

**UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES**



**Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de**  
**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie  
**Filière** : Sciences biologiques  
**Spécialité** : Microbiologie Appliquée

**Présenté par** : BEN GUEHZA Aicha  
MOKNINE Hadjer

**Thème**

**Intérêt technologique des souches de**  
***leuconostoc* isolées à partir de différents**  
**produits laitiers**

**Soutenu publiquement**

Le : 04/07/2019

**Devant le jury :**

- M<sup>me</sup>. Ouled El Hadj Khelil Aminata Professeur Présidente UKM Ouargla
- M<sup>lle</sup>. DJELLOUL DAOUADJI Soumia M.A.A Examinatrice UKM Ouargla
- Mr .BOURICHA M'hamed M.A.A Encadreur UKM Ouargla

**Année Universitaire : 2018 /2019**

## *Remerciement*

*Au début et avant tout, le remerciement et louange à Allah tout puissant, qui nous a guidé sur le chemin droit tout au long de notre travail et nous a inspiré aux justes réflexes et qui nous a donné la santé, le courage, la volanté et la patience pour réaliser ce travail. Nous tenons à exprimer nos profondes remerciement à monsieur **BOURICHA M'hamed**, directeur de ce mémoire, pour son aide précieuse, pour ses conseils, sa disponibilité, sa contribution efficace et ses encouragements et surtout sa patience et son soutien qui ont grandement contribué à mener à terme ce mémoire. Nous remercions également Madame **OULED EL HADJ Aminata** d'avoir acceptée la présidence du jury de notre travail, C'est également un grand honneur pour nous d'être jugé par vous. Soyez assuré de notre plus profond respect.*

*Nous tenons à remercier Mademoiselle **DJELLOUL DAOUADJI Soumia** d'avoir acceptée d'examiner notre mémoire. Vos commentaires durant la soutenance nous seront très utiles.*

*Nous tenons à remercier tous le personnel de l'Université de Kasdi Merbah-Ouargla de nous avoir aidés à réaliser ce projet. Merci infiniment pour les efforts fournis.*

*MOKNINE Hadjer  
& BENGHAZA Aicha*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail:*

*A mon cher mari **ACHRAF**, celui qui a sacrifié tout ce qu'il a de cher pour m'encourager surtout cette année, celui qui m'a toujours soutenu et était ma « force promotrice » pour étudier, travailler et aller plus loin avec plus de soutien, conseil et persévérance, à qui j'éprouve un profond amour et respect.*

*Aux êtes les plus chers à mon cœur dans ce monde qui m'ont beaucoup soutenu, sacrifiés et qui m'ont donné le meilleur, mes parents,*

*Chère mère j'avoue vraiment que tu étais pour moi la lumière qui me guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite.*

*Cher père je me rappelle toujours de tous les moments où tu m'as poussé à travailler et à réussir.*

*A mes chères sœurs **KHAOULA** et **WISSAL** et ma petite ange **ALAA***

*A toutes ma belle famille*

*A mes chères amies **SELMA** et **SAOUSEN***

*A ma collègue **AICHA***

*A toute la famille **MOKNINE**, **BRAHITI** et **GUERNANE** sans exception*

*A tous ceux qui de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail*

***HADJER***



## Dédicace

*Avant tout, Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.*

*Je dédie ce modeste travail:*

*Je tiens à commencer par la très chère dans le monde, qui remplit mon cœur de clarté, à l'idole immortelle, mes parents*

*A ma chère Mère, Ce travail est le fruit de tes nombreux sacrifices et encouragements. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.*

*A mon cher Père, qui m'a beaucoup soutenu, et qui m'a donné le meilleur et toutes les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement et l'amour que je porte pour toi.*

*A mon cher frère WALID et chers petits ANAS et ZAKARIA  
A mes chers grands-parents que Dieu ait pitié d'eux.*

*A mes tantes ZAHRA, HALIMA, MAILODA, HADDA,  
HOURIA, DJAMAL, BELKHAIR, HOCINE et HAMZA et ceux  
qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la  
réalisation de ce travail et mes oncles.*

*A mes chères amies SAMIA, ZAINAB, NASSIMA, NAZIHA,  
ISMAHAN, MANAR, MABROUKA et DJAWHAR. et mes  
autres amies sans exception*

*A ma belle binôme HADHER et tous mes collègues*

*A toute ma famille BENGUEHZA et MERIZIG sans exception*

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment*

*AICHA*

**Remerciement**

**Dédicace**

**Table de Matières**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des photos**

**Liste des abréviations**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

**Introduction**

## **Chapitre I : Généralité sur *Leuconostoc***

1- Bactéries lactiques .....	1
1-1- Définition .....	1
1-2- Habitat .....	1
1-3- Classification des bactéries lactiques .....	1
1-4- Intérêt technologique des bactéries lactiques .....	2
2- Le genre <i>Leuconostoc</i> .....	3
2-1- Historique .....	3
2-2- Définition .....	4
2-3- Caractères culturaux des leuconostocques .....	4
2-3-1- Caractéristiques nutritionnelles .....	4
2-3-2- Caractéristiques physicochimiques .....	5
2-3-3- Caractères biochimiques .....	5
2-3- 3-1- Fermentation des sucres .....	5
2-3- 3-2- Fermentation de citrate .....	6
2-4- Caractères technologiques des leuconostocques .....	8

2-4-1-Acidité.....	8
2-4-2-Production de substance aromatique .....	8
2-4-3-Activité lipolytique .....	9
2-4-4-Activité protéolytique .....	9
2-4-5- Production desdextranes.....	10
2-4-6- Production des substances antimicrobiennes .....	10
2-5- Applications de genre <i>leuconostoc</i> .....	11

## **Chapitre II : Matériel et méthode**

1- Lieu de l'étude .....	12
2- Echantillonnage .....	12
3- Milieux de culture utilisés .....	12
4- Isolement des souches <i>Leuconostoc</i> .....	13
4-1- Préparation des dilutions .....	13
5- Purification .....	13
6- pré-identification des isolats : Tests phénotypiques .....	14
6-1- Examen Macroscopique.....	14
6-2- Examen Microscopique (Coloration de Gram) .....	14
6-3- Test de recherche de la catalase .....	14
7- Conservation des isolats .....	14
7-1- Conservation de courte durée .....	15
7-2- Conservation de longue durée .....	16
8- Tests physiologiques .....	17
8-1- Croissance à différentes températures .....	17
8-2- Thermorésistant.....	17
8-3- Croissance à différentes concentration de NaCl .....	17
8-4- Croissance à différents PH. ....	17
9- Tests biochimiques.....	17
9-1- Recherche de type fermentaire.....	17
9-2- Hydrolyse de l'arginine (ADH) .....	18
9-3- Test de dégradation des sucres .....	18
9-4- Hydrolyse de l'esculine .....	19
10- Tests technologiques .....	21

10-1- Production des exopolysaccharides .....	21
10-2- Mis en évidence de l'activité protéolytique .....	21
10-3- Mis en évidence de l'activité lipolytique .....	21
10-4- Production des substances aromatiques .....	22

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

1- Isolement et purification .....	23
1-1- Isolement .....	23
1-2- Purification .....	24
2- Pré-identification .....	25
2-1- Coloration de Gram.....	25
2-2- Test de recherche de la catalase .....	25
3- Caractéristiques physiologiques et biochimiques .....	26
3-1- Tests physiologiques.....	26
3-1-1- Croissance à différentes températures .....	28
3-1-2- Thermorésistant .....	28
3-1-3- Croissance à différents concentration de NaCl .....	28
3-1-4- Croissance à différents pH .....	28
3-2- Tests biochimiques .....	28
3-2-1- Recherche de type fermentaire.....	28
3-2-2- Hydrolyse de l'arginine (ADH).....	29
3-2-4- Test de dégradation des sucres .....	31
3-2-5-Hydrolyse de l'esculine.....	32
4- Tests technologiques .....	33
4-1- production des exopolysaaccharides (dextranes).....	33
4-2- Mis en évidence de l'activité protéolytique .....	34
4-3- Mis en évidence de l'activité lipolytique .....	36
4-4- Production des substances aromatiques .....	37
<b>Conclusion</b> .....	40

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 01 :</b> Date et lieu d'échantillonnage des différents produits analysés.....	12
<b>Tableau 02 :</b> Tableau représentant les résultats des tests physiologiques.....	27
<b>Tableau 03 :</b> Les caractères biochimiques et morphologiques des isolats.....	30
<b>Tableau 04 :</b> Le profil de dégradation des sucres par les souches de <i>Leuconostoc</i> ..	31
<b>Tableau 05 :</b> Activité protéolytique de certaines souches de <i>Leuconostoc</i> isolées à partir de différents écosystèmes.....	36
<b>Tableau 06 :</b> Les résultats des caractères technologiques des isolats.....	39



## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Schéma représentant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques.....	2
<b>Figure 02 :</b> Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	7
<b>Figure 03 :</b> Schéma représente l'isolement et la purification des isolats.....	13
<b>Figure 04:</b> Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées.....	15
<b>Figure 05:</b> Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.....	16
<b>Figure 06 :</b> Schéma représente le test de fermentation des sucres.....	20

## Liste des photos

<b>Photo 01</b> : Image de <i>leuconostoc</i> .....	4
(A)- Observation de <i>leuconostoc</i> sous microscope optique *100.....	4
(B)- Observation de leuconostoc sous microscope électronique.....	4
<b>Photo 02</b> : Aspect macroscopique des cultures bactériennes des souches de <i>Leuconostoc</i> ensemencées en profondeur sur milieu MRS.V.....	23
<b>Photo03</b> : Aspect des souches pures des <i>Leuconostoc</i> sur bouillon MRS.....	24
<b>Photo 04</b> : Aspect des souches pures des <i>Leuconostoc</i> sur milieu MRS solide.....	24
<b>Photo 05</b> : Observations microscopiques des souches de bactéries lactiques après une coloration de Gram à grossissement x100.....	25
<b>Photo 06</b> : Résultat du test de catalase (test négatif).....	26
<b>Photo 07</b> : Type fermentaire des souches isolées ( <i>Leuconostoc</i> ) sur bouillon MRS.....	29
<b>Photo 08</b> : Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine) Le jaune: ADH-.....	30
<b>Photo 09</b> : Résultats de dégradation des sucres par les souches isolés.....	32
<b>Photo 10</b> : Résultat de l'Hydrolyse de l'esculine / Le noir : esculine +.....	33
<b>Photo 11</b> : Résultat de production dextrans sur milieu MSE des souches <b>C2</b> , <b>C15</b> .....	34
<b>Photo 12</b> : Résultats d'activité protéolytique des souches sur milieu PCA + 10% de Lait écrémé.....	35
<b>Photo 13</b> : Résultats négatives de l'activité lipolytique sur gélose MRS additionné au tween 80 et beurre.....	37
<b>Photo 14</b> : La révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition des colonies de couleur bleu sur gélose KMK des souches <b>F49</b> , <b>F55</b> , <b>V67</b> , <b>C34</b> .....	38

## Liste des abréviations

<b>ADH</b>	Arginine hydrolase
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BL</b>	Bactéries lactiques
<b>CitP</b>	Citrate perméase P
<b>EPS</b>	Exopolysaccharides
<b>G+C</b>	Guanine+Cytosine
<b>HoPS</b>	Homopolysaccharides
<b><i>Lc</i></b>	<i>Lactococcus</i>
<b><i>Ln</i></b>	<i>Leuconostoc</i>
<b><i>S</i></b>	<i>Streptococcus</i>
<b><i>sp</i></b>	espèce inconnue
<b><i>ssp</i></b>	sous-espèce

# **Introduction**

### Introduction

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments qui fortifient notre organisme, aussi il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (**Huyghebaert, 2006**). Bien que ces micro-organismes soient le principal facteur de dégradation du lait, ils sont utilisés dans sa transformation et sa conservation (**Hansal, 2015**).

Actuellement, les industries laitières sont en effet très concernées par l'utilisation des bactéries lactiques comme agent de transformation pour l'obtention du lait fermenté et la réduction des microflore d'altération et des flores pathogènes. Car la suppression de la microflore du lait cru par d'autres techniques telles que la microfiltration, la pasteurisation,... entraîne une diminution de goût et des différences dans les arômes des fromages (**Verdier et al., 2005 ; Bouton et Grappin, 1995**).

Parmi les bactéries lactiques utilisées dans les industries laitières, on peut citer le genre de *Leuconostoc* qui est très utilisé en technologie fromagère pour son aptitude à produire le CO<sub>2</sub>, l'acide acétique, l'acide lactique et les composés aromatiques. Aussi ils peuvent produire des nombreux composés de grande valeur tels que l'éthanol, les agents antimicrobiens (**Tropcheva et al., 2014**) et les nutraceutiques tels que les vitamines et les polyols (**Nuraida, 2015**).

La production d'acide lactique, qui provoque une diminution du pH, conserve plusieurs aliments en inhibant la prolifération de microorganismes indésirables. Cette acidité participe également à la formation de saveur et à la coagulation des caséines (principales protéines du lait), qui modifient la texture des produits tels que le fromage et d'autres laits fermentés (**Papagianni, 2012**). En outre, le dioxyde de carbone peut jouer lui-même un rôle pour la texture de certains de fromages et aussi un agent antimicrobien (**Saranraj et al., 2013**).

L'objectif de notre travail est d'isoler des *leuconostoc* indigènes dans les différents produits laitiers, et effectuer une étude technologique de ces souches afin de pouvoir les utiliser ultérieurement pour améliorer la fabrication des produits laitiers tels que les fromages.

**Chapitre I**  
**Généralité sur**  
*leuconostoc*

## 1. Bactéries lactiques

### 1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacille (**Badis et al., 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme, Elles possèdent catalase négative, nitrate réductase négative, oxydase négative (**Kassas, 2017**).

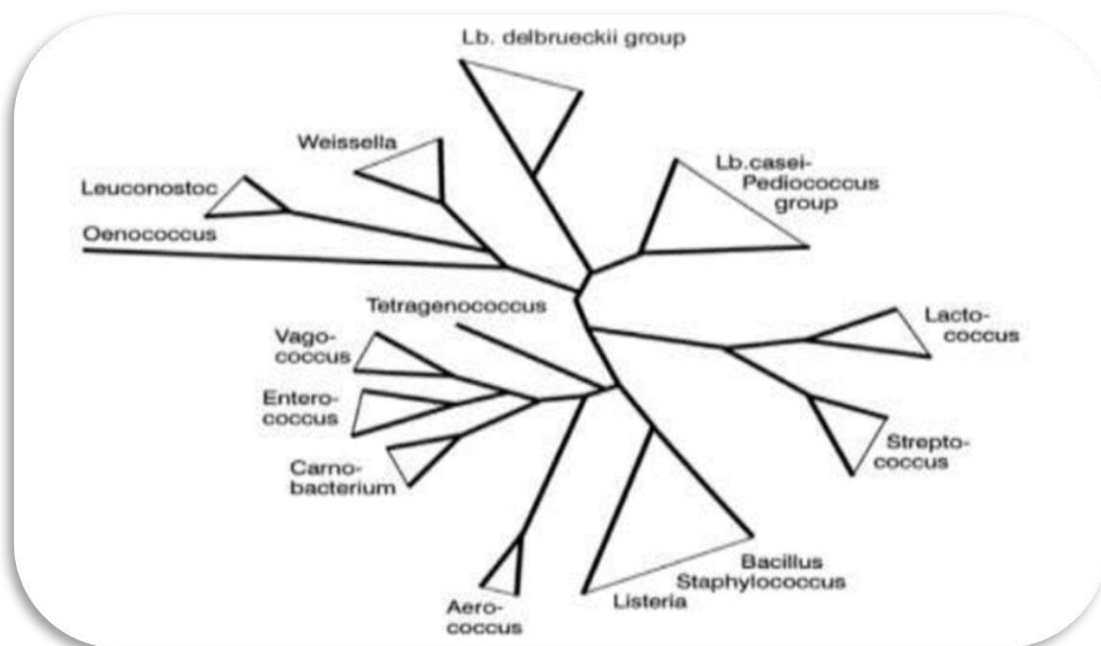
### 1.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples (**Hadef, 2012**). Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de 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**).

### 1.3. Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène et ceci non seulement de côté métabolique mais aussi de côté morphologique, d'habitat ..., cette propriété d'hétérogénéité confère à ce genre des bactéries une diversité permettant de dresser une taxonomie (**Hansal, 2015**).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla-Jensen** qui est basé sur plusieurs caractères (morphologiques, physiologiques et biochimiques) (**Belarbi, 2011**).



**Figure 01** : Schéma représentant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques  
(Axelsson, 2004)

#### 1.4. Intérêt technologique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans le domaine agroalimentaire, essentiellement dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences de croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de préservatifs chimiques (Berguiga et Khemis, 2014).

Leur utilisation par l'homme a été depuis longtemps, elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires: saumurage des légumes, boulangerie, saurissage des poissons, des viandes et des salaisons. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (Badel *et al.*, 2011).

Elles contribuent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans provoquer des altérations sur le goût ni l'odeur, et en augmentant la durée de conservation de ces aliments. Cette conservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyle et les bactériocines (Berguiga et Khemis, 2014). Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées dans les industries laitières et dans la



fermentation de nombreux produits alimentaires en a le genre *leuconostoc* (**Berguiga et Khemis, 2014**).

## 2. Genre *Leuconostoc*

### 2.1. Historique

*Leuconostoc* est un genre de bactéries lactiques. Ce terme scientifique *Leuconostoc* dérivé du mot grec **Nostoc** qui est une algue bleue mucilagineuse et de **leukos** qui veut dire blanc et claire (**Hansal, 2015**).

En **1878**, *Leuconostoc* a été défini pour la première fois par VAN THIEGHEM. Ces bactéries lactiques sont apparues à l'examen microscopique sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans des sucreries. Les *Leuconostocs* responsables de ces accidents produisent des dextrans en milieu saccharosé (ces chaînes sont entourées d'une gaine bien distincte qui rappelle celle des Nostocs) (**Brahimi, 2015**).

En **1912**, BEIJERINCK a isolé, à partir du beurre et d'autres produits laitiers, des microorganismes identiques aux *Leuconostocs* antérieurement décrits, ces microorganismes produisaient de la gomme à partir du saccharose et ils ont pris le nom de *Lactococcus dextranicus* (**Devoyod et Francoise, 1988**).

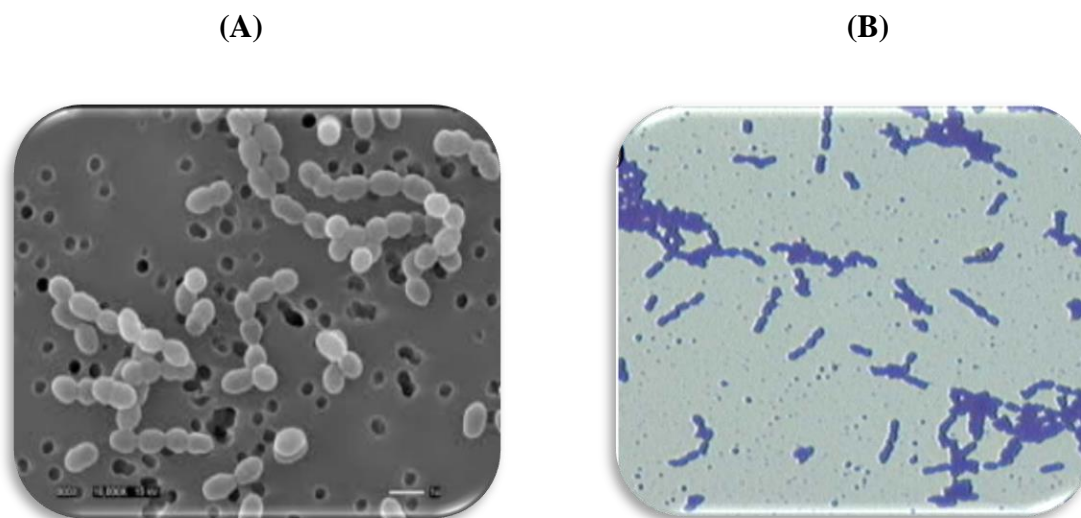
En **1918**, EVAN trouva que les *Leuconostoc* ont le caractère hétérofermentaire, donc ils sont capables de produire de CO<sub>2</sub> à partir du glucose, et celui-ci a été confirmé par HUCKER en **1928** (**Rahmani, 2014**).

En **1919**, ORLA-JENSEN, dans son étude sur les bactéries lactiques, a séparé le genre *Betacoccus* du genre Streptococcus. Et leur nom vient de la betterave (*Beta communis*) d'où ils ont été trouvés. ORLA-JENSEN ensuite a trouvé pour la première fois, d'après leur résultat, qu'il y a une relation entre les *Leuconostoc* produisant du dextrane (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs de l'acide lactique trouvé dans les produits laitiers. Le genre *betacoccus* a été séparé ensuite en deux espèces par ORLA-JENSEN, il y aura *B. arabinosaceus* et *B. bovis* d'après leur capacité de fermenter l'arabinose. (**Devoyod et Francoise, 1988**).

En **1920**, HAMMER, en étudiant les streptocoques des levains, a isolé deux espèces qu'il dénomma *Streptococcus citrovorus* et *S. paracitrovorus*, qu'ils sont reconnus comme responsables de l'arôme du beurre. Ces microorganismes furent, quelques années plus tard, assimilés au genre *Betacoccus* et *S. citrovorus* devint *B. cremoris*. (**Devoyod et Francoise, 1988**).

## 2.2. Définition

Les *leuconostocs* sont des bactéries lactiques à gram positive de la famille des *Leuconostocaceae*, de l'ordre des Lactobacillales. Ce sont des bactéries exigeantes en point de vue nutritionnelle et leur croissance est toujours lente, elles sont non pathogènes, immobiles, a sporulées, anaérobies facultative avec une forme ovoïde, associées en paires ou en chaînes courtes. (Brahimi, 2015 ; Hansal, 2015).



**Photo 01** : Image de leuconostoc :

(A) Observation de *leuconostoc* sous microscope optique \*100.

(B) Observation de *leuconostoc* sous microscope électronique.

<https://fermentationstations.wordpress.com/2016/12/01/leuconostoc-mesenteroides/>

## 2.3. Caractères culturaux des leuconostokes

### 2.3.1. Caractéristiques nutritionnelles

Les leuconostokes ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement, elle sont considérées comme un groupe bactérien le plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotes, phosphates et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments dont le rôle des coenzymes est plus important (Lenoire et al., 1992).

Ils sont exigeant du point de vue nutritionnel (acide aminé et vitamine), en particulier, les *leuconostocs* laitier nécessite pour leur développement les trois acides aminés branché et la glutamine (Hemme et foucaude-scheunemann, 2004), ainsi que les vitamines acide nicotinique, biotine, thiamine et acide pentothénique (Garvi, 1984).

Les *leuconostocs* laitier ont besoin de traces de manganèse pour avoir une croissance et une production de composé de flaveur correct, (**Vidamuthu, 1994**). Ainsi ils possèdent un métabolisme de l'O<sub>2</sub> qui leur permet de se développer plus vite, d'atteindre une biomasse plus importante et de réduire les quantités d'éthanol produites au profil de celle d'acétates (**Hemme et foucaude-scheunemann, 2004**).

### 2.3.2. Caractéristiques physicochimiques

*Leuconostocs* sont des bactéries mésophile, leurs température optimum de croissance est de 18- 30 C°, leur température minimale est de 5C ° et la maximale est de 40C° (**Rahmani, 2014**). Et leur Ph optimale de croissance ne se fait que à un ph voisin au celui du lait et ne se développent plus à un pH acide (**Chakou et Bessadik, 2018**).

### 2.3.3. Caractères biochimiques

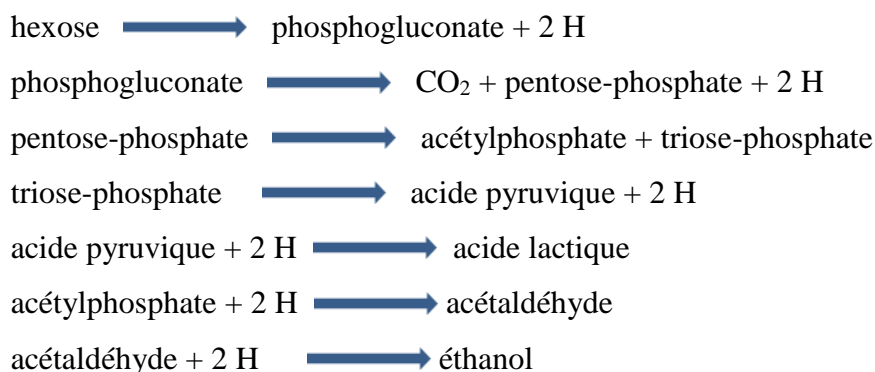
Permis ces caractères biochimiques les plus importants, nous pouvant citer: la fermentation des sucre, la fermentation de citrate, la production de dextrane et la production de substances inhibitrices (**Rahmani, 2014**).

#### 2.3.3.1. Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose (**Lees et Jago, 1976**). Trois voies principales existent pour la synthèse de l'acétaldéhyde à partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'Etner Doudoroff et la voie des hexoses monophosphates (**Devoyod et Françoise, 1988**).

Les *Leuconostocs* fermentent le glucose en utilisant cette troisième possibilité. (La voie des hexoses monophosphates.) Ils clivent le xylose-5-phosphate en acétylphosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate par action de la phosphocétolase (**figure 02**) (**Goldberg et al., 1966**).

Compte tenu des études effectuées sur *Ln. mesenteroides* ou *Ln. dextranicum*, il est possible de donner le schéma simplifié suivant de la fermentation des hexoses par les *Leuconostocs* :



Soit : hexose  $\longrightarrow$  CO<sub>2</sub> + éthanol + acide lactique (Devoyod et Françoise, 1988).

L'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de *Leuconostocs* par voie oxydative (Ito et al., 1983).

Selon LUCEY et CONDON (1986) les cultures aérées de *Leuconostocs* croissent plus vite et produisent plus de biomasse, aux dépens du glucose et d'autres sucres, que les cultures non aérées. Ces dernières ne produisent que peu ou pas d'acétate.

Dans la technologie des fromages à pâtes persillées, le CO<sub>2</sub>, produit par *Leuconostoc* provient de l'hétérofermentation du lactose, est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé, qui seront ensuite peuplées par le *Penicillium*. (Gérald et al., 2001).

Cependant, d'autres composés issus de l'hétérofermentation tels que l'acétate et l'éthanol contribuent à la texture et à la saveur de ces produits laitiers. (Gérald et al., 2001).

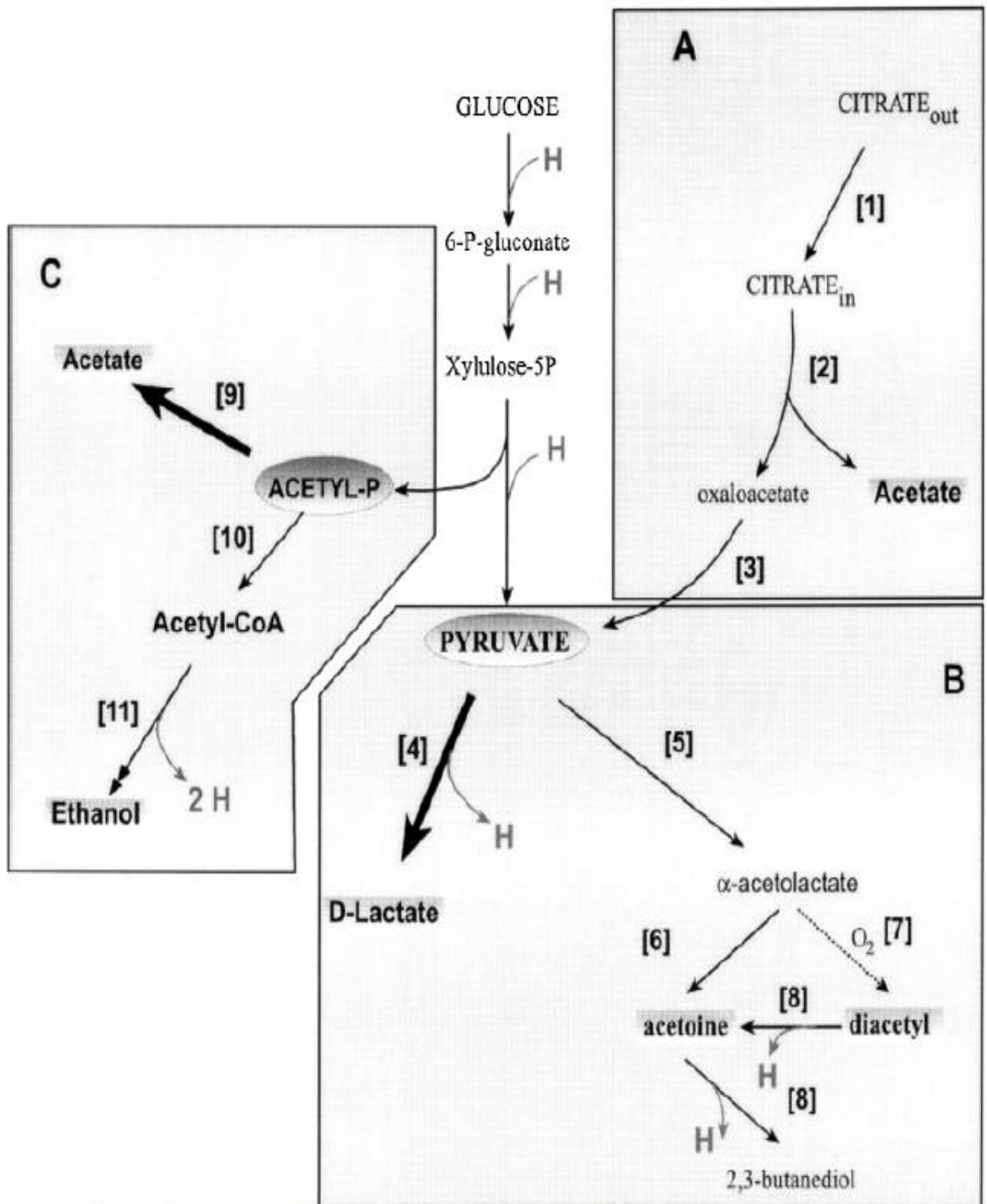
#### 2.3.3.2. Fermentation de citrate

L'acide lactique est utilisé par nombreuse espèces de genre *leuconostoc*, cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et une source d'azote. (Leuveau et bouix 1993).

Le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par un citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par un citrate lyase (Figure 02) (Gérald et al., 2001). L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO<sub>2</sub> par une oxaloacétate décarboxilase (Gérald et al., 2001).

Des transformations successives de pyruvate aboutissent à la formation de composés aromatiques qui est le diacétyle et le produit fini est de 2,3-butylen-glycol (2,3-butanediol) (Cogan ,1882).

Le diacétyle dont le citrate est le précurseur constitue le principal composé aromatique recherché dans les produits laitiers frais comme le beurre, le fromage frais et la crème fraîche (Gérald et al., 2001).



**Figure 02** : Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides*.

1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 α-acétolactate synthase, 6 α-acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase, 10 phosphotransacétylase, 11 alcool déshydrogénase (Gérald et al., 2001).

## 2.4. Caractères technologiques des leuconostokes

Les *Leuconostocs* représentent le troisième groupe important de bactéries lactiques puisqu'ils ont une grande importance et jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentations industrielles (Ogier *et al.*, 2008) comme celui des saucisses fermentées, des légumes et des produits fermentés à base de céréales et des produits laitiers (tels que le beurre, crème, lait frais et crus, fromages) (Guiraud, 2003).

### 2.4.1. Acidité

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 (Monnet *et al.*, 2008).

Le pH normal du lait est de 6,6. La plupart des micro-organismes du lait sont capables de fermenter le lactose en produisant une acidification qui entraîne la coagulation de la caséine. Cette coagulation se fait à partir d'un pH 4,6. Les fermentations microbiennes responsables de l'acidification sont de type homo ou hétérolactique (Guiraud, 2003).

*Ln. lactis* subsp. *lactis*, ssp. *cremoris* et biovar. *diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante. (Lafarge *et al.*, 2004).

Les *leuconostocs* produisent à partir de glucides de l'acide lactique de type (D), de CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et parfois même de l'acétate mais seule, l'espèce *Ln. lactis* qui est capable d'acidifier rapidement le lait, au contraire de l'espèce *Ln. mesenteroides* qui n'acidifie le lait que lentement. (Savado et Traore, 2011).

Grace à la production d'acides, les *leuconostocs* jouent un rôle primordial dans la fermentation des produits alimentaires, ainsi que dans leur conservation. Elles sont utilisées en tant que ferments. Au fur et à mesure du processus, la quantité d'acide lactique augmente, le milieu devient de plus en plus acide et le produit devient stable, ce qui permet une conservation prolongée de l'aliment (Abee *et al.*, 1995; Hugenholtz et Kleerebezem, 1999).

### 2.4.2. Production de substance aromatique

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyle sont les plus

importants (Tamime, 1990). Et son production est un caractère des *Leuconostocs*. (Cogan, 1975).

Les cultures pures de *Leuconostocs* utilisent le citrate très rapidement, par contre elles ne produisent du diacétyl et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu suffisamment acide. (Devoyod et francoise, 1988).

Les lactobacilles (*Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*) synthétisent de l'acétaldéhyde. La teneur en acétaldéhyde est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de la fermentation de citrate (Vignola, 2002). C'est pour cette raison, Les *Leuconostocs* hétérofermentaires sont souvent associés aux lactocoques dans la production de composants aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) (Mahaut et al., 2000).

Certaines espèces de leuconostoc utilisées dans l'industrie laitière sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol (Raynaud et al., 2003 ; Leroy et Devuyst, 2004).

#### 2.4.3. Activité lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les *leuconostocs* et sont moins importante que leurs activités protéolytiques. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008).

Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaires. Néanmoins, les voies métaboliques liées à la lipolyse génèrent des acides gras libres et des précurseurs d'arômes qui entrent dans la saveur globale des produits alimentaires (Bigret, 1994).

La lipolyse est largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés. L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acide gras libre des produits fermentés, réduisant de ce fait la durée de leur maturation mais sans en améliorer systématiquement leur saveur (Zalacain et al., 1996).

#### 2.4.4. Activité protéolytique

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique

dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (**Law et Haandrikman, 1997**).

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés, ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (**Roudj et al., 2009**).

#### **2.4.5. Production des dextrans**

Les dextrans fabriqués industriellement proviennent principalement des souches de espèces *Ln. mesenteroides* à l'aide des paramètres optimisés comme suit : un milieu de culture contenant une concentration adéquate de saccharose et de glucose, une source d'azote (par exemple peptone), du phosphate, des oligo-minéraux et des facteurs de croissance à pH 6,7 à 7,2 ; à une température de 25 °C à 30 °C, et pendant une durée de la fermentation entre 24 h et 48 h (**Naessens et al., 2005**).

Dans le procédé classique d'obtention du dextrane, après la fermentation, les cellules sont éliminées par centrifugation et le dextrane est récupéré par précipitation avec l'éthanol en éliminant ainsi les cellules et l'enzyme. Alternativement, des enzymes immobilisés peuvent être employées, comme cité précédemment, ce qui permet leur réutilisation et facilite le contrôle des conditions de production, étant la production la plus reproductible et propre. Toutefois, la stratégie d'immobilisation est le plus souvent utilisée pour la synthèse d'oligosaccharides que pour le dextrane (**Tanriseven et Doğan, 2002**).

#### **2.4.6. Production des substances antimicrobiennes**

La bioconservation est l'extension de la durée de conservation et de la sécurité des aliments en utilisant une microflore naturelle contrôlée et/ou leurs produits antimicrobiens. Parmi les substances microbiennes produites par les BL, on peut citer: l'acides lactique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide propionique, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, la réutérine et dioxyde de carbone et diverses substances inhibitrices - la plupart non identifiées - avec des activités antibactériennes et antifongiques (**Dortu et Thonart, 2009 ; Papagianni, 2012**).

Plusieurs études ont montré que les espèces appartenant au genre *Leuconostoc*, principalement *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides*, peuvent inhiber la croissance



de plusieurs bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, etc. vu leur capacité à produire les acides organiques, le diacétyle et les bactériocines comme dont la plus connue est **la mesenterocine Y105** produite par *Ln. mesenteroides* (Hollet et Liu, 2011).

### 2.5. Applications de genre *leuconostoc*

Les *Leuconostocs* ont un rôle central en plusieurs secteurs tel que l'industrie alimentaire, pharmaceutiques, l'agriculture, et la biotechnologie. Tandis que leur utilisation en industrie alimentaire constitue l'application majeure de ces bactéries (Kassas, 2017).

Les expolysaccharides produit par *Leuconostoc* ont un rôle d'agents épaississants, des stabilisants, des émulsifiants, des agents gélifiants et/ou viscosifiant dans l'industrie médicale, pharmaceutiques et même dans la fabrication des cosmétiques (Sanlibaba et Çakmak, 2016). Sa présence dans les aliments améliore les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers) dont ils ont plusieurs usages : contrôlent la viscosité et modifient le flux, améliorent la texture, sensation de bouche et la stabilité de congélation-décongélation, épaississants, agents de suspension, produits alimentaires de faibles calories, fibres alimentaires, films et agents de revêtement, glaçage des aliments congelés, et agents hydratants (Bajpai et al., 2015).

Les EPS peuvent également être utilisées comme source d'oligosaccharides et de monomères de sucre. (Patel et al., 2012).

Les *Leuconostocs* sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort par la production de CO<sup>2</sup>. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* (Devoyod et al., 1988).

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthode**

### 1. Lieu de stage

Ce travail a été effectué au niveau des laboratoires de microbiologie appliqué et de biochimie appliquée de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Kasdi Merbah Ouargla). Dans lesquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques sur les différentes souches de bactéries lactiques isolées à partir différent produits laitiers provenant de la région d'Ouargla, à fin d'étudier les caractères technologiques des souches *Leuconostoc* isolées de ces produits laitier. La dite expérience a été effectuée durant la période allant du 06 Février au 25 Avril 2019.

### 2. Echantillonnage

Des échantillons laitiers présentés dans le tableau (**annexe 03**), ont été prélevé dans des flacons stériles et transportés au laboratoire de microbiologie appliqué de l'université d'Ouargla ou ils sont subit des différents tests.

**Tableau 01** : Date et lieu d'échantillonnage des différents produits analysés

Echantillons :		Date de l'échantillonnage	Lieu de l'échantillonnage
Lait de chèvre	1	09/02/2019	Ouargla
	2	11/02/2019	EL BOUR 30km a Ouargla
	3	15/02/2019	Touggourt
Lait de vache		15/02/2019	Batna
Lait de chamelle	1	15/02/2019	Ouargla
	2	24/02/2019	Touggourt
Fromage traditionnel		24/02/2019	Ouargla
Dhane	1	23/02/2019	EL BOUR 30km a Ouargla
	2	23/02/2019	Touggourt

### 3. Milieu d'isolement

- Milieu MRS solide et liquide (**Man Rogosa et Sharpe, 1960**).
- Milieu MSE (**Mayeux, Sandine et Elliker, 1962**).
- Milieu KMK (**Kempler et Mc Kay, 1980**).
- Milieu M16. BCP (**Thomas, 1973**).
- Milieu MRS.BCP.
- Milieu PCA+ lait écrémé.
- Milieu MRS+ tween 80 et beurre.

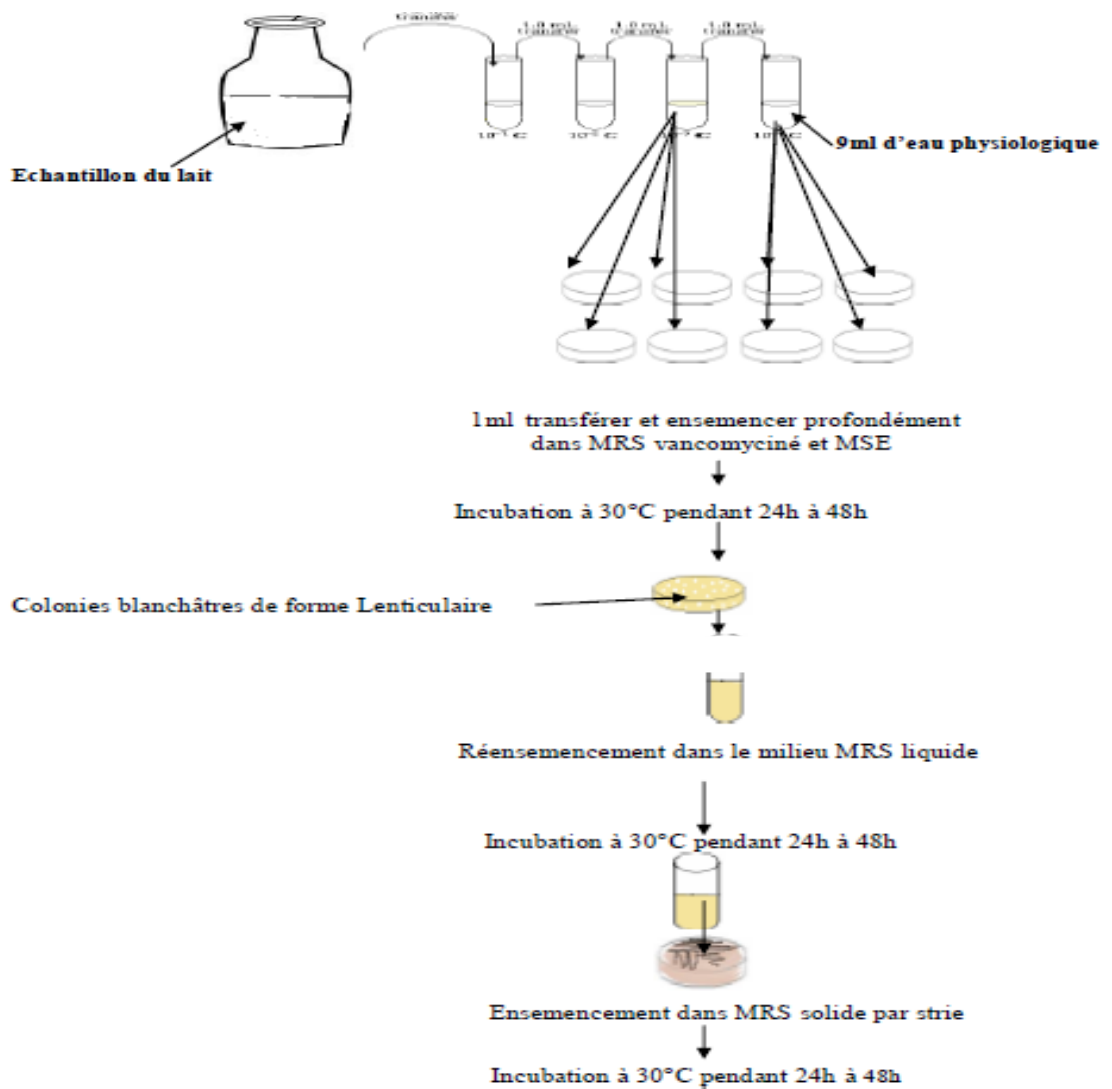
#### 4. Isolement des souches *Leuconostoc*

##### 4.1. Préparation d'échantillons

1ml d'échantillon est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologie peptoné et des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ , seuls les dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  sont retenus et ensemencés en profondeur dans une boîte de pétri (1ml) (Hansel, 2015).

##### 5. Purification

La purification des bactéries lactiques a été réalisée sur milieu MRS solide et liquide afin de s'assurer de la pureté de culture (figure 03) (Djoughri et Madani, 2012).



**Figure 03 :** Schéma représente l'isolement et la purification des isolats (Hansal, 2015 ; Brahimi, 2015).

## 6. Pré-identification des isolats : Tests phénotypiques

### 6.1. Examen Macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies ainsi l'aspect du trouble dans le milieu liquide (**Badis et al., 2005**).

### 6.2. Examen Microscopique (Coloration de Gram)

La coloration de gram est une coloration classique en microbiologie, elle permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries Gram<sup>+</sup> et les bactéries Gram<sup>-</sup>, celle-ci diffèrent par la composition de la paroi, notamment par l'épaisseur de peptidoglycane ou la présence d'une membrane externe (**Hansal, 2015**).

Aussi elle permet de différencier les bâtonnets et les coques et le mode de regroupement (**Djoughri et Madani, 2015**).

### 6.3. Test de catalase

Le test de la catalase permet de vérifier si une bactérie possède l'enzyme de la catalase ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O) ainsi qu'en oxygène (O<sub>2</sub>).



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase<sup>-</sup>) des autres bactéries (catalase<sup>+</sup>). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène sur une lame propre. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (**Marchal et al., 1991**).

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries Gram<sup>+</sup>. Les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques. (**Belarbi, 2011**).

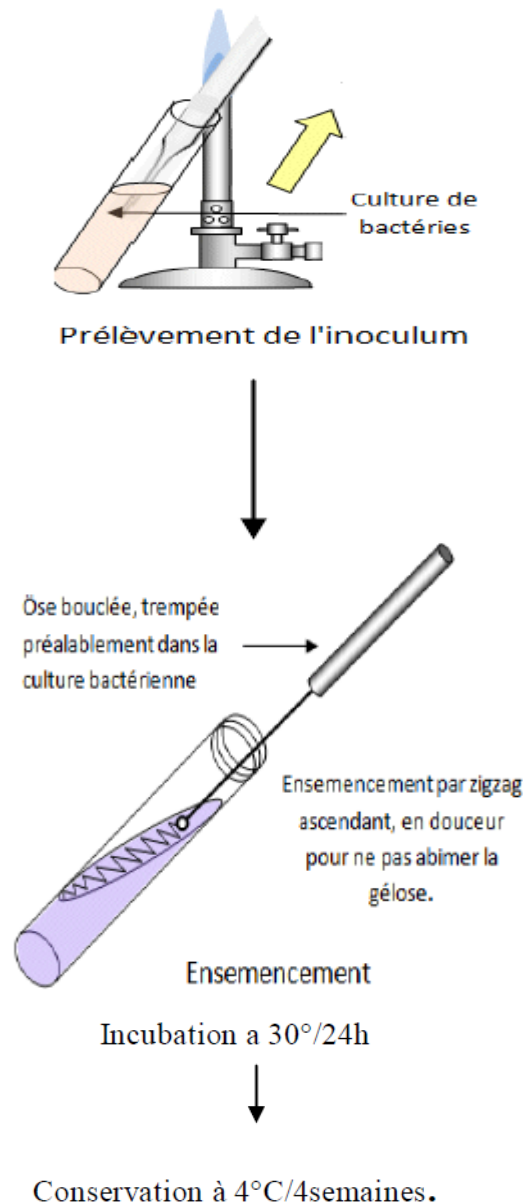
## 7. Conservation des souches

Tous les isolats suspects des bactéries lactiques (Gram positif et catalase négatif) sont conservés

Deux types de conservation de nos souches sont à noter. Une de courte durée et l'autre à longue durée.

### 7.1. Conservation de courte durée

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale 30°C, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines. (Badis *et al.*, 2005).

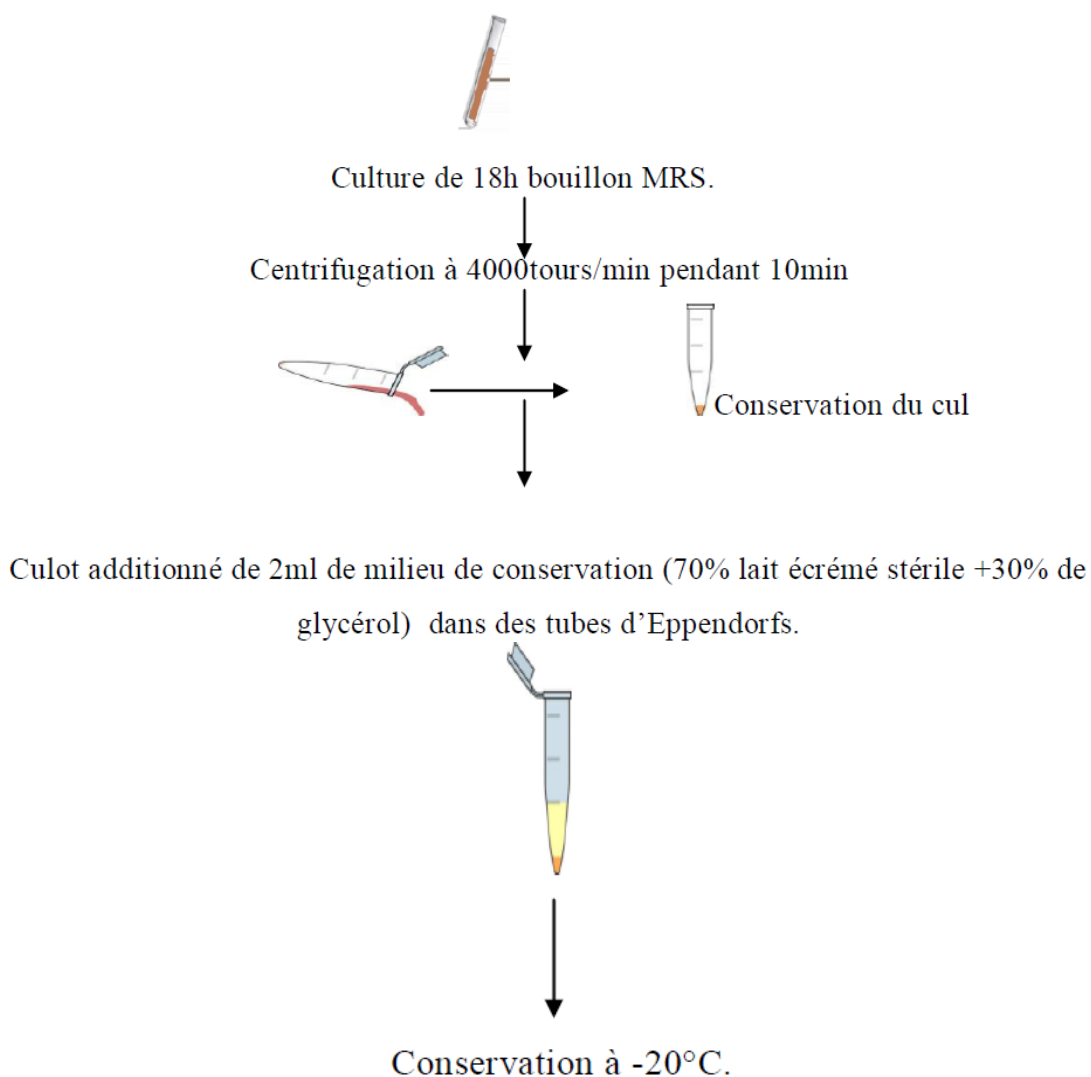


**Figure 04:** Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées (Hansal, 2005).

## 7.2. Conservation de longue durée

À partir de culture de 18h, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours par minute pendant 10 mn, ensuite un rinçage par l'eau distillé stérile a été fait avec une autre centrifugation. Une fois le surnageant a éliminé, en ajoute le milieu de conservation sur le culot (**Brahimi, 2015**).

Le milieu de conservation contient 03 ml de glycérol avec 07 ml de bouillon MRS, cette conservation a été effectuée en tubes eppendorf à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ . (**Badis et al., 2005**).



**Figure 05:** Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (**Badis et al., 2005**).

## 8. Tests physiologique

### 8.1. Croissance à différentes températures

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS liquide après un ensemencement des souches pure et incubation pendant 5 jours a 4°C, 10°C, 37°C et 42°C (**Guessas et kihal, 2004**).

### 8.2. Thermorésistant

La thermorésistantes des bactéries a été testé au bain marie a 63°C pendant 30minute puis incubé a 30°C pendant 24h-48h (**Guiraud, 1998**).

Ces 2 tests vont nous aider a distingué les souches mésophile et thermophile, ainsi que les thermorésistantes (**Hansal, 2015**).

### 8.3. Croissance à différentes concentration de NaCl

La croissance des isolats purs en présence de différentes concentrations de NaCl, à savoir (3% NaCl, 6.5% NaCl) ont été ensemencé puis incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble (**Ghozlane, 2012**).

### 8.4. Croissance à différents PH

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 24h à 30°C), la croissance des souches ont été testé à différents PH (pH 4.8 / pH 6.8 / pH 9.6) et incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours (**Guiraud, 1998**).

La croissance se manifeste par un trouble en milieu liquide MRS (**Guiraud, 1998**).

## 9. Tests biochimique

### 9.1. Recherche de type fermentaire

L'objectif de ce test est de connaitre le type de métabolisme (hétérofermentaire ou homofermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, aussi pour savoir la production du gaz à cause d'une dégradation du glucose (**Hansal, 2015**).

Dans un tube contenant le bouillon MRS et avec une cloche de Durham qui sont inoculé avec la souche a étudié pour mettre en évidence la production de CO<sub>2</sub> et savoir le type fermentaire. Après l'incubation à 30°C pendant 24h, l'apparition du gaz dans la cloche montre que le métabolisme est hétérofermentaire (**Hariri et al., 2009**). Alors que leur absence indique les bactéries homofermentaires.



## 9.2. Hydrolyse de l'arginine (ADH)

Arginine dihydrolase (ADH) est une enzyme capable de dégradé l'arginine en ammoniac et l'identification des souches qui ont cet enzyme se fait sur milieu M16.BCP qui est un milieu d'étude des métabolismes protidiques (**Thomas, 1973**).

Il existe des bactéries lactiques pouvant acidifiées le milieu en utilisant le lactose et elles apparaissent sous forme des colonies jaunâtres et n'ont pas la capacité de dégrader l'arginine, par contre d'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine ce qui rend le milieu alcalinisé et par conséquent en obtient un changement de la couleur de milieu du jaune au violet qui est la couleur initiale de milieu (**Thomas, 1973**).

Cette technique a été réalisé par un ensemencement à partir des cultures jeunes sur gélose M16.BCP, puis incubation à 30°C pendant 48h (**Hansal, 2015**).

## 9.3. Tests de dégradation de sucres

La vérification de la capacité de dégradation des sucres de ces souches isolées a été effectuée sur bouillon MRS dépourvu d'extrait de viande et sans sucre additionné au pourpre de bromocrisol à 0,05g/l (BCP) comme indicateur de pH (**Badis et al., 2005**).

Les sucres utilisés dans ce test sont les suivants: Mannose, Xylose, Arabinose, Lactose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galactose, Glucose, Mannitol. Des solutions sucrés ont été préparer de 01g de chaque sucre avec 10 ml de l'eau distillé stérile, le tout a été homogénéisé puis stérilisé à 100°C pendant 15 min au bain marie (**Chakou et Bessedik, 2018**).

Une culture bactérienne de 18h est centrifugée à 4000 tour par minutes pendant 10 min, suivi par 2 rinçages de culot à l'eau distillé stérile (**Samelis et al., 1994**) pour débarrasser le reste de milieu de culture et obtenu un culot cellulaire pur (**Guessas, 2007**) et après, 01 ml de bouillon MRS.BCP a été ajouté sur le culot récupéré de dernière centrifugation et bien homogénéisé (**Hansal, 2015**).

Vu le nombre important des souches étudiées, des plaque d'Elisa en été utilisées. Chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différentes souches (**Brahimi, 2015**).

Chaque puits contient 200 µl de MRS.BCP avec 100µl de solution sucré et 100µl de suspension bactérienne, le tout a été recouvrir par une couche de huile de paraffine pour crée les conditions d'anaérobiose (**Chakou et Bessedik, 2018**).

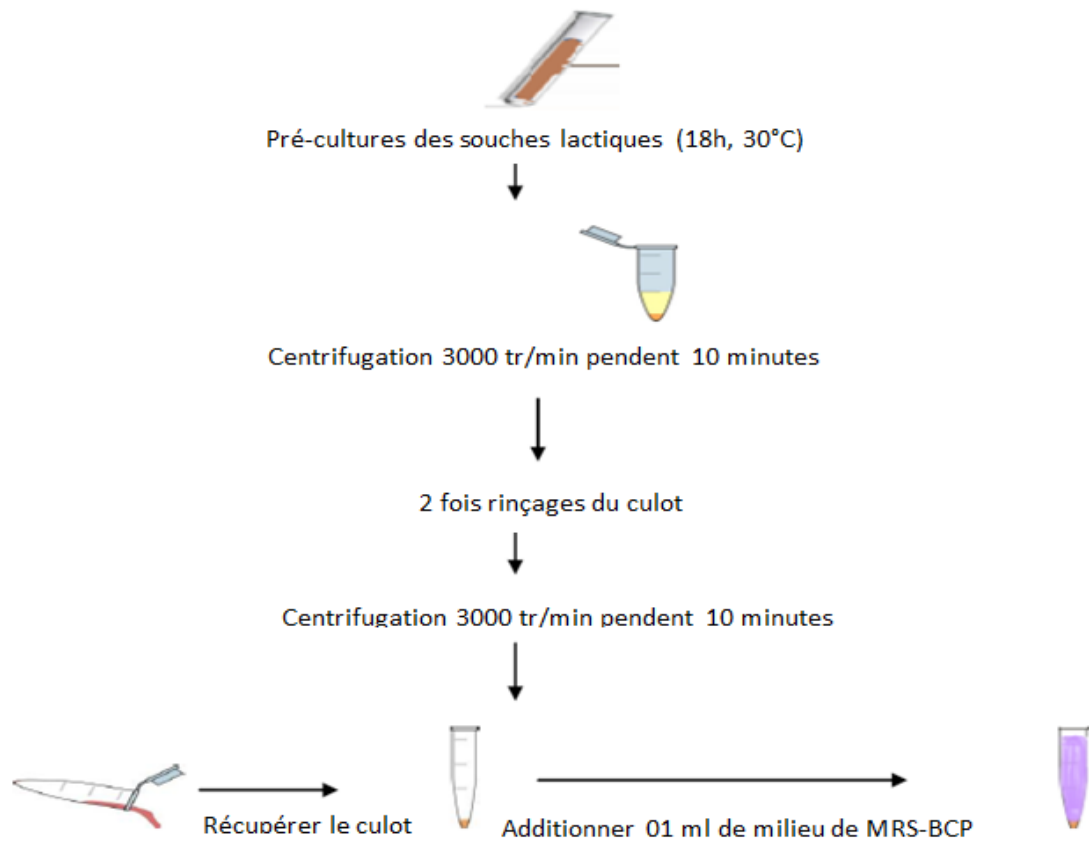
Les microplaquettes ont été incubées à 30°C pendant 72h et vérifiées chaque 24h (Guessas, 2006) (Figure 06).

#### 9.4. Hydrolyse de l'esculine

L'esculine est un hétéroside (molécule composée d'un ose associé à une structure non osidique). L'hydrolyse de l'esculine se fait par l'enzyme d'esculinase, est un des critères usuels utilisés dans l'identification différentielle au sein de nombreux genres bactériens (Guiraud, 1998).

Les produits de dégradation de l'esculine sont le glucose et l'esculénite formé peut réagir avec les ions de fer pour donner un précipité noir dans le milieu situé autour des colonies (Hansal, 2015).

On prélève une goutte d'un tube incubé pendant 24h et on l'ensemencé sur gélose à l'esculine, l'incubation de ces boîtes va de 2 à 5 jours à 30°C (Lelliott et Stead 1987).

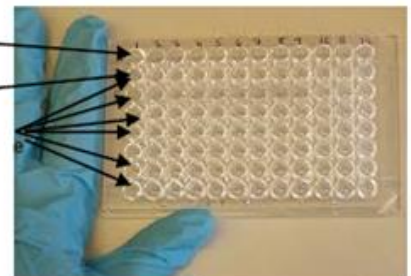
**1ere Etape :****2eme Etape :**

- Préparer milieu MRS BCP (100  $\mu$ l pour chaque puits)
- Préparer les solutions des sucres (10  $\mu$ l pour chaque puits)
- Préparer les solutions Bactérienne (10  $\mu$ l pour chaque puits)

100  $\mu$ l de MRS BCP

100  $\mu$ l de MRS BCP +10  $\mu$ l solutions sucrés

100  $\mu$ l de MRS BCP +10  $\mu$ l solutions sucrés + 10  $\mu$ l de solutions bactérienne



**Figure 06 :** Schéma représente le test de fermentation des sucres.  
(Blarbi, 2011 ; Hansal, 2015).

## 10. Tests technologiques

### 10.1. Production des exopolysaccharides (dextrane)

Les exopolysaccharides (dextrane) sont des substances d'intérêt technologique et pharmaceutique joue un rôle très important en industrie Agroalimentaire (**Mayeux et al., 1962**).

La production dextrane (EPS) est mise en évidence sur milieu solide MSE gélosé et saccharosé. Les souches isolats à tester ont étéensemencées en stries sur la gélose, et incubées à 30°C pendant 24h à48h. Les souches productrices sont caractérisées par l'apparition de colonies larges, visqueuses et gluantes (**Bauer et al., 2009**).

### 10.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les bactéries lactiques peuvent acquérir tous les besoins en acides aminés par l'hydrolyse des protéines présentant dans le lait et ceci grâce à une fermentation reposant sur un système protéolytique (**Zergoune, 2015**).

Cette activité est mise en évidence sur milieu PCA additionné à 1%, 2% et 10% de lait écrémé (0% de matières gras) pour 100 ml de milieu liquéfié (**Zarour, 2018**).

Les bactéries à tester, issues des cultures jeunes, ont étéensemencées par touche à la surface de gélose. Après séchage, fait l'incubation à 30 °C pendant 48 h, l'activité protéolytique de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (**Sonar et Halami, 2014**).

### 10.3. Mise en évidence de l'activité lipolytique

L'activité lipolytique a été recherchée sur milieu MRS additionné au 2% Tween 80 et 2% beurre à part comme substrat lipidique (**Sierra, 1957**). Après la stérilisation de Tween 80 et beurre pendant 30 min à 100°C au bain marie, ensuite, dans un flacon 02 ml de Tween 80 a été additionnée au 100 ml du milieu liquéfié et dans un autre flacon 02 g de beurre a été ajouté sur 100 ml du milieu, les souches à tester ont étéensemencées par touches à la surface de milieu gélosé et incubées à 30°C pendant 24h à48h.

L'activité lipolytique de ces souches se manifeste par une clarification des touches (**Hansal, 2015**).

#### 10.4. Production des substances aromatiques

La production des substances aromatiques est une propriété spécifique aux bactéries lactiques dont laquelle le lactose, le citrate, les acides aminés ou les matières grasses sont utilisés comme substrat. Cette capacité de produire l'arôme est très importante lors de la fermentation des laits ou l'élaboration des fromages frais, crèmes et beurre (Dhouib, 2017).

L'étude de ce caractère a été réalisée sur milieu Kempler et Mc Kay (KMK) (Kempler *et al.*, 1980), additionné 1 ml de la solution de ferricyanide de potassium et 2.5 ml de la solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide ; L'ensemencement des isolats est effectué par stries sur la surface de gélose et incubé à 30°C durant 24h. Les souches productrices sont caractérisées par la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu (Drici *et al.*, 2010).

# **Chapitre III**

## **Résultats et**

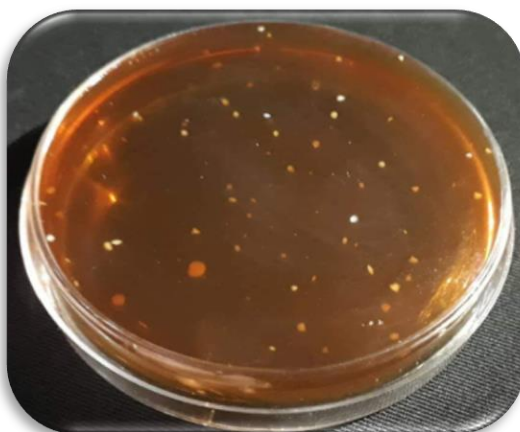
### **discussion**

## 1. Isolement et purification

### 1.1. Isolement

Pour sélectionner les souches *Leuconostoc*, on a réalisé un isolement sur MRSv ; après l'incubation que les bactéries résistants à la vancomycine vont résister.

On a remarqué l'apparition des différentes colonies de petite taille (leur diamètre d'environ 1mm à 2mm), blanchâtre, ronde ou lenticulaire et opaque. On a prélevé que les formes lenticulaires et blanchâtres (**Photo 02**).

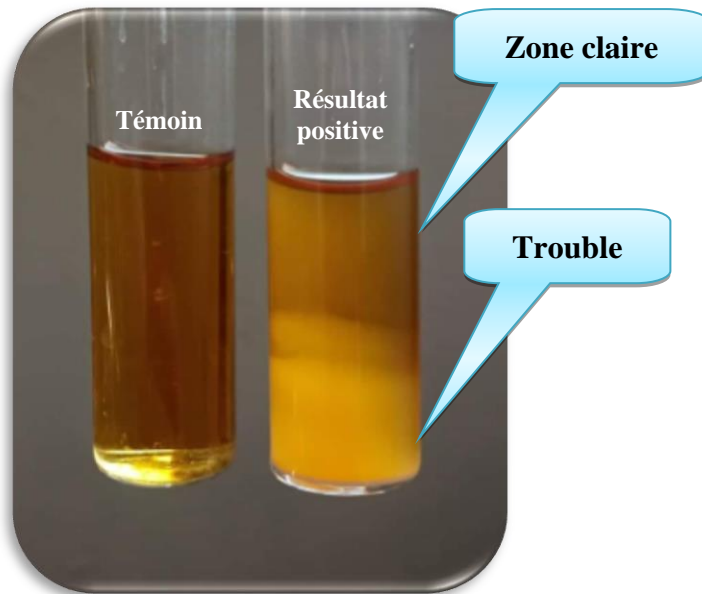


**Photo 02 :** Aspect macroscopique des cultures bactériennes des souches de *Leuconostoc* ensemencées en profondeur sur milieu MRS.V

### 1.2. Purification

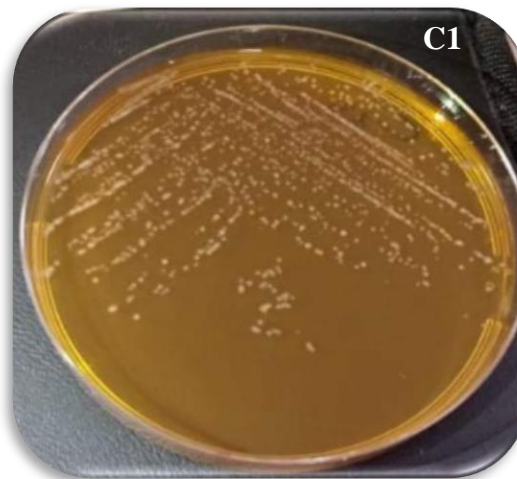
Afin de s'assurer de la pureté des souches recherchés (*Leuconostoc*), des repiquages successives ont été réalisés sur milieu MRS liquide et solide jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et identiques.

- **Sur milieu MRS liquide:** après 24h d'incubation, la croissance sur milieu MRS liquide se traduit par la présence d'un trouble concentré au fond de tube grâce à la recherche des conditions d'anaérobique de ces bactéries avec la présence d'une zone claire qui est surmonté à la surface de milieu liquide(**Photo 03**).



**Photo 03 :** Aspect des souches pures des *Leuconostoc* sur bouillon MRS.

- **Sur milieu MRS solide :** après 24h d'incubation, l'aspect macroscopique des colonies des souches leuconostocpurifiées sur milieu MRS solide se traduit par l'homogénéité des colonies qui sont de petites tailles, rondes, lenticulaires et de couleur blanchâtre(**Photo 04**).



**Photo 04 :** Aspect des souches pures des *Leuconostoc* sur milieu MRS solide.

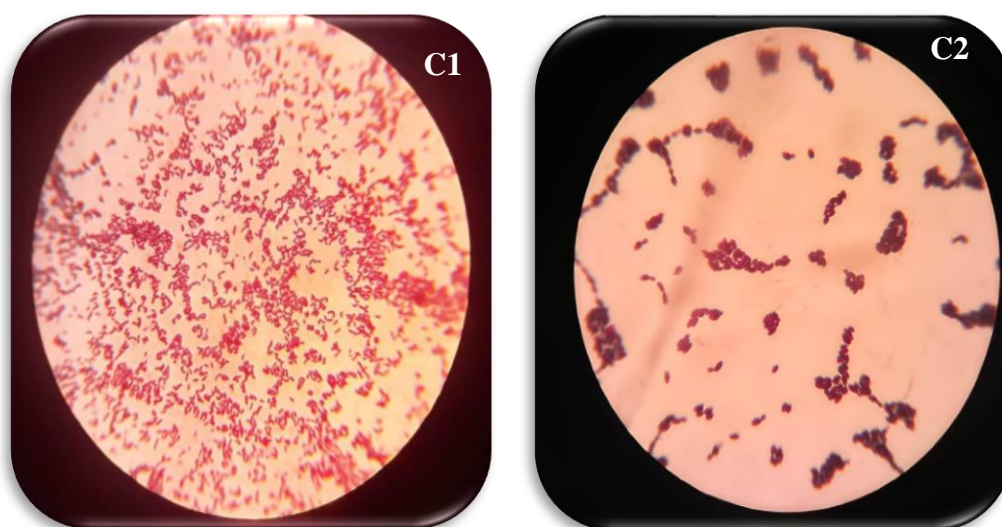


## 2. Pré-identification

### 2.1. Coloration de Gram

L'aspect microscopique après une coloration de Gram a révélé que la plupart des cellules se présentent sous forme de cocci à l'exception de quelques souches de forme bacille.

Dans notre étude, on a éliminé toutes les espèces apparaissent comme Gram négative et les forme de bacille ; et comme une pré-identification en garde juste les souches apparaissent comme gram positive sous forme ovoïde ou coccobacille avec des structures en paire ou en chaînette (**Photo 05**).



**Photo 05** : Observations microscopiques des souches **C1**, **C2** (*Ln. mesentroides* subsp. *mesentroides*) de bactéries lactiques après une coloration de Gram à grossissement **x100**.

### 2.2. Test de recherche de la catalase

La recherche de la catalase se fait par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10V. Le dégagement gazeux traduit l'activité positive de cette enzyme (**Marchal et al., 2001**).

Dans notre étude, on a éliminé toutes les souches catalase positives et on a gardé juste Les souches qui ont un catalase négative car selon les résultats trouvés par (**Carr et al., 2002**) après le dépôt de l'eau oxygénée sur les colonies des bactéries lactique, on n'a pas le dégagement des bulles d'air (**Carr et al., 2002**).



**Photo 06** : Résultat du test de catalase (test négatif)

### 3. caractéristiques physiologiques et biochimiques

Tous les isolas présentent une activité catalasique négative, capables de produire du gaz a partie du glucose (Hétérofermentaire), incapable de dégrader l'arginine (ADH-);ces isolas sont considérés du genre de *leuconostoc*(garvie, 1984 ; Badis et al., 2005 ;Ogier et al., 2008 ; Ghazi et al., 2009).

On a pu sélectionner 14 souches de ce genre comme souches pures isolées de lait cru de chèvres codées par (C1, C2, C10, C12, C13, C15, C16, C18, C21, C23, C34, C39, C41, C43) et une souche isolée de lait cru de vache (V 67) et 08 souches isolés de fromage traditionnel codé comme suit (F49, F55, F63, F64, F65 ,F69, F70, F71).

#### 3.1. Tests physiologiques

Les résultats des tests physiologiques (Croissance à différentes températures et Ph et tests de Résistance à la salinité) réalisé sur les souches de *leuconostoc* isolés, sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 02 :** Tableau représentant les résultats des tests physiologiques S : souche / C : chèvre / F : fromage traditionnel / V : vache

Souches	Croissance à différentes T°					Thermostat	Croissance à différentes [NaCl] (%)		Croissance à différents pH		
	4°C	10°C	37°C	42°C	63°C		3%	6.5%	4.8	6.8	9.6
<b>C1</b>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
<b>C2</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
<b>C10</b>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
<b>C12</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<b>C13</b>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
<b>C15</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
<b>C16</b>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
<b>C18</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<b>C21</b>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
<b>C23</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
<b>C34</b>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
<b>C39</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<b>C41</b>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	
<b>C43</b>	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	
<b>F49</b>	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	
<b>F55</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<b>F63</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<b>F64</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
<b>F65</b>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
<b>F69</b>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
<b>F70</b>	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
<b>F71</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	
<b>V67</b>	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	

### 3.1.1. Croissance à différentes températures

Dans la majorité des souches qui ont été testées, il existe une croissance sous une température de 10°C et de 37°C ceci montre que ces bactéries sont des bactéries mésophiles. Par contre il existe un nombre négligeable des souches qui ont poussé sous la température 4°C et 42°C (**Tableau 02**).

### 3.1.2. Thermorésistant

Il y a aucune souche qui a été poussée à 63°C. Donc on peut dire qu'il n'y avait pas des bactéries thermorésistantes dans nos souches (**Tableau 02**).

Nos résultats semblent à ceux trouvés par **Garvie (1984)** et **Dellaglio et al., (1994)** les *leuconostocs* sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 -30°C.

### 3.1.3. Croissance à différents concentrations de NaCl

Toutes les souches qui ont été testées pour savoir leur résistance aux différentes concentrations de sel ont été résistées à 03% de NaCl mais la majorité de ces souches n'ont pas été poussées à 6.5%. (**Tableau 02**).

### 3.1.4. Croissance à différents pH

Toutes les souches qui ont été testées pour savoir leur résistance aux différents PH ont été poussées à ph 6.8. Par contre il existe un nombre négligeable des souches qui ont poussé à ph 4.8 et ph 9.6. (**Tableau 02**) ce qui a confirmé aux résultats de **Mc Donald et al., (1990)** qui a montré que les *leuconostoc* laitiers se développent le mieux à un PH proche à celui de lait et sont inhibés en milieu acide.

## 3.2. Tests biochimiques

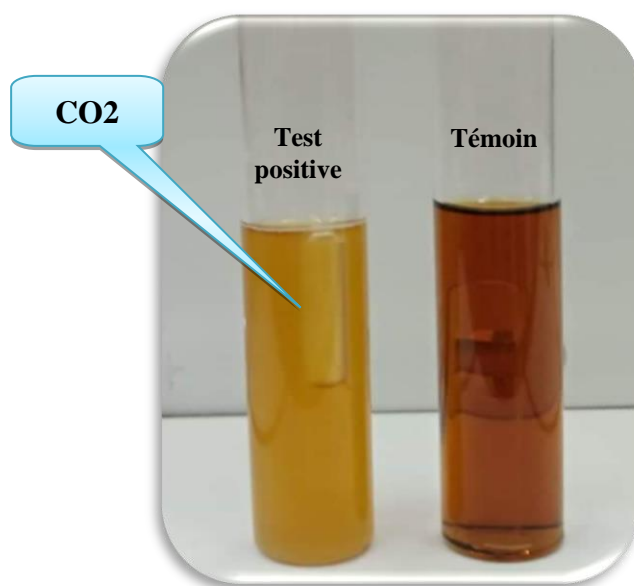
### 3.2.1. Recherche de type fermentaire

Dans des tubes à essais, munis de cloches de Durham et contenant le milieu MRS liquide, on aensemencé les souches à tester, pour différencier entre les souches homolactiques et hétérolactiques. Les souches hétérofermentaires vont produire, en plus de l'acide lactique, l'acide acétique et le CO<sub>2</sub>. La production de gaz se manifeste par le flottement de la cloche. (**Kheddid et al., 2009**). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 03**.

Hétérofermentaire est un caractère spécifique pour les *leuconostoc* (**Mathos et al., 1994**).

Ces microorganismes sont dépourvus d'un fructose -1,6 bisphosphate (FBA) et d'un triose phosphate isomérase (TPI), ainsi que d'un système PTS fonctionnel. Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis

subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase (GLK) ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentose-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Ce dernier est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par le **D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase**, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire. Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le GAP qui rejoint la glycolyse est métabolisé en acide lactique (**Boumediene, 2013**). **Figure 07 (annexe 04)**.



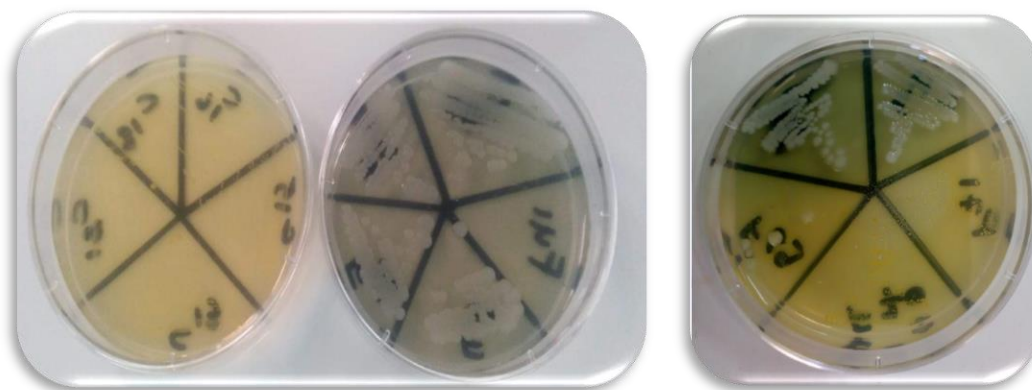
**Photo 07** : Type fermentaire des souches isolées (*Leuconostoc*) sur bouillon MRS.

### 3.2.2. Hydrolyse de l'arginine (ADH)

La production de l'acide lactique acidifie le milieu de culture (M16 BCP), qui contient un indicateur de pH, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune. Les bactéries possédant l'ADH vont realcalinisé le milieu et sa couleur reviendra mauve, les souches qui ne possèdent pas cette enzyme leur milieu va rester jaune. (**Kheddid et al., 2006**).

Après 48h d'incubation sur gélose M16.BCP à 30°C, on a observé l'apparition d'une coloration jaune, dans quelque souches, à cause de l'acidification du milieu donc ces souches n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine (ADH-)

Dans notre étude, seule les souches qui n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine ont été gardés parce que les *Leuconostoc* sont ADH-. Les résultats sont résumés dans le (**Tableau 03**)



**Photo 08 :** Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine)  
Le jaune: ADH+.

**Tableau 03 :** Les caractères biochimiques et morphologiques des isolats.

Souches	Catalase	Gram	ADH	Production de CO <sub>2</sub>
C1	-	+	-	+
C2	-	+	-	+
C10	-	+	-	+
C12	-	+	-	+
C13	-	+	-	+
C15	-	+	-	+
C16	-	+	-	+
C18	-	+	-	+
C21	-	+	-	+
C23	-	+	-	+
C34	-	+	-	+
C39	-	+	-	+
C41	-	+	-	+
C43	-	+	-	+
C49	-	+	-	+
F55	-	+	-	+
F63	-	+	-	+
F64	-	+	-	+
F65	-	+	-	+
F69	-	+	-	+
F70	-	+	-	+
F71	-	+	-	+
V67	-	+	-	+

### 3.2.3. Test de dégradation des sucres

L'identification de l'espèce bactérienne des souches isolées a été réalisée par l'étude du profil de dégradation de 10 sucres (Mannose, Xylose, Arabinose, Manitol, Lactose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galactose, Glucose) sur milieu MRS-BCP sans extrait de viande et dépourvu du sucre et contient un indicateur de PH(Badis et al., 2005).

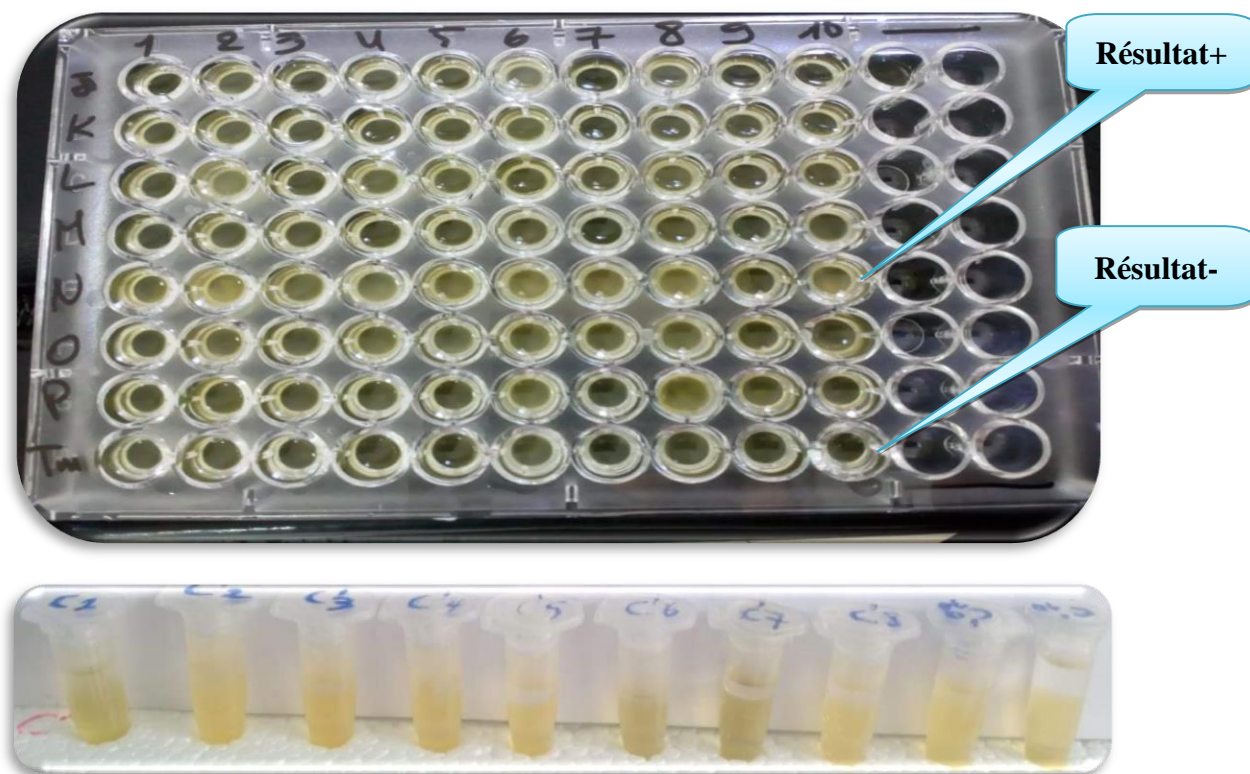
Le résultat positif révèle par la dégradation de sucre qui provoque une acidification de milieu, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune(Hansal, 2015).

Les résultats obtenus montrent la présence de virage de couleur de milieu vers le jaune sauf quelques exceptions. Donc les souches qui ont été isolées ont la capacité de se développer à partir différents source de carbone. Les résultats obtenus sont résumés dans le (Tableau 04).

**Tableau 04:** Le profil de dégradation des sucres par les souches de *Leuconostocs*.

	ARA	GLU	GAL	LAC	FRU	SAC	MNT	MAL	XYL	MAN	ESC
C1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C10	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
C12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
C15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
C16	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
C18	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
C21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
C23	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
C34	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C39	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
C41	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
C43	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
F49	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
F55	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
F63	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
F64	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
F65	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
F69	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
F70	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
F71	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
V67	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

MAN :Mannose, XYL :Xylose, ARA :Arabinose, LAC :Lactose, MAL :Maltose,  
FRU :Fructose, SAC :Saccharose, GAL :Galactose, GLU :Glucose,  
MNT :Mannitol,ESC :Esculine



**Photo 09** : Résultats de dégradation des sucres par les souches isolés

#### 3.2.4. Hydrolyse de l'esculine

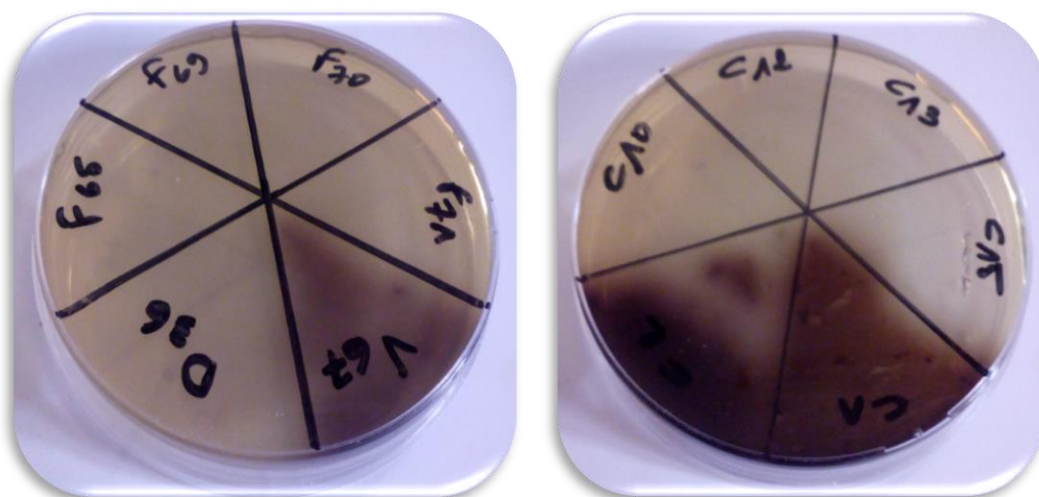
Les résultats obtenus montrent que quelques souches (C1, C2, C10, C16, C18, C23, C41, C43, V67) sont capables de dégrader l'esculine par contre les autres souches sont incapables de le dégrader. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 04.

Après 5 jours d'incubation sur gélose MRS d'esculine à 30°C, on a observé l'apparition d'un précipité noir dans le milieu situé autour des colonies.

Ce précipité est le résultat de la réaction formée entre les ions de fer qui sont dans le milieu et l'esculinite qui est le résultat de la dégradation de l'esculine par l'enzyme d'esculinase. (Guiraud, 1998).

Donc le précipité noir est un indice pour la dégradation de l'esculine par la bactérie et ce caractère est un des critères usuels utilisés dans l'identification différentielle au sein de nombreux genres bactériens (Guiraud, 1998).





**Photo 10** : Résultat de l'Hydrolyse de l'esculine / le noir : esculine +

#### 4. Tests technologiques

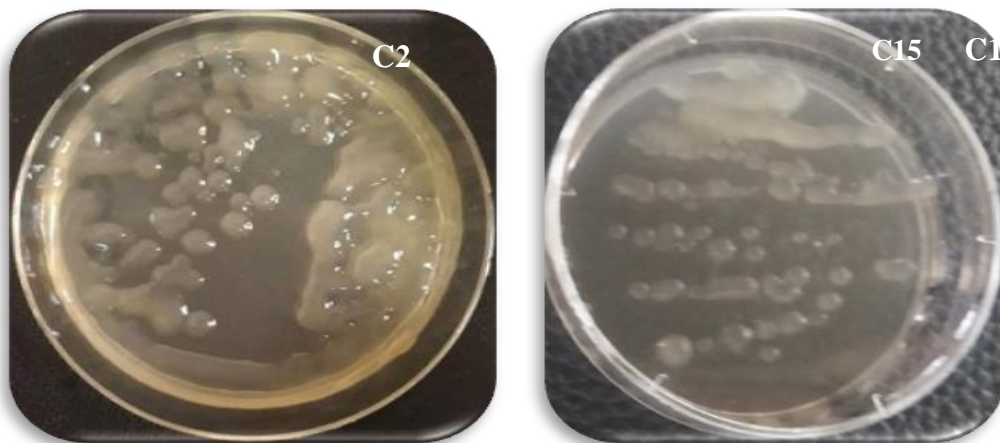
##### 4.1. Production des exopolysaccharides (dextranes)

L'incorporation de dextrane dans les produits de boulangeries en industrie alimentaire améliore la texture et le volume de pain et il est aussi utilisé comme un additif dans des plusieurs produits (**Vettori et al., 2012**).

La production des exopolysaccharides a été testée sur milieu MSE qui est milieu hypersacchorsé. Les bactéries capables de dégrader le saccharose pour produire les exopolysaccharides à l'extérieur de la cellule se traduit par l'apparition des colonies avec un aspect gélatineux (**Ghazi et al., 2009**), dans une réaction catalysée par les enzymes spécifiques, les glucane-saccharases comme les dextrane-sacarases, les alternane-saccharases ou les fructane-saccharases comme levane-saccharases. En utilisant le saccharose comme substrat et générant dans chaque réaction comme produit de son hydrolyse: une molécule de fructose, qui peut être utilisée comme source de carbone par certaines bactéries (**Barrière et al., 2005**), pour substrat transitoire pour la production de mannitol (**Wisselink et al., 2002**) et il est utilisé pour former l'HoPS type levane (**Han et al., 2016**) et une molécule de glucose, ce qui peut être utilisé pour l'allongement des molécules de dextrane ou pour la glycolyse (**Han et al., 2016**).

Après 24h d'incubation on a remarqué que 20 souches ont le pouvoir de produire le dextrane, ce caractère qui a été absent chez les trois souches (C21, C39, C43) isolées de lait de chèvre, l'absence de ce caractère chez ces souches dû par la production d'ESP est associé aux plasmides et qu'ils sont facilement perdus dans la culture (**Cogan et al., 1999**). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 06**, (**Photo 11**).

Ceci rend ce genre très utilisable dans l'industrie grâce à ces propriétés technologiques (épaississantes, stabilisantes et émulsifiantes) aussi l'amélioration des caractères organoleptique des produits fermentés.(Werning *et al.*, 2012).



**Photo 11** :Résultat de production dextrane sur milieu MSE des souches **C2**, **C15**(*Ln. mesentroidessubsp. mesentroides*).

#### 4.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait (Maghnia,2011). La protéolyse de caséine provoque le changement de goût et de la texture final des aliments ceci liée à la lyse de certaines cellules qui libèrent les enzymes protéolytiques internes (Alegria *et al.*, 2013).

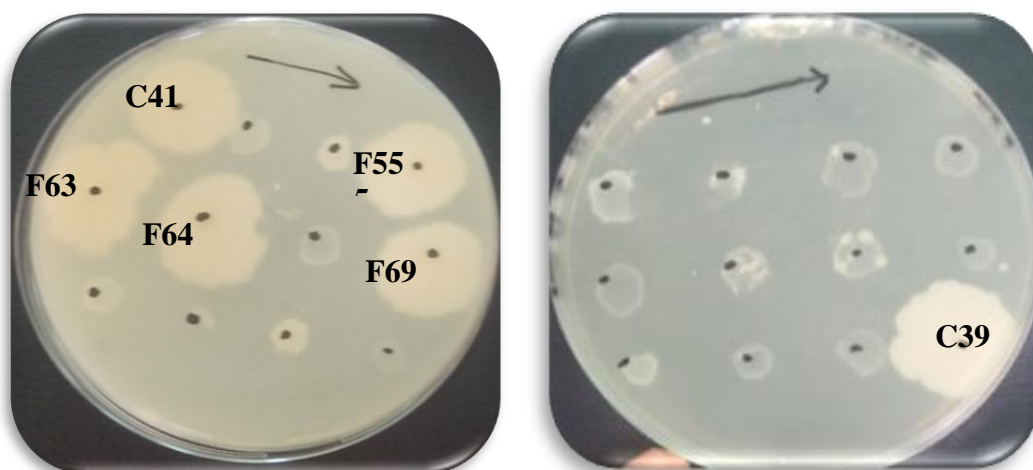
Après incubation, cette propriété s'est manifestée par l'apparition d'un halo clair autour des souches ensemencées sur la gélose PCA additionnée de lait écrémé à des concentrations de 1%, 2% et 10% ceci est grâce à la dégradation de la caséine (Hansal, 2015).

D'après les résultats (Tableau 06),(Photo 12), parmi six souches testées à partir de vingt-trois souches ont exprimé une activité protéolytique qui a évolué avec l'augmentation du pourcentage des protéines du lait (1%, 2% et 10%) avec un diamètre compris entre 15 et 20mm (Tableau 05), selon Vuilleumard (1986), la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse dont le diamètre est supérieur à 5 mm. Par comparaison à ces résultats, nos souches sont révélées protéolytiques. Plusieurs auteurs classent les espèces du genre *Leuconostoc* comme des bactéries peu protéolytiques qui utilisent peu de protéines pour la croissance, ce qui entraîne une

croissance limitée dans le milieu lait, de ce fait, elles se trouvent obligées d'utiliser les acides aminés et de les peptides présents à l'extérieur (Hemme, 2012). Néanmoins, l'incubation de certaines souches de *Leuconostoc* dans le lait indique une protéolyse de caséine, en changeant le goût et la texture finale (Liu et al., 2010).

Chez ces bactéries y compris les *leuconostocs*, plusieurs peptidases intracellulaires de spécificités variables ont été rapportées, et leurs libérations après lyse cellulaire ont été évoquées pour jouer ce rôle recherché dans les produits laitiers fermentés (Liu et al., 2008 ; Smid et Kleerebezem, 2014).

Les souches qui n'ont pas un pouvoir protéolytique sont empêchées l'émergence d'un goût amer lors de la fermentation du lait (Zarour, 2015) ; Aussi ces résultats montrent que nos souches de *Leuconostoc* sont exigeantes aux acides aminés ; et malgré l'exigence des *Leuconostoc* mais elles restent très utilisées dans l'industrie agro-alimentaire grâce à leurs caractères technologiques. (Zarour, 2015).



**Photo 12 :** Résultats d'activité protéolytique des souches sur milieu PCA + 10% de Lait écrémé.

**Tableau 05 :** Activité protéolytique de certaines souches de *Leuconostoc* isolées à partir de différents écosystèmes

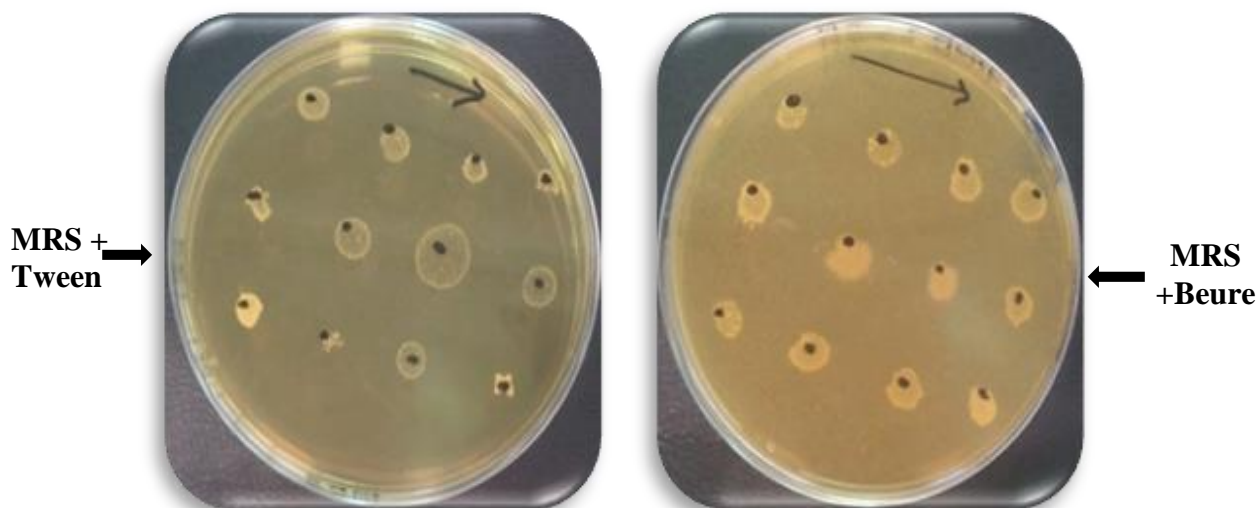
souches	Diamètres des halos PCA + Lait écrémé (mm)		
	1%	2%	10%
<b>C39</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>18</b>
<b>C41</b>	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>19</b>
<b>F55</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>F63</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>20</b>
<b>F64</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>20</b>
<b>F69</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>18</b>

#### 4.3. Mise en évidence de l'activité lipolytique

La saveur caractéristique des produits alimentaires peut également être due à la lipolyse comme la protéolyse dont l'incorporation d'enzymes lipolytiques et/ou protéolytiques accélère la formation d'arôme (Holland et al., 2005). La lipolyse génère des acides gras libres et il est nécessaire d'avoir une forte concentration de ces composés pour produire un effet perceptible sur la saveur du produit (Holland et al., 2005). Le métabolisme des acides gras conduit à la libération de nombreux composés responsables de l'arôme et de la texture tels que les esters, alcools, acides...etc.(Toldrà et al., 2001).

D'après les résultats obtenus (Tableau 06), (Photo 13), des souches qui ont été ensemencées sur gélose MRS additionné au tween 80 et sur gélose MRS additionné au beurre n'ont présenté aucun halo autour de l'ensemencement, ce qui signifie qu'elles sont dépourvues de toute activité lipolytique.

Ces résultats sont montrés que l'activité lipolytique est très faible chez les bactéries lactiques, aussi la plupart des BL ne possèdent que des estérases intracellulaires, par conséquent, la plupart des estérases de BL ne peuvent pas hydrolyser les lipides alimentaires jusqu'à leur libération des cellules lysées. Cette activité enzymatique varie en fonction de la nature des lipides présents et de leur degré de pré-hydrolyse (Thierry et al., 2016), ceci nécessite une source des acides gras pour la croissance des souches de *Leuconostoc* (Hansal, 2015).



**Photo 13 :** Résultats négatives de l'activité lipolytique sur gélose MRS additionné au Tween 80 et beurre.

#### 4.4. Production des substances aromatiques

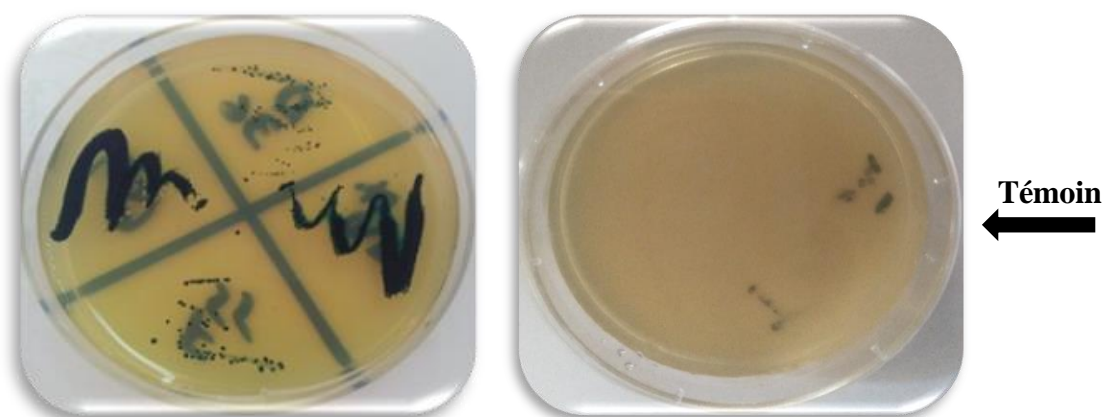
Le métabolite de citrate permet aux bactéries lactiques d'utiliser d'autre source de carbone pour sa croissance, de résister à des conditions acides et de libérer des composés organiques connus par leur participation dans la qualité organoleptique des produits laitiers comme le fromage en fournissant des saveurs (**Gemelas et al., 2014**).

Les *leuconostocs* sont utilisés dans l'industrie laitière pour leur capacité à produire du CO<sub>2</sub> et des composés d'arôme tel que le diacétyle et cela grâce au co-métabolisme sucre/citrate (**Bourellet et al., 2001 ; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**).

Après 48h d'incubation, Les isolats qui ont étéensemencées sur gélose KMK présentent un caractère variable vis-à-vis de l'utilisation de citrate, dont quatorze souches sont capables de cométaboliser le citrate avec le glucose, ces résultats ont montré quele transport de citrate à travers la membrane est effectué par le citrate perméase P (**CitP**), pour l'échange de la forme dianionique du citrate et des anions de lactate, aussi que l'existence de citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ionferrique et le potassium ferricyanide de cette façon résulte la formation des colonies bleues ; ces résultats sont semblables à celles de **Bourel et al., 2001 ; Ghazi et al.,2009**. Les neuf souches restantes (**C12, C13, C15, C18, C21 et C41**) isolées de lait de chèvre et les souches (**F63, F64 et F69**) isolées de fromage frais de vache qui ne dégradent pas le citrate. Cette variabilité peut être due à la perte de plasmide codant les gènes responsables de la dégradation de citrate (**Kihal et al., 1996 ; Giraud, 1998**).Les résultats se présentées dans (**Tableau 06**), (**Photo 14**).

Les *leuconostocs* jouent un rôle dans la production d'arômes par la production des composés ou des précurseurs, qui va participer dans l'amélioration des propriétés organoleptiques des aliments en provoquant des changements de textures et d'arôme, résulte de plusieurs voies comme l'utilisation du citrate (**Hemme et al., 2004**).

D'après ces résultats, les *leuconostocs* présentent un grand intérêt biotechnologique et ceci rend ces bactéries largement utilisées dans des procédés d'élaboration de produits alimentaires. Elles sont principalement utilisées pour leurs diverses propriétés métaboliques importantes dans la fabrication d'un certain nombre de fromages (**Hollandet Liu, 2011**).



**Photo 14 :** La révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition des colonies de couleur bleu sur gélose KMK des souches **F49**, **V67**, **C34** (*Ln. mesentroides* subsp. *dextranicum*), **F55** (*Ln. fallax*).

Tableau 06 : les résultats des caractères technologiques des isolats

les caractères Les souches	Production dextrans	Production des substances aromatiques	Activitélipolytique	Activitéprotéolytique
C1	+	+	-	-
C2	+	+	-	-
C10	+	+	-	-
C12	+	-	-	-
C13	+	-	-	-
C15	+	-	-	-
C16	+	+	-	-
C18	+	-	-	-
C21	-	-	-	-
C23	+	+	-	-
C34	+	+	-	-
C39	-	+	-	+
C41	+	-	-	+
C43	-	+	-	-
F49	+	+	-	+
F55	+	+	-	+
F63	+	-	-	+
F64	+	-	-	-
F65	+	+	-	-
F69	+	-	-	+
F70	+	+	-	-
F71	+	+	-	-
V67	+	+	-	-
%	86.95	60.86	00	26.08

# **Conclusion**



## Conclusion

Cette étude qui a été réalisée au niveau des laboratoires pédagogiques de faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Kasdi Merbah Ouargla), nous a permis d'isoler 255 souches présumées comme bactéries lactiques ; à partir de différents produits laitiers (lait de chamelle, lait de chèvre, lait de vache, fromage traditionnel et D'hen).

Parmi les 255 souches isolées vingt-trois (23) faut partir du genre *Leuconostoc* en se basant sur les tests phénotypiques (microbiologiques et biochimiques); où on a réalisé des tests morphologiques (examen macroscopique, examen microscopique et test de catalase), tests physiologiques (croissance à différentes températures, thermorésistant, croissance à différentes concentrations de NaCl et croissance à différents pH) et des tests biochimiques (recherche de type fermentaire, hydrolyse de l'arginine, test de dégradation des sucres et hydrolyse de l'esculine). Les vingt-trois (23) souches appartiennent à 5 espèces de *Leuconostocs* : *Ln. mesentroides subsp (Ln. mesentroides subsp. mesentroides C1, C2, C13, C15, F65, F70, F71 ; Ln. mesentroides subsp. dextranicum C34, F49, F69, V67 ; Ln. mesentroides subsp. cremoris C21, C39) ; Ln. gelidum (C10) ; Ln. Carnosum (C16, C41) ; Ln. citreum (C43) ; Ln. fallax (C12, C18, F55, F63, F64, C23).*

À la suite, les isolats ont subi une étude des caractères technologiques. Cette étude a montré que les souches de *Leuconostocs* sont performantes dans la production des dextrans (87%) qui vont améliorer les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers), et la production des substances aromatiques (61%) ; On a six souches de *Leuconostocs* ont un pouvoir protéolytique (26%) ce qui va empêcher l'apparition d'un goût amer lors de la fermentation du lait ; mais l'ensemble des souches ne présentent pas aucune activité lipolytique.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

### A

- **Aissani L, Medjani H., 2017.** Etude de quelques aptitudes technologiques en culture pure et mixte de souches de bactéries lactiques isolées de l'ben. Memoire de master Université A. Mira de Bejaia. 54p.
- **Alegria A, Delgado S, Florez A, Mayo B., 2013.** Identification typing and functional characterization of *Leuconostoc spp*, strains from traditional. Starter free cheeses. Dairy Science and Technology. 93p, 657-673.
- **Axelsson L., 2004.** Classification and Physiology in Lactic Acid Bacteria and Functional Aspects. 3e Ed, Marcel Dekker. 633p.

### B

- **Badel S, Bernardi T, Michaud P., 2011.** New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. Biotechnology Advances. 29p, 54-66.
- **Badis A, Laoubdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". Sciences et technologie. 23p, 30-37.
- **Bajpai V, Rather I, Majumder R, Shukla S, Aeron A, Kim K, Kang S, Dubey R, Maheshwari D, Lim J, Park Y., 2015.** Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. Bangladesh Journal of Pharmacology. 11p, 1-23.
- **Barrière C, Veiga-da-Cunha M, Pons N, Guédon E, van Hijum S, Kuipers O, Ehrlich D, Renault P., 2005.** Fructose Utilization in *Lactococcus lactis* as a model for Low-GC Gram-Positive Bacteria: Its Regulator, Signal, and DNA-Binding Site. Journal of Bacteriology. 187p, 3752-3761.
- **Bauer R, Dicks L., 2009.** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Int. J. Food Microbiol. Rev. 101p, 201-216.
- **Belarbi F., 2011.** Isolement et sélection des souches bactéries lactiques des métabolites antibactériennes: présentation générale, Microbiologie alimentaire et industriel. Mémoire de magistère, Université d'Oran. 129p.

- **Belarbi M., 2015.** Etude comparative entre la qualité Microbiologique du lait cru de vache et le Lait de chèvre, Sciences des Aliments. Université d'Oran.
- **Berguiga N, Khemis I., 2014.** L'utilisation des bactéries lactiques dans la fermentation industrielle. Microbiologie fondamentale et appliquée. 132p.
- **Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F, Obert J., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques.
- **Bigret M., 1994.** Lactic acid bacteria and organoleptic properties of foods. Presses Universitaires de Caen, France. 25p.
- **Boumedine K., 2013.** Recherche des bactéries lactique productrice des bactériocines et l'étude de leurs effets sur des bactéries néfastes. Mémoire de magister, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen. 27p.
- **Bourel G, Henini S, Krantar K, Oraby M, Diviès C, Garmyn D., 2001.** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. Université d'Oran. 81p, 75-82.
- **Brahimi S., 2015.** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives "AMOREDJ" fermentés, Biodiversité des micro-organismes. 203p.

### C

- **Carole-Vignola L, Jean A, Paul A, Laurent B., 2002.** Science et technologie du lait, Transformation du lait. Bibliothèque nationale de Canada. 657p.
- **Chakou R, Bessedik Kh., 2018.** Etude de quelques caractères technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées à partir du lait de chèvre et de chamelle. Mémoire de master, Université Kasdi Merbah Ouargla. 16p.
- **Chavarri E, Nunez J, Nunez M., 1983.** Behavior of *Streptococcus lactic* in heat treated (80 °C for 30 min) or sterilized cow's or ewe's milk. Journal of Dairy Research. 50p, 357-363.
- **Chethouna F., 2011.** Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologique du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru.
- **Cogan T., 1975.** Citrate utilization in milk by *leuconostoc cremoris* and *streptococcus diacetylactis*. J.Dairy Res. 42p, 139-146.
- **Cogan T., 1980.** Les levains lactiques mésophiles. J.Dairy Res. 60p ,397-425.

- **Cogan T, Barbosa M, Beuvier E., 1999.** Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*. 409p.

### D

- **Dellaglio F, Roissart H, Torriani S, Curk M C, Janssens D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*. Ed. H Roissart et F M. Luquet Paris, Lavoisier. 25p.
- **Devoyod J-J, Poullain F., 1988.** Les Propriétés de *Leuconostoc*: leur rôle en technologie laitière. Laboratoire de Microbiologie laitière. Intra Editions. Jouy-en-Josas, France. 253p.
- **Dhouib A., 2017.** Mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique par quelques bactéries lactiques isolées de lait de brebis. Master en Analyses Biologiques et Biochimiques, Université d'Oran. 41p.
- **Djoughri K, Madani S., 2015.** Etude microbiologique d'un produit laitier fermenté traditionnel (J'ben) : isolement et identification des bactéries lactiques. *Microbiologie Appliquée*. Université d'Oran1. 210p.
- **Dortu C, Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société and Environnement*. 13p, 143-154.
- **Drici H, Gilbert C, Kihal M, Altan D., 2009.** Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk *J. applied Microbiology*. 501p, 647-650.
- **Drici H, Gilbert C, Kihal M, Atlan D., 2010.** Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *Journal of Applied Microbiology*. 108p, 647-657.
- **Dridier D, Prevost H., 2009.** Bactéries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economica 49 rue Harica 75015 Paris. pp 381- 427.

### G

- **Garvie E., 1984.** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Methods microbiology*.16p, 147-178.
- **Gemelas L, Degraeve P, Demarigny Y., 2014.** The citrate anabolism in homo- and hétérofermentative lab: A selective means of becoming dominant over other

microorganisms in complex ecosystems. Food and Nutrition Sciences. 5p, 953-969.

- **Ghazi F, Henni D, Benmechernene Z, Kihal, M., 2009.** Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominants lactic acid bacteria isolated from algerian raw milk. World Journal of Dairy and Food Sciences. 4p, 78-87.
- **Ghozlane D., 2012.** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyl). Mémoire de magister en Agronomie, Ecole nationale supérieur d'Agronomie El-Harrach Alger. 37p.
- **Guessas B, Kihal M., 2004.** Cracterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. African Journal of Biotechnology vol. 3(6), Pp339-342.
- **Guessas B., 2006.** Potentialité métabolique des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio contrôle des *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat d'Etat, Université d'Oran. 142p.
- **Guessas B., 2007.** Les potentialités métaboliques des bacteries lactique isolées du lait cru de chevre dans le bio-contrôle de *staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat, Université d'Oran. 201p.
- **Guiraud J-P., 1998.** Microbiologie alimentaire, Technique et Ingénierie, Série Agroalimentaire. Ed Dunod Paris. 652p.
- **Guiraud J-P., 2003.** Microbiologie alimentaire, RIA, Dunod, Paris. 650p.

### H

- **Hadef S., 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Thèse magister, Université Ouargla. 135p.
- **Han J, Gao C, Liu Z, Wu Z., 2016.** Levan-producing *Leuconostoc citreum* strain BD1707 and its growth in tomato juice supplemented with sucrose. Applied and Environmental Microbiology. 82p, 1383-1390.
- **Hansal N., 2015.** Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre et de chamelle. Mémoire de magister en Microbiologie Fondamentale et Appliqué, Université d'Oran 1. 154p.

- **Hariri A, Ouis N, Sahnouni F, Bouhadi D., 2009.** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de carbone. Rev. Microbiol, Ind, San et Environn.
- **Hassan A, Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. and Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York.
- **Hemme D, Foucaud-Scheunemanni C., 2004.** Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. Int Dairy J.14p, 467-494.
- **Hemme D., 2012.** Leuconostoc and Its Use in Dairy Technology. In: Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, 2ème Edition. CRC Press. 108p.
- **Holland R., Liu S. Q, Crow V. L, Delabre M. L, Lubbers M, Bennandt M, Norris G., 2005.** Esterase of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. International Dairy Journal. 15p, 711-718.
- **Holland R., Liu, Q. S., 2011.** *Leuconostoc sp.* lactic acid bacteria. Elsevier .138p.
- **Hughenoltz J, Sybesma W, Groot M .N, Wisselink W, Ladero V, Burgess K, Van Sinderen D., 2002.** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of neutraceuticals. Antonie van Leeuwenhoek 82. 217-235p.

### I

- **Ito S, Kobayashie T, Ohta Y, Akiyama Y., 1983.** Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. J. Ferment. Technology. 6p, 353-358.

### K

- **Kassas Z., 2017.** Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba. 59p.

- **Kempler G. M, McKay L. L., 1980.** Improved medium for addiction of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacandylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 39p, 926-927.
- **Khedid K, Faid M, Mokhtarie A, Soulaymani A, Zindine A.,2006.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbioloy. Es*. 10p, 10-16.

### L

- **Lafarg V, Ogier J.C, Girard V, Malaned V, Leveau J.Y., Gruss A., 2004.** Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 70p, 5644-5650.
- **Larpent J. P, Laripent M. G., 1990.** Memento technique de microbiologie. seconde et technique et documentaire Lavoisier. 417p.
- **Law J, Haandrikman A., 1997.** Proteolysis enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7p, 1-11.
- **Lees G.J, Jago G.R., 1976.** Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*
- **Lelliott R.A, Stead D.E., 1987.** Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications vol (2).
- **Lenoir J, Hernier J, Weber F., 1992.** Les groupes microbiens d'intérêt laitiers. Ed. Cidil. 30-50p.
- **Leroy F, Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry, *Trends in Food Science and Technology*. 67-78.
- **Leveau J.Y, Bouxi M., 1980.** La flore lactique dans la technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Bourgeois C M, Leveau J Y, A. Pria. paris. 3-106p.
- **Leveau J.Y, Bouix M., 1993.** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Technologie et Documentation, Lavoisier. Paris*, 85-87p.
- **Liu M, Nauta A, Francke C, Siezen R. J., 2008.** Comparative genomics of enzymes in flavor forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology*.74p, 4590-4600.



- **Liu M, Bayjanov J. R, Renckens B, Nauta A, Siezen R. J., 2010.** The proteolysis system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*. 11p, 1-15.
- **Lucey C.A, Condon S., 1986.** Active role of oxygen and NADH oxydase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiology*. 132p, 1789-1796.

### M

- **Mahaut M, Jeantet R, Brule G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. 194p.
- **Marchal N, Bourdon J, Richad C., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin. 65-49p.
- **Mathot A, Kihal M, Divies C., 1994.** Selective enumeration of *leuconostoc* on vancomycin aga medium. *International Dairy Journal*. 4p, 459-169.
- **Mayeux J, Sandine W, Elliker P., 1962.** A selective medium for addicting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*. 45p, 655-656.
- **Mcdonald L, Flemiming H, Hanssen H., 1990.** Acid tolerance of *leuconostoc mesenteroides* and *lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiology*. 56p, 2120-2124.
- **Monnet V, Latrille E, Beal C, 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. 512-592p.

### N

- **Nuraida L., 2015.** A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*. 4p, 47-55.
- **Naessens M, Cerdobbel A, Soandaert W, Vandamme E., 2005.** *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80p, 845-860.

### O

- **Ogier J, Serror P., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126p, 291-301.

### P

- **Papagianni M., 2012.** Food fermentation and production of bio preservatives. In: Hui, Y. H., Ozgul, E. E., Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology. 2ème Edition CRC Press. US. 6p, 109-124.
- **Patel S, Majumder A, Goyal A., 2012.** Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Indian Journal of Microbiology. 52p, 3-12.

### R

- **Rahmani kh., 2014.** Etude de cinétique d'acidification en Ph et en acide des bactéries lactique du genre leuconostoc. Mémoire de master, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- **Raynaud S., 2006.** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de doctorat. L'institut national des sciences appliquées de Toulouse.
- **Roudj S, Belkheir K, Zadi-karam H, Karam N., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. Européen. J.Sci. Res. 34p, 218-227.

### S

- **Sallofe C., 1994.** Lactis acid bacteries. Dannone News latter n°5 July.
- **Samelis J, Maurogenakis F, Metaxopoulos J., 1994.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Geek gry salami. Int. J. Food microbiology. 23p, 179-96.
- **Sanlibaba P, Çakmak A., 2016.** Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. Applied Microbiology Open Access. 2p. 10115.
- **Saranraj P, Naidu M, Sivasakthivelan P., 2013.** Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: A review. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive. 4p, 1124-1133.
- **Savado A, Ouattara1 C, Savado P, Ouattara1 A, Barro N, Traore A., 2004.** Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. Vol (3), 134-139p.
- **Sonar N, Halami P., 2014.** Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India. Journal of Food Sciences and Technology. 51p, 4143-4148.

- **Smid E, Kleerebezem M., 2014.** Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annals Reviews of Food Sciences and Technology*, 5p, 313-326.

### T

- **Tamime A., 1990.** Microbiology of starter cultures. In: Robinson, R. K. Ed, *Dairy Microbiology*, Elsevier, London. Vol (2), 131- 201p.
- **Tanriseven A, Doğan Ş., 2002.** Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibers. *Process Biochemistry*. 37p, 1111-1115.
- **Thierry A, Pogacic T, Weber M, Lortal S., 2016.** Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods. In Mozzi, F, Raya, R, Vignolo, G. M. Ed, *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.16p, 314-340.
- **Thomas T., 1973.** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *Journal of Dairy Sciences and Technology*. 8p, 70-71.
- **Toldrá F, Sanz Y, Flores M., 2001.** Meat fermentation technology. In: Hui Y, Nip W, Owen A. Ed, *Meat science and applications*. Marcel Dekker, New York. 23p, 537-561.
- **Tropcheva R, Nikolova D, Evstatieva Y, Danova S., 2014.** Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product. *Anaerobe*. 28p, 78-84.

### V

- **Vedamuthu E., 1994.** The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *Journal of Dairy Science*. 77p, 272-2737.
- **Vettori M, Blanco K-C, Cortezi M, Lima C-J, Contiero J., 2012.** Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent application. *Diálogos and Ciência*. 31p, 171-186.
- **Vuillemard J., 1986.** Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Ed, *Microbiologie des aliments*. Lavoisier. Paris. 3p, 1-65.

### W

- **Werning M, Notararigo S, Nácher M., 2012.** Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: El-Samragy Y. Ed. *Food additives*. Intech, Croacia. 83-114p.

- **Wisselink H, Weusthuis R, Eggink G, Hugenholtz J, Grobber G., 2002.** Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*. 12p, 151-161.

### Z

- **Zalacain I, Zapelena M, Astiasaran I, Bello J., 1996.** Addition of lipase from *candida cylindracea* to a traditional formulation of a dry fermented sausage. *Meat science*. 42p 155-163.
- **Zarour K., 2018.** Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées localement. Thème de doctorat en spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Université d'Oran1. 52p.

<https://fermentationstations.wordpress.com/2016/12/01/leuconostoc-mesenteroides/>

# **Annexes**

**Annexe 01 : Les milieux de culture et les solutions utilisés****01- Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Polypeptone.....	10g
Citrate de sodium.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Glucose.....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.25g
MnSO <sub>4</sub> .....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
PH 6.8	

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

**02- Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)**

Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	5g
Peptone.....	10g
Acide ascorbique.....	0.5g
Lactose.....	2g
L-arginine.....	4g
Pourpre de Bromocrésol.....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
PH 6.8	

Autoclavage 120°C/20minutes

**03- Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone.....	20g
Gélatine.....	2.5g
Extrait de levure.....	5g
Saccharose.....	100g
Glucose.....	5g

Citrate de sodium.....	1g
Azide de sodium.....	0.075g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

PH 6.8

Autoclavage 120°C/20minutes

#### **04- Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)**

Extrait de levure.....	3g
Biopolytone.....	2.5g
Glucose.....	5g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

PH 6.8

Autoclavage 121°C/15minutes

Au moment de l'emploi on ajoute les solutions suivants:

- 1 ml d'une solution aqueuse de **ferricyanide de potassium** 10 % (p/v).
- 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de **citrate ferrique et citrate de sodium** (p/p). Ces solutions sont filtrées sur filtre millipore 0.22 µm et sont stérilisées au bain marie à 100°C pendant 10minutes.ils sont conservées à l'obscurité à 4°C.

#### **05- Milieu MRS BCP**

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre.....	1000ml
Bromocrésol pourpre.....	0.025ml

PH 7

Autoclavage 120°C/20minutes

#### **06- Eau Physiologique**

Chlorure de sodium.....	8.5g
Peptone.....	0.5g
Eau distillée.....	1000ml

PH 7

Autoclavage 120°C/20minutes.

#### **07- Milieu PCA (Plate Count Agar).**

Tryptone.....	5.0 g
Extrait autolytique de levure.....	2.5 g
Glucose.....	1.0 g
Agar\agar.....	12.0 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,0 \pm 0,2$ .

Autoclavage 121°C/15minutes.

**08- Lait écrémé**

Lait en poudre.....11 g

Eau distillée.....100 ml

Autoclavage 110°C pendant 10 minutes.

**Annexe 02 : coloration de Gram( Larpent et Lairpent, 1990).**

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette pasteur stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.
- La deuxième étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 s.
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90° (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries «Gram-», et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.
- En fin, quelques gouttes de fuchsine sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1min. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.



Annexe 03 :

Tableau : La présentation des déférant souches isolés à partir de déférant échantillons.

Echantillons	Les déférentes souches isolées		Leuconostocs isolés
Lait de chèvre	1	07	02
	2	36	11
	3	05	01
Lait de vache		67	01
Lait de chamelle	1	12	00
	2	06	00
Fromage traditionnel		71	08
Dhane	1	11	00
	2	40	00

Annexe 04 :

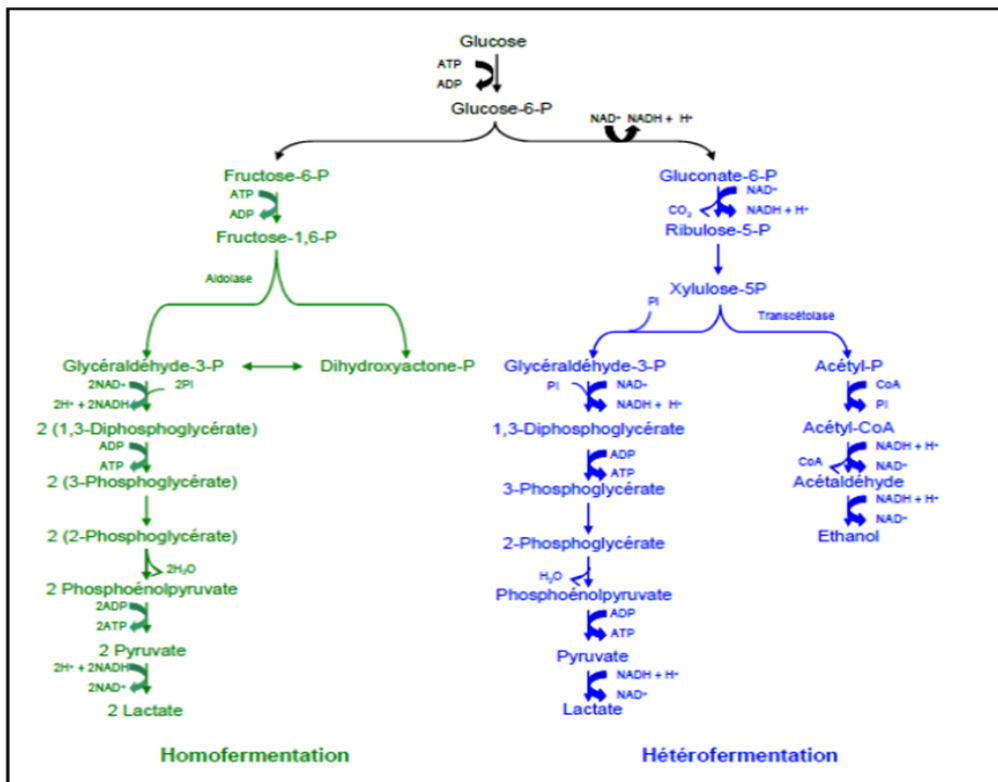


Figure 07 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Boumediene, 2013).

## Résumé

Les bactéries lactiques ont acquis un rôle prépondérant dans l'industrie agro-alimentaire, au vu de ses capacités à améliorer les caractéristiques particulière des produits alimentaires tels que l'arôme et la texture.

En outre les acides organiques produits par ces bactéries garantir une bonne sécurité pour la conservation alimentaire en maintenant un PH relativement bas. L'utilisation pour une application industrielle de ces acides est déterminée en fonction de ses propriétés fonctionnelles et technologiques.

Dans ce travail on a aboutis à isoler 255 souches de bactéries lactique à partir de différent produit laitiers : lait de chèvre, lait de vache, lait de chamelle et à partir du fromage traditionnel.

Les isolats obtenus ont subi à la suite une identification phénotypique, on se basant sur les tests physiologiques et biochimiques classique où on a pu identifier 23 souches appartiennent aux 5 espèces de *leuconostoc* : *Ln. mesentroides subsp (Ln. mesentroides subsp. mesentroides C1, C2, C13, C15, F65, F70, F71 ; Ln. mesentroides subsp. dextranicum C34, F49, F69, V67 ; Ln. mesentroides subsp. cremoris C21, C39) ; Ln. gelidum (C10) ; Ln. Carnosum (C16, C41) ; Ln. citreum (C43) ; Ln. fallax (C12, C18, F55, F63, F64, C23).*

Et puis quelques tests des caractères technologiques ont été réalisé ou en a sélectionné des souches performantes dans la production des dextrans (87%), production des substances aromatiques (61%). Le pouvoir protéolytique (26%) mais les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches ne présentent pas un pouvoir lipolytique ce qui rend ces bactéries très exigeantes.

**Mots clés :** bactéries lactiques, *leuconostoc*, identification, tests phénotypiques, caractères technologiques.

## Abstract

The lactics bacteria have played a leading role in the agri-food industry, given its ability to improve the particular characteristics of food products such as aroma and texture.

In addition the organic acids produced by these bacteria ensure good safety for food preservation by maintaining a relatively low PH. The use for industrial application of these acids is determined by its functional and technological properties.

In this work we managed to isolate 255 strains of lactic acid bacteria from different dairy products: goat's milk, cow's milk, camel's milk and from traditional cheese.

The resulting isolates were subsequently phenotypically identified, based on conventional physiological and biochemical tests or 23 strains belonging to the 5 *leuconostoc* species: *Ln. mesentroides subsp (Ln. mesentroides subsp. mesentroides C1, C2, C13, C15, F65, F70, F71 ; Ln. mesentroides subsp. dextranicum C34, F49, F69, V67 ; Ln. mesentroides subsp. cremoris C21, C39) ; Ln. gelidum (C10) ; Ln. Carnosum (C16, C41) ; Ln. citreum (C43) ; Ln. fallax (C12, C18, F55, F63, F64, C23).*

And then some tests of the technological characteristics were carried out or selected high performance strains in the production of dextran (87%), production of the aromatic substances (61%), the proteolytic power (26%) but the results of the evaluation Technological skills indicate that all the strains do not have a lipolytic capacity which makes these bacteria very demanding.

**Key words:** lactic acid bacteria, *leuconostoc*, identification, phenotypic tests, technological traits.

## ملخص

لعبت البكتيريا اللاكتيك دورا قياديا في صناعة الأغذية، نظرا لقدرتها على تحسين الخصائص الخاصة للمنتجات الغذائية مثل الرائحة والملمس . وبالإضافة إلى ذلك فإن الأحماض العضوية التي تنتجها هذه البكتيريا تضمن سلامة جيدة للحفاظ على الأغذية من خلال الحفاظ على درجة حموضة منخفضة نسبيا. يتم تحديد الاستخدام الصناعي لهذه الأحماض من خلال خصائصها الوظيفية وتكنولوجية.

نجحنا في هذا العمل في عزل 255 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك عن منتجات الألبان المختلفة: حليب الماعز وحليب الأبقار وحليب الإبل والجبن التقليدي ثم بعد ذلك تم تحديد العزلات الناتجة ظاهريا ، استنادا إلى الاختبارات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية التقليدية أين استطعنا تعريف 23 سلالة لوكونوستوك تنتمي إلى خمسة الأنواع:

*Ln. mesentroides subsp (Ln. mesentroides subsp. mesentroides C1, C2, C13, C15, F65, F70, F71 ; Ln. mesentroides subsp. dextranicum C34, F49, F69, V67 ; Ln. mesentroides subsp. cremoris C21, C39) ; Ln. gelidum (C10) ; Ln. Carnosum (C16, C41) ; Ln. citreum (C43) ; Ln. fallax (C12, C18, F55, F63, F64, C23).*

ثم تم إجراء بعض الاختبارات للخصائص التكنولوجية أين تم تحديد سلالات عالية الأداء في إنتاج ديكستران ، وإنتاج المواد العطرية ، تحليل البروتين ولكن نتائج التقييم تشير إلى أن جميع السلالات لا تتمتع بقدرة تحلل الدهون مما يجعل هذه البكتيريا شديدة الصعوبة

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا اللاكتيكية، لوكونوستوك (*leuconostoc*)، تحديد الهوية، الاختبارات المظهرية، المهارات التكنولوجية.