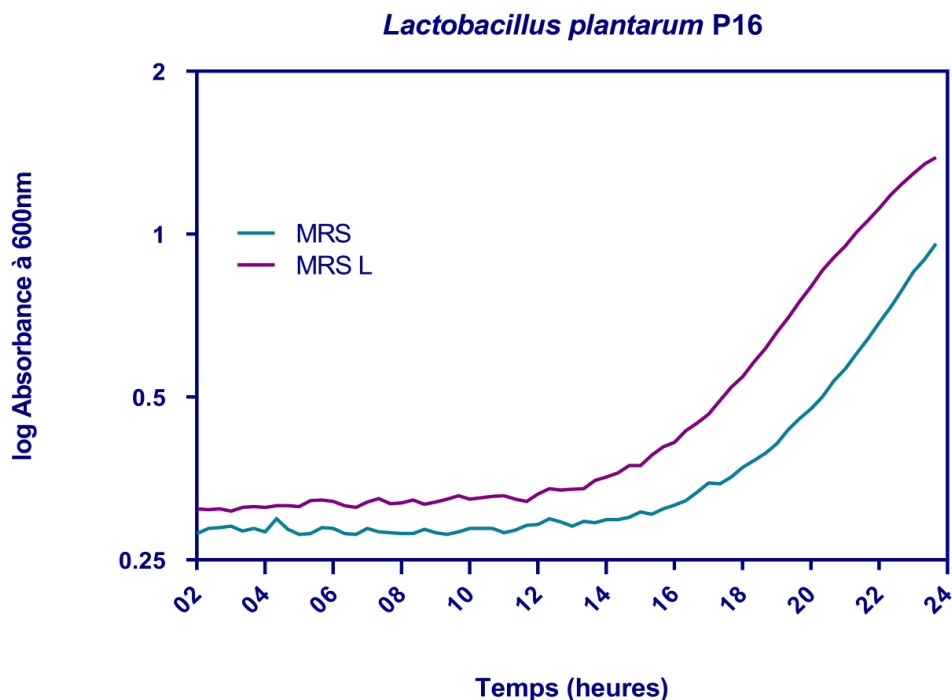


Figure 28 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P16 en présence et en absence de lactose.

Lactobacillus plantarum P17 exprime une forte stimulation de la croissance en présence du lactose, affichant une forte augmentation de l'ordre de 257,76% (Fig.29).

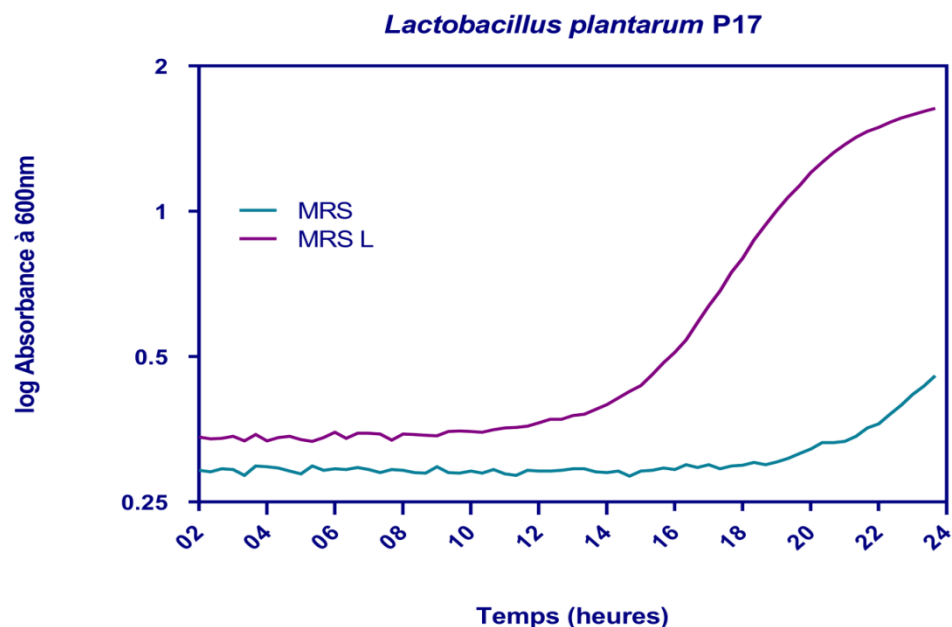


Figure 29 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P17 en présence et en absence de lactose.

Pour la souche *Lactobacillus plantarum* P2, on a noté une forte amélioration de l'ordre de 278,78% de sa croissance en présence du lactose par rapport à son absence (Fig.30).

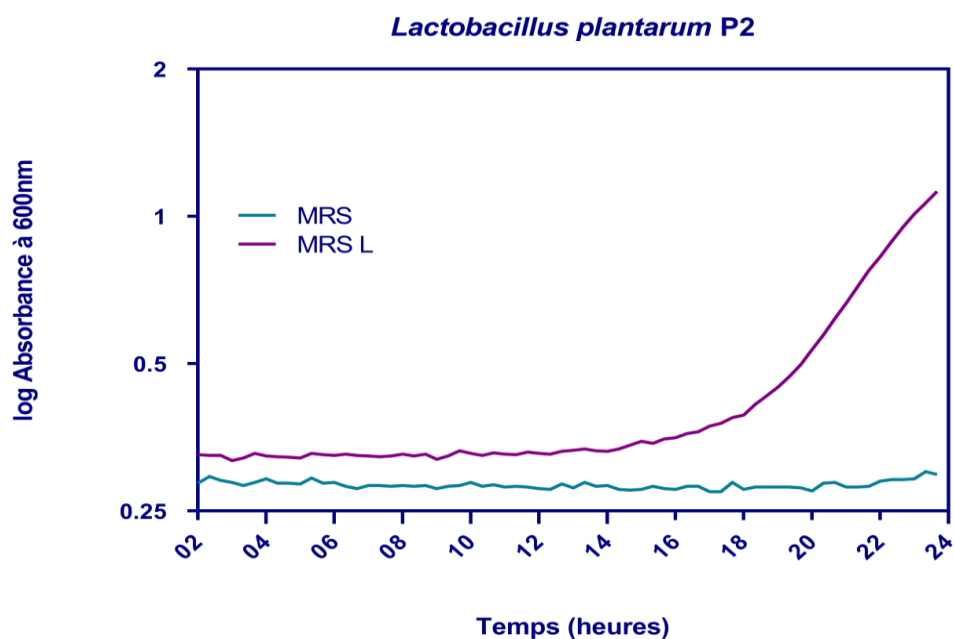


Figure 30 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P2 en présence et en absence de lactose.

La souche *Lactobacillus plantarum* P7, a exprimé une préférence pour le lactose puisque on note une amélioration de la croissance de l'ordre de 193,75 % (Fig. 31).

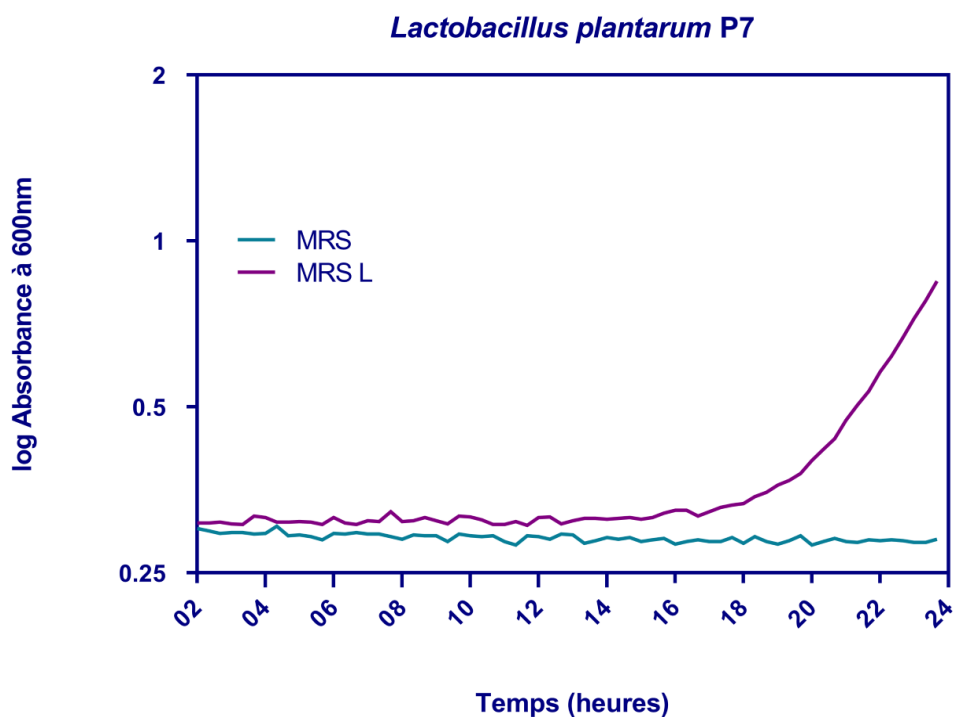


Figure 31 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P7 en présence et en absence de lactose.

III.2.2. Croissance des souches *L. herbarum* issues de lait de chamelle

Nous avons noté pour la souche *L. herbarum*H1 l'existence d'une préférence au lactose qui est représenté par une meilleure cinétique de croissance par rapport à la cinétique de croissance dans un milieu MRS qui ne contient que de glucose et qui est représentée par un pourcentage de l'ordre de 33,8% (Fig.32).

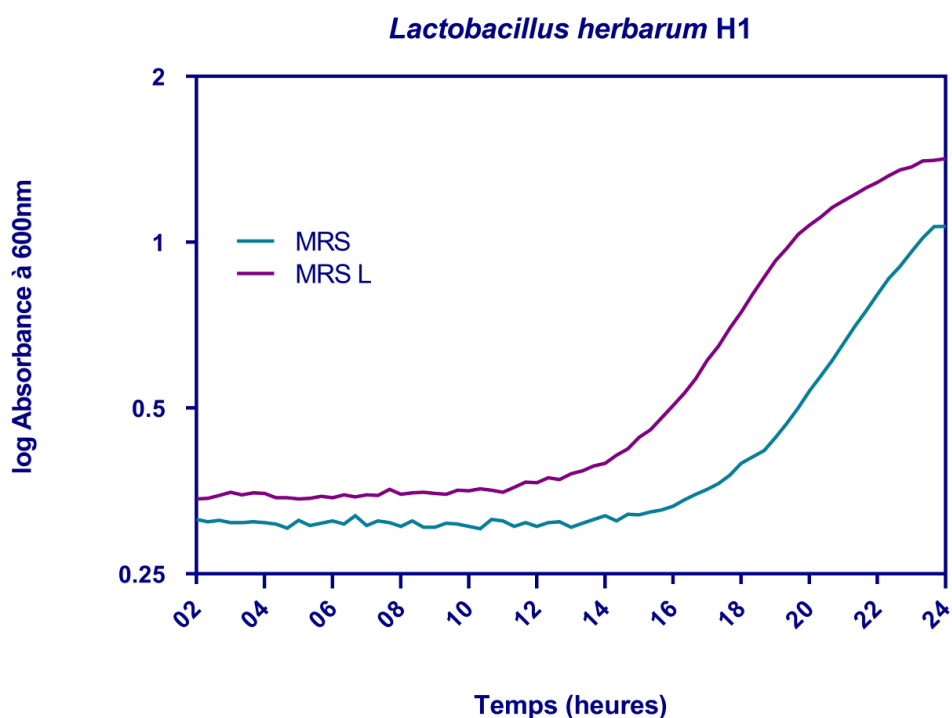


Figure 32 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H1 en présence et en absence de lactose.

Concernant la souche *L. herbarum*H4, nous constatons qu'elle préfère la présence du glucose dans son milieu de culture par rapport au lactose avec une différence de l'ordre de 63,86% (Fig.33).

De même pour la souche *L. herbarum* H6, qui exhibe une préférence pour la présence de glucose exprimée avec une croissance plus élevée en sa présence en affichant un taux de l'ordre de 23,32% par rapport à la présence du lactose (Fig.34).

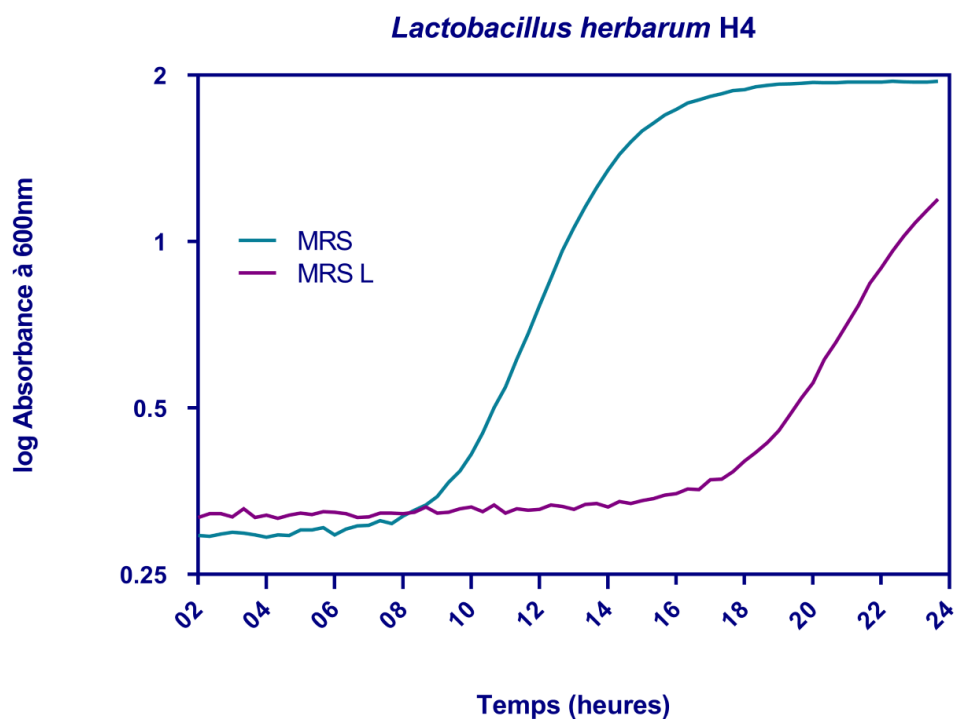


Figure 33 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H4 en présence et en absence de lactose.

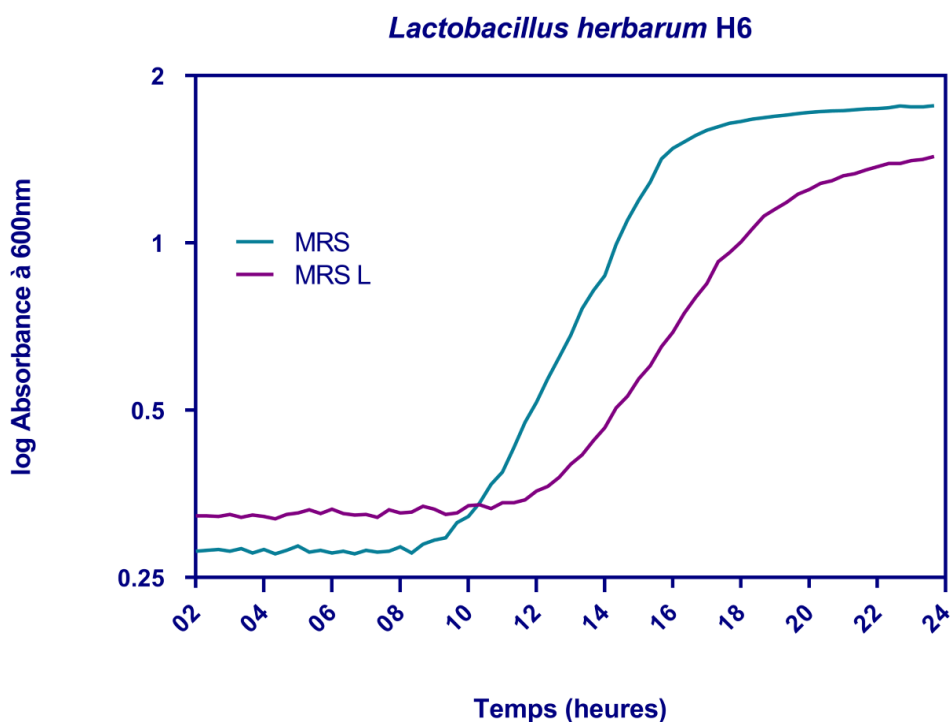


Figure 34 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H6 en présence et en absence de lactose.

La souche *Lactobacillus herbarum*H7 dévoile à son tour une préférence pour le lactose, puisque on a enregistré des améliorations de croissance de l'ordre de 91,76 % (Fig. 35).

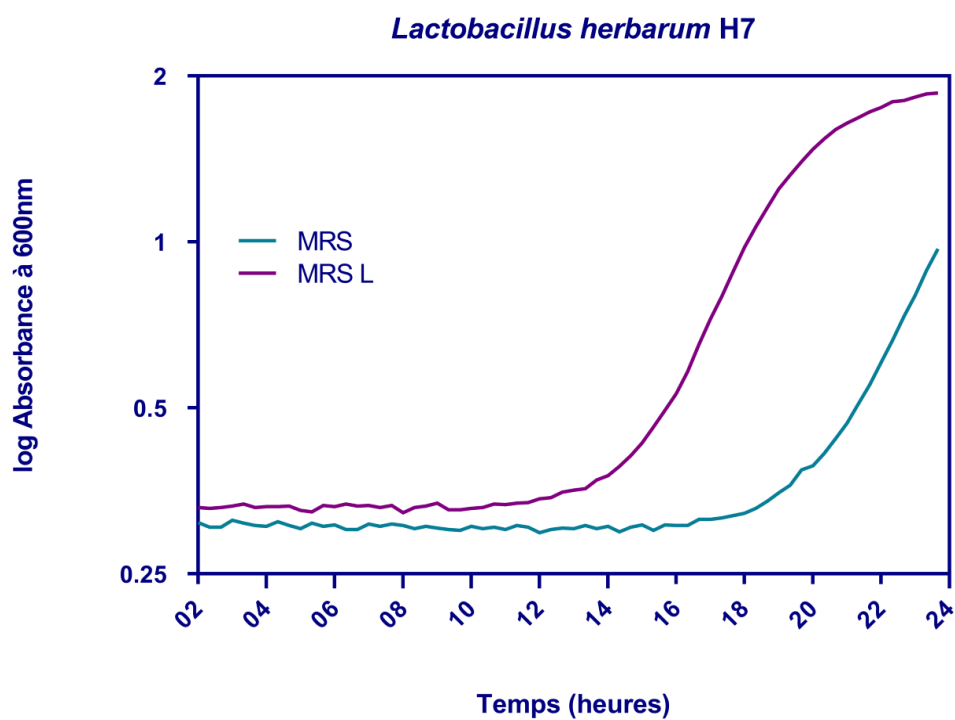


Figure 35 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H7 en présence et en absence de lactose.

On constate un effet positif de la présence du lactose sur la croissance de la souche *Lactobacillus herbarum* H8 dans son milieu de culture, avec une augmentation de l'ordre de 42,38 % (Fig. 36).

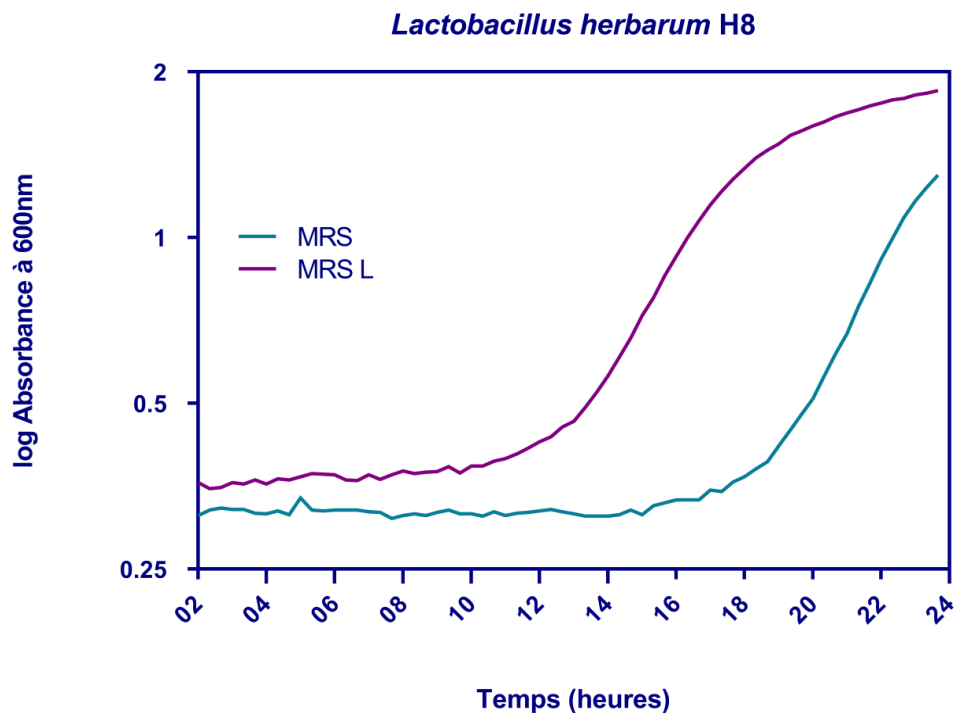


Figure 36 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H8 en présence et en absence de lactose.

Lactobacillus herbarum H9, s'est améliorée dans sa croissance en présence du lactose, en affichant un pourcentage d'augmentation de l'ordre de 54,17% (Fig.37).

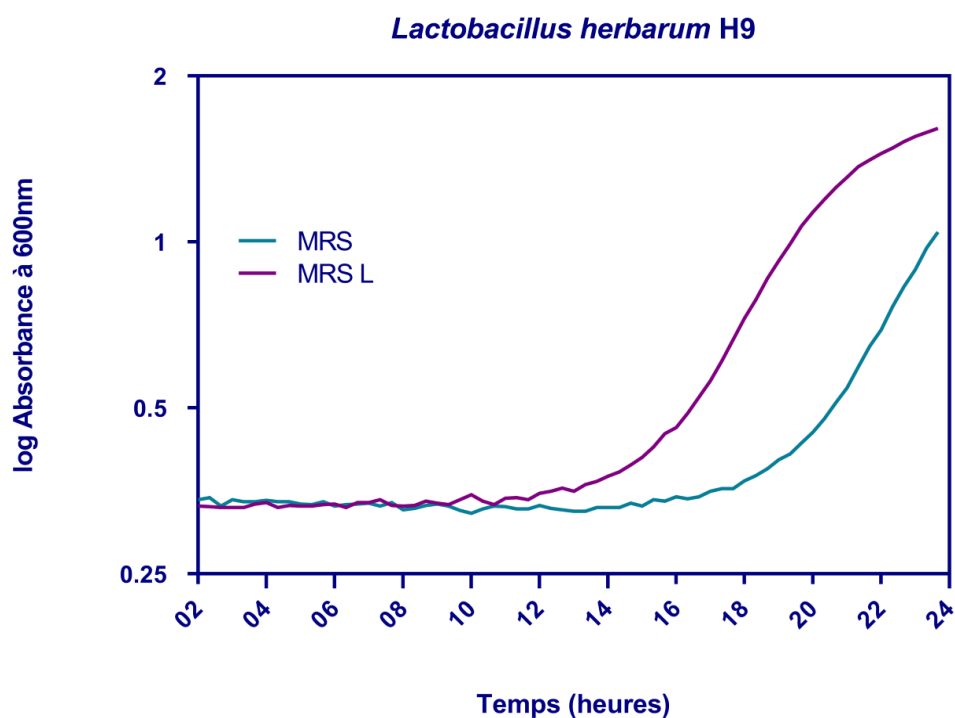


Figure 37 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H9 en présence et en absence de lactose.

III.2.3. Croissance de la souche *L. plantarum* issue de lait de chèvre

La souche *Lactobacillus plantarum* P10 représente l'unique souche isolée à partir de lait de chèvre, cette souche n'as pas de préférence entre le glucose et le lactose dans le milieu de culture (Fig.38).

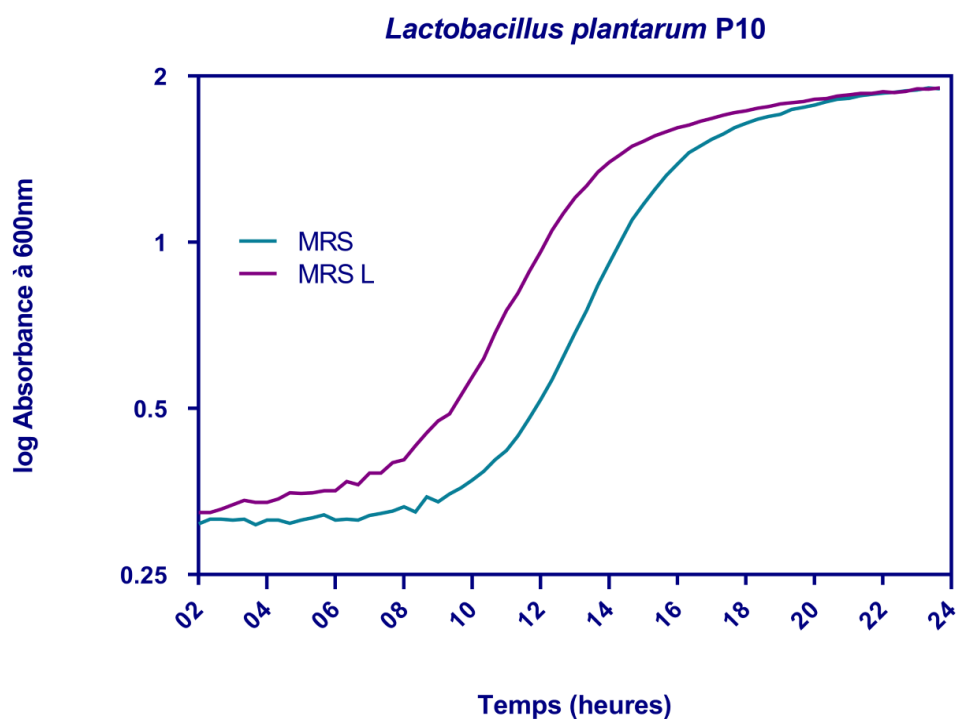


Figure 38 : Cinétique de croissance *Lactobacillus plantarum* P10 en présence et en absence de lactose.

III.2.4. Croissance des souches *L. herbarum* issues de lait de chèvre

Nous avons constaté avec la souche *L. herbarum* H3 qu'il n'y a pas de différence significative dans sa cinétique de croissance en présence et absence de lactose (Fig.39).

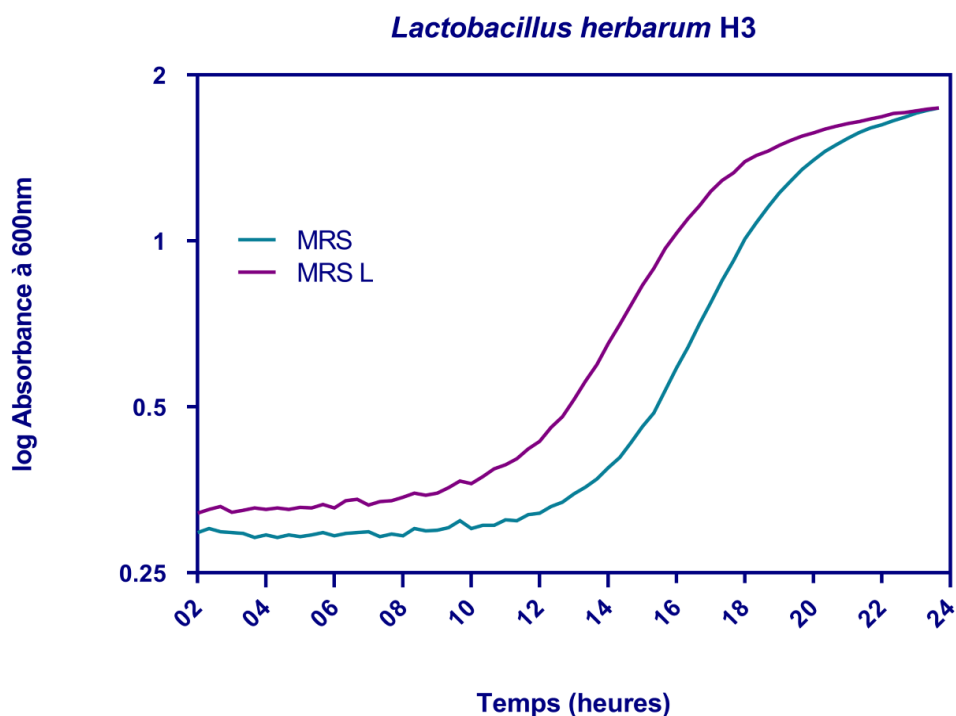


Figure 39 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H3 en présence et en absence de lactose.

La souche *Lactobacillus herbarum* H5, ne présente pas différence apparente par rapport à la présence ou l'absence du lactose dans son milieu de culture (Fig.40).

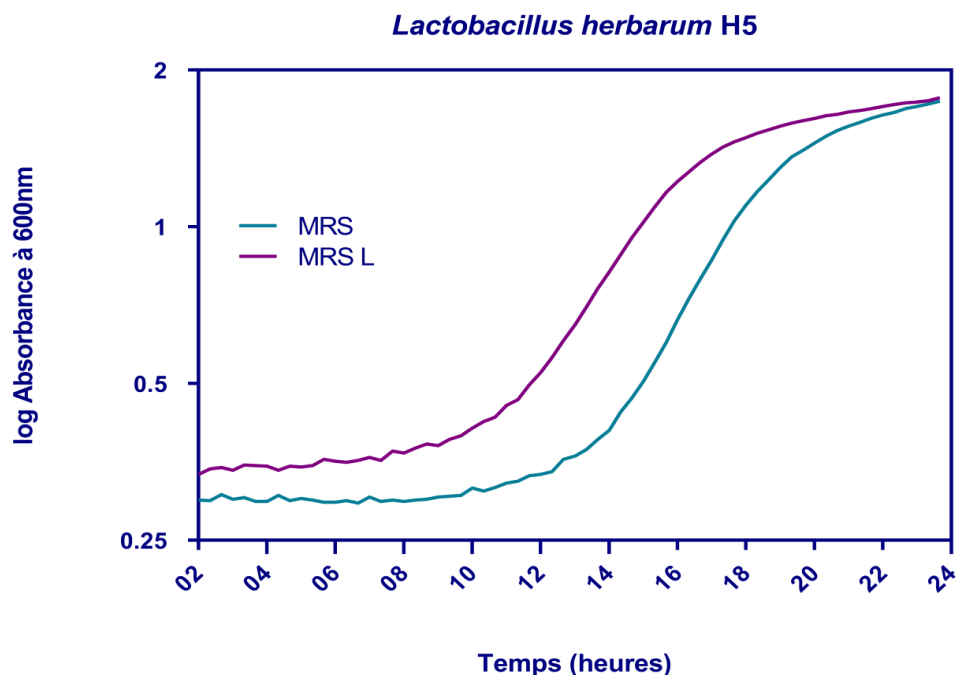


Figure 40 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H5 en présence et en absence de lactose.

A l'inverse des deux souches précédentes H3 et H5, la souche *Lactobacillus herbarum* H10 exprime une remarquable stimulation de la croissance en présence du lactose, en affichant une augmentation de l'ordre de 228,1% (Fig. 41).

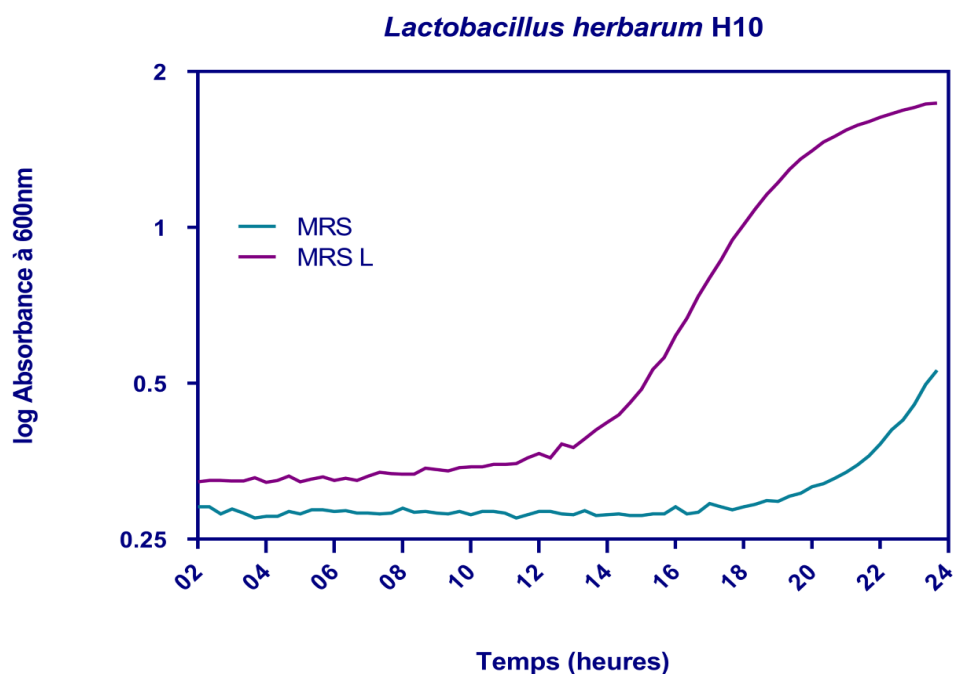


Figure 41 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H10 en présence et en absence de lactose.

Nous n'avons pas remarqué une différence de croissance pour la souche *L. herbarum* H2 en présence et absence de lactose, ce qui laisse dire que la capacité de dégradation de lactose par cette souche est limitée (Fig.42).

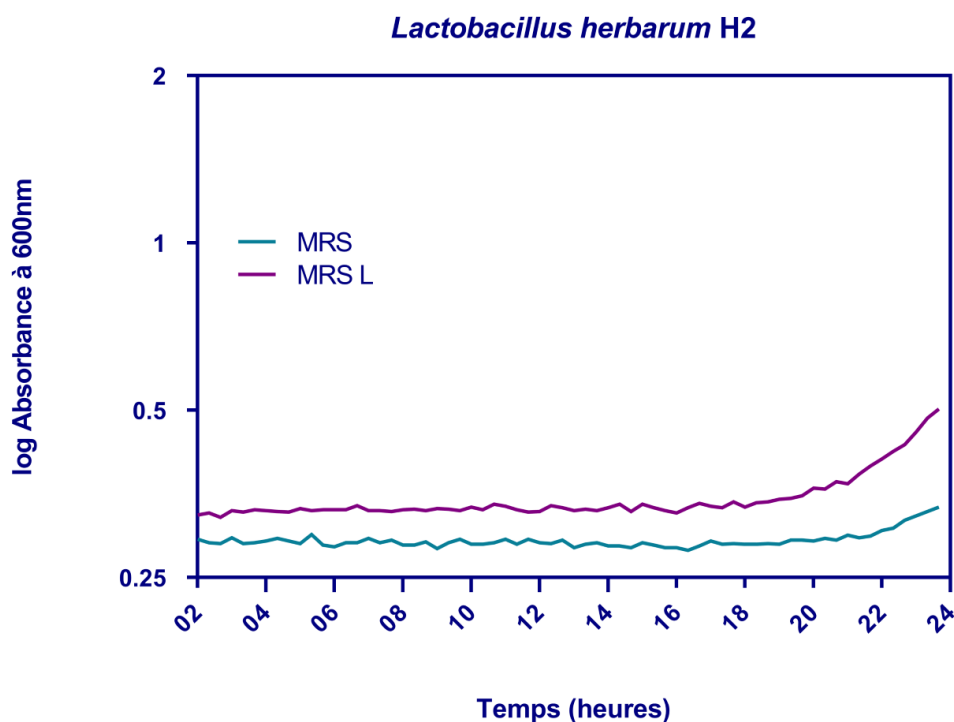


Figure 42 : Cinétique de croissance *Lactobacillus herbarum* H2 en présence et en absence de lactose.

III.2.5. Croissance de la souche *L. brevis* issue de lait de chèvre

La souche B1, représente l'unique souche isolée appartenant à l'espèce *Lactobacillus brevis*, a démontré une amélioration dans sa croissance en présence de lactose, avec un pourcentage d'augmentation de l'ordre de 79,26 % par rapport à son absence (Fig. 43).

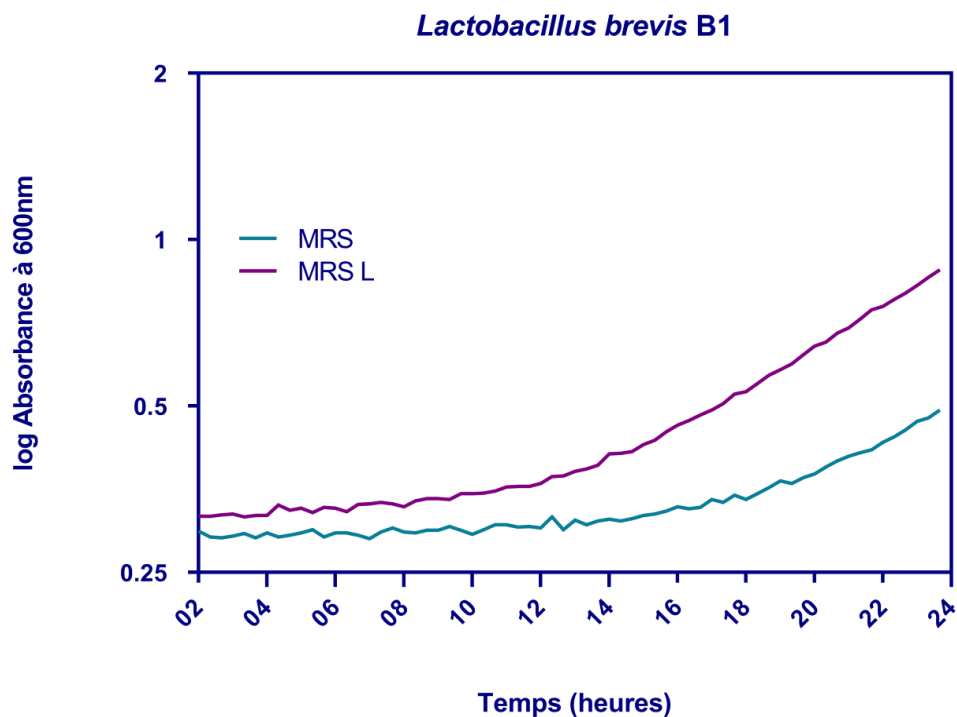


Figure 43 : Cinétique de croissance *Lactobacillus brevis* B1 en présence et en absence de lactose.

L'ensemble des résultats obtenus à travers l'étude de la croissance des différentes souches isolées en présence et en absence de lactose a montré des préférences différentes d'une souche à l'autre, sur les 28 souches isolées, seulement 17 souches qui représentent 60,71 % ont affiché une meilleure croissance sur milieu MRS additionné de lactose comme seule et unique source de carbone. Parmi ces 17 souches préférant le lactose par rapport au glucose, 88,23 % de ces souches sont issues du lait de chamelle, représentées par ordre décroissant par *L. plantarum* P2, *L. plantarum* P17, *L. plantarum* P7, P6, *L. plantarum* P11, *L. plantarum* P9, *L. herbarum* H7, *L. herbarum* H4, *L. herbarum* H4, *L. herbarum* H9, *L. plantarum* P16, *L. herbarum* H8, *L. plantarum* P12, *L. herbarum* H1, *L. herbarum* H6 et *L. plantarum* P16 (Tab.14).

Concernant les souches issues de lait de chèvre seulement un pourcentage de l'ordre de 11,76% a montré une amélioration de la croissance en présence de lactose comme seule source de carbone, représenté par les 2 souches qui sont représentées par ordre décroissant par *Lactobacillus herbarum* H10 et *Lactobacillus brevis* B1 (Tab.14).

Tableau 14: Classement des souches améliorées par la présence du lactose dans le milieu de culture.

Classement	Souches	Origine de la souche	%
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> P2	Chamelle	278,78%
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> P17	Chamelle	257,76%
3	<i>Lactobacillus herbarum</i> H10	Chèvre	228,1%
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> P7	Chamelle	193,75 %
5	<i>L. plantarum</i> P6	Chamelle	183 %
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> P11	Chamelle	169,4%
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> P9	Chamelle	122,63%
8	<i>Lactobacillus herbarum</i> H7	Chamelle	91,76 %
9	<i>Lactobacillus brevis</i> B1	Chèvre	79,26 %
10	<i>L. herbarum</i> H4	Chamelle	63,86%
11	<i>Lactobacillus herbarum</i> H9	Chamelle	54,17%
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> P16	Chamelle	44,32%
13	<i>L. herbarum</i> H8	Chamelle	42,38
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> P12	Chamelle	36,83%
15	<i>L. herbarum</i> H1	Chamelle	33,8%
16	<i>L. herbarum</i> H6	Chamelle	23,32%
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> P8	Chamelle	10,23%

Le comportement des souches en présence et en absence du lactose diffère d'une souche à l'autre, ce qui se traduit par les différences notées entre la cinétique de croissance pour la plupart des souches en présence et absence de lactose, ceci peut s'expliquer par la préférence de la plupart de nos souches appartenant au genre *Lactobacillus* au sucre lactose comme source de carbone.

Cette préférence confirme également que la présence du lactose est indispensable pour l'induction de l'activité β -galactosidase chez *Escherichia coli*, chose remarquée et étudiée par (Mondin *et al.*, 2002).

Certaines études chez l'homme qui ont tenté d'induire l'expression de la lactase dans l'intestin avec différents protocoles d'alimentation en lactose ont systématiquement montré un manque d'induction enzymatique. De même, retirer le lactose de l'alimentation ne réduit pas l'expression de la lactase dans l'intestin. Les preuves provenant d'études transversales montrent que la consommation de lait ou de produits laitiers est un mauvais indicateur du statut en lactase, corroborant les résultats des études d'intervention (Forsgard, 2019).

Cependant, chez les individus déficients en lactase, l'alimentation en lactose favorise la croissance des bactéries digérant le lactose dans le côlon, ce qui améliore le traitement du lactose dans le côlon et entraîne éventuellement une réduction des symptômes d'intolérance (Forsgard, 2019).

Al-Zahrani *et al.* (2019) ont rapporté que le lactose était le meilleur substrat parmi 4 autres sources de carbone (galactose, glucose, fructose et saccharose) testées pour la croissance, le transport intracellulaire et la production d'enzymes extracellulaires (i.e β -galactosidase) chez des souches du genre *Lactobacillus*.

Hickey *et al.* (1986) ont montré que l'addition du glucose dans le milieu contenant le lactose diminue l'activité β -galactosidase (Rephali et Saiser, 1980) et proposent l'obligation de la présence de glucose dans le milieu extérieur pour qu'il puisse exercer un effet répressif.

III.3. Résultat de l'activité β -galactosidase des souches isolées

Durant cette étude, 28 souches isolées et identifiées ont été étudiées vis-à-vis de leur activité β -galactosidase, les résultats sont représentés dans la figure 44.

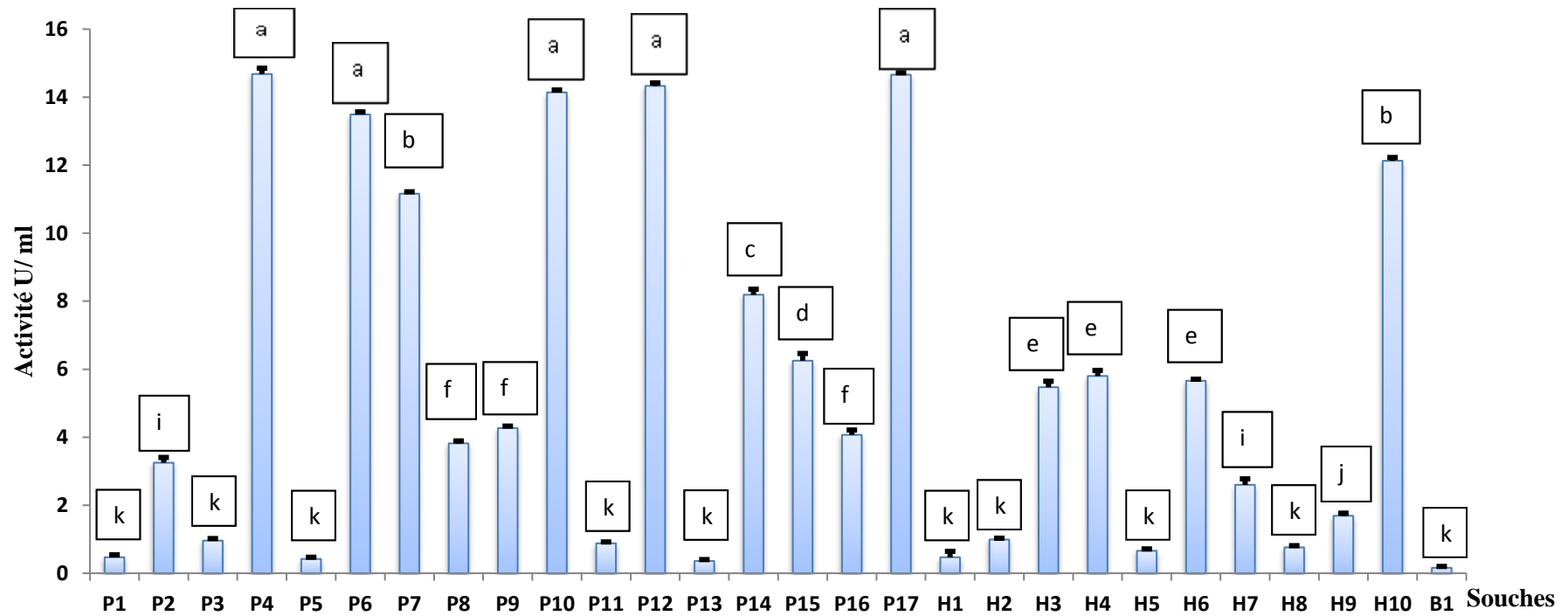


Figure 44: L'activité β -galactosidase (U/ ml; N=3 \pm ecartypes) des souches *Lactobacillus* isolées.

$N=3 \pm$ ecartypes, les groupes homogènes (a, b et c) sont des indicateurs de présence de différence significative ($p<0.05$). Nous avons constaté que la souche P4 présente une activité β -galactosidase plus importante et significativement différente par rapport aux autres souches ($p<0.05$).

Les souches (P6, P10, P12 et P17) présentent des activités β -galactosidase similaires, aucune différence significative n'a été décelée entre les activités enzymatiques.

L'analyse statistique des résultats ($p<0.01$) montre une différence hautement significative entre les activités enzymatiques des souches suivantes (P4 vs P5) avec des rapports de différences estimés à 87%. Aucune différence significative n'a été signalée entre les souches (P1, P3, P5, P11, P13, H1, H2, H5 et H8).

Selon l'ensemble des résultats obtenus, il apparaît que les plus fortes activités β -galactosidase enregistrées pour les différentes souches sont dans un ordre décroissant de l'ordre de 14.84, 14.60, 14.33, 14.10, 13.49, 12.13 et 11.27 U/mL respectivement pour les 5 premières espèces *plantarum* P4, P17, P12, P10 et P6, suivies *L. herbarum* H10 et enfin une sixième espèce *L. plantarum* qui est P7. En revanche, l'activité la plus faible (0.16 U/mL) a été observée chez la souche *Lactobacillus brevis* B1.

Les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* sont parmi les microorganismes fermentateurs les plus importants, elles sont largement utilisées dans le secteur agroalimentaire.

La β -galactosidase est une enzyme produite par ces bactéries dans les produits laitiers tels que le yaourt, le fromage et le lait. Cette enzyme scinde le lactose, principal glucide du lait, en glucose et en galactose, qui peuvent être ensuite absorbés par l'épithélium intestinal (Troelsen, 2005).

La β -galactosidase est une enzyme intracellulaire dont l'extraction à partir des cellules de lactobacilles dépend de la méthode utilisée par le manipulateur dans la perturbation de la paroi cytoplasmique qui la rend perméable au passage de l'enzyme dans le milieu extérieur.

Cette perturbation de la membrane des cellules est l'étape première la plus importante dans l'extraction et la préparation des produits intracellulaires de synthèse cellulaire.

Le lysozyme a été utilisé comme agent de lyse enzymatique responsable de la digestion de la couche de peptidoglycane (catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques) de la paroi cellulaire bactérienne. La lyse enzymatique présente l'avantage d'être spécifique et douce, mais par contre c'est une méthode coûteuse.

Deux méthodes sont actuellement utilisées pour la rupture cellulaire à grande échelle : ce sont le broyeur à billes à haute vitesse et l'homogénéisateur à haute pression (Bury *et al.*, 2001).

Kara (2004) avait constaté que la sonication n'entraînait aucune diminution importante du nombre de cellules bactériennes et il avait conclu que cette méthode pouvait être utilisée comme outil de choix pour la libération de la β -galactosidase chez les espèces utilisées comme probiotiques (Kara, 2004).

La sonication, en tant qu'amplificateur de la lyse de la membrane cellulaire, présente beaucoup d'avantages dont le plus important est l'augmentation significative l'activité de la lactase (Shah et Jelen, 1991).

Geciova *et al.* (2002) ont souligné que de nombreux chercheurs ont étudié la sonication en tant que méthode d'accélération du processus de fermentation laitière. Ces auteurs précisent qu'après sonication de la souche *Streptococcus thermophilus* 143 produisant beaucoup de lactase au cours de la fermentation du yogourt, un épuisement de l'ordre 71 à 74% de la teneur initiale en lactose du lait a été observé. Dans cette même étude, ils avaient rapporté que 39 à 51% de l'hydrolyse du lactose a été obtenue dans du lait sans sonication.

Feliu *et al.* (1998) ont rapporté que la résistance à la désintégration cellulaire par sonication varie selon les espèces bactériennes. Par ailleurs, Kara (2004) avait noté que pour une souche donnée, il y a avait une corrélation positive entre l'activité de la lactase et le temps de sonication.

L'intolérance au lactose est reconnue depuis de nombreuses années comme un problème fréquent chez de nombreux enfants et la plupart des adultes à travers le monde (Heyman, 2006).

Les recherches effectuées pour pallier à ce déficit en lactase ont abouti à la mise au point de laits partiellement ou totalement délactosés qui existent dans le commerce, ainsi qu'à l'utilisation de complément alimentaire sous forme de comprimé d'enzyme lactase industrielle (biologique) ou bien de bactéries lactiques probiotiques potentiellement

productrices de cette enzyme pouvant permettre aux personnes sensibles de consommer quand même du lait entier sans craindre cet inconfort digestif que représente l'intolérance au lactose.

La sélection du genre *Lactobacillus* comme modèle d'étude de l'activité β -galactosidase se justifie par le fait qu'il peut avoir un statut probiotique (microorganisme GRAS) avec un haut potentiel de synthèse de β -galactosidase permettant d'améliorer la digestion du lactose (Vinderola et Rriheimer, 2003).

Dans cette étude, l'association de deux méthodes a été utilisée pour la lyse cellulaire, car les espèces du genre *Lactobacillus* présentent très peu d'activité lactasique extracellulaire, cette activité peut être multipliée plusieurs fois par lyse de cellules bactériennes induites par différents procédés.

Chez les bactéries à Gram positif, une couche épaisse de mucopeptides (réseau de peptidoglycanes) confère une rigidité considérable à la paroi cellulaire. Le réseau de peptidoglycanes semble constituer la principale résistance aux méthodes de lyse des cellules bactériennes (Yadav *et al.*, 2018).

Par conséquent, la quantité de protéines libérée est automatiquement liée à l'efficacité de la méthode de lyse et la nature de la paroi cellulaire. Berger *et al.* (1995) avaient rapporté que la sonication était plus efficace que l'homogénéisation à haute pression, le broyage à la perle ou encore les traitements au toluène-acétone pour la libération de la β -galactosidase.

Les facteurs qui affectent la lyse des cellules microbiennes avec les conditions de sonication dépendent du processus (amplitude, durée, température et fréquence) et de l'entité microbienne (type et stade de croissance du microorganisme) (Kreft et Jelen, 2000; Wang et Sakakibara, 1997).

Le lysozyme (EC 3.2.1.17), également appelé muramidase ou N-acétylmuramideglycanhydrolase, est une glycoside hydrolase qui perméabilise spécifiquement la paroi cellulaire bactérienne en catalysant l'hydrolyse des liaisons bêta 1-4 entre l'acide N-acétylmuramique et le N-acétyl-D résidus de glucosamine dans la couche du peptidoglycane (Choonia et Lele, 2013).

Dans une expérience réalisée par Prasard *et al.* (2013), la méthode de sonication s'est avérée plus efficace pour *B. animalis* subsp *lactis* Bb12, alors que le traitement au lysozyme-EDTA était plus efficace pour *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Dans une recherche similaire, [Montanari et al. \(2000\)](#) démontrent que les souches *L. plantarum* ATCC 1056, *L. plantarum* ATCC 1110 et *L. plantarum* ATCC 1173 présentaient une activité β -galactosidase avec des valeurs relativement faibles de l'ordre de 0.70, 0.92 et 1.61 U/mL, respectivement. En revanche, [Prasad et al. \(2013\)](#) ont obtenu des niveaux d'activité maximale de la β -galactosidase plus élevés, de l'ordre de 6,80 U/mL avec *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 et 7,77 U/mL avec *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Les activités enzymatiques β -galactosidase de la majorité des souches isolées à partir de laits de chamelle et de chèvre enregistrées dans la présente étude sont beaucoup plus importantes que celles rapportées par ces auteurs. Si on considère les espèces *plantarum* par exemple, on constate que notre souche P4 a une activité β -galactosidase qui représente plus de 21,16 et 9 fois celles des souches *L. plantarum* de la collection américaine ATCC 1056, 1110 et 1173 respectivement.

Dans une autre étude réalisée par [Khusniati et al. \(2013\)](#), la souche *L. plantarum* B110 était le meilleur produisant de la β -galactosidase avec une activité enregistrée de l'ordre de 1,93 U/mL.

[Al-Zahrani \(2019\)](#) a isolé à partir de lait de chamelle la souche *Lactobacillus plantarum* KM5 qui exprimait une activité enzymatique β -galactosidase de l'ordre de 1.34U/mL. En ce qui concerne la souche *Lactobacillus brevis*, bactérie à Gram positive hétéro-fermentative obligatoire, contrairement aux souches laitières industrielles, *L. brevis* ne peut pas fermenter le lait car il lui est difficile d'utiliser du lactose ([Kim et al., 2009](#) ; [Rönkä et al., 2003](#)) ; et ceci conforte en quelque sorte la très faible activité β -galactosidase (0,16 U/mL) mesurée pour cette souche dans ce travail.

[Zheleva et al. \(2014\)](#) ont étudié l'influence de la concentration de lactose dans le milieu de culture sur l'activité enzymatique de *Lactobacillus plantarum*, ce qui peut expliquer la présence parfois de différence entre nos résultats et ceux des autres auteurs vis-à-vis de l'activité β -galactosidique.

Il a été démontré et observé par ([Kara, 2004](#)) que le maximum de la production de la β -galactosidase correspond au début de la phase stationnaire, ces auteurs ont observé une diminution de la production de l'enzyme β -galactosidase après cette activité maximale de la β -galactosidase peut être due :

- L'inhibition des fonctions cellulaires résultant de la diminution de pH, à cause de la production d'acide lactique (Kashket, 1987).
- Diminution des facteurs nutritionnels et facteurs de croissances.
- La quantité de glucose et galactose produite peuvent réguler l'activité enzymatique par répression catabolique.

III.4. Résultats de la fermentation du lactose par les lactobacilles isolés et cultivés sur lactosérum

III.4.1. Caractéristiques physicochimiques du substrat « lactosérum déprotéiné »

Le lactosérum provenant de la fromagerie Sidi Saada (wilaya de Relizane) a été utilisé comme milieu de culture pour la fermentation lactique. La composition physicochimique de ce lactosérum avant et après une déprotéinisation est reportée au tableau 15.

Tableau 15: Composition biochimique du lactosérum acide entier et déprotéiné.

Paramètres	Lactosérum entier	Lactosérum déprotéiné
Lactose (g/100g)	60.7	57.7
pH	3.53	7
Matière grasse (g/100g)	0.75	0
Protéines (g/100g)	3.38	2.49
Matière sèche (g/100g)	7.34	5.05
Taux de cendre (g/100g)	6.07	6.01

Par définition, le lactose, les sels minéraux et des protéines mineures du lait (α -lactalbumine et β -lactoglobuline) sont les seuls constituants du lactosérum issu des fromageries. C'est au cours des différentes opérations de sa déprotéinisation (en particulier le chauffage à 120°C qui induit une hydrolyse du lactose) qu'il y a perte d'environ 5% du lactose (Tableau 15).

III.4.2. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches *L. Plantarum* issues de lait de chamelle

Un taux de diminution de lactose de l'ordre de 10,87% et 15,59 % pour les souches *Lactobacillus plantarum* P1 *Lactobacillus plantarum* P2 après 12 heures d'incubation dans du lactosérum avec des pH de l'ordre de 4,53 et 4,71 (Fig. 45 et 46).

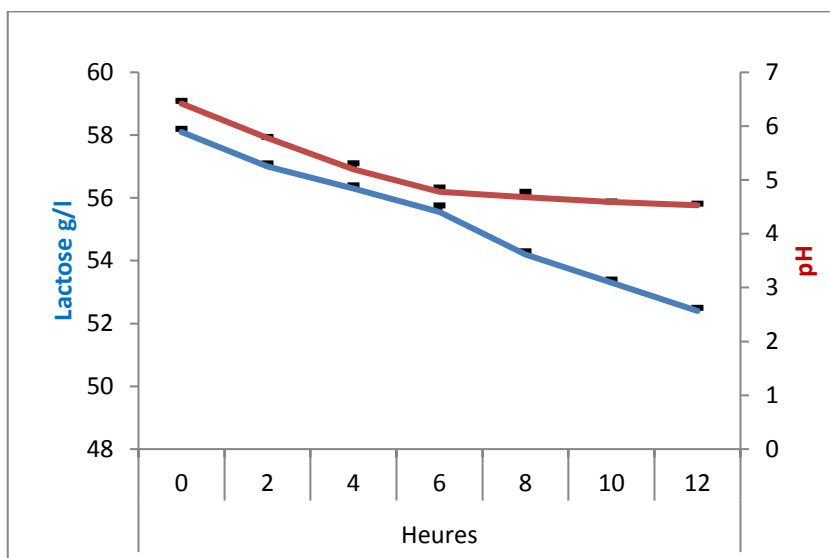


Figure 45: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P1 dans le lactosérum (N=3 \pm écartypes).

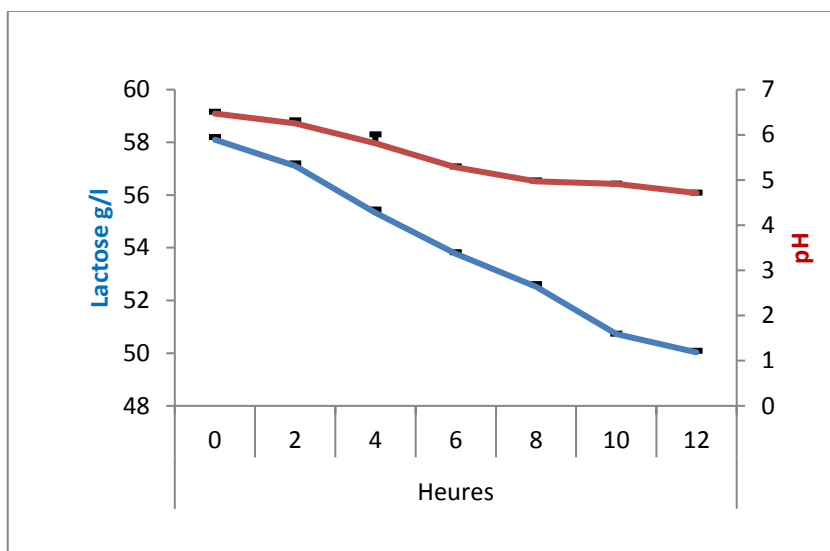


Figure 46: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P2 dans le lactosérum (N=3 \pm écartypes).

Nous avons noté des taux de diminution de lactose dans du lactosérum après son incubation avec les deux souches *Lactobacillus plantarum* P3 et *Lactobacillus plantarum* P4 de l'ordre de 8,68 et 41,09 % et des pH de 4,72 et 4,15 respectivement pour les deux souches, ce résultat reflète la forte activité de dégradation de lactose par la souche P4 (Fig. 47 et 48).

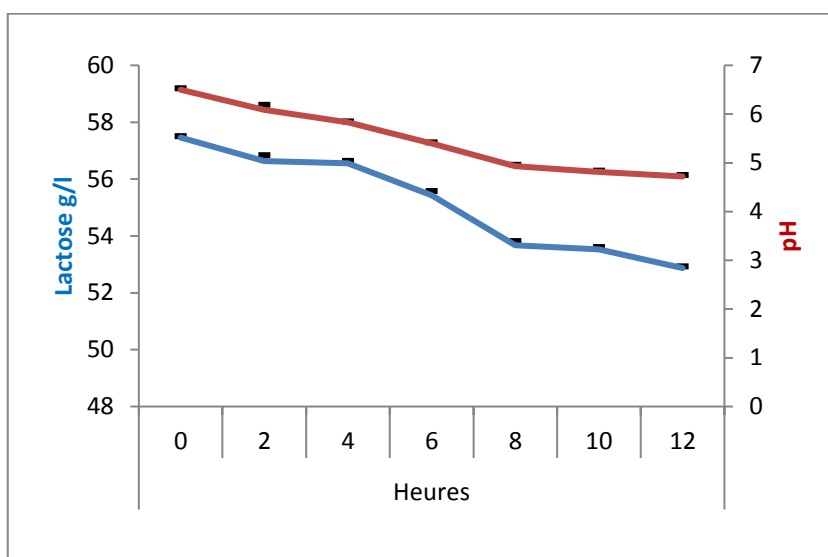


Figure 47: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P3 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

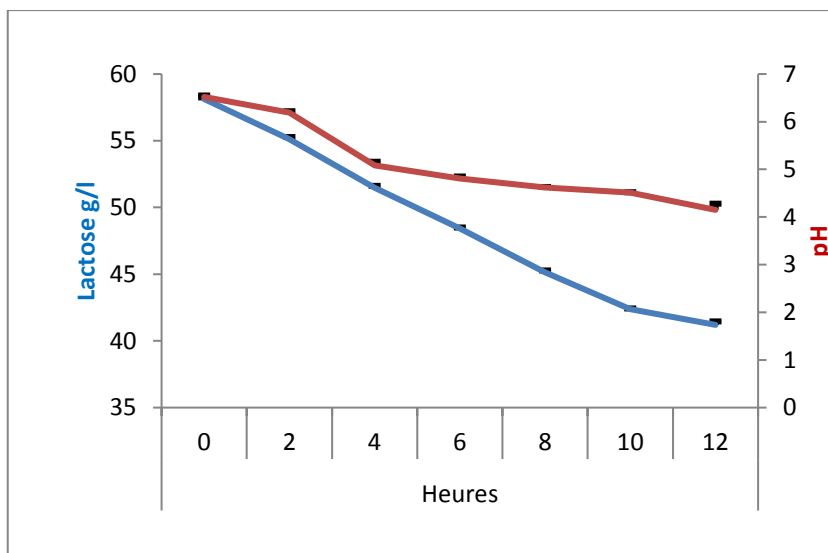


Figure 48: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P4 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

De même pour les deux souches *Lactobacillus plantarum*P5 et *Lactobacillus plantarum* P6, nous avons enregistré des taux de diminution de lactose après 12 heures d'incubation avec du lactosérum de l'ordre de 6,35 et 26,89 % et des pH de 4,22 et 4,15 respectivement pour les deux souches, on observe à travers ces résultats la bonne activité lactasique de la souche P6 (Fig. 50 et 51).

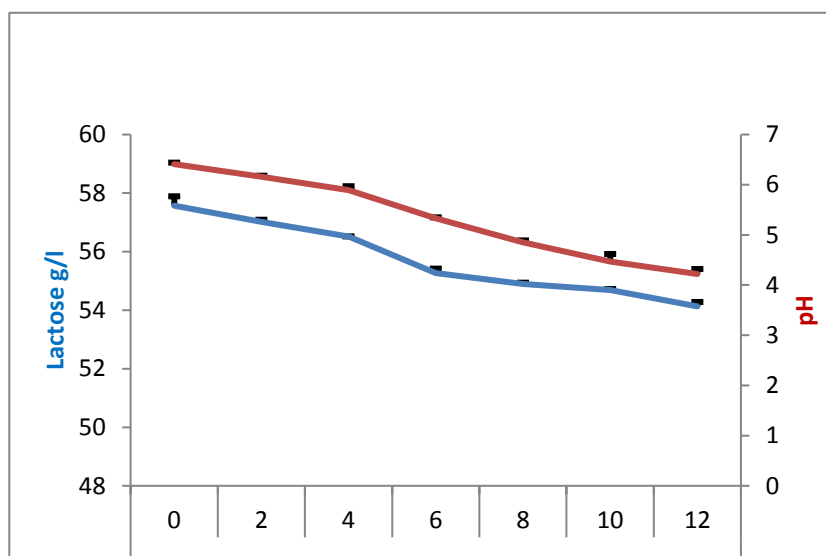


Figure 49: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P5 dans le lactosérum (N=3 \pm écartypes).

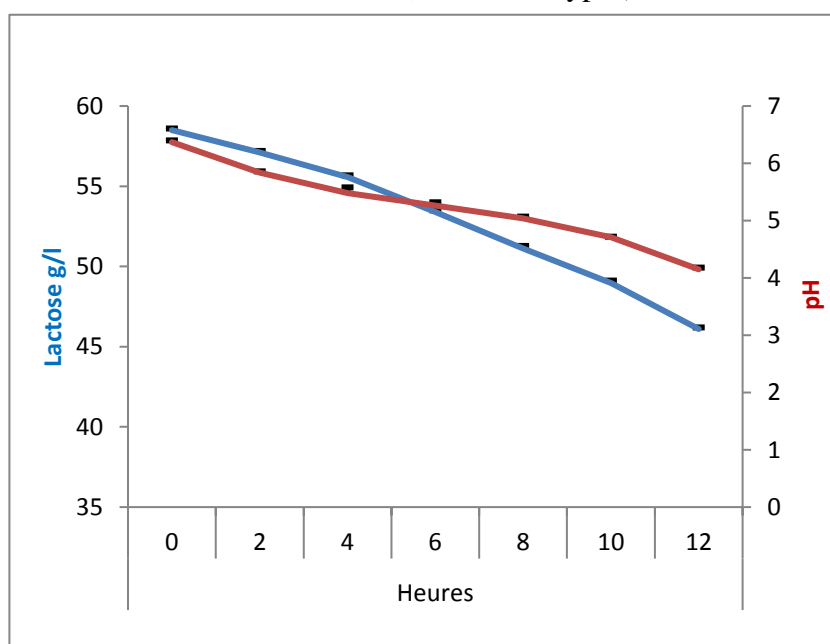


Figure 50: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P6 dans le lactosérum (N=3 \pm écartypes).

Lactobacillus plantarum P7 et *Lactobacillus plantarum* P8 ont révélées une consommation de lactose après incubation avec du lactosérum avec des taux de l'ordre de 16,13 et 10,45 % et des pH de 4,71 et 4,46 respectivement pour les deux souches (Fig. 51 et 52).

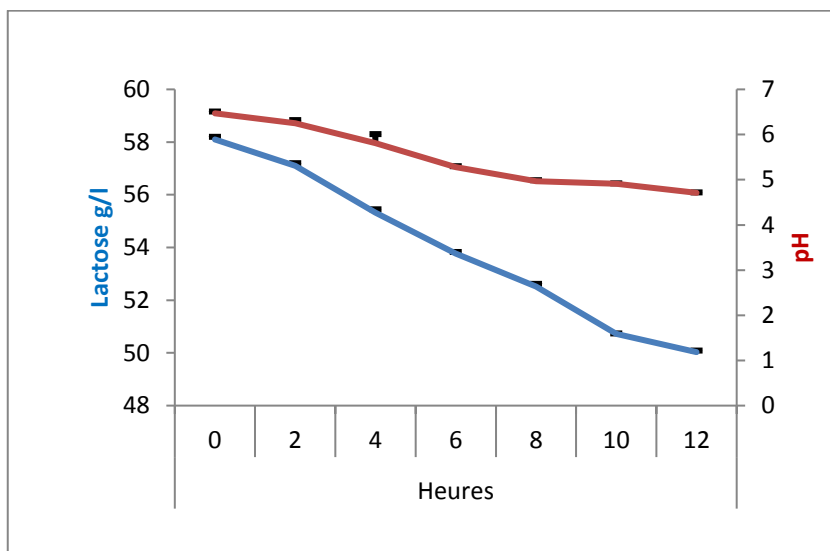


Figure 51: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P7 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

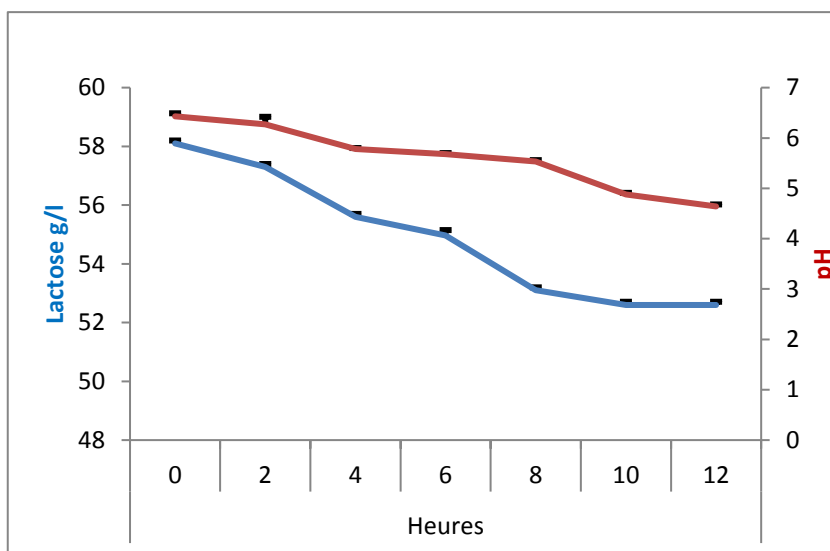


Figure 52: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P8 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Nous avons enregistré après 12 heures d'incubation dans du lactosérum de la souche *Lactobacillus plantarum* P9, une diminution comparable de lactose avec les souches précédentes et qui est de l'ordre de 16,40 % avec un pH de 4,57 (Fig. 53).

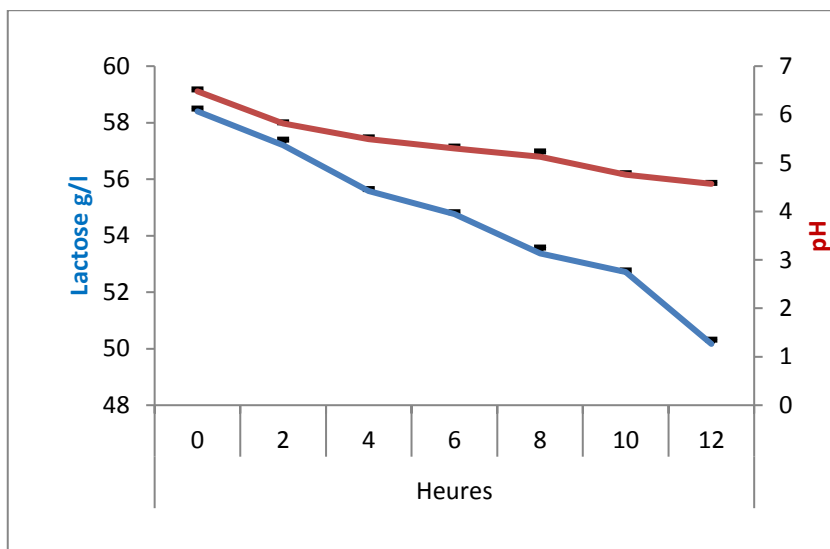


Figure 53: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P9 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Quant à la souche *Lactobacillus plantarum* P11, nous avons noté une diminution de lactose contenu dans du lactosérum après 12 heures d'incubation de 4,05 % et un pH de 5,21 (Fig. 54).

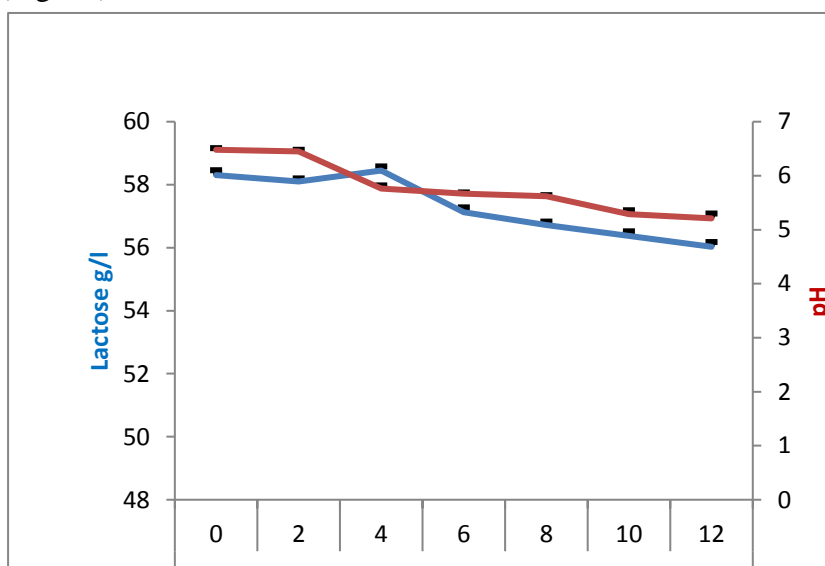


Figure 54: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P11 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Après 12 heures d'incubation dans du lactosérum avec *Lactobacillus plantarum* P12 et *Lactobacillus plantarum* P13, nous avons obtenu une diminution du taux de lactose de l'ordre de 34,64 et 15,96 % et des pH de 4,44 et 4,71 respectivement pour les deux souches (Fig. 55 et 56).

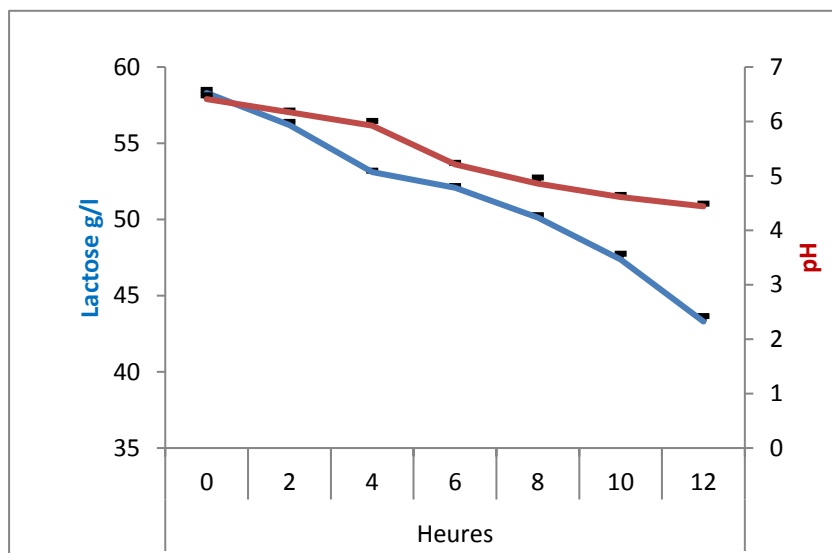


Figure 55: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P12 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

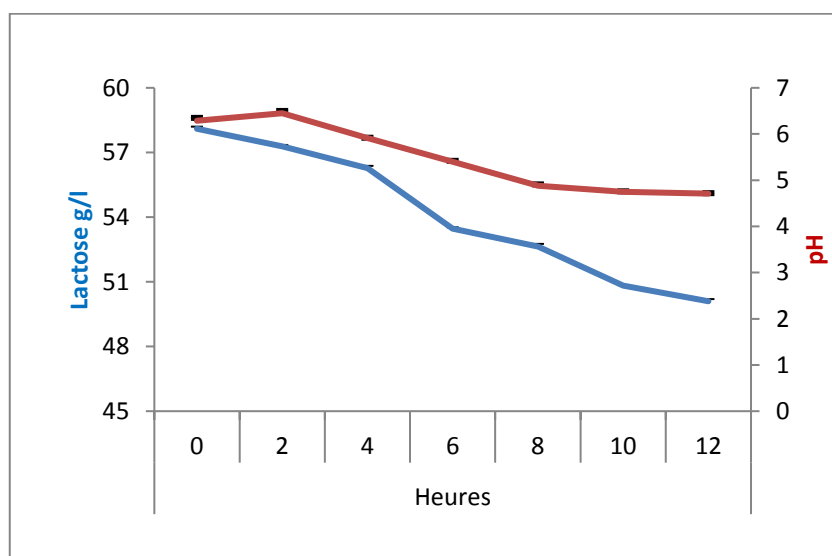


Figure 56: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P13 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Lactobacillus plantarum P14 et *Lactobacillus plantarum* P15 ont exhibées après incubation de 12 heures dans le lactosérum un taux de diminution de lactose de l'ordre de 8,74 et 6,72 % et des pH de 4,59 et 4,6 respectivement pour les deux souches (Fig. 57 et 58).

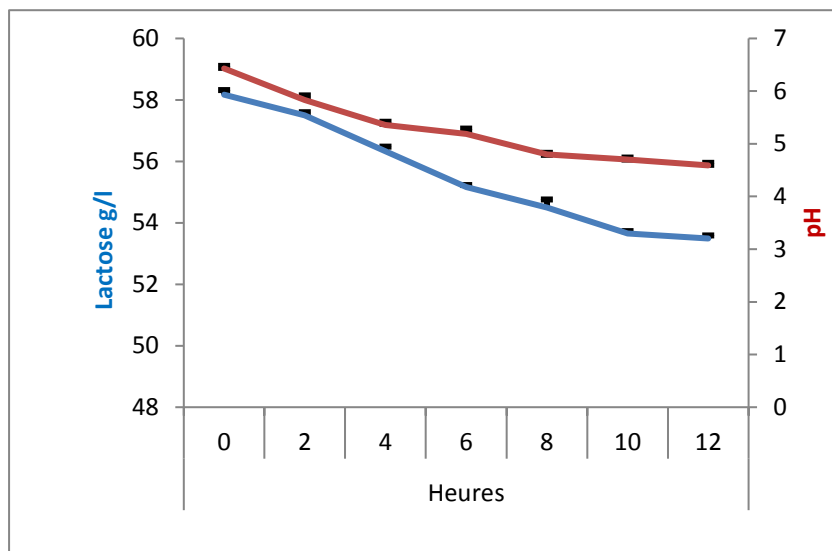


Figure 57: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P14 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

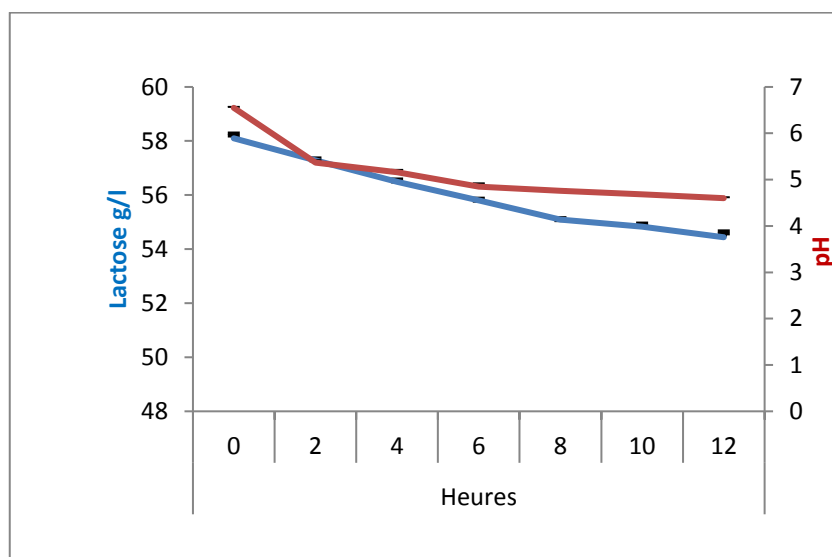


Figure 58: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P15 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

La souche *Lactobacillus plantarum* P16 a montré une activité modérée de dégradation de lactose après 12 heures d'incubation dans du lactosérum, avec un taux de l'ordre de 5,44 % et un pH de 4,46 (Fig. 59).

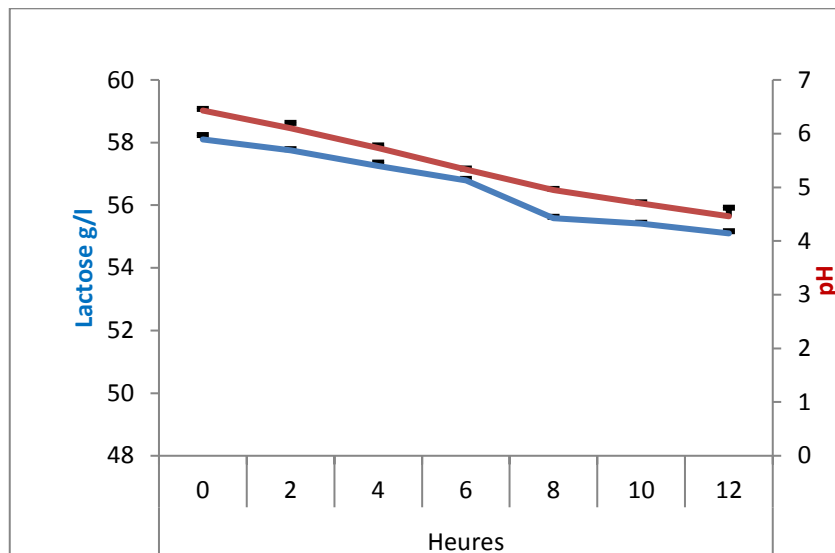


Figure 59: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P16 dans le lactosérum ($N=3 \pm$ écartypes).

Après 12 heures d'incubation dans du lactosérum de la souche *Lactobacillus plantarum* P17, nous avons obtenu une diminution de lactose de l'ordre de 40,5 % et un pH de 4,3 (Fig. 62).

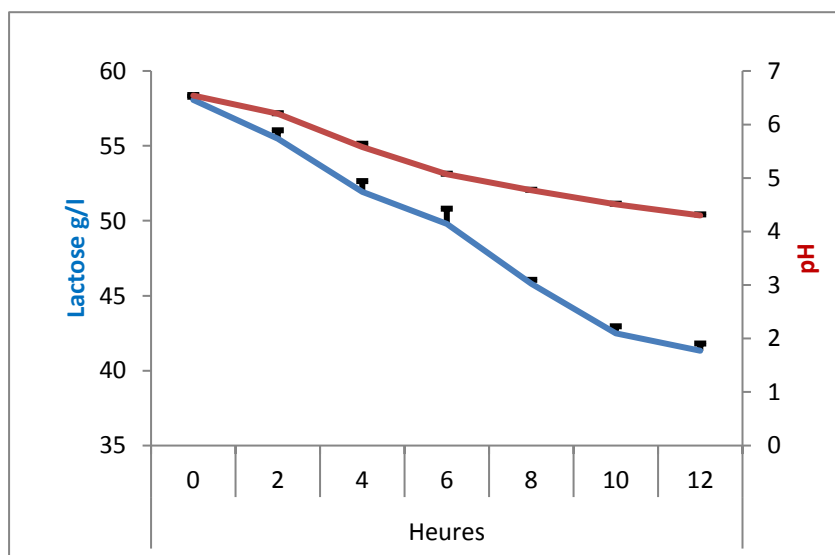


Figure 60: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P17 dans le lactosérum ($N=3 \pm$ écartypes).

III.4.3. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches *L. herbarum* issues de lait de chamelle

Nous avons enregistré une diminution du taux de lactose suite à sa consommation et sa dégradation par l'enzyme β -galactosidase produite lors de l'incubation du lactosérum avec la souche *Lactobacillus herbarum* H1 pendant 12 heures, avec des taux de diminution enregistré de l'ordre de 9,83 % et un pH de 4,65 (Fig. 61).

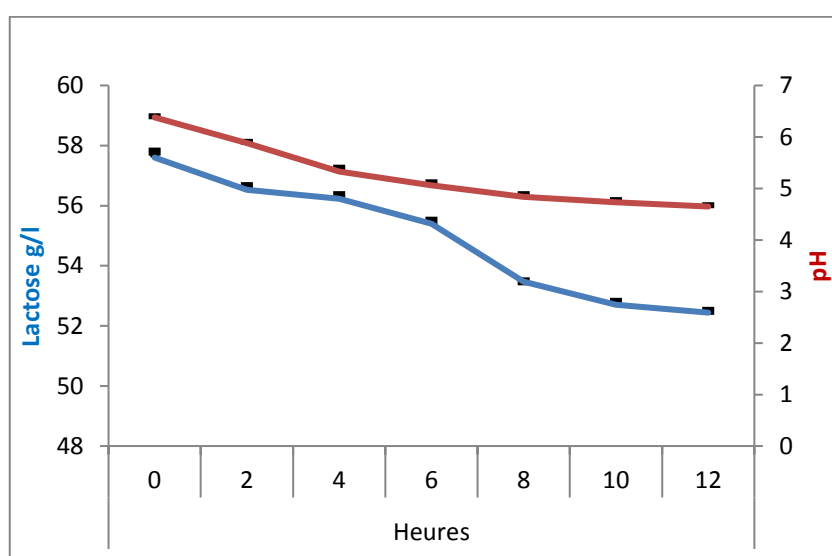


Figure 61: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H1 dans le lactosérum (N=3 \pm écartypes).

Lactobacillus herbarum H4 a enregistré après 12 heures d'incubation dans du lactosérum un taux de diminution de lactose de l'ordre de 11,36 % et un pH de 4,71 (Fig. 62).

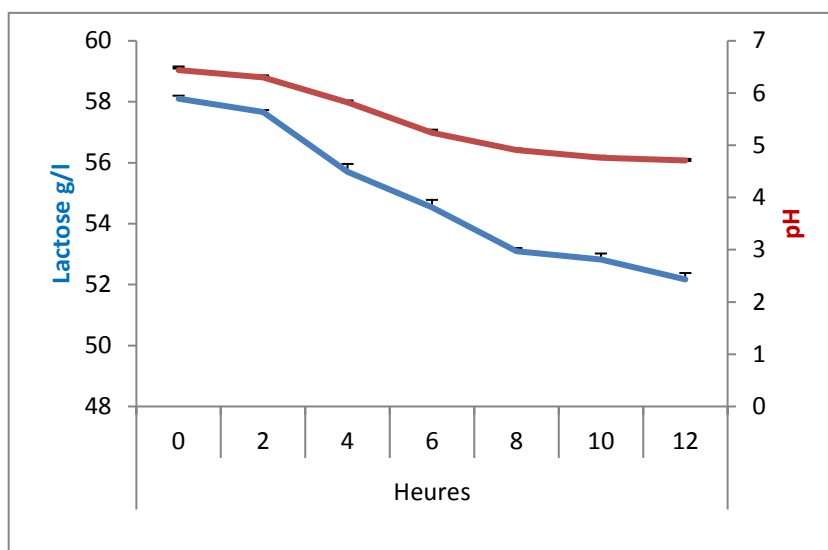


Figure 62: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H4 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Après 12 heures d'incubation avec du lactosérum, la diminution de lactose avec la souche *Lactobacillus herbarum* H6 avec un taux de l'ordre de 9,90 % et un pH de 4,53 (Fig. 63).

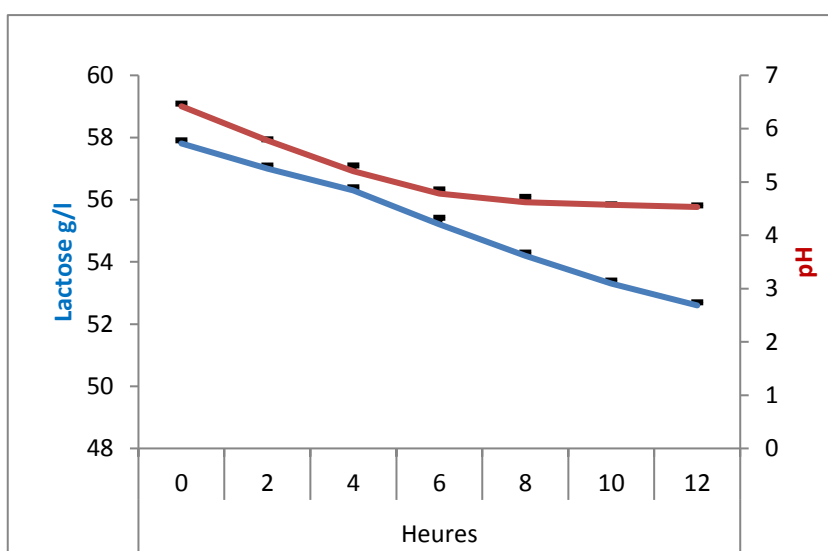


Figure 63: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H6 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Nous avons enregistré après 12 heures d'incubation dans le lactosérum la souche *Lactobacillus herbarum* H7, une diminution comparable avec les souches précédentes vis-à-vis du lactose et qui sont de l'ordre de 16,43 % avec un pH de 4,74 (Fig. 64).

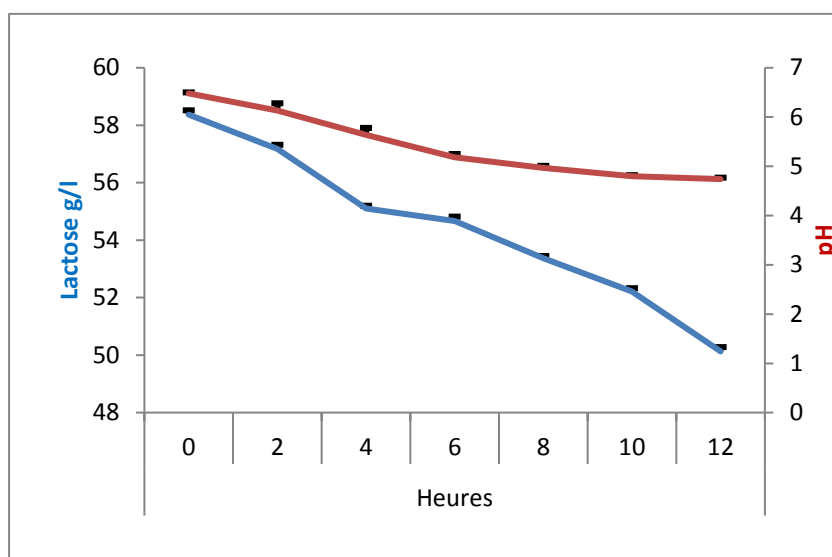


Figure 64: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H7 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

La souche *Lactobacillus herbarum* H8 a montré une activité modérée de dégradation de lactose après 12 heures d'incubation dans le lactosérum, avec un taux de l'ordre de 9,17 % et un pH de 4,62 (Fig. 65).

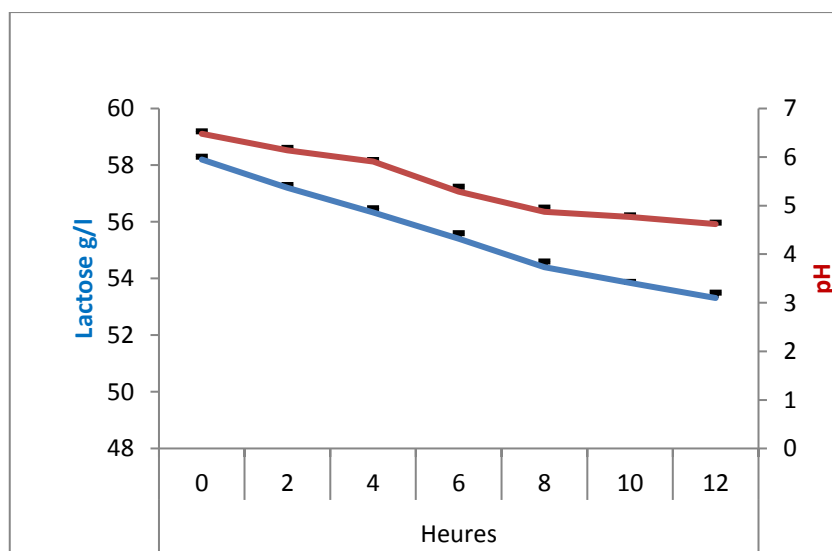


Figure 65: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H8 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Nous avons noté une faible activité dégradant le lactose de la part de la souche *Lactobacillus herbarum* H9 notant un taux de diminution de l'ordre de 8,95 %, avec un pH de 4,53 (Fig. 66).

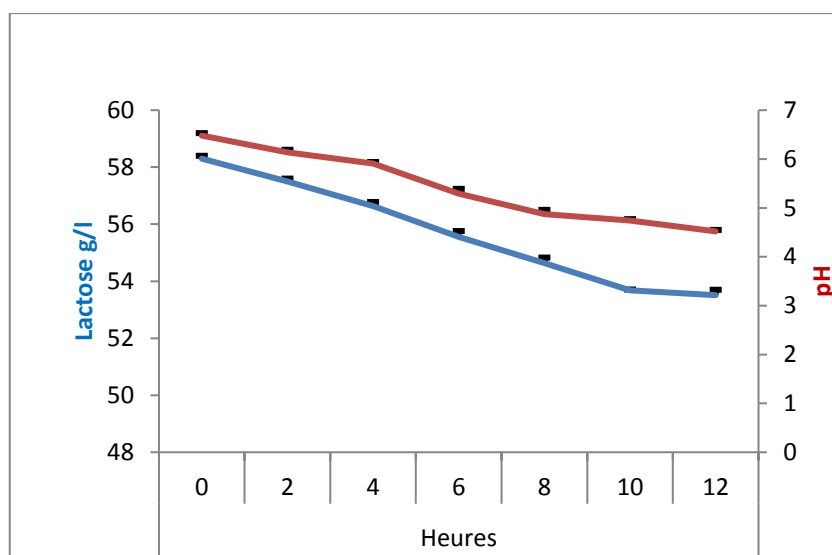


Figure 66: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H9 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

III.4.4. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches *L. plantarum* issues de lait de chèvre

Quant aux la souche *Lactobacillus plantarum* P10, nous avons noté une diminution de lactose contenu dans du lactosérum après 12 heures d'incubation, avec des taux de l'ordre de 31,97 % et un pH de 4,17, ce résultat montre que la souche P10 possède une bonne activité de β -galactosidase (Fig. 67).

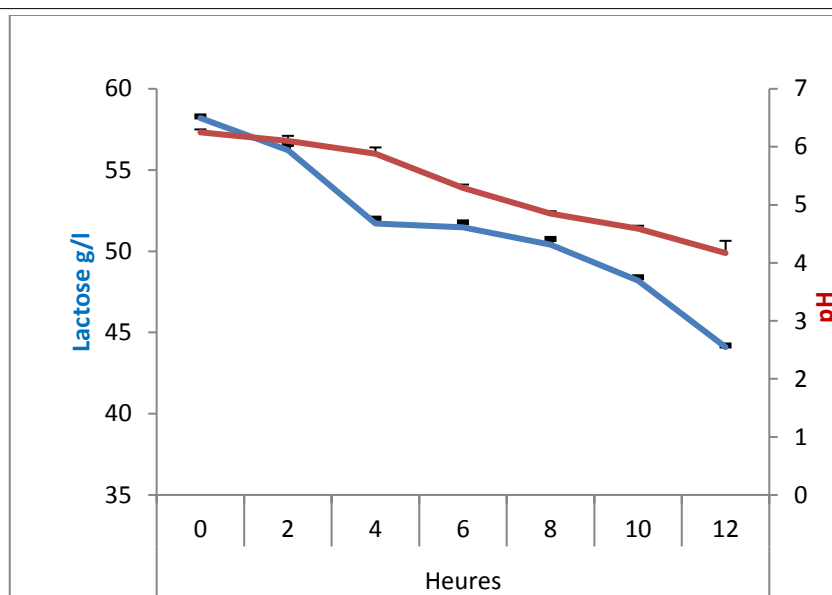


Figure 67: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus plantarum* P10 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

III.4.5. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose par les souches *L. herbarum* issues de lait de chèvre

Un taux de diminution de lactose de l'ordre de 8,92 % et un pH de l'ordre 4,63 respectivement pour la souche *Lactobacillus herbarum* H3 après 12 heures d'incubation dans du lactosérum (Fig. 68).

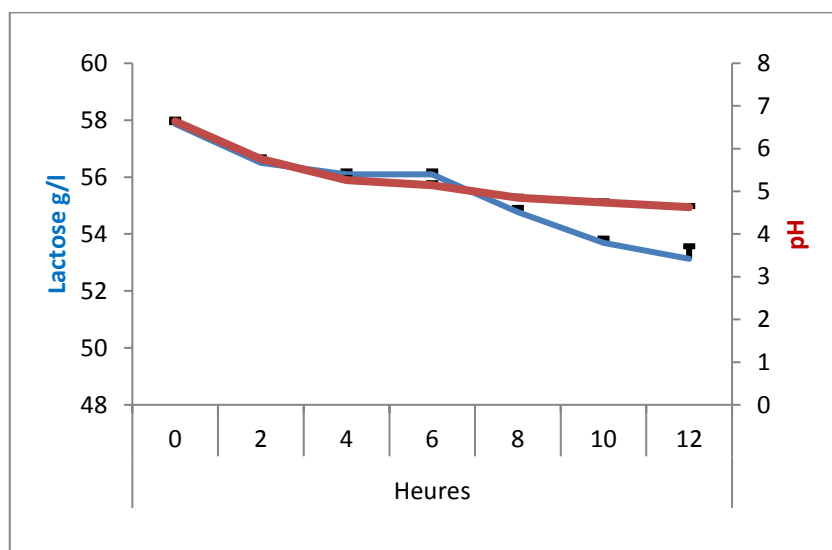


Figure 68: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H3 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Lactobacillus herbarum H5 a enregistré après 12 heures d'incubation dans du lactosérum un taux de diminution de lactose de l'ordre de 8,25 % et un pH de 4,48 (Fig. 69).

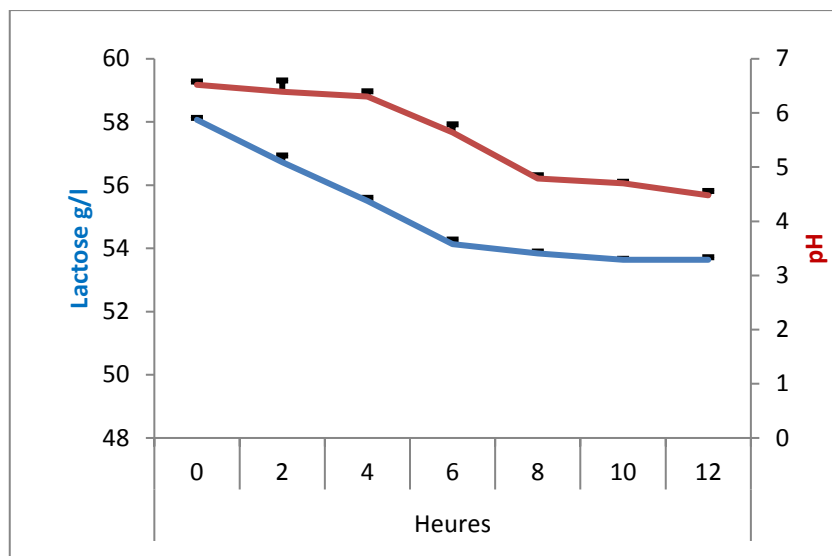


Figure 69: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H5 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Après 12 heures d'incubation dans du lactosérum de la souche *Lactobacillus herbarum* H10, nous avons obtenu une diminution de lactose de l'ordre de 18,87 % et un pH de 4,05 (Fig. 70).

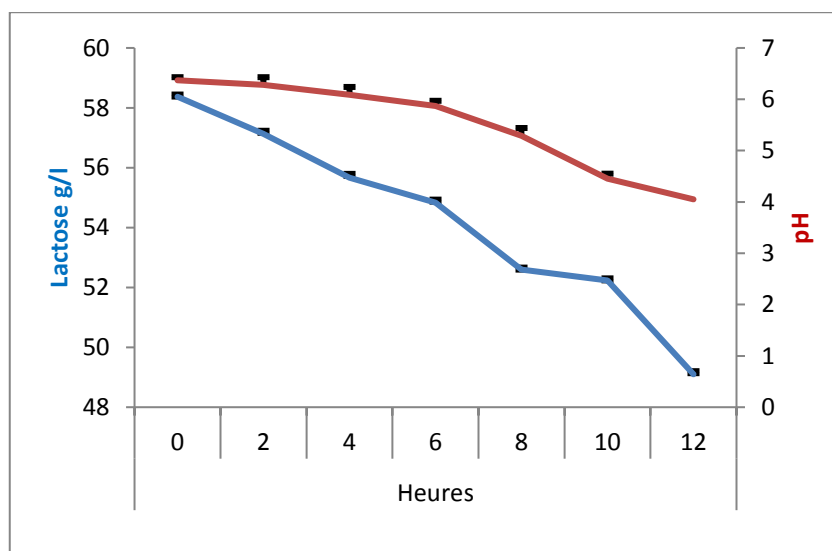


Figure 70: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H10 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Nous avons enregistré une diminution du taux de lactose suite à sa consommation et sa dégradation par l'enzyme β -galactosidase produite lors de l'incubation du lactosérum avec la

souche *Lactobacillus herbarum* H2 pendant 12 heures, avec un taux de diminution enregistré de l'ordre de 5,23% et des pH de 4,7 (Fig. 71).

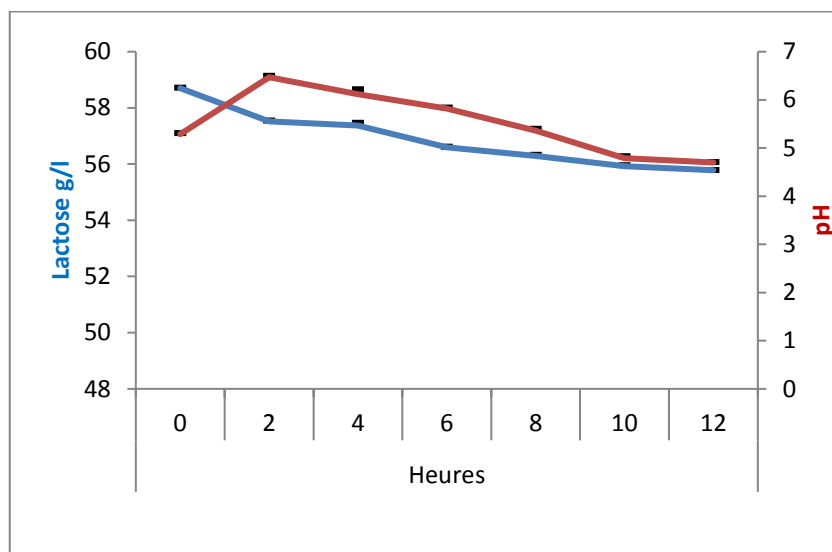


Figure 71: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus herbarum* H2 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

III.4.6. Résultat de l'hydrolyse et du métabolisme du lactose de la souche *L. brevis* issue de lait de chèvre

Nous avons noté une faible activité dégradant le lactose de la part de la souche *Lactobacillus brevis* B1 notant un taux de diminution de l'ordre de 2,81 %, avec un pH de 4, (Fig. 72).

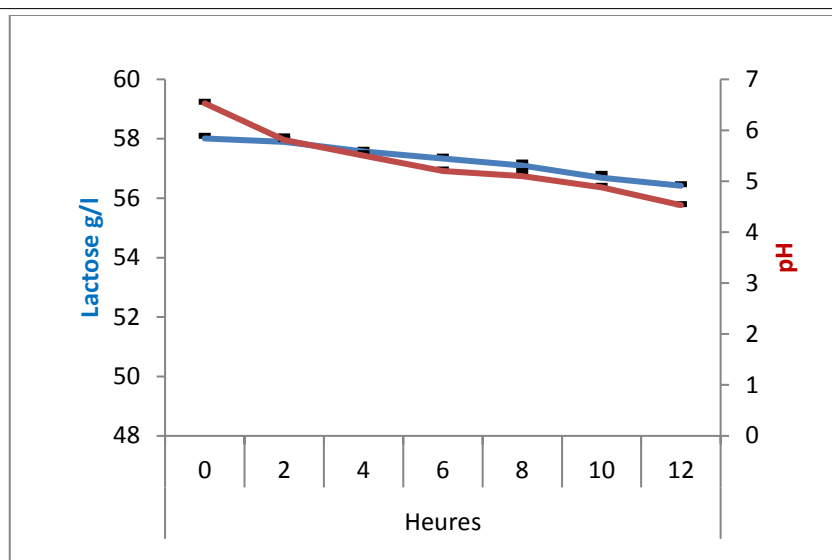


Figure 72: Cinétique de dégradation du lactose par la souche *Lactobacillus brevis* B1 dans le lactosérum (N=3 \pm ecartypes).

Le suivi de la consommation de lactose contenue dans du lactosérum après incubation des 28 souches isolées pendant 12 heures a révélé des taux de consommation différents d'une souche à l'autre. En effet, sur les 28 souches isolées, nous avons noté un classement par ordre décroissant à partir de la souche la plus active en consommation de lactose jusqu'à la plus faible comme suit : un premier groupe avec des taux allant de 41,09 à 15,59 % correspondant par ordre décroissant à : *Lactobacillus plantarum*P4, *Lactobacillus plantarum*P17, *Lactobacillus plantarum*P10, *Lactobacillus plantarum*P12, *Lactobacillus plantarum* P6, *Lactobacillus herbarum*H10, *Lactobacillus herbarum*H7, *Lactobacillus plantarum*P9, *Lactobacillus plantarum* P7, *Lactobacillus plantarum*P13 et *Lactobacillus plantarum* P2.

Un deuxième groupe avec des taux de consommation de lactose allant de 11,36 à 2,81% correspondant par ordre décroissant à : *Lactobacillus herbarum* H4, *Lactobacillus plantarum* P8, *Lactobacillus plantarum* P1, *Lactobacillus herbarum* H6, *Lactobacillus herbarum* H1, *Lactobacillus herbarum*H8, *Lactobacillus herbarum*H9, *Lactobacillus herbarum* H3, *Lactobacillus plantarum*P14, *Lactobacillus plantarum*P3, *Lactobacillus herbarum* H5, *Lactobacillus plantarum*P15, *Lactobacillus plantarum*P5, *Lactobacillus plantarum*P16, *Lactobacillus herbarum* H2, *Lactobacillus plantarum*P11 et en dernier lieu *Lactobacillus brevis*B1 (Tab. 16).

Tableau 16: Classement des souches par ordre décroissant en fonction du taux de lactose consommé dans le lactosérum.

Classement	Souches	Origine de la souche	Taux de diminution de lactose
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> P4	Chamelle	41,09 %
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> P17	Chamelle	40,5 %
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> P10	Chèvre	31,97 %
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> P12	Chamelle	34,64%
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> P6	Chamelle	26,89 %
6	<i>Lactobacillus herbarum</i> H10	Chamelle	18,87 %
7	<i>Lactobacillus herbarum</i> H7	Chamelle	16,43 %
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> P9	Chamelle	16,40 %
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> P7	Chamelle	16,13%
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> P13	Chamelle	15,96 %
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> P2	Chamelle	15,59 %
12	<i>Lactobacillus herbarum</i> H4	Chamelle	11,36 %
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> P8	Chamelle	10,45 %
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> P1	Chamelle	10,87%
15	<i>Lactobacillus herbarum</i> H6	Chamelle	9,90 %
16	<i>Lactobacillus herbarum</i> H1	Chamelle	9,83 %
17	<i>Lactobacillus herbarum</i> H8	Chamelle	9,17 %
18	<i>Lactobacillus herbarum</i> H9	Chamelle	8,95 %,
19	<i>Lactobacillus herbarum</i> H3	Chèvre	8,92 %
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> P14	Chamelle	8,74%
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> P3	Chamelle	8,68%
22	<i>Lactobacillus herbarum</i> H5	Chèvre	8,25 %
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> P15	Chamelle	6,72 %
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> P5	Chamelle	6,35%
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> P16	Chamelle	5,44 %
26	<i>Lactobacillus herbarum</i> H2	Chamelle	5,23%
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> P11	Chamelle	4,05 %
28	<i>Lactobacillus brevis</i> B1	Chèvre	2,81 %

L'ensemble de ces résultats montrent également que le pH diminue progressivement dans le lactosérum comparativement avec le pH initial de lactosérum. Cette diminution de pH est due principalement à la production de l'acide lactique dans le milieu de culture après dégradation du lactose.

Selon [Amrane et Prigent \(1998\)](#), la diminution du pH, lors de la culture libre se combine à l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes fastidieux et requièrent de complexes de croissance, en particulier pour les acides aminés (Gaudreau *et al.*, 2005). Cela montre que la production de β -galactosidase est principalement affectée par le type de glucide et par la quantité de source d'azote. Afin d'encourager la croissance des lactobacilles dans le lactosérum, des nutriments complexes tels que le lait écrémé en poudre, germe de malt, liqueur de maïs, extrait de levure, extrait de viande ou protéines de lactosérum hydrolysées doivent être utilisés (Bury *et al.*, 1999).

Dans cette étude nous avons additionné le lactosérum après traitement par la peptone et l'extrait de levure, à fin l'enrichir et de répondre aux exigences nutritionnelles des souches *Lactobacillus*.

Ornelaset *al.* (2007), ont montré dans une étude portée sur du métabolisme du lactose et de l'activité β -galactosidase chez *Kluyveromyces lactis* cultivé dans du lactosérum issu de fabrication de fromage, ils ont conclu que l'activité β -galactosidase maximale s'est révélé être à la transition entre la phase exponentielle tardive et début de phase de croissance stationnaire de cultures.

Le lactose est le principal constituant du lactosérum de fromagerie, ce sucre représente une principale source de carbone pour les microorganismes (Luquet et François, 1990). Les résultats de Boudjema (2009) ont montré que le lactose représente 70 à 72 % de l'extrait sec de lactosérum.

L'ensemble des résultats enregistrés montrent que la quantité de lactose diminue progressivement avec le temps d'incubation dans les lactosérumsensemencés par les souches *Lactobacillus* isolées comparativement à la quantité de lactose initiale.

La cinétique de dégradation du lactose reflète dans la plupart des cas des souches étudiées leur l'activité β -galactosidique.

En effet sur les 28 souches testées, les souches présentant une fortes activité β -galactosidique et qui sont représentés par ordre décroissant par les souches *L. plantarum* P4, *L. plantarum* P17, *L. plantarum* P12, *L. plantarum* P10, *L. plantarum* P6, *L. herbarum* H10 et *L. plantarum* P7, correspondent respectivement aux activités :14.68, 14.66, 14.33, 14.14, 13.49, 12.13 et 11.16 U/mL, ces activités enzymatiques correspondent après incubation dans

du lactosérum à des taux de dégradation de lactose de l'ordre de 41.09, 40.5, 34.64, 31.97, 26.89, 18.87 et 16.13 respectivement.

. L'ensemble de ces résultats semble très cohérent, puisque on constate que les mêmes souches qui sont les plus actives en enzyme β -galactosidase, dégradent le lactose du lactosérum avec le même ordre obtenu lors de la mesure de cette activité.

Concernant la souche *Lactobacillus brevis* B1, son activité était classée la plus faible parmi les 28 souches isolées (0.16 U/mL), ce résultat concorde parfaitement avec le résultat du taux de diminution du lactose obtenu après l'incubation de cette souche dans du lactosérum et qui était de l'ordre de 2.81 %.

CONCLUSION

Conclusion

L'intolérance au lactose est un inconfort digestif pouvant toucher certaines personnes présentant une déficience de l'enzyme lactase et qui se traduit par une incapacité de digérer le lactose. Il s'agit d'un syndrome clinique qui se caractérise par l'apparition de symptômes gastro-intestinaux chez les personnes qui absorbent mal le lactose.

Le lactose est un disaccharide présent naturellement dans le lait des mammifères, entre autres le lait de vache. Au cours de la digestion, il est décomposé en glucose et en galactose dans l'intestin grêle par l'enzyme lactase. Toutefois, certaines personnes n'arrivent pas à digérer et à absorber adéquatement le lactose, ceci se traduit par un syndrome clinique qui se définit par l'apparition de symptômes gastro-intestinaux à la suite de l'ingestion de lactose par une personne qui présente une malabsorption du lactose (Suchy *et al.*, 2010 ; Heyman, 2006).

Les symptômes de l'intolérance au lactose sont le résultat de la fermentation bactérienne du lactose non digéré au niveau du côlon (Suchy *et al.*, 2010). Ils sont directement liés à la quantité de lactose ingérée et ne dépendent pas de la cause de la malabsorption du lactose (Heyman, 2006). Les symptômes gastro-intestinaux courants qui peuvent survenir après l'ingestion de lactose chez les personnes intolérantes au lactose comprennent les douleurs abdominales, la diarrhée, les flatulences et les ballonnements.

Les produits laitiers fermentés contenant des cultures bactériennes actives sont l'une des sources les plus courantes de probiotiques ; les produits laitiers additionnés de probiotiques pourraient améliorer le microbiote intestinal, avoir un effet immunomodulateur et ainsi favoriser le maintien d'une bonne santé générale en assurant des effets bénéfiques qui peuvent soulager les symptômes de certains troubles gastro-intestinaux, y compris ceux résultant de l'intolérance au lactose.

L'objectif principal de cette étude était l'isolement et la sélection de souches de lactobacilles originaires de différentes régions du Sahara Algérien, à savoir Bechar, El-Bayad et Tindouf, et d'évaluer leur activité β -galactosidase.

L'étude de la croissance des différentes souches isolées en présence et en absence de lactose a montré des préférences différentes d'une souche à l'autre, sur les 28 souches isolées, les résultats ont révélé que sur les 28 souches isolées, 17 souches confirment une amélioration de croissance avec des taux d'amélioration compris entre 278,78 et 10,23%, et qui sont

représentées par ordre décroissant par : *Lactobacillus plantarum* P2, *Lactobacillus plantarum* P17, *Lactobacillus herbarum* H10, *Lactobacillus plantarum* P7, *L. plantarum* P6, *Lactobacillus plantarum* P11, *Lactobacillus plantarum* P9, *Lactobacillus herbarum* H7, *Lactobacillus brevis* B1, *L. herbarum* H4, *Lactobacillus herbarum*, *Lactobacillus plantarum* P16, *L. herbarum* H8, *Lactobacillus plantarum* P12, *L. herbarum* H1, *L. herbarum* H6 et *Lactobacillus plantarum* P8.

Ces souches ont été identifiées phénotypiquement à travers la coloration de Gram et le profil fermentaire et test d'hydrolyse de l'arginine, ainsi que génotypiquement en utilisant l'amplification ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode de la réaction polymérase en chaîne (PCR). Leur capacité à hydrolyser le O-nitrophényl- β -D galactopyranoside (ONPG) a été déterminée.

Un procédé de lyse cellulaire impliquant un traitement par sonication et par lysozyme a été utilisé pour la libération de β -galactosidase à partir des souches isolées. L'analyse de leurs séquences de gènes d'ARNr 16S a révélé que les souches regroupées dans le genre *Lactobacillus*, 17 isolats ont été identifiés comme étant *L. plantarum*, 10 isolats comme *L. herbarum* et un isolat comme *L. brevis*. Les meilleures activités β -galactosidases enzymatiques intracellulaires obtenues par ordre décroissant sont 14,84 (*L. plantarum* P4), 14,60 (*L. plantarum* P17), 14,33 (*L. plantarum* P12), 14,10 (*L. plantarum* P10), 13,49 (*L. plantarum* P6), 12,13 (*L. herbarum* H10) et 11,27 U / mL (*L. plantarum* P7) ; alors qu'un très faible niveau de cette activité a été trouvé pour *Lactobacillus brevis* B1.

Le suivi de la consommation de lactose contenue dans du lactosérum après incubation des 28 souches isolées pendant 12 heures nous a permis de sélectionner les souches les plus consommatrices de lactose suivant un classement par ordre comme suit : *Lactobacillus plantarum* P4 (41,09%), *Lactobacillus plantarum* P17 (40,5 %), *Lactobacillus plantarum* P10 (31,97%), *Lactobacillus plantarum* P12 (34,64%), *Lactobacillus plantarum* P6 (26,89%), *Lactobacillus herbarum* H10 (18,87 %), *Lactobacillus herbarum* H7 (16,43%), *Lactobacillus plantarum* P9 (16,40%), *Lactobacillus plantarum* P7 (16,13%), *Lactobacillus plantarum* P13 (15,96 %) et *Lactobacillus plantarum* P2 (15,59%).

L'ensemble de ces résultats plaident en faveur de l'utilisation de ces lactobacilles isolés dans l'industrie laitière afin de réduire le problème de l'intolérance au lactose.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

-A-

Abbas MM and Mahasne AM (2014). Isolation of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from camels milk. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (15): 1645-1655.

Adams MR and Marteau P (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol*. 27 (2-3): 263-4.

Aguirre M and Collins M. D (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol*. 75 : 95-107.

Alhaag H., Yuan X., Mala A., Bai J and Shao T., (2019). Fermentation Characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus* Species Isolated from Sweet Sorghum Silage and Their Application as Silage Inoculants. *Appl. Sci*. 9, 1247.

Al-Zahrani K., AllamR F., AmashaR., JastaniahS D and Aly M M (2019). Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* KM 5 from camel milk for β -galactosidase production. *IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. 14 (2): 27-35.

Amrane A &Prigent Y. (1998). Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. *Process Biochem*.34: 1-10.

ArribasR. A Forsgard (2019). Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. *Am J Clin Nutr*. 110:273–279.

Ashmaig A, Hasan A, El Gaali E (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *African J. Microbiol Res*. 38: 451-457.

-B-

Badis A., Laouabdia-Sallami N., Guettarni D., Kihal M and Ouzrout R (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C* (23) :30-37.

Bailey RK., Fileti CP., Keith J., Tropez-Sims S., Price W and Allison-Otley SD (2013). Lactose intolerance and health disparities among African Americans and Hispanic Americans: an updated consensus statement. *J Natl Med Assoc*;105:112-127.

Becerra M., Rodríguez-Belmonte E., Esperanza Cerdán M and González Siso M I (2001). Intracellular Proteins from *Kluyveromyces lactis*, *Food technol. biotechnol.* 39(2) : 135–139

Benkebil F et Rouillet M (2007). Intolérance au lactose chez l'enfant : le test génétique va-t-il changer notre approche? *Paediatrica.* 18(1):19-21.

Bennani S., Mchiouer K., Rokni Y and Meziane M. (2017). Characterisation and Identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk. *J. Mater. Environ. Sci.* 8 (S): 4934-4944.

Berger S., Bell E., Sadka A and Mullet J.E.(1995). Arabidopsis thaliana At VSP is homologous to soybean VSPA and VSPB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light, and phosphate. *Plant Mol. Biol.* 27,933–942.

Bhatnagar S and Aggarwal R. (2007). Lactose intolerance. *BMJ.* 334 :1331-1332. *Biophys. Acta.* 1723 : 19–32.

Boudjema KA., Fazouane-Naimi F., Hellal A and Mechakra A (2009). Optimisation et modèle de production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactosérum. *Sci. Technol.* C29: 80-90.

Bourgeois C M & Larpent J P (1989). Microbiologie alimentaire: Les fermentations alimentaires. Edition *Lavoisier*, collection *Tech et Doc.* Paris : 282-293.

Bourgeois C.M et Larpent J.P (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. p.432-704.

Boyaval P., Terré S et Corre C., (1988). Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane. *Lait*. 1: 65-84.

Bulhões A.C., Goldani H.A.S., Oliveira F.S., Matte U.S., Mazzuca R.B. and Silveira T.R (2007). « Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40 (11) : 1441–1446.

Burgain J., Gaiani C., Jeandel C., Cailliez-Grimal C., Revol A-M and Scher J (2012). Maldigestion du lactose : formes cliniques et solutions thérapeutiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 47 (4) : 201-209.

Bury D. and Jelen P (2000). Lactose hydrolysis using a disrupted dairy culture: Evaluation of technical and economical feasibility. *Canadian Agricultural Engineering*. 42: 75-80.

Bury D., Jelen P and Kalab M (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii*ssp. *Bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2: 23-29.

-C-

Carr Frank J., Chill Don and Maida Nino (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4): 281–370.

Chaael A, Boukezzoula N., Belhocine M., Tefiani C and Riazi A (2018). Antagonistic activity of *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS and some *Bifidobacterium*sp against *Shigella sonnei*. *South Asian Journal of Experimental Biology*, Vol 7 (2) : 92-99.

Chaael A., Riazi A., Dubois-Dauphin R and Thonart P (2015). Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac J Trop Dis*. 5(6): 474-482.

Chen K C., Culbertson N J., Knapp J S., Kenny G E and Holmes K K (1982). Rapid method for simultaneous detection of the arginine dihydrolase system and amino acid decarboxylases in microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 16 (5) : 909–919.

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

Choonia H.S and Lele S.S. (2013). Three phase partitioning of β -galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate. *Sep. Purif. Technol.* 110 : 44–50.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P and Lindley N.D (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuw.* 70: 253-267.

Coti P., Bianchi N and Roulet M (2000). Intolérance au lactose : de la biologie des populations au cas individuel. *Rev Med Suisse.* 4 : 20887.

-D-

Dacosta M. (2001). Prébiotiques et probiotiques en alimentation humaine. *Ed. Yves Dacosta.* Paris, 167P

Dainese-Plichon., R Schneider S., Piche T and Hébuterne X. (2014). Malabsorption et intolérance au lactose chez l'adulte. *Nutrition clinique et métabolisme.* 28 : 46–51.

De Man J.C., Rogosa M and Sharpe M.E (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol;* 23 (1): 130-135.

Delacour H., Leduc A., Louçano-Perdriat A., Plantamura J., Ceppa F (2017). Diagnostic de la prédisposition génétique à l'intolérance au lactose par une approche *high resolution melting*. *Annales de Biologie Clinique.* 75 (1) : 67-74.

Delkour J., Ferain T., Hols P (2000). Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. 11 : 497-504.

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C and Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques In : Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica. pp 25-70.

Desmazeaud M (1983). Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait. Technique laitière: 976 : pp11-14. Desmazeaud M (1998). Bactéries lactiques et la fabrication de fromage. Laboratoire de recherches laitières. INRA. Jouy-en-Josas: 1 p.

Desmazeaud M. (1998). Bactéries lactiques et la fabrication de fromage. Laboratoire de recherches laitières. INRA. Jouy-en-Josas: 1 p.

Desmazeaud MJ and De Roissart Hd (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques. in Bactéries Lactiques. *Edition Lorica*, vol.1, p169-205.

Desmazeaud, M. (1996). Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5: 331-343.

Dilmi Bouras A. (2002). Survie de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. Thèse de doctorat d'état. INA El Harrach, Alger, 1-99.

Drider D and Prevost H (2009). *Bactéries lactiques, Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, Economica*, 593 p., chap. II (« Métabolisme des bactéries lactiques, les acides aminés, Véronique MONNET »).

Dupont I. (1998). Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.

-E-

Ebner J., Aşçi Arslan A., Fedorova M., Hoffmann R., Küçükçetin A., Pischetsrieder M (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *J Proteomics*.117: 41-57.

EMOND L. (2004). Conseils nutritionnels, intolérance au lactose. [http://www.servicevie.com/02santé/intoléranceaulactose/I/63%/alimentspriviliégié et eviter/C.lactoseet santé-20/santé.html](http://www.servicevie.com/02santé/intoléranceaulactose/I/63%/alimentspriviliégié_et_eviter/C.lactoseet_santé-20/santé.html).

Ennahar S., Cai Y and Fujita Y (2003). Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (1): 444-51.

-F-

FAO/OMS (2001). Report of a joint FAO/OMS Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional properties of Probiotics in food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Cordoba, ARGENTINE*.

Feliu J. X., Cubarsi R and Villarde A (1998). Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E.coli*. *Biotechnol. Bioeng*, 58 (5).

Forsgard R. A, (2019). Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. *Am J Clin Nutr*; 110: 273–279.

-G-

Garrity G., Boone D and Castenholz W (1984). The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Originally published by Williams and Wilkins. *2nd ed. Hardcover*: 721p.

Gaudreau H., Champagne CP and Jelen P (2005). The use of crude cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk. *Enzyme Microb. Technol.* 36:83-90.

Geciova J., Bury D and Jelen P (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – review. *International Dairy Journal* 12: 541–553.

Gekas V., López-Leiva M (1985). Hydrolysis of lactose: A literature review *Process. Biochemistry*: 2-12,

Gerrit S., Bart A.S and Wim J.M.E. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29: 591-610.

Geussas and Kihal (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats milk. *African Journal of Biotechnology*. 3(6):339-342.

Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M and Tornadijo M.E (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control.*, 18: 716-722

Gosalbes M. J., Monedero V., Alfred C and Pérez-Martínez G (1997). Establishing a model to study the regulation of the lactose operon in *Lactobacillus casei* *FEMS Microbiology Letters* 148: 83-89.

Goy D., Jakob E and Haldemann J (2015). Les fermentations lactiques. Agroscope Transfer | N° 59. ISSN 2296-7230.

Greenberg N.A and Mahoney R.R (1982). Production and Characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Food Science* 47: 1824-1828.

Guiraud JP. (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition :Dunod, Paris, 652p.

-H-

Haider T and Husain Q (2008). Concanavalin: A layered calcium alginate-starch beads immobilized beta galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *International Journal of Pharmaceutics*. 359: 1-6.

Heyman MB (2006). Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*.118: 1279-1286.

Hickey M. W., Hillier A. J and Jago G.R (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative *Lactobacilli* *Applied and Environmental Microbiology* 51 (4): 825-831.

Ho T N T., Tuan N., Deschamps A et Caubet R (2007). Isolation and identification lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*: pp 134-142.

Hofmann K, (1988). pH-A quality criterion for meat. *Fleischwirtsch.*, 6867-70.

HsuC.A., Yu R.C. and Chou C.C. (2005). Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 104 (2): 197-206.

Hubert R. (1998). Biochimie de l'aliment, acide amines and oligopeptides ENSIA. activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*. 46: 775–779.

Husain Q (2010). β -Galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 41-62.

-I-

Illanés A (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic. Journal of Biotechnology*. 14: 1-28.

Ingram CJ., Mulcare CA., Itan Y., Thomas MG and Swallow DM (2009). « Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence ». *Hum Genet*. 124 (6) : 579–91.

-J-

Jacobson RH., Zhang XJ, DuBose RF and Matthews BW (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature*.369 (6483): 761-6.

-K-

Kandler O and Weiss N (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*, Baltimore, Williams & Wilkins, 2: 1209-1234.

Kara F (2004). Release and Characterization of β - galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. M.Sc. Thesis, Middle East Technical University, Turkey. pp: 1-122.

Kashket E. R (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews.* 46: 233-244.

Khedid K., Faid M., Mokhtari A., Soulaymani A and Zinedine A., (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research.* 164: 81-91.

Khusniati T., Aditya A T., Choliq A and Sulistiani (2015). Characterization and identification of the bestscreened indigenous lactic acid bacteria producing β -galactosidase. *Kne Life Sciences.* 2 : 439-445.

Kim J.W and Rajagopal S.N (2000). Isolation and Characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol.* 45 (1) 29-34.

Kim J.Y., Lee M.Y., Ji G.E., Lee Y.S and Hwang K.T (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int. J. Food Microbiol.* 130:12–16.

Klaenhammer T R (1994). Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. in << Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques >> DE ROISSART H., LUQUET F. M. Editeurs *Lorica. Uriage.* 245-280.

Kolars JC., Levitt MD., Aouji M and Savaiano DA (1984). Yogurt—an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med.* 310:1–3.

Kreft M.E and Jelen P (2000). Stability and activity of β -galactosidase in sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii*ssp.*Bulgaricus* 11842 as affected by temperature and ionic environments *Journal of Food Science* 65 (8).

Krieg N R (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Vol: 1.

-L-

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M & Ouhsine M (2005). Selection de souche de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 144: 237-250.

Ladero M., Santos A and García-Ochoa F (2000). Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme MicrobialTechnology*. 27:583-592.

Lait plaisir, (2018). Laitsans lactose !? <http://www.laviesaine.fr/actualites/647/li/?page=3>.

Larpen J P and Larpen-Gourgaud M (1997). Mémento technique de microbiologie : micro-organismes eucaryotes et procaryotes, structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs. Tec & Doc *Lavoisier*, 1039 pages.

Lecerf J M (2017). Les régimes sans lait, pour quoi faire ? N : 159.

Lin MY., Savaiano D and Harlander S (1991). Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. *J Dairy Sci*;74:87-95.

Lomer M. C., Parkes G. C and Sanderson J. D. (2008). Lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther.*, 27(2) : 93-103.

Luquet et Francois M. (1990). Lait et les produits laitiers, vache, brebis, chèvre. Tome II. *Techniques et documentation-Lavoisier*, 621p.

Luquet F M (1986). Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). *Ed .Tech et Doc.* Paris: pp 343-442.

-M-

Madigan M and Martinko J (2007). Biologie des micro-organismes. 11ème édition. *Pearson éd., France.* pp. 1-1047.

Mahoney R.R (1998). Galactosyl- oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a Review. *Food Chemistry* 63 (2): 147-154.

Marroki A., Zúñiga M., Kihal M and Gaspar PM (2011). Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. *Brazilian Journal of Microbiology.* 42: 158-171.

Marteau A. et Marteau P. (2005). Entre intolérance au lactose et maldigestion. *Cah. Nutr. Diet.*, 40 (Suppl. 1) : S20-S23.

Marteau P., Flourie B., Pochart P., Chastang C., Desjeux JF and Rambaud JC (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr.* 64:71–9.

Martini MC., Bollweg GL., Levitt MD and Savaiano DA (1987). Lactose digestion by yogurt beta-galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr.* 45:432–6.

Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R and Saarela M (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Inter. Dairy. J.* 12 :173-182.

Metlef S and Dilmi-Bouras A(2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Rev. Nat. Tec.* 1: 33-44.

Migros : Fédération des coopératives (2019). Fiche d'informations : Intolérance au lactose (sucre de lait).

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

Mondin R., Josephson B., Liu K and (Min-Soo) OJ (2002). The Effect of Glucose, Lactose, and Galactose on the Induction of β -Galactosidase in *E. coli*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*. 2: 22-26.

Monnet V., Nardi M., Chopin A., Chopin M.-C and Gripon J.-C. (1994). Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus subsp. Lactis* NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 45-50.

Montanari G., Zambonelli C., Grazia, L., Benevelli M and Chiavari C. (2000). Release of β -galactosidase from Lactobacilli, *Food Technol. Biotechnol.* 38, 129-133.

Montgomery RK., Krasinski SD., Hirschhorn JN and Grand RJ (2007). Lactose and lactase--who is lactose intolerant and why? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 45 Suppl 2:S131-7

Moulin G., Galzy P and Ratomahenmina R (1976). Sélection des levures en vue de la culture sur lactosérum. *Lait.* 553-554.

-N-

Noh DO, Gilliland SE (1994). Influence of bile on beta-galactosidase activity of component species of yogurt starter cultures. *J Dairy Sci.* 77: 3532-7.

Novel G (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., *Tech. et Doc.* Lavoisier Paris, pp: 170-374.

Nsofor CA., Sarah U and Chinyere U (2014). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from ogi sold in Elele Nigeria. *Journal of Biology and Food Science Research.* 3:19-22.

-O-

Oak SJ and JhaR (2019). The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 59(11):1675-1683.

Ornelas A.P., Silveira W.B., Sampaio F.C and Passos F.M.L. (2007). The activity of β -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. *Journal of Applied Microbiology*. 104 : 1008–1013.

-P-

Panesar PS., Panesar R., Singh RS., Kennedy JF and Kumar H (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 81: 530-543.

Park AR and Oh DK (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85:1279-1286.

Peighambardoust S.H., Fallahe., Hamerr. J. and Van Der Goot A. J (2010). Aeration of bread dough influenced by different way of processing. *Journal of Cereal Science, ELSEVIER*, 51, 89-95.

Pochart P., Bisetti N., Bourlioux P and Desjeux JF (1989). Effect of daily consumption of fresh or pasteurized yogurt on intestinal lactose utilisation in lactose malabsorbers. *Micro ecol Ther* ; 18 :105-110.

Poolman B (1993). Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria. *Lait* 73. 87-96.

Poolman B (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 147-164.

Postma, P., W., Lengeler, J., W and Jacopson, G., R (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiology Reviews* 57 (3): 543- 594.

Prasad L. N., Ghosh B. C., Sherkat F and Shah N. P. (2013). Extraction and characterisation of β -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. lactis Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. bulgaricus ATCC 11842 grown in whey. *International Food Research Journal*. 20(1): 487-494.

Priebe MG., Zhong Y., Huang C., Harmsen HJ., Raangs GC., Antoine JM., Welling GW and Vonk RJ (2002). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose intolerant subjects. *J Appl Microbiol*. 104: 595–604.

-R-

Rabot S., Rafter J., Rijkers GT., Watzl B and Antoine JM (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. *J Nutr*. 140 (3): 677S-89S.

Rahman N., Chen X-h and Dong MS (2010). PCR-DGGE Analysis of microbial community in shubat from Xinjiang. *Food Sci*. 31(11): 136-140.

Raul F. (2001). Lait : Nutrition et santé – Lactose et intolérance au lactose. Ed : *Tec et Doc. Lavoisier*, Paris, 341-351.

Raynaud S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Toulouse, N° d'ordre : 826 pages : 309.

Renouf V., Claisse O and Lonvaud-Funel A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11, 316–327.

Rephali A.W and Saier M. H (1980). Regulation of genes coding for enzyme constituents of the Bacterial phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*. 141 (2): 658-663.

Richmond M.L. (1981). β -galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilization. *J. Dairy Sci*. 64: 1759-1771.

Rönkä E., Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M., Aarnikunnas J and Palva A (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 83:63–74.

Roushanzadeh S., Eskandari M. H., Shekarforoush S. S and Hosseini A, (2014). Phenotypic and genotypic diversity of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional yoghurts produced by tribes of Iran. *Iran J Vet Res.* 15 (4): 347–352.

Rouwenhorst RJ., Pronk JT and Van Dijken JP (1989). The discovery of β -galactosidase. *TIBS.* 14: 416-418.

-S-

Sahi T. (1994). Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Sc and J Gastroenterol.* 202 : 7-20.

Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos WM., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland SE and Mattila-Sandholm T(1998). Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol.* 44 (1-2): 93-106.

SamediL and Charles A L (2019). Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *Annals of Agricultural Sciences.* 64 (1) : 55-62.

Sani R.K., Chakraborti S., Sobti R.C., Patnaik P.R and Banerjee U.C (1999). Characterization and some reaction –engineering aspects of thermostable extracellular β -galactosidase from a new *Bacillus* species *Folia Microbiol.* 44 (4): 367-371.

Santé Canada (2010). Fichier canadien sur les éléments nutritifs, version 2010. www.hc-sc.gc.ca. Accessed January 2, 2015.

Savaiano D. A (2014). Lactose digestion from yogurt : mechanism and relevance, *American Journal of Clinical Nutrition* ; DOI : 10.3945/ajcn.113.073023.

Savijoki K., Ingmer H and Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 : 394-406.

Schlienger J.L (2017). Diététique en pratique médicale courante. *Elsevier Masson*. P424.

Sener N., Apar DK and Ozbek B (2006). A modeling study on lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry*. 41:1493-1500.

Shah N and Jelen P (1991). Lactase activity and properties of sonicated dairy cultures: *Milchwissenschaft*.46 (9).

Sharpe M E (1979). Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. In: Skinner, F. A. and D. W. (Eds). pp. 233-259. *London: Academic Press*.

Sibley E (2004). Genetic variation and lactose intolerance: detection methods and clinical implications. *Am. J. Pharmaco-genomics*. 4, 239-45.

Sicherer S H (2001). « Clinical Implication of cross-reactive food allergens », *Current reviews of allergy and clinical immunology*. 108 (6):881-90.

Somkuti G. A., Solaiman D. K. Y & Steinberg D. H. (1998). Structural and functional analysis of the hsp6.4-bearing plasmid pER341 plasmids in *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid*. 40 : 61-72.

Stiles M E. and Holzapfel W H (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current. Taxonomy. International. *Journal of Food. Microbiology*. 36: pp1-29.

Suchy FJ., Brannon PM., Carpenter TO., Fernandez JR., Gilsanz V., Gould JB., Hall K., Hui SL., Lupton J., Mennella J., Miller N.J, Osganian SK., Sellmeyer DE and Wolf MA. (2010). NIH Consensus Development Conference Statement: lactose intolerance and health. *NIH Consens State Sci Statements*; 27:1-27.

-T-

Tanizawa Y., Kobayashi H., Kaminuma E., Sakamoto M., Ohkuma M., Nakamura Y., Arita M and Tohno M (2017). Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 36 (3):129-134.

Tenu J., Viratelle O and Yon J (1972). Kinetic Study of the Activation Process of beta-Galactosidase from *Escherichia coli* by Mg²⁺. *European Journal of Biochemistry*. 26: 112-118.

Thakur M., Deshpande H.W and Bhate M.A. (2017). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and their exploration in Non-Dairy Probiotic Drink. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6 (4): 1023-1030.

Thomson J (1987). Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria *FEMS Microbiology Reviews*.46: 221-231.

Thomson J (1988). Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in Gram-positive organisms. *Biochimie*.70: 325-356.

Toe C J., Foo H L., Loh T C., Mohamad R., Abdul Rahim R and Idrus Z (2019). Extracellular Proteolytic Activity and Amino Acid Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Foods. *Int. J. Mol. Sci.*, 20 : 1777.

Toualbia M and Dilmi Bouras A (2018).Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus plantarum* from camel milk and its antagonist effect against diarrheal bacteria. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30(4): 283-287.

Tourneur C (1997). Les phénomènes microbiens. In: Le fromage. *Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier Tec & Doc*, Paris, France. Pp.377-446.

Troelsen JT. (2005). Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim.Biophys. Acta*. 1723: 19–32.

-V-

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K and Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60: 407p.

Vinderola C. G., Reinheimer J.A (2003).Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*.36: 895-904.

Viswanathan S., Preethi G., Veilumuthu P and Chairman K (2015). Goat milk –Is it a good source of probiotics? *Pharmaceutical and biological evaluations*. 2 (4): 84-90.

-W-

Wallenfels K and Malhotra O.P (1961). Galactosidases. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 16: 239-298.

Wang D and Sakakibara M (1997). Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry*. 4: 255-261.

-Y-

Yadav A., Espaillet A and Cava F. (2018). Bacterial strategies to preserve cell wall integrity against environmental threats. *Front. Microbiol*.9: 2064.

Yelnetty A., Purnomo H., Purwadi and A Mirah (2014). Biochemical Characteristics of Lactic Acid Bacteria with Proteolytic Activity and Capability as Starter Culture Isolated From Spontaneous Fermented Local Goat Milk. *Journal of Natural Sciences Research*. 4(10) : 137-146.

-Z-

Zadi Karam H & Karam N (2006).Bactéries lactiques du lait de chamelle d’Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*. 24 (3) : 153-156.

Zaitlin P., Dwyer J & Gleason GR (2013). Mistaken beliefs and the facts about milk and dairy foods. *NutrToday*;48:135-143.

Zhao J., Fox M and Cong Y (2010). Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: The role of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther.* 31 : 892-900.

Zheleva P., Vasileva T., Mandadzhieva T., Ivanova I and Iliev I G (2014). Influence of lactose concentration on the α -galactosidase and β -galactosidase activity of *Lactobacillus plantarum*. *J. BioSci. Biotech.* SE/ONLINE: 71-74.

Zhou Q. Z. K and Chen X. D (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* *Biochemical. Engineering Journal.* 9: 33-40.

PUBLICATION

**REGULAR ARTICLE**

Evaluation of lactase activity in new isolated *Lactobacillus* strains

Boukezzoula Nawal^a, Chaael Abdelmalek^a, Tefiani Choukri^b, Bruneau Aurélia^c, Gérard Philippe^c, Bouziane Nabil^a, Nait-Chabane Yassine^d, Girbal-Neuhauser Elisabeth^d and Riazi Ali^{a*}

^aLaboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, Université Abdelhamid Ibn Badis, rue Houcine Hamadou BP 300, 27000 Mostaganem, Algérie

^bDépartement d'Agronomie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid, 13000 Tlemcen, Algérie

^cMicalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

^dLaboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale, I.U.T. Paul Sabatier, 24 Rue d'Embaquès, 32000 AUCH, France

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 20 Feb 2019

Revised: 7 Apr 2019

Accepted: 8 Apr 2019

***Corresponding Author:**

Email: ardz22003@yahoo.fr

Telephone: +213 550204365

Fax: +213 45366501

Keywords: *Lactobacillus*; Milk; Isolation; Characterization; β -galactosidase; Lactose

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and characterize new *Lactobacillus* strains in order to check their β -galactosidase activity. A total of 28 strains were isolated from camel and goat milks collected from the Algerian Sahara. These strains were identified with the method of Polymerase Chain Reaction (PCR) of the 16S rRNA gene. Their ability to hydrolyze O-nitrophenyl- β -D galactopyranoside (ONPG) was determined. Cell lysis method involving sonication and lysozyme treatment was used for β -galactosidase release from the isolated strains. Analysis of their 16S rRNA gene sequences revealed that the strains clustered in the *Lactobacillus* genus, 17 isolates were identified as *L. plantarum*, 10 isolates as *L. herbarum* and one isolate as *L. brevis*. The best intracellular enzymatic β -galactosidase activities obtained in descending order are 14.84 (*L. plantarum* P4), 14.66 (*L. plantarum* P17), 14.33 (*L. plantarum* P12), 14.10 (*L. plantarum* P10), 13.49 (*L. plantarum* P6), 12.13 (*L. herbarum* H10) and 11.27 (*L. plantarum* P7) U/mL; while a very low level of this activity was found for *Lactobacillus brevis* B1. These findings are an argument for the use of these isolated *Lactobacilli* in the dairy industry in order to alleviate lactose intolerance.

1. Introduction

Lactose intolerance has been recognized for many years as a common problem in many children and most adults throughout the world (Heyman, 2006). Species belonging to *Lactobacillus* genus are the most important food fermentators and are used as starters. These bacteria produce an enzyme (i.e. β -galactosidase) that breaks down lactose into glucose and galactose that can be absorbed in the intestinal epithelium (Troelsen, 2005). Consequently,

addition of *Lactobacilli* producing β -galactosidase as probiotic to dairy products could help lactose intolerance symptoms. Lactic acid bacteria (LAB) which constitute a diverse group of *Lactococci*, *Streptococci*, and *Lactobacilli* have become a center of scientific studies for three particular reasons (Somkuti et al., 1998): among them lactose maldigesters individuals may consume some fermented dairy products with little or no adverse effects, and especially LAB are generally regarded as safe

(GRAS). *Lactobacilli* are members of lactic acid bacteria. They are typically rod-shaped, varying from long and slender to short, bent rods. Most species are homofermentative, but some are heterofermentative (Madigan et al., 1997).

The current taxonomic status based on 718 publicly available genomes of the genus *Lactobacillus*, the largest group of lactic acid bacteria, represents over 180 known species (Tanizawa et al., 2017). The *Lactobacilli* are strictly fermentative and require complex nutrients. *Lactobacilli* belong to the normal mucosal microbiota of the human mouth and intestine. These bacteria are known as the most important probiotics and desirable gut bacteria (Nsofor et al., 2014). *Lactobacilli* are used as starter cultures for several varieties of cheese, fermented plant foods, fermented meats, in wine and beer production, sourdough bread and silage (Stiles and Holzapfel, 1997). *Lactobacilli* are naturally present or added intentionally, for technological reasons or to generate health benefits for the consumer. It is known that *Lactobacilli*, which have been used in food products, have beneficial effect on health of human and animals. In other words they have probiotic potential. As a definition, probiotics are live microbial food supplements, which benefit the health of consumers by maintaining, or improving their intestinal balance (Mattila-Sandholm et al. 2002). β -Galactosidase is a tetramer of molecular weight 520 kDa, composed of four identical subunits of MW 130,000 Daltons, each with an independent active site (Tenu et al., 1972). β -Galactosidase is widely used in the dairy industry for lactose hydrolysis in milk and whey, resulting in the facilitation of digestibility and in the enhancement of technological and sensorial characteristics in sweetened, condensed and frozen dairy products (Husain, 2010; Panesar et al., 2006). Moreover, in food processing, β -galactosidase is a precious biocatalyst for environmental biotechnology as long as it solves the problem of whey utilization and disposal (Illanés, 2011).

β -Galactosidase is a common enzyme that can be found in plants, animal organs and microorganisms. These later, are the most suitable sources of this enzyme, due to easy production, high activities and good stability of the enzyme. This use is made safer and risk free for the consumer because of the GRAS status by which LAB are characterized, which allows the use of these bacteria directly in dairy product or their crude enzyme extracts, without the necessity of performing tedious purification

protocols (Park and Oh, 2010). β -galactosidase has long been accepted as an important enzyme for dairy industry. β -galactosidase catalyzes two reactions: hydrolysis of lactose, the milk sugar into glucose and galactose, and in some cases transglycosylation. In dairy industry β -galactosidase has been used to prevent crystallization of lactose, to improve sweetness, and to raise the solubility of the milk product. Moreover, it has been used to produce low lactose containing food products for low lactose tolerance people and for the utilization of cheese whey, which would otherwise be an environmental pollutant (Sani et al. 1999; Rouwenhorst et al. 1989). Enzyme preparations employed in lactose free products are highly purified proteins. The more the protein is purified, the higher its cost becomes. Therefore the cost of the lactose-reduced milk is about 80% higher than the regular unhydrolysed milk (Bury and Jelen, 2000). Cell lysis by sonication has been shown to amplify the β -galactosidase activity several times (Shah and Jelen, 1991; Wang and Sakakibara, 1997; Feliu et al., 1998). Enzymatic hydrolysis of lactose by lactase is one of the most well-liked technologies to produce lactose reduced milk and related dairy products for consumption by lactose intolerant people (Ladero et al., 2001; Sener et al., 2006; Haider and Husain, 2008).

β -galactosidase facilitates the reaction between Lactose molecules and water, by cleaving the oxygen bridge resulting in the production of two simple sugars (Glucose and Galactose).

Shah and Jelen (1991) proposed the use of the sonicated dairy cultures to produce a relatively impure source of β -galactosidase for a potentially more economical process of lactose hydrolysis. Up to date, there has been no sufficient work on the lactic acid bacteria isolated from Algerian camel's and goat's milk according to their ability to produce β -galactosidase; instead, the focus was mainly on cow's milk. Therefore, the present work aims the isolation of new camel's and goat's milk lactic acid bacteria strains having a high potential of β -galactosidase production. Furthermore, this research relies upon the use of the combination of sonication and lysozyme treatment of lysis cell for the release of β -galactosidase.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions

Strains isolated from camel and goat milks from the

Algerian Sahara used in this study, were grown in De Man Rogosa and Sharpe (MRS) medium and incubated at 37°C.

All strains were stored at -80°C in culture broth with glycerol (40%) and were subcultured twice before being used in the experiments.

2.2. Isolation

Six samples of each camel and goat milk were collected in aseptic conditions from different regions of the Algerian Sahara and were immediately cooled and transported to the laboratory in an ice-box (4°C) and investigated for the content of *Lactobacilli* bacteria.

Ten (10) mL of milk sample were added to 90 mL of sterile saline solution and then homogenized to make an initial dilution (10^{-1}). The suspension was used for making suitable serial dilutions up to 10^{-5} by incorporating 1 mL into 9 mL of sterile saline solution in sterile tubes.

Lactobacilli were cultured on De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (CMO 361 Oxoid England) according to De Man et al. (1960) method. 15–20 mL sterile MRS agar (45-50°C) was poured into sterile Petri dishes containing 1 mL of diluted test sample. The inoculums distributed throughout the medium by gentle rotation of plates in one direction and then in the reverse direction.

The inoculated plates were left for 5-10 min to solidify, and then incubated at 37°C for 48-72 h. *Lactobacilli* colonies are smooth, white and convex with regular edges. The colonies were arbitrarily picked from plates and transferred in 10mL of appropriate MRS broth. The selected colonies were purified by repeated streaking.

Expected *Lactobacilli* strains were kept on MRS agar slant at 4 °C and streaked every 4 weeks. Prior to use, *Lactobacilli* strains were activated in MRS broth at 37°C overnight, and subculture in MRS agar at 37°C for 24h.

Gram staining, catalase reaction, gas production, growth at different temperatures and growth at different sodium chloride concentrations were tested for a preliminary separation of different isolates of *Lactobacilli*. Biochemical identification (lactose, sucrose, mannitol, xylose, maltose and trehalose fermentations as well as production of NH₃ from arginine) was then realized. The samples were serially diluted in sterile 0.9% (w/v) sodium chloride solution, plated onto MRS agar (Oxoid, England),

and incubated anaerobically in an anaerobic flask with an anaerobic reagent (Anaerocult P, Merck) at 37°C for 48 h.

Gram-positive, catalase-negative bacilli were identified as presumptive *Lactobacillus* strains.

2.3. Genetic identification

2.3.1. Genomic DNA preparation

The genomic DNA was extracted using the DNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturers' instructions. The DNA concentration was measured using an absorbance of 260 nm and checked by agarose gel electrophoresis.

2.3.2. PCR amplification and nucleotide sequencing

PCR was used to amplify the 16S rRNA gene of isolated strains. The 16S rDNA sequence was determined by direct sequencing. Primers used for PCR and DNA sequencing are presented in Table 1. The PCR amplification was performed with the primer pair Bact986GC-f/Bac-t141-r (targeted against regions of 16S rDNA) (Gelsomino et al., 2006). PCR reactions were carried out in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research, USA). PCR conditions included a hot start at 96°C (5 min), 25 cycles consisting of hybridization at 50°C (1 min), polymerization at 72°C (2 min), denaturation at 96°C (1 min) and a final extension at 72 °C (10 min). PCR products were resolved by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide (1 µL/10 mL) staining.

The amplification PCR products were purified by the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) as instructed by the manufacturer, and sequenced with the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit on the 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems and Hitachi, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Sequence similarities were determined by comparing to 16S rDNA sequences available in the nucleotide databases of the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program for the genus identification.

Primer	Sequence 5'-3'	Use	Target
968-GC-f	CGCCCGGGCGCGCCCGGGC GGGGCGG-GGGCACGGGGGG AACGCGAAGAACCTTA	PCR	Bacteria
1401-r	CGGTGTGTACAAGACCC	PCR	Bacteria

Table 1. Primers used in the study (Gelsomino et al., 2006).

2.4. Enzyme extraction

After overnight culture, bacterial cells were harvested by centrifuging (4000×g, 15 min, 4°C). The cell pellet was washed with a 0.03 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) and centrifuged at 4,000×g for 15 min at 4°C. To improve the β-galactosidase extraction, bacterial cell lysis was performed using a combination of biochemical and physical treatment. In fact, the washed pellet was resuspended in 5 mL lysozyme- Ethylene Diamine Tetra acetic Acid (EDTA) solution (50 mg of lysozyme in buffer containing 1 mM EDTA and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) and incubated for 2h (37°C, under agitation). Then, the lysozyme bacteria mixture was sonicated 3 times in ice (3 min, 16 kHz, Soniprep 150 sonifier) Finally, sonicated solutions were centrifuged (10000×g, 15 min, 4°C) and the supernatant containing the crude β-galactosidase was stored at -20°C until needed for the enzyme assay.

2.5. Assay of β-galactosidase activity

The β-galactosidase activity was determined as described by Hsu et al. (2005). Strains are assayed in triplicate, The reaction mixture was composed of 0.5 mL of supernatant containing extracted enzyme and 0.5 mL of 15 mM o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) in 0.03 M sodium phosphate buffer (pH 6.8). After 10 min of incubation at 37°C, 2.0 mL of 0.1 M sodium carbonate was added to the mixture to stop the reaction. Absorbance was obtained at 420 nm with a spectrophotometer (JENWAY – 7305 UK).

β-galactosidase activities are calculated considering one international enzymatic unit of β-galactosidase as the amount of enzyme that hydrolyzed one micro-mole (μM) of substrate per min under the optimal assay conditions (Griffith and Wolf, 2002).

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with StatBox 6.40 software (Grimmer logiciels, Paris, France).

3. Results

3.1. Identification of isolated *Lactobacillus* strains

3.1.1. Phenotypic characterization

Morphological test results revealed that all the strains isolated from camel's and goat's milk samples were Gram positive and catalase negative.

However, phenotypic characterization, while a fun-

damental and preliminary step, remains summary and imprecise. Also, in order to assign acceptable and reliable profiles to the selected strains, molecular identification is essential and mandatory.

3.1.2. Genotypic characterization

PCR-based identification by Nucleotide sequences of 16S rDNA was performed and the determined 16S rDNA sequence was compared directly with the Genbank database (NCBI BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A high level of similarities of 16S ribosomal DNA nucleotide sequences of the isolated *Lactobacillus* strains was observed. The highest identity allowed the identification at the species level. Sequences permitted the individualization of 3 groups of *Lactobacillus* namely (Table 2):

Type of Sample	Number and Origin of Strains	Percentage		
Camel's Milk	23	82%	30.43% <i>L. herbarum</i>	
			69.56% <i>L. plantarum</i>	
Goat's Milk	5	17.85%	20% <i>L. brevis</i>	
				60% <i>L. herbarum</i>
				20% <i>L. plantarum</i>

Table 2. Prevalence of *Lactobacilli* isolated from camel's and goat's milk.

- A first group assigned as *Lactobacillus plantarum* gathered 69.56% of the strains isolated from camel's milk and 20% of the strains isolated from goat's milk.
- A second group assigned as *Lactobacillus herbarum* gathered 30.43% of the strains isolated from camel's milk and 60% of the strains isolated from goat's milk
- A third group assigned as *Lactobacillus brevis*

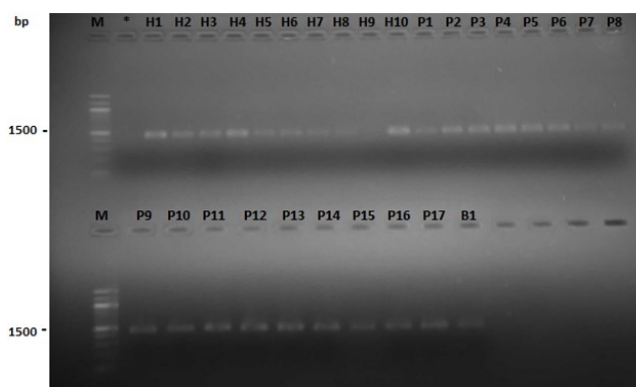


Figure 1. 16S rDNA sequence amplification realized with genomic DNA. Lanes from 1 to 28, represent the isolated strains. Using primer pair 968-GC-f/1401-r, a GeneRuler 100-bp DNA ladder plus (Fermentas) was used as nucleic acid molecular size marker (Lane M), *: Negative control.

Code	Strain	Origin
H1	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
H2	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
H3	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Goat
P1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
H4	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
H5	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Goat
H6	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
P2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
H7	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
P9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Goat
H8	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
P11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
H9	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Camel
P15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
B1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Goat
H10	<i>Lactobacillus herbarum</i>	Goat
P16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel
P17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Camel

Table 3. Results of PCR strain identification.

corresponded to the remaining 20% of strains isolated from goat’s milk.

3.2. β-galactosidase Activity

The best intracellular β-galactosidase activities were, 14.84, 14.60, 14.33,14.10, 13.49,12.13 and 11.27 U/mL respectively for the strains *L. plantarum* P4, *L. plantarum* P17, *L. plantarum* P12, *L.*

plantarum P10, *L. plantarum* P6, *L. herbarum* H10 and *L. plantarum* P7, while the lowest activity (0.16 U/mL) was noted by *Lactobacillus brevis* B1 (Figure 2).

4. Discussion

Isolation of *Lactobacilli* was conducted through goat and camel milks of the Algerian Sahara. Identification was started by Gram staining and standard bacteriological and biochemical methods. Molecular identification was performed by 16 rDNA sequencing; the determined 16S rDNA sequences were compared directly with the Genbank database, and results showed that from camel's milk, strains belong to the species *L. plantarum* (69.56%) and *L. herbarum* (30.43%), and from goat's milk strains belong to the species *L. herbarum* (60%), *L. plantarum* (20%) and *L. brevis* (20%).

In a similar study, Abbas and Mahasneh (2014), isolated from camel's milk 34 strains belonging to *Lactobacillus paracasei* ssp. *piracies* (41%), *Lb. plantarum* (23%), *Lb. rhamnosus* (18%), *Lb. fermentum* (12%) and *Lb. brevis* (6%). In another work, Guessas and Kihal (2004), from a total of 206 lactic acid bacteria isolated from goat milk, strains were identified as *Lactobacillus curvatus* (25.25%), *Lb. helveticus* (10.98%), *Lb. plantarum* (9.89%), *Lb. reuteri* (9.89%), *Lb. casei* (7.69%), *Lb. brevis* (5.49%), *Lb. bulgaricus* (5.49%), *Lb. paracasei* (4.39%) and *Lb. acidophilus* (2.19%).

Lactobacillus species requires riche medium for their growth and β-galactosidase activity, it was reported that by using skim milk (source of lactose) the production of β-galactosidase enzyme value would increase (Vasilijevic and Jelen, 2001).

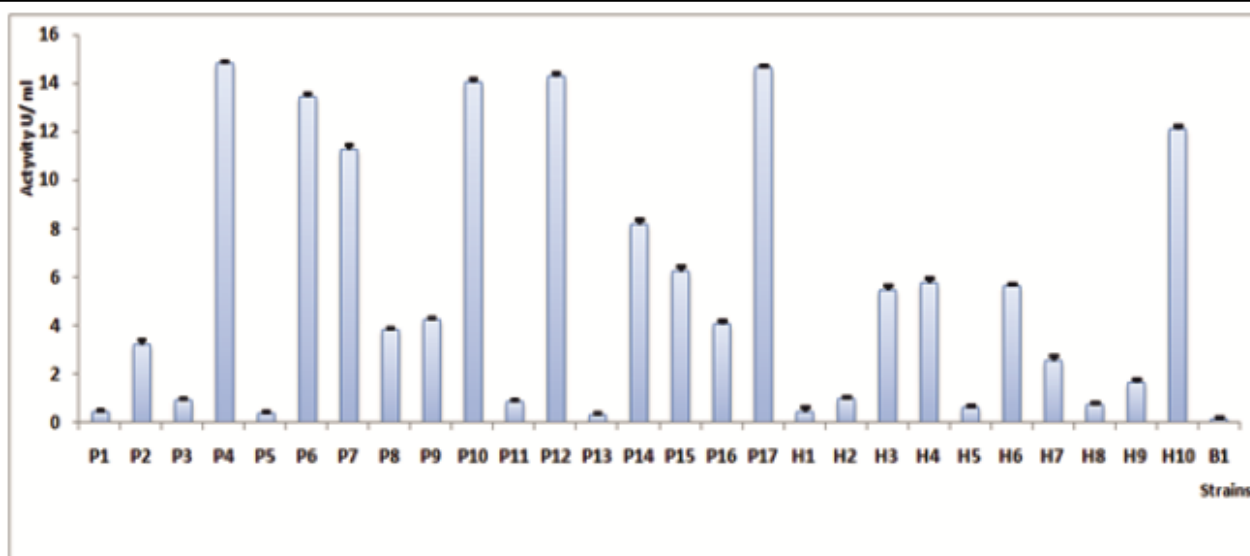


Figure 2. β-galactosidase activity values of the isolated *Lactobacilli* strains.

It is known that β -galactosidase is an intracellular enzyme and in order to maximize the recovery of this enzyme, various cell lysis methods were developed. In our study, we employed sonication and lysozyme EDTA treatment.

Lactic acid bacteria (LAB) have the highest lactase activity due to its content of lactase or β -D-galactosidase which is an intracellular enzyme (Shah and Jelen, 1990). The LAB cells exhibit very little extracellular lactase activity, and it can be increased several times by bacterial cell lysis induced by different methods.

In Gram-positive bacteria a thick layer of mucopolysaccharide (peptidoglycan network) gives a considerable rigidity to the cell wall. The major resistance to disruption of bacterial cells appears to be the peptidoglycan network. Consequently, the amount of protein release is automatically related with the efficiency of the disruption method.

Berger et al. (1995) found that sonication was more effective than high-pressure homogenization, bead milling and toluene-acetone treatments for the release of β -galactosidase from *Thermus* species.

The factors that affect the microbial cell lysis with sonication conditions depend on the process (amplitude, time, temperature and frequency) and microbial entity (type and growth stage of microorganism) (Kreft and Jelen, 2000; Wang and Sakakibara, 1997).

Lysozyme (EC 3.2.1.17), also known as muramidase or N-acetylmuramide glycanhydrolase, are glycoside hydrolases that specifically permeabilize bacterial cell wall by catalyzing hydrolysis of 1,4-beta-linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues in their peptidoglycan layer (Choonia and Lele, 2013).

In another experiment, sonication method was found to be more effective for *B. animalis* Bb12, while lysozyme-EDTA treatment was more effective for *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 (Prasard et al., 2013).

Results of β -galactosidase, revealed that *L. plantarum* P4 strain was the most active among the total of 28 isolated strains producing β -galactosidase with a value of 14.84 U/mL followed in descending order by the values of 14.60, 14.33, 14.10, 13.49, 12.13 and 11.27 respectively for the strains, *L. plantarum* P17, *L. plantarum* P12, *L. plantarum* P10, *L. plantarum* P6, *L. herbarum* H10 and *L.*

plantarum P7, last value of activity was noted by the strain *Lactobacillus brevis* B1 with 0.16 U/mL. In a similar research, Montanari et al. (2000) demonstrate that the strains *L. plantarum* ATCC 1056, *L. plantarum* ATCC 1110 and *L. plantarum* ATCC 1173 exhibited a β -galactosidase activity with the values of 0.7, 0.918 and 1.61U/mL respectively. Prasad et al. (2013), obtained a maximum of β -galactosidase activity of 6.80 U/mL with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 and 7.77 U/mL with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842. Consequently, our results are interesting so that the activities noted by our isolated strains are significantly higher and suggest that higher activities are displayed by *L. plantarum* strains.

Concerning the strain *Lactobacillus brevis*, which is an obligate hetero-fermentative Gram-positive bacterium, unlike dairy industrial strains, *L. brevis* cannot ferment milk because it is hard for it to use lactose (Kim et al., 2009; Rönkä et al., 2003).

5. Conclusion

The *Lactobacillus* strains isolated from camels and goat's milk was characterized and identified as *L. plantarum*, *L. herbarum* and *L. brevis*.

Since lactase from *Lactobacillus* sp is an intracellular enzyme, β -galactosidase release by combination of lysozyme EDTA treatment and sonication methods was useful to increase the β -galactosidase activity.

In this study the β -galactosidase activity was screened among the isolated *Lactobacillus* strains, results revealed that the best activities were registered by the species belonging to *Lactobacillus plantarum* with a maximum yield of 14.84 U/mL noted by the strain P4.

Lactose intolerance has been recognized for many years as a problem in many children and adults. *Lactobacillus* sp. strains are considered as important organisms for dairy industry. In this field, addition of strains endowed with high activity of β -galactosidase as probiotic to milk and cheese and other dairy products appears to be of advantage, and could help lactose intolerance, this enzyme hydrolysing lactose, the main carbohydrate in milk, into glucose and galactose, which can be absorbed by the intestinal epithelium, in this way we can prevent high cost of purification of this enzyme.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Algerian ministry of higher education and scientific research (CNEPRU project number: DO1NO1UN270120140026).

Conflicts of interest statement: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abbas MM, Mehasneh AM (2014) Isolation of *Lactobacillus* with probiotic potential from camel's milk. African Journal of Microbiology Research 8 (15): 1645-1655.
- Berger JL, Lee BH, Lacroix C (1995) Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species. Applied Microbiology and Biotechnology 44 (1-2): 81-87.
- Bury D, Jelen P (2000) Lactose hydrolysis using a disrupted dairy culture: Evaluation of technical and economical feasibility. Canadian Agricultural Engineering 42: 75-80.
- Choonia HS, Lele SS (2013) Release of β -galactosidase by Permeabilization of indigenously isolated *Lactobacillus acidophilus* Using Lysozyme. Chemical and Biochemical Engineering Q 27 (4): 449-456.
- Feliu JX, Cubarsi R, Villarde A (1998) Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. Biotechnology & Bioengineering 58 (5): 536-540.
- Gelsomino A, Badalucco L, Ambrosoli R, Crecchio C, Puglisi E, Meli SM (2006) Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: a case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. Soil Biology and Biochemistry 38: 2069-2080.
- Gheyntanchi E, Heshmati F, Shargh BK, Nowroozi J, Movahedzadeh F (2010) Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated *Lactobacilli* from milk and cheese. African Journal of Microbiology Research 4(6): 454-458.
- Griffith KL, Wolf RE (2002). Measuring β -Galactosidase Activity in Bacteria: Cell Growth, Permeabilization, and Enzyme Assays in 96-Well Arrays. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 397-402.
- Guessas B, Kihal M (2004) Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. African Journal of Biotechnology 3 (6): 339-342.
- Haider T, Husain Q (2008) Concanavalin: A layered calcium alginate-starch beads immobilized beta galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. International Journal of Pharmaceutics 359: 1-6.
- Heyman MB (2006) The Committee on Nutrition: Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. Journal of Pediatrics 118: 1297-1286.
- Hsu CA, Lee SL, Chou CC (2007). Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 2225-2230.
- Husain Q (2010) β -Galactosidases and their potential applications: A review. Critical Reviews in Biotechnology 30: 41-62.
- Illanés A (2011) Whey upgrading by enzyme biocatalysis. Electronic Journal of Biotechnology 14: 1-28.
- Kara F (2004) Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. Dissertation, The graduate school of natural and applied sciences. Middle East Technical University.
- Kim JH, Shoemaker SP, Mills DA (2009) Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. Microbiology 155:1351-1359.
- Kreft ME, Jelen P (2000) "Stability and Activity of β -Galactosidase in Sonicated Cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 as Affected by Temperature and Ionic Environments". Journal of Food Science 65 (8): 1364-1368.
- Ladero M, Santos A, García-Ochoa F (2000) Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized betagalactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microbial Technology 27:583-592.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) Biology of Microorganisms, 8th Ed., Prentice Hall International, Inc.
- Mattila-Sandholm T, Saarela T (2000). Probiotic functional foods. In: Gibson, GR., Williams CMF (Eds.), Functional Foods-Concept to Product. Woodhead Publishing, Cambridge, England 287-313.
- Montanari G, Zambonelli C, Grazia L, Benevelli M, Chiavari C (2000) Release of β -galactosidase from *Lactobacilli*. Food Technology and Biotechnology 38 (2):129-133.
- Nsofor CA, Sarah U, Chinyere U (2014) Isolation and characterization of lactic acid bacteria from ogi sold in Elele Nigeria. Journal of Biology and Food Science Research 3:19-22.
- Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF, Kumar H (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 81: 530-543.
- Park AR, Oh DK (2010) Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 85:1279-1286.
- Prasad LN, Ghosh, BC, Sherkat F, Shah NP (2013) Extraction and characterization of β -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey. International Food Research Journal 20 (1): 487-494.
- Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A (2003) Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. International Journal of Food Microbiology 83:63-74.
- Rouwenhorst RJ, Pronk JT, Van Dijken JP (1989) The discovery of β -galactosidase. TIBS 14: 416-418.
- Sani RK, Chakraborti S, Sobti RC, Patnaik PR, Banerjee UC (1999) Characterization and some reaction engineering aspects of thermostable extracellular β -galactosidase from a new *Bacillus* species. Folia Microbiologica 44 (4):367-371.
- Sener N, Apar DK, Ozbek B (2006) A modeling study on lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. Process Biochemistry 41:1493-1500.
- Shah N, Jelen P (1991) Lactase activity and properties of sonicated dairy cultures. Milchwissenschaft 46 (9):570-573.
- Shah NP, Jelen P (1990) "Survival of Lactic Acid Bacteria and Their Lactases under Acidic Conditions" Journal of Food Science 55(2): 506-509.
- Somkuti GA, Dominiecki ME, Steynberg DH (1998) Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. *bulgaricus* with ethanol. *Current Microbiology* 36: 202-206.

Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

Tanizawa Y, Kobayashi H, Kaminuma E, Sakamoto M, Ohkuma M, Nakamura Y, Arita M, Tohno M (2017) Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 36 (3):129-134.

Tenu J, Viratelle O, Yon J (1972) Kinetic Study of the Activation Process of beta-Galactosidase from *Escherichia coli* by Mg²⁺. *European Journal of Biochemistry* 26: 112-118.

Troelsen JT (2005) Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects* 1723(1-3):19-32.

Vasiljevic T, Jelen P (2001) Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2: 75-85.

Vinderola CG, Reinheimer JA (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.

Wang D, Sakakibara M (1997) "Lactose Hydrolysis and β -Galactosidase Activity in Sonicated Fermentation with *Lactobacillus* Strains". *Ultrasonics Sonochemistry* 4: 255-261.



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).