

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

Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences  
de la Nature et de la Vie



كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et  
Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Études pour l'Obtention du Diplôme de  
Master II en Biologie

Option : *Microbiologie Appliquée*

Thème :

**ÉTUDE ET CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ  
PROTÉOLYTIQUE CHEZ QUELQUES SOUCHES DE  
BACTÉRIES LACTIQUES**

Membres du Jury :

- *Présidente* : Dr. AKROUM S.
- *Encadreur* : Dr. IDOUIT.
- *Examinatrice* : M<sup>elle</sup> ADJEROUD N.

Réalisé par :

BOUGHERRA Chafia  
KHENIFAR Ibtissam

Année Universitaire : 2010 - 2011

# REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah le tout puissant qui nous a donné la capacité afin d'accomplir ce modeste travail et nous a toujours guidé vers le bon chemin.*

*Nous adressons nos vifs et sincères remerciements à notre encadreur **Dr. Idoui Tayeb**, chef du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Jijel pour sa disponibilité, ces conseils et surtout sa patience.*

*Nous tenons également à présenter nos plus vifs remerciements aux **Dr. Sifour Mohammed** et **Dr. Ouled Heddar Houria**, enseignants à l'Université de Jijel pour leurs aides et pour leurs précieux conseils.*

*Notre respect aux membres du jury, qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre travail.*

*Nous remercions tous le personnel du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Jijel.*

*Nos meilleurs et sincères remerciements à nos chers parents, nos frères et sœurs sans oublier tous les étudiants du Master Microbiologie Appliquée promotion 2010-2011.*

*Enfin, que tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de nos profondes sympathies.*

**Chafia et Ibtissam**

# ***Sommaire***

## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	01
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Les bactéries lactique</b>	
I.1. Historique.....	04
I.2. Définition des bactéries lactiques.....	04
I.3. Présentation des bactéries lactiques.....	05
I.4. Caractéristiques des différents genres.....	05
I.4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	05
I.4.2. Le genre <i>Carnobacterium</i> .....	06
I.4.3. Les genres <i>Lactococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Enterococcus</i> .....	07
I.4.4. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> .....	08
I.4.5. Le genre <i>Leuconostoc</i> .....	08
I.4.6. Le genre <i>Bifidobacterium</i> .....	08
<b>Chapitre II : Intérêt biotechnologique des bactéries lactiques</b>	
II.1. Introduction.....	11
II.2. Intérêt biotechnologique des bactéries lactiques.....	11
II.2.1. Activité protéolytique des bactéries lactiques.....	11
II.2.1.1. La composition du système protéolytique chez les bactéries lactiques.....	11
a. Les protéinases.....	12
b. Le système de transport des peptides.....	12
b <sub>1</sub> . DtpT, seul représentant de la famille PTR.....	13
b <sub>2</sub> . Dpp, Opt et Dpp, trois représentants de la famille des ABC- transporteurs.....	13
c. Les peptidases.....	13
c <sub>1</sub> . Aminopeptidases générales.....	13
c <sub>2</sub> . Peptidases de spécificité restreint.....	13
c <sub>3</sub> . Endopeptidases.....	13
II.2.1.2. Catabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques.....	13
II.2.1.3. Ingénierie de la protéolyse.....	15
II.2.1.4. Relation entre la composition du milieu et le système protéolytique.....	15
II.2.2. Aptitudes aromatisantes.....	15
II.2.3. Activité lipolytique des bactéries lactiques.....	15
II.2.3.1. Contenu en estérases.....	16
II.2.3.2. Rôle des estérases.....	16
a. Rôle technologique.....	16
b. Rôle physiologique.....	16
II.2.4. Activité autolytique des bactéries lactiques.....	16
II.2.5. Production de polysaccharides.....	17
II.2.5.1. Généralités.....	17
II.2.5.2. Altérations liées à la production des polysaccharides.....	17
II.2.6. Aptitudes antagonistes des bactéries lactiques.....	17
II.2.6.1. Production des bactériocines.....	17
II.2.6.2. Production d'acides.....	18
II.2.6.3. Production de peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	18
II.2.6.4. Production de dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ) et du diacétyle.....	18
II.2.7. Aptitude à résister aux bactériophages.....	18
II.3. Intérêt probiotique des bactéries lactiques.....	19
<b>Matériel et Méthodes</b>	
II.1. Matériel.....	21
II.1.1. Les souches bactériennes.....	21
II.1.2. Milieux de culture.....	22

II.1.3. Produits chimiques et réactifs.....	22
II.1.4. Appareillage et autres.....	22
II.2. Méthodes.....	23
II.2.1. Vérification de la pureté des souches.....	23
II.2.2. Mise en évidence du caractère protéolytique.....	23
II.2.2.1. Screening primaire.....	23
II.2.2.2. Caractère protéolytique sur Agar au lait.....	23
a. Mesure de l'activité des exoprotéases.....	24
b. Mesure de l'activité des endoprotéases.....	24
II.2.2.3. Test de l'activité protéolytique sur lait.....	24
II.2.2.4. Test de l'activité coagulante des exoprotéases sur lait.....	24
II.2.3. Screening secondaire.....	25
II.2.3.1. Détermination de la concentration des protéines totales.....	25
II.2.3.2. Détermination de l'activité protéasique.....	25
II.2.3.3. Détermination de l'activité spécifique.....	25
II.2.4. Caractérisation de l'activité protéolytique.....	26
II.2.4.1. Mesure de la croissance bactérienne.....	26
II.2.4.2. Préparation des extraits cellulaires.....	26
II.2.4.3. Utilisation de la caséine.....	26
II.2.4.4. Activité protéinasique.....	26
II.2.4.5. Effet de pH sur l'activité protéinasique.....	26
II.2.4.6. Effet de température sur l'activité protéinasique.....	27
II.2.4.7. Effet des cations divalents sur l'activité protéinasique.....	27
II.2.4.8. Effet de l'inhibiteur EDTA sur l'activité protéinasique.....	27
II.2.4.9. Analyse par HPLC.....	27
II.2.4.10. Analyse par CPG.....	27
II.2.5. Pouvoir aromatisant et recherche des produits de la dégradation des acides aminés.....	28
II.2.6. Activité autolytique.....	28
<b>Résultats et Discussion</b>	
III.1. Vérification de la pureté des souches.....	31
III.2. Mise en évidence du caractère protéolytique.....	31
III.2.1. Screening primaire.....	31
III.2.2. Caractère protéolytique sur agar au lait.....	32
III.2.3. Test de l'activité protéolytique sur lait.....	35
III.2.4. Test de l'activité coagulante des exoprotéases sur lait.....	35
III.2.5. Screening secondaire.....	37
III.2.5.1. Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases.....	37
III.2.5.2. Détermination de l'activité spécifique des protéases liées à la paroi.....	37
III.2.5.3. Détermination de l'activité spécifique des protéases intra cellulaires.....	38
III.3. Mesure de la croissance.....	39
III.4. Caractérisation de l'activité protéolytique.....	41
III.4.1. Utilisation de la caséine.....	41
III.4.2. Activité protéinasique.....	42
III.4.3. Effet du pH sur l'activité protéinasique.....	43
III.4.4. Effet de la température sur l'activité protéinasique.....	44
III.4.5. Effet des cations divalents sur l'activité protéinasique.....	46
III.4.6. Effet de l'inhibiteur EDTA sur l'activité protéinasique.....	48
III.4.7. Recherche des produits de l'activité protéinasique par analyse HPLC.....	48
III.4.8. Recherche des produits de l'activité protéinasique par analyse CPG.....	51
III.5. Pouvoir aromatisant et recherche des produits de la dégradation des acides aminés.....	54
III.6. Activité autolytique des souches.....	57
<b>Conclusion</b> .....	59
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

- A : Absorbance ;
- AA : Acide Aminé ;
- ABC : ATP-Binding-Cassette ;
- ADN : Acide Désoxyribo Nucléique ;
- ARN : Acide Ribo Nucléique ;
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate ;
- BL : Bactéries Lactiques ;
- BSA : Sérum Albumin Bovin ;
- C : Celsius ;
- C : Cytosine ;
- Ca<sup>++</sup> : Calcium ;
- CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de Calcium ;
- CEPs : Cell Envelope Proteinase ;
- cm : Centimètre ;
- Co<sup>++</sup> : Cobalt ;
- CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone ;
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ;
- Cu<sup>++</sup> : Cuivre ;
- D : Dextro ;
- DO : Densité Optique ;
- EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique ;
- FAO : Food and Agricultural Organisation ;
- g : Gramme ;
- G : Guanine ;
- GN : Gélose Nutritive ;
- h : Heure ;
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'Hydrogène ;
- HCl : Acide Chlorhydrique ;

Hg<sup>++</sup> : Mercure ;

HPLC : High performance liquid chromatography ;

KDa : Kilo Dalton ;

l : Litre ;

Lb : *Lactobacillus* ;

Lc : *Lactococcus* ;

LDH : Lysine Déshydrogénase ;

M : Molarité ;

mg : Milligramme ;

Mg<sup>++</sup> : Magnésium ;

min : Minute ;

ml : Millilitre ;

mM : Milli mole ;

mm : Millimètre ;

mm<sup>2</sup> : Millimètre carré ;

Mn<sup>++</sup> : Manganèse ;

MRS : Man Rogosa Sharp ;

N : Normalité ;

Na : Sodium ;

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de Sodium ;

NaCl : Chlorure de Sodium ;

NaOH : Hydroxide de Sodium ;

nm : Nanomètre ;

OMS : Organisation Mondiale de la Santé,

Pc : *Pediococcus* ;

Pep : Peptidase ;

PRT : Peptide Transport ;

Prt : Protéase ;

PrtPs : Protéases de la Paroi ;

PTC : Peptidyltransferase ;

St : *Streptococcus* ;

S : Svedberg ;

β : Béta ;

ssp : Sub-species ;

TCA : Trichloroacétique ;

U : Unité ;

V : Volume ;

VP : Vogues Proskauer ;

YMA: Yeast Milk Agar ;

Zn<sup>++</sup> : Zinc ;

α : Alpha ;

γ : Gama ;

κ : Kappa.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques.....	09
<b>Tableau 02</b> : Composés issus de la dégradation enzymatique ou chimique des acides aminés...14	
<b>Tableau 03</b> : Souches utilisées et leurs origines.....	21
<b>Tableau 04</b> : Pouvoir protéolytique des souches étudiées sur milieu YMA.....	31
<b>Tableau 05</b> : Détermination de l'activité protéinasique des exoprotéases par la méthode de l'agar au lait.....	33
<b>Tableau 06</b> : Détermination de l'activité protéinasique des endoprotéases par la méthode de l'agar au lait.....	34
<b>Tableau 07</b> : Temps de coagulation des extraits enzymatiques de <i>Lb. curvatus</i> BJ432, <i>Lb. buchneri</i> G8, <i>Lc. raffinolacticii</i> , <i>St. thermophilus</i> et <i>Pc. acidilacticii</i> .....	36
<b>Tableau 08</b> : Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases.....	37
<b>Tableau 09</b> : Détermination de l'activité spécifique des protéases liées à la paroi.....	38
<b>Tableau 10</b> : Détermination de l'activité spécifique des protéases intra cellulaires de l'agar au lait.....	38
<b>Tableau 11</b> : Activité protéinasique de l'extrait enzymatique de <i>Lb. curvatus</i> BJ432, <i>Pc. acidilacticii</i> , <i>Lb. buchneri</i> G8, <i>Lc. raffinolactis</i> , <i>St. thermophilus</i> .....	42
<b>Tableau 12</b> : Effet de l'inhibiteur EDTA sur l'activité protéinasique.....	48

## Listes des figures

<b>Figure 01</b> : Métabolisme des bactéries lactiques.....	04
<b>Figure 02</b> : Schéma du système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i> .....	11
<b>Figure 03</b> : Courbe de croissance de <i>Lb. curvatus</i> BJ432.....	39
<b>Figure 04</b> : Courbe de croissance de <i>Pc. acidilacticii</i> .....	39
<b>Figure 05</b> : Courbe de croissance de <i>Lb. buchneri</i> G8.....	40
<b>Figure 06</b> : Courbe de croissance de <i>Lc. raffinolactis</i> .....	40
<b>Figure 07</b> : Courbe de croissance de <i>St. thermophilus</i> .....	40
<b>Figure 08</b> : Activité caséinolytique de l'extrait de <i>Lb. curvatus</i> BJ432.....	41
<b>Figure 09</b> : Activité caséinolytique de l'extrait de <i>Pc. acidilacticii</i> .....	41
<b>Figure 10</b> : Activité caséinolytique de l'extrait de <i>Lb. buchneri</i> G8.....	41
<b>Figure 11</b> : Activité caséinolytique de l'extrait de <i>Lc. raffinolactis</i> .....	41
<b>Figure 12</b> : Activité caseinolytique de l'extrait de <i>St. thermophilus</i> .....	42
<b>Figure 13</b> : Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lb. curvatus</i> BJ432.....	43
<b>Figure 14</b> : Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Pc. acidilacticii</i> .....	43
<b>Figure 15</b> : Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lc. raffinolactis</i> .....	43
<b>Figure 16</b> : Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lb. buchneri</i> G8.....	43
<b>Figure 17</b> : Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>St. thermophilus</i> .....	44
<b>Figure 18</b> : Effet de la température sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lb. curvatus</i> BJ432.....	45
<b>Figure 19</b> : Effet de la température sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Pc. acidilacticii</i> .....	45
<b>Figure 20</b> : Effet de la température sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lb. buchneri</i> G8.....	45
<b>Figure 21</b> : Effet de la température sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lc. raffinolactis</i> .....	45
<b>Figure 22</b> : Effet de la température sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>St. thermophilus</i> .....	45
<b>Figure 23</b> : effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lb. curvatus</i> BJ432.....	46
<b>Figure 24</b> : effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Pc. acidilacticii</i> .....	46
<b>Figure 25</b> : effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lb. buchneri</i> G8.....	47
<b>Figure 26</b> : effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>Lc. raffinolactis</i> .....	47
<b>Figure 27</b> : effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de <i>St. thermophilus</i> .....	47
<b>Figure 28</b> : Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique <i>Lb. curvatus</i> BJ432 sur la caséine (0.5 mg/ml).....	49
<b>Figure 29</b> : Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique <i>Pc. acidilacticii</i> sur la caséine (0.5 mg/ml).....	49
<b>Figure 30</b> : Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de <i>Lb. buchneri</i> G8 sur la caséine (0.5 mg/ml).....	50
<b>Figure 31</b> : Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de	50

<b>Figure 32:</b> Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de <i>St. thermophilus</i> sur la caséine (0.5 mg/ml).....	51
<b>Figure 33 :</b> Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action de l'extrait enzymatique <i>Lb. curvatus</i> BJ432 sur la caséine (0.5 mg/ml).....	52
<b>Figure 34 :</b> Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de <i>Pc. acidilacticii</i> sur la caséine (0.5 mg/ml).....	52
<b>Figure 35 :</b> Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action enzymatique de <i>Lb. buchneri</i> G8 sur la caséine (0.5 mg/ml).....	53
<b>Figure 36 :</b> Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action enzymatique de <i>Lc. raffinolactis</i> sur la caséine (0.5 mg/ml).....	53
<b>Figure 37 :</b> Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action enzymatique de <i>St. thermophilus</i> sur la caséine (0.5 mg/ml).....	54
<b>Figure 38 :</b> analyse par CPG des composés aromatiques chez <i>Lb. curvatus</i> BJ432.....	55
<b>Figure 39 :</b> analyse par CPG des composés aromatiques chez <i>Pc .acidilacticii</i> .....	55
<b>Figure 40 :</b> analyse par CPG des composés aromatiques chez <i>Lb. buchneri</i> G8.....	55
<b>Figure 41 :</b> analyse par CPG des composés aromatiques chez <i>Lc. raffinolactis</i> .....	56
<b>Figure 42 :</b> analyse par CPG des composés aromatiques chez <i>St. thermophilus</i> .....	56
<b>Figure 43 :</b> Taux d'autolyse après 30 min et après 180 min d'incubation de <i>Lb. curvatus</i> BJ432, <i>Pc. acidilacticii</i> , <i>Lb. buchneri</i> G8, <i>Lc. raffinolactis</i> et <i>St. thermophilus</i> .....	57

## Liste des photos

<b>Photo 01</b> : Dispositif pour la récupération des métabolites volatils et des produits de la dégradation des acides aminés.....	28
<b>Photo 02</b> : Zones de protéolyse sur milieu YMA.....	32
<b>Photo 03</b> : Zones de protéolyse sur milieu Agar au lait.....	32
<b>Photo 04</b> : dégradation totale de la caséine par <i>Pc. acidilacticii</i> . ....	35
<b>Photo 05</b> : dégradation partielle de la caséine par <i>Lc. lactis ssp cremoris</i> CHT24.....	35
<b>Photo 06</b> : Test du pouvoir coagulant sur lait.....	36

# ***Introduction générale***

Les bactéries lactiques ont une longue histoire d'utilisation dans les processus de fermentation des aliments. Des efforts ont été fournis pour mettre en évidence le rôle des bactéries lactiques dans ces processus et en particulier la protéolyse qui est principalement étudiée par référence à la technologie des fromages parce qu'elle joue un rôle important dans le développement de la texture et de la flaveur de ces produits (Savijoki *et al.*, 2006; Marathe & Ghosh, 2009).

Les exigences nutritionnelles prononcées des bactéries lactiques ne leur permettent pas une croissance dans des milieux à faible concentration en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait, mais la présence d'un système protéolytique complexe assure leur croissance dans ces milieux. Ce système est actuellement bien décrit, il est composé de protéinases qui contribuent à la dégradation primaire des caséines du lait, de peptidases qui hydrolysent les peptides résultant et les systèmes transportant les petits peptides et les acides aminés obtenus (Bouton *et al.*, 1993; Law & Haandrikman, 1997; Smit *et al.*, 2005; Roudj *et al.*, 2009).

C'est dans cette optique qu'il nous a paru utile de s'engager à l'étude du système protéolytique de souches de bactéries lactiques locales isolées de différentes niches écologiques.

Cette présente étude est composée de deux parties, une bibliographique qui s'articule autour de deux chapitres traitants le volet des bactéries lactiques et leurs intérêt technologiques et une deuxième, expérimentale où on a tracé comme objectifs les points suivants :

- Screening primaire des souches protéolytiques sur milieux solides ;
- Screening secondaire en se basant sur la détermination de l'activité spécifique ;
- Etude des facteurs influençant l'activité protéinasiqne optimale chez *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii* ;
- Recherche des produits de dégradation des protéines par les méthodes de séparation, HPLC et CPG.

# ***Synthèse bibliographique***

***Chapitre I : les bactéries  
lactiques***

## I.1. Historique :

Des étapes importantes dans la taxonomie des bactéries lactiques (BL) sont apparues à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et le début du 20<sup>ème</sup> siècle, avec la description des genres *Leuconostoc*, *Streptococcus*, ainsi que des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Pot, 2008).

En 1901, Beijerick a déterminé le groupe des BL en les séparant des coliformes. En 1919, Orla-Jensen a publié un large nombre de nouvelles espèces, contenant six espèces de *Lactobacillus*. En 1937, Sherman a publié une classification de streptocoques avec de nouvelles espèces et de genres, mais elle reste utile jusqu'à 1957. En 1965, Abo-Elnaga et Kandler ont fait réapparaître l'intérêt des lactobacilles (Pot, 2008).

A la fin des années soixante dix, et avec l'apparition des techniques génotypiques, des changements considérables avaient lieu et le nombre de nouvelles espèces a été augmenté progressivement, avec l'apparition de 13 nouvelles espèces de lactobacilles décrites en 2005 (Pot, 2008).

## I.2. Définition des bactéries lactiques :

Le groupe des BL ou bactéries de l'acide lactique a été défini par Orla-Jensen (1919), elles constituent un groupe hétérogène qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents : acide acétique, éthanol, CO<sub>2</sub> (Figure 01) (Leveau et Bouix, 1993).

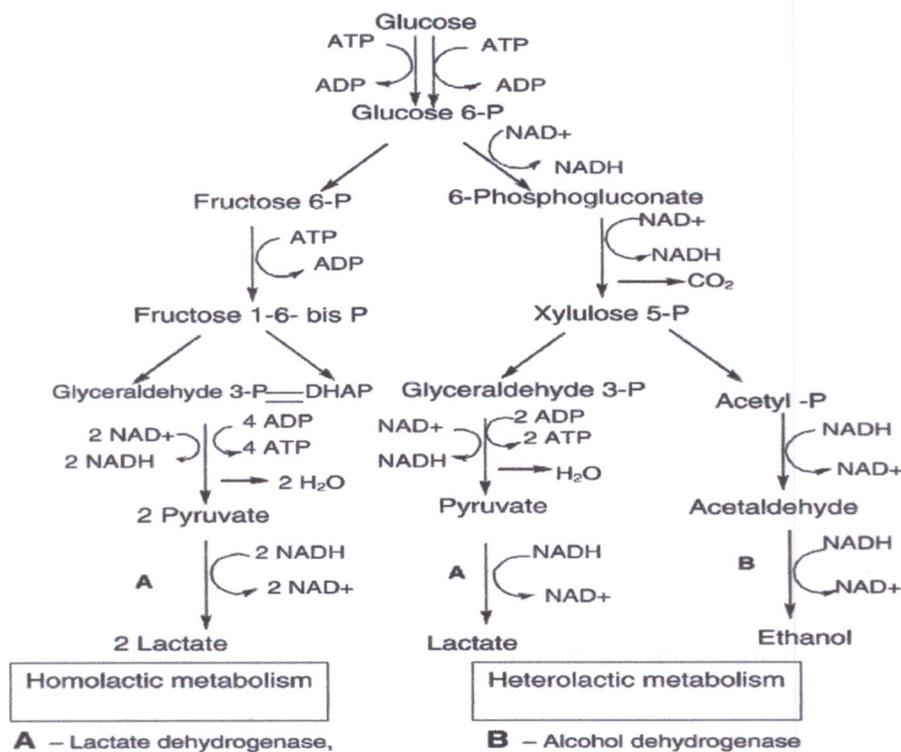


Figure 01 : Métabolisme des bactéries lactiques (Reddy *et al.*, 2008).

### I.3. Présentation des bactéries lactiques :

Les BL, groupe hétérogène représenté par plusieurs genres dont les cellules sont soit des coques soit des bacilles. Elles présentent des caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement (**Renault, 2002; Pilet et al., 2005; Badis et al., 2005; Settanni et Moschetti, 2010**) :

- Ce sont des bactéries à Gram positif généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase, oxydase négatives et généralement nitrate réductase négatives ;
- Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés (AA), des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras mais aussi leur métabolisme fermentaire : incapables de synthétiser le noyau hème des porphyrines, elles sont normalement dépourvues de cytochromes et en conséquence inaptes à toute respiration aérobie ou anaérobie ;
- Ce sont des bactéries anaérobies facultatives : microaérophiles, capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose. Leur caractère pathogène est en revanche extrêmement réduit. Notamment, certaines espèces des genres *Streptococcus* et, dans certaines conditions, *Enterococcus* peuvent être impliquées dans des infections humaines.

Du point de vue phylogénétique, les BL appartiennent à la branche *Clostridiale* des bactéries Gram positives, avec un pourcentage en guanine- cytosine (C+G) inférieur à 55%. La taxonomie actuelle regroupe les principaux genres de BL en fonction de leur parenté phylogénétique : *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* (**Pilet et al., 1998; Beasley, 2004; Pilet et al., 2005**).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme un genre de BL, bien qu'il se distingue par un pourcentage de C+G de 55 %, largement supérieur à celui des autres genres. De récentes études taxonomiques ont également conduit à différencier de nouveaux genres comme *Vagococcus*, *Oenococcus* et *Tetragenococcus*. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiaux ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (**Leveau et al., 1991; Leveau et Bouix, 1993**).

### I.4. Caractéristiques des différents genres

#### I.4.1. Le genre *Lactobacillus* :

Il regroupe de nombreuses espèces, isolées d'habitats variés : cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux, lait et produits laitiers, produits carnés, poissons marinés ou fumés, eaux usées, sol... (**Pilet et al., 2005**).

Les espèces de *Lactobacillus* sont caractérisées par des cellules en forme de bâtonnets souvent groupées en chaînes, une forte exigence en facteurs de croissance, ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (**Guiraud et Rosek, 2004**).

L'hétérogénéité est illustrée par la variation du G+C: 32 à 53 %. Originellement, elles ont été classées en trois groupes, des sous-genres, par Orla-Jensen (1919) (**Leveau et al., 1991; Leveau et Bouix, 1993; Pilet et al., 2005**):

-*Thermobacterium* : homofermentaire et thermophile.

-*Streptobacterium* : homofermentaire et mésophile.

-*Batabacterium* : hétérofermentaire, soit mésophile, soit thermophile.

La classification actuelle est loin d'être définitive, mais les résultats de la taxonomie moléculaire, la détermination du type de peptidoglycanes (PTG), les propriétés de certaines enzymes dont la LDH, la détermination de l'isomère de l'acide lactique, la taille du génome et l'hybridation ADN-ADN ont permis à Kandler et Weiss de diviser les lactobacilles en trois groupes qui recouvrent, sous de nouvelles définitions, les groupes d'Orla- Jensen (Leveau *et al.*, 1991; Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 2005).

- **Groupe I:** Regroupe les lactobacilles homofermentaires obligatoires, contenant les espèces du groupe *thermobacterium* et d'autres espèces nouvellement décrites. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate.

Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'homme et les animaux (tractus digestif, organes génitaux) et participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme.

- **Groupe II:** Regroupe les lactobacilles hétérofermentaires facultatives, capables d'utiliser la voie hétérofermentaire à partir du gluconate. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces majoritairement mésophiles dont *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*, intervenant dans la fermentation des produits carnés et céréaliers, et *Lb. casei* utilisé pour ses propriétés probiotiques.

- **Groupe III:** Regroupe les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires, constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. sanfransiscensis* et *Lb. brevis*, qui font partie de la flore des levains de panification, et *Lb. kefir* isolé du grain de kéfir.

#### 1.4.2. Le genre *Carnobacterium* :

Ce genre a été créé par Collins *et al.* (1987) pour regrouper des lactobacilles atypiques, isolés de viande de bœuf, de poisson et de volaille, peu acidifiants et psychrotrophes. Ils sont incapables de croître en présence de 8 % de NaCl et à 45°C ni sur milieu à l'acétate, mais donnent des colonies visibles à 10°C et parfois à 0°C (Bourgeois et Larpent, 1996; Carole Edima, 2007 ; Pot, 2008).

Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridation ADN-ADN, dans un nouveau genre, *Carnobacterium*. Morphologiquement proches des *Lactobacillus*, ils s'en différencient par leur tendance psychrotrophes et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique. De même leur peptidoglycane est constitué d'acide méso-diaminopimélique alors qu'il est caractérisé par le peptide Lys-Asp chez la plupart des *Lactobacillus*. Les carnobactéries sont phylogénétiquement plus proches de genre *Enterococcus* (Pilet *et al.*, 2005).

Ce genre comprend quatre espèces, *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum*. Ils sont isolés de produits carnés ou de produits de la mer, le plus souvent conditionnés sous atmosphère modifiée, mais également du contenu intestinal ou du tissu rénal de salmonidés (Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

### **1.4.3. Les genres *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* :**

Ils rassemblent les coques homofermentaires, produisant en majorité de l'acide L- lactique. Les espèces initialement regroupées dans le genre *Streptococcus* ont été redistribuées dans ces quatre genres selon les homologies de leurs ARN ribosomiques 16S (Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

Le genre *Lactococcus* (streptocoques du groupe N de Lancefield) représente les streptocoques dits « lactiques », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ils sont mésophiles, mais se développent jusqu'à 10°C. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Leveau et Bouix, 1993; Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

Ce genre regroupe les *Lc. lactis*, *Lc. garviae* et *Lc. raffinolactis*. Certaines espèces isolées de poissons et d'eau douce et qui possèdent la particularité d'être mobiles, ont été répertoriées dans le nouveau genre *Vagococcus* (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Pilet *et al.*, 2005).

Dans le genre *Streptococcus*, les streptocoques lactiques forment un groupe distinct des autres espèces qui sont soit pathogènes pour l'homme (*St. pyogenes*) ou pour les animaux (*St. agalactiae*) soit saprophytes de la cavité orale (*St. mutans*, *St. salivarius*) ou de l'intestin (*St. faecalis*). Ces espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de Lancefield et par leur capacité de croître à des températures extrêmes : 45°C pour les thermophiles, 10°C pour les mésophiles (Leveau et Bouix, 1993).

Des critères moléculaires permettent aussi de les distinguer : la composition de leur PTG est variable selon la nature peptidique, la composition de leur ADN mesurée par le GC, l'homologie de séquence entre ADN et ARNr et enfin l'homologie de séquence de leur génome mesurée par hybridation ADN-ADN (Leveau et Bouix, 1993).

Récemment, les résultats d'hybridation entre acides nucléiques et de séquençage des ARNr ont permis d'exclure du genre *Streptococcus* proprement dit les streptocoques lactiques mésophiles et les Streptocoques fécaux. Ces derniers ont été placés près des *Bacillus* dans le nouveau genre : *Enterococcus* (Leveau et Bouix, 1993).

Les streptocoques lactiques se composent en fait de deux groupes distincts : les streptocoques mésophiles possédant l'antigène de groupe N, d'où leur nom de streptocoques de groupe N et l'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* qui ne possède pas d'antigène de Lancefield (Leveau et Bouix, 1993).

Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe sérologique D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme « streptocoques fécaux », comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ce sont également des coques homofermentaires qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6.5 % de NaCl, et à pH 9.6, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement, en particulier la température (30 min à 60°C). Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol et produits laitiers. Au sein des BL, les bactéries du genre *Enterococcus* ont une position particulière : parfois utilisés comme indicateur de contamination fécale dans les aliments, ils peuvent aussi être associés à la fermentation de certains fromages Italiens (Pilet *et al.*, 2005).

#### I.4.4. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* :

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrade, sont des germes microaérophiles et mésophiles (Guiraud, 1998 ; Sutra *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

Leurs exigences nutritionnelles, leur faible activité protéolytique et chez la plupart des espèces leur incapacité d'utiliser le lactose ne leur permettant pas d'acidifier et de coaguler le lait. Par contre, certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevées, comme *Pc. halophilus* renommé *Tetragenococcus halophilus* qui tolère jusqu'à 18 % de NaCl. Ils sont présents dans la bière, le vin, les produits végétaux (ensilages) et les Saumures (anchois salés) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

#### I.4.5. Le genre *Leuconostoc* :

Les *Leuconostoc* sont des anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel, ils se développent entre 20° et 30°C, pas à 45°C. Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou chainettes, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate, ce qui leur confère une activité aromatique importante. D'autres synthétisent des dextrans en présence de saccharose (Guiraud, 1998 ; Guiraud et Rosec, 2004 ; Pilet *et al.*, 2005).

Ce genre comporte 6 espèces présentes majoritairement dans les produits végétaux, mais elles sont également isolées dans les produits laitiers. Ils participent à la fermentation des produits végétaux. L'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été renommée *Oenococcus oeni* et certaines lactobacilles fermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Pilet *et al.*, 1998).

#### I.4.6. Le genre *Bifidobacterium* :

La forme des cellules de *Bifidobacterium* est caractérisée par une grande variété : coccoïde, allongée avec des protubérances, des bifurcations, des extrémités spatulées. Elles sont souvent arrangées en chaînes étoilées, en V ou en palissades. (Leveau et Bouix, 1993).

Elles se différencient des autres BL par leur caractère anaérobie, leur GC élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphokétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique (rapport 3:2), ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des BL. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C ; ils se développent à pH supérieur à 5. Ils sont isolés de l'homme et des animaux, et sont surtout utilisés pour leurs propriétés nutritionnelles (Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

Ce genre est divisé en 24 espèces pouvant présenter entre elles une homologie parfois importante. Cependant *Bb. longum* et *Bb. infantis* seraient la même espèce ; ainsi que *Bb. catenulatum* et *Bb. pseudocatenulatum* et d'autre part *Bb. thermophilum* et *Bb. boum*. (Leveau et Bouix, 1993).

Les caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques sont résumées dans le tableau 01.

**Tableau 01 : Caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques (Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).**

Genre	Morphologie	Fermentation	T° optimale	Nb espèces	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	bacilles	homofermentaires ou hétérofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 : 23 G2 : 16 G3 : 22	Homme Produits laitiers, carnés, Végétaux...
<i>Carnobacterium</i>	bacilles	hétérofermentaires	psychrotrophes	6	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	coques	homofermentaires	mésophiles	5	Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	coques	homofermentaires	mésophiles ou thermophiles	19	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	coques	homofermentaires	mésophiles	13	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Vagococcus</i>	coques mobiles	homofermentaires	mésophiles	2	Poissons, eaux douces
<i>Pediococcus</i>	coques en tétrades	homofermentaires	mésophiles	7	Bière, produits végétaux, sauces
<i>Tetragenococcus</i>	coques en tétrades	homofermentaires	mésophiles	1	saumures
<i>Leuconostoc</i>	coques	hétérofermentaires	mésophiles	11	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	coques	hétérofermentaires	mésophiles	1	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	forme irrégulière	acide acétique et lactique	mésophiles	25	Intestin de l'homme et des animaux

***Chapitre II : intérêt  
technologique des bactéries  
lactiques***

## II.1. Introduction :

Les BL ont une longue histoire d'application dans les produits fermentés. Leur participation aux caractéristiques organoleptiques, technologiques, nutritionnelles et sanitaires de ces produits s'exerce par différentes propriétés métaboliques. Dans les aliments, les BL ont deux rôles principaux liés à leurs activités métaboliques (Pilet *et al.*, 1998; de Vuyst et Leroy, 2007) :

- Un rôle positif ou technologique : il s'exerce principalement dans les produits fermentés avec des conséquences sur l'ensemble des facteurs de qualité ;
- Un rôle négatif: il se traduit essentiellement par l'altération de denrées alimentaires concernées, qu'elles soient ou non fermentées.

## II.2. Intérêt technologique des bactéries lactiques

### II.2.1. Activité protéolytique des bactéries lactiques

Les BL possèdent un système protéolytique complexe afin d'assurer leur croissance dans des milieux à très faible concentration en petits peptides et en AA libres, comme dans le lait. Leur activité protéolytique globale est considérée comme faible comparée à celle d'autres genres bactériens comme *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Proteus* (de Giori et Hebert, 2001; Lopezdel Castillo-Lozano, 2007; Roudj *et al.*, 2009).

#### II.2.1.1. La composition du système protéolytique chez les bactéries lactiques:

L'équipement enzymatique des BL est complexe, par la diversité et la nature des enzymes détectées et par leur localisation intra ou extracellulaire. Les composants structurales du système protéolytique peuvent être divisés en trois groupes en se basant sur leur fonction : les protéinases qui hydrolysent les caséines en peptides; les peptidases qui dégradent les peptides; et le système de transport qui transporte les produits d'hydrolyse à travers la membrane cytoplasmique (Gilbert *et al.*, 1996; Law et Haandrikman, 1997; Smit *et al.*, 2005). La figure 2, illustre le système protéolytique de *Lactococcus lactis*.

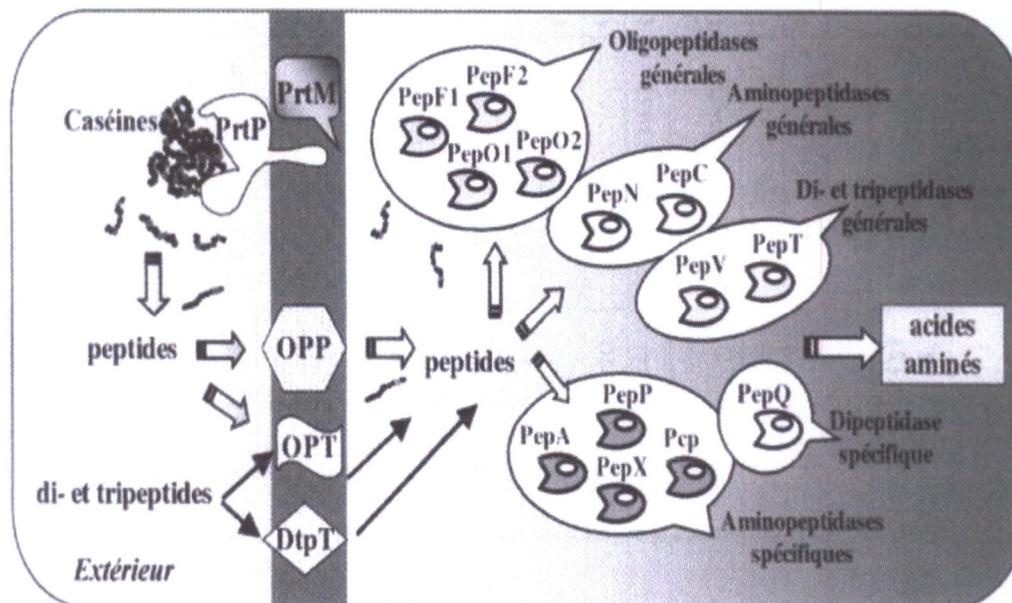


Figure 02 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan *et al.*, 2008).

Le système protéolytique est composé de :

**a. Les protéinases :** La première étape dans l'utilisation de la caséine par les BL est réalisée par les protéinases d'enveloppe cellulaire (protéases de paroi) (CEPs) et aussi des protéases intracellulaires libérées par la lyse cellulaire (Leveau et Bouix, 1993 ; Savijoki *et al.*, 2006).

De nombreuses données biochimiques, génétiques ainsi que la comparaison et l'analyse des séquences déduites de plusieurs gènes PrtP ont permis de mettre en évidence une structure commune. Les PrtP sont synthétisées dans le cytoplasme bactérien sous forme de pré-proprotéines inactives et de grande taille ( $\approx 1900$  AA; 200 KDa). A partir de la région N-terminale des PrtPs, on distingue une organisation en huit domaines aux quels peuvent être associées différentes fonctions (Savijoki *et al.*, 2006 ; Atlan *et al.*, 2008) :

- Le pré-domaine ( $\approx 30$  AA), appelé aussi séquence signal, permet à la protéine d'être dirigée vers la membrane cytoplasmique et de traverser grâce au système de sécrétion Sec; le pré-domaine est éliminé par une peptidase spécifique membranaire ;

- Le pro-domaine ( $\approx 150$  AA) est indispensable au repliement correct de l'enzyme dans l'enveloppe bactérienne est éliminé par auto-digestion ;

- Le domaine catalytique ( $\approx 500$  AA) est caractéristique de la famille des subtilisines qui sont des protéases à sérine excrétées par les bactéries du genre *Bacillus*. Ce domaine est le siège de trois sites de liaison au calcium stabilisant l'enzyme, d'une région de liaison au substrat et du site actif composé de trois AA: acide aspartique (D 30), histidine (H 94) et sérine (S 433) Le domaine A ( $\approx 400$  AA) n'est pas associé à une fonction connue et présente une structure en feuillets  $\beta$  ;

- Le domaine B ( $\approx 500$  AA) stabilise la structure du domaine catalytique ;

- Le domaine H ( $\approx 200$  AA) constitue une longue structure en hélice  $\alpha$  qui projette les domaines A et B à l'extérieur de la bactérie ;

- Le domaine W ( $\approx 100$  AA) est une région hydrophile traversant la paroi bactérienne ;

- Enfin, le domaine d'ancrage à la paroi bactérienne ( $\approx 40$  AA) qui est présent chez de nombreuses protéines de surface des bactéries à Gram positif.

Les CEPs ont une préférence marquée en vers les caséines hydrophobes, les protéines les plus abondantes dans le lait. Les caséines sont réparties en:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - et  $\kappa$ -caséines, chacun contient un large nombre de résidus proline qui empêchant la formation des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ . Ces caractéristiques de la structure secondaire conduisent à une molécule ouverte non saturée sensible à l'action des CEPs (Savijoki *et al.*, 2006).

Les PrtPs de *Lactococcus* sont divisées en deux enzymes P I et P III, qui se distinguent par leur spécificité au substrat pour  $\alpha_1$ -,  $\beta$ -, et  $\kappa$ -caséines. Le type P I dégrade principalement la  $\beta$ -caséine qui est clivée en plus de 100 oligonucléotides différents allant de 4 à 30 résidus d'AA. La  $\kappa$ -caséine est clivée par l'enzyme P I, tandis que l'enzyme P III est capable de cliver  $\alpha_1$ -,  $\beta$ -, et  $\kappa$ -caséines. Les PrtPs sont en outre classés en 7 groupes : a, b, c, d, e, f, et g en fonction de leur spécificité en vers le fragment  $\alpha$ - caséine (Savijoki *et al.*, 2006).

**b. Le système de transport des peptides :** La seconde étape dans l'utilisation de la caséine comprend le transport des peptides générés par les CEPs à l'intérieur de la cellule. Les peptidases des BL sont toutes localisées dans le cytoplasme (Savijoki *et al.*, 2006).

D'un point de vue structural, les transporteurs de peptidases des BL appartiennent à deux grandes familles, les transporteurs PTR (peptide transport) et les ABC transporteurs (ATP-binding-cassette). Cette classification est concordante avec la distinction qui est faite sur un plan énergétique, où le transport de peptides dépend soit de la force proton-motrice, soit de l'hydrolyse de l'ATP. Du point de vue de la spécificité de substrat, les transporteurs de di- et

tripeptides sont classiquement opposés aux transporteurs d'oligopeptides, en référence à la situation rencontrée chez *Lc. lactis*, la BL modèle (Atlan *et al.*, 2008).

**b<sub>1</sub>. DtpT, seul représentant de la famille PTR :** DtpT, initialement caractérisé chez *Lc. lactis*, est une protéine comprenant 12 fragments transmembranaires en hélice  $\alpha$  (Atlan *et al.*, 2008).

**b<sub>2</sub>. Dpp, Opt et Opp, trois représentants de la famille des ABC-transporteurs :** Les systèmes ABC sont des transporteurs à plusieurs composantes, ils comportent systématiquement deux protéines (ou domaines) membranaires fortement hydrophobes, comprenant chacune six segments transmembranaires (Atlan *et al.*, 2008).

**c. Les peptidases :** Après que les peptides dérivés de la caséine sont prises par les cellules des BL, ils sont dégradés par une action concertée des peptidases avec des spécificités différentes. Les peptidases sont classés en deux groupes majeurs, les endopeptidases qui clivent des liaisons peptidiques à l'intérieur des chaînes peptidiques, et les exopeptidases qui nécessitent une extrémité libre et libère un ou deux AA à partir d'une des deux extrémités d'un peptide. Chez les BL, la majorité des exopeptidases sont des aminopeptidases. Dans ces deux groupes (exo et endopeptidases), les peptidases sont classées en fonction de leur spécificité de substrat qui peut être large ou restreinte à quelques AA (peptidases spécifiques des résidus acides, de la proline) (Savijoki *et al.*, 2006; Atlan *et al.*, 2008).

**c<sub>1</sub>. Aminopeptidases générales :** Les aminopeptidases générales PepN et PepC, de large spécificité de substrat, hydrolysent des peptides de taille variant de 2 à 12 AA, et ont en général peu d'activité sur les peptides contenant de la proline. Toutes les BL possèdent au moins une dipeptidase et une tripeptidase qui hydrolyse spécifiquement les di- et tripeptides, respectivement (Atlan *et al.*, 2008).

**c<sub>2</sub>. Peptidases de spécificité restreint :** De par leur origine caséique, les peptides constituant les substrats naturels des peptidases des BL sont riches en proline. Quatre peptidases ont été caractérisées : une X-propyl dipeptidyl aminopeptidase libérant des peptides de type X-Pro (PepX), une aminopeptidase libérant les résidus N-terminaux lorsqu'ils sont suivis d'une ou deux prolines, les dipeptidases Pep Q (prolidase) et Pep R (prolinase) hydrolysant les dipeptides de type x-pro et pro-x, respectivement (Atlan *et al.*, 2008).

**c<sub>3</sub>. Endopeptidases :** Les deux endopeptidases Pep O et Pep F. Pep O hydrolysent les peptides de taille variant de 5 à 35 résidus, Pep F des peptides variant de 7 à 17 résidus (Christensen *et al.*, 1999; Atlan *et al.*, 2008).

### II.2.1.2. Catabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques :

Les petits peptides et les AA libres générés pour l'hydrolyse des caséines sont transportés à l'intérieur de la cellule où les peptides sont à leur tour hydrolysés en AA. Le catabolisme des AA peut être une source d'énergie pour certaines BL en cas de limitation en nutriments, par trois voies cataboliques principales. Ce sont, la décarboxylation des AA, le catabolisme de l'arginine et celui de la sérine. Il peut être également une voie majeure de formation de molécules aromatiques grâce à l'action de plusieurs enzymes dont des transaminases, des décarboxylases, des déshydrogénases, des désaminases et des lyases. Ces composés d'arômes incluent des alcools, des aldéhydes, des acides, des esters et des composés soufrés. Le tableau 2, illustre les composés issus de la dégradation enzymatique ou chimique des acides aminés (Carole Edima, 2007; Lopezdel Castillo-Lozano, 2007 ; Atlan *et al.*, 2008).

**Tableau 02 : Composés issus de la dégradation enzymatique ou chimique des acides aminés (Ammor, 2004)**

Acide aminé	Aldéhydes	Alcools	Acides carboxyliques	Esters	Thiol/divers
Leucine	3-méthylbutanol (isovaléraldéhyde)	3-méthylbutanol	Acide 3-méthylbutanoïque	Ethyl-3-méthylbutanoate	
Isoleucine	2-méthylbutanol	2-méthylbutanol	Acide 2-méthylbutanoïque		
Valine	2-méthylpropanol (isobutyraldéhyde)	2-méthylpropanol	Acide 2-méthylpropanoïque	Ethyl iso-butanoate	
Phénylalanine	Phénylacétaldéhyde benzaldéhyde	Phényléthanol phénylméthanol	Acide phénylacétique Acide benzoïque	Phényléthylacétate Ethyl benzoate	
Tyrosine	Hydroxyphényl acétaldéhyde	Hydroxyphényléthanol	Acide hydroxyphénylacétique		p-crésol Phénol
Tryptophane	Indol-3-acétaldéhyde Indol-3-aldéhyde	Tryptophol	Acide indol-3-acétique		Skatole, indol
Méthionine	3-méthylthio- Propanol (méthional)	3-méthylthio- Propanol (méthionol)	Acide 3-méthylthio- propanoïque	Ethyl-3-méthylthio- propanoate S-méthylthio- acétate	Méthanethiol
Cystéine	2-thioéthanol	2-thioéthanol	Acide 2-thio- Acétique		H <sub>2</sub> S

### II.2.1.3. Ingénierie de la protéolyse :

L'ingénierie de la protéolyse a pour but de mieux comprendre la spécificité d'hydrolyse des peptidases et des protéases et de moduler la protéolyse dans les produits laitiers. Ainsi, des enzymes protéolytiques ont été modifiées par mutagenèse afin de modifier leur spécificité d'hydrolyse (Atlan *et al.*, 2008).

Le développement d'outils génétiques chez *Lc. lactis* a permis de sur-exprimer des peptidases déjà présentes chez l'espèce mais également d'exprimer des peptidases hétérologues chez *Lc. lactis* pour accélérer leur croissance dans le lait. L'utilisation des mutants négatifs pour des peptidases de quelques souches conduit à une augmentation de la production de peptides ayant une activité biologique (Atlan *et al.*, 2008).

### II.2.1.4. Relation entre la composition du milieu et le système protéolytique:

Durant les procédés de fabrication des produits laitiers fermentés, les BL en culture sont soumises à des variations diverses (propriétés nutritionnelles, paramètres physiques et chimiques du milieu). Pour se développer, les bactéries doivent donc être capables de s'adapter aux changements (Atlan *et al.*, 2008).

La croissance sur les milieux de laboratoire riches en AA et en peptides diminue fortement l'activité des protéases de paroi mais pas celle des peptidases. Cette inhibition résultant d'une concentration trop faible de  $Ca^{++}$  et de l'action répressive des acides aminés et surtout de peptides. Ce phénomène est en accord avec l'utilisation tardive des protéines du lait après la disparition des acides aminés et des peptides. Cette répression serait double : il y aurait d'abord répression de la transcription des gènes spécifiques des protéases de paroi et ensuite de la traduction des ARN messagers produit qui sont supposés être stables (Leveau & Bouix, 1993).

### II.2.2. Aptitudes aromatisantes :

Les BL jouent un rôle important sur les propriétés organoleptiques du produit dans lequel elles se développent. Cela est dû aux composés organiques qu'elles sécrètent par transformation du milieu (Leveau *et al.*, 1991).

En dehors de l'acide lactique et d'autres acides organiques produits par fermentation qui confèrent aux produits leur caractère acide, les principaux composés impliqués sont le diacétyle et l'acétaldéhyde, responsables notamment des saveurs caractéristiques du beurre et du yaourt. Ils sont produits à partir du pyruvate, issu de la glycolyse, mais aussi du métabolisme du citrate et de la dégradation de certains acides aminés. Un grand nombre de composés issus de la protéolyse, des activités lipolytiques et estérasiques participent à la formation d'arômes lors de l'affinage des fromages. La flore lactique participerait également à la saveur des saucissons par son activité lipolytique. Dans les levains de panification, le rôle des BL est essentiellement aromatique, par production d'acides organiques qui confèrent au pain au levain son goût particulier (Pilet *et al.*, 1998).

### II.2.3. Activité lipolytique des bactéries lactiques

De même que les BL ne sont pas très protéolytiques, elles ne sont pas non plus très lipolytiques comparativement à d'autres espèces bactériennes comme : *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Achromobacter*. Néanmoins, des activités d'hydrolyse d'esters ont été mesurées à de nombreuses reprises chez les BL (Ammor, 2004; Medina *et al.*, 2004; Atlan *et al.*, 2008).

D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle des esters formés avec des acides gras à chaîne courte ( $C_2$  à  $C_8$ ), des lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (supérieur à  $C_8$ ). Ces enzymes

sont impliquées dans l'hydrolyse de mono-, di- et tri- glycérides. Elles sont aussi capables de catalyser deux types différents de réactions de synthèse : la synthèse d'esters à partir d'alcool et d'acides gras et la réaction de transestérification dans laquelle le donneur d'acyle est un ester (Atlan *et al.*, 2008).

**II. 2.3.1. Contenu en estérases :** Les activités estérasiques et lipasiques sont classiquement mesurées à l'aide de substrats naturels (triacylglycérols, huile d'olive) ou synthétiques chromogènes (dérivés paranitrophényl d'acides gras) dont l'hydrolyse est mesurée (Atlan *et al.*, 2008).

Trois points communs se dégagent pour les estérases des bactéries lactiques (Atlan *et al.*, 2008):

- Elles hydrolysent préférentiellement des esters composant des chaînes d'acides gras en C4 et C6 ;
- Elles sont inhibées par des inhibiteurs d'enzymes à sérine ce qui permet de les classer dans la famille des hydrolases possédant une sérine dans leur site actif ;
- Elles sont très majoritairement décrites comme des enzymes localisées à l'intérieur de la bactérie ce qui est confirmé par les données génétiques disponibles.

### II. 2.3.2. Rôle des estérases

**a. Rôle technologique :** Quand on sait que les esters sont des molécules volatiles fortement aromatiques retrouvées en grand nombre dans les produits fermentés, l'importance des estérases, capables de les hydrolyser ou de les synthétiser devient évidente (Atlan *et al.*, 2008).

La formation des esters dont les seuils de détection sont très bas et les notes aromatiques florales, fruitées ou soufrées plutôt agréables, doit être maîtrisée pour une bonne qualité organoleptique du produit fermenté. Les estérases sont donc des enzymes clés dans le développement de la saveur du produit (Atlan *et al.*, 2008).

**b. Rôle physiologique :** Le rôle que jouent les estérases dans la physiologie des bactéries lactiques reste encore bien obscur. Les mutants négatifs obtenus pour ces enzymes montrent que l'activité estérasique n'était pas nécessaire à la croissance de la bactérie ni dans un milieu synthétique, ni dans un lait écrémé ou entier (Atlan *et al.*, 2008).

Le fait que les estérases ne puissent pas hydrolyser la matière grasse du lait n'est pas non plus un argument en faveur d'un rôle nutritionnel des estérases. L'expression des gènes codant les estérases et leur régulation n'est pas connue. Les seules données disponibles viennent de rares données génétiques et protéomiques (Atlan *et al.*, 2008).

### II.2.4. Activité autolytique des bactéries lactiques :

Les autolysines sont définies comme des enzymes bactériennes endogènes capables d'hydrolyser le peptidoglycane, qui est le constituant majeur et essentiel de la paroi. Leur action peut donc induire la lyse bactérienne (Chapot-Chartier, 1996).

Dans le cas des bactéries lactiques utilisées dans la fabrication des produits laitiers fermentés, l'autolyse des cellules va permettre de libérer leur contenu enzymatique intra-cytoplasmique qui joue un rôle important dans le développement de la saveur et de la texture des fromages (Chapot-Chartier, 1996).

Parmi ces enzymes, les mieux caractérisés sont les peptidases qui libèrent des petits peptides et des acides aminés libres qui sont des précurseurs d'arômes. La lyse précoce des bactéries est

corrélée avec un niveau de protéolyse plus élevée des caséines et un niveau d'amertume plus faible (Chapot-Chartier, 1996).

## II.2.5. Production de polysaccharides

**II.2.5.1. Généralités :** Certaines BL, produisent des polysaccharides de grande importance industrielle; les polysaccharides excrétés par les BL sont appelées exopolysaccharides (EPS). Ils ont des masses moléculaires moyennes allant de  $1 \times 10^4$  à  $6 \times 10^6$  Da et peuvent être classés selon deux grands types en fonction de leur composition chimique et le mécanisme de biosynthèse : homopolysaccharides et hétéropolysaccharides (Vignola, 2002; Laws *et al.*, 2001; Vaningelgem *et al.*, 2003; Atlan *et al.*, 2008 ).

Les homopolysaccharides, constituées seulement d'un seul type de monosaccharide, sont divisés en 4 groupes:  $\alpha$ - D-glucanes,  $\beta$ -D-glucanes, fructanes et d'autres comme polygalactanes. Les hétéropolysaccharides, constitués d'un enchainement linéaire ou ramifié d'un petit nombre de sucres (1 à 7) appelé unité répétitive (Cerning, 1995; de Vuyst & Degeest, 1999; Yang, 2000; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

Les EPSs des BL ont une grande importance pour la santé humaine et des applications industrielles, d'une Part, elles interviennent comme agents diminuant le cholestérol, anti- ulcères, anti tumorales ou encore immuno- stimulantes. D'autre part, elles jouent un rôle important dans les propriétés texturants des produits (viscosité, formation d'un gel) (Gamar-Nourani *et al.*, 1998; Lin & Chang Chien, 2007; Patel *et al.*, 2010).

**II.2.5.2. Altérations liées à la production des polysaccharides :** Les EPSs des BL sont responsables de la formation des biofilms en surface des produits carnés conservés sous vide ou de produits de salaison (de Vuyst & Degeest, 1999; Pilet *et al.*, 1998; Laws *et al.*, 2001).

Dans le cidre, la bière et le vin, la synthèse d'EPS provoque une altération grave, ils augmentent excessivement la viscosité, ce qui les rend impropres à la commercialisation (Walling *et al.*, 2001).

## II.2.6. Aptitudes antagonistes des bactéries lactiques :

Les BL sont connues pour produire, lors de leur croissance, des substances inhibant la croissance d'autres microorganismes. Cette caractéristique est utilisée pour la destruction des bactéries pathogènes dans la fabrication des aliments, ainsi que pour la conservation. Ces influences antagonistes sont dues aux métabolites excrétés : acide lactique et autres acides organiques, diacétyle, peroxydes d'hydrogène et surtout antibiotiques et bactériocines (O'Sullivan *et al.*, 2002; Savadogo *et al.*, 2004; Herreros *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2009).

### II.2.6.1. Production des bactériocines :

Les bactériocines sont des peptides ou des complexes (généralement 30 à 60 AA) synthétisés au niveau du ribosome et qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique sur d'autres espèces unique souvent taxonomiquement proches (Cenatiempo *et al.*, 1996; Garneau *et al.*, 2002; Cholet, 2006; Savadogo *et al.*, 2006).

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leurs poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action. Toutes les bactériocines produites par les bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram +. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre les bactéries Gram - n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram - ne permettant pas aux

bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. Ils sont généralement thermorésistants (Labioui *et al.*, 2005; Pilet *et al.*, 2005; Dortu et Thonart, 2009).

### II.2.6.2. Production d'acides :

Les niveaux et les types d'acides organiques produits durant le processus de fermentation dépendent des espèces de BL, de la composition des milieux de culture et des conditions de croissance. L'effet antimicrobien des acides organiques est lié à la réduction du pH (Lindgren et Dobrogrosz, 1990; Ammor *et al.*, 2006).

L'acide lactique est l'acide organique le plus important produit par les BL. Il a des effets bénéfiques, surtout dans la conservation des aliments et la production d'arômes (Elmoualdi *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

Il existe des altérations liées à la production de l'acide lactique et d'autres acides organiques, dont une acidification trop marquée est nuisible à l'affinage de certains fromages et à la qualité du yaourt par exemple. L'acidification trop poussée, ou non contrôlée, est également à l'origine de l'altération des produits carnés conservés sous vide ou saumurés, avec le développement de gout et d'odeur acides (Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

### II.2.6.3. Production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

L'effet antimicrobien de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être dû à l'oxydation des groupes sulfhydryls causant la dénaturation d'un nombre d'enzymes ou à la peroxydation des lipides membranaires provoquant la perméabilité de la membrane (Ammor *et al.*, 2006).

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut s'accumuler dans certaines conditions et réagir avec les pigments de la viande pour former une porphyrine. Il s'ensuit un verdissement observé sur des produits tels que les saucisses et le jambon cuit conservés sous vide (Pilet *et al.*, 2005).

### II.2.6.4. Production de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et du diacétyle :

Le mécanisme de l'action antimicrobienne du CO<sub>2</sub> est mal connu. Cependant, le CO<sub>2</sub> joue un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe les décarboxylations enzymatiques et l'accumulation du CO<sub>2</sub> dans la double membrane lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité. Il peut inhiber la croissance de plusieurs microorganismes d'altération, et spécialement les bactéries psychrotrophes Gram – (Lindgren et Dobrogrosz, 1990; Hotctikiss, 1999; Ammor *et al.*, 2006).

L'effet du CO<sub>2</sub> sur l'altération peut être sensible dans le cas de viandes conservées sous vide où la production du CO<sub>2</sub> par ces bactéries provoque des défauts d'aspect (gonflement des conditionnements) (Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2005).

Le diacétyle est un composant aromatique, produit du métabolisme du citrate et capable d'inhiber des bactéries à Gram – (Ammor *et al.*, 2006; Suskovic *et al.*, 2010).

### II.2.7. Aptitude à résister aux bactériophages :

Les bactériophages ou virus bactériens, doués d'une spécificité plus ou moins large, peuvent s'attaquer aux BL, provoquer leur lyse et être responsables de défauts d'acidification au cours de la fermentation qui devient ainsi inefficace (Leveau *et al.*, 1991).

Les bactéries peuvent se défendre contre l'attaque des bactériophages notamment par leurs systèmes de restriction-modification. La présence de tels systèmes a été décrite dans les streptocoques lactiques par Lawrence et Collins qui ont imputé cette particularité intéressante en technologie à la présence d'un plasmide dans les cellules compétentes (Leveau *et al.*, 1991).

### II.3. Intérêt probiotique des bactéries lactiques :

La plupart des microorganismes probiotiques sont des BL. En 2001, un comité d'experts de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and agricultural organisation, FAO) et l'organisation mondiale de la santé OMS définissait les probiotiques comme des microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**Klaenhammer, 2000; Sandres, 2000; Beasley, 2004; Guarner et al., 2005; Gänzle et al., 2007**).

Cette dernière définition comprend les hôtes tant humaines qu'animales et ne se limite plus aux activités de la microflore colique, mais concerne aussi d'autres parties du corps et certains paramètres immunologiques (**Yao et al., 2009**).

Les souches de BL probiotiques proviennent des aliments et appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (**Ljungh et Wadström, 2006 ; Yao et al., 2009**).

Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion du lactose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention ou le raccourcissement de la durée de la diarrhée (notamment les diarrhées provoquées par *Clostridium difficile*), la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale, la prévention du cancer du colon et diminution de leur développement, réduction des niveaux du cholestérol, prévention des infections urogénitales et réduction des infections à *Helicobacter pylori* (**Schrezenmeir et de Vrese, 2001 ; Yao et al., 2009**).

Ces effets sur la santé peuvent s'expliquer par des mécanismes tels que certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de peroxyde d'hydrogène, acides organiques et peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire (**Petrova et al., 2009; Yao et al., 2009**).

Nombreux additifs nutritionnels avec des bactéries probiotiques pour les animaux sont utilisés pour réduire ou diminuer les pathogènes ou comme un moyen pour améliorer la croissance et la conversion des aliments (**Suskovic et al., 2010**).

# ***Matériel et Méthodes***

## II. Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, de l'Université de Jijel.

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Les souches bactériennes :

Pour réaliser notre travail, on a utilisé un soucier de bactéries lactiques locales isolées de différentes niches écologiques qui sont fournies de la part du Dr. Idoui T. Toutes les espèces ont été identifiées par les techniques de la microbiologie classique. Le tableau 03, regroupe les espèces utilisées au cours de cette étude.

**Tableau 03** : Souches utilisées et leurs origines.

Souche	Origine
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> L47	lapin
<i>Lactobacillus buchneri</i> G2	Gésier du poulet de chair
<i>Lactobacillus buchneri</i> G8	Gésier de poulet de chair
<i>Lactobacillus confusus</i> R26	Raïb traditionnel
<i>Lactobacillus curvatus</i> BJ432	Beurre traditionnel
<i>Lactobacillus curvatus</i> R2	Raïb traditionnel
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> G5	Gésier de poulet de chair
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> G8	Gésier de poulet de chair
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	Lait de vache
<i>Lactobacillus fermentum</i> G2	Gésier du poulet de chair
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Beurre traditionnel
<i>Lactobacillus helveticus</i> BJ431	Beurre traditionnel
<i>Lactobacillus plantarum</i> 07	Lait de vache
<i>Lactobacillus plantarum</i> B2	Beurre traditionnel
<i>Lactobacillus plantarum</i> BJ0021	Beurre traditionnel
<i>Lactobacillus plantarum</i> BJ434	Beurre traditionnel
<i>Lactobacillus plantarum</i> G1	Gésier de poulet de chair
<i>Lactobacillus plantarum</i> P117	Ensilage
<i>Lactobacillus plantarum</i> R2	Raïb traditionnel
<i>Lactobacillus veridescens</i>	humaine
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> B13	Beurre traditionnel
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	Lait de chamelle
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> L52	lapin
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 024	Lait de vache
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> B7	Beurre traditionnel
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	Lait de chamelle
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	Lait de chamelle
<i>Lactococcus raffinolatis</i>	Beurre traditionnel
<i>Pediococcus acidilacticii</i>	Souche commerciale
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> R15	Raïb traditionnel
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Beurre traditionnel

### II.1.2. Milieux de culture :

Pour réaliser notre travail, plusieurs milieux de culture préparés au niveau du laboratoire ont été utilisés, à savoir :

- Bouillon M17, pour la culture des lactocoques et des streptocoques ;
- Bouillon MRS (Man Rogosa Sharp), utilisé pour la culture des lactobacilles ;
- Gélose Agar au lait, pour révéler l'activité protéolytique ;
- Lait écrémé reconstitué à 9%, 12% : pour la culture des BL ;
- Milieu YMA (Yeast Milk Agar), pour le screening des souches protéolytiques ;
- Milieu A (Caséine 10g,  $\text{NaNO}_3$  3g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{KCl}$  0.5g,  $\text{FeSO}_4$  0.01g) : milieu de base pour enrichir la croissance des BL ;

Ainsi, on a utilisé la Gélose Nutritive (GN), pour la vérification de la pureté des souches utilisées.

### II.1.3. Produits chimiques et réactifs :

Les produits majoritairement utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- BSA (Sérum albumine bovin) ;
- Caséine ;
- Cations divalents :  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  ;
- Citrate de sodium 0.02 M ;
- Eau distillée ;
- EDTA ;
- HCl 2N ;
- Lysozyme 1% ;
- Méthanol ;
- NaCl 0.2 mol/l, pH 5.5 ;
- NaOH 0.2 mol/l ;
- NaOH 0.5 N ;
- Réactif de Bradford ;
- Réactif de Follin-Ciocalteu dilué à 50% ;
- Tampon acétate de sodium 88.5 nmol/l + NaCl 0.7 mol/l, pH 5.1 ;
- Tampon citrate de sodium 1% ;
- Tampon phosphate de sodium 0.066 mM pH 7 ;
- Tampon phosphate de sodium 50 mM pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 ;
- Tampon phosphate de sodium 50 mmol/l pH 7 ;
- Tampon phosphate de sodium pH 7, Tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 avec  $\text{CaCl}_2$  20 mM ;
- TCA 5%, 12% ;
- Trypsine ;
- Tyrosine ;
- VP I (solution alcoolique d' $\alpha$ -naphthol) et VP II (solution aqueuse de soude 16%) ;
- Acide oléique ;
- Présure.

### I.1.4. Appareillage et autres :

Il s'agit de différents outils et appareils du laboratoire qui ont été utilisés :

- Agitateur magnétique (BUNSEN) ;
- Appareil CPG (SHIMADZU) ;
- Appareil HPLC (SHIMADZU) ;
- Autoclave (SHIA VX ELECTRONIC) ;
- Bain marie (GERHARDT BONN) ;
- Balance (DENVER) ;
- Balance analytique (KERN ALS 220.4N) ;
- Bec bunsen ;
- Centrifugeuse (HETTICH) ;
- Etuve (MEMMERT) ;
- Four Pasteur (CONTROLS) ;
- pH mètre (HANNA) ;
- Réfrigérateur (CONDOR) ;
- Spectrophotomètre (SHIMADZU UV MINI 1240) ;
- Vortex électronique (MS2 MINISHAKER).
- Billes au verre.

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Vérification de la pureté des souches :**

L'ensemble des souches a été revivifié par ensemencement du bouillon MRS par les lactobacilles et M17 par les lactocoques et les streptocoques (V/9V) suivi d'une incubation à 37°C pendant 18h. A partir de ces cultures, la gélose nutritive a été ensemencée puis incubée à 37°C pendant 18-24h. La pureté de chaque souche a été vérifiée par un examen macroscopique de l'aspect des colonies (Moulay *et al.*, 2006).

### **II.2.2. Mise en évidence du caractère protéolytique**

#### **II.2.2.1. Screening primaire :**

Pour mettre en évidence le caractère protéolytique des BL, la méthode décrite par **Larpent et Larpent-Gourgand (1997)** a été appliquée.

En effet, des disques de papier Wattman N° 3 ont été déposés à la surface de la gélose YMA déjà coulée et solidifiée (5 disques par boîte), puis chaque disque a été imbibé de 25 µl de chaque souche de culture jeune (âgée de 18h). L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 à 48h.

L'activité protéolytique est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de chaque disque.

#### **II.2.2.2. Caractère protéolytique sur Agar au lait :**

Le screening primaire, a permis de sélectionner les souches à activité protéolytique selon la technique mise en œuvre. L'activité protéolytique des exoprotéases et des endoprotéases a été testée par modification de la méthode décrite par **Thivierge (1999)**, c'est la méthode des puits sur milieu Agar-lait.

Après avoir couler et solidifier le milieu agar-lait, des puits ont été confectionnés, le fond de chaque puit a été soudé par le même milieu. Après solidification complète, chaque puit reçoit 25 µl du surnageant. Le caractère protéolytique est estimé par mesure des halos clairs autour de chaque puit après une incubation à 37°C/ 24h.

### a. Mesure de l'activité des Exoprotéases :

L'extrait enzymatique a été préparé par modification de la méthode de **Roudj et al. (2009)**, des cultures bactériennes (cultures âgées de 18h) ont été centrifugées à 9600g/6min et les surnageants sont récupérés puis soumis à différentes conditions :

- A la température ambiante pendant 30min ;
- A la chaleur 65°C/10 min ;
- A froid jusqu'à la congélation.

Une fois que les surnageants traités sont prêts, on applique la même technique décrite en II.2.2.2 sur le milieu Agar-lait. Une activité positive est décelée par l'apparition d'un halo clair autour du puit après une incubation à 37°C/24h.

### b. Mesure de l'activité des endoprotéases :

L'extrait enzymatique a été préparé par modification de la méthode de **Desmazeaud et Vassal (1979)** : après centrifugation des cultures à 9600g/6min, les culots sont lavés deux fois, le premier lavage avec du tampon phosphate de sodium pH 7, et le deuxième avec le même tampon en ajoutant des billes au verre. Le surnageant ainsi récupéré a été traité puis testé, en appliquant la même technique décrite avec la mesure de l'activité des exoprotéases.

L'activité protéinasique est déterminée en mesurant le diamètre de l'auréole d'hydrolyse obtenue.

En parallèle, la trypsine a été utilisée comme témoin positif à des concentrations de 0.00005 g/ml, 0.0001 g/ml, 0.0002 g/ml, 0.0005 g/ml, 0.001g/ml, 0.003 g/ml, 0.006 g/ml, 0.012 g/ml, 0.025 g/ml, 0.05 g/ml, 0.1 g/ml, 0.2 g/ml.

L'activité protéinasique est exprimée en unité trypsique/ml.

### II.2.2.3. Test de l'activité protéolytique sur lait :

Ce test est qualitatif dans la mesure où on recherche les produits de la dégradation des protéines du lait. Le principe de la technique utilisée est celui décrit par **Leveau et Bouix (1993)** : Du lait écrémé stérile reconstitué à 9% a étéensemencé par la culture jeune (V/9V) puis incubé à 37°C.

Après 7 jours d'incubation, chaque tube reçoit les réactifs de Vogues-Proskauer (VP I et VP II). L'apparition d'un anneau rouge témoigne de la dégradation des protéines du lait, donc une activité protéolytique positive. De même, une observation macroscopique de la clarification du milieu témoigne également d'une protéolyse.

### II.2.2.4. Test de l'activité coagulante des exoprotéases sur lait:

L'activité coagulante est déterminée par modification de la méthode de **Vassal et Gripon (1984)** ; des cultures bactériennes (cultures âgées de 18h) de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii* ont été centrifugées à 6000g/10min et les surnageants ont été récupérés et considérés comme des extraits enzymatiques. Par la suite, 5 ml du lait écrémé reconstitué à 9% a été inoculé par 1 ml du surnageant pour chaque souche, parallèlement à ce test, la présure a été utilisée comme témoin positif. Ce test a été réalisé à la température ambiante.

L'activité coagulante des exoprotéases est mesurée par calcul du temps nécessaire pour coaguler le lait comparativement à la présure.

### II.2.3. Screening secondaire

#### II.2.3.1. Détermination de la concentration des protéines totales :

Les cultures sur bouillon MRS ou M17, ont été centrifugées à 6000g/10min. Pour les exoprotéases, le surnageant est considéré comme extrait enzymatique (Roudj *et al.*, 2009). Cependant pour les protéases liées à la paroi et après centrifugation, le culot a été récupéré puis lavé avec le tampon citrate de sodium 1%, le surnageant récolté est considéré comme extrait enzymatique. Par ailleurs et pour les protéases intracellulaires, le culot bactérien a été lavé deux fois, le 1<sup>er</sup> lavage avec le tampon citrate de sodium (1%) avec 1% lysozyme, le 2<sup>ème</sup> lavage a été effectué avec le même tampon sans lysozyme. Le surnageant obtenu sert également d'extrait enzymatique.

La concentration en protéines totales a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976) : 5 ml de réactif de Bradford a été ajouté à 0.5 ml du surnageant, le mélange a été bien agité à l'aide d'un vortex. Après incubation au bain marie pendant 30 min à 37°C, l'absorbance a été mesurée à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée en mg/ml à l'aide d'une courbe étalon de la BSA.

#### II.2.3.2. Détermination de l'activité protéasique :

Les mêmes extraits préparés en II.2.3.1 ont été utilisés pour déterminer l'activité protéasique des exoprotéases, endoprotéases et protéases liées à la paroi.

L'activité protéasique a été déterminée par modification de la méthode de Sutar *et al.* (1986) : 0.4 ml caséine (2.5% dans le citrate de sodium 0.02 M) a été ajouté à 1.5 ml de tampon citrate de sodium 1%, puis 0.3 ml d'extrait a été ajouté. Après incubation au bain marie pendant 30 min à 37°C, la réaction a été stoppée par addition de 2.6 ml de TCA (5%). Ensuite, 0.4 ml HCl (2 N) a été ajouté.

Après congélation, une centrifugation à 6000g/10 min a été faite et l'absorbance des surnageants a été mesurée à 280 nm. L'activité protéasique est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de tyrosine en U/ml/30min qui correspond à l'activité en mg/ml/30min.

#### II.2.3.3. Détermination de l'activité spécifique :

L'activité spécifique est mesurée par le nombre d'unité d'activité protéasique par mg des protéines contenues dans un ml d'extrait selon la formule suivante (Desmazeaud et Vassal, 1979) :

$$\text{Activité spécifique (U/mg)} = \text{Activité protéasique (U/ml)} / \text{Protéines totales (mg/ml)}$$

Les souches qui ont une grande activité spécifique intracellulaire ont été sélectionnées pour le reste de cette étude.

## II.2.4. Caractérisation de l'activité protéolytique

### II.2.4.1. Mesure de la croissance bactérienne :

Les résultats du screening secondaire ont permis de sélectionner les souches les plus performantes. Afin d'entamer cette deuxième partie expérimentale, la croissance de chaque souche a été mesurée selon la technique décrite par **Vasala et al. (2005)** : Les bouillons MRS ou M17 ont été ensemencés par les souches à tester, puis incubés à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 600 nm chaque deux heures.

### II.2.4.2. Préparation des extraits enzymatiques :

A partir des cultures jeunes (18 h à 37°C) sur bouillon MRS ou M17, le milieu A a été ensemencé par les souches à tester (2V/9V), puis une centrifugation a été faite à 6000 g/10 min et le culot de chaque culture a été récupéré et lavé deux fois, le 1<sup>er</sup> avec le tampon phosphate de sodium 50 mM contenant 20 mM CaCl<sub>2</sub> et le deuxième avec le même tampon mais sans Ca Cl<sub>2</sub>. Après incubation pendant 4 h à 37°C, une centrifugation à froid a été appliquée (6000/10min). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique (**Tsakalidou et al., 1999**).

### II.2.4.3. Utilisation de la caséine :

L'utilisation de la caséine a été mesurée par une modification de la méthode de **Desmazeaud et Juge (1976)** : à 1 ml d'extrait enzymatique, 11.5 ml de caséine a été ajouté (2 g de caséine pour 100 ml de tampon phosphate de Na 0.066 M, pH 7). Après chaque heure d'incubation à 37°C, la réaction a été stoppée par addition de 2 ml de TCA à 12% à 2 ml du mélange réactionnel. Après centrifugation (6000 g/5min), 1.5 ml de soude (NaOH 0.5 N) a été ajouté à 1.5 ml du surnageant. La variation de l'absorbance a été mesurée à 440 nm.

### II.2.4.4. Activité protéinasique :

100 µl d'extrait enzymatique a été incubée avec 100 µl d'une solution de caséine (4 mg/ml) et 200 µl de tampon phosphate de Na (50 mM, pH7) pendant 1h à 37°C, la réaction a été stoppée par addition de 400 µl de TCA à 12%.

Après 10 min d'incubation à 25°C, ce mélange a été centrifugé (6000 g/15min), ensuite, le surnageant a été récupéré pour un dosage par la méthode de Follin-Ciocalteu.

2.5 ml de NaOH 0.2 mol/l a été ajouté à 0.5 ml du surnageant, puis, 0.25 ml de réactif de Follin-Ciocalteu dilué à 50% a été additionné. Après agitation et incubation pendant 30min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 660 nm en utilisant la tyrosine pour établir la courbe étalon. Une unité protéinasique est définie comme la quantité d'enzyme donnant une augmentation de la DO de 0.1 (**Marathe et Ghosh, 2009**).

### II.2.4.5. Effet de pH sur l'activité protéinasique :

L'activité protéinasique a été mesurée par la même technique décrite en II.2.4.4 mais avec les tampons phosphate de Na (50 mM) pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8 (**Kabadjova-Hristova et al., 2006**).

#### II.2.4.6. Effet de température sur l'activité protéinasique :

Une fois avoir le pH optimal de l'activité, l'activité protéinasique de l'extrait enzymatique de chaque souche a été déterminée par la même technique décrite en II.2.4.4 mais à différents intervalles de températures d'incubation : 10, 20, 30, 37, 42 et 50°C (**Kabadjova-Hristova et al., 2006**).

#### II.2.4.7. Effet des cations divalents sur l'activité protéinasique :

Cette activité a été déterminée dans les conditions optimales de pH et de température par la même technique décrite en II.2.4.4 en ajoutant séparément les éléments Cu<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> et Zn<sup>++</sup> (1 ml) à une concentration de 1 mM après l'ajout du tampon phosphate de Na (50 mM). (**Marathe et Ghosh, 2009**).

#### II.2.4.8. Effet de l'inhibiteur EDTA sur l'activité protéinasique :

La technique utilisée est celle décrite par **Kabadjova-Hristova et al. (2006)**. Cette activité a été déterminée dans les conditions optimales de pH et de température par la même technique décrite en II.2.4.4 en ajoutant l'EDTA (1 ml) à une concentration de 10 mM après l'ajout du tampon phosphate de Na (50 mM).

#### II.2.4.9. Analyse par HPLC :

La technique décrite par **Marathe et Ghosh (2009)** a été appliquée : 0.5 ml d'extrait enzymatique a été ajouté à 0.5 ml de caséine (0.5 mg/ml) et 1 ml de tampon phosphate de Na (50 mM) de pH optimal pour l'activité de chaque extrait enzymatique, puis, le mélange est incubée à la température optimale d'activité pendant 4 h et 24 h. La réaction a été stoppée par addition de TCA à 12 % (1 ml).

Après un repos de 10min à 25°C, une centrifugation a été réalisée à 8000g/10 min, le surnageant a été utilisé pour l'analyse par HPLC selon les conditions suivantes :

- phase mobile : méthanol ;
- Colonne : C18 ;
- T° : 40°C ;
- Débit : 9.99 à 1 ml/min ;
- Temps : 40 min.

Il est a noté que des étalons d'acides aminés ont été utilisés, à savoir : la tyrosine, la D-L phényl alanine, la leucine et la glycine.

#### II.2.4.10. Analyse par CPG :

Les mêmes échantillons de 24h utilisés pour l'HPLC ont été analysés par CPG selon les conditions suivantes :

- Volume injecté : 0.1µl ;
- Gaz vecteur : Helium (1ml/min) ;
- Colonne : SE 30 ;
- T° : 75°C à 200°C/ [80°C/min] ;
- T° finale maintenue/ 10min ;

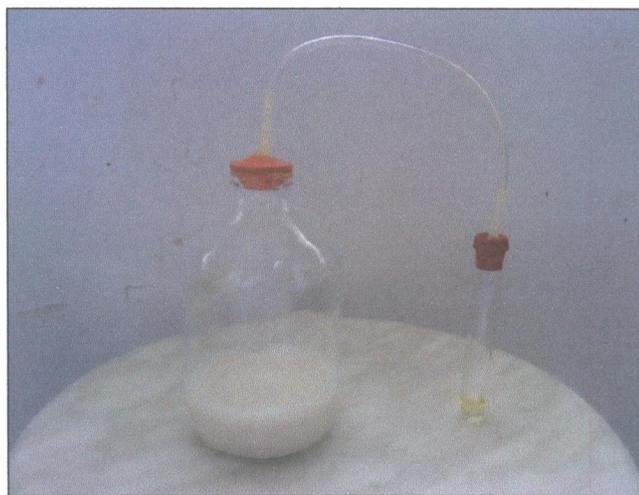
- Injecteur et détecteur : 250°C ;
- Solvant : méthanol.

### II.2.5. Pouvoir aromatisant et recherche des produits de la dégradation des acides aminés :

Le pouvoir aromatisant des souches étudiées et la recherche des produits de la dégradation des acides aminés ont été estimés par modification de la méthode de **Degorce-Dumas *et al.* (1986)** : Un flacon contenant 100 ml de lait écrémé reconstitué à 12% a été inoculé avec 10 ml de culture jeune de chaque souche. Ce dernier a été relié à un tube contenant 1 ml de l'acide oléique (photo 01).

Après 14 jours d'incubation à 37°C, la méthode dite de Head-Space a été appliquée: Le lait coagulé a été placé au bain marie réglé à 60°C pendant 30min, le gaz surmontant le flacon passe vers le tube contenant du gras qui va servir d'échantillon à analyser. Le contenu du tube a été dilué dans le méthanol puis injecté directement à l'appareil de CPG selon les conditions suivantes :

- Volume injecté : 0.1µl ;
- Gaz vecteur : Helium (1ml/min) ;
- Colonne : SE 30 ;
- T° : 60°C à 250°C ;
- Solvant : méthanol.



**Photo 01** : Dispositif pour la récupération des métabolites volatils et des produits de la dégradation des acides aminés.

### II.2.6. Activité autolytique :

L'autolyse a été évaluée dans un mélange de trois tampons (acétate de Na 88.5 nmol/l + NaCl 0.7 mol/l, pH 5.1 ; NaCl 0.2 mol/l, pH 5.5 et phosphate de Na 50 mM/l, pH 7) par modification de la méthode de **Piraino et al. (2008)**.

Les cultures jeunes ont été centrifugées à froid à 12600g/5min, les culots ont été ainsi récupérés et lavés deux fois dans du NaCl stérile 0.85% (4°C). Le tampon d'autolyse a été ajouté au surnageant obtenu et le mélange a été incubé à 40°C. L'absorbance a été mesurée à 650 nm au début d'incubation ( $A_0$ ), après 30min ( $A_{30}$ ) et après 180min ( $A_{180}$ ). Les résultats sont exprimés par la mesure du taux d'autolyse après 30min et après 180min.

L'autolyse est exprimée en pourcentage d'autolyse des cellules, qui est défini comme suit :

$(A_0 - A_t) \times 100/A_0$  où  $A_0$  = l'absorbance initiale et  $A_t$  = l'absorbance mesurée après t heures d'incubation.

## ***Résultats et Discussion***

### III. Résultats et Discussion

#### III.1. Vérification de la pureté des souches :

Sur gélose nutritive, les colonies obtenues sont examinées à l'œil nu, ce sont des colonies de petite taille, de couleur blanchâtre, de surface lisse, plus au moins bombées, les colonies de chaque boîte ont la même taille, même couleur et même aspect, témoignant de la pureté des souches.

#### III.2. Mise en évidence du caractère protéolytique

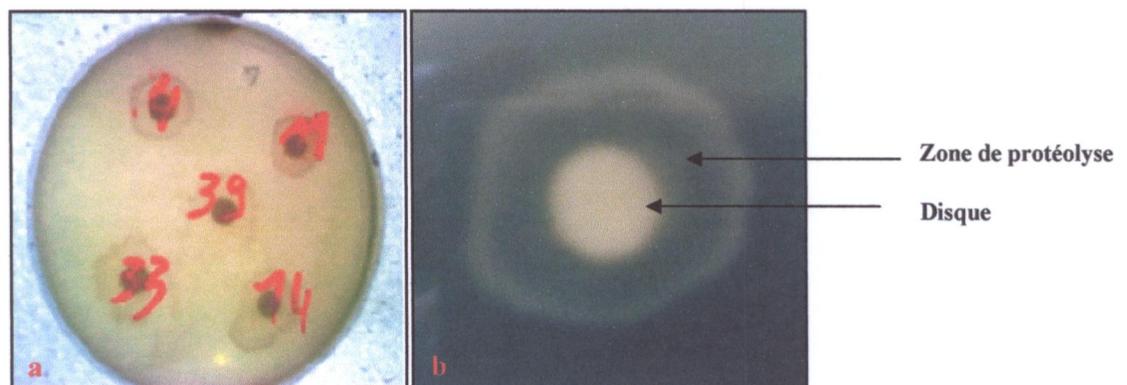
##### III.2.1. Screening primaire :

Sur le milieu YMA, les souches testées pour leur pouvoir protéolytique ont montré une croissance avec ou sans protéolyse, ce qui témoigne que ce milieu répond aux exigences des bactéries.

En effet, les souches protéolytiques ont montré des zones de protéolyse, sous forme d'halos clairs autour des disques (photo 02). La photo 02<sup>b</sup>, a montré clairement l'aptitude de la souche *Lb. plantarum* P117 à dégrader la seule source de protéine de ce milieu, avec une zone de protéolyse claire.

Les résultats illustrés par les chiffres du tableau 04, montrent que les zones de protéolyse oscillent entre 10 mm à 14 mm, ce qui prouve que toutes ces souches mises au test disposent d'un complexe d'enzymes protéolytiques.

D'après ces résultats, on a constaté que *Lc. raffinolactis* présente une forte activité protéolytique avec un diamètre de 1.4 cm, alors que la plus faible activité est notée avec *Lc. lactis* ssp. *lactis* CHT5 ayant donnée une zone de protéolyse de 1 cm.



**Photo 02:** Zones de protéolyse sur milieu YMA.

(a) : Protéolyse de cinq souches (4) *Lb. plantarum* P117 (11) *Lb. plantarum* BJ0021 (14) *Lb. helveticus* BJ431 (33) *Lc. raffinolactis* (39) *St. thermophilus* ; (b) : protéolyse de la souche *Lb. plantarum* P117.

**Tableau 04 :** Pouvoir protéolytique des souches testées sur milieu YMA.

Souche	Diamètre de la zone d'hydrolyse (cm)
<i>Lb. buchneri</i> G8	1.1
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	1.1
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	1.1

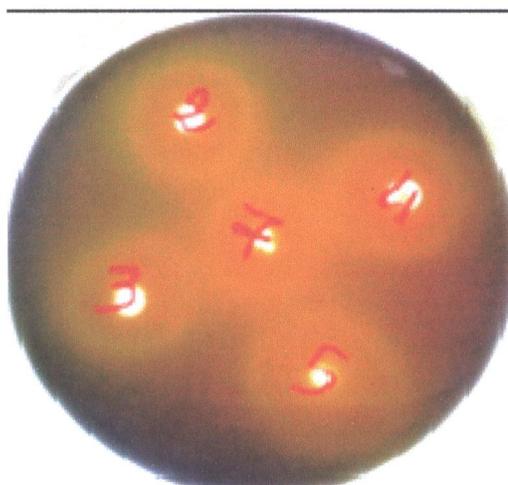
Souche	Diamètre de la zone d'hydrolyse (cm)
<i>Lb. helveticus</i>	1.1
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	1.2
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	1.2
<i>Lb. plantarum</i> P117	1.2
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	1.1
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	1.1
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	1.0
<i>Lc. raffinolactis</i>	1.4
<i>Pc. acidilacticii</i>	1.1
<i>St. thermophilus</i>	1.2

Ces résultats sont proches de ceux trouvés par **Moulay et al. (2008)**, qui ont montré dans une étude sur les bactéries lactiques isolées du lait de chèvre algérien, que le diamètre des zones de protéolyse était supérieur à 1 cm. En revanche, nos résultats se trouvent aussi bons que ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, ayant rapporté que la zone de protéolyse de bactéries lactiques isolées du beurre traditionnel était entre 5 et 6 mm de diamètre.

Par ailleurs, nos résultats sont contradictoires avec ceux trouvés dans une étude menée par **Idoui et al. (2009)** sur les bactéries lactiques des olives de tables qui n'ont donné aucune zone de protéolyse sur le même milieu YMA. Les mêmes auteurs ayant rapporté en **2009** que les espèces de bactéries lactiques isolées du beurre de brebis avaient une aptitude protéolytique sur le même milieu (zone de protéolyse entre 5 mm à 6.6 mm).

### III.2.2. Caractère protéolytique sur agar au lait :

Les extraits enzymatiques qu'on a soumis aux différents traitements à savoir chaleur et froid comparé aux conditions normales (température ambiante), ont montré une activité protéolytique reflétée par des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose au lait (photo 03), donc ces extraits ont la capacité d'hydrolyser les caséines du lait. Les résultats de ce test sont portés sur le tableau 05 et le tableau 06 pour les exoprotéases et les endoprotéases respectivement.



**Photo 03:** Zones de protéolyse sur milieu Agar au lait

(2) : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* 45 (3) *Lc. lactis* ssp. *lactis* CHT25 (4) *Lb. plantarum* P117 (5) *Pc. acidilacticii*  
(7) *Lb. curvatus* BI432

Pour les exoprotéases, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 05. D'après ces résultats, il apparaît que l'activité protéinasique des extraits enzymatiques soumis au traitement thermique et au froid est remarquablement faible par rapport à cette activité dans les conditions normales.

Dans les conditions normales, l'activité protéinasique est sensiblement plus importante pour *Lb. helveticus* BJ431 (entre 0.012 et 0.025 U trypsique) que pour *Lb. plantarum* P117. Cependant, *Lb. helveticus* montre la plus faible activité, entre 0.0005 et 0.001 U trypsique.

En effet, l'activité protéinasique des extraits enzymatiques soumis au traitement thermique est importante chez *Lb. curvatus* BJ432 (0.001 U trypsique) que chez *Lb. helveticus* BJ431 et *Lb. plantarum* BJ0021 alors que cette activité est très faible chez *St. thermophilus*, elle se situe entre 0.00002 et 0.00005 U trypsique.

En ce qui concerne l'activité protéinasique des extraits traités au froid, elle varie de 0.006 U trypsique pour *Pc. acidilacticii* et entre 0.00002 et 0.00005 U trypsique pour *Lb. helveticus* BJ431.

Il apparaît clairement que les deux traitements physiques affectent notablement l'activité protéinasique des exoprotéases des différentes espèces de bactéries lactiques. Cela dit, la chaleur aurait un effet dénaturant aussi bien que le froid.

**Tableau 05 :** Détermination de l'activité protéinasique des exoprotéases par la méthode de l'agar au lait.

Souche	Activité protéinasique U trypsique (g/ml)		
	Natif	Chaleur	Froid
<i>Lb. buchneri</i> G8	0.006	0.0005	0.0005
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	0.006	0.001	0.00005
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	0.006 à 0.012	0.0002	0.001 à 0.003
<i>Lb. helveticus</i>	0.0005 à 0.001	0.0001 à 0.0002	0.0002
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	0.012 à 0.025	0.001	0.00002 à 0.00005
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	0.003 à 0.006	0.001	0.0002
<i>Lb. plantarum</i> P117	0.012 à 0.025	0.0005	0.001
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	0.003	0.0002	0.0001 à 0.0002
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	0.006 à 0.012	0.0002	0.0002
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	0.006	0.0002	0.0002 à 0.0005
<i>Lc. raffinolactis</i>	0.006 à 0.012	0.0005 à 0.001	0.0002
<i>Pc. acidilacticii</i>	0.012	0.0001	0.006
<i>St. thermophilus</i>	0.01 à 0.003	0.00002 à 0.00005	0.002

Pour les endoprotéases, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 06. D'après ces résultats, il apparaît que l'activité protéinasique des extraits enzymatiques soumis au traitement thermique et au froid est remarquablement faible par rapport à cette activité dans les conditions normales.

Dans les conditions normales, l'activité protéinasique est sensiblement plus importante pour l'extrait de *Lb. buchneri* G8 supérieure à 0.2 U trypsique que pour ceux de *Lb. helveticus*

BJ431, *Lb. plantarum* BJ0021, *Lc. raffinolactis* et *Pc. acidilacticii* qui présentaient des activités respectives de 0.012, >0.2, >0.2 et >0.2 U trypsique. Cependant, l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432 montre la plus faible activité, elle se situe entre 0.0003 et 0.0006 U trypsique.

D'après les résultats du même tableau, l'activité protéinasique des extraits enzymatiques soumis au traitement thermique est importante chez *Lb. buchneri* G8 (0.025 U trypsique) alors que cette activité est très faible chez *Lb. helveticus* (entre 0.0001 et 0.0002 U trypsique) que chez l'extrait de *Lc. lactis ssp. lactis* CHT5.

En ce qui concerne l'activité protéinasique des extraits traités au froid, elle varie au voisinage de 0.2 U trypsique pour les extraits de *Lb. buchneri* G8, *Lb. helveticus* BJ431, *Lb. plantarum* BJ0021, *Lc. raffinolactis* et *Pc. acidilacticii* et entre 0.0005 et 0.001U trypsique pour l'extrait de *St. thermophilus*.

**Tableau 06** : Détermination de l'activité protéinasique des endoprotéases par la méthode de l'agar au lait.

Souche	Activité protéinasique U trypsique (g/ml)		
	Natif	Chaleur	Froid
<i>Lb. buchneri</i> G8	> 0.2	0.025	0.2
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	0.0003 à 0.0006	0.001 à 0.003	0.003 à 0.006
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> 45	0.2	0.0002	0.003
<i>Lb. helveticus</i>	0.012	0.0001 à 0.0002	0.003 à 0.006
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	> 0.2	0.003	0.2
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	> 0.2	0.012	0.2
<i>Lb. plantarum</i> P117	0.2	0.006 à 0.012	0.025
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> CHT24	0.2	0.0002	0.05
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CHT25	0.1	0.0002	0.001 à 0.003
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CHT5	0.05 à 0.1	0.0001 à 0.0002	0.025
<i>Lc. raffinolactis</i>	> 0.2	0.012	0.2
<i>Pc. acidilacticii</i>	> 0.2	0.001 à 0.003	0.2
<i>St. thermophilus</i>	0.05 à 0.1	0.006 à 0.012	0.0005 à 0.001

D'après ces résultats, il est remarquable que, contrairement aux résultats trouvés avec l'activité des exoprotéases, le froid et la chaleur n'ont pas d'effet considérable sur l'activité protéinasique des endoprotéases.

Par comparaison de nos résultats à ceux trouvés par **Thivierge (1999)** ayant utilisé la même technique avec des souches de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* dans les conditions normales (0 à 0.00131 g/ml Unité trypsique), on constate que nos souches sont plus performantes avec une activité qui peut aller jusqu'à 0.025 g/ml Unité trypsique avec les exoprotéases et plus de 0.2 g/ml Unité trypsique avec les endoprotéases.

Par ailleurs, **Roudj et al. (2009)** ont évalué l'activité protéolytique des exoprotéases sur le milieu Agar-lait (1%) contenant 0.02 %  $\text{NaN}_3$  par la mesure du carré de diamètre exprimé en  $\text{mm}^2$  et ils ont trouvé que *Lb. brevis* CHTD27 et *Lb. plantarum* BH14 montraient des clarifications de 289  $\text{mm}^2$  et 324  $\text{mm}^2$  respectivement, tandis que nos résultats obtenus avec les exoprotéases dans les

conditions normales montrent des clarifications entre 169 mm<sup>2</sup> avec l'extrait de *Lb. helveticus* et 441 mm<sup>2</sup> avec celui de *Lb. plantarum* P117.

### III.2.3. Test de l'activité protéolytique sur lait :

La lecture des résultats de ce test, a montré qu'après l'ajout des réactif de Vogues Proskauer (VPI et VPII), aucun signe de produits de dégradation métabolique des protéines n'a été observé (apparition de l'anneau rouge), en revanche, une dégradation totale ou partielle des caséines du lait traduite par une clarification du milieu, témoigne d'un pouvoir de protéolyse assez important des souches mises au test. Cette lecture, nous pousse à croire que les réactifs étaient périmés.

A travers cette lecture, on constate que la meilleure performance protéolytique sur lait est celle de la souche *Pc. acidilacticii* qui donne une dégradation totale des protéines (photo 04), le reste des souches montrent une dégradation partielle (Photo 05).



**Photo 04** : dégradation totale de la caséine par *Pc. acidilacticii*.

**Photo 05** : dégradation partielle de la caséine par *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CHT24.

D'après **Leveau et Bouix (1993)**, les protéines d'un lait reconstitué étaient bien hydrolysées lorsque la concentration bactérienne devenait importante. Ainsi, la croissance de plusieurs souches de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* dans le lait apparait limitée par la faible vitesse de la protéolyse des caséines du lait.

### III.2.4. Test de l'activité coagulante des exoprotéases sur lait:

La lecture des résultats de ce test, a montré que les extraits enzymatiques sont dotés d'une activité coagulante du lait (photo 06).

Après comparaison des temps de coagulation des extraits et celui de la présure (tableau 07), on a constaté que l'extrait de *Pc. acidilacticii* arrive à coaguler le lait au bout de 5 min et 33 secondes, timing peu proche de celui de la présure (2 min et 50 secondes).

Cependant, la coagulation du lait par les extraits de *St. thermophilus*, *Lc. raffinolactis*, *Lb. buchneri* G8 n'est obtenue qu'après 15 min, 31 min 50 secondes et 2 heures 43 min, respectivement. Tandis que *Lb. curvatus* BJ432 n'arrive à coaguler le lait qu'après 2 jours.

Cette activité montre que les enzymes contenues dans les extraits ont la faculté de déstabiliser la caséine par coupure des ponts phényl- alanine-méthionine.



**Photo 06 :** Test du pouvoir coagulant sur lait de : (7) *Lb. curvatus* BJ432, (32) *Lb. buchneri* G8, (36) *Lc. raffinolactis* (39), *St. thermophilus* et (30) *Pc. acidilacticii*.

**Tableau 07 :** Temps de coagulation des extraits enzymatiques de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactisii*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Extrait enzymatique	présure	<i>Lb. curvatus</i> BJ432	<i>Pc. acidilacticii</i>	<i>Lb. buchneri</i> G8	<i>Lc. raffinolactis</i>	<i>St. thermophilus</i>
Temps de coagulation	2 min 50 secondes	Après 2 jours	5 min 33 secondes	2 heures 43 secondes	31 min 50 secondes	15 min

Selon Thivierge (1999), la présure contient deux enzymes, la chymosine et la pepsine, mais la chymosine est la principale protéinase présente dans la présure pour la fabrication des fromages, elle a un rôle au niveau de la protéolyse primaire (hydrolyse de la caséine).

Selon Nouani *et al.* (2009), parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulants le lait à partir de cultures microbiennes a suscité un intérêt pour la fromagerie, où plusieurs souches de microorganismes ont fait l'objet de productions industrielles de leurs protéases coagulantes.

### III.2.5. Screening secondaire

#### III.2.5.1. Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases :

Les résultats trouvés sont résumés dans le tableau 08. D'après ces résultats, il apparaît que la concentration en protéines totales ainsi que l'activité protéasique diffère d'une souche à une autre. En effet, la concentration en protéines totales varie de 0.165 mg/ml pour *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CHT24 et de 0.239 mg/ml pour *Lb. helveticus* BJ431 tandis que l'activité protéasique était de 0.260 U/ml et 0.570 U/ml pour *Lb. plantarum* BJ0021 et *Lb. plantarum* P117 respectivement.

Par conséquent, l'activité spécifique était plus élevée chez *Lb. plantarum* P117 ayant enregistré une valeur de 3.202 U/mg, cette valeur se trouve supérieure à celle trouvée chez la souche de même espèce codée BJ0021 (1.421 U/mg).

**Tableau 08** : Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases.

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
<i>Lb. buchneri</i> G8	0.223	0.324	1.453
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	0.178	0.534	3.000
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	0.185	0.292	1.578
<i>Lb. helveticus</i>	0.213	0.294	1.380
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	0.239	0.320	1.339
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	0.183	0.260	1.421
<i>Lb. plantarum</i> P117	0.178	0.570	3.202
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	0.165	0.493	2.988
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	0.189	0.269	1.423
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	0.185	0.542	2.930
<i>Lc. raffinolactis</i>	0.211	0.328	1.555
<i>Pc. acidilacticii</i>	0.185	0.547	2.957
<i>St. thermophilus</i>	0.170	0.354	2.082

#### III.2.5.2. Détermination de l'activité spécifique des protéases liées à la paroi:

Les résultats sont résumés dans le tableau 09. D'après ces résultats, il apparaît que la concentration en protéines totales ainsi que l'activité protéasique diffère d'une souche à une autre. En effet, la concentration en protéines totales varie de 0.153 mg/ml dans l'extrait de *Pc. acidilacticii* et de 0.244 mg/ml dans celui de *Lb. buchneri* G8 alors que l'activité protéasique varie de 0.261 U/ml (*Lb. helveticus*) et de 0.439 (*Pc. acidilacticii*).

De ces résultats, il en ressort également que cette collection peut être partagée en deux groupes, celui ayant une activité spécifique supérieure à 2 U/ml, et l'autre à activité spécifique inférieure à 2 U/ml. Cependant et contrairement aux différences observées entre les chiffres de l'activité spécifique des exoprotéases des souches de même espèce (*Lb. plantarum*), aucune différence n'a été décelée à l'encontre de l'activité spécifique des endoprotéases de ces souches.

Enfin, il se trouve que la meilleure activité spécifique est celle de l'extrait de l'espèce *Pc. acidilacticii* (2.869U/mg) et que la plus faible a été enregistrée avec celui de *Lb. helveticus* (1.311 U/mg).

**Tableau 09** : Détermination de l'activité spécifique des protéases liées à la paroi.

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
<i>Lb. buchneri</i> G8	0.244	0.349	1.430
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	0.195	0.361	1.851
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	0.191	0.295	2.545
<i>Lb. helveticus</i>	0.199	0.261	1.311
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	0.175	0.357	2.040
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	0.179	0.313	1.749
<i>Lb. plantarum</i> P117	0.179	0.309	1.726
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	0.166	0.383	2.307
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	0.156	0.355	2.276
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	0.189	0.290	1.534
<i>Lc. raffinolactis</i>	0.190	0.399	2.100
<i>Pc. acidilacticii</i>	0.153	0.439	2.869
<i>St. thermophilus</i>	0.189	0.363	1.921

### III.2.5.3. Détermination de l'activité spécifique des protéases intracellulaires :

Le tableau 10 résume les résultats obtenus. D'après ces résultats, il apparaît que la concentration en protéines totales ainsi que l'activité protéasique diffère également d'un extrait d'une souche à un autre. En effet, la concentration en protéines totales varie de 0.140 mg/ml de l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432 à 0.191 mg/ml de l'extrait de *Lb. helveticus* BJ431 alors que l'activité protéasique varie de 0.325 U/ml de l'extrait de *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* 45 à 0.441 U/ml de l'extrait de *Lc. raffinolactis*.

L'activité spécifique est plus élevée chez *St. thermophilus* dont la valeur obtenue était de 2.700 U/mg en revanche la plus faible a été enregistrée avec l'extrait de *Lb. helveticus* (1.831 U/mg). Par comparaison aux résultats des tableaux 8 et 9, il en ressort que la meilleure activité du complexe protéasique est celui des enzymes intracellulaires.

**Tableau 10** : Détermination de l'activité spécifique des protéases intra cellulaires.

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
<i>Lb. buchneri</i> G8	0.169	0.426	2.521
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	0.140	0.355	2.536
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	0.152	0.325	2.138
<i>Lb. helveticus</i>	0.190	0.348	1.831
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	0.191	0.429	2.246
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	0.152	0.327	2.151
<i>Lb. plantarum</i> P117	0.164	0.363	2.213
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	0.170	0.352	2.070

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	0.168	0.360	2.143
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	0.166	0.362	2.181
<i>Lc. raffinolactis</i>	0.190	0.441	2.321
<i>Pc. acidilacticii</i>	0.171	0.434	2.538
<i>St. thermophilus</i>	0.160	0.432	2.700

Dans une étude similaire, **Desmazeaud et Vasal (1979)** ont trouvé que l'activité spécifique intracellulaire exprimée en U/mg des Streptocoques lactiques mésophiles varie entre 1 et 3.5.

A travers ces résultats, 5 souches ont été sélectionnées grâce à leurs activités intracellulaires élevée : *Lb. curvatus* BJ432 (2.536 U/mg), *Lb. buchneri* G8 (2.521 U/mg), *Lc. raffinolactis* (2.321 U/mg), *St. thermophilus* (2.700 U/mg), *Pc. acidilacticii* (2.538 U/mg), pour effectuer la suite du travail expérimentale.

### III. 3. Mesure de la croissance :

Les figures 03, 04, 05, 06 et 07 illustrent les courbes de croissance de *Lb. curvatus* BJ432, *Pc. acidilacticii*, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis* et *St. thermophilus* respectivement. En effet, *Lb. curvatus* BJ432 et *Pc. acidilacticii* sont entrées dans la phase exponentielle après 4h d'incubation (phases de latence), alors que la phase de latence de *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis* et *St. thermophilus* est de 2h. Après 14h d'incubation, *Lb. curvatus* BJ432, *Pc. acidilacticii*, *Lc. raffinolactis* sont entrées dans la phase stationnaire. Cependant, *Lb. buchneri* G8 et *St. thermophilus* n'atteignent cette phase qu'après 16h d'incubation.

Enfin, *Lb. curvatus* BJ432 et *Lc. raffinolactis* présentent une phase de déclin après 18h d'incubation, alors que *Pc. acidilacticii* et *Lb. buchneri* G8 sont entrées dans cette phase après 20h d'incubation, et *St. thermophilus* après 22h.

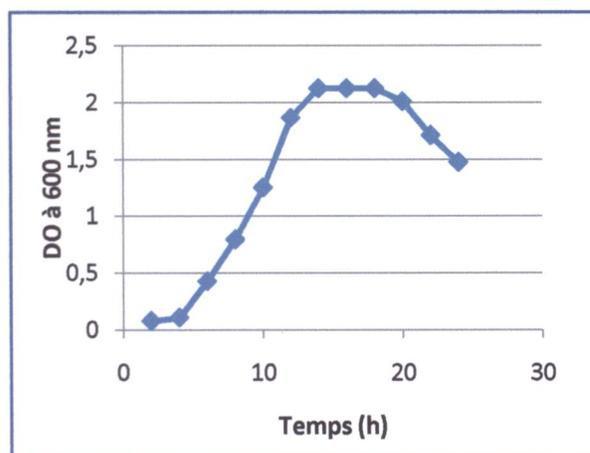


Figure 03 : Courbe de croissance de *Lb. curvatus* BJ432.

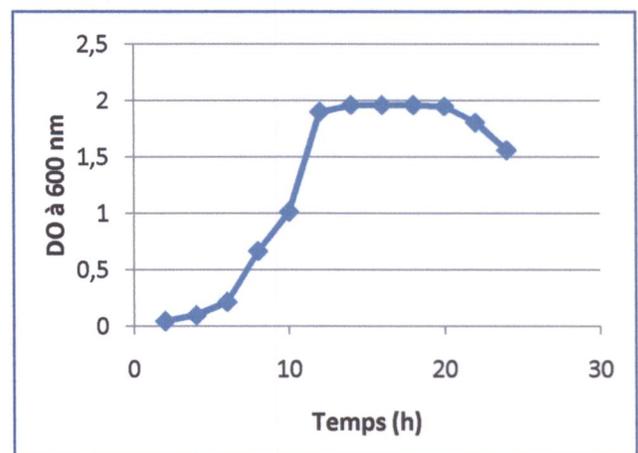
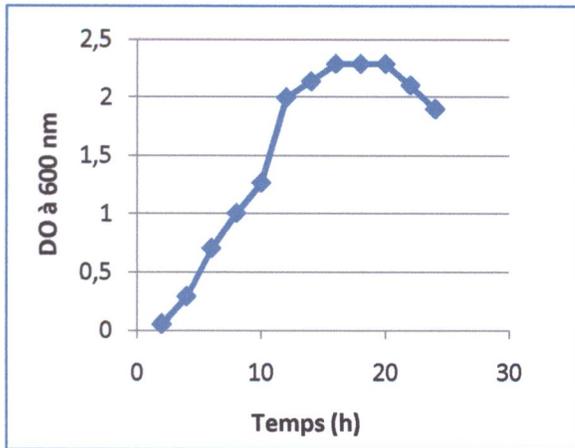
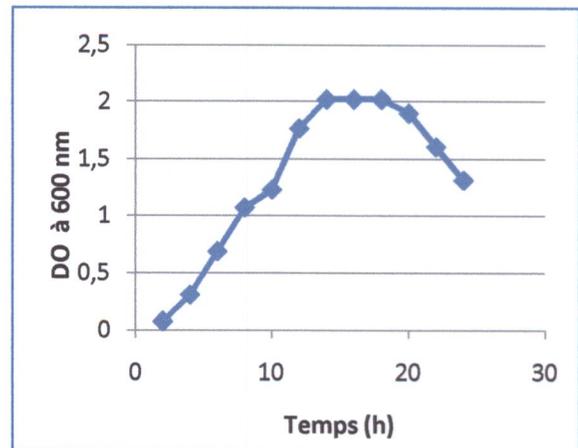


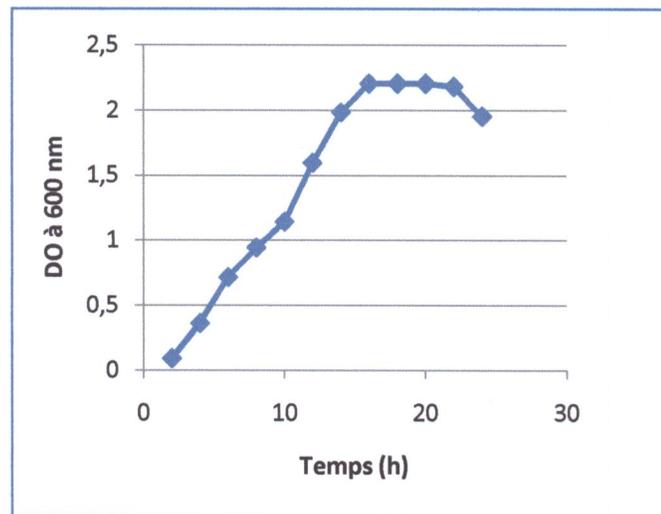
Figure 04 : Courbe de croissance de *Pc. acidilacticii*.



**Figure 05:** Courbe de croissance de *Lb. buchneri* G8.



**Figure 06:** Courbe de croissance de *Lc. raffinolactis*.



**Figure 07:** Courbe de croissance de *St. thermophilus*.

Des résultats similaires ont été trouvés par **Marathe et Ghosh (2009)** qui ont rapporté par mesure de l'absorbance à 530 nm que *Lb. plantarum* NCIM 2083 s'est retrouvée en phase exponentielle après 4h d'incubation à 30°C et atteint la phase stationnaire après 13h.

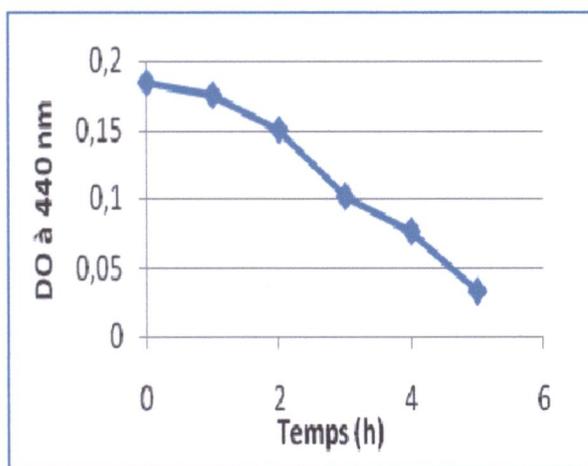
Par ailleurs, **Kabadjova-Hristova et al. (2006)** ont montré après mesure de l'absorbance à 600 nm que *Lactobacillus kefir* DR22x isolée des grains de kéfir a mis 7h d'incubation à 37°C pour passer en phase exponentielle et atteint la phase stationnaire après 14h d'incubation et que la phase de déclin a débuté après 18h d'incubation.

### III.4. Caractérisation de l'activité protéolytique

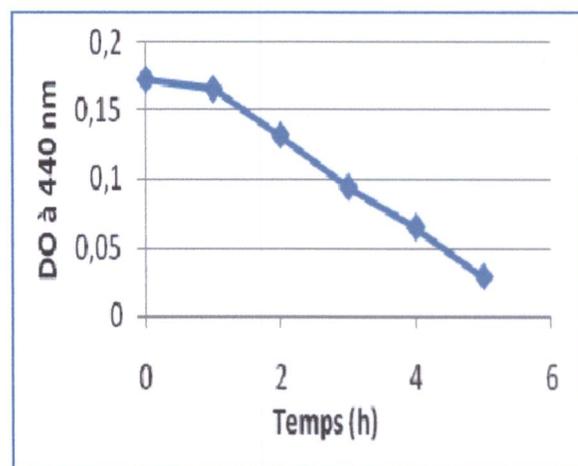
#### III.4.1. Utilisation de la caséine :

Les figures 08, 09, 10, 11 et 12 montrent des cinétiques correspondantes à l'hydrolyse de caséine par les extraits enzymatiques des souches étudiées au cours d'une incubation de cinq heures. En effet, une diminution de l'absorbance au cours du temps est observée, témoignant une augmentation de la vitesse de dégradation de la caséine.

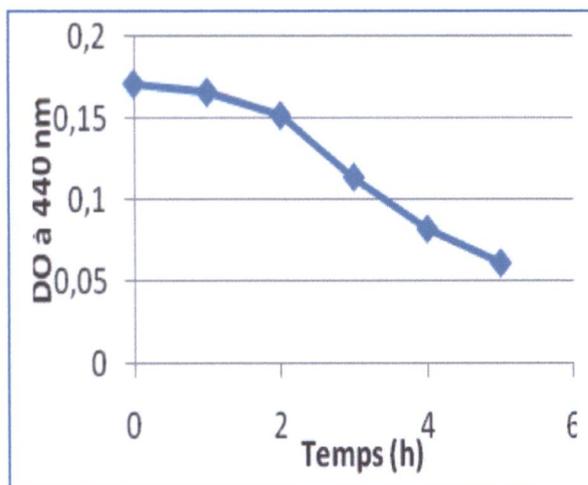
D'après les résultats trouvés, il apparaît clairement que l'activité des extraits enzymatiques diffère d'une souche à une autre, ainsi les extraits de *Pc. acidilacticii* et *St. thermophilus* ont une très faible activité de dégradation durant la première heure d'incubation mais au cours des heures qui suivent, la vitesse de dégradation est remarquablement accélérée. En revanche, les extraits enzymatiques de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8 et *Lc. raffinolactis* apparaissent plus actifs, avec une faible dégradation durant les deux premières heures d'incubation puis, suivie d'une augmentation de l'activité caséinolytique. Cette activité, témoigne de la présence des enzymes, les protéases et les peptidases.



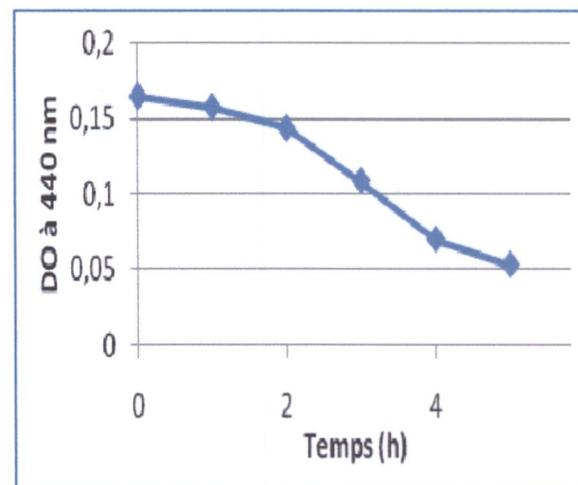
**Figure 08:** Activité caséinolytique de l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432.



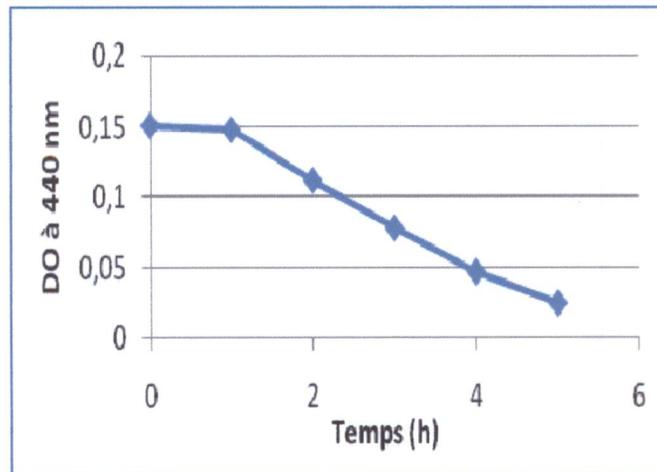
**Figure 09 :** Activité caséinolytique de l'extrait de *Pc. acidilacticii*.



**Figure 10 :** Activité caséinolytique de l'extrait de *Lb. buchneri* G8.



**Figure 11 :** Activité caséinolytique de l'extrait de *Lc. raffinolactis*.



**Figure 12** : Activité caseinolytique de l'extrait de *St. thermophilus*.

Nos résultats se concordent à ceux trouvés par **Desmazeaud et Juge (1976)**, ces auteurs ont montré que l'activité caséinolytique de l'extrait de *St. thermophilus* augmente au cours du temps d'incubation (45min).

L'hydrolyse de la caséine est un processus complexe en raison, notamment, de l'intervention de nombreux systèmes protéolytiques et de la multiplicité des facteurs susceptibles de modifier l'activité de ceux-ci tel que la température et le pH.

### III.4.2. Activité protéinasique :

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 11, ce tableau représente l'activité protéinasique des extraits enzymatiques des souches étudiées exprimée en U/ml/min. Il est remarquable que cette activité varie d'un extrait d'une souche à un autre. On constate que cette activité oscille entre 0.29 U/ml/min pour l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432 et 0.39 U/ml/min pour l'extrait de *St. thermophilus*.

**Tableau 11** : Activité protéinasique de *Lb. curvatus* BJ432, *Pc. acidilacticii*, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus*.

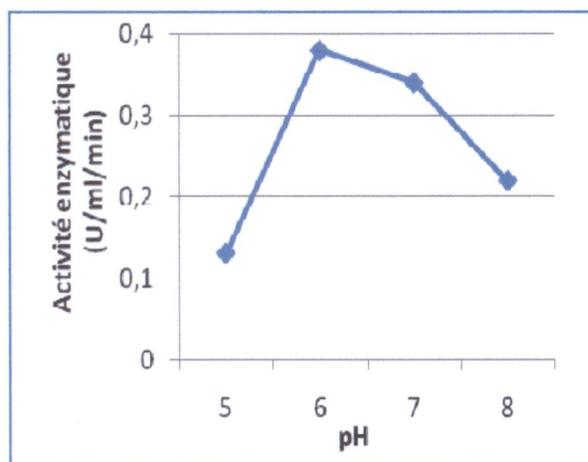
Souche	Activité protéinasique (U/ml/min)
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	0.29
<i>Pc. acidilacticii</i>	0.37
<i>Lb. buchneri</i> G8	0.34
<i>Lc. raffinolactis</i>	0.33
<i>St. thermophilus</i>	0.39

Les résultats trouvés nous laissent constater que ces activités sont considérées comme un peu faibles comparativement à celle trouvée par **Marathe et Ghosh (2009)** ayant trouvé une valeur de 1.1 U/ml/min avec l'extrait de *Lb. plantarum* NCIM 2083.

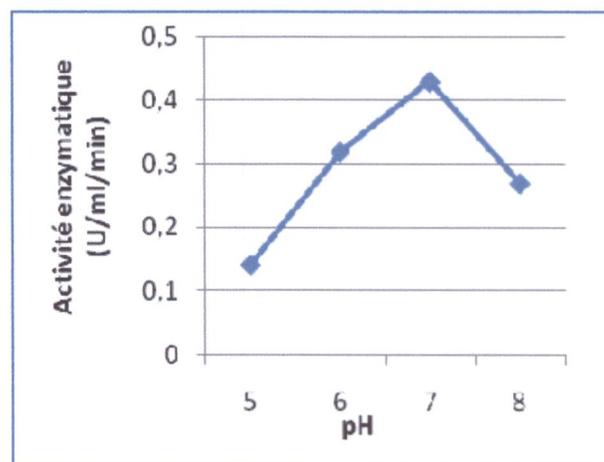
### III.4.3. Effet du pH sur l'activité protéinasique :

Le pH est l'un des paramètres qui influence significativement l'activité protéinasique. L'étude de l'effet de ce paramètre, nous a été très utile pour mieux caractériser l'activité des extraits de nos cultures.

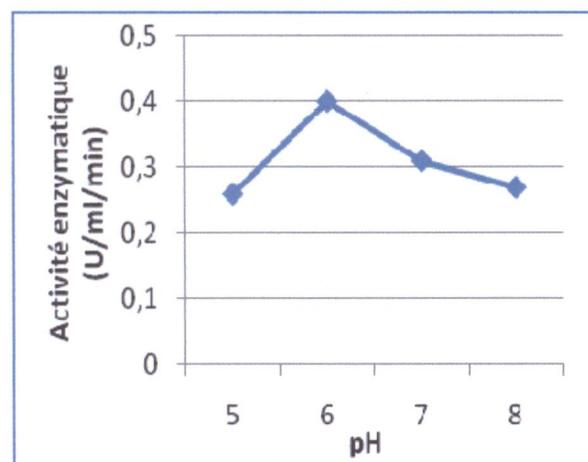
Les figures 13, 14, 15, 16 et 17 montrent l'effet du pH sur l'activité protéinasique des extraits enzymatiques des souches étudiées. Ces résultats montrent la spécificité de l'activité des enzymes contenus dans l'extrait de chaque souche vis-à-vis du pH du milieu, en effet, il est bien clair que le pH 6 est le pH optimal pour l'activité protéinasique de *Lb. curvatus* BJ432 et *Lc. raffinolactis*, alors que *Lb. buchneri* G8, *Pc. acidilacticii*, *St. thermophilus* ont donné une activité protéinasique maximale sur le milieu à pH 7.



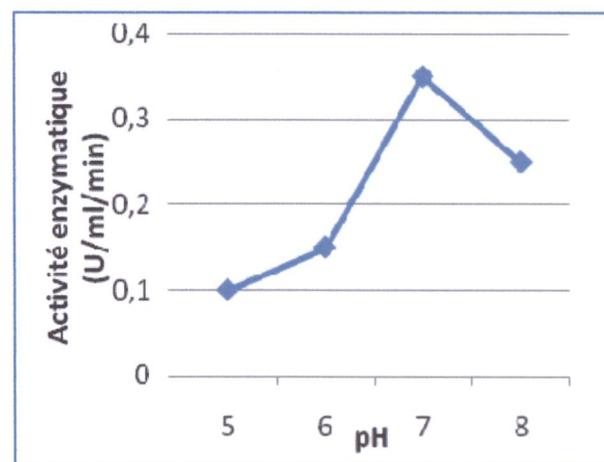
**Figure 13 :** Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432.



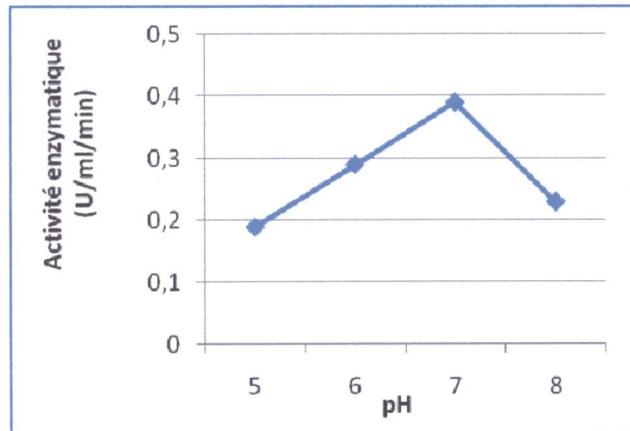
**Figure 14 :** Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de *Pc. acidilacticii*.



**Figure 15 :** Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de *Lc. raffinolactis*.



**Figure 16 :** Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de *Lb. buchneri* G8.



**Figure 17 :** Effet du pH sur l'activité protéinasique de l'extrait de *St. thermophilus*.

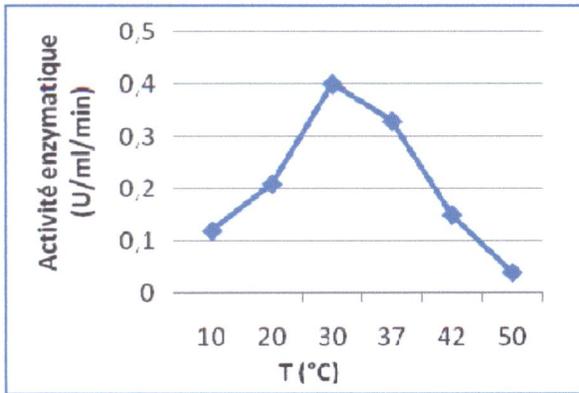
Nos résultats sont proches de ceux obtenus par **Gobbetti et al. (1999)** qui ont montré que l'activité protéinasique optimale de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B397, *Lc. lactis* ssp. *lactis* T12 et *Lb. plantarum* 2739 se situe dans l'intervalle de pH 6 à pH 8. Par ailleurs, **Marathe et Ghosh (2009)** ont montré que le pH optimal pour l'activité protéinasique de *Lb. plantarum* NCIM 2083 est de pH 7. De même, **Kabadjova-Hristova et al. (2006)** ont trouvé que le pH optimal pour l'activité protéinasique de *Lb. kefir* DR22x est de pH 7.2.

#### III.4.4. Effet de la température sur l'activité protéinasique :

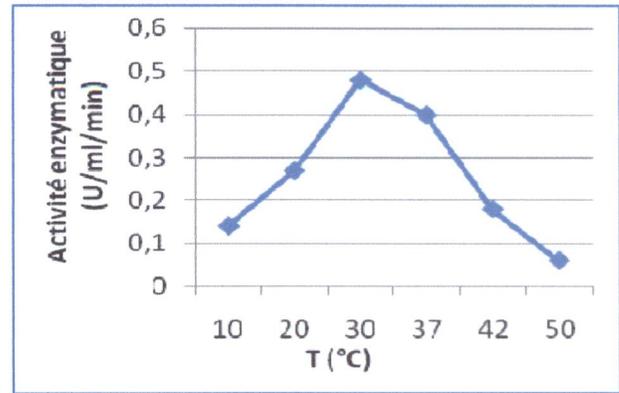
La température se trouve également l'un des paramètres déterminant de la cinétique enzymatique, ainsi la détermination des valeurs de cette dernière va nous permettre d'optimiser l'activité protéinasique des souches.

Les résultats illustrés par les figures 18, 19, 20, 21 et 22 montrent l'effet de la température sur l'activité protéinasique des extraits enzymatiques des souches étudiées.

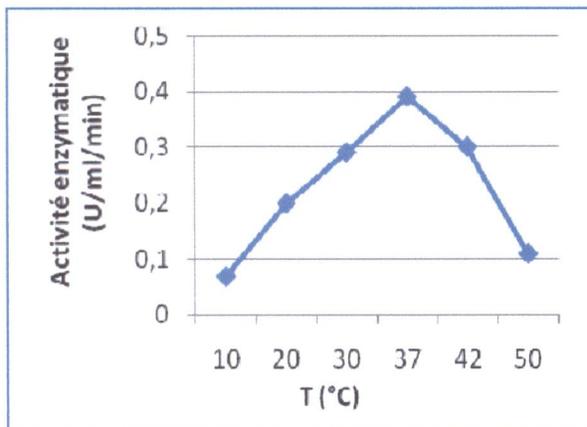
L'analyse de ces résultats fait cependant apparaître quelques différences. En effet, chaque extrait possédait une température optimale pour laquelle l'activité est maximale. Effectivement, *Lb. curvatus* BJ432 et *Pc. acidilacticii* ont donné une activité maximale à 30°C tandis que l'activité de *Lb. buchneri* G8 et *Lc. raffinolactis* est maximale à 37°C, enfin celle de *St. thermophilus* est à 42°C.



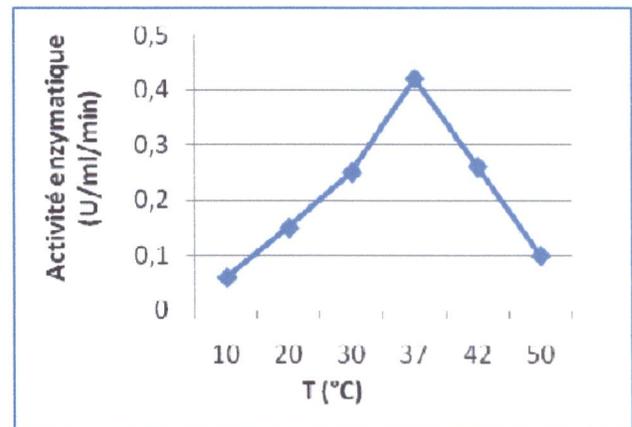
**Figure 18 :** Effet de la température sur l'activité protéinase de l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432.



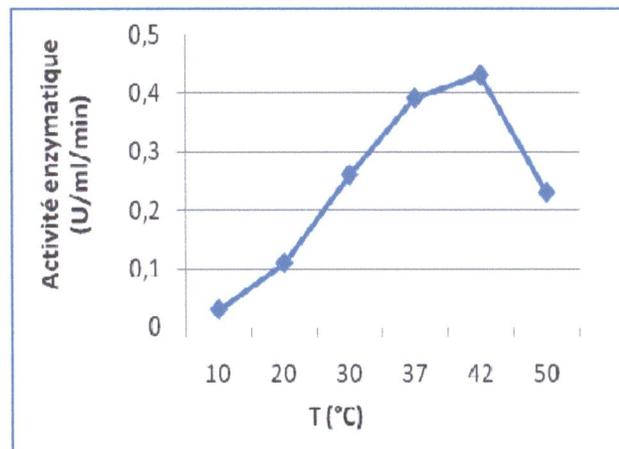
**Figure 19 :** Effet de la température sur l'activité protéinase de l'extrait de *Pc. acidilacticii*.



**Figure 20 :** Effet de la température sur l'activité protéinase de l'extrait de *Lb. buchneri* G8.



**Figure 21 :** Effet de la température sur l'activité protéinase de l'extrait de *Lc. raffinolactis*.



**Figure 22 :** Effet de la température sur l'activité protéinase de l'extrait de *St. thermophilus*.

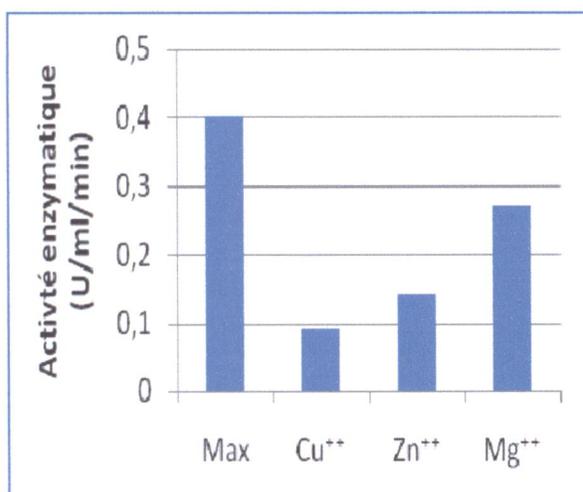
Nos résultats sont en accord et ceux obtenus par **Gobbetti et al. (1999)** ayant rapportés que l'activité protéinase optimale de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B397, *Lc. lactis* ssp. *lactis* T12 et *Lb. plantarum* 2739 est dans la gamme de température 35-45°C.

Cependant, **Marathe et Ghosh (2009)** ont trouvé que la température optimale pour l'activité protéinase de *Lb. plantarum* NCIM 2083 est de 30°C, tandis que **Kabadjova-Hristova et al. (2006)** ont trouvé que la température optimale pour l'activité protéinase de *Lb. kefir* DR22x est de 37°C.

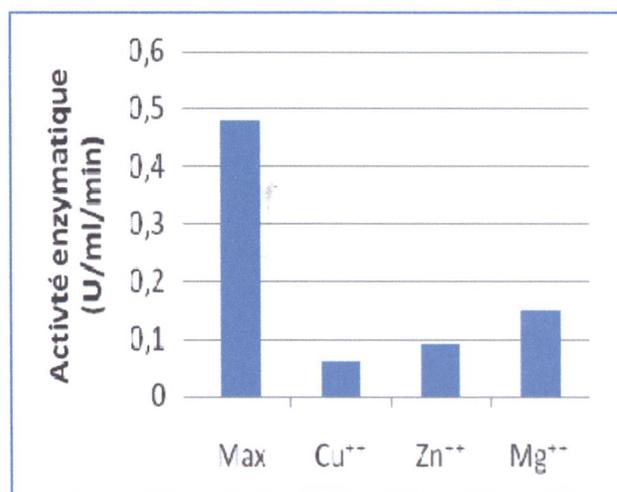
### III.4.5. Effet des cations divalents sur l'activité protéinase :

Au cours des réactions enzymatiques, les cations divalents sont utilisés comme cofacteurs pour activer ou désactiver ces réactions. Les figures 23, 24, 25, 26 et 27 montrent l'effet des cations divalents sur l'activité protéinase des extraits enzymatiques des souches étudiées.

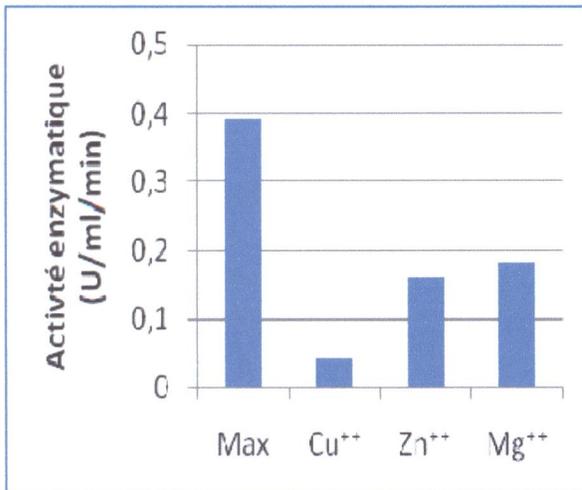
D'après ces figures, l'activité protéinase est réduite par les trois cations divalents utilisés; en revanche des spécificités intrinsèques de chaque extrait enzymatique de chaque souche sont remarquables. En effet, l'activité protéinase se trouvent fortement réduite par les ions de  $\text{Cu}^{++}$  chez *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8 et *Pc. acidilacticii* et par  $\text{Mg}^{++}$  chez *Lc. raffinolactis*. De même, une forte réduction est marquée avec les ions  $\text{Zn}^{++}$  chez *St. thermophilus*.



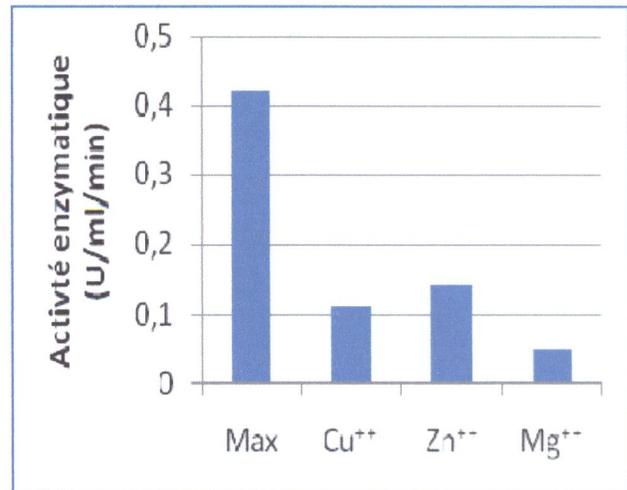
**Figure 23** : effet des cations divalents sur l'activité protéinase de l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432.



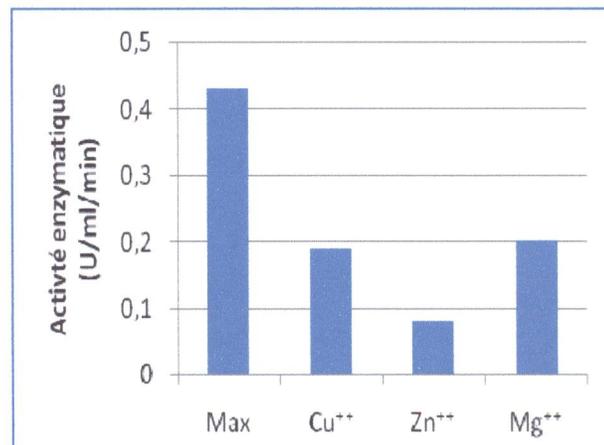
**Figure 24** : effet des cations divalents sur l'activité protéinase de l'extrait de *Pc. acidilacticii*.



**Figure 25 :** effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de *Lb. buchneri* G8.



**Figure 26 :** effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de *Lc. raffinolactis*.



**Figure 27 :** effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait de *St. thermophilus*.

Dans une étude similaire conduite par **Marathe et Ghosh (2009)**, les résultats publiés ont montré que l'activité protéinasique de *Lb. plantarum* NCIM 2083 est totalement inhibée par Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> et Co<sup>++</sup>, alors que les ions Mg<sup>++</sup> et Mn<sup>++</sup> provoquaient une réduction partielle.

Par ailleurs, les résultats obtenus par **Boyaval (1989)** ont montré que les aminopeptidases, les dipeptidases et les tripeptidases de *St. cremoris* et *St. lactis* sont réactivées par les ions Co<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> tandis que les aminopeptidases de *Lc. lactis* sont inhibées par les ions Cu<sup>++</sup> et Hg<sup>++</sup> et réactivées par les ions Co<sup>++</sup> et Zn<sup>++</sup>.

### III.4.6. Effet de l'inhibiteur EDTA sur l'activité protéinasique :

L' EDTA est utilisé comme inhibiteur des métallo-enzymes, sa principale caractéristique est son fort pouvoir chélateur (ou complexant) par lequel il forme des complexes métalliques très stables.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 12. D'après ces résultats, on constate que l'EDTA provoque une réduction de l'activité protéinasique de 17.5%, 23.08%, 26.2%, 37.21% et 33.33% des extraits enzymatiques de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*, respectivement.

**Tableau 12 :** Effet de l'inhibiteur EDTA sur l'activité protéinasique.

Souche	Activité sans EDTA (%)	Activité résiduelle (en présence de l'EDTA) (%)
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	100	82.5
<i>Lb. buchneri</i> G8	100	76.92
<i>Lc. raffinolactis</i>	100	73.8
<i>St. thermophilus</i>	100	62.79
<i>Pc. acidilacticii</i>	100	66.67

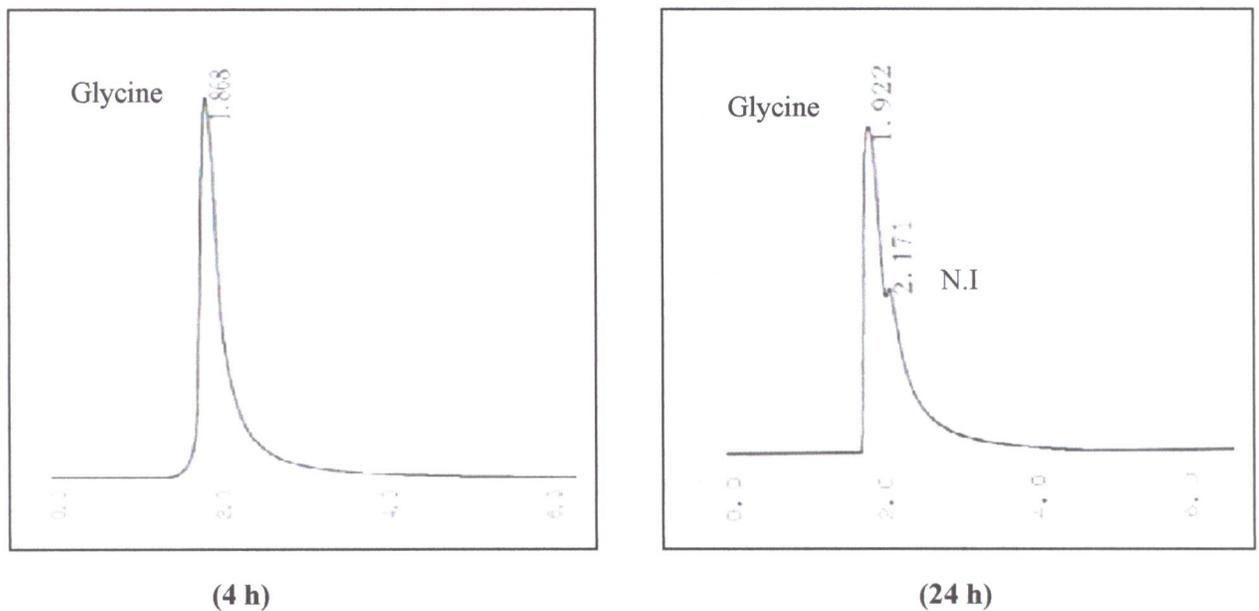
Dans une étude semblable, **Kabadjova-Hristova et al. (2006)**, ont trouvés que l'EDTA réduit de 27 % l'activité protéinasique de l'extrait cellulaire de *Lb. kefir* DR22x.

### III.4.7. Recherche des produits de l'activité protéinasique par analyse HPLC (acides aminés) :

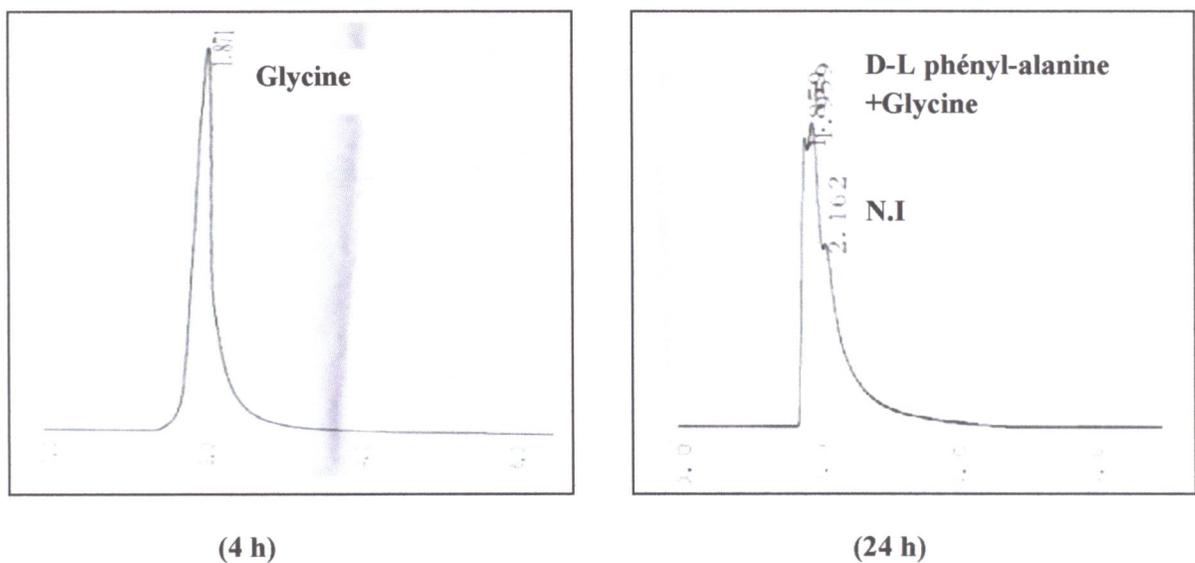
Les Figures 28, 29, 30, 31 et 32 montrent les chromatogrammes obtenus après analyse par HPLC et cela après 4h et 24h d'incubation. La présence des pics caractéristiques de chaque AA va nous permettre de localiser le site d'action de l'enzyme sur la molécule de caséine.

Après comparaison des temps de rétention des AA étalons et les pics obtenus pour chaque souche après 4h et 24h d'incubation, on a trouvé que l'action enzymatique sur la caséine (0.5 mg/ml) par l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8 et *Pc. acidilacticii* donne de la glycine après 4h aussi bien qu'après 24h, tandis que l'activité des enzymes de *Pc. acidilacticii* libère de la D-L-phényl-alanine en plus de la glycine après 24h d'incubation. Par ailleurs, les enzymes de *Lc. raffinolactis* et *St. thermophilus* s'attaquent aux sites de liaison de leucine et la libère dans le milieu.

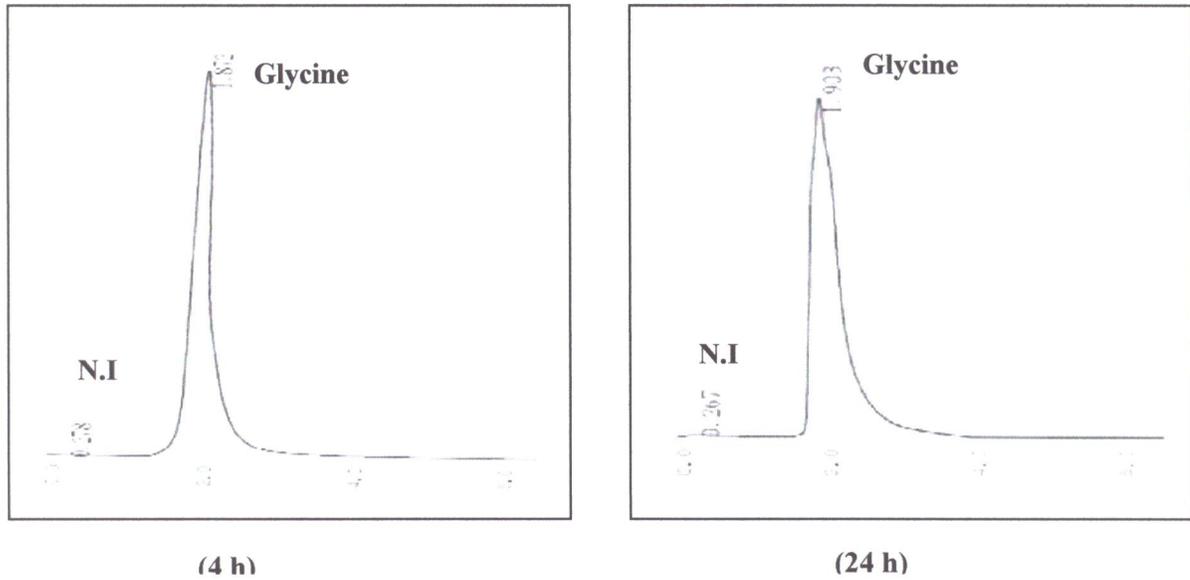
Il apparaît également sur les mêmes chromatogrammes, des pics qu'on n'arrive pas à identifier par manque d'AA étalon et par le fait que notre HPLC est qualitative (non analytique). Cela dit, il nous paraît important de souligner que les enzymes des différentes souches libèrent d'autres AA, et ou peptides dans le milieu et que les pics non identifiés en témoignent.



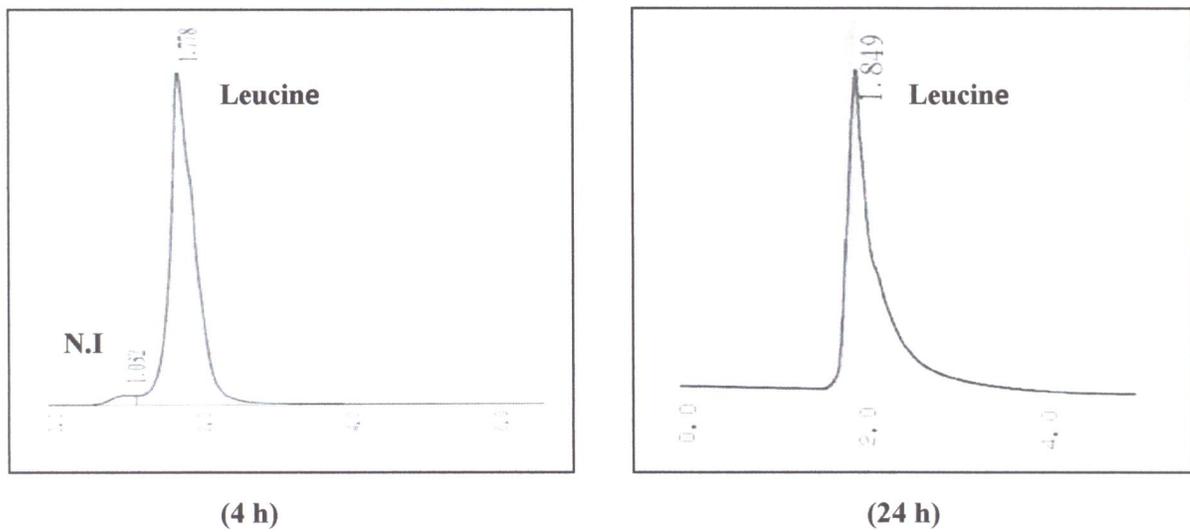
**Figure 28 :** Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432 sur la caséine (0.5 mg/ml).



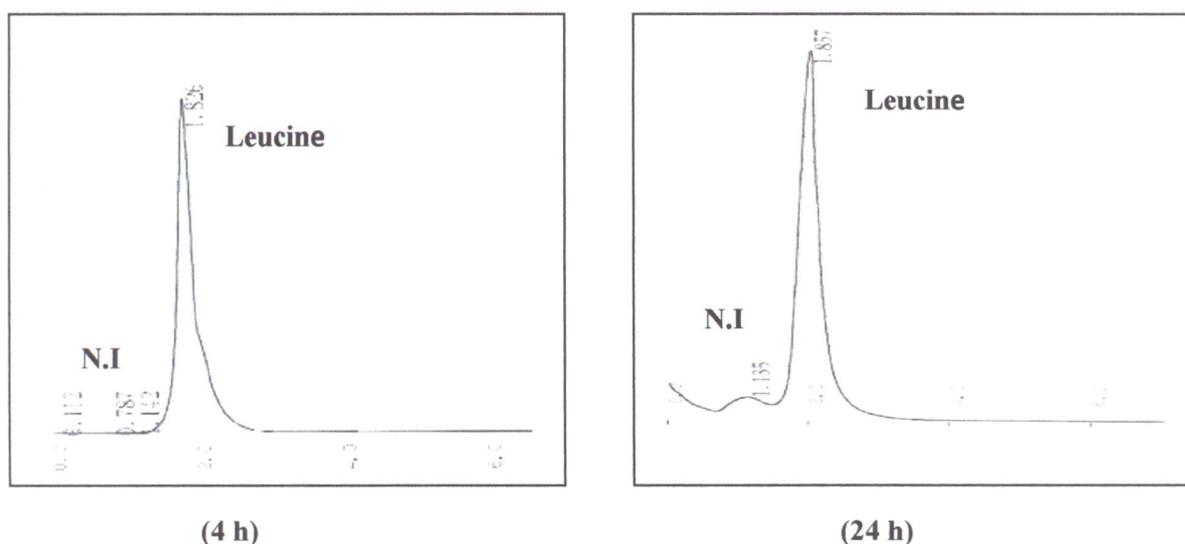
**Figure 29 :** Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *Pc. acidilacticii* sur la caséine (0.5 mg/ml).



**Figure 30 :** Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *Lb. buchneri* G8 sur la caséine (0.5 mg/ml).



**Figure 31 :** Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *Lc. raffinolactis* sur la caséine (0.5 mg/ml).



**Figure 32:** Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *St. thermophilus* sur la caséine (0.5 mg/ml).

Les différents pics obtenus en parallèle avec les pics d'AA cités ci-dessus pouvant être des peptides ou d'autres acides aminés qui n'appartiennent pas aux étalons utilisés. **Marathe et Ghosh (2009)**, et par application de la même technique qu'on a utilisé, ont obtenu des pics correspondant à des peptides après la mise en contact de l'extrait enzymatique de *Lb. plantarum* NCIM 2083 avec de la caséine suivie d'une incubation de 4h.

### III.4.8. Recherche des produits de l'activité protéinasiq ue par analyse CPG :

Les figures 33, 34, 35, 36, et 37 montrent les chromatogrammes obtenus après analyse par CPG et cela après 24h d'incubation.

En se basant sur le rapport m/z des pics obtenus et comparativement au rapport m/z des acides aminés, les produits obtenus après dégradation de la caséine sont généralement des acides aminés ou leurs dérivés.

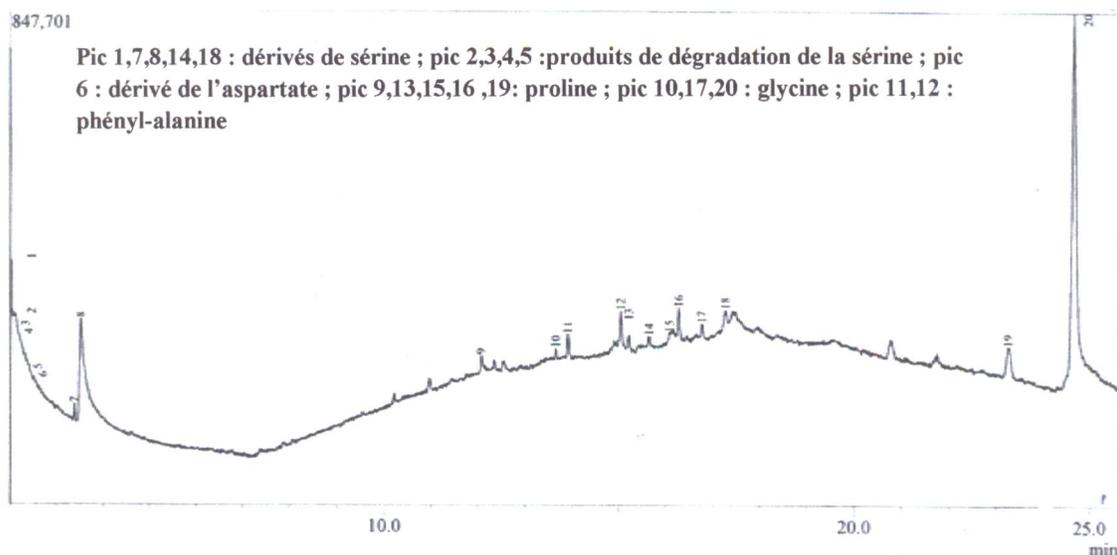
Les résultats illustrés par la figure 33, nous laissent constater que l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432 a donné des pics correspondants aux AA à savoir la proline et la glycine dont le rapport m/z est de : 97.05 et 57.02 respectivement. En plus des acides aminés, d'autres composés ont été détectés que l'on considère comme des dérivés d'acides aminés et on cite les dérivés de la sérine, d'aspartate et de phényl-alanine dont le rapport m/z était de : 87.03, 115.03 et 147.07 respectivement. De même, des produits de dégradation de la sérine ont été aussi détectés.

En ce qui concerne l'extrait de *Pc. acidilacticii* (figure 34), il a donné les mêmes produits obtenus avec l'extrait de *Lb. curvatus* BJ432, en plus de la valine et des dérivés de la glycine.

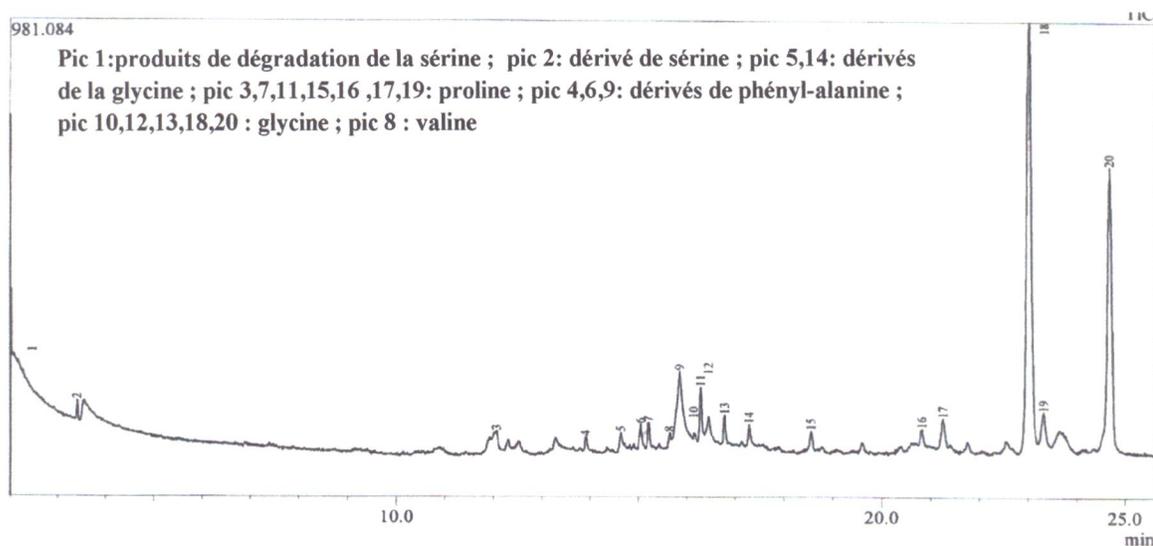
D'autre part, l'extrait de *Lb. buchneri* G8 a donné, la proline et la glycine aussi bien que des dérivés de sérine et de phényl alanine ainsi que des produits de dégradation de la sérine (figure 35). De même, il apparaît d'après la figure 36 que l'extrait de *Lc. raffinolactis* a donné la glycine, des dérivés de sérine, d'aspartate et d'autres composés légers.

Enfin, la glycine, la proline et des dérivés de la sérine ont été détectés avec l'extrait de *St. thermophilus* (figure 37).

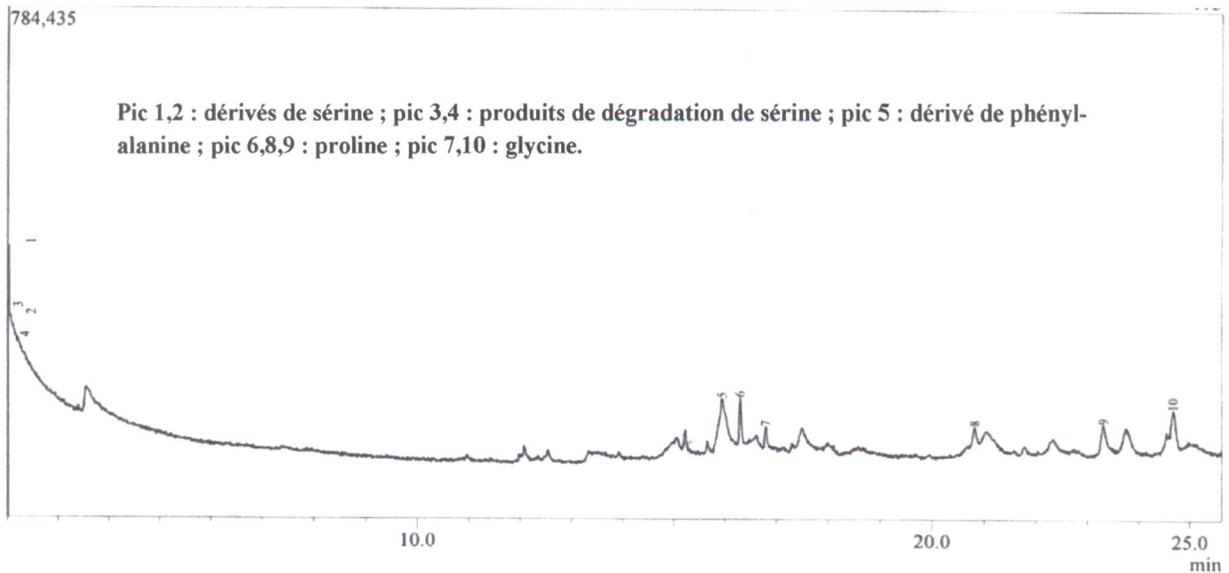
Cette analyse par CPG des produits de dégradation de la caséine a donné des résultats performants par rapport aux résultats obtenus par HPLC et elle nous a permis de d'avancer que les extraits des souches utilisées ont une capacité à dégrader la caséine grâce aux enzymes protéolytiques à site de clivage diversifiés.



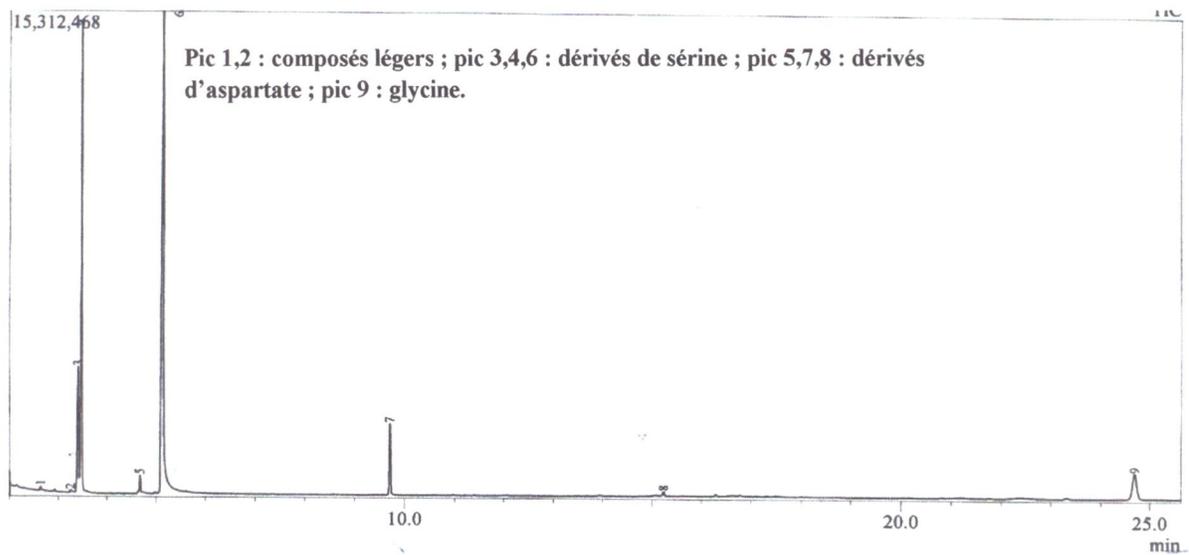
**Figure 33** : Analyse par CPG des composés obtenus après 24h de l'action de l'extrait enzymatique *Lb. curvatus* BJ432 sur la caséine (0.5 mg/ml).



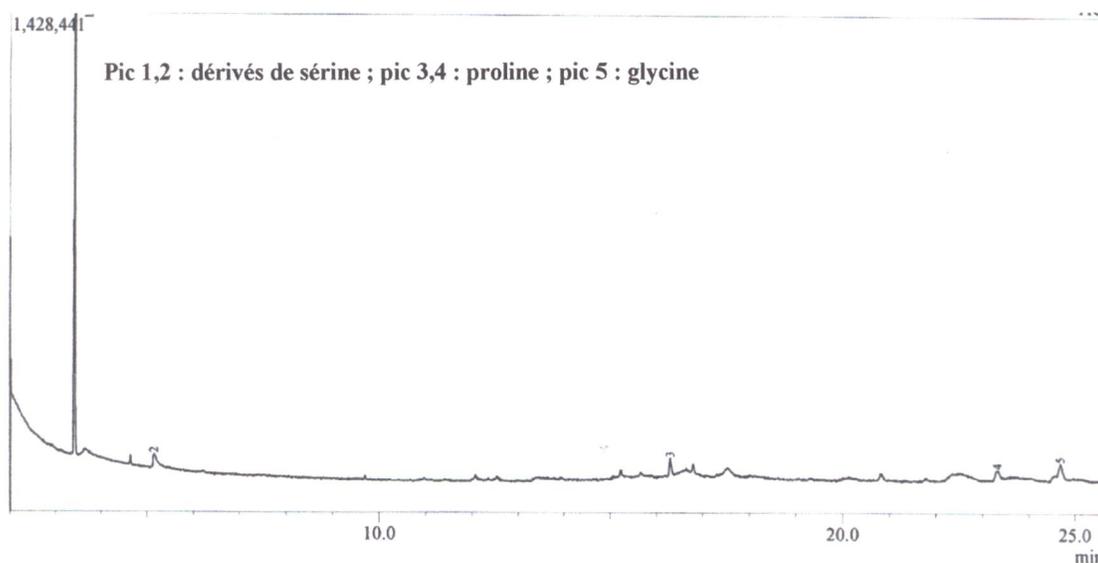
**Figure 34** : Analyse par CPG des composés obtenus après 24h de l'action de l'extrait enzymatique de *Pc. acidilacticii* sur la caséine (0.5 mg/ml).



**Figure 35 :** Analyse par CPG des composés obtenus après 24h de l'action de l'extrait enzymatique de *Lb. buchneri* G8 sur la caséine (0.5 mg/ml).



**Figure 36 :** Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *Lc. raffinolactis* sur la caséine (0.5 mg/ml).



**Figure 37 :** Analyse par CPG des composés obtenus après 24 h de l'action de l'extrait enzymatique de *St.thermophilus* sur la caséine (0.5 mg/ml).

### III.5. Pouvoir aromatisant et recherche des produits de la dégradation des acides aminés :

Les figures 38, 39, 40, 41, et 42 montrent les chromatogrammes obtenus après analyse par CPG.

Les résultats illustrés par la figure 38, nous laissent constater que *Lb. curvatus* BJ432 a donné trois pics correspondant aux composés aromatiques à savoir un alcool issu des AA à groupement carboxylique double, alcool issu des acides aminés cycliques aromatiques et un aldéhyde issu des osamines.

En ce qui concerne *Pc.acidilacticii* (figure 39), elle a donné un arôme issu des AA à chaîne latérale polaire, un arôme issu des osamines, un aldéhyde issu des AA aromatiques, un arôme cyclique et un aldéhyde pur. D'autre part, *Lb. buchneri* G8 a donné, un aldéhyde issu de la dégradation de la méthionine en plus que des aldéhydes purs (figure 40).

D'après la figure 41, *Lc. raffinolactis* a donné un composé aldéhydique issu des AA aromatiques, un alcool et un acide carboxylique issus de la dégradation soit de la valine soit de la méthionine.

Enfin, un alcool issu de peptide court et des esters issus de divers AA ont été détectés avec *St. thermophilus* (figure 42).

A travers ces résultats, nous pouvons conclure qu'on a l'aptitude protéolytique aussi bien que aromatisante des souches testées. Notant également que les chromatogrammes ont montré des pics qui représentent certains produits de la dégradation des protéines du lait qu'on n'a pas pu identifier.

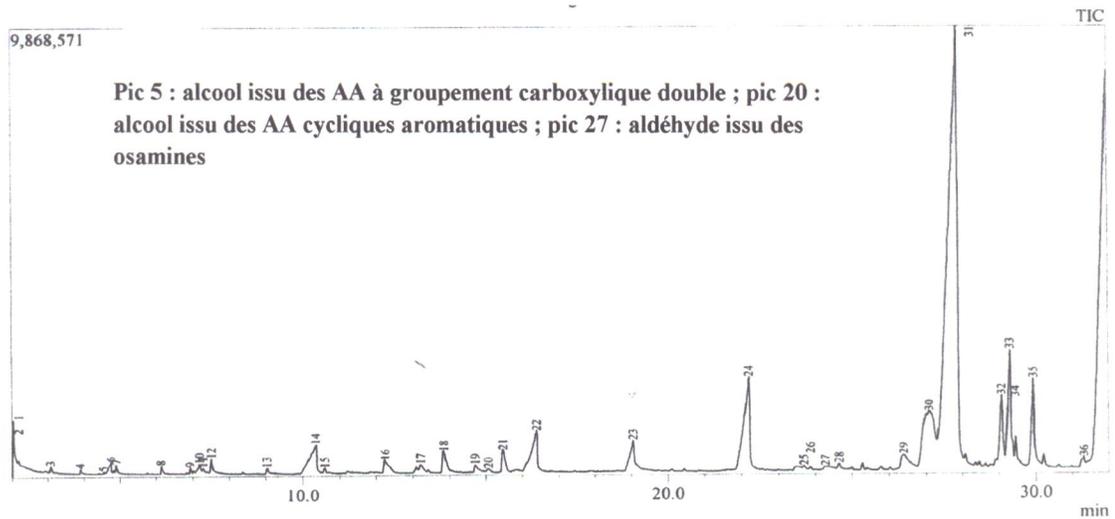


Figure 38 : analyse par CPG des composés aromatiques chez *Lb. curvatus* BJ432.

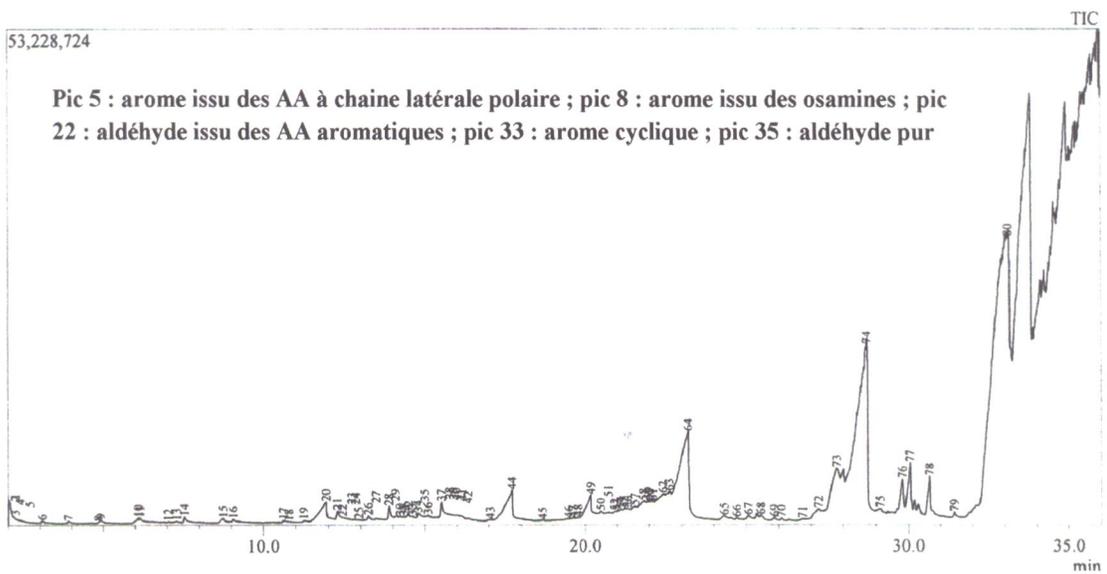
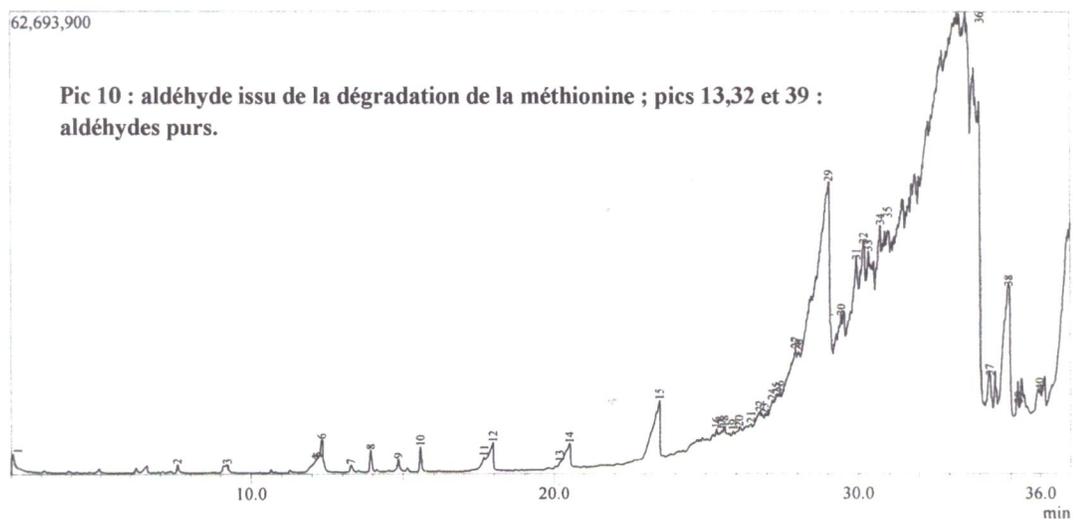


Figure 39 : analyse par CPG des composés aromatiques chez *Pc. acidilacticii*.



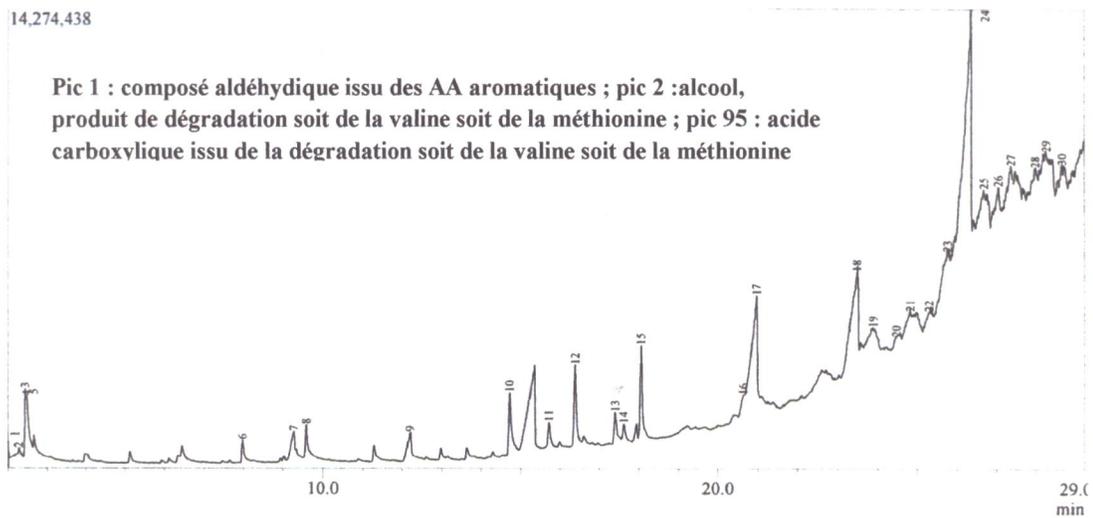


Figure 41 : analyse par CPG des composés aromatiques chez *Lc. raffinolactis*.

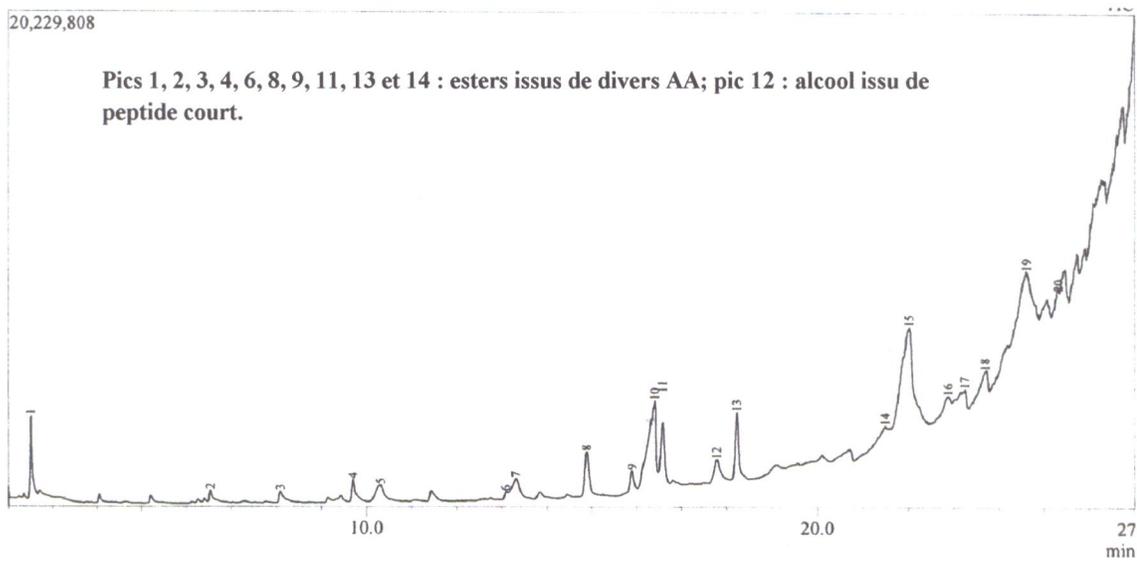
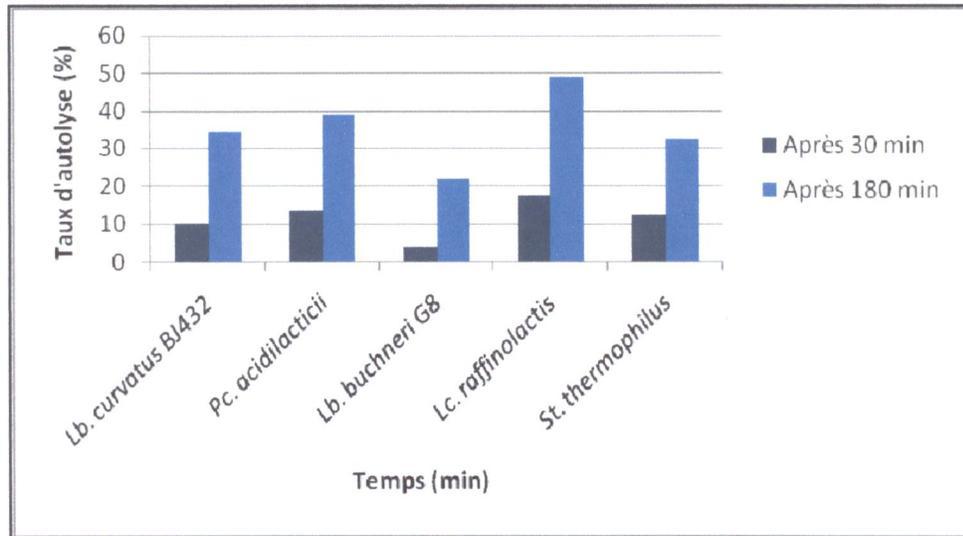


Figure 42 : analyse par CPG des composés aromatiques chez *St. thermophilus*.

### III.6. Activité autolytique des souches :

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 43. D'après ces résultats, le pourcentage d'autolyse obtenu après 30 et 180min varie considérablement d'une souche à une autre avec une vitesse d'autolyse plus importante pour *Lc. raffinolactis* qui est arrivée jusqu'à 17.28% après 30min et à 48.72% après 180min. Contrairement à *Lb. buchneri* G8 qui a une faible vitesse d'autolyse de 3.71% après 30min et 21.79% après 180min.



**Figure 43 :** Taux d'autolyse après 30 min et après 180 min d'incubation de *Lb. curvatus* BJ432, *Pc. acidilacticii*, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis* et *St. thermophilus*.

Dans une étude similaire, **Thivierge (1999)** a rapporté que le pourcentage d'autolyse après 3h d'incubation varie de 13.6% chez *Lc. Lactis* ssp. *cremoris* PA48-6 et de 40 % chez *Lc. lactis* ssp. *cremoris* LL 30-3.

Dans une étude relative au suivi d'autolyse chez *Lb. helveticus* CNRZ 414 dans les tampons, en se basant sur l'évolution de l'absorbance à 650 nm au cours de la lyse cellulaire, **Lortal et al. (1989)** ont rapporté que la chute de la DO était surtout importante dans les 8 premières heures (diminution de 50 % par rapport à la DO initiale).

Par ailleurs, **Roudj et al. (2009)** ont trouvé dans une étude relative à l'autolyse induite par carence nutritionnelle, que le taux d'autolyse après 24 h d'incubation est de 68.8% pour la souche *Lb. brevis* CHTD 27.

Enfin, il est utile de signaler que l'autolyse a un rôle important en industrie des fromages, pour laquelle la libération des enzymes, contribue à une bonne hydrolyse des protéines et au développement des arômes dans ces produits.

## ***Conclusion***

L'activité protéolytique des bactéries lactiques a un rôle important dans la fabrication des produits fermentés notamment les fromages où la protéolyse contribue à la flaveur de ces produits par la formation de peptides et d'acides aminés transformés à leurs tours en composés aromatiques par des réactions enzymatiques.

A travers cette étude, nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :

Parmi la collection composée de 31 souches mises au test, seulement 13 souches ont donné une activité protéolytique sur milieux solides.

Dans ce cadre et concernant l'activité protéolytique sur lait, *Pc. acidilacticii* est la seule souche qui a donné une dégradation totale des caséines du lait. De même, *Pc. acidilacticii* a donné le meilleur résultat pour le test de l'activité coagulante.

La détermination de l'activité spécifique des exoprotéases, protéases liées à la paroi et protéases intracellulaires, nous a permis de sélectionner cinq souches : *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*, en se basant sur leur activité intracellulaire élevée.

Concernant l'activité caséinolytique, les résultats ont montré que les extraits cellulaires des cinq souches ont une vitesse de dégradation différente de cette protéine.

L'étude des facteurs influençant l'activité protéinasique à savoir le pH, la température, les cations divalents et l'EDTA a montré que l'activité des extraits enzymatiques des cinq souches est optimale dans la gamme pH6 – 7 ; une température entre 30 – 42 °C et que les ions  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  provoquent une réduction de l'activité avec des différences remarquables. De même l'EDTA a réduit l'activité.

Le suivi d'autolyse dans les tampons a montré que le taux d'autolyse est varié d'une souche à une autre.

Enfin, le recours aux techniques de séparation (HPLC et CPG) a permis de déterminer les produits de dégradation à savoir ; les acides aminés, les peptides et les aromes.

Pour compléter cette recherche, des études doivent être faites pour mieux étudier l'activité protéolytique chez les BL, et on cite :

- Détermination de l'activité aminopeptidasique.
- Utilisation d'autres techniques de séparation telle que SDS-PAGE pour déterminer le type des caséines hydrolysées :  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - et  $\kappa$  caséine.

***Références bibliographiques***

- Ammor M.S. 2004.** Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat. Université de Rennes. France.
- Ammor S, Tauveron G, Dufor E, Chevalier I. 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compounds. *Food Control*. **17**:454-461.
- Atlan D, Béal C, Champonier-Vergès M.C, Chapot-Chartier M.P, Chouayekh H, Coccagn-Bousquet M, Deghorain M, Gadu P, Gilbert C, Goffin P, Guédon E, Guillouard I, Guzzo J, Juillard V, Ladero V, Lindley N, Lortal S, Loubière P, Maguin E, Monnet C, Monnet V, Rul F, Tourdot-Maréchal R, Yvon M.** Métabolisme et ingénierie métabolique in. bactéries lactiques De la génétique aux ferments (Corrieu G ; Luquet F.M). **2008.** TEC & DOC-Lavoisier. Paris.
- Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout R. 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Technol.* **23**:30-37.
- Beasley S. 2004.** Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Thesis of Doctorat. University of Helsinki. Finland.
- Bourgeois C.M, Larpent J.P. 1996.** Microbiologie alimentaire Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. TEC & DOC- Lavoisier. Paris.
- Bouton Y, Guyot P, Dasen A, Grappin R. 1993.** Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. 1. Validation sur minifromages des techniques de laboratoire. *Lait*. **73**:265-279.
- Boyaval P. 1989.** Lactic acid bacteria and metal ions. *Lait*. **69**:87-113.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye bindings. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Carole Edima H. 2007.** *Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse de Doctorat. Nancy-Université. France.
- Cenatiempo Y, Berjeaud J.L, Biet F, Fremaux C, Hechard Y, Robichon D. 1996.** Bacteriocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait*. **76**:169-177.
- Cerning J.1995.** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. **75**:463-472.
- Chapot-Chartier M.P. 1996.** Les autolysines des bactéries lactiques. *Lait*. **76**:91-109.
- Cholet O. 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale ABIÉS. France.
- Christensen J.E, Dudley E.G, Pederson J.A, Steele J.L. 1999.** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **76**:217-246.

- De Giori G.S, Hébert E.M. 2001.** Methods in Biotechnology. *Food Microbiol. Protocol.* **14**(3): 197-203.
- De Vuyst L, Degeest B.1999.** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:163-171.
- De Vuyst L, Leroy F. 2007.** Bacteriocins from lactic acid bacteria : Production, purification, and food applications. *J. Mol. Biotechnol.* **13**:194-199.
- Degorce-Dumas J.R, Goursaud J, Leveau J.Y. 1986.** Analyse des composés volatils du yaourt par chromatographie en phase gazeuse-espace de tête (head-space). *Ind. Alim. Agric.* **8**:805-808.
- Desmazeaud M.J, Vassal L. 1979.** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles : Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait.* **587**: 327-344.
- Desmazeaud M.J, Juge M. 1976.** Caractérisation de l'activité protéolytiques et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus*. *Lait.* **555-556**:241-260.
- Dortu C, Thonart P. 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconversion des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(1):143-154.
- Elmoualdi L, Labioui H, Boushama L, Benzakour A, Ouhssine M, El Yachioui M. 2008.** Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Bull. Soc. Pharma. Bordeaux.* **147**:7-18.
- Gamar-Norani L, Blondeau K, Simonet J.M. 1998.** Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. App. Microbiol.* **85**: 664-672.
- Gänzle M.G, Vermeulen N, Vogel R.F. 2007.** Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* **24**:128-138.
- Garneau S, Martin N.I, Vederas J.C. 2002.** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochim.* **84**:577-592.
- Gilbert C, Altan D, Blanc B, Portalier R, Germoud G.J, Lapierre L, Mollet B. 1996.** A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prt B gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacterial.* **178**(11):3059-3065.
- Gobbetti M, Lanciotti R, De Angelis M, Rosaria Corbo M, Massini R, Fox P. 1999.** Study of temperature, pH, NaCl, and  $a_w$  on the prteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic reponse surface methodology. *Enzyme Microbiol. Technol.* **25**:795-809.
- Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Monelli L. 2005.** Should yoghurt cultures be considered probiotic. *British J. Nutr.* **93**:783-786.
- Guiraud J.P, Rosec J.P. 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. Saint-Denis. La Plaine. France.

- Guiraud J.P. 1998.** Microbiologie alimentaire. BUNOD. Paris.
- Herrerros M.A, Sandoval H, Gonzalez L, Castro J.M, Fresno J.M, Tornadijo M.E. 2005.** Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Food Microbiol.* **22**:455-459.
- Hotchkiss J.H, Chen J.H, Lawless H.T. 1999.** Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J.Dairy Sci.* **82**:690-695.
- Idoui T, Karam N.E. 2008.** Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *I. J.Fats.Oils.* **59**(4): 361-367.
- Idoui T, Boudjerda J, Leghouchi E, Karam N.E. 2009.** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *I. J.Fats.Oils.* **60**(2):177-183.
- Idoui T, Boudjerda J, Leghouchi E, Karam N.E. 2009.** Naturally fermented Jijelian black olives: microbiological characteristics and isolation of lactic acid bacteria. *I. J.Fats.Oils.* **60**(5):516-520.
- Iyer R, Tomar S.K, Uma Maheswari T, Singh R. 2010.** *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **20**:133-41.
- Kabadjova-hristova P, Bakalova S, Gocheva B, Moncheva P. 2006.** Evidence for proteolytic activity of *Lactobacilli* isolated from kefir grains. *Biotechnol. & Biotechnol.* **20**(2):89-94.
- Klaenhammer T.R. 2000.** Probiotic bacteria: Today and tomorrow. *J.Nutr.* **130**:4155-4165.
- Labioui H, Elmoualdi L, El Yachioui M, Ouhssine M. 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **144**:237-250.
- Larpent J.P, Larpent-Gourgand M. 1997.** Memento technique de microbiologie. TEC & DOC-Lavoisier. Paris.
- Law J, Haandrikman A. 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **7**:1-11.
- Laws A, Gu Y, Marshall V. 2001.** Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol.Advances.* **19**:597- 625.
- Leveau J.Y, Bouix M, de Roissart H.** La flore lactique in Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires (**Bourgeois C.M ; Leveau J.Y**). 1991. 2<sup>ème</sup> édition. Vol. 3. TEC & DOC-Lavoisier. Paris.
- Leveau J.Y, Bouix M. 1993.** Microbiologie industrielle les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. Paris.
- Lin T.Y ; Chang chien M.F. 2007.** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem.* **100**:1419-1423.
- Lindgren S.E, Dobrogosz W.J. 1990.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and food fermentations. *FFMS Microbiol Rev.* **87**:149-164

- Ljungh A, Wadstrom T. 2006.** Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intestinal microbiol.* 7:73-90.
- Lopezdel Castillo-Lozano M. 2007.** Production d'aromes soufrés par les flores d'affinage : Catabolisme de la L-cystéine. Thèse de Doctorat. L'institut National Agronomique Paris-Grignon. France.
- Marathe M.Y, Ghosh J.S. 2009.** Study of proteinase activity of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2083. *I.J.G.M.B.* 1(1):001-005.
- Medina R.B, Katz M.B, Gonzalez S, Oliver G. 2004.** Public Health Microbiology Methods in Molecular Biology. *Food microbial protocols.* 268(7):465-470.
- Montville T.J, Winkowskia K, Ludeschera R.D. 1995.** Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int. Dairy J.* 5:797-814.
- Moulay M, Aggad H, Benmechernene Z, Guessas B, Henni D.E, Kihal M. 2006.** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World J.Dairy & Food Sci.* 1(1):12-18.
- Nouani A, Belhamiche N, Slamani R, Fazouane F, Belbraouet S, Bellal M.M. 2009.** Purification et caractérisation électrophoretique d'une protéase coagulant le lait de *mucor pusillus*: comparaison de méthodes. *esjr.* 35(4):512-521.
- O'sullivan L, Ross R.P, Hill C. 2002.** Potential of bacteriocins-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochemistry.* 84:593-604 .
- Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. 2003.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry- fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat sci.* 65:859-867.
- Patel A.K, Michaud P, Singhania R.R, Soccol C.R, Pandey A. 2010.** Polysaccharides from probiotics: New developments as food additives. *Food Technol. Biotechnol.* 48(4):451-463.
- Petrova M, Georgieva R, Dojchinovska L, Kirilov N, Iliev I, Antonova S, Hadjieva N, Ivanova I, Danova S. 2009.** Lactic acid bacteria against pathogenic microbes. *Trakia J. Sci.* 7(2):33-39.
- Pilet M.F, Magras C, Federighi M.** Bactéries lactiques in bactériologie alimentaire (**Federighi M**). 2005. 2<sup>ème</sup> édition. Economica. Paris.
- Pilet M.F, Uagras C, Federighi M.** Bactéries lactiques in Manuel de bactériologie alimentaire (**Sutra L, Federighi M, Joouve J.L**). 1998. POLYTECHNICA. Paris.
- Pirainno P, Zotta T, Ricciardi A, Mc Sweeney P.L.H, Parente E. 2008.** Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. *Int.Dairy J.* 18:81-92.
- Pot B.** The taxonomy of lactic acid bacteria in bactéries lactiques De la génétique aux ferments (**Corrieu G, Luquet F.M**). 2008. TEC& DOC-Lavoisier. Paris.

- Reddy G, Altaf Md, Naveena B.J, Venkatshwar M, Vijay Kumar E.2008.** Amylolytic bacteria lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol Advances.* **26:**22-34.
- Renault P .2002.** Genitically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie.* **84:**1073-1087.
- Roudj S, Belkheir K, Zadi Karam H, Karam N.E. 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du sud ouest Algerien. *European J. Sci. Res.* **34(2):**218-227.
- Ruas- Madiedo P, Hhugenholtz J, Zoon P. 2002.** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12:**163-171.
- Sanders M.E. 2003.** Probiotics: Consideration for human health. *Nutr. Rev.* **61:**91-99.
- Savadogo A, Quattara cheik A.T, Bassole Imael H.L, Traore A.S. 2004.** Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pak.J. Nutr.* **3(3):**174-179.
- Savadogo A, Quattara cheik A.T, Bassole Imael H.L, Traore A.S. 2006.** Bacteriocins and lactic acid bacteria- a mini review. *African J. Biotechnol.* **5(9):**678- 683.
- Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71:**394-406.
- Schrezenmeir J, Verse M.2001.** Probiotics, Prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am. J. Clin.Nutr.* **73:**3615-3645.
- Settanni L, Moschetti G. 2010.** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* **27:**691-697.
- Smit G, Smit B.A, Engels W.J.M. 2005.** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29:**591- 610.
- Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Pavunc A.L, Habjanic K, Matosic S. 2010.** Antimicrobial activity the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48(3):**296-307.
- Sutar I.I, Vatak H.G, Srinivasan M.C, Sivaraman H. 1986.** Production of alkaline protease by immobilized mycelium of *Condiobolus*. *Enzyme Microbiol.Technol.* **8:**632-634.
- Thivierge N. 1999.** Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pour le développement des ferments mésophiles à aptitudes fromagères élevées (Cheddar). Mémoire de Master. Université de laval. Canada.
- Tsakalidou E, Anastasiou R, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Kalantzopoulos G. 1999.** Cell wall bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*-ACA-DC 178: Characterization & specificity for beta-casein. *Applied & Environ.Microbiol.* **65:**2035-2040.

**Vaningelgem C.F, Zamfir F, Mozzi T, Adriany M, Vancanneyt J, Swings L, De Vuyest L. 2003.** Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains in reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:900-912.

**Vasala A, Panula J, Neubauer P. 2005.** Efficient lactic acid bacteria production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp *Salicinius* with pre-treatment by proteolytic micro-organisms. *J. biotechnol.* **117**:421-431.

**Vassal L, Gripon J.C.1984.** L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert : rôle de la présure et de *Penicillium caseicolum*, moyens de la contrôler. *Lait.* **64**:397-417.

**Vignola C.L. 2002.** Science et technologie du lait. Presses Internationales Polytechnique. Montreal.

**Walling E, Gindreau E, Lonvaud-Funel A. 2001.** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point d'outils moléculaires de détection. *Lait.* **81**:289-300.

**Yang Z. 2000.** Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. Thesis of Doctorat. University of Helsinki. Finland.

**Yao A.A, Egounlety M, Kouame L.P, Thonart P. 2009.** Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.* **153**:54-65.

# ***Annexes***

## Annexe I

## Composition des milieux de culture et réactifs utilisés

• **Bouillon MRS (pH 6,8)**

Pour 1 litre :

- Peptone.....	10,00 g
- Extrait de viande .....	10,00 g
- Extrait autolytique de levure .....	5,00 g
- Glucose.....	20,00 g
- Tween 80 .....	1,08 g
- Phosphate bipotassique .....	2,00 g
- Acétate de sodium .....	5,00 g
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g
- Sulfate de magnésium .....	0,20 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g

• **Bouillon M 17 (pH 7,1)**

Pour 1 litre :

- Peptone .....	2,5g
- Peptone papainique.....	7,5 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
- Extrait de viande .....	5,00 g
- Lactose .....	5,00 g
- Phosphate de sodium .....	19,00 g
- Sulfate de magnésium .....	0,25 g
- Acide ascorbique .....	0,50 g

• **Gélose YMA (pH 7,1)**

Pour 1 litre :

- Peptone.....	5 g
- Extrait de levure.....	3g
- Lait écrémé.....	2g
- Agar .....	15g

• **Gélose Agar au lait** : Il se compose d'un mélange de deux milieux

\* milieu A : pour un litre

- Agar.....	3%
- Extrait de levure.....	1%

\* milieu B : pour un litre

-Lait écrémé.....	6%
-Pourpre de Bromocrésol.....	0,006%

Mélange A/B : Agar 1.5%, extrait de levure 0.5%, lait écrémé 3.0%, pourpre de Bromocrésol 0.003%.

• **Gélose nutritive (GN)**

Pour un litre :

- Peptone.....	10 g
- Extrait de viande.....	5g
- Chlorure de Sodium.....	5g
- Agar .....	15g

- **Milieu A (pH 6)**

Pour un litre :

- Caséine.....10g
- NaNO<sub>3</sub>.....3g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1g
- MgSO<sub>4</sub>.....0,5g
- KCl.....0,5g
- FeSO<sub>4</sub>.....0,01g

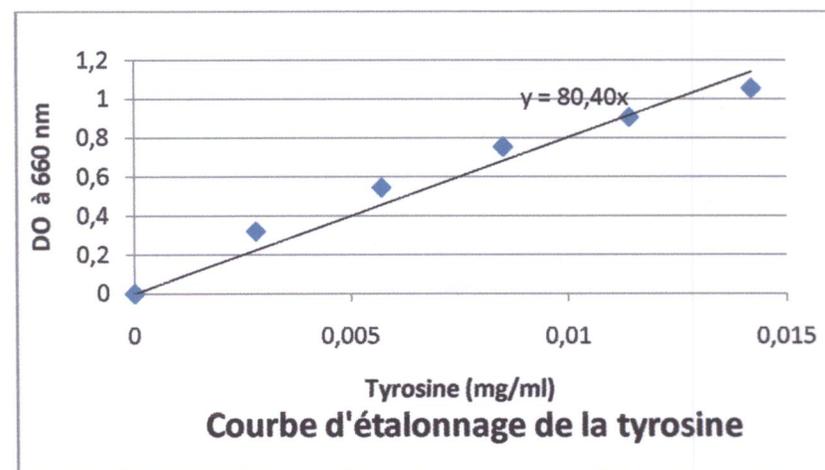
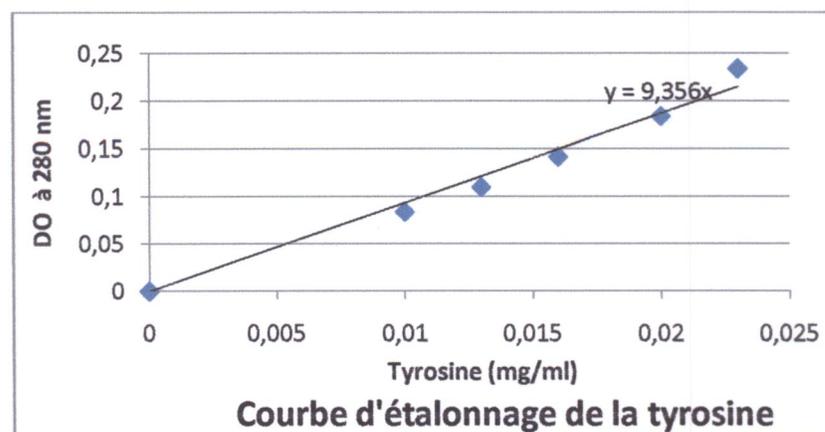
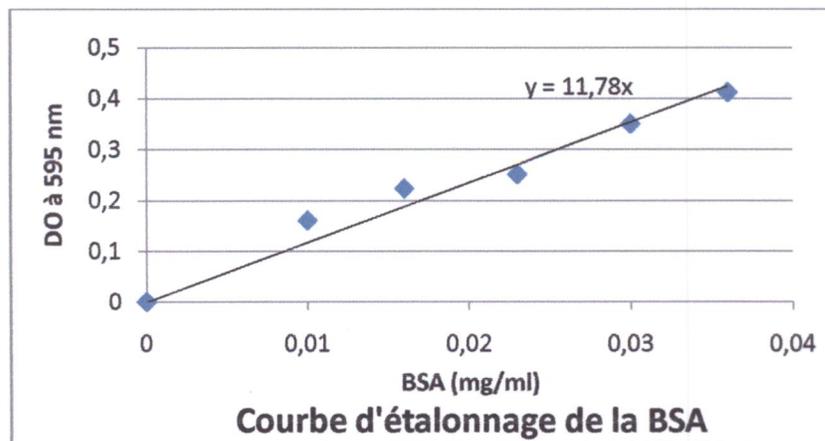
- **Réactif de Bradford**

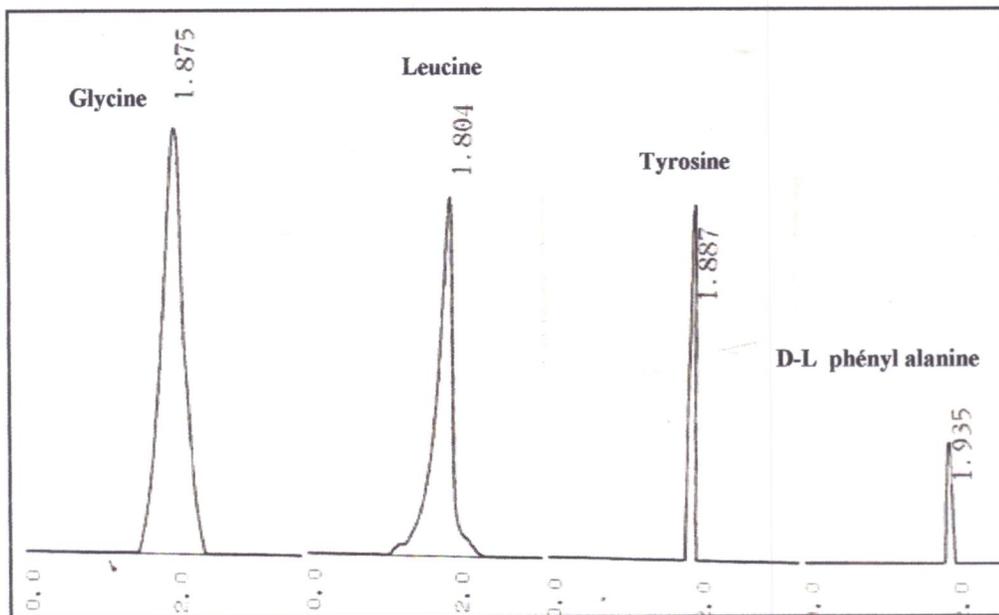
Pour un litre :

- Bleu de coomassie G250..... 10 mg
- Ethanol (95%).....50ml
- Acide phosphorique (85%).....100ml
- Eau distillée

## Annexe II

### Courbes d'étalonnage





Chromatogramme des acides aminés étalons

## Annexe III

Tableau 01 : Diamètre des zones de protéolyse des exoprotéases sur milieu Agar au lait.

souche	Diamètre (mm)		
	Natif	Chaleur	Froid
<i>Lb. buchneri</i> G8	18	12	12
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	18	14	06
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	19	10	15
<i>Lb. helveticus</i>	13	09	10
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	21	14	05
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	17	14	10
<i>Lb. plantarum</i> P117	21	12	14
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	16	10	09
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	19	10	10
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	18	10	11
<i>Lc. raffinolactis</i>	19	13	10
<i>Pc. acidilacticii</i>	20	08	18
<i>St. thermophilus</i>	15	05	10

Tableau 02 : diamètre des zones de protéolyse des endoprotéases sur milieu Agar au lait.

Souche	Diamètre (mm)		
	Natif	Chaleur	Froid
<i>Lb. plantarum</i> P117	26	19	22
<i>Lb. buchneri</i> G8	30	22	26
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	17	15	17
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	26	10	16
<i>Lb. helveticus</i>	20	09	17
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	28	16	26
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	30	20	26
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	26	10	23
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	24	10	15
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	24	09	22
<i>Lc. raffinolactis</i>	30	20	26
<i>Pc. acidilacticii</i>	32	15	26
<i>St. thermophilus</i>	24	19	13

**Tableau 03** : la concentration en protéines totales et l'activité protéasique.

DO Souche	Exoprotéases		Protéases liées à la paroi		Protéases intra cellulaires	
	DO à 595 nm	DO à 280 nm	DO à 595 nm	DO à 280 nm	DO à 595 nm	DO à 280 nm
<i>Lb. buchneri</i> G8	1.315	0.910	1.441	0.981	0.994	1.197
<i>Lb. helveticus</i> BJ431	1.412	0.899	1.035	1.001	1.125	1.203
<i>Lb. curvatus</i> BJ432	1.050	1.498	1.150	1.013	0.825	0.997
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 45	1.090	0.820	1.127	0.829	0.898	0.911
<i>Lb. helveticus</i>	1.258	0.825	1.172	0.732	1.121	0.978
<i>Lb. plantarum</i> BJ0021	1.080	0.729	1.058	0.880	0.896	0.917
<i>Lb. plantarum</i> P117	1.050	1.602	1.054	0.866	0.968	1.019
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHT24	0.970	1.385	0.979	1.075	1.002	0.988
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT25	1.116	0.756	0.921	0.997	0.991	1.011
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHT5	1.092	1.521	1.113	0.815	0.981	1.016
<i>Lc. raffinolactis</i>	1.242	0.922	1.119	0.993	1.119	1.239
<i>Pc. acidilacticii</i>	1.094	1.534	0.905	1.231	1.008	1.219
<i>St. thermophilus</i>	1.002	0.994	1.112	1.018	0.944	1.213

**Tableau 04** : Mesure de la croissance de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche Temps (h)	DO à 600 nm				
	<i>Lb. curvatus</i> BJ432	<i>Lb. buchneri</i> G8	<i>Lc. raffinolactis</i>	<i>St. thermophilus</i>	<i>Pc. acidilacticii</i>
2	0.083	0.056	0.075	0.094	0.047
4	0.112	0.291	0.304	0.365	0.099
6	0.431	0.705	0.687	0.718	0.218
8	0.798	1.003	1.072	0.946	0.667
10	1.254	1.267	1.229	1.144	1.013
12	1.863	1.994	1.769	1.597	1.898
14	2.126	2.135	2.019	1.983	1.959
16	2.126	2.289	2.019	2.201	1.959
18	2.126	2.289	2.019	2.201	1.959
20	2.009	2.289	1.901	2.201	1.949
22	1.711	2.102	1.607	2.18	1.802
24	1.476	1.899	1.315	1.953	1.561

**Tableau 05 :** Activité protéinasique de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche	<i>Lb. curvatus</i> BJ432	<i>Lb. buchneri</i> G8	<i>Lc.</i> <i>raffinolactis</i>	<i>St.</i> <i>thermophilus</i>	<i>Pc.</i> <i>acidilacticii</i>
DO à 660 nm	0.879	1.118	1.015	0.983	1.182

**Tableau 06 :** Effet de pH sur l'activité protéinasique de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche	pH	DO à 660 nm			
		5	6	7	8
<i>Lb. buchneri</i> G8		0.312	0.444	1.109	0.756
<i>Lb. curvatus</i> BJ 432		0.391	1.145	1.023	1.672
<i>Lc. raffinolacticii</i>		0.790	1.204	0.943	0.811
<i>Pc. acidilacticii</i>		0.424	0.956	1.289	0.805
<i>St. thermophilus</i>		0.571	0.872	1.167	0.691

**Tableau 07 :** Effet de la température sur l'activité protéinasique de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche	T(°C)	DO à 660 nm					
		10	20	30	37	42	50
<i>Lb. buchneri</i> G8		0.214	0.593	0.887	1.163	0.895	0.341
<i>Lb. curvatus</i> BJ 432		0.360	0.646	1.194	0.983	0.438	0.122
<i>Lc. raffinolacticii</i>		0.198	0.437	0.763	1.248	0.789	0.291
<i>Pc. acidilacticii</i>		0.427	0.810	1.436	1.199	1.531	0.192
<i>St. thermophilus</i>		0.103	0.329	0.776	1.185	1.303	0.694

**Tableau 08 :** Effet des cations divalents sur l'activité protéinasique de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche	Cation	DO à 660 nm			
		Cu <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Sans cation
<i>Lb. buchneri</i> G8		0.131	0.488	0.540	1.163
<i>Lb. curvatus</i> BJ 432		0.277	0.431	0.822	1.194
<i>Lc. raffinolacticii</i>		0.323	0.424	0.166	1.248
<i>Pc. acidilacticii</i>		0.182	0.281	0.447	1.436
<i>St. thermophilus</i>		0.581	0.233	0.620	1.303

**Tableau 09** : Effet de l'EDTA sur l'activité protéinolytique de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche	DO 660 nm	
	EDTA	Sans EDTA
<i>Lb. buchneri</i> G8	0.893	1.163
<i>Lb. curvatus</i> BJ 432	0.983	1.194
<i>Lc. raffinolacticii</i>	0.945	1.248
<i>Pc. acidilacticii</i>	0.963	1.436
<i>St. thermophilus</i>	0.811	1.303

**Tableau 10** : Activité autolytique chez *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii*.

Souche	D0 à 650nm		
	A <sub>0</sub>	A <sub>30</sub>	A <sub>180</sub>
<i>Lb. buchneri</i> G8	1.239	1.193	0.969
<i>Lb. curvatus</i> BJ 432	1.097	0.990	0.721
<i>Lc. raffinolacticii</i>	1.215	1.005	0.623
<i>Pc. acidilacticii</i>	1.167	1.010	0.714
<i>St. thermophilus</i>	1.184	1.038	0.801

**Tableau 11** : Diamètres des zones de protéolyse pour la trypsine.

Trypsine (g/ml)	Diamètre (mm)	Trypsine (g/ml)	Diamètre (mm)
0.00002	4	0.006	18
0.00005	6	0.012	20
0.0001	8	0.025	22
0.0002	10	0.05	23
0.0005	12	0.1	25
0.001	14	0.2	26
0.003	16		

**Tableau 12** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ 432 après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.868	11754160	540376	100

**Tableau 13** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ 432 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.922	4387423	298547	53.2501
2	2.171	3851849	150317	46.7499
Total		8239271	448864	100

**Tableau 14** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Pc. acidilacticii* après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.871	14483432	722207	100

**Tableau 15** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Pc. acidilacticii* après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.859	1367183	263194	15.5591
2	1.959	3115254	278029	35.4529
3	2.162	43045994	167610	48.988
Total		8787031	708832	100

**Tableau 16** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Lb. buchneri* G8 après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.1872	16499628	817602	100

**Tableau 17** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Lb. buchneri* G8 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	0.267	60691	1938	0.4179
2	1.903	14462472	520806	99.5821
Total		14523163	522744	100

**Tableau 18** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Lc. raffinolacticii* après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.032	477289	20755	2.7771
2	1.778	16709240	714002	97.2229
Total		17186529	734757	100

**Tableau 19** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *Lc. raffinolacticii* après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.849	7670744	334560	100

**Tableau 20** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *St. thermophilus* après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	0.112	1354	173	0.0133
2	0.787	2278	79	0.0224
4	1.826	101854772	552599	99.9644
Total		101858404	552851	100

**Tableau 21** : Analyse par HPLC de l'extrait enzymatique de *St. thermophilus* après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	1.135	1040553	32667	5.9843
2	1.857	16347459	762602	94.0157
Total		17388012	795269	100

**Tableau 22** : Analyse par CPG de l'extrait enzymatique de *Lb. curvatus* BJ 432 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Surface %	Longueur	Longueur %	m/z
1	2.024	1185872	8.53	412931	17.96	82.95
2	2.125	3633866	26.13	296292	12.88	44.00
3	2.333	444700	3.20	177954	7.74	44.00
4	2.408	1162259	8.36	147668	6.42	44.00
5	2.608	711713	5.12	67021	2.91	44.00
6	2.708	228770	1.65	31572	1.37	119.90
7	3.390	42198	0.30	28507	1.24	82.95
8	3.527	1149904	8.27	166114	7.22	82.95
9	12.074	59696	0.43	24819	1.08	97.10
10	13.666	49755	0.36	16913	0.74	57.05
11	13.926	117398	0.84	41138	1.79	149.10
12	15.057	198831	1.43	62818	2.73	149.10
13	15.230	60460	0.43	23018	1.00	97.10
14	15.663	46663	0.34	17827	0.78	83.00
15	16.100	137457	0.99	13450	0.58	97.15
16	16.291	158762	1.14	56256	2.45	97.10
17	16.783	71389	0.51	25267	1.10	57.05
18	17.283	90942	0.65	25929	1.13	82.95
19	23.277	306050	2.20	47553	2.07	97.10
20	24.675	4049923	29.12	616699	26.82	57.05
Total		13906608	100	2299746	100	

**Tableau 23** : Analyse par CPG de l'extrait enzymatique de *Pc. acidilacticii* après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Surface %	Longueur	Longueur %	m/z
1	2.073	2315028	13.79	226255	8.71	44.00
2	3.403	66530	0.40	40187	1.55	82.90
3	12.071	391860	2.33	38934	1.50	97.10
4	13.910	72756	0.43	26745	1.03	149.05
5	14.647	106038	0.63	30513	1.18	55.05
6	15.055	190437	1.13	52215	2.01	149.05
7	15.221	166052	0.99	52325	2.01	97.05
8	15.650	94644	0.56	30839	1.19	99.10
9	15.858	1426836	8.50	154337	5.94	149.05
10	16.150	164998	0.98	19961	0.77	57.00
11	16.288	353909	2.11	110703	4.26	97.10
12	16.452	199376	1.19	44382	1.71	57.00
13	16.788	169176	1.01	59841	2.30	57.05
14	17.293	118972	0.71	41654	1.60	55.00
15	18.560	168624	1.00	42201	1.63	97.10
16	20.823	132695	0.79	338090	1.31	97.10
17	21.253	304735	1.81	59072	2.27	97.10
18	23.019	6057687	36.07	880414	33.90	57.05
19	23.315	463777	2.76	71524	2.75	97.10
20	24.685	3828372	22.80	580852	22.37	57.05
Total		16792502	100	2596844	100	

**Tableau 24** : Analyse par CPG de l'extrait enzymatique de *Lb. buchneri* G8 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Surface %	Longueur	Longueur %	m/z
1	2.023	981095	18.52	409664	34.24	82.95
2	2.067	400576	7.56	276497	23.11	84.95
3	2.208	2170116	40.96	162298	13.57	44.00
4	2.342	310780	5.87	64594	5.40	44.00
5	15.948	481561	9.09	59633	4.98	149.00
6	16.292	204306	3.86	71689	5.99	97.10
7	16.796	109068	2.06	32920	2.75	57.05
8	20.822	108865	2.05	25988	2.17	97.10
9	23.315	214191	4.04	37999	3.18	97.10
10	24.680	318052	6.00	55132	4.61	57.05
Total		5298610	100	1196414	100	

**Tableau 25** : Analyse par CPG de l'extrait enzymatique de *Lc. raffinolacticii* après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Surface %	Longueur	Longueur %	m/z
1	2.641	179056	0.21	111443	0.30	40.00
2	3.250	209412	0.25	76628	0.20	47.95
3	3.403	7987020	9.49	3996365	10.58	82.95
4	3.473	22464001	26.71	14658745	38.82	82.95
5	4.675	872356	1.04	557159	1.48	116.90
6	5.133	43340417	51.52	15167577	40.16	81.95
7	9.710	4109375	4.89	2270350	6.01	116.90
8	15.234	249260	0.30	130810	0.35	116.90
9	24.692	4707737	5.60	794669	2.10	57.05
Total		84118634	100	37763746	100	

**Tableau 26** : Analyse par CPG de l'extrait enzymatique de *St. thermophilus* après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Surface %	Longueur	Longueur %	m/z
1	3.412	2139844	74.06	1265647	88.77	82.95
2	5.150	178253	6.17	36636	2.57	81.90
3	16.299	146497	5.07	50504	3.54	97.10
4	23.328	166195	5.75	27609	1.94	97.10
5	24.689	258484	8.95	45344	3.18	57.05
Total		2889273	100	1425740	100	

Présenté par :  
Bougherra Chafia  
Khenifar Ibtiissam

Encadré par :  
Dr. Idoui T.

Soutenu  
Le 04. 07. 2011  
A 14 : 00

**Thème : Etude et caractérisation de l'activité protéolytique chez quelques souches de bactéries lactiques**

### Résumé

Le système protéolytique joue un rôle essentiel dans le métabolisme de l'azote des bactéries lactiques dans le lait. L'activité protéolytique était recherchée chez une collection de 31 souches de bactéries lactiques locales isolées de différentes niches écologiques. 13 souches montrent une activité protéolytique sur différents milieux. L'activité protéolytique était mieux caractérisée chez *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* et *Pc. acidilacticii* afin de déterminer les facteurs influençant l'activité maximale et de rechercher les produits de dégradation des caséines du lait.

**Mots clés :** bactéries lactiques, enzyme protéolytique, caséine.

### Abstract

In milk the proteolytic system plays an essential role in nitrogen metabolism of lactic acid bacteria. The proteolytic activity was investigated in a collection of 31 local strains of lactic acid bacteria. Solely 13 strains showed proteolytic activity in different media. This activity was best characterized in *Lb. curvatus* BJ432, *Lb. buchneri* G8, *Lc. raffinolactis*, *St. thermophilus* and *Pc. acidilacticii* to determine the factors influencing the maximum activity and further more the degradation products of milk caseins.

**Keywords:** lactic acid bacteria, proteolytic enzyme, casein.

### ملخص

الحليب. لقد قمنا بدراسة لنشاط هذا النظام الإنزيمي البروتيني للبكتيريا اللبنية يلعب دورا أساسيا في هدم بروتينات المركب البروتيني عند 31 سلالة محلية من البكتيريا اللبنية معزولة من بيئات ايكولوجية مختلفة. أظهرت النتائج أن 13 سلالة لها نشاط إنزيمي بروتيني في أوساط زرع مختلفة. هذا النشاط تمت دراسته بدقة عند *Lb. curvatus* BJ432، *Lb. buchneri* G8، *Lc. raffinolactis*، *St. thermophilus* و *Pc. acidilacticii* من أجل تحديد العوامل المؤثرة على نشاطه الأقصى بالإضافة إلى نتائج هدم كازيينات الحليب.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا اللبنية، الإنزيم البروتيني ، كازيين.