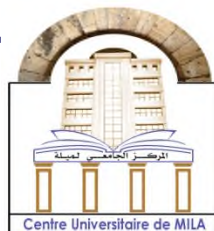


· · · · ·  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
· · · · ·

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

N°Ref :.....



**Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila**

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de  
Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement**

**Option : Biochimie et Microbiologie Appliquée**

**Thème :**

***Caractérisation de l'activité protéolytique de  
quelques souches de bactéries lactiques***

**Présenté par : Azzem Hadia**

**Chebli Naima**

**Devant le jury composé de :**

**M<sup>r</sup> BOUBENDIR Abdelhafid**

**M<sup>lle</sup> RABHI Nour El-Houda**

**M<sup>lle</sup> HADEF Sawsen**

**Maître de Conférences A (C.U.M)**

**Maître Assistante A (C.U.M)**

**Maître Assistante A (C.U.M)**

**Président**

**Examinatrice**

**Promotrice**

**Année Universitaire: 2015/2016**

## *Remerciements*

*Avant tout, nous remercions "Allah", le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant. Louange à "Allah " Seigneur du monde, qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.*

*Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous tenons avant tout à remercier notre promotrice M<sup>lle</sup> HADEF Sawsen, Maître Assistante A, qui a accepté de nous encadrer, qui a nous guidé par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et nous ont bien expliqué les étapes de ce travail.*

*Veillez trouver ici, l'expression de notre profond respect et nos sincères remerciements.*

*Nous remercions également:*

*M<sup>r</sup> BOUBENDIR Abdelhafid, Maître de conférences A, pour l'honneur qu'il nous a fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.*

*M<sup>lle</sup> RABHINour-Elhouda, Maître Assistante A, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos sincères remerciements au personnel des laboratoires pédagogiques du Centre Universitaire de Mila.*

*Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos familles et nos amies pour leurs encouragements et leur compréhension*

*Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvant ainsi l'expression de nos profondes gratitude et respects.*

# Dédicaces

*J'offre ce travail*

*À la source du savoir de mon père Abd Madjid, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*À la lumière de mon cœur ma très chère mère Razika qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*À la source du bonheur de mon frère Nasro et de mes sœurs Souad et Ferial, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A toute famille Azzem et Soufi*

*À mes chers petits neveux et nieces Siradj, Kouki et Meriem.*

*À ma chère et adorable camarade Naima et sa famille*

*Et à tous mes amis ainsi que mes proches Amira, Amina, Siham, Meriem<sup>2</sup>, Afaf, Nadira, Aya, Amel et Marwa.*

# Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,  
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mon cher père ALI qui m'a appris le sens de la persévérance tout au  
long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*A la lumière de mes yeux et ma coeure , l'ombre de mes pas et le bonheur de  
ma vie ma mère SALIHA qui m'a apporté son appui durant toutes mes années  
d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,  
courage et sécurité.*

*Je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que DIEU vous protège  
et vous donne bonne santé*

*Mon cher frère ABDELGHANI*

*pour ta compréhension et ton aide précieuse dans les moments difficiles*

*A mes très chères sœurs : FARIDA, RADIA, NORA ET LAILA*

*À mes chers petits neveux et nièces ISLAM, ALAAERREHMAN, DIKRA,  
ZAKARIA, MOUHAMED ET IKBAL.*

*A toute la famille CHEBLI ET DOULA*

*À ma chère et adorable camarade HADIA et sa famille*

*Et à tous mes amis ainsi que mes proches HALIMA, LOUBNA, SIHAM,  
MERJEM, FOUZIA, NADIRA, MOUNA, AMEL ET NARIMANE.*

*Et toutes mes amies sans exception.*

*NAIMA*

## *Résumé*

---

À travers cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité protéolytique d'une collection de dix-huit souches de bactéries lactiques d'origine locale (dix souches d'*Enterococcus* sp. et huit de *Lactobacillus* sp.). Les résultats obtenus montrent que la totalité de nos souches ont été protéolytiques.

Nous avons procédé, par la suite, à caractérisation physico-chimique partielle de l'activité enzymatique des exo et des endoprotéases de deux souches révélées comme les plus protéolytiques : *Enterococcus* sp. E5 et *Lactobacillus* sp. L1. L'activité des exoprotéases a été plus importante que celles des endoprotéases.

Ces enzymes se sont avérées sensibles aux variations de la température, du pH et la présence de quelques effecteurs (EDTA, NaCl, CaCl et tween 80). Ainsi, la souche d'*Enterococcus* sp. E5 a présenté un bon pouvoir autolytique et meilleur que celui de la souche *Lactobacillus* sp. L1.

**Mots clés:** Bactéries lactiques, activité protéolytique, exoprotéase, endoprotéase, autolyse.

## *Abstract*

---

In this study, we were interested for evaluation of the proteolytic activity for a collection of eighteen local isolates of lactic acid bacteria (ten strains of *Enterococcus* sp. and eight of *Lactobacillus* sp.). The results showed that the totality of strains were proteolytically active.

Thereafter, we carried a partial physicochemical characterization of the enzymatic activity of exo and endoproteases of two strains revealed as the most proteolytic: *Enterococcus* spp. E5 and *Lactobacillus* sp. L1. The exoprotease activity was higher than that of the endoprotease.

These enzymes proved to be sensitive to changes in temperature, pH and the presence of some effectors (EDTA, NaCl, CaCl and Tween 80). Thus, *Enterococcus* sp. E5 was presented a good autolytic activity which better than that of the *Lactobacillus* sp. L1.

**Key-words:** Lactic acid bacteria, proteolytic activity, exoprotease, endoprotease, autolysis.

## المخلص

من خلال هذه الدراسة ، اهتمنا بتقييم النشاط البروتيني لثمانية عشر سلالة من البكتيريا اللبنية المحلية ( عشر سلالات من جنس *Lactobacillus* sp. و ثمانية من جنس *Enterococcus* sp.

أظهرت النتائج أن كل السلالات لها نشاط بروتيني ، الذي سمح بدراسة بعض الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للنشاط الإنزيمي الداخلي و الخارجي للسلالتين *Lactobacillus* sp. L1 و *Enterococcus* sp. E5 باعتبارهما الأكثر نشاطا. فكان النشاط الإنزيمي الخارجي أفضل من النشاط الداخلي.

غير أن هذه الإنزيمات ثبت أنها حساسة لتغيرات درجة الحرارة, درجة الحموضة و وجود بعض المؤثرات ( EDTA ، NaCl ، CaCl و Tween 80). كما بينت النتائج أن سلالة *Enterococcus* sp. E5 لها قدرة عالية على الانحلال الذاتي مقارنة بالسلالة *Lactobacillus* sp. L1.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا اللبنية, النشاط البروتيني, البروتينات الخارجية, البروتينات الداخلية, الانحلال الذاتي.

## Table des Matières

---

Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III

Introduction .....	01
--------------------	----

### Partie I : Synthèse Bibliographique

#### Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Généralités.....	03
I.2. Les principales caractéristiques.....	03
I.3. Habitat et origine des bactéries lactiques .....	04
I.4. Classification.....	04
I.5. Identification des bactéries lactiques.....	06
I.6. Les principaux genres des bactéries lactiques.....	07
I.6.1. <i>Lactobacillus</i> .....	07
I.6.2. <i>Enterococcus</i> .....	08
I.6.3. <i>Streptococcus</i> .....	09
I.6.4. <i>Lactococcus</i> .....	09
I.6.5. <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> .....	09
I.6.6. <i>Leuconostoc</i> .....	10
I.6.7. <i>Bifidobacterium</i> .....	10
I.7. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques11 .....	11
I.7.1. Voie homofermentaire ou EMP .....	11
I.7.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates.....	11
I.8. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées .....	13
I.8.1. Aptitude acidifiante .....	13
I.8.2. Activité protéolytique.....	13
I.8.3. Activité lipolytique.....	13
I.8.4. Aptitude aromatisante .....	14
I.8.5. Production des substances inhibitrices.....	14
I.8.6. Formation des exopolysaccharides .....	14
I.8.7. Performance .....	15
I.8.8. Propriété probiotique.....	15
I.9. Applications .....	16

#### Chapitre II : Protéolyse et Autolyse des BL

II.1. Protéolyse et nutrition azotée des bactéries lactiques .....	17
II.2. Généralité sur Les caséines du lait.....	17
II.3. Les protéases .....	18
II.3.1. Généralités sur les protéases .....	18
II.3.2. Propriété.....	19
II.3.3. Classification .....	20

## *Table des Matières*

---

II.3.3.1. Les exopeptidases .....	22
II.3.3.2. Les peptides de transport .....	22
II.3.3.3. Les endopeptidases .....	22
II.4. Régulation de la protéolyse chez les bactéries lactiques .....	23
II.5. Catabolismes des acides aminés .....	24
II.6. Autolyse bactérienne.....	24
II.6.1. Les autolysines.....	25
II.6.2. Facteur d'induction de l'autolyse bactérienne .....	26
II.6.2.1. Les facteurs physico-chimiques.....	26
II.6.2.2. Les facteurs enzymatiques .....	27
II.7. Intérêt de l'activité protéolytique et autolytique des bactéries lactiques .....	27
II.8. Les amines biogènes .....	27

## **II. Matériel et Méthodes**

II.1. Matériel .....	29
II.1.1. Matériel biologique.....	29
II.1.1.1. Les souches bactériennes .....	29
II.1.1.2. Le lait écrémé.....	30
II.1.2. Milieux de culture .....	30
II.1.3. Produits chimiques.....	31
II.1.4. Tampons.....	31
II.1.5. Appareillage.....	31
II.2. Méthodes.....	32
II.2.1. Revivification et purification des souches bactériennes .....	32
II.2.2. Confirmation de la pureté des souches .....	32
II.2.2.1. Coloration de Gram.....	32
II.2.2.2. Test de la catalase .....	32
II.2.3. Etude de l'activité protéolytique des souches lactiques.....	32
II.2.3.1. Activité protéolytique sur gélose MRS au lait.....	32
II.2.3.2. Activité protéolytique sur milieu Agar au lait .....	33
II.2.4. Caractérisation physico-chimique partielle de l'activité protéolytique .....	33
II.2.4.1. Suivi de la croissance bactérienne des deux souches lactiques .....	33
II.2.4.2. Préparation de l'extrait enzymatique des exoprotéases .....	33
II.2.4.3. Préparation de l'extrait enzymatique des endoprotéases .....	34
II.2.4.4. Détermination de la concentration en protéines totales extraits enzymatiques .....	34
II.2.4.5. Détermination de l'activité protéasique des exo et endoprotéases .....	34
II.2.4.6. Détermination de l'activité spécifique .....	34
II.2.4.7. Facteurs influençant l'activité protéasique des souches lactiques .....	35
II.2.4.7.1. Effet du pH.....	35
II.2.4.7.2. Effet de la température.....	35
II.2.4.7.3. Effet des effecteurs .....	35
II.2.5. Activité autolytique.....	35

## *Table des Matières*

---

### **II. Résultat et discussion**

III.1. Revivification et l'identification des souches lactiques .....	37
III.1.1. Examen macroscopique .....	37
III.1.2. Examen microscopique.....	38
III.2. Mise en évidence protéolytique.....	39
III.2.1 .Pouvoir protéolytique sur gélose MRS au lait.....	39
III.2.2. Pouvoir protéolytique sur milieu Agar au lait (milieu A/B).....	42
III.3. Caractérisation physico-chimique partielle de l'activité protéolytique .....	44
III.3.1. Suivi de la croissance bactérienne .....	44
III.3.2. Détermination de l'activité spécifique des extraits enzymatiques.....	45
III.3.2.1. Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases.....	45
III.3.2.2. Détermination de l'activité spécifique des endoprotéases.....	46
III.4. Facteurs influençant L'activité protéasique U/ml des souches lactiques .....	48
III.4.1. Effet du pH .....	48
III.4.2. Effet de la température .....	50
III.4.3. Effet des effecteurs .....	52
III.5. Activité autolytique .....	55

<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>57</b>
---	-----------

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau 01 :</b> Composition et certaines caractéristiques des caséines .....	18
<b>Tableau 02 :</b> Classification des protéases .....	21
<b>Tableau 03 :</b> Espèces de bactéries lactiques utilisées et leurs origines.....	30
<b>Tableau 04 :</b> Niveau d'activité autolytique et pourcentage exprimé par chaque genre Bactérien .....	35
<b>Tableau 05 :</b> Diamètres (mm) de protéolyse des souches de bactéries lactiques .....	40
<b>Tableau 06 :</b> Activité protéinasiq ue des souches sur milieu Agar au lait.....	43
<b>Tableau 07 :</b> Activité spécifique des exoprotéases .....	46
<b>Tableau 08 :</b> Activité spécifique des endoprotéases.....	47

## *Liste des figures*

---

<b>Figure 01</b> : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S.....	06
<b>Figure 02</b> : Voies fermentaires de la dégradation du glucose.....	12
<b>Figure 03</b> : Modèle de fonctionnement du système protéolytique des bactéries lactiques .....	23
<b>Figure 04</b> : Constituants cellulaires libérés par la lyse et état de l'art concernant leur devenir dans le fromage .....	25
<b>Figure 05</b> : Structure du peptidoglycane et spécificité des différentes classes d'enzymes capables d'hydrolyser le peptidoglycane.....	26
<b>Figure 06</b> : Revivification des souches étudiées sur bouillon MRS .....	37
<b>Figure 07</b> : Purification des souches sur milieu MRS .....	38
<b>Figure 08</b> : Aspect microscopique des souches codées "L2" et "E9" .....	38
<b>Figure 9</b> : Exemple de résultats de l'activité protéolytique des souches sur milieu MRS au lait... ..	41
<b>Figure 10</b> : Activité protéolytique des souches sur milieu Agar au lait.....	42
<b>Figure 11</b> : Évolution de la densité optique des cultures pures selon le temps.....	45
<b>Figure 12</b> : Effet de pH sur l'activité endoprotéasique des "L1" et "E5" .....	48
<b>Figure 13</b> : Effet de pH sur l'activité d'exoprotéase des "L1" et "E5" .....	49
<b>Figure 14</b> : Effet de température sur l'activité endoprotéasique des "L1" et "E5" .....	51
<b>Figure 15</b> : Effet de température sur l'activité exoprotéasique des "L1" et "E5" .....	51
<b>Figure 16</b> : Effet des effecteurs sur l'activité endoprotéasique des "L1" et "E5" .....	53
<b>Figure 17</b> : Effet des effecteurs sur l'activité exoprotéasique des "L1" et "E5" .....	54
<b>Figure 18</b> : Activité autolytique des souches "L1" et "E5" .....	55

### ➤ **Noms de genres bactériens**

*En.* : *Enterococcus*

*Lb.* : *Lactobacillus*

*Lc.* : *Lactococcus*

*Ln.* : *Leuconostoc*

*St.* : *Streptococcus*

### ➤ **Unités de mesures**

% : pourcentage

° C : Degré Celsius

Da, KDa: Dalton, Kilodalton

Kg, g, mg: Kilogramme, Gramme, milligramme.

h, min : heure, minute

M, mM : Molaire, millimolaire

ml,  $\mu$ l : millilitre, microlitre

N : Normalité

nm, mm : nanomètre, millimètre

p/p: poids/poids

rpm : Rotation par minute

T : Temps

T° : Température

U : Unité

$\lambda$  : longueur d'onde

### ➤ **Autres abréviations**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique Ribosomique

ATP: Adénosine triphosphate

A<sub>w</sub> : Activité de l'eau

## *Liste des abréviations*

---

BL : Bactérie lactique

BSA : Albumine Sérique Bovine

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

DO : Densité Optique

EC : Enzyme Commission of Classification

EDTA: Ethylene diamine tétraacétate de sodium

EMP: Embden- Meyerh of-Parnas

EPS: Exopolysaccharide

FAO: Food and Agriculture Organization

FBA: Fructose-1,6-bisphosphate aldolase

GC: Guanine + Cytosine

GRAS: Generally Regarded As Safe

HCl : Chlorure d'hydrogène

L(+) : Lactase (+)

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : Potentiel d'Hydrogène

SDS : Dodecyle sulfate de sodium

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

TCA : Acide Trichloroacétique

Les bactéries lactiques sont un groupe des bactéries saprophytes, représentant le deuxième plus grand marché de la production de la biomasse, après les levures. Elles sont considérées comme les bactéries les plus importantes dans les produits laitiers, raison pour laquelle elles ont été utilisées pour des siècles comme starter dans les fermentations lactières. Elles sont capables de produire plusieurs composés : des acides organiques tels que l'acide lactique, des exopolysaccharides, des substances aromatiques et antimicrobiennes, ect.. (**Budiarto et al., 2014 ; El-Kotami et al., 2015**).

Les bactéries lactiques sont largement disponibles dans la nature. Leurs propriétés ont été utilisées pour la fabrication d'une vaste gamme de produits laitiers comme le fromage, les yaourts, etc. La première caractéristique recherchée de ces microorganismes est d'augmenter l'acidité du lait en produisant de l'acide lactique à partir du lactose. En outre, en raison de la lipolyse et les activités protéolytiques au cours de l'affinage du fromage, les bactéries lactiques ont un impact significatif sur la formation du goût, d'arôme et de texture. Elles peuvent également participer à l'augmentation de prestation de santé par la capacité de diminuer la pression artérielle, stimuler le système immunitaire, favoriser l'absorption du calcium. Ces effets bénéfiques sont produits par une variété de peptides libérés lors de l'hydrolyse des protéines du lait (**Griffiths et Tellez., 2013 ; Turhan et Öner , 2014**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes exigeants qui nécessitent une source d'acides aminés ou de peptides, qui sont fournis par la protéolyse des protéines présentes dans la matière première riches en protéines comme le lait, la viande et les légumes dans lequel ils sont principalement trouvés (**Manca de Nadra, 2007**).

La protéolyse est un processus biochimique complexe qui permet la croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait. Le système protéolytique comprend des protéinases situées dans la paroi de la cellule qui permet la dégradation des caséines en oligopeptides. La deuxième partie du système protéolytique est le système de transport des peptides qui permet le transit des oligopeptides publié sur la surface cellulaire. Les peptidases intracellulaires qui hydrolysent les oligopeptides en petits peptides ou acides aminés constituent la dernière partie de ce système. Ces enzymes peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par l'autolyse bactérienne. Cette dernière est liée à l'âge de la cellule ou aux conditions

physiologiques défavorables qui activent les autolysines capables d'hydrolyser les peptidoglycane de la paroi. Les enzymes bactériennes, lorsqu'elles sont libérées dans le caillé fromager participent efficacement à l'affinage du fromage. (**Manca de Nadra, 2007; Roudj et al., 2009**).

Une meilleure connaissance des bactéries lactiques, ainsi qu'une meilleure caractérisation de leurs activités métaboliques semblent être des voies à privilégier afin de les bien exploiter soit comme ferment dans les productions industrielles, ou comme probiotique.

Dans ce cadre, le présent travail vise à l'étude du pouvoir protéolytique d'un souche de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers locaux (dix souches d'*Enterococcus* sp. et huit souches de *Lactobacillus* sp.), ainsi, la caractérisation physico-chimique partielle de l'activité enzymatique des exo et des endoprotéases. La lyse des bactéries est corrélée avec le niveau de protéolyse des caséines et le niveau d'amertume du produit. De ce fait, nous nous sommes intéressés à la détermination du taux de l'autolyse de nos souches.

Notre présent manuscrit est divisé en trois parties. La première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de deux chapitres, qui vont traiter un état de connaissance sur les bactéries lactiques, leurs principales caractéristiques, les principales activités métaboliques suscitant un intérêt technologique : plus précisément l'activité protéolytique et autolytique. La deuxième partie du manuscrit a rassemblé et énuméré les différentes méthodes et techniques mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Dans une troisième partie, les résultats obtenus sont interprétés et discutés. Finalement, une conclusion générale va permettre de récapituler les principaux résultats de cette étude avec une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

### I.1. Généralités

Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal (**Limsowtin et al., 2004 ; Gemechu, 2015**). Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle (**Quinto et al., 2014**), Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans la conservation des aliments en raison d'une part, de leur pouvoir acidifiant (acide lactique) qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques et, d'autre part, grâce à leur capacité de produire d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines (**Cizeikiene et al., 2013 ; Adeniyi et al., 2015**). Les bactéries lactiques sont employées traditionnellement dans la fermentation de végétaux, de produits laitiers ou carnés et en panification (**Chen et al., 2003 ; Dhamale et al., 2015**).

Les bactéries lactiques 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 exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (**Pilet et al., 2005**). Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Gevers, 2002 ; Hogg, 2005 ; Arena et al., 2015**).

### I.2. Les principales caractéristiques

Ce sont des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés, de forme bacilles ou coccidés (**Dhamale et al., 2015 ; Tanasupawat et al., 2015**). Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (**Hogg, 2005 ; Dhamale et al., 2015 ; Tanasupawat et al., 2015**).

Le manganèse joue un rôle important pour les bactéries lactiques en les protégeant de la toxicité de l'oxygène. Accumulé dans la cellule, cet élément est comparable à la superoxyde dismutase qui décompose les superoxydes (**Hagen et al., 2000 ; Leroy et al., 2004**).

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les

hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose (Maret *et al.*, 2015). Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO<sub>2</sub> (Atlan *et al.*, 2008 ; Maslanka *et al.*, 2015). Elles survivent dans un milieu à faible Aw, et résistent à l'éthanol (10-15 % éthanol) et au CO<sub>2</sub> (Sachindra *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2008).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les bases puriques et pyrimidiques, les acides gras et les glucides fermentes cibles (Gevers., 2002 ; Hogg, 2005). Croissance à des températures différentes (10°C et 45°C), des concentrations en NaCl (4% et 6.5%), et le pH (5-8) (Sachindra *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2008 ; Tanasupawat *et al.*, 2015).

### I.3. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hassan et Frank, 2001 ; Horvath *et al.*, 2009 ; Turhan et Öner, 2014).

### I.4. Classification

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous-espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union internationale de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

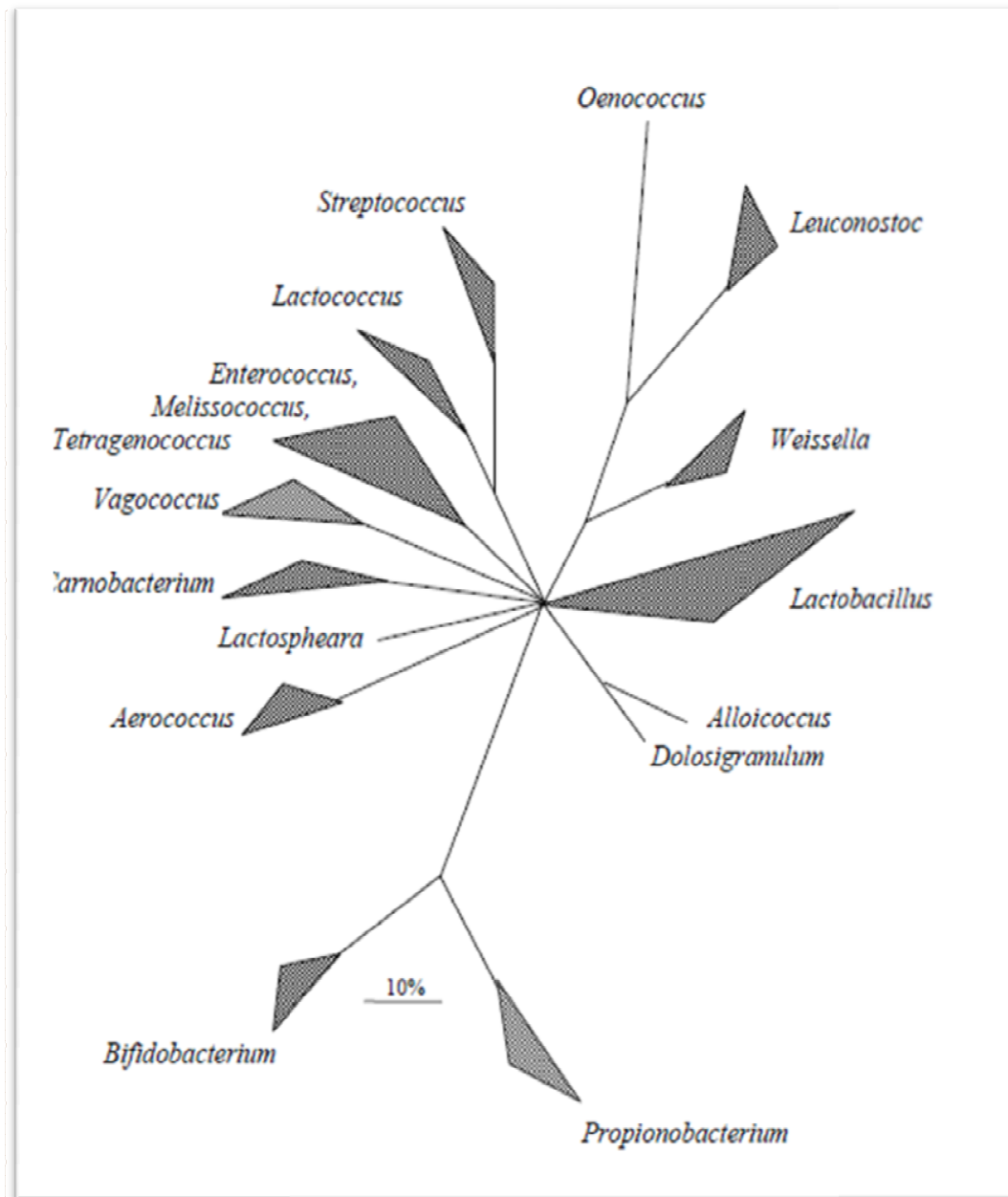
La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001).

Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques, ...D'après **Ludwig et al. (2008)**, le phylum *Firmicutes* comprend trois classes :

*Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel de (**Bergey, 2009**).



**Figure 01:** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Klein, 2003).

### I.5. Identification des bactéries lactiques

Les méthodes phénotypiques sont toujours utilisées dans les laboratoires de microbiologie alimentaire appliquée, les caractérisations morphologiques ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques, biochimiques et chimiotaxonomiques sont pratiquées. Des tests physiologiques simples, tels que la croissance à différentes températures, la tolérance aux acides et au sel ainsi que la production de gaz sont utiles pour la différenciation des genres (Gevers, 2002 ; Temmerman et al., 2004).

Les techniques génotypiques basées sur les acides nucléiques comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées (**Penaud, 2006**). En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencé par les conditions de culture (**Gevers, 2002**). Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Toutefois, il existe quelques limites (**Rossello-Mora et Amann, 2001 ; Van HylckamaVlieg et al., 2006**).

## I.6. Les principaux genres des bactéries lactiques

### I.6.1. *Lactobacillus*

*Lactobacillaceae* comprend le plus grand nombre d'espèces GRAS (Generally Recognized As Safe) et de nombreuses souches sont parmi les bactéries les plus importantes de la microbiologie alimentaire et de la nutrition humaine en raison de leur contribution à la production d'aliments fermentés ou leur utilisation comme probiotiques (**Giovanna E. Felis, Elisa Salvetti et Sandra Torriani 2015**).

Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux) (**Guiraud et al., 2003**).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**) :

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

**Groupe II** « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces

les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakeet* *Lb. plantarum*.

**Groupe III « Betabacterium »** : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire (en laiterie, fromagerie, charcuterie, dans la fabrication de la choucroute, ...). Leur rôle est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisin, choucroute, cornichon,...) (**Rodas et al., 2005 ; Figueiredo et al., 2008 ; Siezen et al., 2008**).

### **I.6.2. Enterococcus**

Les *Enterococcus* sont des micro-organismes mésophiles qui se développent dans une gamme des températures allant de 10 à 45°C, avec une température optimale de 35°C. Certaines espèces peuvent survivre à 60°C pendant 30min. Ils poussent dans des conditions hostiles de 6.5% de NaCl, de lait renfermant 0.1 % de bleu de méthylène, de concentration en sels biliaires de 40 % et dans une gamme de pH comprise entre 4.4 et 9.6 (**Galvez et al., 2012**) Les *Enterococcus* sont des coques homofermentaires ( **LeBlanc, 2006 ; Henning et al., 2015**).

Les entérocoques produisent des bactériocines considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, Ils apportent des bénéfices pour la santé (effets positifs sur la flore intestinale, ils peuvent aussi avoir des propriétés probiotiques (**Moreno et al., 2006 ; Galvez et al., 2012**). D'ailleurs, des préparations d'*En. faecium* et d'*En. faecalis* sont été utilisées en tant que probiotiques (**Guerra et al., 2007 ; Ruiz-Moyano et al., 2008**). Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles (**Marteau et al., 2004 ; Galvez et al., 2012**).

Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (**Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007**).

### I.6.3. *Streptococcus*

*Streptococcus* sont des coques en paire ou en chaîne, Gram (+), catalase (-), non sporulés, immobiles et anaérobies facultatifs. Historiquement, la différenciation sérologique de Lancefield était importante dans la classification des streptocoques. A l'heure actuelle, cette méthode est moins appréciée dans la classification mais elle reste toujours utile dans l'identification rapide de la plupart des bactéries pathogènes (**Huys et al., 2006 ; Koort et al., 2006 ; Desar et al., 2008**).

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (**Huys et al., 2006 ; Koort et al., 2006 ; Desar et al., 2008**).

*Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Pilet et al., 2005**).

### I.6.4. *Lactococcus*

Les lactocoques sont la forme de coques Gram positives et s'associent entre elles en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, leur métabolisme est généralement homofermentaire avec, principalement, la production de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Elles se distinguent par leur température de croissance minimale inférieure ou égale à 10°C et optimale voisine de 30°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont généralement présents dans divers aliments fermentés, l'environnement de produits laitiers et dans les sources végétales et animales, mais généralement pas dans les matières fécales ou dans le sol (**Teuber et Geis, 2006**).

### I.6.5. *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines

espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005 ; Tanasupawat et al., 2015). Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

#### I.6.6. *Leuconostoc*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol (Tanasupawat et al., 2015). Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrine, la capacité à croître à différents pH (5-7) et température (20-40°C), l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho et al., 2007 ; Tanasupawat et al., 2015). Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO<sub>2</sub>, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

#### I.6.7. *Bifidobacterium*

Les *Bifidobacterium* (l'ancien nom étant *Lactobacillus bifidus*) sont des bacilles présents dans la flore intestinale des nouveaux-nés. Les *Bifidobacterium* sont phylogéniquement proches des actinomycètes alors que les autres bactéries lactiques sont proches des clostridies (Guiraud et al., 2003). Souches de *Bifidobacterium* peuvent survivre le transit intestinal et persister transitoirement dans le côlon. Les bifidobactéries ont besoin d'un environnement anaérobie et un pH neutre pour survivre et être viable au nombre requis pour fournir des avantages thérapeutiques (*bifidobacterium bifidum*) (Settachaimongkon et al., 2014). Les rôles thérapeutiques de bifidobactéries dans des modèles animaux et chez les êtres humains sont dus à quatre mécanismes majeurs, y compris la modulation du système immunitaire de l'hôte, la résistance aux maladies infectieuses causées par des

rotavirus et autres entéropathogènes contrôle des maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pochite et la prévention du cancer (*bifidobacterium bifidum*) (Settachaimongkon et al., 2014).

### **I.7. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques**

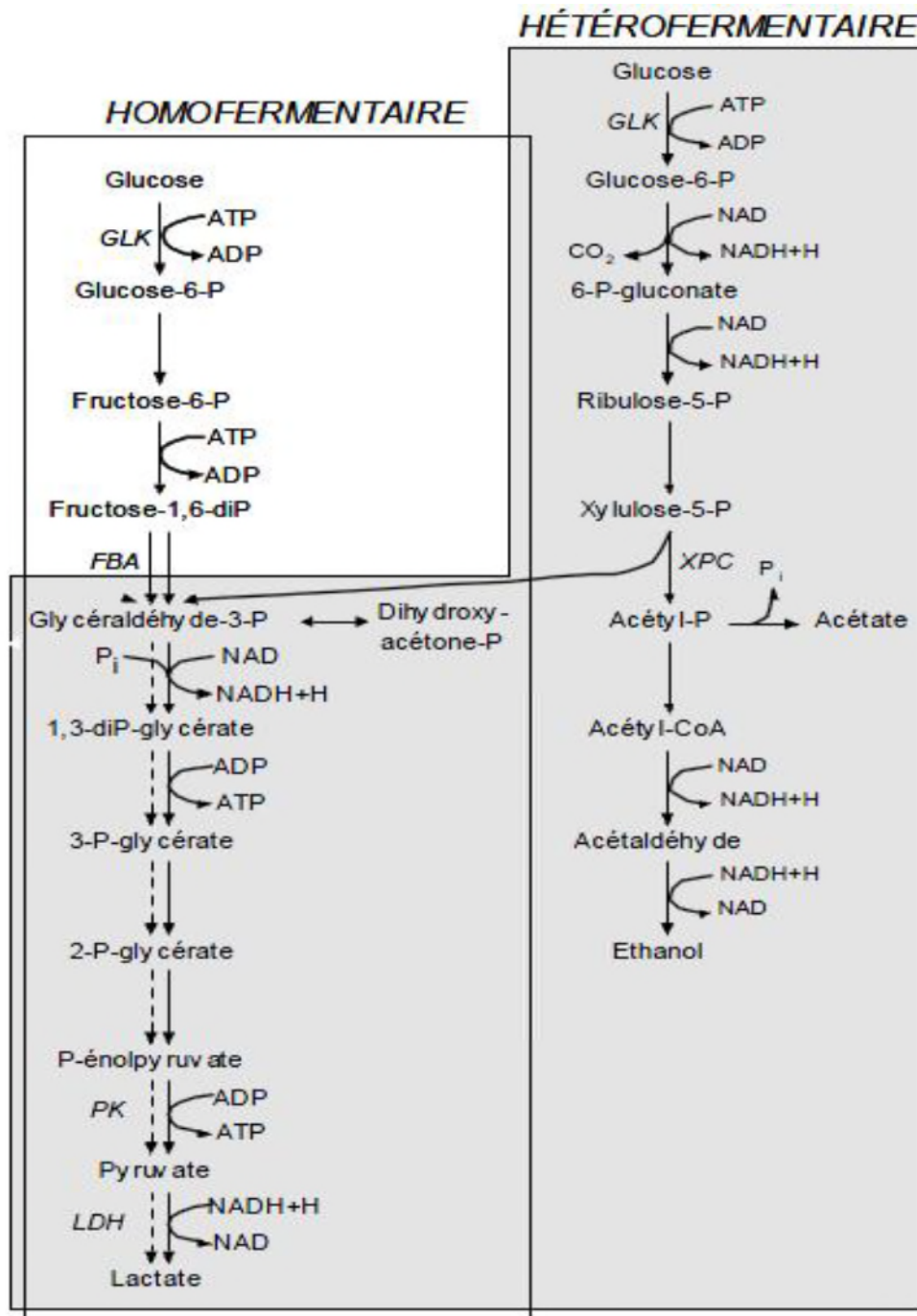
Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose) (Atlan et al., 2008). Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaire (Embden- Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan et al., 2008).

#### **I.7.1. Voie homofermentaire ou EMP**

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pedicoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Wee et al., 2006 ; Maślanka et al., 2015).

#### **I.7.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates**

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Wee et al., 2006 ; Maślanka et al., 2015).



**Figure 02:** Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008). [GLK: glucokinase, FBA: fructose-1,6- biphosphatealdolase, XPC: xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK: pyruvate kinase, LDH: lactate déshydrogénase].

## I.8. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées des BL

### I.8.1. Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (**Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008**). Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (**Béal et al., 2008**) :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (**Monnet et al., 2008**).

### I.8.2. Activité protéolytique

En général, les bactéries lactiques ont une propriété protéolytique sur les protéines contribuant à la décomposition des peptides en acides aminés (**Scannell et al., 2004 ; Drosinos et al., 2007, Dalmiş et al., 2008**). Des peptidases issues de ces bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (**Hughes et al., 2002 ; Papamanoli et al., 2003 ; Ammor et al., 2005**). Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009**).

### I.8.3. Activité lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques (**Béal et al., 2008**). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases

qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal et al., 2008 ; Serhan et al., 2009).

#### I.8.4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l' $\alpha$ -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006).

#### I.8.4. Production des substances inhibitrices

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les substances antimicrobiennes, est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire, pourrait déboucher vers la biopréservation des aliments (Labioui et al., 2005).

De nombreuses publications font état de production des bactériocines par les bactéries lactiques, ce sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les bactériocines telles que la plantacine (produite de *Lb. plantarum*), la curvacine (de *Lb. curvatus*), la leucocine (de *Leuconostoc*), la pediocine (de *Pediococcus acidilactici*) ou la nisine (de *Lactococcus*) ont démontré leur efficacité vis-à-vis des *Clostridium* ssp. (Drosinos et al., 2006 ; Albano et al., 2007; Todorov et al., 2007).

#### I.8.5. Formation des exopolysaccharides

La plupart des microorganismes synthétisent les polysaccharides. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule. D'autres sont des composants de la paroi. Un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le terme "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire". Deux types d'EPS, soit excrété dans le milieu environnant, soit lié à la surface de la cellule sous forme de capsule,

peuvent être produits par certaines bactéries lactiques (**Topisirovic et al., 2006 ; Canquil et al., 2007 ; Ai et al., 2008**).

Les travaux sur les polysaccharides bactériens, leur rôle et les conséquences de leur existence ont été d'abord réalisés en recherche médicale. A l'heure actuelle, l'utilisation des EPS couvre de vastes domaines qui vont de l'industrie alimentaire (en particulier les produits laitiers) et pharmaceutique, à la récupération assistée du pétrole (**Ruas- Madiedo et al., 2002 ;Welman et al., 2003**). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. Delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (**Amatayakul et al., 2006 ; Durlu-Özkaya et al., 2007**). L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Ruas-Madiedo et al., 2005**).

#### **I.8.6. Performance**

Indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, les bactéries lactiques doivent être résistantes aux bactériophages, aux traitements mécaniques, à la congélation ou à la lyophilisation et au stockage. Elles doivent également être tolérantes aux inhibiteurs de la croissance (antibiotiques, acidité, éthanol, chlorure de sodium) (**Béal et al., 2008**).

#### **I.8.7. Propriétés probiotiques**

Les probiotiques sont définis par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture des Nations Unies (**FAO**) et mondiale Organisation de la Santé (**OMS**) (**2001,2002**) comme «micro-organismes vivants, qui lorsqu'il est administré des quantités suffisantes confèrent un avantage de santé sur l'hôte » en plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (**Ouwehand et al., 2002 ; Da Cruz et al., 2007**). De plus, elles présentent des propriétés thérapeutiques spécifiques à chaque souche, principalement en termes d'activités immunostimulantes et anti-diarrhéiques (**FAO/WHO, 2002**).

## I.9. Applications

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques responsables de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Maret, 2015**). Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale (**Gemechu, 2015**).

Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (**Gemechu, 2015; Dhamale et al., 2015**). Selon **Mäyrä-Mäkinen et Bigret (2004)**, la fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de mille produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (**Maret, 2015**).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (**Ruas-Madiedo et al., 2002 ; Wisselink et al., 2002 ; Maret, 2015**). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (**Cizeikiene et al., 2013**) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (**Langella et al., 2001 ; Dhamale et al., 2015**).

### II.1. Protéolyse et nutrition azotée des bactéries lactiques

La protéolyse chez les bactéries lactiques est assez bien documentée (Savijoki et al., 2006 ; Dhamale et al., 2015). La machinerie protéolytique développée chez ces bactéries est assez complexe de fait de la présence limitée d'acide aminés libre dans le milieu lait et des auxotrophes de ces bactéries pour plusieurs acides aminés (Turhan et Öner, 2014). Le système protéolytique peut être divisée en plusieurs étapes : les protéines de dégradation, les peptides de transport et les peptides de dégradation qui jouent un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acide aminé à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait (Rademaker et al., 2007 ; Kelly et al., 2010 ; Kurniati et al., 2015).

### II.2. Généralités sur les caséines du lait

Les caséines sont les protéines majeures de lait (environ 80% des protéines totales). Elles se définissent comme étant la fraction protéique qui précipite à pH 4.6 à 20°C. Les caséines sont au nombre de quatre : caséine- $\alpha$ 1, caséine- $\alpha$ 2, caséine- $\beta$  et caséine- $\kappa$ . Ce sont des polypeptides phosphorés associés surtout à des constituants minéraux de manière à former des micelles de phospho-caséinate de calcium et la caséine- $\kappa$  pouvant être également glycosylé (Roe, 2001 ; Fox et al., 2004 ; Chandan, 2006).

Les caséines- $\alpha$  et  $\beta$  sont sensibles à la présence de calcium (elles précipitent), mais elles sont très peu sensibles aux enzymes protéolytiques. Par contre, la caséine- $\kappa$  n'est pas affectée par la présence de calcium, mais elle est par les protéases. L'agrégation de ces trois constituants confère à la micelle une grande stabilité dans le lait et empêche sa coagulation par les ions du calcium grâce à la caséine- $\kappa$  (Vignola, 2002 ; Fox et al., 2004 ; Belitz et al., 2009).

**Tableau 1:** Composition et certaines caractéristiques des caséines (Belitz et al., 2009).

Caséines	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$	$\kappa$
Proportion du total en caséine(%)	38	10	35	13
Résidus d'acides aminés	199	207	209	169
Groupement phosphate	8	10-13	5	1
Résidus cystéine	-	2	-	2
Poids moléculaire (Da)	23164	25388	23983	19038
pH isoélectrique	4.1	4.1	4.5-5.3	4.1-4.5
Sensibilité au calcium (précipitation) (concentration en Ca à 37°C)	++ (3-8mM)	+++ (<2mM)	+ (8-15mM)	-

### II.3. Les protéases

#### II.3.1. Généralités sur les protéases

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Abidi et al., 2014). Elles sont normalement générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée (Benedykt et Katarzyana, 2008 ; Reddy et al., 2008 ; Wilkesman et Kurz, 2009). Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications : industrielle, biotechnologique, médicale et dans les domaines de recherche (Coral et al., 2003 ; Sandhya et al., 2005 ; Budiarto et al., 2016). Elles ont été utilisées pour la première fois dans l'industrie alimentaire comme des agents de coagulation pour la production de fromage (Sandhya et al., 2004).

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002 ; Sandhya et al., 2005**). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques (**Coral et al., 2002 ; Gupta et al., 2002 ; Sandhya et al., 2005 ; Aguilar et al., 2008**):

- La susceptibilité à la manipulation génétique;
- La grande diversité biochimique des produits obtenus. Les microorganismes élaborent une large gamme des protéases, qui peuvent être intra et/ou extracellulaires :
- Les premières sont importantes dans les différents processus cellulaires et métaboliques, tel que la sporulation, la différenciation, la maturation des enzymes et la maintenance du réserve cellulaire en protéines.
- Tandis que les autres sont essentielles pour l'hydrolyse des sources nutritionnelles protéiques et pour inhiber la cellule d'absorber ou d'utiliser des produits hydrolytiques.

### II.3.2. Propriétés

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que : le site actif, le mécanisme catalytique, les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha et al., 2006 ; Vishwanatha et al., 2009 ; Miratis Sulthoniyah et al., 2015**). La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser. Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides (**Sumantha et al., 2006 ; Benedykt et Katarzyana, 2008**).

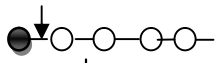
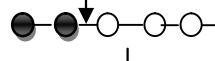

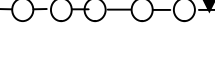
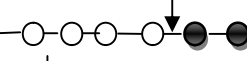

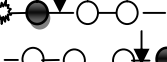
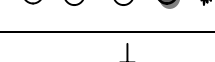
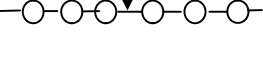
Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases

peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) (**Benedykt et Katarzyna, 2008**).

### **II.3.3. Classification**

D'après "The Enzyme Commission of Classification", les protéases appartiennent au groupe 3 (les hydrolases) et sous groupe 4 (qui hydrolysent les liaisons peptidiques) (**Rao et al., 1998 ; Sumantha et al., 2006 ; Wilkesman et Kurz, 2009**). Auparavant, la classification a été basée essentiellement sur la source d'enzyme, l'action de catalyse, le poids moléculaire et la spécificité de substrat ou de la charge. Cependant, un système plus rationnel s'utilise actuellement basé sur la comparaison des sites actifs, les mécanismes d'action et sur la structure tridimensionnelle (**Aguilar et al., 2008**).

Tableau2: Classification des protéases (Rao et al., 1998).

Protéases	Mode d'action	EC N°
<b>Exopeptidases</b>		
<b>Amino-peptidases</b>		3.4.11
Dipeptidyl peptidases		3.4.14
Tripeptidyl peptidases		3.4.14
<b>Carboxy-peptidases</b>		3.4.16-3.4.18
Protéase type Sérine		3.4.16
Métallo-protéase		3.4.17
Protéase type Cystéine		3.4.18
Peptidyle dipeptidase		3.4.15
Dipeptidase		3.4.13
<b>Omega peptidases</b>		3.4.19
		3.4.19
<b>Endopeptidases</b>		
		3.4.21-3.4.34
Protéase à Sérine		3.4.21
Protéase à Cystéine		3.4.22
Protéase à acide aspartique		3.4.23
Métallo-protéase		3.4.24
Endopeptidase (mécanisme catalytique est inconnu)		3.4.99

○ Ces cercles représentent les résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique ;

● Les cercles pleins indiquent les acides aminés terminaux ;

✱ Les étoiles signifient les terminaux bloqués ;

↓ Les flèches indiquent les sites d'action d'enzymes.

### II.3.3.1. Les exopeptidases

La protéolyse chez les bactéries lactiques commence par l'action d'une protéase de paroi, enzyme à sérine qui hydrolyse les caséines du lait en oligopeptides (**Bachmann et al., 2012**). Certaines souches des bactéries lactiques ne possèdent pas de protéase de paroi et dépendent de la protéase de paroi présente chez les autres souches pour se développer dans le lait (**Savijoki et al., 2006**). Cinq types de protéases de paroi de la même famille, mais présentant certaines différences, ont été caractérisées chez les bactéries lactiques : PrtP chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*, PrtH chez *Lb. helveticus*, PrtR chez *Lb. rhamnosus*, PrtS chez *St. thermophilus* et PrtB chez *Lb. Bulgaricus* (**Savijoki et al., 2006 ; Hou et al., 2015 ; González-Olivares et al., 2014**). Elles contiennent différents domaines : Le domaine correspondant au peptide signal (PP), le domaine catalytique des protéases à sérine (PR), un domaine d'insère (I) qui régule probablement leur spécificité, le domaine A de fonction inconnue, le domaine B participant probablement à la stabilité, le domaine hélix (H) qui positionne A et B à l'extérieur de la cellule et un domaine hydrophobe W (**Atlan et al., 2008**).

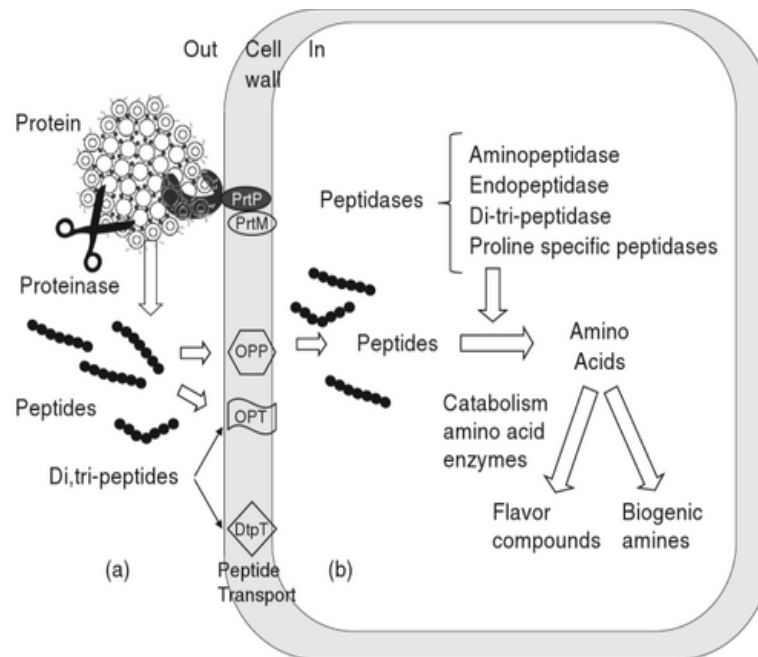
### II.3.3.2. Les peptides de transport

Les oligopeptides produits par l'action de protéase constituent la source principale d'acide aminé pour les lactocoques. Ces derniers sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de trois ou quatre transporteurs selon la souche (**Liu et al., 2010 ; Griffiths et Tellez, 2013**). Ils appartiennent à deux grands groupes : les PRT (peptide transport) et les ABC (ATP-binding-cassette) transporteurs. Pour les premiers, le transport de peptide dépend de la force proton-motrice, pour les seconds il dépend de l'ATP. Les systèmes Opp appartiennent à la super famille des ABC transporteurs. DtpT et DtpP sont des transporteurs proton- dépendants. Ces transporteurs se distinguent par leur organisation et leur spécificité. Le système Opp transport les peptides entre 4 et 18 acides aminés (**Lamarque et al., 2004**). DtpT et DtpP transportent les di et tri-peptides (**Hou et al., 2015**).

### II.3.3.3. Les endopeptidases

Les peptides internalisés sont ensuite hydrolysés par plusieurs peptidases différentes avec des spécificités chevauchantes dans certains cas (**Savijoki et al., 2006 ; Nájera-Domínguez, Gutiérrez-Méndez., 2013**). Les aminopeptidases générales comme PepC et PepN libèrent des acides aminés de l'extrémité N-terminale d'une grande quantité

d'oligopeptides (Liu et al., 2010). Les aminopeptidases PepV et PepT ont aussi des spécificités de séquence très large et hydrolyse des di et tri-peptides, respectivement (Donkor et al., 2007). L'endopeptidase PepO, ou encore PepF, hydrolyse des oligopeptide d'une certaine taille, ainsi PepX et PepQ sont spécialisées dans l'hydrolyse des peptides contenant la proline, très abondant dans les caséines (Liu et al., 2010 ; González-Olivares et al., 2014 ; Hou et al., 2015).



**Figure 3:** Modèle de fonctionnement du système protéolytique des bactéries lactiques. (a) : compartiment extracellulaire, (b) : compartiment endocellulaire (Kowalczyk et al., 2015).

#### II.4. Régulation de la protéolyse chez les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques répondent à la quantité d'azote disponible en régulant leur système protéolytique par l'expression d'un groupe des gènes PrtP, PrtM, Opp-PepD, PepN, PepC et PepX uniquement en conditions d'azotes limitant et elles sont réprimées lorsque les conditions sont favorables. Il est connu que CodY régule négativement l'expression de certains gènes codant des protéines participant à la protéolyse et que cette répression est modulée par quantité d'acides aminés branchés (isoleucine, leucine, valine). Des expériences in vitro ont montré que CodY reconnaît une séquence inter génique précédant l'opéron Opp régulé et que les acides aminés branchés stimulent cet accrochage (Hassain, 2013 ; Hou et al., 2015).

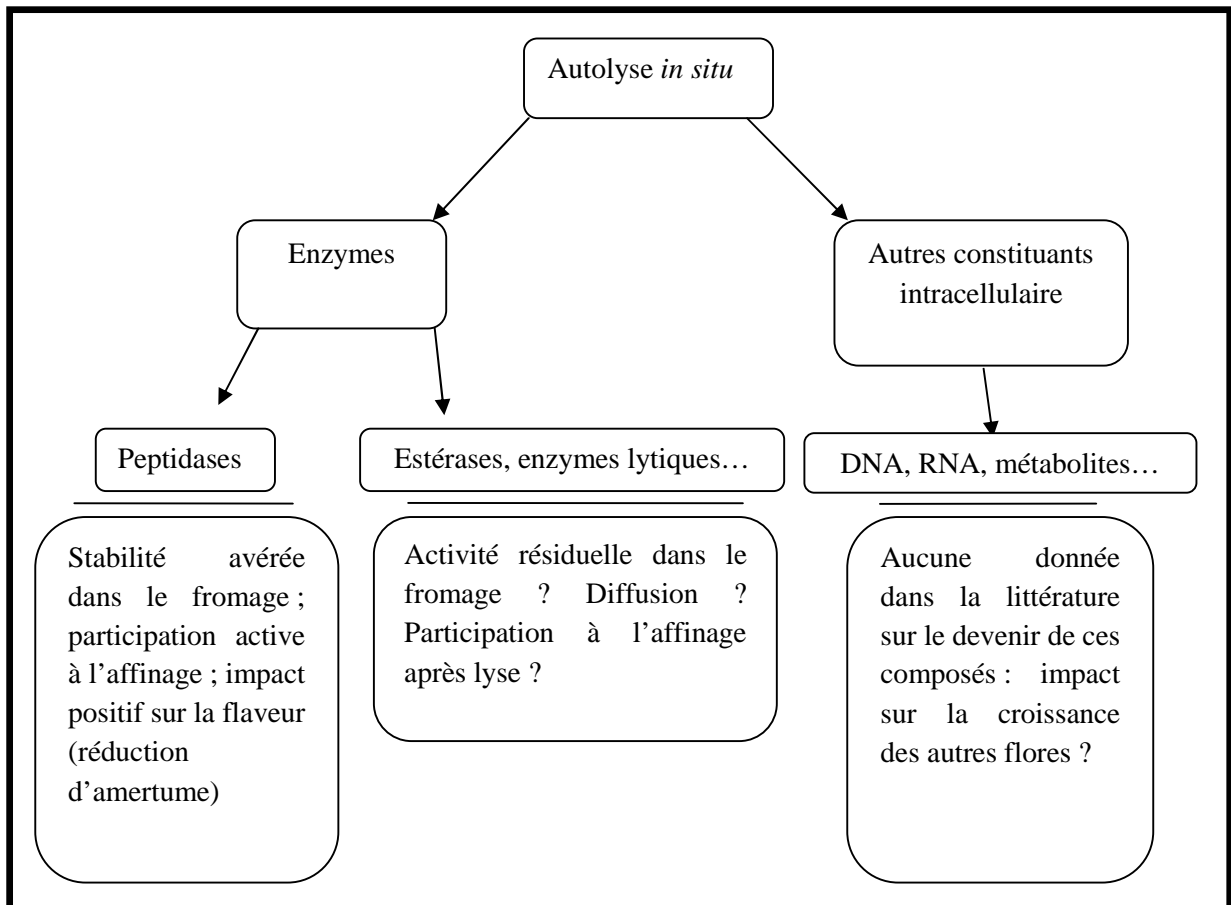
### II.5. Catabolisme des acides aminés

Le catabolisme des acides aminés par les bactéries lactiques est fortement impliqué dans la qualité et la sécurité des produits fermentés. En effet, il peut générer des composés toxiques tels que des amines biogènes, mais il est également une voie majeure de formation de molécules aromatiques. Le catabolisme des acides aminés peut également être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (**Atlan et al., 2008 ; Nájera-Domínguez et Gutiérrez-Méndez, 2013 ; Sahingil et al., 2014**).

### II.6. Autolyse bactérienne

Durant de la phase de déclin, et après l'épuisement nutritionnel du milieu et l'accumulation des déchets toxiques les cellules se lysent, s'ouvrent et libèrent leur contenus cellulaires dans le milieu. Cette phase correspond à l'autolyse spontanée (**Roudj et al., 2009**). L'autolyse bactérienne spontanée ou induite, résulte de la dégradation enzymatique du constituant majeur de la paroi cellulaire, le peptidoglycane, par des peptidoglycane hydrolases endogènes (PGHs) nommées « autolysines », il s'agit d'un hétéropolymère constitué de chaînes linéaires de polysaccharides composés d'un enchainement d'acides N-acétyl muramique (MurNAc) et de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et liées entre elles par des courtes chaînes peptidiques (**Lortal et Chartier, 2005 ; Nájera-Domínguez et al., 2013**).

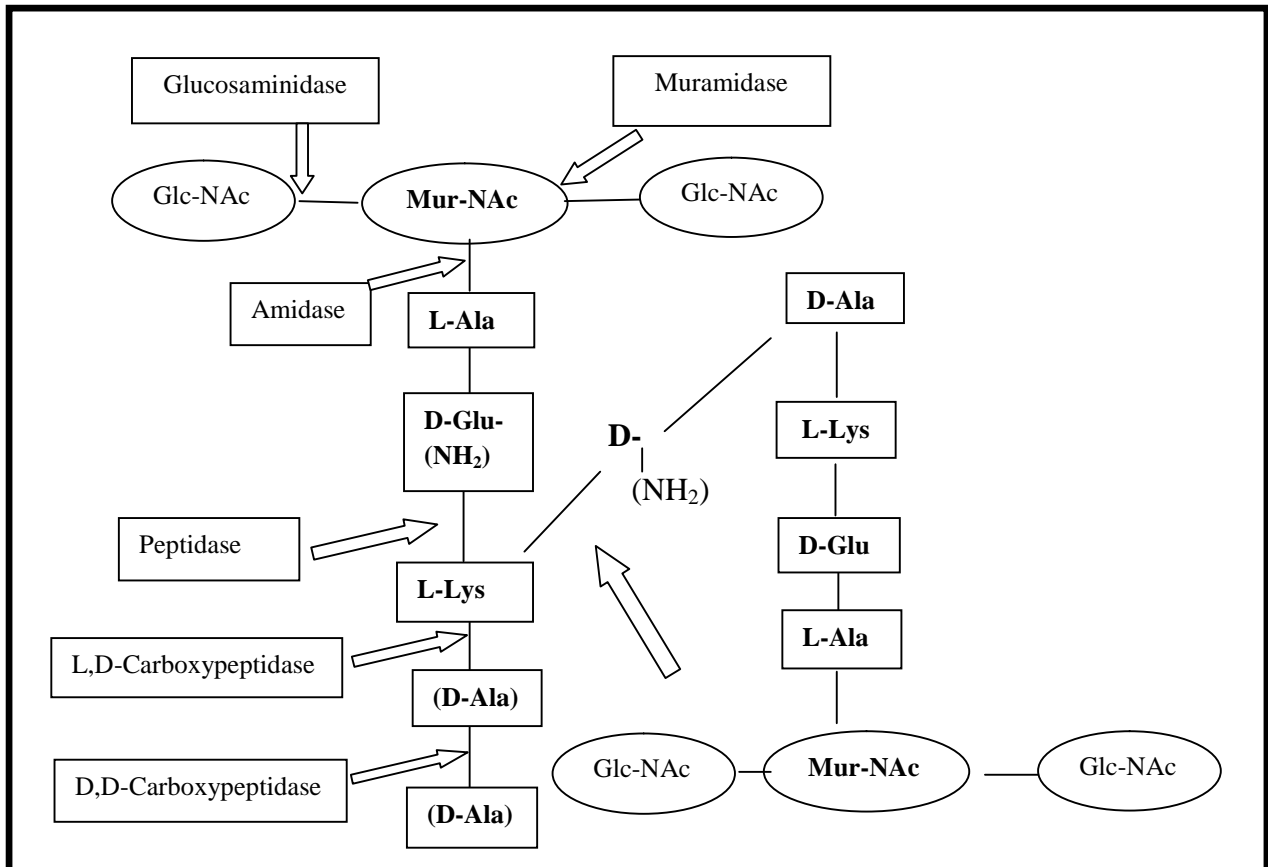
Le phénomène d'autolyse a été observé dans beaucoup de bactéries Gram positives que négatives. Il arrive généralement dans des conditions qui aboutissent à la cessation de la synthèse de peptidoglycane, par exemple la famine de nourriture ou d'autres conditions environnementales défavorables (**Lortal et Chartier, 2005 ; Roudj et al., 2009**). Sachant que l'autolyse de la cellule permet la libération des enzymes intracellulaire (protéolytique et autres) nécessaire à la maturation fromagère (**Lazure-Demers, 2000 ; Roudj et al., 2009**).



**Figure 4 :** Constituants cellulaires libérés par la lyse et leur devenir dans le fromage (Atlan *et al.*, 2008).

### II.6.1. Les autolysines

Les autolysines ou appelées également peptidoglycane hydrolase sont des enzymes capable d'hydrolyser la structure de base des parois bactériennes, le peptidoglycane, engendrant un dommage de l'intégrité de la cellule (Lazure-Demers, 2000 ; Roudj *et al.*, 2009). Ces enzymes sont localisés dans la paroi même des bactéries. Elles jouent habituellement un rôle positif au sein de la bactérie (Lortal, 1995), dans son métabolisme normal, elles sont impliquées dans le maintien et le développement de paroi, la division cellulaire, la formation des flagelles et la formation et la germination des spores. Différentes classes d'hydrolases de peptidoglycane peuvent être définies selon leur spécificité d'hydrolyse de peptidoglycane. L'action de ces enzymes sur le peptidoglycane peut conduire à la lyse de la cellule lorsqu'un nombre suffisant de liaisons est hydrolysé, après arrêt de la synthèse du peptidoglycane, par exemple en situation de carence nutritionnelle (Chartier, 2005 ; Hassain, 2013).



**Figure 5** : Structure du peptidoglycane et spécificité des différentes classes d'enzymes capables d'hydrolyser le peptidoglycane (Atlan *et al.*, 2008).

## II.6.2. Facteurs d'induction de l'autolyse bactérienne

Sous l'influence de plusieurs facteurs physiques, chimiques, enzymatiques ou autre, l'autolyse peut se déclencher (Hilde *et al.*, 1995 ; Kang, 1998 ; Nájera-Domínguez *et al.*, 2013) :

### II.6.2.1. Les facteurs physico-chimiques

Les facteurs physico-chimiques sont parmi les paramètres qui ont une influence sur la capacité des cellules à s'autolyse.

- **Température** : est l'un des facteurs les plus étudiés, plus la température est élevée plus l'autolyse est importante.
- **Le pH** : l'activité d'autolysine dépend du pH optimum du milieu de la culture bactérienne variant de 5,5 à 8.
- **Choc osmotique** : une augmentation du taux d'autolyse a été démontrée à maintes reprises lors de l'exposition des cellules bactériennes à des milieux fortement hyperosmotiques, ou à des milieux hypoosmotiques.

- **Les ions divalents et les agents chélateurs** : lorsque des ions divalents (comme  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) sont ajoutés à des tampons d'autolyse, on peut assister à une augmentation de l'activité autolytique, par contre, des résultats contraires ont été rapportés chez certaines espèces.

De plus, l'utilisation de certains agents chélatants (comme l'EDTA) réduit la dégradation protéolytiques des enzymes autolytiques par chélation des ions leur servant de cofacteurs (El- Soda et al., 1994).

#### II.6.2.2. Les facteurs enzymatiques

En plus des autolysines bactériennes, d'autres enzymes ont aussi le potentiel d'hydrolyser la paroi bactérienne, le lysozyme de blanc d'œuf de poule est un meilleur exemple, on peut aussi inclure avec les facteurs enzymatiques, des agents chimiques ou des antibiotiques ayant une action directe ou indirecte sur l'activité des enzymes autolytiques (Ohmiya et Sato, 2014).

#### II.7. Intérêt de l'activité protéolytique et autolytique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques et particulièrement *Lactococcus lactis* est responsable d'une activité protéolytique qui est le phénomène dominant lors de l'affinage au cours de la formation de fromage. Cette activité contribue dans l'apparition des courts peptides et d'acides aminées, précurseurs de nombreuses molécules riches en arômes et en saveurs (Terzić-Vidojević et al., 2014 ; Turhan et Öner, 2014).

D'autre part, lors de la digestion de lait des peptides sont libérés des caséines, une fraction de ces peptidiques est susceptible d'exercer des effets désirables chez les consommateurs après l'ingestion de ce lait fermenté (Dhamale et al., 2015). Ces peptides sont désignés peptides fonctionnels ou encore peptides bioactifs (Turhan et Öner, 2014). Il y a quatre domaines principaux dans lesquels l'effet observé lors de la consommation des produits laitiers, peut être attribué à ces peptides, qui sont respectivement, le système digestif, les défenses de l'organisme, le système cardio-vasculaire et le système nerveux (Tome, 1998).

#### II.8. Les amines biogènes

Les amines biogènes (AB), aussi appelées amines naturelles, sont des bases azotées de faible poids moléculaire, constituant de nombreux aliments (Burdychova et al., 2007). Les

AB peuvent être d'origine endogène à de faibles concentrations dans les aliments non fermentés comme les fruits, les légumes, la viande, le lait et le poisson. Elles sont formées aussi par la décarboxylation des acides aminés ou par l'amination et la transamination des aldéhydes et des cétones lors de la détérioration des aliments ou au cours de la fermentation microbienne contrôlée ou spontanée (**Karovičová et al., 2005 ; McCabe-Sellers et al., 2006**). A noter que d'après **Bauza et al. (1995)**, l'amination des cétones et aldéhydes est à l'origine des amines volatiles.

## **0I.I. Matériel et Méthodes**

Notre travail a été réalisé au laboratoire de biologie du Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila, durant la période Février-Avril de l'année 2016. Il a pour objectif de recouvrir les points suivants :

- Etude de l'activité protéolytique d'une collection de bactéries lactiques sur gélose;
- Caractérisation physico-chimique partielle de l'activité protéolytique des exo et des endoprotéases des souches sélectionnées;
- Evaluation de l'activité autolytique des souches sélectionnées.

## **II.1. Matériel**

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, nous nous sommes servis du matériel suivant :

### **II.1.1. Matériel biologique**

#### **II.1.1.1. Les souches bactériennes**

Les dix-huit souches de bactéries lactiques ont été utilisées pour la réalisation de cette étude. Ces souches ont été identifiées par les techniques de microbiologie classique. Le nom des espèces et leurs origines sont portés sur **le tableau 03**.

**Tableau 03** : Espèces de bactéries lactiques utilisées et leurs origines.

<b>Souches</b>	<b>Origine</b>	<b>Code</b>
<i>Enterococcus</i> sp. C02	Beurre de chèvre	E1
<i>Enterococcus</i> sp. C06	Beurre de chèvre	E2
<i>Enterococcus</i> sp. C08	Beurre de chèvre	E3
<i>Enterococcus</i> sp. C09	Beurre de chèvre	E4
<i>Enterococcus</i> sp. C10	Beurre de chèvre	E5
<i>Enterococcus</i> sp. C16	Beurre de chèvre	E6
<i>Enterococcus</i> sp. C18	Beurre de chèvre	E7
<i>Enterococcus</i> sp. C19	Beurre de chèvre	E8
<i>Enterococcus</i> sp. C30	Beurre de chèvre	E9
<i>Enterococcus</i> sp. C40	Beurre de chèvre	E10
<i>Lactobacillus</i> sp. K07	Klila	L1
<i>Lactobacillus</i> sp. K08	Klila	L2
<i>Lactobacillus</i> sp. K11	Klila	L3
<i>Lactobacillus</i> sp. K20	Klila	L4
<i>Lactobacillus</i> sp. K22	Klila	L5
<i>Lactobacillus</i> sp. K22S	Klila	L6
<i>Lactobacillus</i> sp. K32	Klila	L7
<i>Lactobacillus</i> sp. K34	Klila	L8

### II.1.1.2. Le lait écrémé

Le lait écrémé en poudre a été fourni par l'unité GROUZ, Ouad El Athmania, Mila. Il a été utilisé pour l'étude du pouvoir protéolytique des bactéries lactiques.

### II.1.2. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Les géloses** : MRS (de Man-Rogosa et Sharp), Agar au lait, MRS au lait écrémé.
- **Les bouillons** : MRS, Bouillon MRS au lait écrémé.

La stérilisation des milieux et des matériels nécessaire pour la culture s'effectue par autoclavage à 121°C pendant 10 minutes.

### **II.1.3. Produits chimiques**

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

- **Les colorants:** Violet de Gentiane, fuschine, pourpre de bromocrésol.
- **Les acides et bases:** HCL (2N), NaOH, TCA à 5%.
- **Alcool et autres:** Réactif de Bradford, éthanol, lugol, eau oxygénée, caséine, tyrosine, trypsine, albumine sérique bovine (BSA), NaCl, Tween 80 à 2%, EDTA, SDS à 0.25%, CaCl<sub>2</sub>.

### **II.1.4. Tampons**

La réalisation de la présente étude a nécessité les tampons suivants :

- Tampon citrate de sodium 1% pH 6.8 ;
- Tampon phosphate 10mM (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 5.5 ;
- Tampon phosphate 50mM (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 6;
- Tampon phosphate de sodium Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, pH 7.8.

### **II.1.5. Appareillage**

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Agitateur électrique (Stuart) ;
- Autoclave (Pbibrand) ;
- Bain Marie (Mettler) ;
- Balance (Kern) ;
- Balance analytique (Kern) ;
- Centrifugeuse électrique (Sigma) ;
- Etuves (Mettler) ;
- Micropipettes (Socorex) ;
- Microscope optique (Optika) ;
- pH mètre (Hanna) ;
- Réfrigérateur (Samsung) ;
- Spectrophotomètre (Shimadzu, UV1800) ;
- Vortex électrique (Topmix).

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Revivification et purification des souches bactériennes**

Les souches lactiques utilisées ont été cultivées sur bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Le développement des bactéries se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond de tube.

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, préalablement coulée et solidifiée, ont étéensemencées par stries, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h jusqu'à l'obtention des colonies homogènes de même forme, même taille et même couleur (**Idoui et al., 2009**).

### **II.2.2. Confirmation de la pureté des souches**

La pureté des souches a été vérifiée en réalisant une coloration de Gram et une recherche de la catalase.

#### **II.2.2.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été effectuée après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram selon le protocole décrit par **Prescott et al. (2003) (voir annexe 02)**. Celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

#### **II.2.2.2. Test de la catalase**

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Prescott et al. (2003)**. Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu MRS gélosé à l'aide d'une anse stérile dans de l'eau oxygénée. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

### **II.2.3. Etude de l'activité protéolytique des souches lactiques**

#### **II.2.3.1. Activité protéolytique sur gélose MRS au lait**

Pour mettre en évidence cette activité, la gélose MRS (**voir annexe 01**) au lait 10% a été coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman n°3 stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 24h, les souches lactiques dégradent les caséines en acides

aminés pour assurer leur développement dans le lait, dont la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (Grattepanche, 2005).

### II.2.3.2. Activité protéolytique sur milieu Agar au lait

L'activité protéolytique des souches pures a été évaluée par la méthode décrite par Thivierge (1999), c'est la méthode des puits sur milieu Agar au lait 3% :

Après avoir coulé et solidifier le milieu agar au lait 3%, des puits ont été confectionnés, le fond de chaque puits est soudé par le même milieu. Après solidification complète, chaque puits a reçu 25µl de la culture jeune. Le caractère protéolytique est estimé par mesure des halos clairs autour de chaque puits après une incubation à 37°C pendant 48h. L'activité protéolytique est exprimée en unité trypsique/ml.

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

### II.2.4. Caractérisation physico-chimique partielle de l'activité protéolytique

Après un travail préalable de screening parmi un ensemble de souches pour cette activité d'intérêt, nous avons retenu pour la suite de l'étude deux souches lactiques : *Lactobacillus* sp. codée L1 et *Enterococcus* sp. codée E5.

#### II.2.4.1. Suivi de la croissance bactérienne des deux souches lactiques

Des tubes contenant le bouillon MRS ont étéensemencés par les souches bactériennes jeunes (âgées de 6h) de L1 et E5. Le suivi de la croissance bactérienne a été réalisé en mesurant la densité optique (DO<sub>620</sub>) à temps zéro heure (T<sub>0</sub>), puis après 2h, 4h, 6h, 8h et 24h d'incubation à 37°C.

#### II.2.4.2. Préparation de l'extrait enzymatique des exoprotéases

L'extrait enzymatique des deux souches L1 et E5 a été préparé par modification de la méthode de Roudj et al. (2009) : des cultures bactériennes jeunes (âgées de 18h) ont été centrifugées à 9600 rpm/6min et les surnageants sont récupérés et considérés comme extrait enzymatique brut des exoprotéases.

### II.2.4.3. Préparation de l'extrait enzymatique des endoprotéases

L'extrait enzymatique des deux souches *Lactobacillus* sp. **L1** et *Enterococcus* sp. **E5** a été préparé selon la méthode de **Guo et al. (2009)** : après une centrifugation des cultures jeunes (âgées de 18h) à 4500 rpm/20min, les culots ont été lavés trois fois par le tampon phosphate de sodium 50mM (pH 7.8), les cellules bactériennes sont resuspendues dans une solution (tampon phosphate de sodium 50mM, NaCl 100mM, 0.25% SDS, 1mg/ml lysosyme, pH 8.5) avec agitation. Après incubation pendant 3h à 37°C, la solution bactérienne est centrifugée à 10000 rpm/20min et le surnageant est récupéré et considéré comme extrait enzymatique des endoprotéases.

### II.2.4.4. Détermination de la concentration en protéines totales des extraits enzymatiques

La concentration en protéines totales est déterminée selon la méthode de Bradford (1976): 5ml de réactif de Bradford (**voir annexe 01**) est ajouté à 0.5ml du surnageant des exoprotéases, le mélange est bien agité à l'aide d'un vortex. Après incubation à 37°C pendant 30min, l'absorbance est mesurée à 595nm. La concentration en protéines est déterminée en mg/ml à l'aide d'une courbe d'étalonnage de la BSA (**voir annexe 04**).

### II.2.4.5. Détermination de l'activité protéasique des exo et endoprotéases

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

Après congélation, une centrifugation à 6000 rpm/10min est faite et l'absorbance des surnageants est mesurée à 280nm. L'activité protéasique est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage de tyrosine en U/ml, qui correspond à l'activité en mg de tyrosine libérée pendant une heure de temps par 1ml d'une solution d'enzyme.

### II.2.4.6. 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**) :

Activité spécifique (U/mg)= Activité enzymatique (U/ml) / Protéines totales (mg/ml).

### **II.2.4.7. Facteurs influençant l'activité protéasique des souches lactiques**

#### **II.2.4.7.1. Effet du pH**

L'influence du pH est étudiée en mesurant l'activité enzymatique des exo et endoprotéases sur le substrat dissout (caséine) dans des solutions tampons à différents pH 5.4/5.7/6/7.2 et 8.2, selon la méthode décrite en **II.2.4.5**. Le pH optimal est déterminé à partir de la courbe d'activité protéolytique en fonction du pH.

#### **II.2.4.7.2. Effet de la température**

Pour l'estimation de l'effet de la température sur les protéases, les mêmes conditions de travail ont été reprises en **II.2.4.5** sauf l'incubation des mélanges a été conduite pendant 30min à des températures variables (28°/30°/37°/42°/50°C). La température optimale est déterminée à partir de la courbe d'activité protéolytique en fonction de la T°.

#### **II.2.4.7.3. Effet des effecteurs**

Les méthodes de **Sutar et al. (1986)** et **El-Ghaish (2010)** permet de préciser l'effet des effecteurs (CaCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 10mM, NaCl 5%, tween 80 à 2%) sur l'activité protéasique des exo et endoprotéases : un volume de 0.3ml d'extrait enzymatique est ajouté à 1.5ml du tampon citrate PH 6.8 additionné des différents effecteurs. Après une heure d'incubation à 37°C, un volume de 0.4ml de caséine (2.5% dans le citrate de sodium 0.02M) est ajouté au mélange réactionnel.

Après incubation au bain marie pendant 30min à 37°C, la réaction est stoppée par l'addition de 2.6ml de TCA 5% et 0.4ml de HCl (2N). Ce mélange est laissé au congélateur avant d'être soumis à une centrifugation (6000 rpm pendant 10min) et l'absorbance des surnageants est mesurée à 280nm.

### **II.2.5. Activité autolytique**

L'activité autolytique des souches bactériennes a été évaluée par la méthode décrite par **El Din et al., 2002** :

Les souches bactériennes cultivés sur bouillon MRS ont été recueillis par centrifugation (5000 rpm/10 min) après 6h d'incubation à 30°C. Ces cellules ont été lavées deux fois par

le tampon phosphate de potassium (10mM, pH 5.5) et reprises par la suite dans le tampon de phosphate de potassium (50mM, pH 6) additionné de 1M de NaCl de sorte à avoir une suspension bactérienne à une  $DO_{560nm}$  égale 1. Ces suspensions cellulaires sont soumises à un cycle de congélation à  $-20^{\circ}C$  pendant une nuit puis une décongélation 1 h à température ambiante. Après, ces cellules sont par la suite incubées à  $37^{\circ}C$  pendant 24h et une semaine, la DO est mesurée à une longueur d'onde de 560nm. Le taux d'autolyse est exprimé en pourcentage (%) selon la méthode de **Boutran et al., 1988**, il est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'autolyse (\%)} = (A_0 - A_t) 100 / A_0$$

Où :

$A_0$  : La DO de la suspension bactérienne avant l'incubation.

$A_t$  : La DO de la suspension bactérienne après incubation.

L'autolyse bactérienne est classée selon le niveau d'activité de chaque genre bactérien comme rapporté par **Ayad et al., 2004** et résumé dans le tableau suivant (**Tableau 04**) :

**Tableau 04** : Niveau d'activité autolytique et pourcentage exprimé par chaque genre bactérien (**Ayad et al., 2004**) .

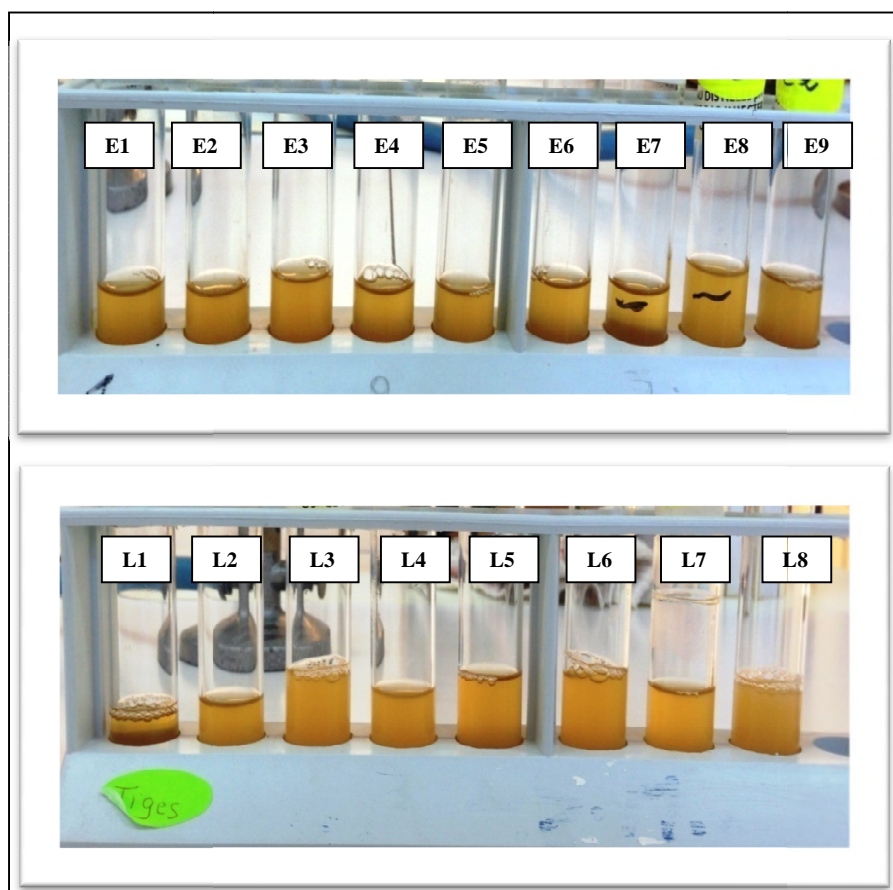
Niveau d'autolyse (%)	Lactocoques	Entérocoques	lactobacilles
<b>Bonne autolyse</b>	25-37	35-66	70-96
<b>Moyenne autolyse</b>	15-24	24-34	40-69
<b>Faible autolyse</b>	01-14	0.22	0.39

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Revivification et confirmation de la pureté des souches

##### III.1.1. Examen macroscopique

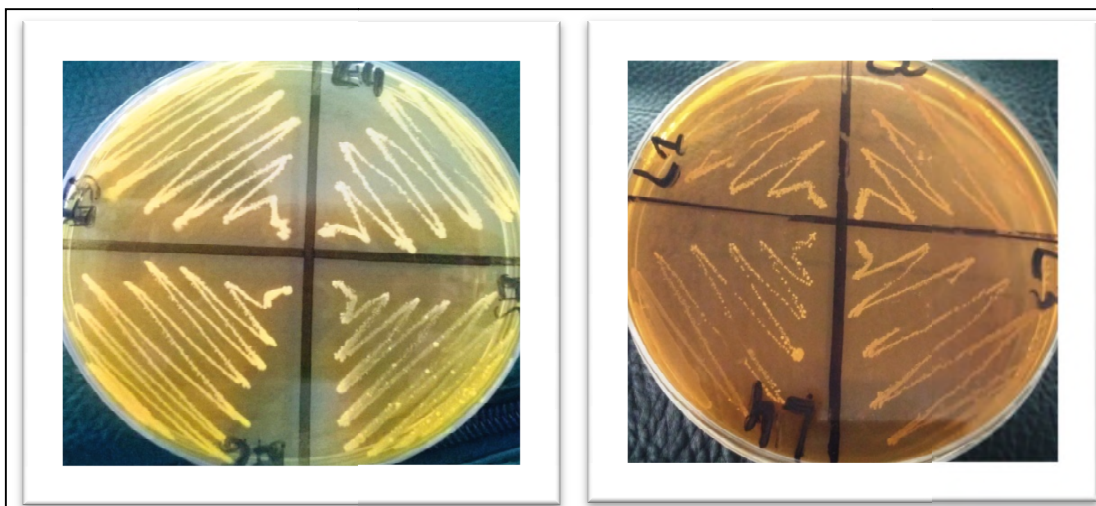
La revivification des dix-huit souches lactiques a été réalisée sur bouillon MRS. La présence de trouble homogène avec une pastille blanche au fond de tube désigne la viabilité de la souche lactique (**Figure 06**).



**Figure 06** : Revivification des souches étudiées sur bouillon MRS.

"L": *Lactobacillus* sp. ; "E": *Enterococcus* sp.

Ces souches ont été purifiées sur milieu MRS (**Figure 07**). La caractérisation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide MRS après 24h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques : de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanche crème.

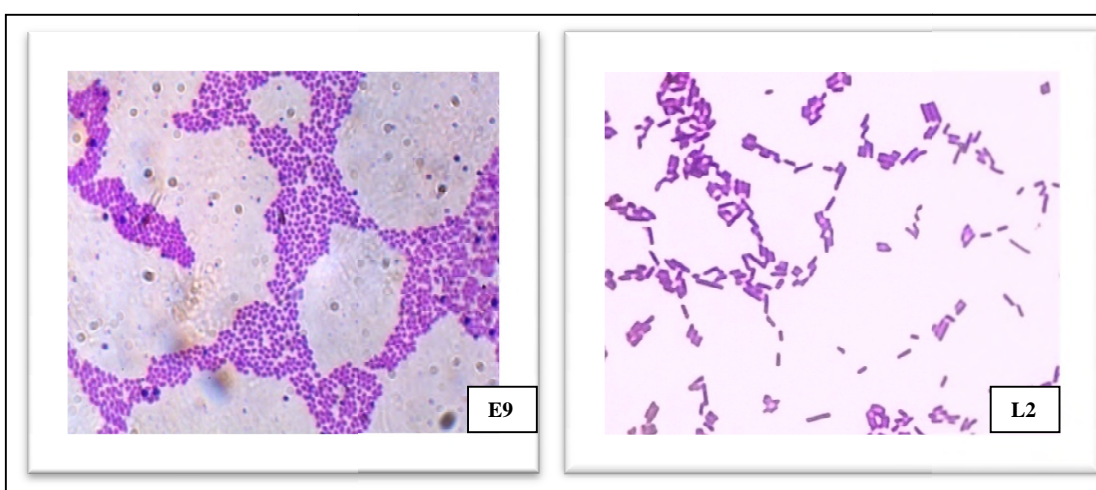


**Figure 07 :** Purification des souches sur gélose MRS.

"L": *Lactobacillus* sp. ; "E": *Enterococcus* sp.

### III.1.2. Examen microscopique

La coloration de Gram a montré que toutes les souches ont été de Gram positif. L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules, coque et bacille de différentes tailles. Les bactéries sous forme de cocci (10 souches) se disposent en chaînettes, en amas ou sont parfois isolées, par contre celle de la forme bacillaire (08 souches) sont sous forme de chaînette. **La figure 08** montre l'aspect des souches codées "E9" et "L2". La pureté est confirmée, par la suite, par le test de catalase qui a été négatif pour toutes les souches.



**Figure 08:** Aspect microscopique des souches codées "L2" et "E9"

"L": *Lactobacillus* sp. ; "E": *Enterococcus* sp.

### **III.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique**

La protéolyse des caséines est probablement l'événement le plus important sur les deux plans de la nutrition et de la technologie de la fabrication des produits laitiers. Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques sont importants, en tant que des moyens qui rendent la protéine et le peptide disponibles pour la croissance et essentiellement, en tant qu'élément de traitement dans les procédés de maturation qui donnent aux aliments leurs propriétés rhéologiques et caractéristiques organoleptiques (**Kurniati et al.,2015**).

De ce fait, la mise en évidence des nouvelles souches microbiennes produisant des enzymes coagulantes caractérisées par une haute activité coagulante comparée à celle protéolytique, reste toujours un objectif primordial pendant la recherche (**Wu et al., 2008**).

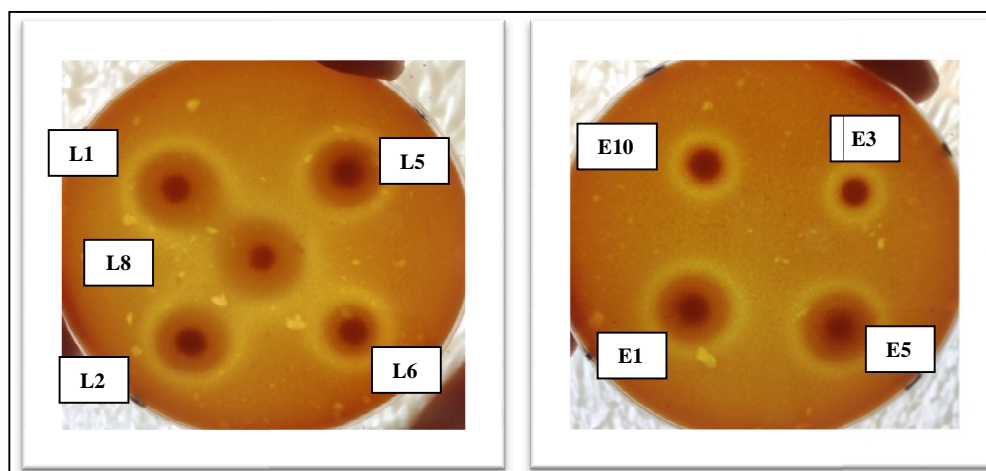
#### **III.2.1. Pouvoir protéolytique sur gélose MRS au lait**

Les résultats de la protéolyse réalisée sur le milieu MRS additionné du lait écrémé à 10% pour les différentes souches sont résumés dans **le tableau 05**. Il en ressort du tableau que la totalité des souches étudiées présentent une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques (**Figure09**).

Selon **Vuillemard (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Donc d'après **le tableau 05**, nos dix-huit souches sont protéolytiques, dont les diamètres des zones de protéolyse ont été compris entre 13 et 24mm.

**Tableau 05 :** Diamètres (mm) de protéolyse des souches de bactéries lactiques sur milieu MRS au lait.

<b>Les souches</b>	<b>Diamètre (mm)</b>
<i>Enterococcus</i> sp. E1	21
<i>Enterococcus</i> sp. E2	20
<i>Enterococcus</i> sp. E3	13
<i>Enterococcus</i> sp. E4	20
<i>Enterococcus</i> sp. E5	<b>23</b>
<i>Enterococcus</i> sp. E6	18
<i>Enterococcus</i> sp. E7	22
<i>Enterococcus</i> sp. E8	20
<i>Enterococcus</i> sp. E9	16
<i>Enterococcus</i> sp. E10	13
<i>Lactobacillus</i> sp. L1	<b>24</b>
<i>Lactobacillus</i> sp. L2	19
<i>Lactobacillus</i> sp. L3	20
<i>Lactobacillus</i> sp. L4	20
<i>Lactobacillus</i> sp. L5	20
<i>Lactobacillus</i> sp. L6	17
<i>Lactobacillus</i> sp. L7	17
<i>Lactobacillus</i> sp. L8	22



**Figure 09** : Exemple de résultats de l'activité protéolytique des souches sur milieu MRS au lait.

"L": *Lactobacillus* sp. ; "E": *Enterococcus* sp.

Ces résultats montrent que la souche *Lactobacillus* sp. **L1** est fortement protéolytique (24 mm) comparativement aux autres souches qui ont présenté des valeurs comprises entre 16 et 22 mm de diamètre. L'activité protéolytique des souches codées "E3" et "E10" est faible (13 mm de diamètre), par contre la souche *Enterococcus* sp. **E5** est fortement protéolytique (23mm).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Akabanda et al. (2014)**, qui ont trouvé que la plupart des souches du genre *Lactobacillus*, comme *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, et les souches *En. faecium* ont présenté des activités protéolytiques à des divers degrés.

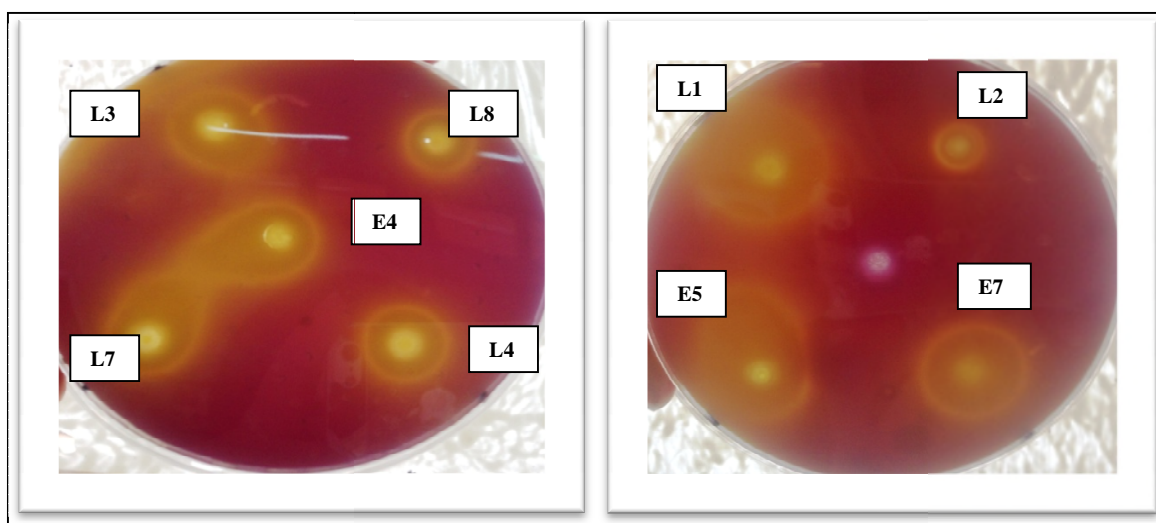
Les études effectuées, à ce jour, concernant la protéolyse des bactéries lactiques sont principalement limitées aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus*. Les voies biochimiques qui conduisent à la dégradation de la caséine et le transport des peptides et des acides aminés, sont jugées d'être les mêmes pour les autres BL, y compris le genre *Enterococcus*. Cependant, peu de données existent dans la littérature concernant le système protéolytique des entérocoques, en comparaison avec d'autres espèces de BL. Cette activité est généralement faible pour les souches d'entérocoques, à l'exception de la souche *En. faecalis* (**Foulquié Moreno et al., 2006**).

Selon **Castberg et Morris (1976)**, les lactobacilles produisent généralement des protéinases neutres actives sur le  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  caséine mais l'intensité de leur activité est extrêmement variable d'une espèce à une autre. Certaines espèces du genre *Enterococcus* présentent une faible activité protéolytique.

De même **Arizcun et al. (1997)**, **Sarantinopoulos et al. (2001)** et **Ambadoyiannis et al. (2005)** ont montré que le niveau de l'activité des aminopeptidases et des protéinases des entérocoques est faible.

### III.2.2. Pouvoir protéolytique sur milieu Agar au lait (milieu A/B)

Dans un second temps, l'activité protéasique des souches a été recherchée sur milieu Agar au lait à 2% pour la quantifier. Cette activité s'est manifesté par l'apparition d'un halo autour des puits, un exemple de ces résultats est montré dans **la figure10**. Les zones de protéolyse ont été comprises entre 06 et 14 mm.



**Figure 10** : Activité protéolytique des souches sur milieu Agar au lait.

"L": *Lactobacillus* sp. ; "E": *Enterococcus* sp.

Les résultats de la quantification (par U trypsique) de la protéolyse sur milieu Agar au lait, sont récapitulés dans **le tableau 06**. Nous avons constaté que, sans exception, toutes les souches ont exprimé une activité protéolytique oscillant entre 0.0002 et 0.006 U trypsique.

Les résultats obtenus avec les souches codées "E5", "E7" et "L1" sont plus importants et meilleurs par rapport aux autres souches qui possèdent une activité allant de 0.0002 jusqu'à

0.003 U trypsique. Alors que les souches codées "E4", "L2", "L3", "L4", "L7" et "L8" ont présenté une activité inférieure à 0.0002 U trypsique.

Une étude conduite par **Thivierge (1999)** sur *Lc. lactis* ssp. *cremoris* en utilisant la même technique, a montré l'existence d'une activité de 0 à 0.0013 U trypsique.

**Tableau 06:** Activité protéasique des souches sur milieu Agar au lait.

Activité U trypsique (g/ml)	<0.0002	0.0002	0.0005	0.001	0.003	0.006
Souches	E4, L2, L3, L4, L7, L8	L6	E1, E9	E2, E10, E3	E8, E6, L5	<b>E5, E7, L1</b>

D'après ces résultats, nous avons remarqué que les mêmes souches sur deux milieux différents à base de lait (MRS au lait et Agar au lait) ont enregistré des diamètres de zone de protéolyse différente. Ces observations nous sont permis de confirmer que le comportement protéolytique de ces souches est variable d'un milieu à autre. Ces mêmes observations ont été constatées par **Hassaine (2013)** en testant plusieurs milieux.

**Kok (1990), Kunji et al. (1996)** et **Savijoki et al. (2006)** ont démontré l'existence d'une relation directe entre l'expression de cette activité protéolytique et la composition chimique du milieu de culture et en particulier la présence des protéinases de paroi décrite chez quelque bactéries lactiques, *Lb. paracasei* (PrpP), *Lb. helveticus* (PrpH) et *Lb. rhamnosus* (PrpR).

Les différents genres des bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (**Arena et al., 2015**). Ce système comprend des protéases situées à la surface cellulaire et une large gamme de peptidases intracellulaires. (**Roudj et al., 2009**). La pertinence de ce groupe d'enzymes, riches en diversité structurelle et mécanismes d'action se reflète dans l'importance de leurs applications dans les procédés industriels (**Abidi et al., 2014**).

D'après **El-Ghaish et al. (2010)**, la taille de la zone claire dans la gélose au lait écrémé indique l'étendue des protéinases produite par les lactobacilles. Les enzymes protéolytiques des *Lactobacillus* sp. ont été étudiés avec détail par plusieurs auteurs. Ils ont été décrits comme étant similaire à ceux des lactocoques sur le plan biochimique. Leur équipement enzymatique est constitué principalement d'une protéinase de paroi et une multitude de peptidase, qui interviennent dans l'affinage des fromages (**Bockelman, 1995**). D'un autre part, **Gatti et al. (1994)** a démontré que l'activité protéolytique des entérocoques durant la croissance dans le lait est parfois comparable à celle de *St. thermophilus*.

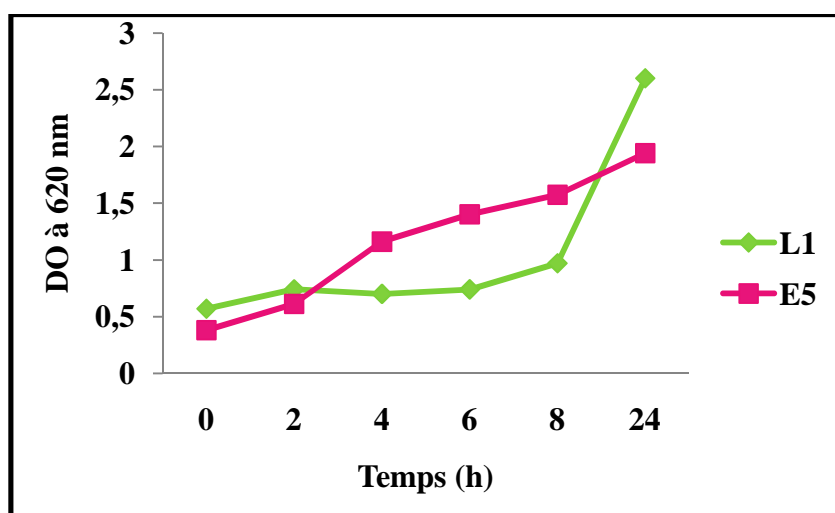
L'activité protéolytique des bactéries lactiques joue un rôle important dans divers processus cellulaires et physiologiques et contribue fortement dans le développement des propriétés organoleptiques de différents produits laitiers fermentés (**Axelsson, 1998 ; Donkor et al., 2007 ; Dhamale et al., 2015**). La production d'un produit alimentaire fermenté de haute qualité dépend en partie de système protéolytique des bactéries lactiques starter, qui affecte l'apparition des saveurs par la formation des peptides et des acides aminés dans les produits transformés. Chez ces bactéries, plusieurs peptidases intracellulaires de spécificité variable ont été rapportés, et leur libération après lyse cellulaire a été évoqués pour jouer ce rôle rechercher dans les produits laitiers fermentés (**Law et Handrikman, 1997 ; Christensen et al., 1999**).

### **III.3. Caractérisation physico-chimique partielle de l'activité protéolytique**

Nous avons caractérisé partiellement les enzymes protéolytiques des souches, en utilisant le surnageant de culture comme source d'enzymes protéolytiques libérés dans le milieu (enzyme extracellulaire ou exoprotéase) et l'extrait brut intracellulaire comme source de protéase endocellulaire (endoprotéase). A cet effet nous avons poursuivi notre travail qu'avec les deux souches "**L1**" et "**E5**" jugées comme les plus protéolytiques.

#### **III.3.1. Suivi de la croissance bactérienne**

La croissance bactérienne des deux souches "**L1**" et "**E5**" est suivie par l'évolution de la densité optique, mesuré à  $\lambda=620$  nm, au cours du temps (après chaque de 2 heures d'incubation). La densité optique est révélée à différents intervalles de temps au cours de la croissance, par conséquent nous avons obtenue deux courbes de croissance pour les deux souches bactériennes sélectionnées *Lactobacillus* sp. **L1** et *Enterococcus* sp. **E5** (**Figure11**).



**Figure 11** : Évolution de la densité optique des cultures pures selon le temps.

"L1" : *Lactobacillus sp.* et "E5" : *Enterococcus sp.*

Les deux courbes sont divisées en deux phases distinctes :

La première est la phase de latence qui dure 2h pour *Enterococcus sp.* E5 dont la DO varie de 0.381 à 0.612, tandis qu'elle est plus lente pour *Lactobacillus sp.* L1 qui dure jusqu'à 6h où la DO s'étend de 0.571 à 0.741. Cette phase varie d'un genre à l'autre selon l'âge des bactéries inoculées et l'adaptation au milieu.

La deuxième phase est la phase exponentielle. Elle est plus courte pour *Lactobacillus sp.* L1 comparativement à *Enterococcus sp.* E5, dont la DO varie entre 0.741 et 2.602. Elle dure 16h pour la souche "L1". Alors que la souche "E5" a déclenchée des divisions successives à partir de 2h jusqu'à 24h où la DO oscille entre 0.612 et 1.941. Cette phase est la phase physiologique par excellence, les bactéries se multiplient sans entrave.

### III.3.2. Détermination de l'activité spécifique des extraits enzymatiques

Pour déterminer l'activité spécifique des endo et des exoprotéases des deux souches lactiques *Lactobacillus sp.* L1 et *Enterococcus sp.* E5, nous avons quantifié en premier lieu l'activité des protéines totales (mg/ml) des extraits bruts et mesuré l'activité protéasique (U/ml) par la méthode de Bradford.

#### III.3.2.1. Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases

Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 07**. L'analyse de ces valeurs montre que la concentration en protéines totales des exoprotéases est la même pour les deux

souches "L1" et "E5". Alors que l'activité protéasique est 231.666 U/ml et 136.666 U/ml pour *Lactobacillus* sp. L1 et *Enterococcus* sp. E5 respectivement.

**Tableau 07 :** Activité spécifique des exoprotéases.

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
L1	0.03	231.66	6.99
E5	0.03	136.66	4.20

Après le calcul de l'activité spécifique, les résultats diffèrent entre les deux souches. La valeur la plus élevée était 6.99U/mg enregistrée par la souche "L1", et la plus faible est estimée de 4.20U/mg pour la souche "E5". Alors que **Pescuma et al.(2010)** ont trouvé des valeurs de l'activité protéolytique oscillant entre 0.08 U/ml et 0.62 U/ml après 12h d'incubation pour des souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus* sp.

Les travaux de **Andrighetto et al. (2001)** réalisés sur 124 souches d'entérocoques ont montré une faible activité de ces dernières, sauf 30 souches d'*En. faecalis* qui ont présentées des taux élevés de protéolyse. La même conclusion a été établie par **Sarantinopoulos et al. (2001)**, qui ont fait un screening de 124 souches d'*En. faecium*, *En. faecalis*, et *En. durans* pour leur activité protéolytique et ils ont trouvé que la majorité de ces souches ont une activité exoprotéasique faible mis à part *En. faecalis* considérée comme la plus active.

### III.3.2.2. Détermination de l'activité spécifique des endoprotéases

**Le tableau 08 :** Illustre les résultats de l'activité spécifique des protéases endocellulaires. Il apparaît que la concentration en protéines totales de *Lactobacillus* sp. L1 est de 0.027 mg/ml et 0.03 mg/ml pour l'autre souche. Ainsi que l'activité protéasique 29 U/ml avec *Lactobacillus* sp. L1 et 48.334 U/ml avec *Enterococcus* sp. E5.

Tableau 08 : Activité spécifique des endoprotéases.

souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
<b>L1</b>	0.03	29.00	0.80
<b>E5</b>	0.031	48.33	1.51

Les meilleures activités spécifiques sont obtenues avec *Enterococcus* sp. **E5** ayant une valeur de 1.51U/mg. Alors que *Lactobacillus* sp. **L1** a montré l'activité la plus faible (0.80 U/mg).

Si nous comparons ces résultats avec celles obtenus avec les exoprotéases, nous pouvons constater que la meilleure activité du complexe enzymatique est celle des enzymes exocellulaires. Cela peut être dû au substrat utilisé pour la mesure de l'activité protéolytique. Les enzymes intracellulaires n'ont pas la capacité d'hydrolyser les caséines, donc nous pouvons dire que le milieu endocellulaire ne contient pas assez de protéases (qui hydrolysent des protéines) mais plus précisément des peptidases (qui hydrolysent des peptides).

La protéolyse chez les bactéries lactiques commence par l'action d'une protéase de paroi, enzyme à sérine qui hydrolyse les caséines du lait en oligopeptides. Certaines souches de bactéries lactiques ne possèdent pas de protéase de paroi et dépendent de la protéase de paroi présente chez les autres souches pour se développer dans le lait (**Savijoki et al., 2006**). Cinq types de protéases de paroi de la même famille mais présentant certaines différences ont été caractérisées chez les bactéries lactiques : PrtP chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*, PrtH chez *Lb. helveticus*, PrtR chez *Lb. rhalnosus*, PrtS chez *St. thermophilus* et PrtB chez *Lb.bulgaricus* (**Savijoki et al., 2006**).

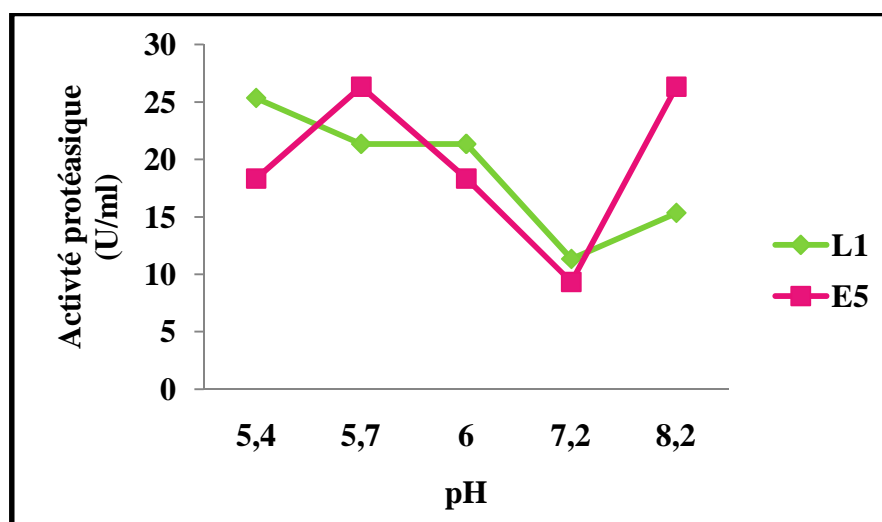
**Lamarque et al. (2004)**, **Liu et al. (2010)** et **Griffith et Tellez (2013)** confirment que le système protéolytique des BL est hautement efficace. Il comprend des protéinases d'enveloppe cellulaire qui dégradent les caséines en gros peptides, et ces derniers sont intégrés par les bactéries grâce à trois ou quatre transporteurs selon la souche. Ils appartiennent à deux grands groupes : les PRT (peptide transport) et les ABC (ATP-binding-cassette) transporteurs. Là, des peptidases intracellulaires clivent ces peptides en petits peptides et en acides aminés qui sont utilisés comme nutriments par les BL.

### III.3.3. Facteurs influençant l'activité protéasique des souches lactiques

Plusieurs travaux ont été publiés sur les facteurs influençant l'activité protéolytique des BL, tels que les travaux de **Hegazi (1990)**, **El-Ghaish et al. (2010)**, **Tsaniyatul et al., (2015)**...etc. Dans leurs études, ces auteurs ont pu déterminer l'effet du pH, de la température, et des effecteurs métalliques sur l'activité enzymatique.

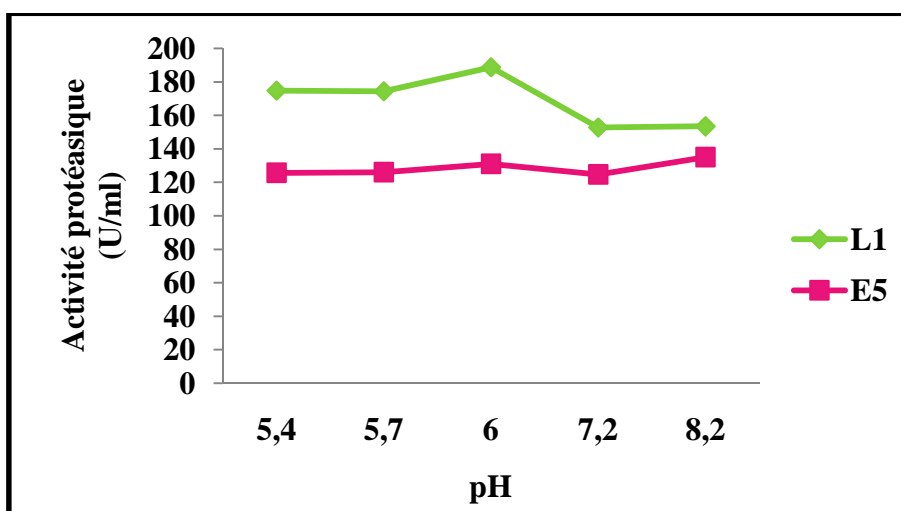
#### III.3.3.1. Effet du pH

L'activité enzymatique des endo et des exoprotéases est affectée par les variations de pH. A cet effet nous avons poursuivi notre travail en utilisant des pH 5.4/5.7/6/7.2, et 8.2 à température 37°C. Les résultats obtenus concernant les peptidases intracellulaire et les protéases extracellulaires des deux souches *Lactobacillus* sp. **L1** et *Enterococcus* sp. **E5** sont présentées dans les figures 12 et 13 respectivement.



**Figure 12** :Effet de pH sur l'activité endoprotéasique des **L1** et **E5**.

"**L1**":*Lactobacillus* sp.et "**E5**": *Enterococcus* sp.



**Figure 13** : Effet de pH sur l'activité d'exoprotéasique des "L1" et "E5".

"L1": *Lactobacillus* sp. et "E5": *Enterococcus* sp.

La courbe d'activité endoprotéasique de *Lactobacillus* sp. **L1** en fonction du pH montre une activité maximale de 25.33U/ml à pH 5.4, suivi par une diminution de leur activité avec l'augmentation de pH de 5.4 à 7.2 où elle est de l'ordre de 11.33U/ml. Tandis que à pH 8.2 l'activité enzymatique atteint une valeur de 15.33U/ml.

D'après **Maślanka et al. (2015)**, les bactéries du genre *Lactobacillus* (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) préfèrent l'environnement avec un pH 5.5-5.8. Par contre **Guo et al. (2009)** ont montré que l'optimum de pH des *Lb. helveticus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* était dans la gamme de 5 à 6.5.

Pour l'endoprotéase de la souche *Enterococcus* sp. **E5**, nous avons observés deux pics sur la courbe de l'activité enzymatique en fonction de pH respectivement 5.7 et 8.2 avec une même valeur de 26.33U/ml, et une modeste valeur de 9.33 U/ml qui correspondent l'activité minimale. Cependant, **El-Ghaish et al. (2010)** ont rapporté que l'optimal pH des souches d'*Enterococcus* (*En. faecalis*, *En. faecium*) est de 6.5 et que les conditions de base sont plus favorables à la protéolyse que des conditions acides.

D'autre part, les courbes obtenues lors de la mesure de l'activité exoprotéasique en fonction du pH des deux souches "L1" et "E5", permettent d'observer une grande similarité entre ces deux souches avec quelques différences caractérisées par le taux d'activité et l'optimum. Nous avons remarqué que les enzymes des deux souches étaient active dans une large gamme de pH allant de 5.4 à 8.2 avec un optimum à pH 6 de 188.66

U/ml pour *Lactobacillus* sp. **L1**. Alors que le pH 8.2 est le pH de l'optimal d'activité qui atteint 135 U/ml pour *Enterococcus* sp. **E5**.

Par contradiction, **Tsaniyatul et al. (2015)** ont constatés que l'activité maximale pour *Lb. plantarum* est à pH 7. En outre, **Budiarto et al. (2016)** ont observé que les enzymes ont été en bonne activité protéolytique à pH acide dont l'activité maximale était à pH 5 pour *Lb. plantarum*. D'autre part, **Rahkila (2015)** montre dans une étude réalisée sur des souches d'*Enterococcus* sp. que ces dernières ont pu conserver leur activité à pH 9.6, ce qui désigne leur tolérance à un pH basique.

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (**Hames et al., 2006**).

### **III.3.3.2. Effet de la température**

L'effet de la température sur l'activité enzymatique des endo et des exoprotéases a été étudiée avec une incubation pendant 30min à des températures variables de 28°C/30°C/37°C/42°C et 50 °C à pH 6.8.

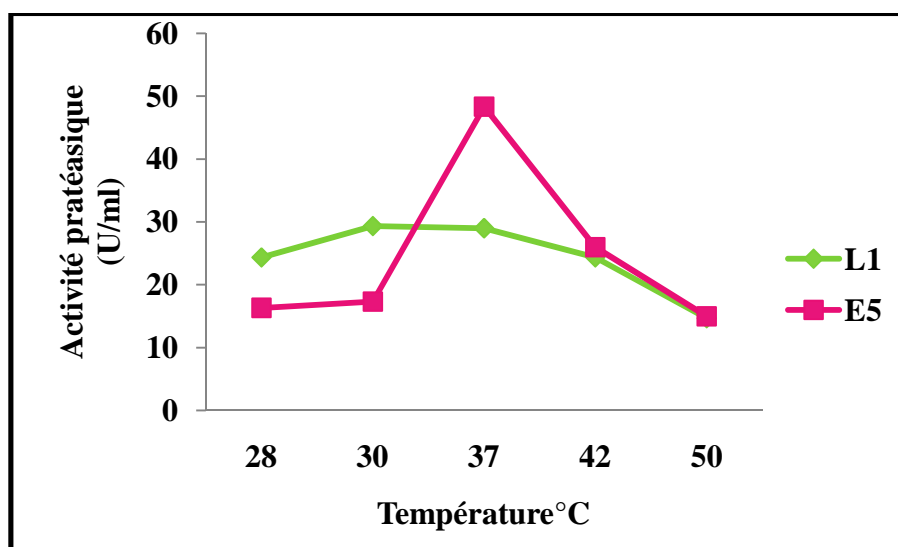


Figure 14 : Effet de la température sur l'activité endoprotéasique des "L1" et "E5".

"L1": *Lactobacillus* sp. et "E5": *Enterococcus* sp.

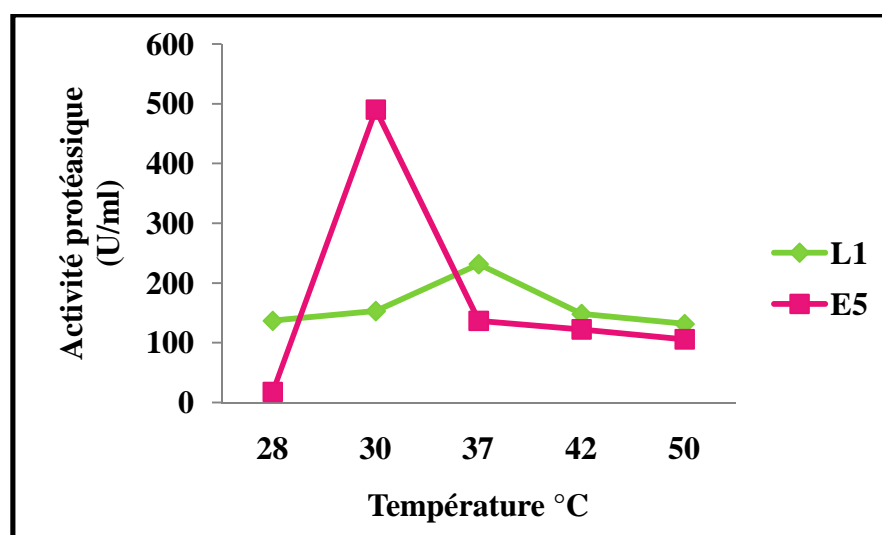


Figure 15 : Effet de la température sur l'activité exoprotéasique des "L1" et "E5".

"L1": *Lactobacillus* sp. et "E5": *Enterococcus* sp.

Comme il est montré dans la figure 14, l'activité protéolytique des endoprotéases de *Lactobacillus* sp. L1 est importante dans une plage de température de 28 à 42°C, ceci indique la propriété de stabilité thermique de ces enzymes (Budiarto et al., 2016). Elle atteint son maximum de l'ordre de 29.33 U/ml à 30°C, puis baisse à 14.66 U/ml à 50°C. Macedo et al. (2002) ont trouvé que les enzymes purifiées de *Lb. plantarum* ont montré une activité optimale à 37°C.

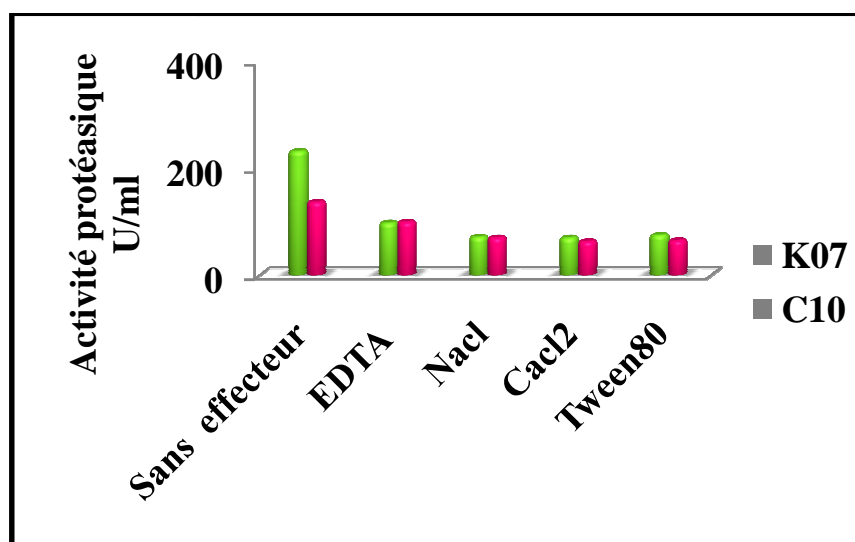
Alors que la protéase intracellulaire de la souche *Enterococcus* sp. **E5** a enregistré une activité maximale de 48.33 U/ml à 37°C, puis des faibles activités de l'ordre de 16.33 U/ml à 28°C et 15 U/ml à température 50°C. D'après **El-Ghaish et al. (2010)**, l'activité protéolytique la plus élevée a été observée à 42°C pour *En. faecalis* et *En. faecium*.

De plus, les courbes de variation de l'activité protéasique des exoprotéases des souches étudiés "**L1**" et "**E5**" sont illustrés dans **la figure15**, dont laquelle l'activité la plus élevée (231.66 U/ml) a été observé à 37°C pour *Lactobacillus* sp. **L1**. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs: **El - Ghaish et al. (2010)**, **Ahmadova et al. (2011)** et **Hadji Sfaxi et al. (2012)**. Tandis que **Guo et al. (2009)** ont montré que la température optimale de l'enzyme était de 40°C pour *Lb. helveticus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*. Cependant, la souche *Enterococcus* sp. **E5** a présenté l'activité la plus élevée de 490 U/ml à 30°C, alors que le minimum est enregistré à température 28°C avec une valeur de 17.66 U/ml. De plus, l'hydrolyse a été affectée négativement à des températures de 37°C, 42°C et 50°C.

D'après **Hames et al., (2006)**, l'élévation de la température de la réaction, augmente l'énergie calorique des molécules de substrat. Ceci accroît la proportion des molécules avec une énergie suffisante pour surmonter la barrière d'activation qui fait augmenter la vitesse de la réaction. D'un autre côté, à de plus haute température, une augmentation de la rupture des multiples faibles interactions non covalentes qui habituellement stabilisent la structure tridimensionnelle, est considérable. Ce qui conduit à la dénaturation d'enzyme. En plus, même des petites modifications dans la conformation spatiale, peuvent altérer la structure du site actif d'enzyme et conduire à une diminution de son activité catalytique.

### **III.3.3.3. Effet des effecteurs**

Pour caractériser l'effet des effecteurs sur l'activité protéolytique, nous avons utilisé les composés: CaCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 10mM, NaCl à 5%, tween 80 à 2% dans les conditions expérimentales (37°C et pH 6.8).L'effet de ces effecteurs sur les exoprotéases et endoprotéases des deux souches de *Lactobacillus* sp. **L1** et *Enterococcus* sp. **E5** est indiqué dans **les figures 16 et 17**.



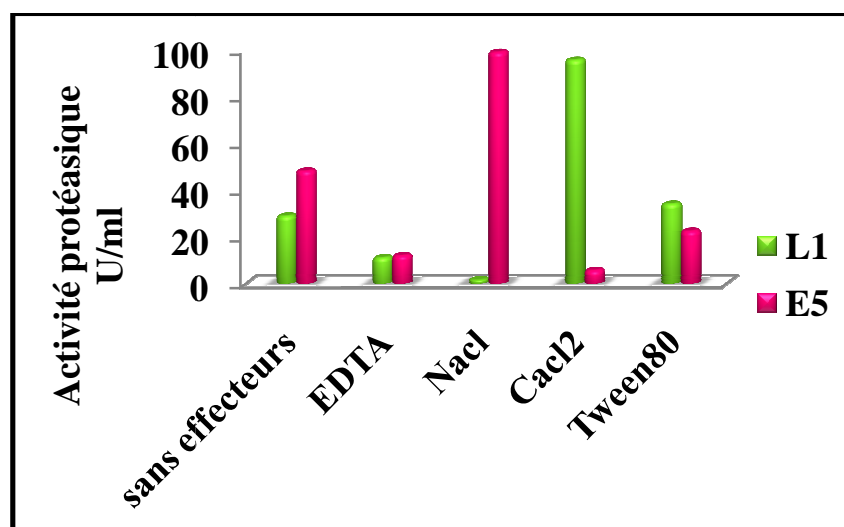
**Figure 16:** Effet des effecteurs sur l'activité exoprotéasique des "L1" et "E5".

"L1" : *Lactobacillus* sp. et "E5" : *Enterococcus* sp

La présence de ces composés a provoqué une diminution de l'activité pour les deux souches étudiées en comparaison avec l'absence de ces effecteurs. L'optimum de l'activité est enregistré avec l'agent chélatant EDTA (99.16 U/ml). C'est-à-dire que l'activité a été diminuée avec un pourcentage de 57.20% pour la souche "L1" et de 27.44% pour la souche "E5".

Lors d'une étude réalisée par **Hegazi (1990)** sur l'activité protéolytique de la souche *En. faecalis* ssp. *Liquifaciens*, il est démontré que cette dernière est influencée positivement par des faibles concentrations de NaCl, et négativement par les fortes concentrations. De même pour le calcium, soit il n'a pas d'effet, soit il réduit l'hydrolyse des caséines.

Selon **Budiartha et al. (2016)**, les protéases extracellulaires de *Lb. plantarum* était sensible à la fois aux inhibiteurs de protéases tels que l'EDTA (inhibiteur de protéase de type métallique) et le Tween-20 (tensioactif non ionique). En outre, ils ont constaté que la l'activité de protéase est dépendante des ions métalliques tels que le  $Ca^{2+}$  utilisé comme cofacteur. Cela signifie que ces enzymes sont de type métalloprotéase



**Figure17** : Effet des effecteurs sur l'activité endoprotéasique des "L1" et "E5".

"L1": *Lactobacillus* sp. et "E5": *Enterococcus* sp

L'activité protéolytique des endoprotéases des deux souches testées "L1" et "E5" (**Figure 17**) est fortement inhibée en présence de NaCl (1.66 U/ml) pour *Lactobacillus* sp. L1 et en présence de CaCl<sub>2</sub> (5.66 U/ml) pour *Enterococcus* sp. E5. Ainsi, l'activité a été réduite avec l'EDTA et Tween 80 pour les deux souches "L1" et "E5".

Par contre, l'activité protéasique a été favorisée en présence de NaCl pour la souche *Enterococcus* sp. E5 où une valeur de 99.16 U/ml a été enregistrée, donc un rendement de 205.17% d'activité. D'un autre part, la souche *Lactobacillus* sp. L1 a montré l'activité la plus élevée en présence de CaCl<sub>2</sub> (95.83 U/ml) avec un rendement de 330.45% d'activité

**Dib et al. (2014)** ont observé que l'activité a été fortement inhibée en présence de l'EDTA, ce qui indique la présence de métalloprotéases pour *Lb. plantarum*. D'autre part, **Macedo et al. (2002)** ont trouvé que l'inhibiteur de métalloenzymes EDTA, inactive l'enzyme purifiée à une concentration aussi faible que 1mM.

D'après **Tanasupawat et al. (2015)** les *Lactobacillus* sp. sont favorisés dans un milieu à 2% de NaCl, cependant, **Galvez et al. (2012)** ont rapportés que *Enterococcus* sp. supportent les conditions hostiles de 6,5% de NaCl.

La puissance de la stabilité des protéases contre les ions dépend du type de métal utilisé et de la concentration d'une amplitude donnée. À une certaine concentration d'un ion métallique particulier peut agir comme un inhibiteur, mais il peut également agir comme un activateur avec d'autres concentrations (Sulthoniyah *et al.*, 2015).

D'après les résultats obtenus au cours de l'expérimentation sur les deux profils exo et endoprotéase, nous avons démontré que le système protéolytique est un système multi protéique fait intervenir en premier lieu une protéase de paroi qui clivent les caséines en grande peptides. Ceci rend l'activité exoprotéasique plus remarquable que les endoprotéases. Ainsi, ces oligopeptides sont hydrolysés par tout un éventail de peptidases intracellulaires qui ont le potentiel pour assurer la libération des petits peptides et des acides aminés. Après, ils sont transportés à l'intérieure de la cellule et donc permettre la croissance des bactéries (González-Olivares *et al.*, 2014).

#### III.4. Activité autolytique

Cette activité est fortement recherchée et occupe une place technologique de choix lors de la fabrication et l'affinage des fromages (Hassaine, 2013). L'autolyse bactérienne a été évaluée pour les deux souches pendant 7 jours sur milieu MRS dans les conditions optimales de croissance (37°C). La figure 18 représente les résultats trouvés.

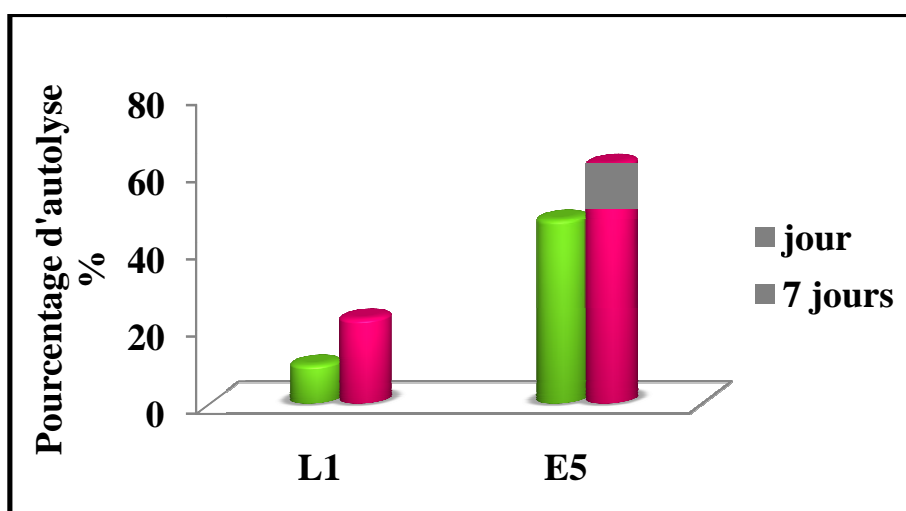


Figure 18 : Activité autolytique des souches "L1" et "E5".

"L1": *Lactobacillus* sp. et "E5": *Enterococcus* sp.

Après le 1<sup>er</sup> jour d'incubation le pourcentage d'autolyse de *Lactobacillus* sp. **L1** est de 10.06% contre 47.63% pour *Enterococcus* sp. **E5**, alors qu'après 7 jours d'incubation, les deux souches montrent un taux d'autolyse différents, soit 21.99% et 62.08% respectivement pour *Lactobacillus* sp. **L1** et *Enterococcus* sp. **E5** (**Figure. 18**).

D'après les résultats illustrés et le classement rapporté par **Ayad et al., 2004**, il en ressort que la souche *Lactobacillus* sp. **L1** a une activité autolytique faible. Alors que *Enterococcus* sp. **E5** est jugée comme hautement autolytique. Ceci est en contradiction avec les résultats trouvés par **Hassaine (2013)** qui a montré des taux d'autolyse plus élevés pour les lactobacilles en comparaison avec ceux enregistrés chez les souches d'entérocoques et lactocoques. De même, **Dako et al. (1995)** et **El-Soda et al. (1995)** ont rapporté que les souches du genre *lactobacillus* s'autolysent plus rapidement à ceux décrits par **Ayad (2001)**.

L'activité autolytique est plus sélectionnée chez les bactéries lactiques que les autres starters bactériens à cause de la capacité des bactéries lactiques de produire des enzymes spécifiques, qui sont capables d'hydrolyser les liaisons du peptidoglycane de leurs propres parois. Le phénomène d'autolyse présente un intérêt particulier quand à son utilisation potentielle dans la fabrication des produits laitiers fermentés. En effet, le contenu enzymatique intracellulaire des bactéries lactiques libéré après autolyse joue un rôle important dans le développement de la saveur et de la texture des fromages (**Visser, 1993 ; Wouters et al., 2002 ; Ayad et al., 2003**). Parmi ces enzymes, les mieux caractérisées sont les peptidases qui libèrent des petits peptides et des acides aminés libres et qui sont des précurseurs d'arômes. L'action des peptides contribue également à diminuer l'amertume. L'autolyse libère aussi des estérases et des lipases doués de capacité à produire des saveurs dans les matrices fromagères (**Hassaine, 2013**).

Ce travail que nous avons entrepris avait pour objectif la caractérisation de l'activité protéolytique d'un soucier de bactéries lactiques autochtones, constitué de dix-huit souches. Nous nous sommes intéressés à tester le pouvoir protéolytique des souches et à évaluer l'effet de quelques facteurs physico-chimique sur les protéases exocellulaire et intracellulaire.

La confirmation de la pureté de l'ensemble des souches lactiques a été réalisée, après une revivification, par une coloration de Gram et le test de catalase. L'examen microscopique à montré la présence de deux formes, des bacilles (huit souches) et des coques (dix souches) avec catalase négatif.

A la lumière des résultats obtenus, la totalité des souches ont présenté une activité protéolytique sur des milieux solides. Elle est exprimée d'une manière très hétérogène entre les souches et, de plus, en termes de milieux. Sur milieu MRS au lait, nous avons enregistré des zones de protéolyse oscillant entre 13 et 24 mm. Alors que sur milieu Agar au lait, les zones ne dépassent pas les 14 mm.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à la caractérisation physico-chimique partielle de l'activité enzymatique des exo et des endoprotéases de deux souches révélées comme les plus protéolytiques : *Enterococcus* sp. **E5** et *Lactobacillus* sp. **L1**. L'activité des exoprotéases a été plus importante que celles des endoprotéases où la valeur la plus élevée était de l'ordre de 231.66 U/ml enregistrée par la souche **L1**. Les mêmes observations sont enregistrées pour l'activité spécifique des deux extraits enzymatiques.

Ces enzymes se sont avérées sensible aux variations de la température, du pH et la présence de quelques effecteurs. L'activité exoprotéasique est à son optimum à pH 6, bien que pour les endoprotéase a été à pH 5.4 pour la souche **L1** et pH 5.7 et pH 8.2 pour la souche **E5**. Concernant l'effet de la température, l'activité est meilleure à 37°C pour les endoprotéases des deux souches et les exoprotéases de **L1**, contrairement aux exoprotéases de la souche **E5** où l'optimum est à 30°C.

Cependant, la présence des effecteurs a provoqué une diminution de l'activité pour les deux souches étudiées. L'optimum de l'activité est enregistré avec l'agent chélatant EDTA (99.16 U/ml) avec les exoprotéases de la souche **L1**. Celle des endoprotéases des deux souches testées **L1** et **E5** est fortement inhibé en présence de NaCl (1.66 U/ml) pour

*Lactobacillus* sp. **L1** et de en présence de  $\text{CaCl}_2$  (5.66 U/ml) pour *Enterococcus* sp. **E5**. Ainsi, l'activité a été réduite avec Tween 80 pour les deux souches **L1** et **E5**.

La propriété autolytique reflète la capacité des souches de libérer des enzymes intracellulaires suite à l'âge, le stress et les conditions défavorables. Au vu des résultats, le taux d'autolyse d'*Enterococcus* sp. **E5** est plus important que celui de *Lactobacillus* sp. **L1**.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter ce travail, nous proposons :

- L'établissement des profils protéiques des souches lactiques par les techniques (SDS- PAGE, HPLC, PCR) ;
- D'étudier leurs critères de sécurité comme la production des amines biogènes ;
- L'utilisation d'autres substrats pour mieux caractériser l'activité des endopeptidases et tester d'autres effecteurs.
- La caractérisation moléculaire des enzymes et l'étude de la régulation de leur expression ;
- D'évaluer de façon plus approfondie et plus précise l'influence de l'autolyse bactérienne sur l'activité protéolytique.

La connaissance de nouvelles souches de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agroalimentaire et une meilleure caractérisation de leurs propriétés fonctionnelles, offre une nouvelle voie dans le domaine de la recherche scientifique, surtout en microbiologie appliquée dont le but de produire à l'avenir de nouveaux produits alimentaires concurrentiels sur le plan national et international.

A-B-C

**Abidi F., Aissaoui N., Lazar S et Marzouki M.N., 2014.** Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger* use in Antioxidant peptides production. *J. Mater. Environ. Sci.* **5**: 1490-1499.

**Adeniyi B.A., Adetoye A. et Ayeni F.A., 2015.** Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *African Health Sci.* **15** (3): 888-95.

**Aguilar C.N., Gerardo G.S., Plilia A., Raul R.H., José M.H. et Juan C.E., 2008.** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American. J. Biochem. and Biotechnol.* **4** (4): 354-366.

**Aguilar-Galvez A., Dubois-Dauphin R., Destain J., Campos D. et Thonart P., 2012.** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16** (1): 67-76.

**Ahmadova A., Dimov S., Ivanova I., Choiset Y., Chobert J-M., Kuliev A. et Haertlé T., 2011.** Proteolytic activities and safety of use of Enterococci strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *Eur. Food. Res. Technol.* **233**: 131–140.

**Ai L., Zhang H., Guo B., Chen W., Wu Z. et Wu Y., 2008.** Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. *Carbohydrate Polymers.* **74**: 353-357.

**Akabanda F., Owusu-Kwarteng J., Tano-Debrah K., Parkouda C., et Jespersen L., 2014.** The use of lactic acid Bacteria starter culture in the production of Nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *Int. J. Food Sci.* **11**.

**Akkiraju D.K.S., Sonawane P.D., Jaybhaye A.S et Akkiraju C.P., 2015.** Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial activity and in vitro, in vivo studies of LAB activity on *Fusarium oxysporum* infected tomato seeds. *Int. J. Adv. Res.* **3** (5): 954-963.

**Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T. et Teixeira P., 2007.** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages), In situ assays. *Meat Sci.* **76**: 796-800.

- Al-kotami S., Abou-Ghorrah S. et Yazaji S., 2015.** Detection and isolation of lactic acid bacteria and its use as local starters in Syrian Akawi cheese processing. *Int. Food Res. J.* **22** (4): 1699-1704.
- Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F. et Shah N.P., 2006.** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J.* **16**: 40-51.
- Ambadoyiannis G., hatzikamari M., Litopoulou-Tzanetaki E. et Tzanetakis N., 2005.** Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnol.* **18** : 307-325.
- Ammor S., Rachman C. et Chaillou S., 2005.** Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.* **22**: 373-382.
- Andrighetto C., Knijff E., Lombardi A., Torriani S., Vancanneyt M., Kersters K., Swings J. et Dellaglio F., 2001.** Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res. May.* **68** (2):303-16.
- Arena M.P., Caggianiello G., Russo P., Albenzio M., Massa S., Fiocco D., Capozzi V. et Spano G., 2015.** Functional starters for functional yogurt. *Foods.* **4**: 15-33.
- Arizcun C., Barcina Y. et Torre P., 1997.** Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **38**: 17-24.
- Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaign-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. et Yvon M., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec et Doc, Lavoisier.* Paris. 271-447.
- Axelsson L., 2004.** Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3<sup>e</sup> Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.

- Ayad E.H.E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H. et El-Soda M., 2004.** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiol.* **21**: 715-725.
- Ayad E.H.E., Verheul A., Brninenberg P. et Wouthers J.G.S., 2003.** Starter culture development for improving the flavour of Proosdij-type Cheese. *Int. Dairy J.* **13**: 159-168.
- Bachmann H., Starrenburg M.J.C., Molenaar D., Kleerebezem M. et van Hylckama Vlieg J.E.T., 2012.** Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. **26** (5) : 115-124.
- Bauza T., Blaise A., Teissedre P.L., Cabanis J.C., Kanny G., Moneret-Vautrin D.A. et Daumas F., 1995.** Les amines biogènes du vin : métabolisme et toxicité. Bulletin de l'OIV. **68**: 42-67.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris. 661-765.
- Belitz H.-D., Grosch W. et Schieberle P., 2009.** Food chemistry. 4<sup>ème</sup> Ed Springer Verlag Berlin. 1070.
- Benedykt W. et Katarzyana P., 2008.** Regulation of bacterial protease activity. *Cellular Mol. Biol. Letters.* **13**: 212-229.
- Bergy, 2009.** Manuelle de la systématique bactérienne. 1<sup>er</sup> Ed. RE Buchanan and N.E Gibbons. 600.
- Bochelmon W., 1995.** The proteolytic system of starrer and non-starter bacteria : comonents and their importance for cheese ripening. *Int. Dairy J.* **5**: 997-994.
- Budiarto B.R., Mustopa A.Z. et Idarmawan T., 2016.** Characterization of partially extracellular proteases from bekasam-isolated *Lactobacillus plantarum* S31 and its application to hydrolyze skimmed-milk with antibacterial property. *Int.J. Food Res.* **23** (1): 340-349.
- Burdychova R. et Komprda T., 2007.** Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Letters.* **276**: 149-155.

**Canquil N., Villarroel M., Bravo S., Rubilar M et Shene C., 2007.** Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. **68**: 270-279.

**Castberg H.B. et Morris H.A., 1976.** Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese-making. *A rev.* **31**: 85-90.

**Chandan Ramesh C., 2006.** Manufacturing yogurt and fermented Milks. *1<sup>ère</sup> Ed.* Blackwell Publishing. 364.

**Chapot-Chartier. M. P., 1996.** Les autolysines des bactéries lactiques. *Le lait*. **76**: 91-109.

**Chen H. et Hoover D., 2003.** Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 82-100.

**Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. *Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.*

**Christensen C., Bratt H., Collins L.J., Coolbear T., Holland R., Lubbers M.W., O'Toole P.W. et Reid J.R., 2002.** Cloning and expression of an oligopeptidase, PepO, with novel specificity from *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20). *App Environ Microbiol.* **68**: 254-262.

**Cizeikiene D., Juodeikiena G., Paskevicius A et bartkiene Elena., 2013.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food control.* **31** (2): 539-545.

**Coral G., Arikan B., Ünaldi M.N. et Güvenmez H., 2003.** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals. Microbiol.* **53** (4): 491-498.

**Coulter T.P., 2002.** Food: the chemistry of its components. *4<sup>ème</sup> Ed.* Royal Society. Chem. England. 432.

### E-D

**Da Cruz A.G., Faria J.A.F. et Van Dender A.G.F., 2007.** Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res Inter.* **40**: 951-956.

- Dako E., El-Soda M., et Simard R., 1995.** Autolytic Properties and aminopeptidases activities of Lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **28** : 503.
- Dalmis Ü et Soyer A., 2008.** Effect of processing methods and starter culture (*Staphylococcus xylosus* and *Pediococcus pentosaceus*) on proteolytic changes in Turkish sausages (sucuk) during ripening and storage. *Meat Sci.* **80**: 345-354.
- Desar I.M.E., De boer M., Bens C.C.P.M. et al. 2008.** Rapid and reliable identification of *Streptococcus anginosus* group isolates to the species level by real-time PCR and melting curve analysis. *J. Microbiol. Methods.* **75**: 372-374.
- Desmazeaud M.J. et Vassal L., 1979.** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles : Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait.* **587** : 327-344.
- Dhamale K.S., Sonawane P.D., Jaybhaye A.S et Akkiraju P.C., 2015.** Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial activity and in vitro, in vivo studies of LAB activity on *Fusarium oxysporum* infected tomato seeds. *Int. J. Adv. Res.* **3** (5): 954-963.
- Dib W., Biscola V., Choiset Y., Chobert J-M., Haertlé T., Chekroun A., Saidi D., Kheroua O., 2014.** Characterization of a new isolate of *Lactobacillus brevis* WD19 from Algerian goat milk with proteolytic activity. *Global Adv. Res. J. Agric. Sci.* **3** (12): 423-432.
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shah N.P., 2007.** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait.* **86**: 21–38
- Drosinos E.H., Paramithiotis S., Kolovos G., Tsikouras I et Metaxopoulos I. 2007.** Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiol.* **24**: 260-270.
- Durlu-Özkaya F., Aslim B et Taha ozkaya M. 2007.** Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT - Food Sci and Tech.* **40**: 564-568.
- El-Din B., El-Soda M et Ezzat N., 2002.** Protéolytic, lipolytic and autolytic activities of enterococci strains isolated from Egyptian dairy products. *Lait.* **82**: 289-304.

**El-Ghaish S., Dalgalarondo M., Choiset Y., Sitohy M., Ivanova I., Haertlé T. et Chobert J-M., 2010.** Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chem.* **120**: 758–764.

**El-Ghaish S., Dalgalarondo M., Choiset Y., Sitohy M., Ivanova I., Haertlé T. et Chobert J-M., 2010.** Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *Eur. Food Res. Tech.* **230**: 635–643.

**El-Soda M., Farkye N. et Vuilleumard J.C., 1994.** Autolysis of lactic acid bacteria: impact on flavor development in cheese. In the 8<sup>th</sup> Flavour Symposium. Edited by G. Charahamboulos. *Amsterdam : Elsevier sci.* 1205-3173.

**El-Soda M., Farkye N., Vuilleumard V., et others authors., 1995.** Autolysis of Lactic acid bacteria. Impact on flavour development in cheese. In Food Flavour : Generation Analysis and Process influence. Edited by G.Charalmbous. Amsterdam, The Netherlands : *Elsevier Sci. B.V.* 2205-2223.

### E-G

**FAO/WHO., 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.

**Felis G.E., Salvetti E. et Torriani S., 2015.** Systematics of lactic acid bacteria. In: Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications (Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M). 2<sup>e</sup> Ed. *Wiley-Blackwell.* 392.

**Figueiredo A.R., Campos F., De Freitas V., Hogg T et Couto J.A., 2008.** Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol.* **25**: 105-112.

**Fox Patrick F., McSweeney Paul H.K., Cogan T.M. et Guinee T.P., 2004.** Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects Volume 1. 3<sup>ème</sup> Ed *Elsevier Academic*, London ON, Canada.

**Gatii M., Fornasari E., Garni D., Giraffa G. et Neviani E., 1995.** Gli enterococchi nei formaggi italiani : attività biochimie sinifacto tecnologica. *Industria del Latte.* **30** : 11-27.

**Gemechu T., 2015.** Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr. J. Food sci.* **9** (4): 170-175.

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

**Gevers D., 2002.** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. *Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.*

**González-Olivares L.G ., López-Cuellar Z.L ., Añorve-Morga J., Franco-Fernández M.J., Castañeda-Ovando A., Contreras-López E., Jaimez-Ordaz J. et Rodriguez-Serrano G. M., 2014.** Viability and proteolytic capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during cheese ripening. *J. Biosci. Med.* **2**: 7-12.

**Grattepanche F., 2005.** Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse de doctorat. Université Laval. **260**.

**Griffiths M.W. et Tellez A.M., 2013.** *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiol.* **4**: 30-39.

**Guerra N.P., Bernardez P.F., Mendez J., Cachaldora P., Castro P.L., 2007.** Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Scie. Tech.* **134** : 89-107.

**Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.

**Guo Y., Pan D., Zeng X. et Tanokura M., 2009.** Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* **112**: 533-538.

**Gupta A., Roy I., Khare S.K. et Gupta M.N., 2005.** Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* Pse A. *J. Chromatography.* **1069**: 155-161.

## H-I

**Hadji Sfaxi I., El-Ghaish S., Ahmadova A., Rabesona H., Haertlé T. et Chobert JM., 2012.** Characterization of new strain *Lactobacillus paracasei* I-N-10 with proteolytic activity: Potential role in decrease in -casein immuno-reactivity. *Eur. Food Res. Tech.* **235**: 447-455.

**Hagen B.F., Næs H. et Holck A.L., 2000.** Meat starters have individual requirements for Mn<sup>2+</sup>. *Meat Sci.* **55**: 161-168.

**Hames R.S., Lowe J.D., Swarthout S.B. et Rosenberg K.V., 2006.** Understanding the risk to neotropical migrant bird species of multiple human-caused stressors: elucidating processes behind the patterns. *Ecology and Society*. **11**(1): 24.

**Hassan A.N. et Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: *Appl. Dairy Microbiol* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2<sup>ème</sup> Ed. *Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

**Hegazi F.Z., 1990.** Growth rate, proteolysis and acid production of *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* in skim milk with some additives. *Nahrung*. **34** : 195– 199.

**Henning C., Gautam D et Muriana P., 2015.** Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus* spp. Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin PCR Array. *Microorganisms*. **3**: 1-16.

**Hilde M.O, Vegarud G. et Langsrud T., 1995.** Autolysis of Lactococci: Detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3598-3603.

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

**Hogg T., 2005.** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.

**Hou J-c., Liu F., REND., Han W-w. et DUY., 2015.** Effect of culturing conditions on the expression of key enzymes in the proteolytic system of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. **16** (4):317-326.

**Hughes M.C., Kerry J.P., Arendt E.K., Kenneally P.M., Mcsweeney P.L.H. et Oneill E.E., 2002.** Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Sci.* **62**: 205-216.

**Huys G., Vancanneyt M., D'haene K., Vankerckhoven V., Goossens H. et Swings J., 2006.** Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res in Microbiol.* **157**: 803-810.

**Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*. **60** (2): 177-183.

**K-L**

**Kang O-J, Vézina L-P, Laberge S. et Simad R.E., 1998.** Some Factors Influencing the Autolysis of *Lactobacillus bugarius* and *Lactobacillus casei*. *J. dairy sci.* **81**: 639-646.

**Karovičová J. et Kohajdová Z., 2005.** Biogenic amine in food. *Chem. Pap.* **59**(1) : 70-79.

**Klein G., 2003.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:123–131.

**Kok J., 1999.** Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* **87**: 15-42.

**Koort J., Coenye T., Santos E.M. et al., 2006.** Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with "Morcilla de Burgos". *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 164-168.

**Krieg N.R., 2001.** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity G.M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore. **720**: 33 - 38.

**Kunji E.R., Mierau I., Hagting A., Poolman B et Konings W.N., 1996.** The proteolytic of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**: 187-221.

**Kurniati N., Mubarik N.R. et Desniar., 2015.** Optimization of production of protease by *Lactobacillus plantarum* sk (5) from bekasam with response surface methodology. *Pak. J. Biotechnol.* **12** (2): 123-130.

**Lakshmi B.K.M., Ratna sri P.V., Ambika Devi K et Hemalatha KP.J., 2014.** Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from *haloalkaliphilic bacillus* sp. *Int. J. Res. in Engineering and Technology.* **03** (02): 2319-1163.

**Lamarque M., Charbonnel P., Audel D., Piard J., Atlan D et Juillard V., 2004.** A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *J. Bacteriol.* **186**: 6492-6500.

**Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A., Gruss A. et Le Loir Y., 2001.** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait*. **81**: 19-28.

**Lazur-Demers G., 2002.** Mise au point d'une méthode rapide d'extraction des autolysines chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. Faculté des études supérieures de l'Université Laval, Canada.

**LeBlanc D., 2006.** Enterococcus. *Prokaryotes*. **4**:175-204.

**Leroy F. et De vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Sci & Tech*. **15**: 67-78.

**Limsowtin G.K.Y., Broome M.C. et Powell I.B., 2004.** Lactic acid bacteria, taxonomy. In Encyclopedia of Dairy Sci. Roginski H. Oxford, Elsevier. 1470-1478.

**Liu B., Larssou L., Caballero A., Hao X., Oling D., Grantham J. et Nystrom T., 2010.** The Polarisome Is Required for Segregation and Retrograde Transport of Protein Aggregates. *Cell*. **140** (2): 257-267.

**Lortal S. et Chapot-Chartier M.P., 2005.** Role mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J*. **15**: 857-871.

**Law J. et Haandrikman A., 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*. **7**: 1-11.

**Ludwig W., Schleifer K-H. et Whitman W.B., 2008.** Bergey's taxonomic outlines - Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. **3**.

#### M-N

**Macedo A.C., Tavares T.G. et Malcata F. X., 2002.** Purification and characterization of an intracellular aminopeptidase from a wild strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Serra da Estrela cheese.

**Manca de Nadra M.C., 2007.** Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review. *Communicating Current Res. Edu. Topics and Trends in Appl Microbiol.A. Méndez-Vilas (Ed.)*

**Maret du Toit., 2015.** Lactic Acid Bacteria: FRIEND OR FOE ? Inaugural lecture delivered on 12 February.

**Marteau P. et Seksik P. 2004.** Place des probiotiques dans la prevention et le traitement des diarrhees postantibiotiques. *Revue Francaise des Laboratoires*. 73-76.

**Maślanka S., KOSA., Bańczyk M., Czopek I. et AdamŁ.,2015.** Study of concentration of lactic acid obtained in the process of lactic fermentation of lactose contained in the spent whey using *Lactobacillus*. *Chemik*. **69** (4): 241–251.

**Mäyrä-Mäkinen A. et Bigret M., 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3<sup>e</sup>Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 73-102.

**McCabe-Sellers B., Staggs C. et Bogle M., 2006.** Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J. Food Compos. Anal.* **19**: 58-65.

**Miratis Sulthoniyah ST., Hardoko et Nursyam H., 2015.** Characterization of Extracellular Protease Lactic Acid Bacteria From Shrimp Paste. *J. Life Sci. Biomed.* **5** (1): 01-05.

**Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris. 512-592.

**Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. et De vuyst L., 2006.** The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.

**Nájera-Domínguez C et Gutiérrez-Méndez N., 2013.**Autolytic and Proteolytic Properties of Strains of *Lactococcus lactis* Isolated from Different Vegetables, Raw-Milk Cheeses and Commercial Starter Cultures. *Food and Nutrition Sci.* **4**: 21-26.

**Nielsen D.S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A.G. et Arneborg N. 2008.** Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Sci.* **80**: 919-926.

### O-P

**Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saïhi A., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 286-290.

**Ohmiya K. et Sato Y., 2014.** Promotion of Autolysis in Lactobacilli. *Agric and Biol Chem.* **39:** (3) 585-589.

**Omar Hassain., 2013.** Caractéristiques D'interets Technologiques De Souches De Bactéries Lactiques Isolées De Lait Camelin Du Sud Algerien. Thèse doctorat. L'Université d'Oran Es-sénia.

**Ouwehand A. C., Salminen S. et Isolauri E., 2002.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82:** 279-289.

**Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopouloutzanetaki E. et 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.

**Penaud S., 2006.** Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon.267.

**Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F. et de Valdez G.F., 2010.** Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **141:** 73-81.

**Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2<sup>ème</sup> Ed., *Economica*. Paris. 219-240.

**Prescott M., Nowakowski S., Gavin P., Nagley P., Whisstock J.C. et Devenish R.J., 2003.** Subunit gamma-green fluorescent protein fusions are functionally incorporated into mitochondrial F1F0-ATP synthase, arguing against a rigid cap structure at the top of F1. *J Biol Chem.* **278** (1): 251-6.

### **Q-R**

**Qitti M., Fornasari E., Garni D., Giraffa G. et Neviani E., 1994.** Gli enterococchi nei formaggi italiani : attività biochimiche significato tecnologica-*Industria del Latte.* **30:** 11-27.

**Quinto E.J., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J et Girbés T., 2014.** Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sci.* **5:** 1765-1775

**Rahkila R., 2015.** Taxonomy and diversity of coccal lactic acid bacteria associated with meat and the meat processing environment. Helsinki.

**Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **62** (3): 597-653.

**Reddy L.V., Wee Y.-J., Yun J.-S. et Ryu H.-W., 2008.** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Tech.* **99**: 2242-2249.

**Rodas A.M., Ferrer S. et Pardo I., 2005.** Polyphasic study of wine *Lactobacillus*. strains, taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 197 - 207.

**Roe S., 2001.** Protein purification and applications : a practical approach. 2<sup>e</sup> Ed Oxford University Press. USA. 262.

**Rossello-Mora R. et Amann R., 2001.** The Species Concept for Prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67.

**Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European J. Sci. Res.* **34** (2): 218-227.

**Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. et Zoon P., 2002.** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**: 163-171.

**Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P. et Cordoba M.G., 2008.** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.* In Press, Corrected Proof.

### S-T

**Sachindra N.M., Sakhare P.Z., Yashoda K.P. et Narasimha Rao D., 2005.** Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control.* **16**: 31-35.

**Sahingil D., Hayaloglu A., Simsek O et Ozer B., 2014.** Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brined cheese: effects of ripening temperature and adjunct culture. *Dairy Sci. Tech, EDP sci/Springer.* **94** (6): 603-623.

- Sandhya C., Sumantha A. et Pandey A., 2004.** Proteases. In: Enzyme Technology, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), *Asiatech Publishers Inc.*, New Delhi, (India). 312–325.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. et Pandey A., 2005.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. **40**: 2689-2694.
- Sarantinopoulos P., Andrighetto C., Georgalaki M.D., Rea M.C., Lombardi A., Cogant.M., Kalantzopoulos G. et Tsakalidou E., 2001.** Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* **11**: 621–647.
- Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G. et Tsakalidou E., 2001.** Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Appl. Environ Microbiol.* **66** : 794-800.
- Savijokie K., Ingmer H. et Varmanen P., 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 394-406.
- Scannell A.G.M., Kenneally P.M. et Arendte.K., 2004.** Contribution of starter cultures to the proteolytic process of a fermented non-dried whole muscle ham product. *Int. J. Food Microbiol.* **93**: 219-230.
- Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. et Fanni J., 2009.** Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* **26** : 645-652.
- Settachaimongkon S., Robert Nout M.J., Antunes Fernandes E.C., van Hooijdonk T.C.M., Zwietering M.H., Smid E.J. et van Valenberg H.J.F., 2014.** The impact of selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt. *Int. Dairy J.* **38**: 1-10.
- Siezen R.J., Starrenburg M.J., Boekhorst J., Renckens B., Molenaar D. et van Hylckama Vlieg J.E., 2008.** Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Appl Environ Microbiol.* **74**:424-36.
- Sneath P.H.A., 2001.** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Bacterial Nomenclature. In Bergey's manual of systematic bacteriology. *Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. 2<sup>eme</sup> Ed.* **721**: 83 - 88.

- Sumantha A., Larroche C. et Pandey A., 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Tech. Biotechnol.* **44** (2): 211-220.
- Sutar I.I., Vatak H.G., Srinivasan M.C. et Sivaraman H. 1986.** Production of alkaline protease by immobilized mycellium of *Condiobolus*. *Enz. Microbiol. Tech.* **8**: 632-634.
- Tamime A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3<sup>eme</sup> Ed., *John Wiley and Sons, Inc.*, New York. 261-366.
- TanasupawatS., Phoottosavak M. et Keeratipibul S., 2015.** Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *J. Appl. Pharmaceutical Sci.* **5** (03): 006-012.
- Temmerman R., Huys G. et Swings J., 2004.** Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends. Food Sci. Tech.* **15**: 348–359.
- Terzić-Vidojević A., Mihajlović S., Uzelac G., Golić N., Fira Đ., Kojić M. et Topisirović L.J., 2014.** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined golija cows' milk cheeses. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade. **66** (1): 179-192.
- Teuber M. et Geis A., 2006.** The genus *lactococcus*. In: Dworkin et al. (Eds.), *Prokaryotes*, Springer, New York, NY. **4**: 205-228.
- Thivierge N., 1999.** Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pour le développement des ferments mésophiles à aptitudes fromagère élevées (Cheddar). Mémoire M. *Sci. National Library of Canada*.
- Todorov S.D., Koep K.S.C., Van Reenen C.A., Hoffman L.C., Slinde E. et Dicks L.M.T., 2007.** Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and Springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. *Meat Sci.* **77**: 405-412.
- Tomé.D., 1998.** Peptides fonctionnels. *Danone World Newqletter.* **17**: 1-17.
- Topisirovic L., Kojic M., Fira D., Golic N., Strahinic I. et Lozo J., 2006.** Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 230-235.

**Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005.** Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* **99**: 30-37.

**Turhan I., Öner Z., 2014.** Determination of starter culture properties of lactic acid bacteria isolated from cheese. *Gida.* **39** (1): 9-15.

V-W

**Van de Hychma Vlieg E. J., Randemaker J. L., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W.J. et Siezen R.J., 2006.** Natural diversity and adaptative response of *Lactococcus lactis*. *Curr. Op. Microbiol.* **17**: 1-8.

**Vignola Carole L., 2002.** Science et Technologie du lait : transformation du lait. *Ed Presses Internationales Polytechniques.* 600.

**Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G. et Singh S.A., 2009.** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem.* **114**: 402-407.

**Visser S., 1993.** Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavour : An overview. *J. Dairy Sci.* **76**: 329-350.

**Vuillemard J.C., 1986.** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. **3**: 1-65.

**Wee Y.J., Kim J. N. et Ryu H.W., 2006.** Biotechnological production of lactic acid and Its Recent Application. *Food tech.* **44** (2) : 163-172.

**Welman A.D. et Maddox I.S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends in Biotechnol.* **21**: 269-274.

**Wilkesman J. et Kurz L., 2009.** Protease Analysis by Zymography : A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnol.* **3**: 175-184.

**Wisselink H.W., Weusthuis R.A., Eggink G., Hugenholtz J. et Grobben G. J., 2002.** Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int. Dairy J.* **12**: 151-161.

**Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J. et Smit G., 2002.** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* **12**: 91-109.

**Wu J., Chen H. et Chen W., 2008.** Fermentation parameter and partial biochemical

characterization of milk-clotting enzyme from Chinese distiller's yeast. *Annals of Microbiol.* **58** (4): 717-722.

**Annexe 01 : Composition des milieux de culture, réactifs et tampons**

▪ **Milieu MRS (pH 6.5)**

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	5g
Glucose .....	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bipotassique .....	2g
Acétate de sodium .....	5g
Citrate d'ammonium .....	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O .....	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O .....	0.5g
Agar .....	15g
Eau distillée qsp .....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

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

**Milieu A** : pour un litre

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

Autoclavage à 121°C pendant 15min.

**Milieu B** : pour un litre

Lait écrémé .....	6%
Pourpre de Bromocrésol .....	0.006%

Stérilisation par tyndallisation 3 fois à 90°C

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

▪ **Réactif de Bradford**

Bleu de coomassie G250.....	10mg
Ethanol (95%) .....	50ml
Acide phosphorique (85%) .....	100ml
Eau distillée qsp .....	1000ml

**Annexe 02 : Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

**Annexe 03 : Croissance bactérienne**

**Tableau 3.1** : Evolution de la densité optique au cours du temps.

<b>Souches</b>	<b>T0h</b>	<b>T2h</b>	<b>T4h</b>	<b>T6h</b>	<b>T8h</b>	<b>T24h</b>
<b>L1</b>	0.571	0.742	0.701	0.741	0.971	2.602
<b>E5</b>	0.381	0.612	1.161	1.402	1.574	1.941

Annexe 04 : Courbes d'étalonnage

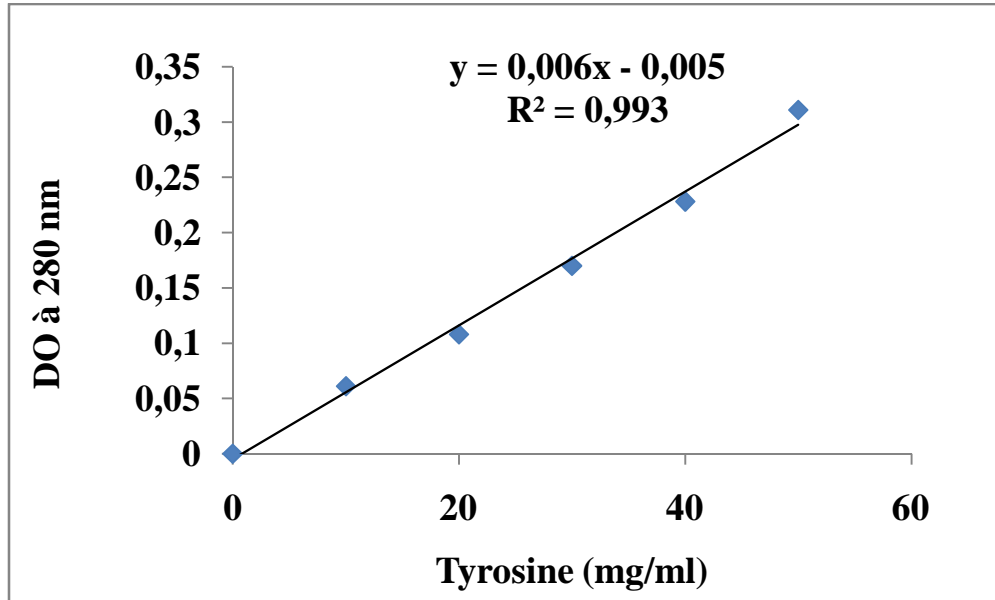


Figure 4.1: Courbe d'étalonnage de la tyrosine

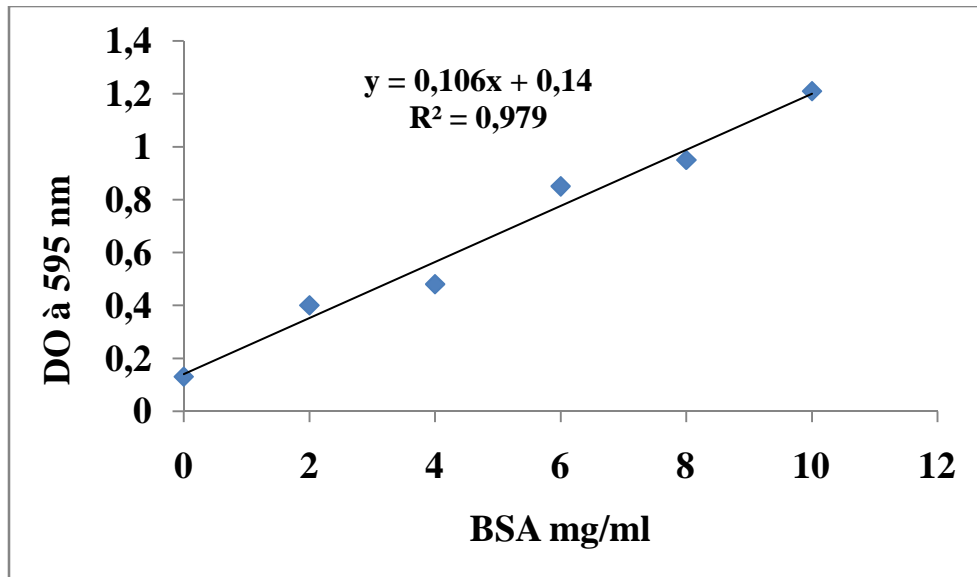


Figure 4.2 : Courbe d'étalonnage de la BSA.

## Annexes

### Annexe 05: Pouvoir protéolytique

**Tableau 5.1 :** Effet de pH sur l'activité endoprotéasique.

U/ml	pH 5.4	pH 5.7	pH 6	pH 7.2	pH 8.2
L1	25.334	21.334	21.334	11.334	15.334
E5	18.334	26.334	18.334	9.334	26.334

**Tableau 5.2 :** Effet de pH sur l'activité exoprotéasique.

U/ml	pH 5.4	pH 5.7	pH 6	pH 7.2	pH 8.2
L1	174.666	174.332	188.666	152.666	153.332
E5	125.666	126	131	124.666	135

**Tableau 5.3 :** Effet de température sur l'activité endoprotéasique.

U/ml	28°C	30°C	37°C	42°C	50°C
L1	24.334	29.334	29	24.334	14.666
E5	16.334	17.334	48.334	16	15

**Tableau 5.4:** Effet de température sur l'activité exoprotéasique.

U/ml	28°C	30°C	37°C	42°C	50°C
L1	137	153.322	231.666	146.322	131.666
E5	17.166	490	136.666	122.322	105.666

**Tableau 5.5 :** Effet des effecteurs sur l'activité endoprotéasique.

U/ml	Sans effecteur	EDTA	CaCl <sub>2</sub>	Tween 80	NaCl
L1	29	11.167	95.833	34.167	1.666
E5	48.333	12	5.667	22.500	99.167

## *Annexes*

---

**Tableau 5.6 :** Effet des effecteurs sur l'activité exoprotéasique.

<b>U/ml</b>	<b>Sans effecteur</b>	<b>EDTA</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>Tween 80</b>	<b>NaCl</b>
<b>L1</b>	231.666	97.500	69.833	75	71.333
<b>E5</b>	136.666	99.167	63	64.667	69.833

### **Annexe 06 : Pouvoir autolytique**

**Tableau 6.1:** Evolution de l'activité autolytique au cours du temps.

<b>DO</b>	<b>T0</b>	<b>24h</b>	<b>7J</b>
<b>L1</b>	0.834	0.798	0.665
<b>E5</b>	1.730	0.710	0.591

---

**Présenté par :** Azzem Hadia  
Chebli Naima

**Encadreur :** M<sup>lle</sup> HADEF Sawsen

---

**Nature du diplôme :** Master en Biologie : Option Biochimie et Microbiologie Appliquée

---

**Thèmes :** *Caractérisation de l'activité protéolytique de quelques souches de bactéries lactiques*

---

### Résumé

À travers cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité protéolytique d'une collection de dix-huit souches de bactéries lactiques d'origine locale (dix souches d'*Enterococcus* sp. et huit de *Lactobacillus* sp.). Les résultats obtenus montrent que la totalité de nos souches ont été protéolytiques. Nous avons procédé, par la suite, à caractérisation physico-chimique partielle de l'activité enzymatique des exo et des endoprotéases de deux souches révélées comme les plus protéolytiques : *Enterococcus* sp. E5 et *Lactobacillus* sp. L1. L'activité des exoprotéases a été plus importante que celles des endoprotéases. Ces enzymes se sont avérées sensibles aux variations de la température, du pH et la présence de quelques effecteurs (EDTA, NaCl, CaCl et tween 80). Ainsi, la souche d'*Enterococcus* sp. E5 a présenté un bon pouvoir autolytique et meilleur que celui de la souche *Lactobacillus* sp. L1.

**Mots clés:** Bactéries lactiques, activité protéolytique, exoprotéase, endoprotéase, autolyse.

---

### Abstract

In this study, we were interested for evaluation of the proteolytic activity for a collection of eighteen local isolates of lactic acid bacteria (ten strains of *Enterococcus* sp. and eight of *Lactobacillus* sp.). The results showed that the totality of strains were proteolytically active. Thereafter, we carried a partial physicochemical characterization of the enzymatic activity of exo and endoproteases of two strains revealed as the most proteolytic: *Enterococcus* spp. E5 and *Lactobacillus* sp. L1. The exoprotease activity was higher than that of the endoprotease. These enzymes proved to be sensitive to changes in temperature, pH and the presence of some effectors (EDTA, NaCl, CaCl and Tween 80). Thus, *Enterococcus* sp. E5 was presented a good autolytic activity which better than that of the *Lactobacillus* sp. L1.

**Key-words:** Lactic acid bacteria, proteolytic activity, exoprotease, endoprotease, autolysis.

---

### المخلص

من خلال هذه الدراسة ، اهتمنا بتقييم النشاط البروتيني لثمانية عشر سلالة من البكتيريا اللبنية المحلية ( عشر سلالات من جنس *Lactobacillus* sp. و ثمانية من جنس *Enterococcus* sp. . أظهرت النتائج أن كل السلالات لها نشاط بروتيني ، الذي سمح بدراسة بعض الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للنشاط الإنزيمي الداخلي و الخارجي للسلالتين *Lactobacillus* sp. L1 و *Enterococcus* sp. E5 باعتبارهما الأكثر نشاطا. فكان النشاط الإنزيمي الخارجي أفضل من النشاط الداخلي. غير أن هذه الإنزيمات ثبت أنها حساسة لتغيرات درجة الحرارة , درجة الحموضة و وجود بعض المؤثرات ( CaCl , EDTA NaCl و Tween 80). كما بينت النتائج أن سلالة *Enterococcus* sp. E5 لها قدرة عالية على الانحلال الذاتي مقارنة بالسلالة *Lactobacillus* sp. L1.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا اللبنية , النشاط البروتيني , البروتينات الخارجية , البروتينات الداخلية , الانحلال الذاتي.