

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun -Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présentées par :

TADJER Nessrine

SEBA Kheira

Thème :

**Etude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques conservées
dans le laboratoire de Microbiologie de l'université Ibn Khaldoun -
TIARET-**

Soutenu publiquement le /06/2023

Jury		Grade
Président	Mr HOCINE.L	MCA
Encadrant	Mme MOULAY.M	MCA
Co-encadrant	Mr BENBEGUARA. M	MAA
Examineur	Mr ABBES.M.A	MCA

Année universitaire 2022-2023

REMERCIEMENT

Nous remercions d'abord ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la bonne santé pour accomplir ce travail dans les meilleures conditions.

La réalisation de ce mémoire a n'a été possible que grasse a la collaboration d'un certain nombre de personnes en particulier notre promotrice MOULAY. M pour sa patience, sa disponibilité durant la période de la préparation de ce travail et notre Co-promoteur BENBEGUARA.M son soutien moral et ces consignes.

Nous remercions MRHOCINE.L le responsable de l'équipe de formation master microbiologie appliquée et maître de conférences à Université de Tiaret que nous avoir fait l'honneur de présider le jury

Nous exprimons toute notre gratitude ABBES.M.A maître de conférences à université de Tiaret que nous tiens à remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, nos vifs remerciements s'adressent également à toutes les personnes qu'on contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce document.

DEDICACES

Du plus Profond de mon cœur, Je tiens à dédier ce modeste travail à tous ceux qui m'ont encouragé durant toutes mes études

*A mes chers merveilleux parents **Mohamed** et **Malika***

Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect. Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi

Aucun mot ne saurait décrire mon immense amour, ma gratitude et ma profonde considération pour tous les sacrifices que vous avez consenti à mon égard, mon instruction et mon bien être, pour tous vous encouragements dès le début de mes études.

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vœux tant formulés
Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A mes chères sœurs **Maha**, **Linda***

*A mon unique frère : **Abdel Malek Rabeh***

A mes chers(es) amis(es), et ma famille

*Je dédie ce travail, aussi, à mon binôme **Tadjer Nessrine** avec laquelle j'ai réalisé ce travail pour ses efforts et les moments passés ensemble. A tous ceux que je n'ai pas cités ici et qui ont une place dans mon cœur.*

KHEIRA

DIDICACE

Tout d'abord, el hamdolillah ; m'a orienté vers le droit chemin le long de mon travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études.

*À mon cher Papa **Hamid***

Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et tout les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être et tu m'as toujours encouragée et donné envie d'aller plus loin.

*À ma chère maman **Yamina***

Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne, mon parcours et qu'était mon ombre durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.

Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude pour ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir,

Puisse Dieu vous bénisse et vous protège.

*À mes adorables sœurs : **Fatima et Aya***

*À mes petits frères : **Mohamed Amine et Zakaria Ahmed***

*À ma chère tante **Khadem**, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait*

*À mes grand-mères surtout **Fatima** qui ma encouragée depuis mon enfance*

*À mes tentes **Khadidja, Khaldia, Mokhtar, Mbaraka, Souaad**, et mon tonton **MOHAMED***

*À mes cousins et cousines : **Habiba, Mokhtar, Mohamed, Ikram, Hanane, Soundous, Miral, Ratil, Assil et Assinet.***

*À mon amie **Seba Kheira** avec laquelle j'ai partagé tous les bons moments de mon cursus. Tu as toujours été soucieuse de mon parcours. Merci infiniment pour ta sympathie, tes conseils et ton soutien constant.*

À tous(es) mes amis(es),

À tous ceux qui m'aiment,

À tous ceux que j'aime,

A tous ceux que je n'ai pas cités ici et qui ont une place dans mon cœur.

Je dédie ce modeste travail...

NESSRINE

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Différentes caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques.	4
02	Le matériel de laboratoire utilisé : appareillage, milieux de culture, verreries et autres.	8
03	Aspect morphologique des souches sélectionnées	17
04	Résultats des tests physiologiques des souches	18
05	Les résultats de lait de Sharman à 0.1 et 0.3%, type fermentaire, et croissance à pH 9.6.	19
06	Identification des souches de bactéries lactiques.	24
07	Diamètre de la zone d'hydrolyse des bactéries protéolytiques.	26
Liste des tableaux des annexes		
08	Composition de milieu MRS	01
09	Composition de milieu M17	01
10	Composition de milieu PCA	01
11	Composition de bleu de méthylène	02
12	Préparation du Lait écrémé	02

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (<i>Lactococcus</i>)	5
02	Protocole expérimental	12
03	Aspect des colonies des bactéries isolées obtenus après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.	15
04	Aspect des cultures pures des bactéries lactiques. La culture se développe mieux en profondeur où la pression de l'oxygène est faible.	16
05	Observation microscopique des bactéries à Gram+ après purification Objectif (×100).	17
06	La thermorésistance	20
07	Aspect des cultures des bactéries lactiques en milieu hypersalé	20
08	Résultats de tests de laits de Sherman, la réduction de bleu de méthylène est observée par le virage de couleur bleu.	21
09	Test de la fermentation avec milieu MRS liquide contenant la cloche de Durham	22
10	Croissance de culture à pH=9.6	22
11	: apparition des zones d'hydrolyse des protéines de lait écrémé sur milieux MRS et PCA par les bactéries lactiques sur différentes concentrations (10% et 20%)	24
12	Absence des zones d'hydrolyse des protéines de lait écrémé sur milieu PCA 10%	25
Liste des figures des annexes		
13	Milieux MRS et M17	03
14	Les étapes de coloration de Gram	03
15	Résultat final de coloration de Gram sur la lame	03
16	Observation microscopique des bactéries à Gram+ après purification Objectif (×100), souche Ma ₁₇	03
17	Observation microscopique des bactéries à Gram+ après purification Objectif (×100), souche Str4	03
18	Apparition des zones d'hydrolyse des protéines de lait écrémé sur milieu MRS de concentrations 10%	04

Liste d'abréviation

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate

BM : Bleu de méthylène

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

GC % : Pourcentage de guanine et cytosine

MRS : Man, Rogosa, Sharpe.

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

PCA : Plate Count Agar.

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	II
Liste des figures	III
Introduction	1

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique

1. Bactéries lactiques	3
1.1. Définition	3
1.2. Principales caractéristiques	3
2. Activité et pouvoir protéolytique	4
3. Intérêt technologique de l'activité protéolytique des bactéries lactique	5

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Objectif de travail	7
2. Lieu et période de travail	7
3. Matériel	7
3.1. Matériel biologique	7
3.1.1 Bactéries lactiques	7
3.1.2 Lait écrémé	7
3.2 Matériel de laboratoire	7
4. Méthodes	9
4.1 Protocole expérimentale	9
4.2 Repiquage et revivification souches	10
4.2.1 Purification des souches	10
4.2.2 Ré-identification des souches	10
4.3 Etude morphologique	10
4.3.1 Etude macroscopique	10
4.3.2 Etude microscopique	11
4.4 Étude biochimique physiologique	11
Test de la catalase	11
4.5 Conservation des souches	12
4.5.1 Conservation de courte durée	12
4.5.2 Conservation de longue durée	12
4.6 Test de citrate	12
4.7 Lait de Sherman	12
4.8 Croissance en condition hostiles	13
4.8.1 Test de thermorésistance	13
4.8.2 Croissance à pH 9.6	13
4.8.3 Croissance en bouillon hypersalé	13
4.9 Test du type fermentaire	13
4.10 La protéolyse sur milieu solide	14

Chapitre II : Résultats et discussion

I- Caractérisation des souches	15
1. Caractérisation morphologique	15
1.1 Caractéristiques macroscopiques	15
1.1.1 Sur milieu solide	15
1.1.2 Sur milieu liquide	15
1.2. Caractérisation microscopique	16

2. Tests biochimiques et physiologiques	18
2.1. Test de la thermorésistance	19
2.2. Croissance en milieu hypersalé	20
2.3. Croissance sur le lait de Sherman	21
2.4. Type fermentaire	21
2.5. Croissance à pH 9,6	22
II. Détection de l'activité protéolytiques	24
Conclusion	28
Références bibliographiques	30
Annexes	
Résumé	

Introduction

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques font partie intégrante de notre environnement et de notre régime alimentaire. Il s'agit d'un groupe d'espèces hétérogènes dont la caractéristique commune est la production d'acide lactique au moyen de la fermentation des sucres (**Djerdir et Nasri, 2018 ; Solanki et Hati, 2018**). La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés et leur confère une saveur typique (**Labaoui et al., 2005**).

L'acidification, la production d'acides organiques et d'autres composés antimicrobiens, telles que les bactériocines, jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes ou des contaminants (**Dortu et Thonart, 2009**).

L'importance des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire est indéniable. Elles confèrent aux produits finis des caractéristiques organoleptiques et texturales spécifiques, améliorent la conservation des aliments et apportent des bénéfices pour la santé en favorisant la digestion et en renforçant le système immunitaire. Cependant, il convient de mentionner que l'utilisation des bactéries lactiques à des fins industrielles n'est pas sans coût économique. La production de bactéries lactiques localement peut jouer un rôle essentiel dans la réduction des coûts d'importation ; cela conduit à trouver dans quelle mesure les souches lactiques conservées maintiennent-elles leur propriété protéolytique au fil du temps, et quels facteurs influencent la stabilité de cette activité enzymatique ?

La caractérisation des activités métaboliques et leur exploitation en transformation laitière ainsi que pour la production des bio-ingrédients fonctionnels constituent des axes de recherche universelle. La sélection de nouvelles souches de bactéries lactiques d'intérêt technologiques passe obligatoirement par l'étude de leur capacité à se multiplier dans le milieu lait. C'est dans ce dernier milieu que les bactéries lactiques doivent trouver un certain nombre de nutriments nécessaires à leur croissance, en particulier les acides aminés pour les quelles sont auxotrophes (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

L'activité protéolytique est la principale fonction identifiée comme essentielle à la croissance optimale des bactéries lactiques dans le lait, en particulier chez les lactocoques envers la nutrition azotée. Ainsi, la présence d'une protéase de paroi, d'un transporteur d'oligopeptides et de certaines peptidases intracellulaires sont nécessaires et permettent un

Introduction

développement rapide des bactéries dans le lait. Les voies de biosynthèse de l'aspartate et des bases puriques sont également identifiées comme nécessaires pour une croissance optimale dans le lait (**Morino *et al.*, 2003**).

La protéolyse joue un rôle majeur dans le développement des propriétés organoleptiques du fromage et dans les phases d'affinage et de maturation d'une vaste gamme de produits laitiers (**Kalbaza, 2018 ; Meghoufel, 2019**).

Dans ce contexte nous avons pensé à mener notre travail qui vise à réidentifier et sélectionner des souches lactiques possédant une activité protéolytique, conservées dans le laboratoire de microbiologie -Tiaret-.

Première partie
Synthèse bibliographique

1. Bactéries lactiques

1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles tirent leur appellation du fait qu'elles se nourrissent de glucides et produisent des quantités considérables d'acide lactique comme sous-produit métabolique par la dégradation des sources hydrocarbonées comme les sucres, alcools et acides organiques (Desmazeaud, 1996; Euzeby, 2002; George *et al.*, 2018).

Ces bactéries sont des cocci ou des bâtonnets, à Gram+, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni oxydase (certaines souches ont une pseudo-catalase). Elles sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles, notamment dans la production de produits alimentaires, augmenter leurs valeurs nutritives et la durée de conservation, réduire les substances nocives, (Novel, 1993; Zhen *et al.*, 2021).

Selon Garnier et Denis (2011) et Mokoena (2017), les bactéries lactiques regroupent 60 genres comprennent plus de 168 espèces, se présentant sous forme de cellules sphériques ou ovoïdes de moins de 2 micromètres de diamètre, elles ont un aspect caractéristique en paires (diplocoques), en chainettes ou tétrades, fréquemment rencontrés dans la fermentation des aliments distincts : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Entérocooccus*.

1.2. Principales caractéristiques

Caractéristiques morphologiques, les bactéries lactiques peuvent être caractérisées par leurs tailles, leurs formes et leurs couleurs. Ce niveau est important pour comprendre la structure et l'organisation cellulaire (Zhen *et al.*, 2021).

Caractéristiques biochimiques, les bactéries lactiques peuvent être caractérisées par leur profil enzymatique, leur capacité à fermenter différents sucres et leur production de métabolites spécifiques.

Caractéristiques moléculaires, les bactéries lactiques peuvent être caractérisées par leurs séquences d'ADN. Des techniques telles que la PCR (Polymérase Chain Reaction) et le séquençage de l'ADN peuvent être utilisées pour identifier les bactéries lactiques à l'aide de marqueurs moléculaires spécifiques.

(Bin Masalam *et al.*, 2018). Le tableau 1 illustre les différentes caractéristiques des bactéries lactiques

Tableau 1 : différentes caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques (Leveau et Bouix, 1993).

Caractérisation Genre	Forme	Arrangement	Fermentation	ADN : GC %
<i>Streptococcus</i>	Coque	Chaîne	Homolactique	34-64
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Chaîne	Hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	Tétrade	Homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Chaîne	Homo/hétéro	32-53
<i>Lactococcus</i>	Coque	Diplo ou en chaînes	Homolactique	32-53

2. Activité et pouvoir protéolytique

En raison de leur charge et de leur poids moléculaire, les oligopeptides, sans parler des protéines, ne peuvent pas pénétrer les enveloppes cellulaires microbiennes et les membranes cellulaires, en particulier la membrane plasmique. Ainsi, pour être utilisés, ils doivent d'abord être hydrolysés par des systèmes protéolytiques soit extracellulaires soit associés à la paroi cellulaire (Garde *et al.*, 2002).

L'activité protéolytique est l'une des principales activités des bactéries lactiques et fait référence à leur capacité à cliver les protéines (liaisons peptidiques) en peptides et acides aminés en utilisant les peptides les plus courts qui ont été délivrés dans la cellule. La caséine doit être hydrolysée en acides aminés constitutifs par des enzymes protéolytiques. Leurs activités doivent être contrôlées et spécifiques afin d'éviter des effets néfastes sur la qualité et les caractéristiques du produit.

Selon ECK *et al.*, (1987), les protéases localisées à la surface des bactéries assurent l'hydrolyse partielle de la caséine en polypeptides capables de diffuser à travers la paroi. Ces polypeptides sont ensuite dégradés par des peptidases, situées sur ou au voisinage de la membrane cytoplasmique en molécules composées de cinq à six résidus d'acides aminés capables de migrer à travers cette membrane. Des peptidases cytoplasmiques où associées aux

ribosomes complètent ensuite l'hydrolyse, la figure 01 résume l'utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (*Lactococcus*).

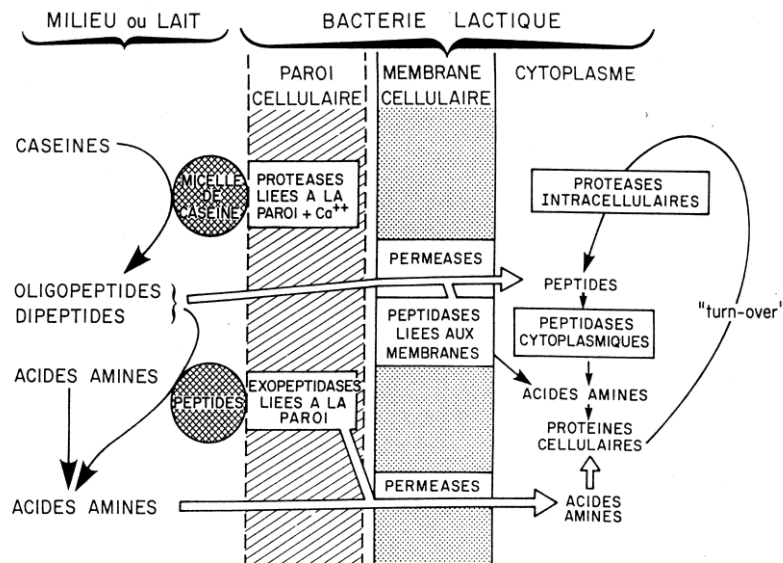


Figure (01) : Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (*Lactococcus*) (Desmazeaud, 1983).

Le niveau de ces activités protéolytiques peut varier en fonction des conditions environnementales de croissance telles que le pH du milieu, la température, la concentration en protéines dans le milieu nutritif, la composition du milieu de culture et le type de souche (Law et Kolstad, 1983; Desmazeaud, 1996; Chistensen et al., 1999; John, 2014)

Plusieurs enzymes protéolytiques ont été trouvées chez les bactéries lactiques et leur localisation cellulaire a été déterminée : Protéases et peptidases extracellulaires ou liées aux enveloppes cellulaires ; Protéinases et peptidases intracellulaires.

Selon Lopez, (2008), les protéases et les peptidases peuvent être classées selon trois critères différents :

- Leur besoin en ATP (adénosine triphosphate)
- La nature de leur site catalytique
- La spécificité de la séparation

3. Intérêt technologique de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques sont importants dans les procédés de maturation des produits qui donnent aux aliments leurs propriétés et caractéristiques organoleptiques (la texture, la saveur des aliments et la production de composés aromatiques)

et l'utilisation de ces bactéries en industrie alimentaire est déterminée par leurs propriétés technologiques (**Law et Kolstad 1983; Ennadir *et al.*, 2014**).

Donc les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans la production de nombreux fromages et de laits fermentés. Elles interviennent par la production d'acide lactique et elles participent à la production de composés d'arômes ou de leurs précurseurs (**Desmazeaud, 1983**). Il apparaît donc naturel de sélectionner les bactéries lactiques sur leurs aptitudes à produire de l'acide lactique et à dégrader les protéines, ce qui est l'une des caractéristiques intervenant lors de l'affinage des fromages

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

1. Objectif de travail

Les objectifs de notre travail visent à traiter les points suivants :

- Purification et ré-identification des souches lactiques conservées dans le laboratoire de microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie -Tiaret-.
- Vérification de l'activité protéolytique avec deux concentrations de lait écrémé 10% et 20% en utilisant deux milieux de cultures à savoir PCA et MRS.

2. Lieu et période de travail

Les travaux de notre partie expérimentale sont effectués au sein des laboratoires de microbiologie et de biochimie au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun -Tiaret-, Pendant une période de 45 jours allant du 01/02/2023 jusqu'au 15/03/2023.

3. Matériel

3.1. Matériel biologique

3.1.1 Bactéries lactiques

Un échantillonnage composé de 28 espèces bactériennes provient de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran. Elles ont été isolées à partir de lait cru de chèvre, prévenant des fermes de la région de Tiaret et d'Oran, repiquées et conservées de longue durée dans le laboratoire de microbiologie -Tiaret-.

3.1.2 Matière premier : Lait écrémé

La poudre de lait écrémé utilisée de notre partie expérimentale a été ramenée de la laiterie Sidi Khaled Tiaret.

3.2 Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé pour la réalisation de notre travail est représenté dans le tableau 2

Tableau 2 appareillage, milieux de culture, verreries et autres

Appareillage	Milieux de cultures et réactifs	Verreries	Autres
<ul style="list-style-type: none"> • Etuve (Mammert) • Bain marie (Mammert) • Agitateur chauffant (Arec) • Balance électrique (Ohaus) • pH mètre (Hanna hi 2210) • Réfrigérateur (Iris) • Autoclave • Centrifugeuse (Hettich Universal 320) • Microscope optique (Leica DM500) 	<ul style="list-style-type: none"> • MRS et M17 (liquide et solide) PCA (voir annexe 01) • Extrait de levure • Bleu de méthylène • NaOH • NaCL • Violet de gentiane • Lugol • Alcool • Fuchsine 	<ul style="list-style-type: none"> • Béchers • Eprouvettes graduées • Tubes à essai • Flacons • Lames • Pipettes graduées • Pipettes pasteur • Entonnoirs 	<ul style="list-style-type: none"> • Anse de platine • Seringues • Spatules • Bec bunsen • Boîtes de pétri • Pissettes • Pincés • Cloches de durham • Portoirs

4. Méthodes

4.1. Protocole expérimental

Les étapes de notre partie expérimentale sont résumées dans le protocole illustré dans la figure ci- dessous

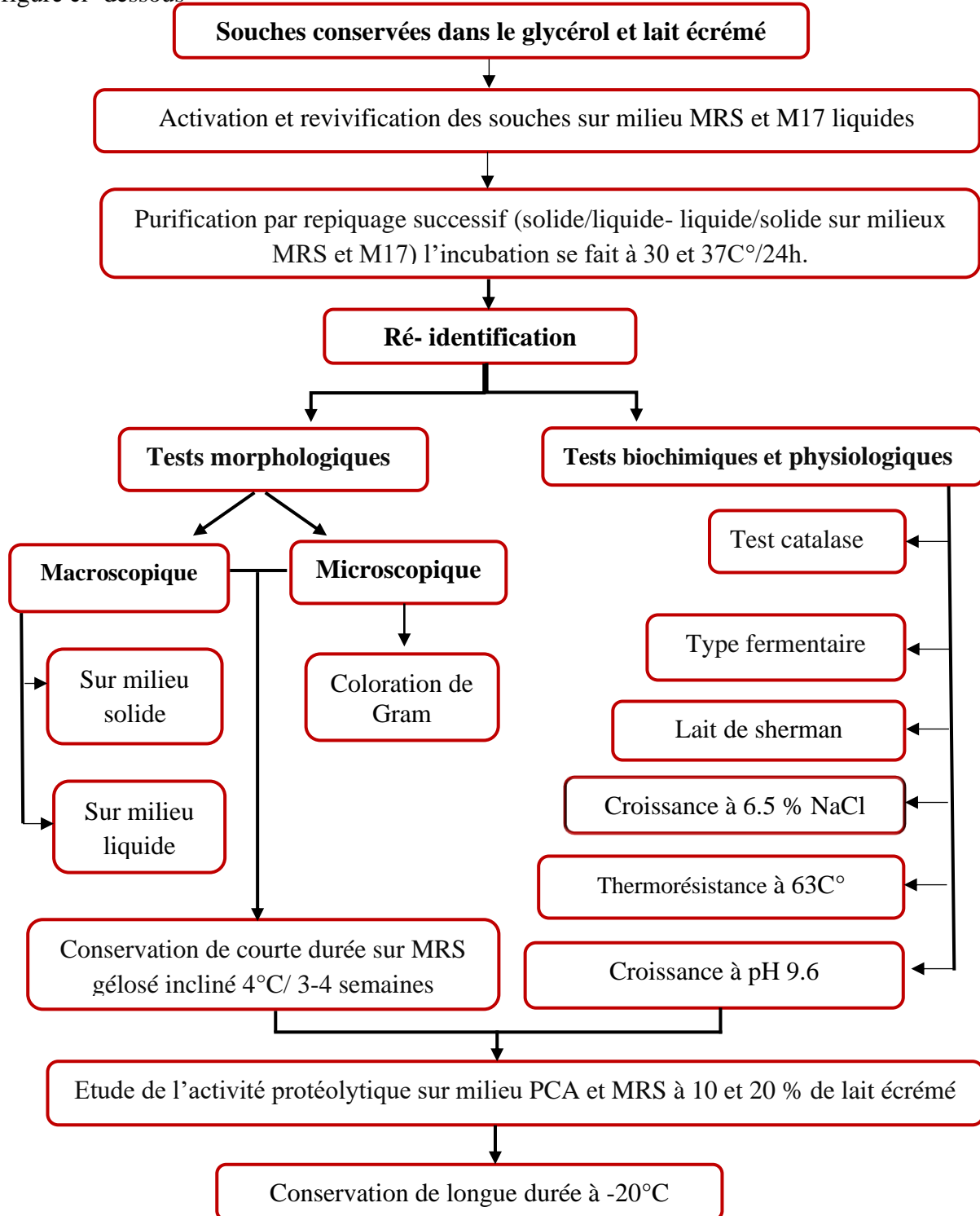


Figure 02 : Protocole expérimental

4.2. Repiquage et revivification des souches

Les souches utilisées sont sous forme congelée en cultures pures additionnées de lait écrémé et glycérol. Elles sont activées par repiquage selon **Guiraud, (1998)** comme suit :

- Introduire une goutte d'inoculum dans 5 ml de milieu de croissance, le plus souvent M17 bouillon pour les lactocoques et les streptocoques ; bouillon MRS pour les leuconostocs.
- Incubation à 30°C pour les lactocoques et leuconostoc et 37°C pour les streptocoques pendant 24 h.

4.2.1. Purification des souches

Cette technique consiste à effectuer des repiquages sur bouillon MRS et M17. Après la croissance des bactéries on procède à la purification sur milieux solides MRS et M17.

Après l'incubation à 30°C et 37°C pendant 24h, les colonies présentent des aspects morphologiquement différents (de 4 à 6 colonies), ont été purifiées par les méthodes des stries sur milieux solides MRS et M17 (**Badis *et al.*, 2005**).

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques (coloration de Gram) avec une recherche de la catalase après chaque repiquage. Toutes les souches à Gram positif et catalase négative sont retenues pour la suite des analyses. (**Idoui *et al.*, 2009**).

4.2.2 Ré-identification des souches

Les cellules sélectionnées subissent une identification macroscopique, microscopique, biochimique et physiologique.

L'ensemencement à partir des cultures jeunes se fait en milieux solides MRS et M17, l'incubation à 30 et 37°C pendant 24 à 48 h (**Badis *et al.*, 2004**)

4.3 Etude morphologique

4.3.1 Etude macroscopique

L'étude macroscopique permet de décrire les cultures bactériennes sur milieu solide et liquide.

Les 28 souches utilisées dans notre partie expérimentale ont été purifiées sur milieu MRS et M17. La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide MRS après 24h d'incubation à 30°C et 37°C et de déterminer les critères relatifs

aux colonies des bactéries lactiques (taille, contour, aspect, couleur) et montre le caractère microaérophile qui se manifeste sous forme d'un trouble. (**Zarour et al., 2012; Holzapfel et Wood, 2014**).

4.3.2 Etude microscopique

Cet examen repose sur la coloration de Gram qui nous s'assurer de la pureté des souches et de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, leurs morphologies et le mode de regroupement (**Zantar et al., 2013; Belhamra, 2017**).

Selon **Larpent, 1990** ce test se réalise comme suit :

Réaliser une suspension à partir d'une culture jeune et prélever une aliquote de suspension à l'anse de platine puis on la pose par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame, après sécher et fixer par la chaleur à l'aide de bec Benzen, ensuite ajouter quelque goutte de violet de gentiane sur le frotti fixé pendant 1 min, rincer et ajouter de lygol pendant 1 min.

Verser goutte à goutte l'alcool, laisser agir 07 secondes, puis rincer avec de l'eau distillée.

Enfin recolorer à la fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau distillée, après séchage on passe à l'observation microscopique.

4.4 Étude biochimique et physiologique

4.4.1 Test de la catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) celui-ci est très toxique. Certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Selon **Marchal et al., (1991); Ahirwar et al., (2017)**, Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase négatif) des autres bactéries (catalase positif). La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2), ce test consiste sur les étapes suivantes :

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer à l'aide de l'anse de platine une colonie isolée (ou plusieurs) de la souche à tester, puis dissocier.
- Observer l'apparition de bulles.

4.5 Conservation des souches

Pour permettre la continuité de notre travail, les souches purifiées doivent être bien conservées, et selon la durée de la conservation on applique 2 techniques : conservation de courte durée et de longue durée.

4.5.1 Conservation de courte durée

Les souches sont conservées dans le milieu MRS solide incliné dans des tubes à essais stériles. Après ensemencement et incubation en condition optimale de 30 et 37° C pendant 24h à 48h, les tubes sont conservés au réfrigérateur à (-4°C) pendant 3 à 4 semaines, et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Leclerc *et al*, 1977; Badis, 2004**).

4.5.2 Conservation de longue durée

On ensemence les souches dans un milieu de base liquide. Après incubation en condition optimale, on centrifuge la culture jeune dans des tubes Eppendorfs à 3000 tours pendant 5 minutes et on ajoute au culot obtenu le mélange de 70% lait écrémé et de 30% glycérol pure puis on conserve à (-20°C) au congélateur (**Kihal, 1996; Moulay *et al.*, 2006**).

4.6 Test de citrate

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

La pente du milieu est ensemencée sous forme de strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30°C et 37°C pendant 24 h à 72 h. En cas de réaction négative, ré-incubé encore 24 h (**ISO, 2003**).

4.7 Test de lait de Sherman

Cet examen a pour but d'étudier l'aptitude des bactéries lactiques à pousser en présence de 0,1% et 0,3% du bleu de méthylène ainsi que leur capacité à le réduire. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer (**Bekhouche, 2006**).

On ensemence les isolats purs dans le lait écrémé stérile à 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène, l'ensemble incube à 30°C et 37°C pendant 24 à 48h.

Les résultats positifs sont définis par la coagulation du lait et la réduction du colorant. Ce test est surtout intéressant pour différencier les streptocoques fécaux et les lactocoques. (Guthamam, 1991; Badis *et al.*, 2004; Siezen *et al.*, 2005; Joffin et Leyral, 2006; Mami *et al.*, 2008).

4.8 Croissance en conditions hostiles

4.8.1 Test de thermorésistance

Le test de croissance consiste à ensemencer les souches bactériennes dans des tubes à essais contenant le bouillon MRS, puis à les incuber à 63.5°C pendant 30 min au bain marie pour la différenciation entre les souches lactiques mésophiles et les souches thermophiles. (Guiraud, 2003; Bennani *et al.*, 2017).

L'absence du trouble indique un résultat négatif qui définit des souches mésophiles, alors que le trouble résulte de la croissance des souches thermorésistantes (Badis *et al.*, 2004; Joffin et Leyral, 2006).

4.8.2 Croissance à pH 9.6

Le milieu MRS à pH 9,6 est ensemencé par des cultures jeunes et incubé à 30 et 37°C pendant 24h généralement les bactéries lactiques ne peuvent pas croître dans un milieu basique (Mathara *et al.*, 2004).

4.8.3 Croissance en bouillon hypersalé

Ce test est réalisé par ensemencement du milieu MRS additionné de 6,5% NaCl à partir de culture jeune. L'incubation se fait à 30 et 37°C pendant 24 à 48h. Au contraire des entérocoques, les bactéries lactiques sont sensibles au milieu hypersalé (Mathara *et al.*, 2004).

4.9 Test du type fermentaire

Ce test permet de donner la nature de la fermentation des sucres ; homofermentaire ou hétérofermentaire.

On incube la souche à tester dans le milieu MRS liquide contenant la cloche de Durham à 30 et 37°C pendant 24h, le développement des bactéries hétérofermentaires se manifeste par

l'apparition du gaz dans la cloche de Durham, et qui est absent chez les bactéries homofermentaires (**Bourgeois *et al.*, 1991**).

4.10 La protéolyse sur milieu solide

Une fois les souches des bactéries lactiques sont pures les tests de détection de l'activité protéolytique sont réalisés selon **Moulay *et al.*, (2006)**.

On ensemence 2 microlitres de la culture de chaque bactérie à l'aide d'une micropipette sur les milieux suivants : MRS et PCA à 10 et 20% de lait écrémé, qu'on incube à 30 et 37°C pendant 24 à 48h (**Moulay *et al.*, 2006**).

L'apparition d'un halo clair autour des touches révéla l'activité protéolytique et permet en même temps de déceler et classer les souches protéolytiques.

La grandeur de diamètre de la zone d'hydrolyse indique l'intensité de l'activité protéolytique ce qui permet de classer les souches retenues selon leur pouvoir protéolytique (**Huggins et Sandine, 1984; Moulay, 2005**).

Chapitre II

Résultats et discussion

I- Caractérisation des souches

1. Caractérisation morphologique

L'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont la base de la détermination du genre et de l'espèce dans certains cas, les figures (03, 04 et 05) montrent les aspects micro et macroscopiques des souches étudiées.

1.1 Critères macroscopiques

1.1.1 Sur milieu solide

L'observation des colonies a permis de distinguer des colonies bien séparées, blanchâtres ou légèrement jaunâtres, lenticulaires et de tailles variables, avec un diamètre d'environ 1 mm (Figure 03).

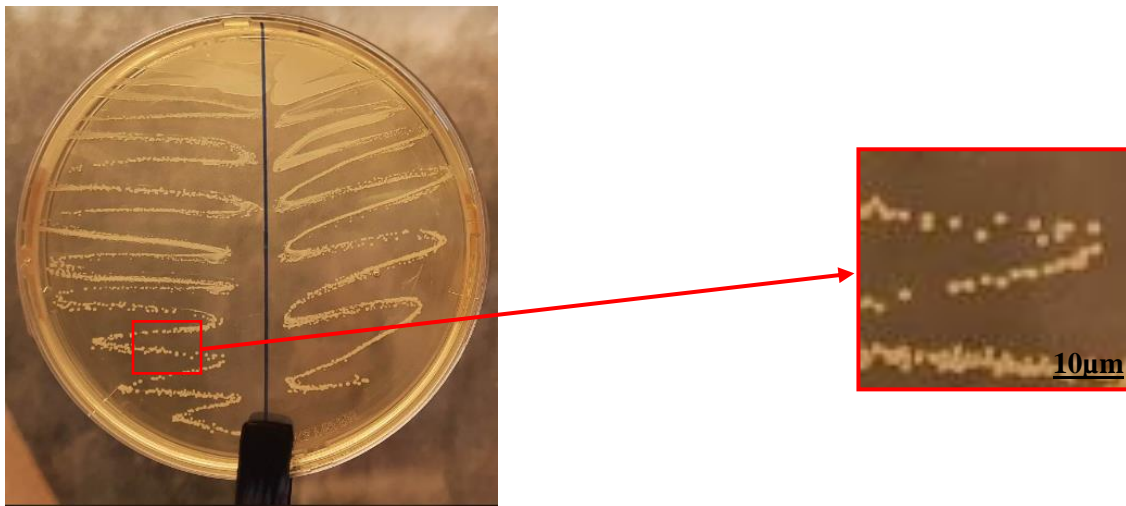


Figure 03 : Aspect des colonies des bactéries isolées obtenues après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.

1.1.2 Sur milieu liquide

L'observation visuelle de la croissance des bactéries lactiques dans les milieux liquides MRS et M17 montre que le caractère anaérobie et microaérophile des bactéries lactiques se manifeste sous forme d'une turbidité au fond du tube (Figure 04

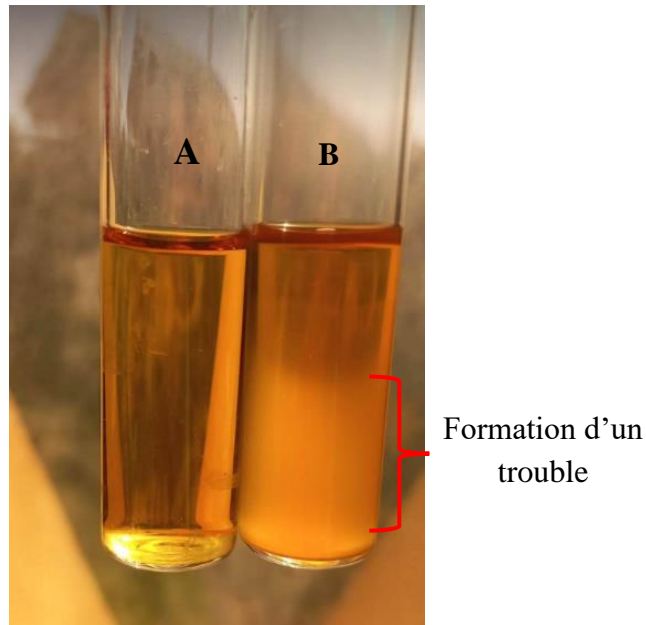


Figure 04 : Aspect morphologique des cultures pures des bactéries lactiques en milieu liquide. La culture se développe mieux en profondeur où la pression de l'oxygène est faible
A : Témoin B : Culture bactérienne

1.2 Caractérisation microscopique

Après coloration de Gram l'observation microscopique des cellules (annexe 03), révèle que toutes les souches isolées sont Gram positive, en formes de coques, l'arrangement cellulaire est variable : disposées en diplocoques et en courtes chaînettes, qui sont les caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques.

Tableau 03 et la figure 05 illustrent l'aspect microscopique des bactéries lactiques.

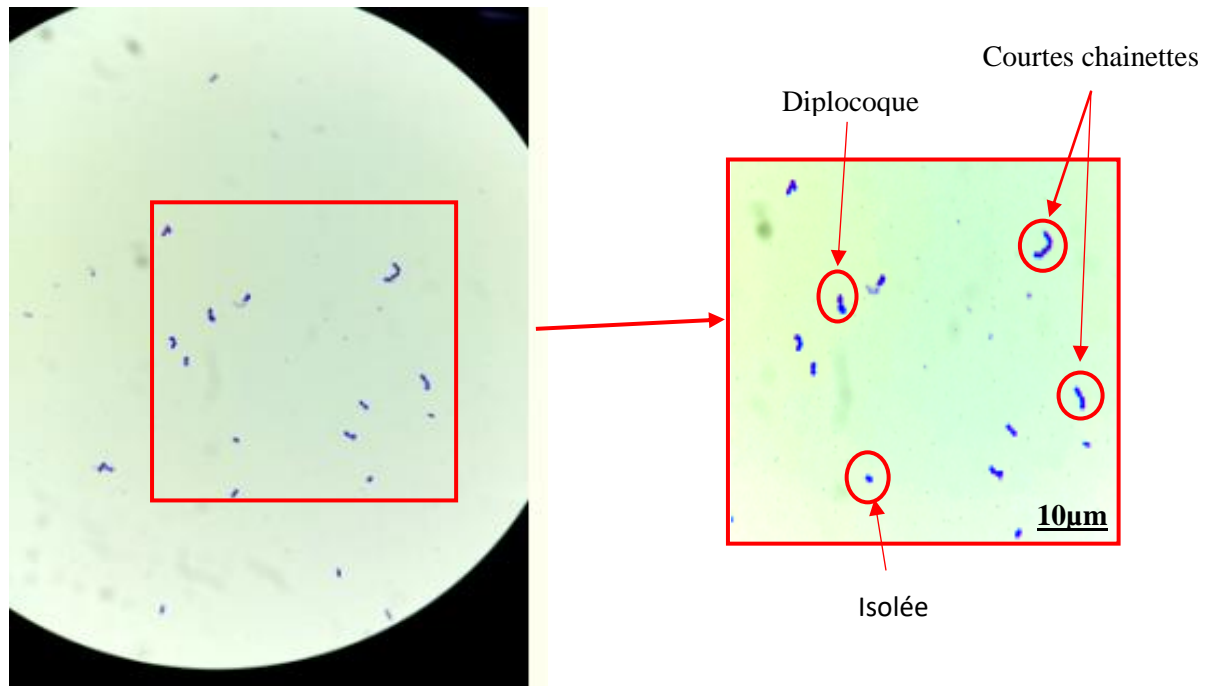


Figure 05: Observation microscopique des bactéries à Gram+ après purification (G×100)

Tableau (03) : Aspect morphologique des souches sélectionnées

Codes des souches	Aspect de la colonie	Gram	Morphologie cellulaire Arrangement
D19⑤1, D19⑤2	Lenticulaire crème	+	Cocci, diplo, courtes chainette
Ma12.1, Ma12.2, Ma12.3, Ma14.1, Ma14.2, Ma16.1, Ma16.2, Ma16.3, Ma17.1, Ma17.2, Ma27.1, Ma27.2,	Lenticulaire crème	+	Cocci, diplo, courtes chaînes
SD178.1, SD178.2, SD178.3, SD173	Lenticulaire crème	+	Cocci, diplo, courtes chaînes
Str.1, Str.2, Str.3	Lenticulaire crème	+	Cocci, diplo, courtes chaînes
Str4, D19.8.1, D19.8.2, D19.7, D19.3, D19.1.1, D19.1.2	Pas de croissance		

Parmi les 28 souches isolées, 21 ont été retenues pour la recherche de la catalase. Nos résultats indiquent une réaction négative (absence de dégagement de bulles), ce que signifie que les souches étudiées sont à catalase négative.

Nos résultats de ce test sont identiques à ceux de **Bourgoi, (1996); Guiraud, (1998) et Boudali et al., (2008)**.

2. Tests biochimiques et physiologiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des 21 souches sont résumés dans les tableaux (04 et 05).

Tableau (04) : Résultats des tests physiologiques des souches

Souches	Croissance à 30 °C	Croissance à 37°C	NaCl 6.5 % hypersalé	Thermo résistance
D19(5).1	+	/	-	-
D19(5).2	+	/	-	-
Ma12.1	+	/	-	-
Ma12.2	+	/	-	-
Ma12.3	+	/	-	-
Ma14.1	+	/	-	-
Ma14.2	+	/	-	-
Ma16.1	+	/	-	+
Ma16.2	+	/	-	+
Ma16.3	+	/	-	-
Ma17.1	+	/	-	-
Ma17.2	+	/	-	-
Ma27.1	+	/	-	-
Ma27.2	+	/	-	-
SD178.1	+	/	-	-
SD178.2	+	/	-	-
SD178.3	+	/	-	-
SD173	+	/	+	-
Str.1	/	+	-	+
Str.2	/	+	-	-
Str.3	/	+	-	-

+ : résultats positifs

- : résultats négatifs

/ : non déterminé

Tableau (05) : les résultats de lait de sherman à 0.1et 0.3%, type fermentaire, et croissance à pH 9.6.

Souches	pH= 9.6	Citrate	Lait de Sherman		Type fermentaire
			0.1%	0.3%	
D19(5).1	-	-	-	-	Hétéro
D19(5).2	-	-	-	-	Homo
Ma12.1	-	-	/	-	Homo
Ma12.2	-	-	/	/	Homo
Ma12.3	-	-	/	/	Homo
Ma14.1	+	-	/	/	Homo
Ma14.2	-	-	/	/	Hétéro
Ma16.1	-	-	+	-	Homo
Ma16.2	-	-	+	-	Hétéro
Ma16.3	-	-	+	-	Homo
Ma17.1	+	-	/	/	Homo
Ma17.2	+	-	/	/	Homo
Ma27.1	+	-	-	+	Hétéro
Ma27.2	-	-	-	+	Homo
SD178.1	-	-	/	+	Hétéro
SD178.2	+	-	/	+	Homo
SD178.3	-	-	/	+	Hétéro
SD17.3	+	-	-	-	Hétéro
Str.1	+	-	-	-	Homo
Str.2	-	-	-	/	Homo
Str.3	-	-	-	/	Homo

+ : résultats positifs

- : résultats négatifs

Homo : homofermentaire

Hétéro : hétérofermentaire

2.1. Test de la thermorésistance

Thermorésistance est un caractère physiologique permettant de diviser les souches en deux groupes : groupe des souches mésophiles et le groupe des souches thermophiles. Le résultat positif se traduit par un trouble. Seules les souches thermophiles (Ma16.1, Ma1.6.2, Str.1) poussent et tolèrent une température de 63.5°C pendant 30 min, contrairement aux souches mésophiles qui sont incapables de se développer.

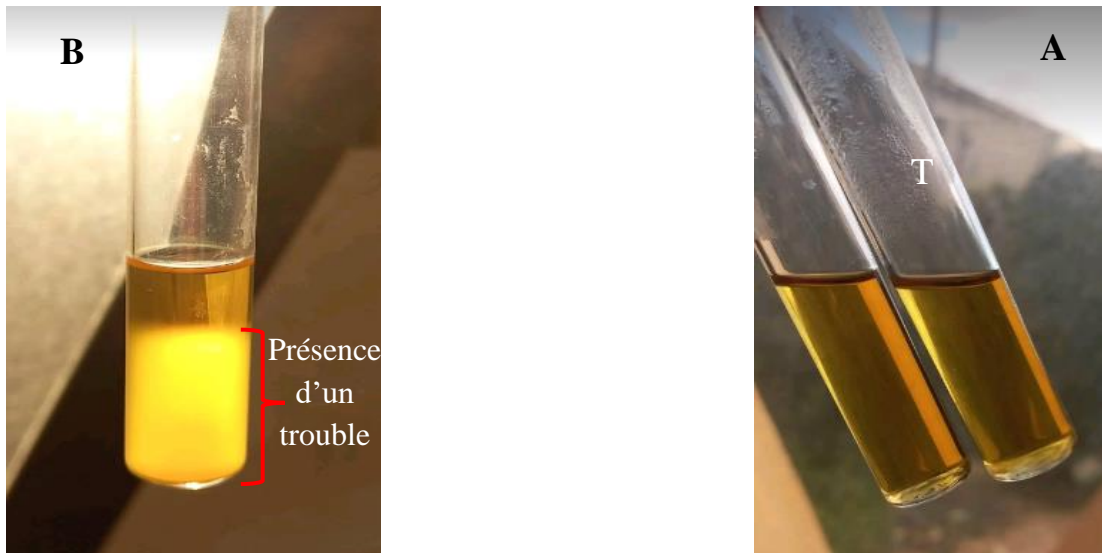


Figure 06 : La thermorésistance

A : Ma₁.6.2

T : Témoin

B : pas de croissance

2.2. Croissance en milieu hypersalé

Le milieu salé à concentration de 6.5 % est un milieu hostile pour la plupart des bactéries, celles qui le tolèrent peuvent y pousser. Après l'incubation la souche SD₁₇₃ a écarté des autres souches par sa capacité de se développer à 6.5 % NaCl (figure 6-A). Aucune croissance n'a été remarquée dans les autres tubes (figure 6-B). Tableau (04)

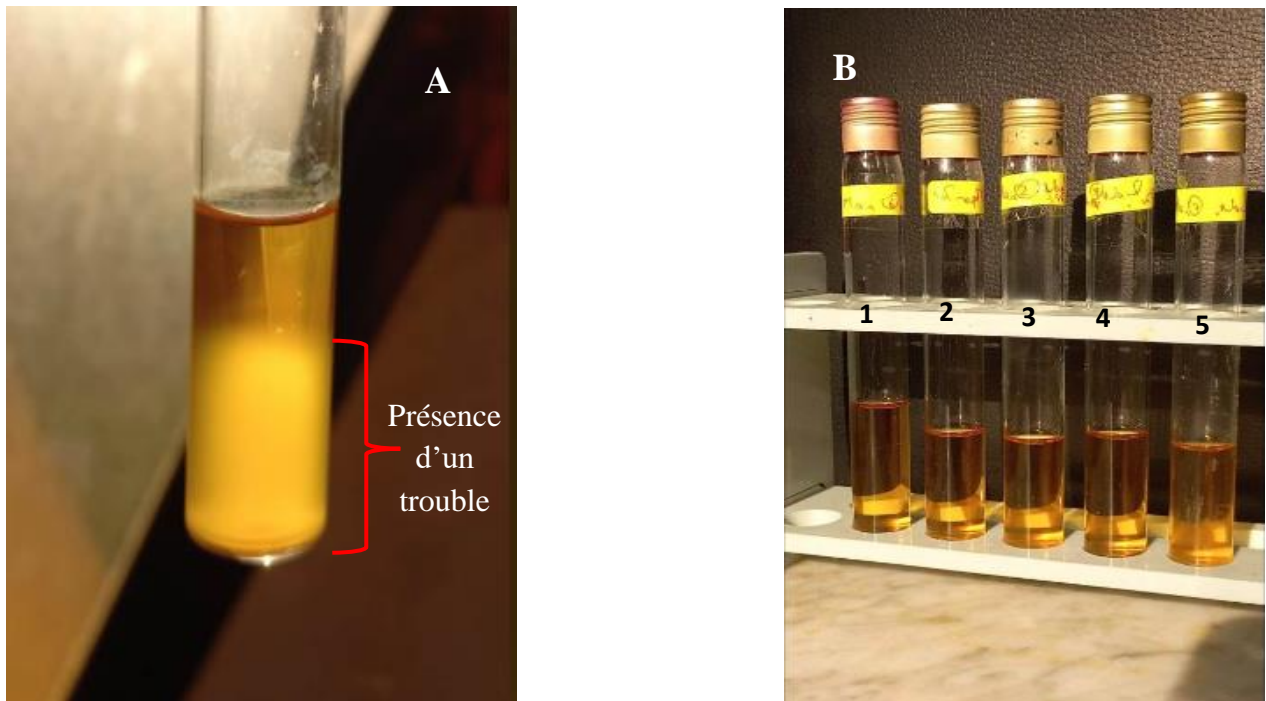


Figure 07 : Aspect des cultures des bactéries lactiques en milieu hypersalé

1 : D19(5).1

A : SD₁₇₃
2 : D19(5).2

3 : Ma₁.2.1

B : pas de croissance

4 : Ma₁.2.2

5 : Ma₁.2.3

2.3. Croissance sur le lait de Sherman

Les résultats obtenus par la suite, dans un lait écrémé stérilisé contenant le bleu de méthylène, ont montré que les souches (Ma₁6.1, Ma₁6.2, Ma₁6.3) sont capables de croître en présence du bleu de méthylène 0.1%.

Le résultat pour le lait de Sherman 0.3% montre que les souches (Ma₂7.1, Ma₂7.2, SD₁₇8.1, SD₁₇8.2, SD₁₇8.3) sont capables de pousser en présence du bleu de méthylène 0.3%. **Tableau (05)**

D'après **Guthamam, 1991** la souche *lactococcus lactis* est capable de pousser en présence de 0.3% de BM, les streptocoques fécaux se développent en présence de 0.1% de BM, quand le *streptococcus thermophilus* est très sensible au BM.

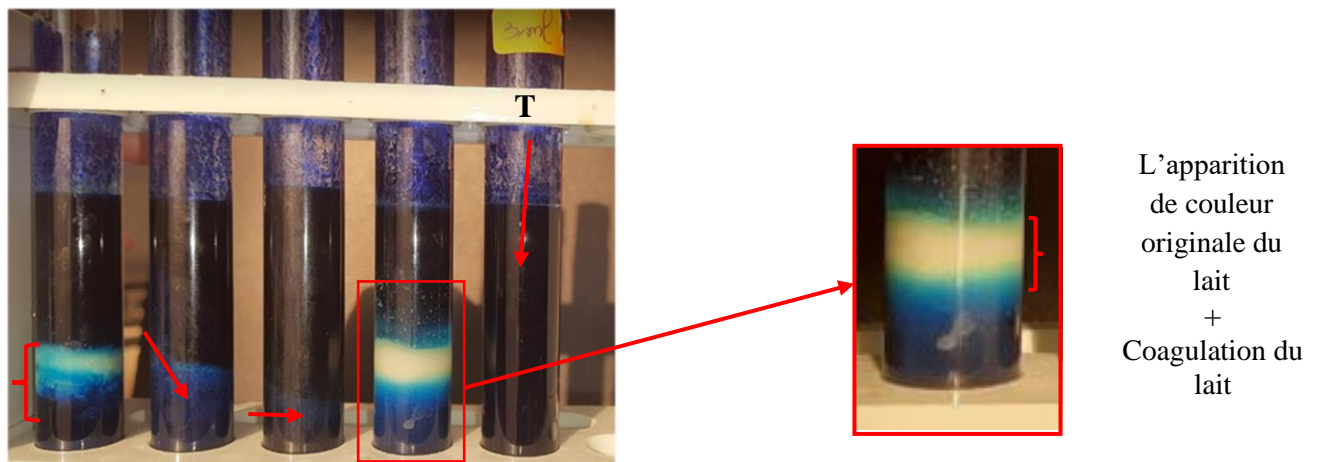


Figure 08 : résultats de test de laits de sherman, la réduction de bleu de méthylène est observée par le virage de couleur bleu

2.4. Type fermentaire

Ce test permet de distinguer les isolats lactiques homofermentaires à des hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂) à partir du glucose. La culture des isolats est faite sur bouillon MRS supplémenté de la cloche de Durham. Après incubation à 30°C et 37°C pendant 24 à 48 heures, la production de CO₂ se traduit par une présence de gaz dans la cloche des souches (SD₁₇.3, SD₁₇8.3, SD₁₇8.1, Ma₂7.1, Ma₁6.2, Ma₁4.2, D19⑤1) montre qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire alors que l'absence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire **tableau (05)**.

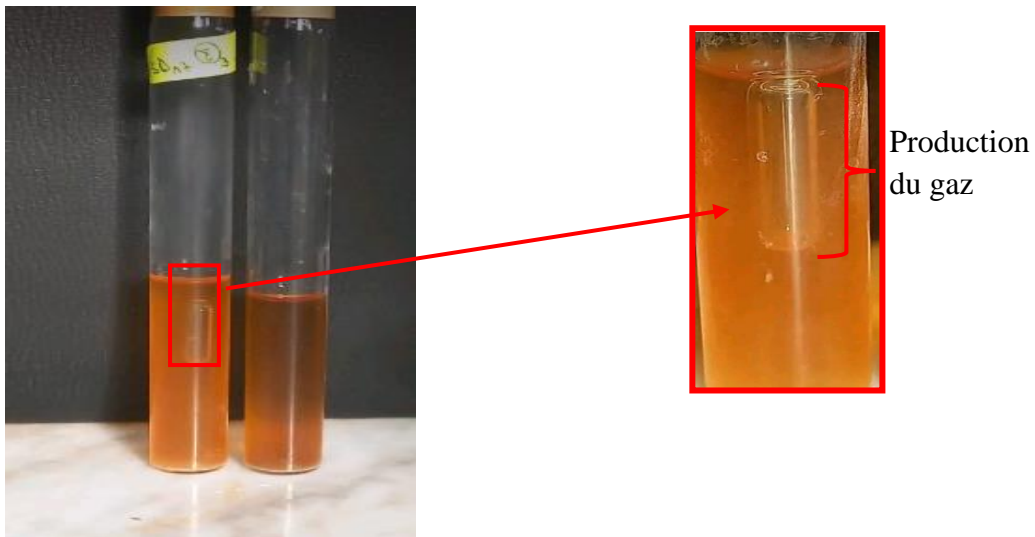


Figure 09 : Test de la fermentation sur milieu MRS liquide contenant la cloche de Durham

2.5. Croissance à pH 9,6

La croissance des bactéries est révélée par l'apparition d'un trouble dans les tubes (Ma_{14.1}, Ma_{17.1}, Ma_{17.2}, Ma_{27.1}, SD_{178.2}, SD₁₇₃, Str.1) ; les milieux clairs indiquent résultat négatif ce qui montre la sensibilité des bactéries lactiques au milieu basique.

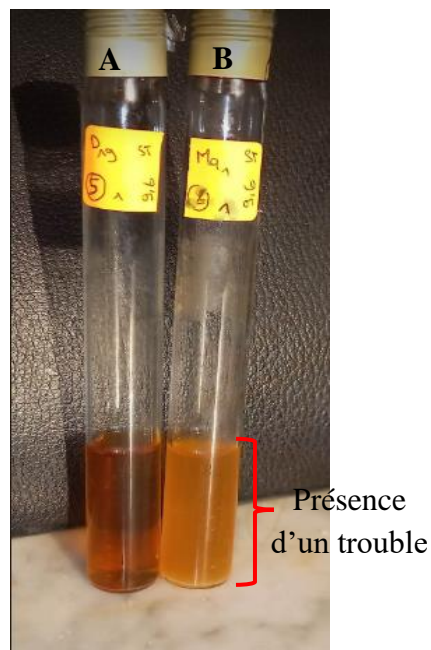


Figure 10 : croissance à pH=9.6

A : D19⑤2, pas de croissance

B : Ma_{16.1}, croissance

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats cocci mésophiles qui ne se développent pas à 63.5°C et qui sont hétérofermentaires montrent que ces isolats appartiennent au genre *Leuconostoc* (D19^⑤.2).

Les cocci mésophiles homofermentaires Ma₁2.1 ; Ma₁2.2 ; Ma₁2.3 qui ne poussent pas à 6.5% NaCl appartiennent au genre *Lactococcus*.

Les isolats homofermentaires qui se développent à 63.5°C, dans milieu hypersalée et dans le milieu hyperalcalin et sont thermorésistants font partie du genre *Enterococcus*.

17 souches qui restent appartiennent à d'autres genres Ma₁6.3 ; Ma₂7.2 ; Str.2 ; Str.3 ; SD₁₇3 ; Ma₁7.1 ; Ma₁7.2 ; Ma₂7.1 ; Str.1 ; Ma₁6.2 ; Ma₁6.1 ; D19^⑤.1 ; SD₁₇8.1 ; SD₁₇8.2 ; SD₁₇8.3 ; Ma₁4.1 ; Ma₁4.2

Nos résultats concordent à ceux trouvés par **Badis, (2004)**; **Ashmaig et al., (2009)** ; **Berradia, (2016)** ; et **Bellal, (2018)**

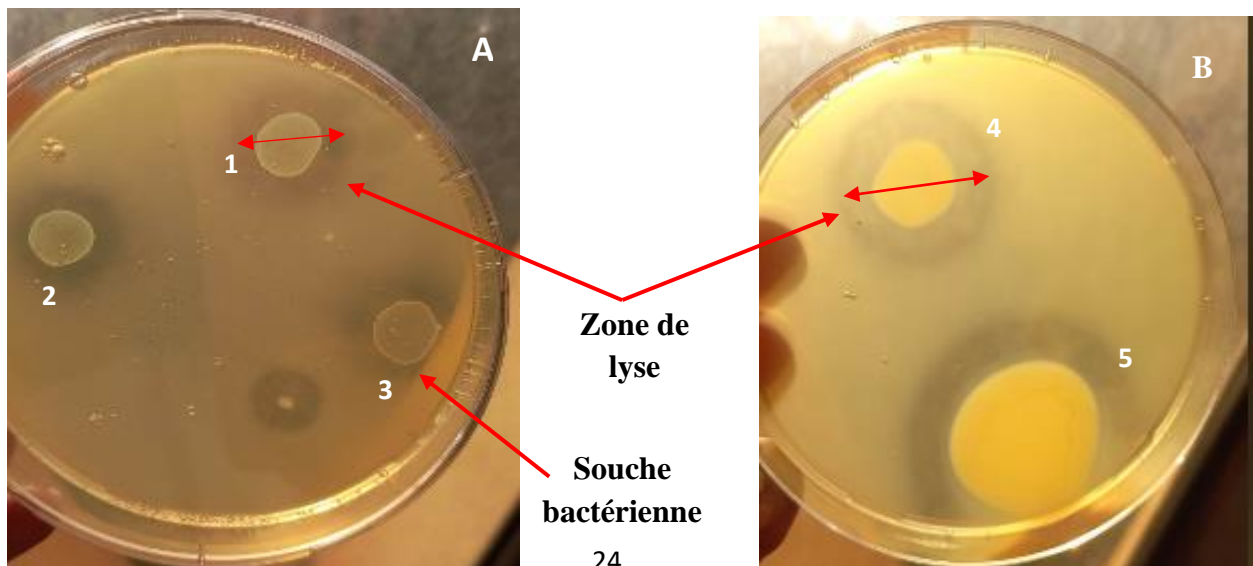
Suite à l'analyse des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques comparés à ceux de **Badis et al., (2004)**, **Moulay et al., (2006)**, **Boudali et al., (2008)** et **Bousebta et al., (2022)**, nous avons pu identifier 04 souches bactériennes ; 01 souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, 03 souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* et 17 autres souches qui nécessitent d'autres tests de confirmation tels que le citrate et le lait de Sherman, **tableau(06)**.

Tableau (6) : Identification des souches de bactéries lactiques.

Code de souche	Identification
D19⑤2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Ma ₁ 2.1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
Ma ₁ 2.2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
Ma ₁ 2.3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
Ma ₁ 6.3 ; Ma ₁ 6.2 ; Ma ₁ 6.1	Autres bactéries
D19⑤.1 ;	
Str.2 ; Str.3 ; Str1	
SD ₁₇ 3	
SD ₁₇ 8.1 ; SD ₁₇ 8.2 ;SD ₁₇ 8.3	
Ma ₁ 7.1 ; Ma ₁ 7.2	
Ma ₂ 7.1 ; Ma ₂ 7.2	
Ma ₁ 4.1 ; Ma ₁ 4.2	

II. Détection de l'activité protéolytique

La zone d'hydrolyse transparente autour de colonies indiquant l'activité protéolytique sur milieux PCA et MRS



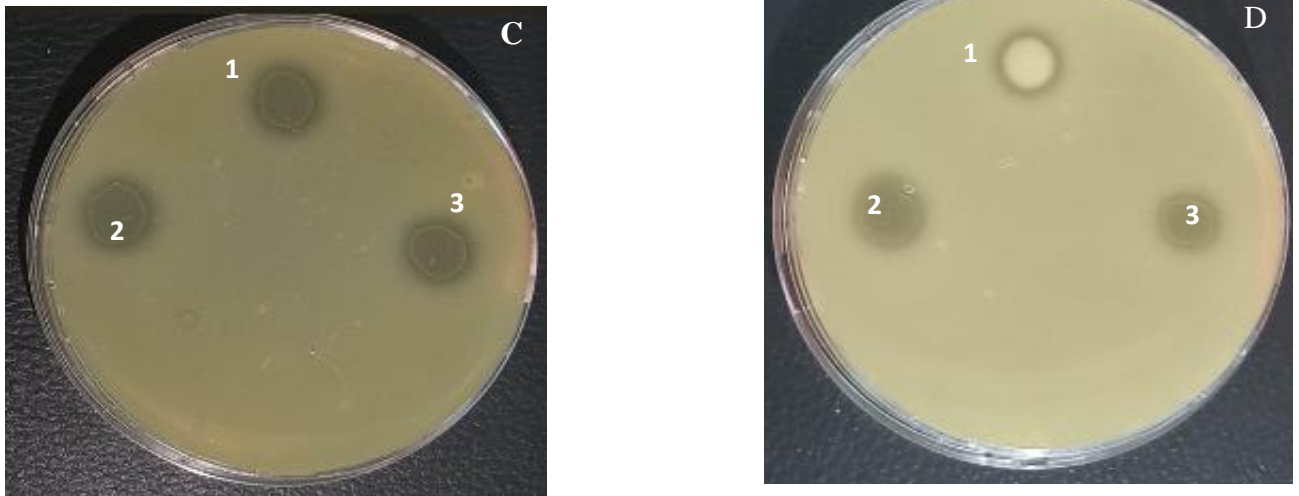


Figure 11: apparition des zones d'hydrolyse des protéines de lait écrémé sur milieux MRS et PCA par les bactéries lactiques sur différentes concentrations (10% et 20%)

A : milieu MRS avec concentration de 10% de lait écrémé.

B : milieu MRS avec concentration de 20% de lait écrémé.

C : milieu PCA avec concentration de 10% de lait écrémé.

D : milieu PCA avec concentration de 20% de lait écrémé.

1 : Ma₁2.1

2 : Ma₁2.2

3 : D19⑤2

4 : Ma₁6.3

5 : Ma₁2.3

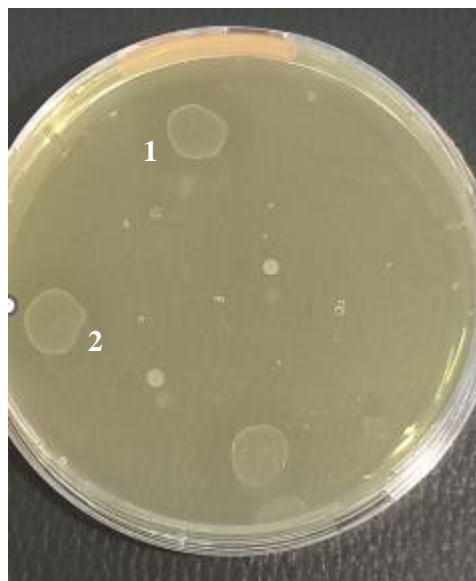


Figure 12 : Absence des zones d'hydrolyse des protéines de lait écrémé sur milieu PCA 10%

Tableau (07) : Diamètre de la zone d'hydrolyse des bactéries protéolytiques.

Souche	MRS 10%	MRS 20%	PCA 10%	PCA 20%
D19⑤2	2.9	2.05	0.85	1.05
Ma ₁ 2.1	1.3	1.85	1	1.4
Ma ₁ 2.2	1.65	2.35	1.25	2.3
Ma ₁ 2.3	3.05	2.1	1	1.4
Ma ₁ 6.3	1.7	2	1	1.8
Ma ₂ 7.2	1.8	2.95	1.25	1.4
Str.2	1.75	1.9	1	1.55
Str.3	2.75	2.35	1	1.6
SD ₁₇ .3	0	0	0	0
Ma ₁ 4.1	0	0	0	0

Nous avons mis en évidence l'activité protéolytique sur deux milieux de cultures (MRS et PCA) à 10 et 20 % de lait écrémé, les résultats obtenus sont montrés dans les figures (10 et 11) et nous permettons de constater que :

Sur les milieux MRS et PCA, 08 souches sur 10 testés montrent une activité protéolytique, 04 parmi eux sont identifiés.

Les résultats présentés dans le **tableau (07)** indiquent le diamètre de la zone d'hydrolyse des protéines de lait sur milieux solides. Le diamètre de la zone d'hydrolyse a été mesuré sur milieux MRS et PCA avec différentes concentrations de lait écrémé (10% et 20%).

Nous avons constaté que les souches testées présentaient une activité protéolytique, qui se manifeste par un halo distinct autour des coloniesensemencées par contact. Sur milieu MRS 10% et 20%. Le diamètre de la zone d'hydrolyse varie entre 1.3 et 3.05 cm, sur milieu PCA, la zone varie entre 0.85 et 1.55 sur milieu MRS (**tableau 07**).

Sur les 10 souches protéolytiques, 03 se sont révélées fortement protéolytiques en donnant un halo large, claire très visible autour des touches, le reste des isolats donnant des petites zones par rapport aux souches précédentes.

La détection de souche positive renseigne sur la présence de protéases chez ces souches, et rejoignent les tableaux de **Desmazeaud (1983)** ; **Moulay *et al.*, (2006)**.

L'absence de l'activité protéolytique chez les souches considérées négatives peut être expliquée soit par :

Une absence réelle d'une protéase de paroi, c'est-à-dire la souche ne dispose pas de protéase, sachant que ce caractère est instable puisqu'il est porté sur un plasmide chez la majorité des bactéries lactiques (**Kok, 1990**).

Présence de protéase non fonctionnelle, suite à une inactivation du gène responsable de la synthèse (gène prtP) ou celui de la maturation de la protéase (prtM).

Les résultats obtenus sur milieu MRS-lait et le milieu PCA-lait indiquent que l'activité protéolytique dépend en partie de la composition du milieu de culture.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

La présente étude a été conduite dans le but de vérifier et étudier une des propriétés technologiques attribuées aux bactéries lactiques, à savoir l'activité protéolytique. Le rôle de cette dernière, assure les caractéristiques particulières des produits alimentaires.

À travers cette étude, nous sommes arrivés à réidentifié 21 souches conservées dans le laboratoire de microbiologie appliquée Tiaret. Mises aux tests morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats obtenus confirment que les bactéries conservées sont toutes Gram positive sous formes des coques associées en diplocoques ou en courtes chainettes, catalase négative, homofermentaires pour les lactocoques et hétérofermentaires pour les leuconostocs.

Ces résultats permettent de sélectionner :

- 1 souche de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.
- 3 souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- 17 autres souches bactériennes qui nécessitent plus de tests pour les réidentifiés

Les résultats obtenus à travers le test d'hydrolyse sur milieu gélosé MRS et PCA 10 et 20% lait écrémé, montrent une activité protéolytique considérable des souches avec un diamètre de zone varie entre 1.3 et 3.05 cm sur milieu MRS, et de 0.85 à 1.55 cm sur milieu PCA.

D'après les tests réalisés certains effets indésirables sont observés sur les bactéries lactiques qu'on doit les prendre en considération tels que :

Perte de viabilité : dans le cas de **D19.8.1, D19.8.2, D19.7, D19.3, D19.1.1, D19.1.2** les bactéries perdent leur viabilité

Altération génétique : dans le cas de **Str4** veut dire un risque de mutations spontanées des bactéries lactiques.

Diminution de l'activité métabolique : dans le cas de **SD17.3, Ma14.1** les bactéries lactiques peuvent subir une absence de l'activité protéolytique.

Ces changements peuvent être liés aux mauvaises conditions de conservation.

Nos résultats assez intéressants ouvrent les perspectives :

Conclusion

- Fabriquer un lait fermenté ou un fromage à l'aide des souches lactiques testées.
- Étudier les caractères biotechnologiques des isolas.
- Faire l'étude statistique de l'ensemble des souches lactiques protéolytiques.
- Étudier l'effet de la conservation sur l'activité métabolique des bactéries lactiques à savoir de l'activité protéolytique.
- Tester périodiquement les souches conservées pour évaluer leur activité métabolique
- Standardiser génétiquement les souches isolées
- Tester les souches standardisées à l'échelle industrielle
- Voir le facteur qui affecte l'activité protéolytique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Ahirwar, SS, Gupta, MK, Gupta, G., & Singh, V. (2017).** Dépistage, isolement et identification des espèces de lactobacilles des caries dentaires des enfants. *International Journal Of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (1), 497-503
- **Ashmaig, A., Hasan, A., El Gaali, E. (2009).** Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *African Journal of Microbiology Research*, 3: 451-457.

B

- **Badis A, Guetarni D, Moussa-Boudjemaa B, Henni DE, Tornadijo ME, Kihal M. (2004).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* 21: 343-349.
- **Badis A.(2004).** Identification et caractérisation technologique de bactéries lactiques isolée à partir de lait crue de chèvre de quatre populations caprines locales. Thèse de Docteur D'état en microbiologie alimentaire, Université d'Oran.
- **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". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.
- **Bekhouche, F.(2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires, 149p.
- **Bellal ibtissam. (2018).** L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis les souches pathogènes ; Master Académique en Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem p42-p45
- **Belhamra, Z. (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires, thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 147p.

-
- **Bennani, S., Mchiouer, K., Rokni, Y., & Meziane, M. (2017).** Caractérisation et identification des bactéries lactiques isolées du lait cru de vache marocain. *Journal plus vert des sciences biologiques*, 25, 4934-4944
- **Berradia. A. (2016).** Isolement, purification et identification des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre, Master Académique en Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem- p39
- **Bin Masalam MS, Bahieldin A, Alharbi MG, Al-Masaudi S, Al-Jaouni SK, Harakeh SM, et al. (2018).** Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in saudi raw and fermented milk. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018:7970463. doi: 10.1155/2018/7970463
- **Boudali.Y ; Hati.K.(2008).** L'activité protéolytique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre ; mémoire de fin d'étude vue de l'obtention du diplôme des études supérieures en science biologique. Université Ibn Khaldoun-Tiaret-p45-48
- **Bourgeois C.M. et Leveau J.Y.(1991).** le contrôle microbiologique in technique d'analyses et de controles dans les industries agroalimentaires. Vol 3, 2ème édition. Tec et Doc Lavoisier, Paris. pp: 345-355.
- **Bourgeois C.M., Larpent J.P.(1996).** microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentation alimentaire. 2ème édition, tome 2; Tec et Doc, Lavoisier, Paris. pp: 7.

G

- **Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., & Steele, J.L. (1999).** Peptidases et catabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques. *Antoine van Leeuwenhoek*, 76 (1), 217-246.
- **Corrieu, g., Luquet f. (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.Ed. TEC & Doc Lavoisier. Paris.p823

D

- **Desmazeaud M. J. (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait*, 63, pp. 267-316.

-
- **Desmazeud M. (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité, cahier Agriculture, 5, pp: 331-343.
- **Devriese et Pot (1995).** The genus Enterococcus. In genera of Lactic acid Bacteria. Edited by wood B.J.B. pp, 327-367.
- **Djerdir, Z & Nasri, K .(2018).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activités antimicrobiennes, mémoire de master. Université A. MIRA – Bejaia Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, 69p.
- **Dortu C. et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13. 143-154.

F

- **ECK A., (1987).** Le fromage. 2ème Ed Tech. Doc. Lavoisier (Paris). p 101 – 227.
- **Ennadirj., Hassikou R., Al Askari G., Arahou M., Bouazza F., Amallah L., Amine S. A., Khedid K., (2014).** Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of Lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco). *J.Mater. Environ.Sci.*5 (4). Pp1125-1132.

G

- **Garnier F., Denis F. (2011).** Bactériologie Médicale : Cocci à Gram Positif. Paris : Elsevier Masson : 299-319
- **George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F., et al. (2018).** Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Front. Microbiol.* 9:2899. doi: 10.3389/fmicb.2018.02899
- **Guiraud J. P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, pp 219-232, 530-582.
- **Guiraud J.P. (1998) .** Microbiologie alimentaire, Dunod, Paris. P : 80, 84, 116, 282,283, 291
- **Guthmann J F. (1991).** Technique d'Analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires, Le contrôle microbiologique 2iem édition entièrement revue. 135- 202.

H

- **Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). (2014).** Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley and Sons
- **Huggins A.R. et Sandine W.E. (1984).** Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic Streptococci. Dairy sci 67:1674-1679.

g

- **Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E., & Karam, N. E. (2009).** Lactic acid bacteria from " Sheep's Dhan", a traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. Grasas y aceites, 60(2), 177-183
- **Ismaili, M.A., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B. et Zahar, M. (2016).** Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. The International Journal of Multi- disciplinary Sciences, 1 (1): 81-94.
- ISO (2003).

L

- **Joffin J N, Leyral G. (2006).** Microbiologie technique « Tome 1 »: Dictionnaire des techniques. CRDP Aquitaine, Bordeaux
- **John Wiley,(2014),** lactic bacteria :Biodiversity and Taxonomy

K

- **Kalbaza, K., Halima, Z.K., & Karam, N.E. (2018).** Identification et principales caractéristiques technologiques des souches de Lactococcus et Lactobacillus isolées du hamoum, un blé fermenté algérien. Journal africain de biotechnologie, 17 (5), 108-117.
- **Kihal M. (1996).** Etudes de la production du dioxyde de carbone par Leuconostoc mesenteroides, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.
- **Kihal, M., Prevost, H., Lhotte, M., Huang, D. & Diviès, C. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in Leuconostoc. Letters in applied microbiology, 22, 219-223.

Références bibliographiques

-
- **Klaenhammer, T. R., Fremaux, C. et Hechard, Y. (1994).** Activité antimicrobienne des Bactéries

I

- **Labioui H., Elmoualdi L., El yachioui M. et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm.* (Bordeaux) 144. 237-250.
- **Larpent, J-P., & Larpent-Gourgaud, M. (1990).** Mémento technique de Microbiologie. Technique et documentation-Lavoisier. Paris, 417.
- **Law B.A. And Kolstad J. (1983).** Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek* 49: 225-245
- **Law J et Haandrikman A. (1997).** Proteolytic enzymes of Lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.*, 1-11.
- **Leclerc H., Buttiaux R., Guillaume J. et Wattre P. (1977).** Microbiologie appliquée. Edition DOIN, Paris, pp : 179,184-185.
- **Leveau., Bouix.,M et Tec&Doc (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt Industriel.
- **Lopez K. L. (2008).** Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence à partir de données hétérogènes et incomplètes. Thèse doctorat Agro Paris Tech

M

- **Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 3 : 39-49.
- **Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries 3ème Ed., Doin éditeurs, Paris.
- **Mathara J.M., Shillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K. et Holzapfel W.H. (2004).** Isolates, identification and characterization of the dominant microorganisms. *Food microbiol.* Aug.94 (3) pp:269-278.

-
- **Mokoena, M. (2017).** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules* 22:1255. doi: 10.3390/molecules22081255 ---
- **Morino M, Maifreni M., et Rondinini G. 2003.** Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol Lett.* 5;229(1):133-40.
- **Moulay M., (2005).** Étude de la flore lactique protéolytique du lait cru de chèvre de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée. Thèse de magistère Université d'Oran
- **Moulay M., Aggad H., Benchernoune Z., Guessas B., Henni D. and Kihal M. (2006).** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and proteolytic activity. Oran University, Algeria.

N

- **Novel G. (1993).** Les bactéries lactiques in microbiologie industriel, les microorganismes d'intérêt industriel, Edition J.Y. Leveau et M. Bouix; Techniques et Documentation Lavoisier, Paris. France, pages 170,171, 204,206-207.

J

- **Tabak S., Bensoltane A. (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, *Nature & Technologie* 6 :71-79. 123.

S

- **Siezen, R.J., B. Renckens, I. van Swam, S. Peters, R. van Kranenburg, M., Kleerebezem and W.M. de Vos. (2005).** Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8371-8382.
- **Solanki, D., & Hati, S. (2018).** Fermented camel milk: A Review on its bio-functional properties. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(4), 268-274.



Z

- **Zantar, S., El Galiou, O., Zerrouk, H. M., & Laglaoui, A. (2013).** Elaboration d'un fromage de chèvre semi-affiné à partir d'une sélection de souches lactiques autochtones isolées du lait de chèvres du Nord du Maroc. *Options Méditerranéennes A*, 108(1), 191-197.
- **Zarour, K., Z. Benmechernene, M. Hadadji, B.Moussa-Boudjema, D. J. Henni and M. Kihal. (2012).** Bioprospecting of *Leuconostocmesenteroides* strains isolated from Algerian rawcamel and goat milk for technological properties
- **Zhen, S., Yaqi,W ;Jiangtao, W ; Jinju,W ; Mengxin.,L ; Xianjia,B ; Meluleki ,H et weitao,G. (2021).** Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and expanding application in food industry

Annexes

Annexe 01**Les milieux de cultures**

- **Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharp, 1960)** : est utilisé pour la culture de *Lactocoque*

Composition en g/l. Tableau 08

Les ingrédients	Composition
Extrait de levure	10g
Extrait de viande	5g
Glucose	20g
Citrate de sodium	1g
Acétate de sodium	0.05g
Phosphate potassique	2g
Eau distillée	1000ml
Agar	15g
pH	6.2

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu M17 : (Teuber et Geis, 2006)**

Composition en g/l. Tableau 09

Les ingrédients	Composition
Peptone tryptique de caséine	2.5g
Peptones pepsique de viande	2.5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	2.5g
Lactose	5g
B-glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0.25g
Acide ascorbique	0.5g
Actidione	10g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2



Figure 13 : Milieux MRS et M17

- **Milieu PCA (Joffin et Leyral ; 1997)** : utilisé pour la mise en évidence de l'activité protéolytique.

Composition en g/l. Tableau 10

Les ingrédients	Composition
Tryptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	7

Autoclavage à 120°C pendant 20minutes.

Annexe 02

- **Lait de Sherman au bleu de méthylène (Leveau *et al.*, 1991)**

Lait de Sherman à 0,1% :

- 9ml de lait écrémé stérilisé en tubes (115°C – 10min)
- 1ml de bleu de méthylène à 1 % stérilisé 20min à 120°C

Lait de Sherman à 0,3% :

- 9ml de lait écrémé stérilisé en tubes (115°C – 10min)
- 3ml de bleu de méthylène à 3% stérilisé 20min à 120°C

Annexes

➤ **Bleu de méthylène :**

Composition en g/l. Tableau 11

Ingrédients	Composition
Peptone	10g
Éosine	0.4g
Hydrogénophosphate de potassium	0.0625g
méthylène	2g
Lactose	15g
pH	6.8

➤ **Lait écrémé :** utilisé pour les cultures bactériennes, et la conservation des souches.

Composition en g/l. Tableau 12

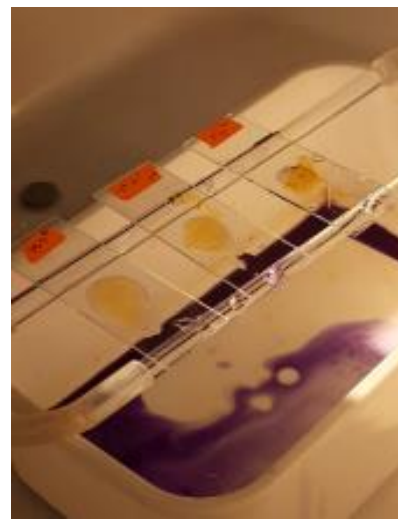
Les ingrédients	Composition
Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	100ml
pH	6.8

Annexe 03

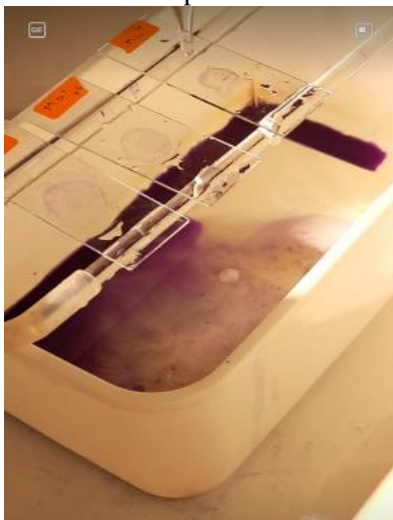
Coloration de Gram



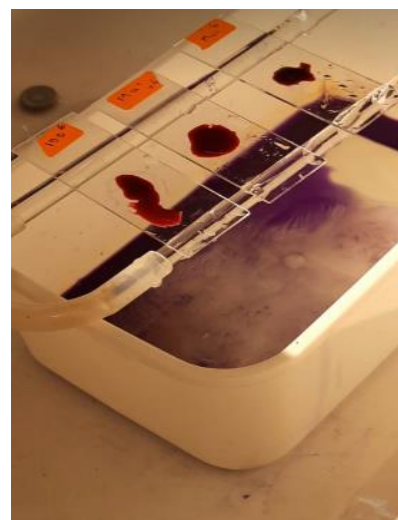
Ajouter quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant 1 min



Après rinçage on ajoute de lygol pendant 1 min



Versez quelques gouttes de l'alcool pendant 07 secondes



Ajouter quelques gouttes de Fuchsine sur la lame qu'on laisse agir 1 min



Lavez doucement à l'eau distillée et séchez la lame

Figure 14 : les étapes de coloration de Gram



Figure 15 : Résultat final de coloration de Gram sur la lame

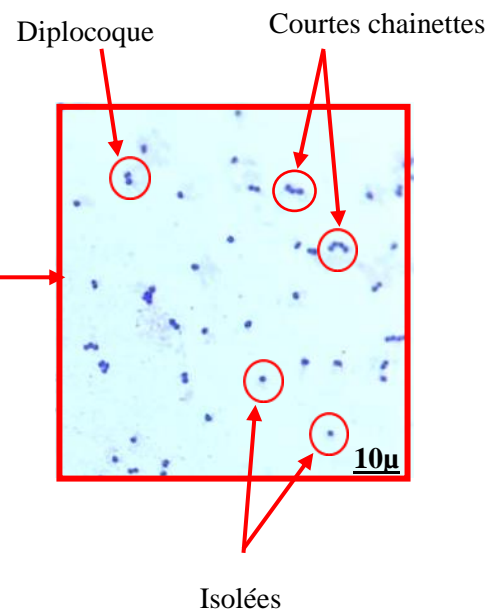
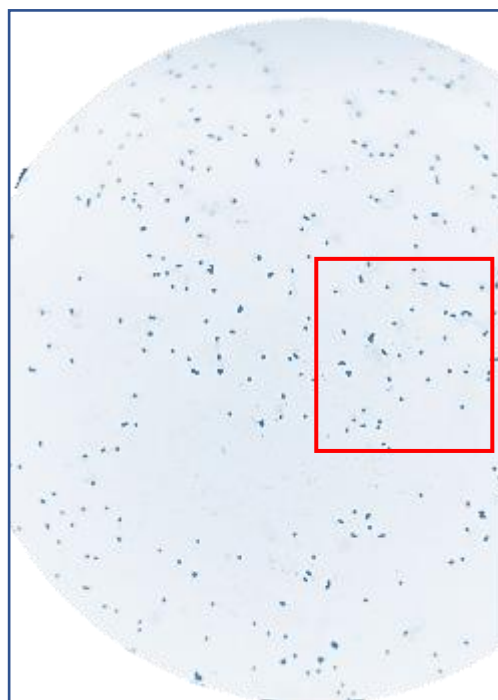


Figure 16 : Observation microscopique des bactéries à Gram+ après purification Objectif ($\times 100$), souche Ma₁₇

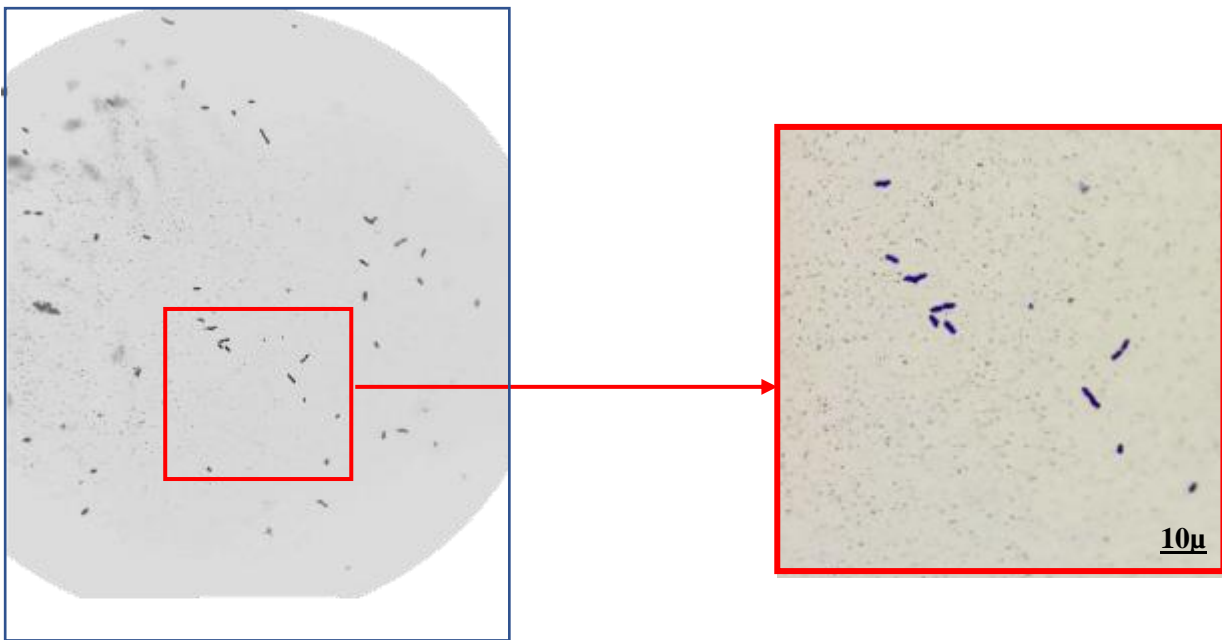


Figure 17 : Observation microscopique des bactéries à Gram+ après purification Objectif ($\times 100$), souche Str4

Annexe 04

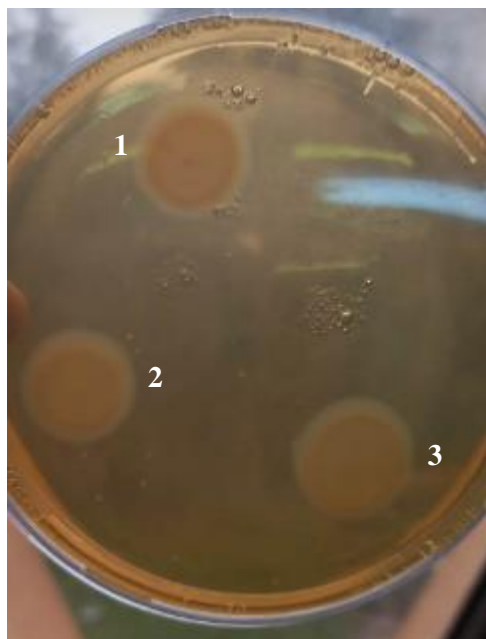


Figure 18 : apparition des zones d'hydrolyse des protéines de lait écrémé sur milieu MRS de concentrations 10%

- 1 : Str2
- 2 : Str3
- 3 : Ma₁4.2

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو التحقق من النشاط البروتيني لبكتيريات اللبن المحفوظة في مختبر الأحياء الدقيقة التطبيقية بجامعة تيارت. وقد تم استخدام الاختبارات الشكلية والكيميائية الحيوية والفسيلولوجية لتحقيق هذا الهدف.

النتائج المحصل عليها سمحت بتعريف بكتيريات اللبن التالية:

1- سلالة من *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

3- سلالات من *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

17- سلالة بكتيرية أخرى تتطلب مزيداً من الاختبارات لإعادة التعرف عليها.

تم تمييز 3 أنواع من البكتيريات المحللة للبروتين وهي بكتيريا عالية التحلل البروتين ; Ma₁2.3 ; Str.3 ; Ma₁2.1 ; Ma₁6.3 ; Ma₁2.2 ; Str2 ; Ma₂7.2 ضعيفة D19(5)2 و منعدمة نشاط التحلل للبروتين SD_{17.3}, Ma₁4.1

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبن، إعادة التعرف، نشاط التحلل البروتيني، سلالات محفوظة

Summery

The aim of this study was to verify the proteolytic activity of lactic acid bacteria preserved in the Applied Microbiology Laboratory at Tiaret University. Morphological, biochemical and physiological tests were used to achieve this objective.

The results obtained enabled us to select 21 strains:

- 1 strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.
- 3 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- 17 other bacterial strains that require further testing to re-identify them.

Proteolytic activity can distinguish strains to strongly Ma₁2.3; Str.3; D19(5)2 , weakly Ma₁2.1; Ma₁6.3; Str2 Ma₁2.2; Ma₂7.2 or non-proteolytic bacteria SD_{17.3}, Ma₁4.1.

Keywords: lactic acid bacteria, re-identification, proteolytic activity, conserved strains

Résumé

L'objectif de cette étude, vise à vérifier l'activité protéolytique des bactéries lactiques conservées dans le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Tiaret. Des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques ont été utilisés pour atteindre cet objectif.

Les résultats obtenus permettent de sélectionner 21 souches :

- 1 souche de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.
- 3 souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- 17 autres souches bactériennes qui nécessitent plus de tests pour les réidentifiées

L'activité protéolytique peut distinguer les souches à des bactéries fortement Ma₁2.3 ; Str.3 ; D19⑤2, faiblement Ma₁2.2 ; Ma₂7.2 ; Ma₁2.1 ; Ma₁6.3 ; Str2 ou non protéolytiques SD₁₇.3, Ma₁4.1.

Mots clés : Bactéries lactiques, réidentification, activité protéolytique, souches conservées