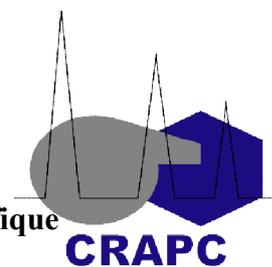




République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE KASDI MERBAH - OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADIMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Identification et caractérisation technologique des bactéries
lactiques isolées à partir de Smen camelin**

Présenté par

NAGHNAGH Rachid

ABDELAOUI Bayoud Brahim

Soutenu publiquement le : 20/06/2022

Devant le jury :

Présidente :	KHALLEF Sakina	MCA	Univ. K. M. Ouargla
Encadreur :	MOSBAH Saïd	MCA	Univ. K. M. Ouargla
Co-Encadreur :	BOURICHA M'hamed	MCB	Univ. K. M. Ouargla
Examineur :	DJELLOUL DAOUADJI Soumia	MCB	Univ. K. M. Ouargla

Année universitaire :2021/2022

Remerciements

Nous remercions en premier lieu le DIEU, le tout Puissant., qui nous 'a permis d'avoir finalisé ce travail de mémoire, et ses innombrables bienfaits.

*Tout d'abord nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à nos encadreur **Mr. MOSBAH Said**, et **Mr. BOURICHA M'hamed** Maîtres de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université KasdiMerbah Ouargla, nous la remercions de nous encadrer, orienter, aider et conseiller.*

*Nous remercions **Mr. BOUAL Zakaria**, et **Mr. HANNI Abdallah** pour leurs précieux conseils.*

*Merci à **Mme KHALLEF Sakina** et à **Melle DJELOUL DAOUADJI Soumiad** d'avoir accepté d'évaluer notre travail au sein du jury de soutenance.*

*Nous adressons des remerciements en particulier à **Mr KEDDAR Mohamed nadire** et **Mr KASBI Ibrahim** qui ont accepté de participer à cette étude et sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.*

Merci aux professeurs de la faculté des sciences de la vie, ainsi qu'à nos maîtres de nous 'avoir transmis leur savoir et leur passion.

*Nous souhaitons également remercier **BABZIZ Reduane**, **HARIZ Salah Eddine**, **HADJ AYOUB Brahim**, et **RIAG Abderrahman** pour avoir su nous faire confiance et nous avoir conseillé tout au long de deux années.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Melle BOUZIANE Ghania** et **Melle GUEHAZ Karim** de nous avoir accueilli dans le laboratoire et pour la confiance et l'aide qu'ils nous ont accordé, ainsi que toute l'équipe du laboratoire ; collègues, sans oublier tout le personnel de la bibliothèque de faculté des sciences de la nature et de la vie.*

Pour leur aide et leur compréhension.

Finalement, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.



Dédicaces

Je dédie ce travail de soutenance à : Mes chers parents, mes sœurs et, ma famille, mes frères, sans oublier les amies, surtout *Youcef.K* et la société El-Rouwad pour l'éducation et l'enseignement et Laboratoire Ibr. ABDELLAOUI. B

Je dédie ce travail de soutenance à : Mes chers parents, ma sœur et mes frères *Krimou, Sofian*, et *Riyad*, mon beau-frère *Salah* et nièces *Razan, Manar* sans oublier mes amies, surtout *Rostom* et *Youcef, Aicha, Amina, Anouar, Fadila, Nour El-houda, Randa, Safa, Salsabile, Souhila, Somia, Wiam*.

Rachid.N

Liste des abréviations

- ADH** : Arginine Dihydrolas
- BCP** : Bromocrésol pourpre
- BL** : Bactéries lactiques
- BM** : Bleu de méthylène
- CaCO₃** : Carbonate de calcium
- CFU/ml** : Unité formant colonie par millilitre
- EPS** : Exo-polysaccharides
- KMK** : Kempler et Mc Kay, 1980.
- LB** : *Lactobacillus*
- Lc** : *Lactococcus*
- Leu-AP** : Leucine-Aminopeptidase
- Ln** : *Leuconostoc*
- Lys-AP** : Lysine-Amin peptidase
- M** : souche isole à température 37°C
- M16 BCP** : M16 Bromocrésol pourpre
- MRS** : de Man-Rogosa et Sharpe, 1960
- MSE** : Mayeux, Sandine et Elliker, 1962.
- NaCl** : Chlorure de sodium
- NaOH** : Hydroxyde de sodium
- ph** : Potentiel d'Hydrogène
- S** : souche isole à température 30°C
- T°** : Température
- Zi** : Zone d'inhibition

Liste des tableaux

Tableau I: Souches pathogènes utilisées dans le test antimicrobien	17
Tableau II: Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées à partir de Smen camelin	20
Tableau III : Les résultats de test de croissance à différentes températures.....	21
Tableau IV : Les résultats du test de thermorésistance.....	21
Tableau V: Les résultats du test de croissance à différents pH et à différentes concentrations en NaCl (%).....	22
Tableau VI: Les résultats des tests biochimiques des souches isolées.....	23
Tableau VII : Les résultats du test de la dégradation de citrate.....	30
Tableau VIII: Les résultats de fermentation des sucres par les souches isolées.....	55
Tableau IX: Les diamètre d'activité protéolytique des souches isolées	56
Tableau X: Diamètre d'activité antibactérienne des isolats vis-à-vis des bactéries pathogènes	58

Liste des figures

- Figure 1** : Répartition des espèces de la collection lactique (%)26
- Figure 2**: L'activité antimicrobienne des souches isolées vis-à-vis les bactéries pathogènes31
- Figure 3**: Les diamètres des zones claires d'Activité protéolytique des souches isolées55

Liste des photos

Photo 1: Résultat du test de lait de Sherman (forme oxydé)	24
Photo 2 : Résultat du test de lait de Sherman (forme réduit).....	24
Photo 3: Résultats de Fermentation des carbohydrates par les souches bactériennes sur une plaque d'Elise	25
Photo 4: Activité protéolytique des isolats sur milieu MRS additionné lait écrème	27
Photo 5 : Activité lipolytique des isolats sur gélose MRS additionné au tween 80.....	28
Photo 6: Résultats de dégradation de citrate révèle par l'apparition des colonies de couleur bleu sue gélose KMK.....	29
Photo 7: Résultats d'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre Salmonella enterica ATCC6017	31
Photo 8: Aspect macroscopique des souches lactique sur gélose MRS	53
Photo 9: Observations microscopiques des souches isolées après une coloration de Gram à grossissement (x100)	53
Photo 10: Résultat du test de catalase (test négatif).....	53
Photo 11: Test de recherche type fermentaire (CO ₂ +)	54
Photo 12: Aspect des colonies a ADH positif sur milieu MRS-BCP	54
Photo 13: Aspect des colonies a ADH négatif sur milieu MRS-BCP.....	54
Photo 14: Résultats d'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre Salmonella enterica ATCC6017	56
Photo 17: Résultats d'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre Escherichia coli ATCC25992.....	57
Photo 16: Résultats d'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre Staphylococcus aureus ATCC25923	57
Photo 15: Résultats d'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre Pseudomonas aeruginosa ATCC9027	57

Liste des annexes

Annexe 01 : Milieux de culture.....	49
Annexe 02 : Solution, Reactifs et Tampons Phosphate.....	51
Annexe 03 :Protocole de coloration de Gram (Baldent., 1997).....	52
Annexe 04 : Matériel utilisé.....	52
Annexe 05 : Examen macroscopique et microscopique.....	53
Annexe 06 : Tests physiologiques et biochimiques	54
Annexe 07 : Tests technologiques.....	55

Table de matières

Liste des abréviations	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des photos.....	VII
Liste des annexes.....	VIII
Introduction.....	2

PARTIE I

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique.....	4
I. Synthèse bibliographique	5
1. Importance des bactéries lactiques dans le domaine technologique et industriel 5	
2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques camelines.....	5
2.1. Pouvoir acidifiant.....	5
2.2. Aptitude protéolytique.....	6
2.3. Aptitude lipolytique	6
2.4. Aptitude texturant	7
2.5. Aptitude aromatisante	8
2.6. Activité antimicrobienne	8
3. Principales genres ou espèces des bactéries lactiques camelin à pouvoirs	

PARTIE II

Matériel et Méthodes

technologiques puissants	9
1. Préparation de Smen.....	11
2. Isolement et pré-identification des bactéries lactiques.....	11

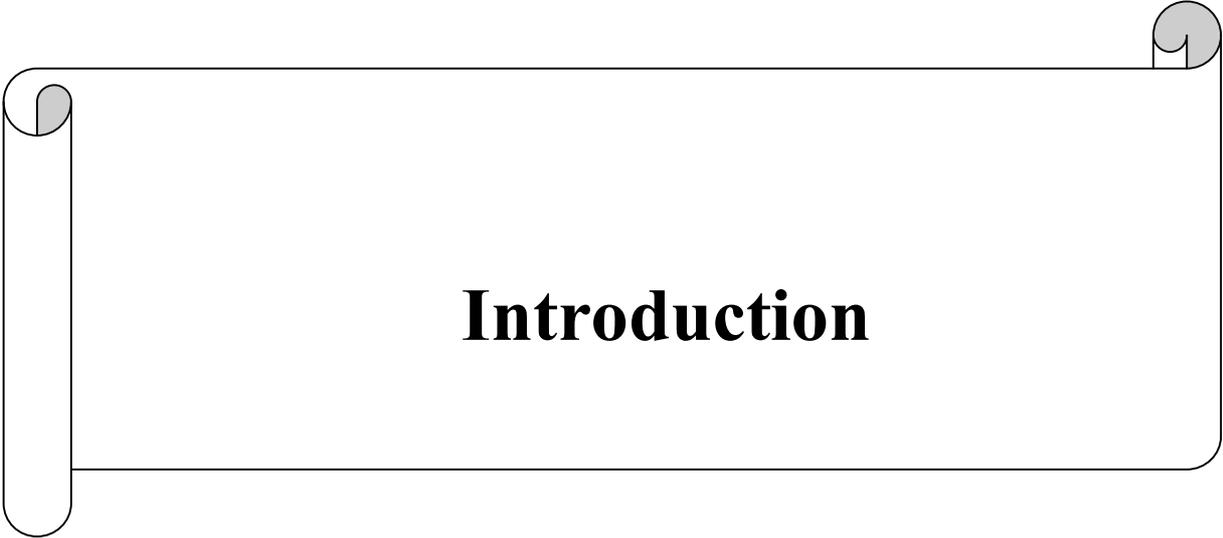
2.1.	Préparation des dilutions décimales et isolement	11
2.2.	Purification	12
2.3.	Pré-identification des isolats.....	12
2.3.1.1.	L'aspect macroscopique	12
2.3.1.2.	Aspect microscopique	12
2.3.1.3.	Conservation des isolats	13
2.3.2.1.	Croissance à différentes températures.....	13
2.3.2.2.	Résistance à la salinité.....	14
2.3.2.3.	Croissance à différent pH	14
2.3.3.1.	Recherche de type fermentaire.....	14
2.3.3.2.	Hydrolyse de l'arginine.....	14
2.3.3.3.	Utilisations des sucres	15
2.3.3.4.	Culture sur lait de Sherman	15
2.3.4.	Tests biotechnologiques.....	16
2.3.4.1.	Activité protéolytique.....	16
2.3.4.2.	Activité lipolytiques	16
2.3.4.3.	Production des Exopolysacharides.....	16
2.3.4.4.	Production des substances aromatiques.....	16

PARTIE III

Résultats et Discussion

2.3.4.5.	Production des substances antimicrobiennes.....	17
1.	Pré-identification des bactéries lactiques isolé à partir du Smen camelin .	19
1.1.	Examen macroscopique et microscopique	19
1.2.	Test de recherche de la catalase.....	19
2.	Tests physiologiques	20
2.1.	Test de croissance à différentes températures	20

2.2.	Thermorésistance	20
2.3.	Test de croissance à différentes pH et concentrations de NaCl.....	22
3.	Tests biochimiques.....	23
3.1.	Recherche de type fermentaire	23
3.2.	Hydrolyse de l'arginine	24
3.3.	Lait de Sherman	24
3.4.	Test de dégradation des sucres.....	25
4.	Tests technologiques	26
4.1.	Pouvoir protéolytique.....	26
4.2.	Pouvoir lipolytique.....	27
4.3.	Pouvoir aromatique	28
4.4.	Activité antibactérienne.....	30
	Conclusion	33
IV.	Conclusion générale.....	34
V.	Références bibliographiques	37
	Annexes.....	48
	Résumé.....	59



Introduction

Introduction

Le lait de chamelle occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne des nomades, de par sa composition équilibrée en nutriments de base (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire. En raison de son importance ce produit peut être consommé à l'état frais, mais aussi sous forme pasteurisé, stérilisé ou transformé en produits fermentés (**Huyghebaert, 2006**). Parmi les dérivés du lait de chamelle on trouve le lait fermenté, le fromages traditionnels (Klilla) et le beurre fermenté (Smen).

Le beurre fermenté ou (Smen) est utilisé à de nombreuses fins thérapeutiques, telles que l'inconfort gastro-intestinal et les problèmes de peau. Cette Propriétés thérapeutiques sont à l'origine d'une flore lactique abondante dans le Smen. Cettedernière améliore le profil thérapeutiques et médicinales de ces aliments par production des molécules bioactives(**Ewe et Loo, 2016**).

Les bactéries lactiques sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et la qualité organoleptique des produits alimentaires fermentés (**Ganzeleet al., 2000 ; Delgado et al., 2001 ; Taillez.,2001**).

Parmiles intérêts des bactéries lactiques dans les aliments fermentés réside principalement dans certaines activités métaboliques particulières. La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés et leur confère une saveur typique (**Labaouiet al.,2005**).

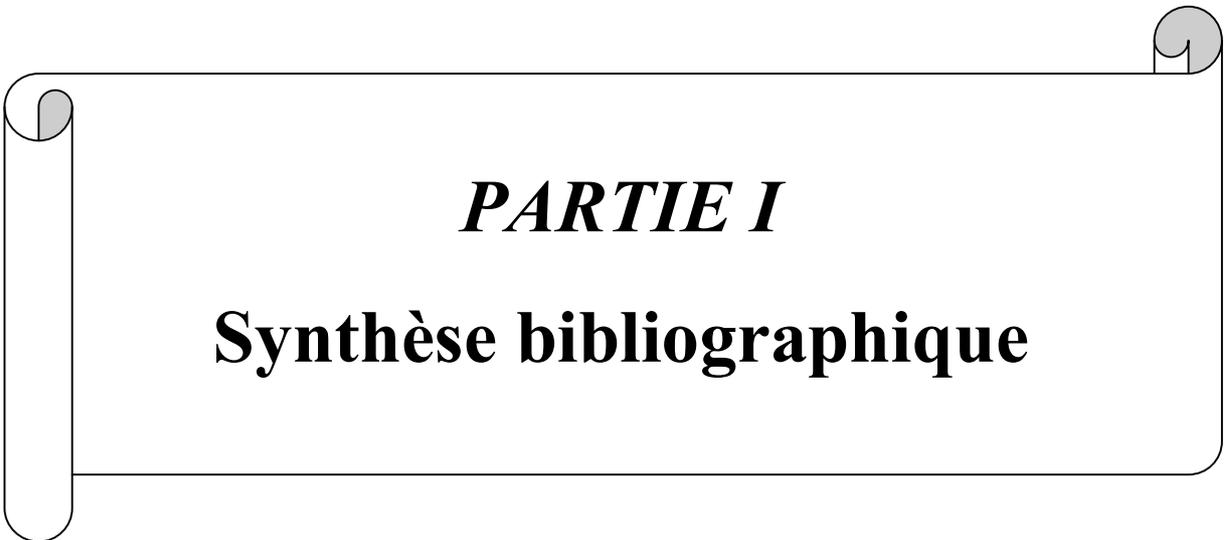
Ces bactéries contribuent par leur pouvoir de sécrétion de métabolites variées. Soit à la production de composés volatils qui participent au développement de l'arôme, de la saveur, et de la texture de plusieurs produits laitiers. Certaines bactéries lactiques produisent des exopolysaccharides qui jouent un rôle important dans le développement de la texture de plusieurs produits laitiers (**Labaouiet al.,2005**).

D'autre part, les bactéries lactiques réduisent le nombre ou inhibent la croissance des pathogènes dans les produits alimentaires par la production des bactériocines (**Osullivanet al.,2002**).

Dans ce contexte, l'intérêt de ce travail consiste à l'étude de certains pouvoirs technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du Smen camelin.

Le manuscrit est structuré en trois parties, la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les principales genres ou espèces de bactéries lactiques isolées du lait camelin qui présentent des pouvoirs technologiques importants.

Dans la deuxième partie du manuscrit nous exposons le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Elle comporte les techniques de pré-identification morphologiques, physiologiques et biochimiques et les tests technologiques des souches lactiques isolées et purifiées. La troisième partie du manuscrit est consacrée aux résultats et discussion. On termine avec une conclusion qui englobe les résultats de ce travail.



I. Synthèse bibliographique

1. Importance des bactéries lactiques dans le domaine technologique et industriel

Les bactéries lactiques sont des microorganismes à Gram positif, non sporulées, Cocci ou bâtonnets. Ils se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur de la fermentation des glucides (**De Vuyst et Leroy, 2007**). Ce groupe de bactéries est très hétérogène et partage divers aspects morphologiques, métaboliques et physiologies, et sont capable d'intervenir dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires par la contribution à la texture (production des EPS), à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Leur capacité de fermenter les glucides en acide lactique conduit à une diminution du pH à des valeurs favorables à la bio conservation des denrées alimentaires (**Carmen et al., 2000**). D'autre part, ce groupe joue un rôle aussi dans l'industrie chimique (production des acides), dans le domaine médical (substance antimicrobienne) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exo polysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (**Rodriguez et al., 2003**).

2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques camelines

2.1. Pouvoir acidifiant

L'acidification constitue le rôle principal des BL utilisées comme ferments ayant pour but l'abaissement du pH, qui conduit à la coagulation des protéines (caséines) du lait et l'augmentation de la synérèse du caillé. Participent Aussi à l'amélioration des propriétés rhéologiques et organoleptiques des aliments fermentés et limitent les risques de croissance des flores pathogènes (**Papamanoliet al., 2003**).

Cette activité est très variée au sein d'une même espèce et entre les espèces et se manifeste par la production de l'acide lactique issu de la fermentation des glucides au cours de la croissance bactérienne (**Raynaud, 2006**).

Plusieurs auteurs, ont isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle et leurs dérivés et ont étudié leurs potentiels technologiques, parmi ses souches on trouve :

Lactobacillus salivarius possède une forte activité acidifiante. D'autre part, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèces *bulgaricus*, ont montré une activité d'acidification moyenne (Seifu*et al.*, 2012).

Huggins et Sandine (1984) ont rapporté que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* était un faible producteur d'acide-lactique, et même Hassaine*et al.*, (2007) qui ont signalé généralement les espèces *d'Enterococcus* possède une capacité d'acidification lente. D'autre part, *Ln. Mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *breviset Lb. plantarum* ont montré de faibles activités acidifiantes (Centeno*et al.*, 2016).

2.2. Aptitude protéolytique

Le système protéolytique des bactéries lactiques est constitué de protéases liées à la paroi cellulaire qui hydrolyse les protéines en peptides et qui sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou des exopeptidases en des acides aminés et des petits peptides (Donkoret *et al.*, 2007 ; Monnet *et al.*, 2008 ; Roudjet *et al.*, 2009).

La dégradation de la caséine joue un rôle important dans le développement de la texture du fromage. En outre la dégradation secondaire des peptides et d'acides aminés est considérée comme ayant un impact majeur sur le développement de la saveur dans le fromage (Boussouar, 2016).

Une partie des peptides et d'acides aminés sont transformés vers des composés aromatiques notamment par transamination. Cela conduit à la production d'aldéhydes, d'acétaldéhydes, d'alcools, d'acides (comme l'acide acétique ou l'acide propionique) mais aussi d'acétone et de diacétyl (Meghouf*et al.*, 2019).

De même, Donkoret *et al.*, (2007) ; Monnet *et al.*, (2008) ; Roudjet *et al.*, (2009) ont rapporté que dans le lait de chamelle les *Lactobacilles* possède généralement une activité protéolytique plus élevée que les *Lactocoques*. En plus de ça (Belkheir *et al.*, 2016) ont trouvé tous les isolats de *Leuconostoc* et de *Lactobacilles* présentaient des valeurs d'activités de Lys-AP supérieures à celles de Leu-AP.

2.3. Aptitude lipolytique

L'activité lipolytique des bactéries lactiques a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans le développement de la qualité organoleptique par formation des substances aromatiques des produits transformés tels

que les produits laitiers. Ceci est dû à la présence des estérases qui hydrolysent les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8). Ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (**Béalet *al.*, 2008 ; Serhanet *al.*, 2009**).

Bien que cette activité puisse être responsable de la détérioration du goût si elle n'est pas employée de manière contrôlée dans la production de certains fromages comme le Brie et le Saint Paulin (**Chilliard, 1982**). Ces activités lipolytiques sont généralement faibles chez les BL, et les *Lactocoques* considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus Thermophilus* et les *Lactobacilles* (**Chilliard, 1982**). Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béaletal., 2008**).

2.4.Aptitude texturant

Les BL produisant des exo-polysaccharides (EPS); ces microorganismes présentent une importance industrielle dans l'amélioration de produits alimentaires et sont utilisés comme cultures starters pour la production du yaourt, le fromage et les produits à base de céréales (**Liu *et al.*, 2010**).

Ces EPS sont formées par une succession d'unités répétitives linéaires ou ramifiées de monosaccharides reliés entre eux par des liens osidiques. Ces unités sont principalement le glucose, le galactose, le mannose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, et le fructose, en proportions variables (**Khue et Ngoc, 2013, Finoreet *al.*, 2014, Zarour, 2018**).

Certaines souches des bactéries lactiques ont la caractéristique de synthétiser des EPS, glucanes (dextranes) et fructosanes (levanes) (**Leveau et Bouix, 1993**). Ces polymères de sucre jouent un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Comme exemple, les *Lb. Delbruecki*ssp. *Bulgaricus* et *Streptococcus Thermophilus* produisant des EPS, qui sont utilisés dans la fabrication des yaourts pour améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité du produit fini. De même, l'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. Lactis*ssp. *cremoris* sont très prometteuses pour la rhéologie des produits laitiers fermentés (**Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho *et al.*, 2007**).

2.5. Aptitude aromatisante

Les BL possèdent des caractéristiques technologiques essentielles pour l'obtention d'une bioconservation optimale, d'un arôme et d'une texture caractéristique des produits alimentaires fermentés. Elles sont capables de synthétiser de nombreux composés aromatiques tels que l' α -acétoacétate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétone et 2,3-butanediol, l'acétate, le formiate. Ces composés sont synthétisés principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette propriété est importante lors d'élaboration des fromages, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006**).

En plus, le diacétyl est le principal composé aromatique de nombreux produits laitiers à l'arôme de beurre (**Francoiset *al.*, 2007**). *Lactococcus lactis* ssp. *Diacetylactis* est considérée comme principal fournisseur de diacétyl et d'acétaldéhyde à partir de citrate (**Doleyres, 2003**).

2.6. Activité antimicrobienne

Cette activité est liée à la capacité des bactéries lactiques de synthétiser différents métabolites comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines, qui sont capables de réduire la croissance bactérienne (**Turpin, 2011**).

Parmi les acides organiques, on trouve, l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique, qui sont élaborés au cours de la fermentation des glucides, et peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le H₂O₂ produit par les BL s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. L'accumulation de CO₂ comme métabolite secondaire dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. D'autre part, le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et des moisissures (**Alakomiet *al.*, 2000 ; Ammoret *al.*, 2006**).

Parmi les bactériocines on peut citer la plantarcine produite par *Lactobacillus plantarum*, l'entéroccine produite par *Enterococcus faecium*, lactococcine A, la lactococcine B et la lactococcine M produites par *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, mésentéroccine produite par *Leuconostoc mesenteroides* (**Makhloufi, 2011**).

La nisine synthétisée par *Lactococcus lactis* est utilisée comme additif alimentaire afin d'inhiber le développement des espèces nuisibles responsables des intoxications alimentaires (**Doumandjiet al., 2010**). Elle est efficace contre les germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutyricum*(**Kalchayanand et al., 1992, de Arauzet al., 2009**).

Généralement les bactériocines produites par les BL partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari et al., 2009**). Toutes les différentes propriétés des bactériocines permettraient d'inhiber la croissance des microorganismes indésirables sans modification des propriétés organoleptiques du produit (**Meghoufel, 2019**).

3. Principales genres ou espèces des bactéries lactiques camelin à pouvoirs technologiques puissants

Parmi les Principaux genre de bactéries lactiques camelin qui possèdent une forte activité acidifiant, ce *Lactobacilles sp.* Qui sont utilisés comme cultures starters dans l'industrie laitière (**Belkheir et al., 2016**). D'après (**Vedamuthu, 1994**) ont rapporté que les souches lactiques qui possèdent une bonne activité aromatique sont à partir de *Ln. Mesenteroides* et *Ln. Lactis* qui produisent des arômes à partir de citrate.

(**Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007**) ont montré que EPS produits par les souches *Lc. Lactis* sp. *Cremoris* sont très prometteuse pour la rhéologie des produits laitiers.

Badis et Mebrouk.(2004) ont rapporté que les *Lactobacilles* présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les *Lactocoques*, et parmi les souches qui a montré une forte activité protéolytique *Lb. helveticus*.

Dans la dégradation des lipide (**Béalet al., 2008**) à montrer que *Lactocoque* possède une activité lipolytique importante.

Kalchayanand et al.(1992), de Arauzet al.(2009) ont montré que l'espèce *Lactococcus lactis* joue un rôle important dans la préservation des aliments par la production de la nisine qui possède une activité à large spectre contre les bactéries pathogènes.



PARTIE II
Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

1. Lieu et période d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de microbiologie 1, CRAPC (Centre de recherche en science et technique d'analyse physique et chimique), situé au niveau du nouveau pôle universitaire, université de KasdiMerbah–Ouargla. Dans lesquels différentes analyses de ce travail ont été réalisées à fin d'étudier le pouvoir technologique des bactéries lactique isolées à partir de Smencamelin, cette étude a été effectuée durant la période du 27 novembre 2021 jusqu'au 26 mai 2022.

1. Préparation de Smen

Le beurre de chamelle fermenté (ou Smen camelin) est élaboré dans le laboratoire de CRAPC selon la méthode traditionnelle citée par **Mosbahet al.,(2022)**.

L'ensemble de trois (3) échantillons de lait cru (1L) sont traités à partir des chamelles (*Camillus dromedarius*) élevées par un système d'élevage intensif dans la région de Ghardaïa, les échantillons sont transportés au laboratoire et laissés fermentés spontanément pendant environ 96 heures à la température ambiante jusqu'à l'obtention du « Raib ». Ce dernier est baratté dans un agitateur incubateur (500 agitation/min) à température (35°C) pendant 45 min dans le but d'homogénéiser la matière grasse.

La séparation de la crème se fait par centrifugation du lait à 3500 g/min pendant 20 min à 4°C. La crème sur la surface est récupérée par une cuillère dans un béccher propre. Cette opération est répétée deux fois afin de récupérer le maximum de la matière grasse. La crème fermentée est lavée par l'eau salée (5% de NaCl) froide, afin d'éliminer la trace de lait restante.

Le Smen camelin ou le beurre de chamelle fermenté est mûri par l'entreposage (2ème fermentation) de la crème fermentée dans un pot de terre à un endroit sec et sombre et à température ambiante durant 3 mois.

2. Isolement et pré-identification des bactéries lactiques

2.1. Préparation des dilutions décimales et isolement

Peser 10 g d'échantillon de Smen dans un récipient avec 90 ml d'eau physiologique. Placer le récipient dans un bain Marie à 45°C et mélanger jusqu'à la

fusion de Smen et puis préparer les dilutions décimales suivantes jusqu'à la dilution 10^{-5} (Norme ISO 6887-4, 2003).

Prélever aseptiquement à l'aide d'une micropipette stérile 1ml de la solution mère et l'introduire dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique pour réaliser la dilution 10^{-2} et agiter bien, Ensuite, transférer 1ml de ce premier tube dans le deuxième et de la même façon les dilutions décimales successives sont effectuées (jusqu'à 10^{-5}). Pour chaque dilution décimales 2 boîtes de Pétri sontensemencées par transfert de 1ml dans chaque boîte.

Couler la gélose M.R.S(Annexe 01) maintenue en surfusion à 45°C dans des boîtes de Pétri. Pour obtenir une répartition homogène des colonies, on procède par remuage des boîtes sur une surface plane en veillant à inverser régulièrement le sens de rotation ; laisse la gélose se solidifier. Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C et 37°C jusqu'à la croissance des colonies (maximum 48h) (de Man Rogosaet al., 1960).

2.2.Purification

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur MRS liquide (Annexe 01) et sur MRS solide par la méthode des stries jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches. L'incubation se fait à 30°C et 37°C pendant 24h à 48h.

2.3.Pré-identification des isolats

2.3.1. Tests morphologiques

2.3.1.1.L'aspect 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 sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (Badis et al., 2005).

2.3.1.2.Aspect microscopique

2.3.1.2.1. Test de la catalase

L'activité catalytique se traduit par l'intervention d'une enzyme respiratoire appelé catalase qui permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et oxygène



(O₂). Celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :

La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H₂O₂ à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (**Guiraud J.P., 2003**).

2.3.1.2.2. Coloration de Gram(Annexe 04)

C'est une étape très importante dans l'identification de genre (**Badiset al.,2004**). Elle consiste à distinguer entre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif par rapport leurs constituants de la paroi bactérienne. Plus précisément, par rapport à l'épaisseur du peptidoglycane.

2.3.1.3.Conservation des isolats

Pour une bonne continuité du travail, les isolats purifiés doivent être bien conservés. Les mesures techniques, nécessaires à la conservation d'un isolat, seront prises le plus rapidement possibles après l'isolement.

2.3.1.3.1. Conservation à court terme

Dont laquelle un ensemencement a été effectué sur gélose MRS incliné et incubé à 30°C et 37°C, après l'apparition des colonies les cultures ont été maintenues sous une température de 4°C deux tubes à chaque souche (**Saidi et al., 2002**).

2.3.1.3.2. Conservation à longue terme

Elle a été faite à partir des cultures jeunes sur milieu liquide et après une centrifugation à 8000 g/min pendant 10 min. Le culot est récupéré et rincé par l'eau distillée stérile. Une autre centrifugation a été fait et le culot est ajouté en eppendorf avec un milieu de culture de conservation est composé de 3 ml de glycérol et 6 ml de bouillon MRS. Le tout est conservé à une température de -20°C (**Badiset al., 2005**).

2.3.2. Tests physiologiques

2.3.2.1.Croissance à différentes températures

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4°C, 10°C, 15°C, 30°C, 37°C et 42°C.

Alors que la thermorésistante des bactéries a été tester au bain marie à 55°C/15 minutes et 63°C/30 minutes puis on a incubé à 30°C et 37°C /5 jours d'incubation (**Idouiet al., 2009**).

Ces tests vont nous aider à distinguer les souches mésophiles et des thermophiles ainsi que thermorésistantes.

2.3.2.2.Résistance à la salinité

La croissance des isolats purs en présence de différentes concentrations de Na Cl, à savoir (3% Na Cl, 6.5% Na Cl, 9.6% Na Cl) ont étéensemencé puis incubé à 30°C et 37°C pendant 2 à 3 jours, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble (Ghozlane, 2012).

2.3.2.3.Croissance à différent pH

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 18h à 30°C et 37°C), ces derniers ont étéensemencées dans un milieu MRS liquide à : pH 3.5, pH 9.6 et incubé à 30°C et 37°C pendant 2 à 3 jours.

2.3.3. Tests biochimiques

2.3.3.1.Recherche de type fermentaire

Ce test permet de connaître le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz à partir de la dégradation du glucose. Les souches isolées sontensemencées dans un bouillon MRS contenant les cloches des durhams, puis incubés à 30°C et 37°C pendant 24h. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire. Le type fermentaire de *Leuconostocest* hétérofermentaire (le métabolisme de glucose produit des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂. Le type fermentaire de *Leuconostocest*hétérofermentaire (le métabolisme de glucose produit des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂(Carr *et al.*, 2002).

2.3.3.2.Hydrolyse de l'arginine

L'arginine d'hydrolase (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en ammoniac, et des acides aminés (composés basiques) mis en évidence par l'ensemencement des souches sur milieu M16 BCP(Annexe 01), après incubation à 30°C et 37°C à 24h en anaérobiose. Le virage de milieu de vert au jaune (car on a utilisé l'indicateur coloré le bleu de bromothymol) indique qu'il n'y a pas d'hydrolyse de l'arginine. Par contre les colonies de couleur blanches hydrolysent l'arginine (Thomas, 1973).

2.3.3.3.Utilisations des sucres

La vérification de la capacité de dégradation des sucres de ces souches isolées a été effectuée sur bouillon MRS.BCP (Annexe 01), dépourvu d'extrait de viande et sans sucre (**Badis et al., 2005**).

Les sucres utilisés dans ce test sont les suivants : Mannose, Xylose, Arabinose, Ribose, Lactose, Maltose, Fructose, Galactose, Raffinose, Amidon, Rhamnose, Mannitol. Des solutions sucrées ont été préparées de 1g de chaque sucre avec 10 ml de l'eau distillée stérile, le tout a été homogénéisé dans vortex3500 tour /min, puis stérilisé à 100°C pendant 10 min au bain Marie.

Trois cultures jeunes de chaque souche ont été préparées, puis une centrifugation de chaque culture dans un tube d'appendorf a été effectuée à 4000 tours pendant 10 min. Le culot a été récupéré et additionné à l'eau distillée stérile puis une autre centrifugation a été réalisée pour éliminer les restes de milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur ; ce rinçage est réalisé deux fois consécutives, et après, 01 ml de bouillon MRS.BCP(Annexe 08), a été ajouté sur le culot récupéré de la dernière centrifugation et bien homogénéisé (**Hansal, 2015**).

L'ensemencement a été réalisé dans des microplaquettes contenant des puits, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différentes souches, chaque puits contient 200 µl de MRS.BCP avec 20µl de solution sucrée et 20µl de suspension bactérienne, le tout a été recouvert par une couche d'huile de paraffine.

Les microplaquettes ont été incubées à 30°C et 37°C pendant 72h et vérifiées chaque 24h (**Guessas, 2006**).

2.3.3.4.Culture sur lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser dans le lait à 0% matière gras en présence de bleu de méthylène à différentes concentrations. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé (0% matière gras) au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 30°C pendant 24h à 48h. La réaction positive se traduit par la réduction de bleu de méthylène qui vire du bleu (forme oxydée) vers le transparent (forme réduite) (**Maghnia, 2011**).

2.3.4. Tests biotechnologiques

2.3.4.1. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est recherchée, sur la gélose MRS additionnée de lait écrémé totalement (5ml dans 100ml gélose MRS) 5% coulé, solidifiée et séchée puisensemencé avec 5µl de la culture jeune de chaque souche en touche à la surface du milieu solide et à des distances égales les unes des autres. On laisse les souches sécher et on incube les boîtes à 30°C et 37°C pendant 24h à 48h (**Van Den Berg et al., 1993**).

L'effet protéolytique est traduit par l'apparition des halos clairs autour des colonies bactériennes. Les halos les plus larges indiquent que les souches ont une activité protéolytique plus importante.

2.3.4.2. Activité lipolytiques

L'activité lipolytique est recherchée sur milieu MRS additionné de 2% de Tween 80 (sources lipidiques artificielles) et 2% de CaCO₃ homogénéisé bien le flacon, couler les boîtes, les laisser solidifiée et séchée, puisensemencées les boîtes par touches. Après incubation à 30°C et 37°C pendant 24 à 48h, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée des souchesensemencées (**Guiraud et al., 1980**).

2.3.4.3. Production des Exopolysaccharides

Le dextrane est un exo-polysaccharide produit par quelques espèces du genre *Leuconostoc* ainsi que d'autres genres bactériens. La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (Annexe 01), (**Mayeux et al., 1962**).

Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies bleues, larges, visqueuses, gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'identification permettant d'identifier les souches du *Leuconostoc* productrices et non d'EPS. On a réalisé des ensemencements sur milieu MSE par des pré-cultures de 18h et incubé à 30°C et 37°C pendant 24h à 48h (**Sanchez et al., 2005**).

2.3.4.4. Production des substances aromatiques

La production des substances aromatiques est une propriété spécifique aux bactéries lactiques chez lesquelles 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 gélose KMK(Annexe 01), dont la seule source de carbone est le citrate qui va alcaliniser le milieu après leur utilisation par les bactéries. L'ensemencement est effectué par stries sur la surface à partir d'un milieu solide et incubé à 30°C et 37°C durant 24h (Guiraud, 1980).

2.3.4.5. Production des substances antimicrobiennes

2.3.4.5.1. Interaction microbienne

Dans cette partie on a réalisé des interactions entre les souches lactiques isolées du Smen de chamelle et 04 souches pathogènes de références. Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le (Tableau I) :

Tableau I: Souches pathogènes utilisées dans le test antimicrobien

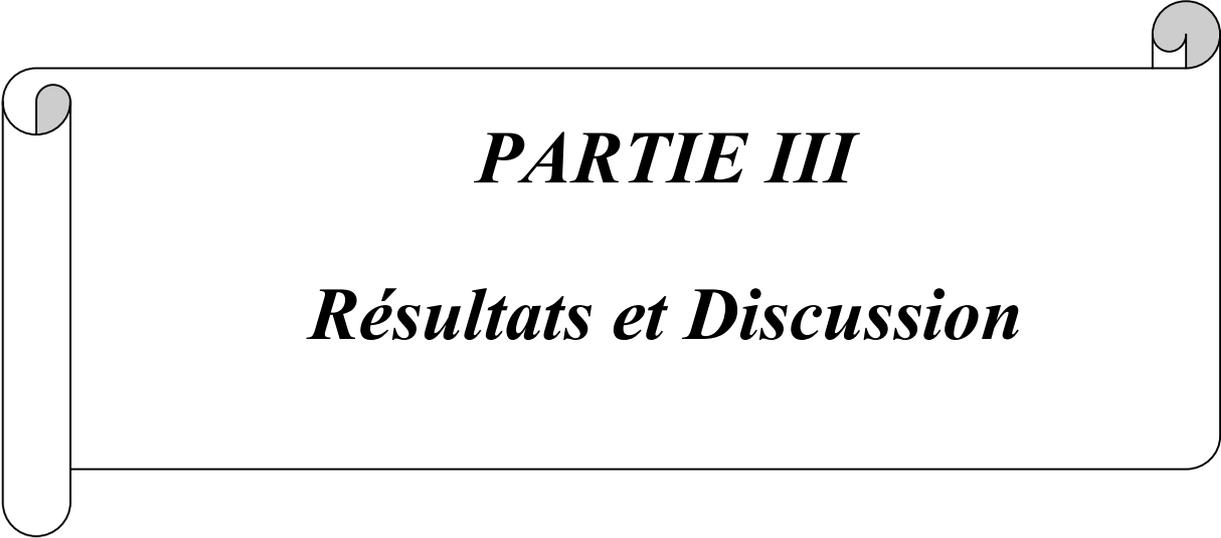
Numéro	Bactéries	Gram	Référence
6	<i>Salmonella enterica</i>	Négative	ATCC6017
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	ATCC25923
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	ATCC9027
12	<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC25992

✓ Préparation des précultures des bactéries pathogènes

Dans un premier temps ces bactéries sont cultivées à 37°C±1,1ml sur 10 ml de bouillon nutritif pendant 18 à 24h. La culture obtenue de 24h, servirait d'inoculum.

2.3.4.5.2. Methoddirect (Spot agar test)

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode (Fleming *et al.*, 1975). Le milieu MRS est ensemencé en touche par nos isolats (souches inhibitrices). Après 24heures d'incubation une couche du milieu Mueller-Hinton(Annexe 05), semi solide est ensemencée par la souche indicatrice (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) est coulée à la surface puis ré incubée pour 24 à 48 heures supplémentaire. Les souches présentant une zone claire tout autour sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both with rounded ends and a slight shadow effect.

PARTIE III

Résultats et Discussion

III. Résultats et discussion

1. Pré-identification des bactéries lactiques isolé à partir du Smen camelin

1.1.Examen macroscopique et microscopique

Cette étape consiste en la description des colonies obtenues après l'isolement des souches lactiques à partir du beurre de chamelle fermenté. L'observation macroscopique des cultures sur les géloses MRS, révèle la présence des colonies arrondies, lenticulaires, bombées, de couleur blanchâtre crème à défirrent taille (Photo 8, Annexe 05).

Dans le bouillon MRS, la croissance bactérienne est apparue sous forme d'un trouble. L'observation microscopique après la coloration de Gram a révélé que toutes les souches Gram positif sont présumées des bactéries lactiques ; elles se présentent en forme de bâtonnet disposées en chaînette plus ou moins longue ou en amas ou des coques disposées en amas, en chaînes, et en paires et des bacilles disposés en chaînes et en amas (Photo 9, Annexe 05).

1.2.Test de recherche de la catalase

Toutes les souches qui ont été testées ne possèdent pas l'enzyme catalase donc le test est négatif. Toutes les souches qui ont été Gram positif et catalase négatif ont été retenues (Photo 10, Annexe 05).

Sur 37 isolats purifiés et examinés, on a sélectionné 10 souches qui sont Gram positive et catalase négative et présentent des caractères biochimiques et physiologiques différents. L'ensemble des critères morphologiques des isolats sont présentées dans le (Tableau II). Selon (**Guiraud J.P., 2003**) le caractère Gram positif et catalase négative sont des deux caractéristiques communes des bactéries lactiques.

Tableau II: Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées à partir de Smen camelin

Souches	Coloration de Gram	Test de catalase	Forme	Regroupement
S3	+	-	Coques	En Court chaînes
S5	+	-	Cocci	Diplocoques, en chaînes
S8	+	-	Bacille	En amas
S9	+	-	Coques	Enchaînés
S20	+	-	Bâtonne courte	Isolées, en petite amas
M1	+	-	Cocci	Diplocoques, en petite amas
M2	+	-	Coques	En amas et en Courtes chaînes
M5	+	-	Cocci	En amas
M9	+	-	Coccobacille	Diplocoques, en Courtes chaînes
M14	+	-	Bacille	En amas et en Courtes chaînes

S. souche pousse à 30 C°

M. souche pousse à 37 C°

2. Tests physiologiques

Les caractéristiques physiologiques des isolats sont présentées dans les deux (Tableau III), (Tableau IV) et (Tableau V).

2.1. Test de croissance à différentes températures

Les résultats sont présentés dans le (Tableau III), toutes les souches testées ont montré la capacité de croître à la température 15°C et 42°C. Quatre isolats (S20, M1, M2, M5) ont montré une capacité à croître à 4°C et 10°C par contre deux isolats (M9, M14) ne peuvent pas croître à ces deux températures. Selon **Tailliez, (2004)**, la plupart des *Lactobacilles* se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C.

2.2. Thermorésistance

Les résultats sont présentés dans le (tableau IV), toutes les souches présentent une capacité à résistera traitement thermique à 55°C pendant 15 minutes et 62°C pendant 30 minutes, sauf la souche S5, M9.

Tableau II : Les résultats du test de croissance à différentes températures

Caractères Souches	Croissance à différentes T°			
	4 C°	10 C°	15 C°	42 C°
S3	+	-	+	+
S5	-	+	+	+
S8	-	+	+	+
S9	-	±	+	+
S20	+	±	+	+
M1	+	+	+	+
M2	+	+	+	+
M5	+	+	+	-
M9	-	-	+	+
M14	-	-	+	+

Tableau III : Les résultats du test de thermorésistance

Caractères Souches	Thermorésistance à 55 C°/15 min	Thermorésistance à 62 C°/30 min
S3	+	+
S5	-	-
S8	+	+
S9	+	+
S20	+	+
M1	+	+
M2	+	±
M5	+	+
M9	-	-
M14	+	+

2.3. Test de croissance à différents pH et concentrations en NaCl

Les résultats sont présentés dans le (Tableau V), la totalité de ces souches présentent la capacité de croître à pH 9,6 et NaCl 3%. Tandis que, les isolats (M2, M9) résistent dans toutes les concentrations de NaCl et pH testés et ce sont les seuls isolats qui résistent à 9,6% de NaCl.

D'après **Zadi-Karam (2006)**, les bactéries qui vivent dans le lait camelin sont adaptées à sa salinité et peuvent par conséquent être exploitées dans les transformations technologiques et dans la fermentation des produits salés tels les fromages salés, les olives et les concombres.

Tableau IV: Les résultats du test de croissance à différents pH et à différentes concentrations en NaCl (%)

Caractères	Croissance à différentes concentrations de NaCl			Croissance à différents pH	
	3 %	6.5%	9.6%	3.5	9.6
Souches					
S3	+	-	-	-	+
S5	+	-	-	-	+
S8	+	+	-	+	+
S9	+	-	-	-	+
S20	+	-	-	+	+
M1	+	+	-	+	+
M2	+	+	+	+	+
M5	+	+	-	+	+
M9	+	+	+	+	+
M14	+	-	-	-	+

3. Tests biochimiques

Les caractéristiques biochimiques des isolats sont présentées dans le (Tableau VI).

Tableau V:Les résultats des tests biochimiques des souches isolées

Caractère Souche	Type fermentaire	ADH	Citrates	Lait de Sherman			
				0.1%		0.3%	
				R	C	R	C
S3	Hom	-	-	-	-	-	-
S5	Hét	-	-	+	-	-	-
S8	Hom	-	+	+	+	-	-
S9	Hom	-	+	-	-	-	-
S20	Hét	-	+	+	+	-	-
M1	Hom	+	+	+	+	+	±
M2	Hom	+	-	-	-	-	-
M5	Hom	+	+	+	+	+	+
M9	Hét	-	+	+	+	-	-
M14	Hom	-	+	-	-	-	-

Hét :Hétérofermentaires /**Hom** :Homofermentaire / + : test positif / - : test négatif

± : Résultat intermédiaire /**R** : Réduction / **C** : Coagulation

3.1.Recherche du type fermentaire

La recherche de type fermentaire est Parmi les premières clés d'identification phénotypique des bactéries lactiques leur objectif est de faire différencier entre les souches hétérofermentaires et les souches homofermentaires(**Hansal, 2015**).

Les résultats montrent que la production de gaz (CO₂) à partir du glucose à été observée chez les souchesS5, S20 et M9. Ces isolats sont considérés comme hétérofermentaires.

La production de CO₂a été observée au niveau de la cloche avec l'apparition d'une trouble au fond des tubes (Photo 11, Annexe 06). Le reste des souches S3, S8, S9, M1, M2, M5, et M14 sont considérés comme homofermentaires.

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ à des proportions égales (**Carr et al., 2002**).

3.2.Hydrolyse de l'arginine

L'activité de l'arginine déshydrogénase effectuée sur les 10 souches, sur milieu M16-BCP a révélé que les souches M1, M2 et M5, sont ADH positive « couleurviolet »(Photo 6) et le reste des souches sont ADH négatif « couleurjaune »(Photo 6).

D'après **Khaddidet al., (2006)**, la fermentation du lactose par les bactéries rend le milieu acide avec une coloration jaune en présence de l'indicateur de pH (BCP). Et les souches ont ADH positive dégrade l'arginine et produire l'ammoniac qui augmente le pH du milieu et qui provoque le virage de couleur en violet (**Thomas., 1973**).

3.3.Lait de Sherman

Test lait de Sherman permet de mettre en évidence le développement des bactéries en présence de bleu de méthylène et de différencier entre *Lactocoques* et *Entérocoques*. Les quatre souches S3, S9 et M2, M14) ne réduisent pas le bleu de méthylène à 0.1% et 0.3% et reste la couleur bleue (forme oxydé) (Photo 1). Par contre, les souches S5, S8, S20, M1, M5, M9 réduisent le bleu de méthylène à deux concentration, changement de couleur vers blanc (forme réduite) (Photo 2).

Ce test porte toujours sur le système respiratoire du *Lactocoques*, vu que ce sont des microaérophiles, ils ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur du lait (bleue) ne virera que légèrement ver le blanc et ce contrairement aux *Entérocoques* (aérobies) qui utilisent tout l'oxygène du bleu de méthylène (**Larpentetal., 1990**).



Photo 2: Résultat du test de lait de Sherman (forme oxydé)



Photo 1 : Résultat du test de lait de Sherman (forme réduit)

3.4. Test de dégradation des sucres

Ce test permet de mettre en évidence la fermentation des sucres par les souches et produit des acides se manifeste par un virage de couleur au jaune (Photo 3) (**Guiraud J.P., 2003**). Les résultats de ce teste sont présentées dans le (Tableau VIII,Annexe 6).

Le profil fermentaire des sucres nous a permis de confirmer la pré-identification de nos isolats et nous remarquons qu'il y a des variabilités concernant la fermentation des sucres et ceci peut être expliqué par la différence des souches.

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques.

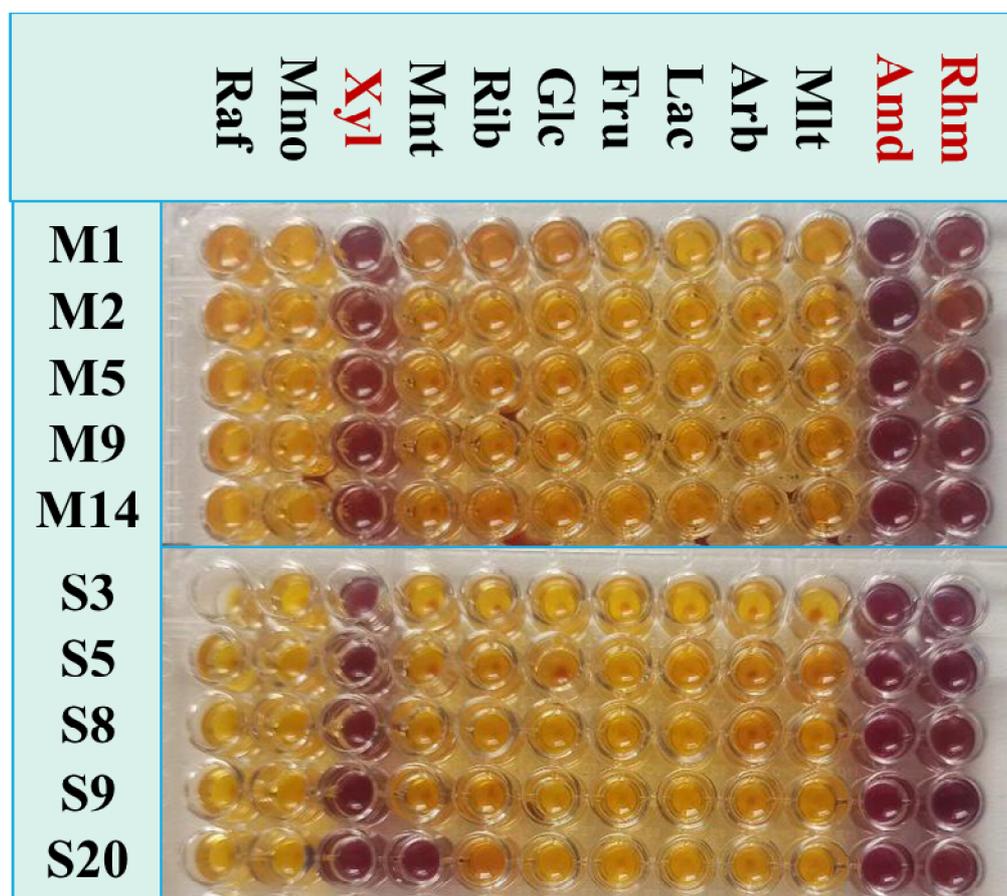


Photo 3: Résultats de la fermentation des carbohydrates par les souches bactériennes sur une plaque d'Elise

Tous les isolats sont incapables d'utiliser le xylose et l'amidon.

D'après les résultats de Pré-identification obtenus, et suite de la comparaison avec la littérature (**Guiraud J.P., 2003**) les souches obtenues présentent la répartition suivante; donnée par la (Figure 1).

- S8, S20, M14: *Lactobacillus sp.*
- S3, S9: *Streptococcus sp.*
- S5, M9: *Leuconostoc sp.*
- M1, M5 : *Enterococcus sp.*
- M2 : *Lactococcus sp.*

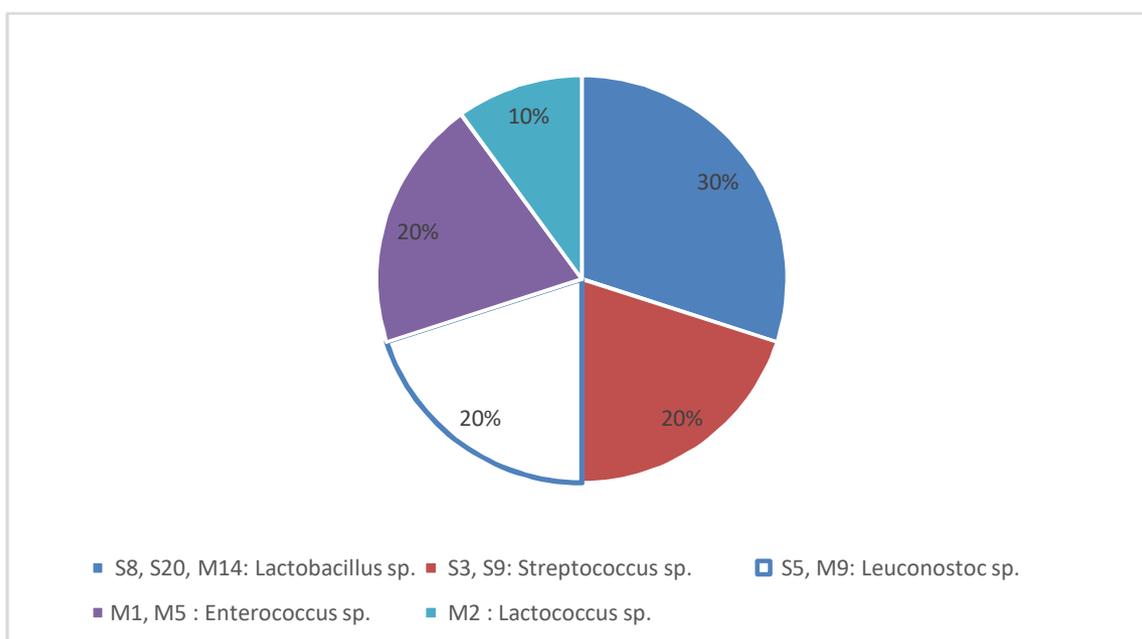


Figure 1 : Répartition des espèces de la collection lactique (%)

4. Tests technologiques

4.1. Pouvoir protéolytique

Dans cette étude toutes les souches ont montré une activité protéolytique positive, et qui varie d'une souche à l'autre et qui se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des souches ensemencées ceci est grâce à la dégradation de la caséine (**Hansal, 2015**).

Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont résumés dans le (Tableau IX, annexe7) et l'histogramme dans la (Figure 3, Annexe 07) et (Photo 4).

Selon **Vuillemard (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm Alors les souches présentent un

activité protéolytique positive correspondent à S3, S8, S9, S20, M1, M2, M5, M14 (Photo 4).

Les souches S8, S20, M14 présentent une activité protéolytique plus importante par rapport à la souche M2 ce résultat s'accorde avec la littérature (**Donkoretal., 2007 ; Monnet *etal.*, 2008 ; Roudjet *al.*, 2009**) on rapporte que les *Lactobacilles* présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les *Lactocoques*.

Les deux isolats S5, M9 considérés comme des protéolyse négative ce résultat s'accorde avec les littératures **Kanza Z, (2015)** ont rapporté que *Leuconostoc* n'ont pas un pouvoir protéolytique ce qui empêche l'émergence d'un goût amer lors de la fermentation du lait.

D'autre part **Arizcunetal., (1997)**, ont montré que les niveaux de l'activité d'aminopeptidase et protéinase des *Entérocoques* est faible. Contrairement aux *Lactobacilles* qui possèdent une forte activité d'aminopeptidase (**Litopoulo-Tzanetakietal., 2011**).

Certains acides aminés étant impliqués dans la production de composés aromatiques, soit directement ou indirectement, servant de précurseurs pour les

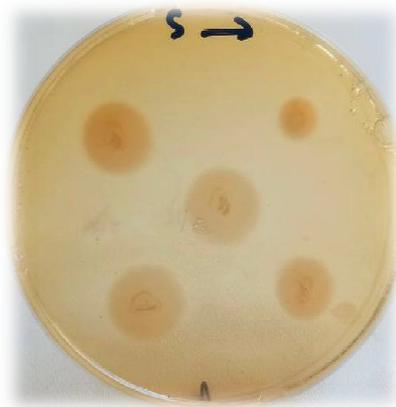


Photo 4: Activité protéolytique des isolats sur milieu MRS additionné de lait écrémé

aldéhydes, acides, alcools ou esters (**Ayadetal., 2001**).

4.2. Pouvoir lipolytique

Le résultat du pouvoir lipolytique montre que toutes les souches présentent une légère activité lipolytique (faible halo clair entourant la culture bactérienne) (Photo 5).

D'une manière générale l'activité lipolytique des bactéries lactiques est faible et varie d'une espèce à l'autre. En effet, il a été démontré que les *Lactobacilles* et *Strptococcusthermophilus*, présentent des activités lipolytiques faibles comparés aux *Lactocoques* qui eux sont considérés plus lipolytiques (Béalet *al.*, 2008).

Cette faible activité lipolytique présente un avantage quant à leur utilisation en tant que cultures starter, provoquant ainsi une dégradation limitée des composés gras du lait, juste suffisante pour produire les produits aromatiques sans provoquer la rancidité du produit fini (Mc sweeneyet Sousa, 2000).

D'après Deeth et Touch, (2000); les enzymes lipolytiques coupent les liaisons esters des triacylglycérols, produisant des mono- et des diacylglycérols et des acides gras libres, qui jouent un rôle de précurseur important dans les réactions cataboliques, qui produisent des composés volatils et contribuent à la flaveur des fromages (MC Sweeneyet *al.*, 2000).



Photo 5 : Activité lipolytique des isolats sur gélose MRS additionné au tween 80

4.3. Pouvoir aromatique

Les souches à citrate positif sont capables de fermenter le citrate permettent la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanure de cette façon résulte la formation des colonies bleues. D'autre part, les souches à citrate négatif peut être expliqué par la perte de plasmide codant pour le citrate perméase (Kihalet *al.*, 1996). Dans notre cas toutes les souches isolées sont citrate positif sauf la souche S3 qui ne dégradent pas le citrate (Tableau VII) (Photo6).

La capacité d'utiliser le citrate par les BL est un caractère technologique important dans le domaine industriel par leur activité aromatique. Parmi les souches possèdent une

bonne activité aromatique on cite *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Mannueta *et al.*, 2000).

Par ailleurs, certaines espèces du genre *Pediococcus* sont capables de métaboliser le citrate et le malate en acétone et diacétyl qui enrichissent les saveurs du fromage, du beurre et d'autres produits laitiers (Papagianni et Anastasiadou, 2009).

Hemmeet *al.*, (2004) ont rapporté que le genre *Leuconostoc* joue des rôles importants dans la technologie des produits laitiers, en particulier par la production de gaz et des composés aromatiques.

Il existe certaines espèces de bactéries lactiques capables de synthétiser des arômes comme le diacétyl, acétone, 2,3-butanediol et α -acétoacétate à partir du pyruvate. Parmi ces espèces *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Raynaud *et al.*, 2003 ; Leroy et Devuyst., 2004) et aussi *Lb. plantarum* (Montville *et al.*, 1987).

Par contre *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ne possèdent pas la capacité de produire l'acétone comme substance aromatique (Badiset *et al.*, 2002 ; Badiset *et al.*, 2005 et Ghazi *et al.*, 2009).

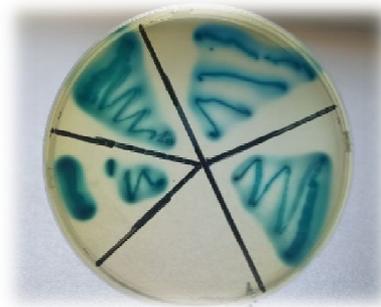


Photo 6: Résultats de dégradation de citrate révélés par l'apparition des colonies de couleur bleu sur gélose KMK

Tableau VI : Les résultats du test de la dégradation de citrate

Souche	Genre	Dégradation de citrate
S3	<i>Streptococcus sp</i>	-
S5	<i>Leuconostocsp</i>	+
S8	<i>Lactobacillus sp</i>	+
S9	<i>Streptococcus sp</i>	+
S20	<i>Lactobacillus sp</i>	+
M1	<i>Enterococcussp</i>	+
M2	<i>Lactococcussp</i>	+
M5	<i>Enterococcussp</i>	+
M9	<i>Leuconostocsp</i>	+
M14	<i>Lactobacillus sp</i>	+

4.4. Activité antibactérienne

Ce test permet de mettre en évidence l'activité antimicrobienne que possèdent les souches isolées à inhiber d'autres souches pathogènes. Cette activité se révèle par l'apparition d'une zone d'inhibition dans le milieu. Un résultat est considéré positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2mm (**Tabak, 2012**).

Tous les isolats des bactéries lactiques sélectionnées possèdent une forte capacité inhibitrice vis-à-vis des bactéries pathogènes testées (Figure 2) (Tableau X, Annexe 07) et les photos suivent (photo 7) et (14, 15, 16, 17, Annexe 07).

D'après les résultats obtenus, nos bactéries isolées sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antimicrobienne variable.

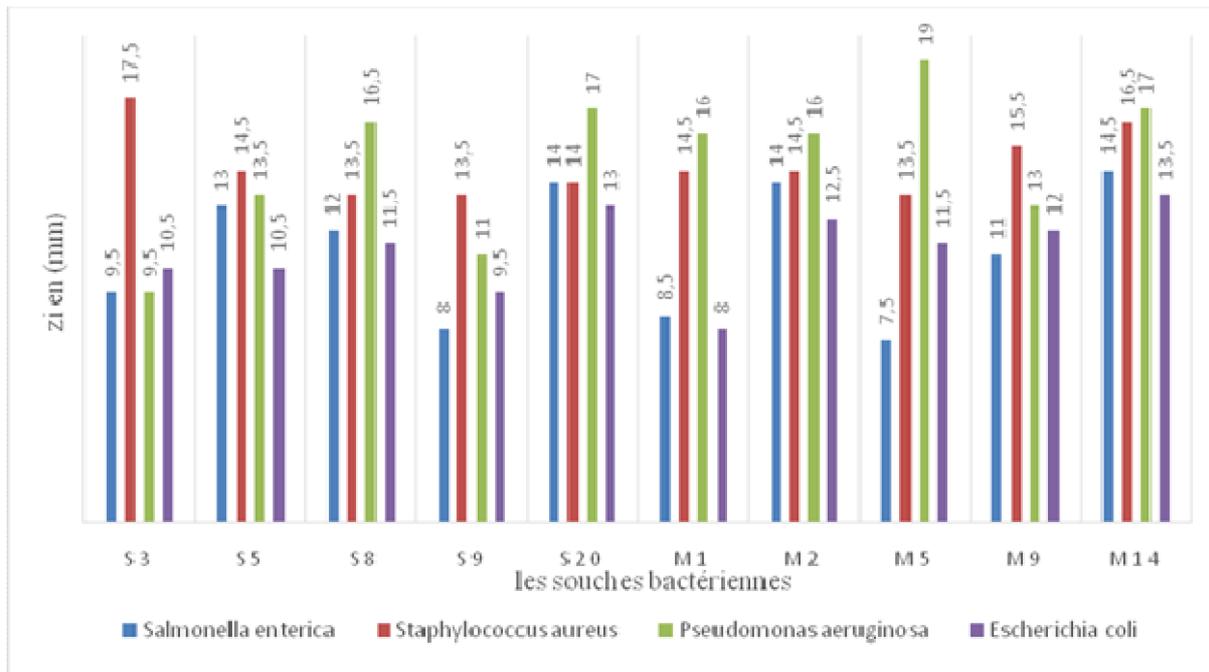


Figure 2: L'activité antimicrobienne des souches isolées vis-à-vis les bactéries pathogènes

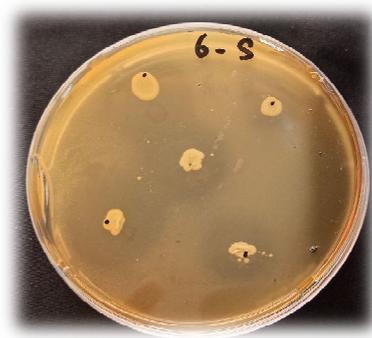


Photo 7: Résultats de l'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre *Salmonella enterica* ATCC6017

L'activité antibactérienne la plus importante a été détectée avec l'isolat M14 qui a inhibé la croissance de toutes les souches pathogènes. Par contre l'isolat S9 a montré une faible activité antibactérienne contre la plupart des souches pathogène par rapport aux autres isolats. L'action inhibitrice des bactéries lactique se fait par la sécrétion des métabolites primaires (acide lactique et acétique ...) ainsi que à la production d'autres composés antimicrobiens, tels que l'acide formique, hydrogène peroxyde et bactériocines (Titieket *al.*, 1996 ; Aslam et Qazi, 2010).

L'accumulation des composés inhibiteurs joue un rôle important dans les mécanismes de bio-conservation des aliments (**Delgado et al., 2001**).

D'après **Charlier et al., (2009)** ont montré que *Lactococcus ssp.* Et *Leuconostoc sp.* Présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui est induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

Antonio et al.,(1999) ont montré que la production d'acide lactique par les *Lactobacilles* contribue, avec le maintien d'un pH acide inférieur à 4,5 à réduire fortement les risques de certaines infections. Comme le cas d'*E. coli* qui est inhibée par l'acide lactique à pH de 5,1 (**Taylor,2005**)

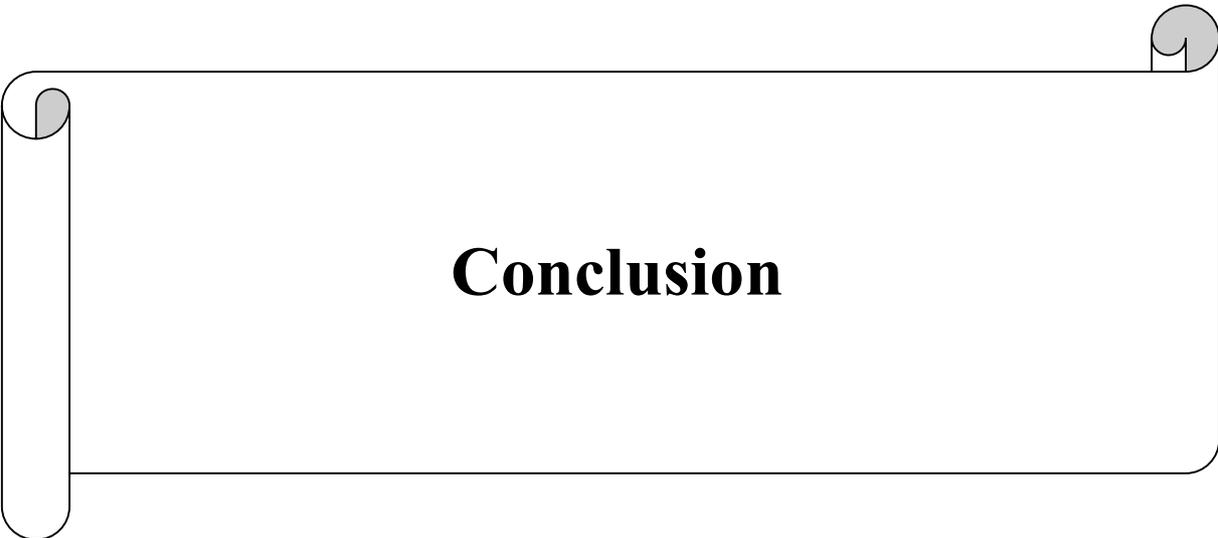
Ces acides, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Alakomi et al., 2000**).

L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). Par exemple, l'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique et il inhibe les levures et les moisissures et les bactéries (**Blom et Mortvedt, 1991**).

Parmi les actions inhibitrices des bactéries lactiques, la sécrétion des bactériocines, qui sont surtout actives sur les pathogènes à Gram⁺ et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (**Labioui et al., 2005**).

Raccach, (1987) montre que l'espèce *Pediococcus pentosaceus* joue un rôle important dans la préservation des aliments par la production de pediocines actives contre les bactéries pathogènes tel que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*.

Par ailleurs, la bactériocine nisine est ajoutée fréquemment aux fromages pour prévenir la germination des spores de *Clostridium*, tel que *Clostridium tyrobutyricum* (**Schillinger et al., 1996**).



Conclusion

IV. Conclusion générale

Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers. Un intérêt industriel tout particulier a été porté pour ces bactéries. Elles sont utilisées aussi pour améliorer des caractères organoleptiques de certains produits (le goût, la saveur, la texture, l'arôme...) comme le yaourt, le fromage, le pain et les produits carnée...etc. Parmi ces produits on trouve le Smen.

Le Smen camelin est un produit laitier précieux. Il est utilisé comme remède chez les populations nomade Algériens pour ses propriétés médicinales connus. À partir d'un échantillon de Smen camelin des analyses microbiologiques et des tests biochimiques et physiologiques sont effectués pour l'isolement et l'identification des bactéries lactiques. Nous avons isolé 10 souches appartenant à cinq différents genres qui sont : *Lactobacillus sp.*(30%) ,*Streptococcus sp.* (20%) et *Leuconostoc sp.* (20%), *Enterococcus sp.* (20%) *Lactococcus sp.* (10%). Les souches isolées sont des cocci, des coques, des coccobacilles et des bacilles. La plupart sont des homofermentaires thermorésistantes. Toutes les souches peuvent être recultivées à 15°C, 45°C, à pH 9.6 et à 3% d'NaCl. Elles sont dépourvues de la catalase et la plupart ne dégradent pas l'arginine et sont capable d'utiliser le citrate et de fermenter tous les sucres sauf xylose et amidon.

Les résultats de l'activité protéolytique, montrent que 2 souches (*Lactobacillus sp*, *Lactococcus sp*, S20 et M2) ont la capacité de dégrader la caséine du lait contenant dans le milieu, où la souche *Lactobacillus sp* présente la zone de la protéolyse la plus importante avec un diamètre de $12,5 \pm 1,5$ mm dans le MRS à 1% de lait écrémé.

Les résultats de l'activité lipolytique montrent que les souches isolées ont la capacité de dégrader les lipides du lait contenant dans le milieu, où toutes les souches présentent une faible activité lipolytique.

Les résultats de l'activité antimicrobienne, montrent que toutes les souches isolées possèdent une capacité d'inhibition des souches pathogènes testées. Les résultats d'inhibition révèlent que la souche M14 présente une forte activité antimicrobienne par rapport aux autres souches.

La présente étude a donné des résultats primitifs, ce qui motive le lancement d'autres recherches dans le futur afin de compléter et d'approfondir l'étude sur le Smen traditionnel notamment :

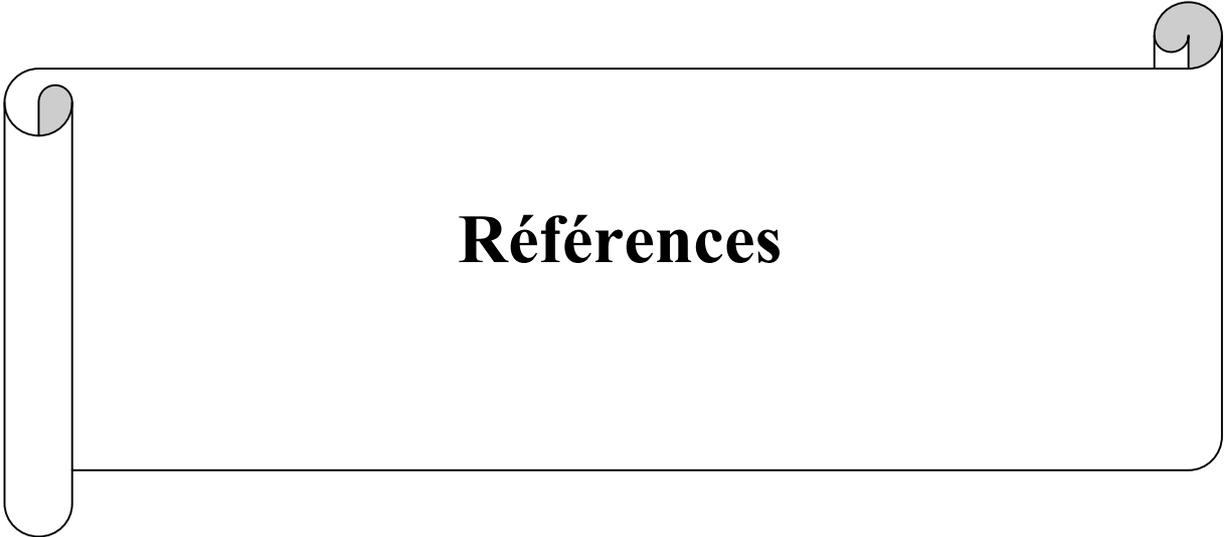
-Identification moléculaire est très essentielle pour mieux identifier les isolats.

-Etude de la stabilité des molécules dans les conditions industrielles : pH, température...etc. Ainsi que l'optimisation du rendement de productivité des souches sélectionnées.

-Etude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des bactéries sélectionnées contre un panel plus large de microorganismes (bactéries et champignons).

-Mesure de leur résistance aux bactériophages

-Etude du comportement vis-à-vis des traitements de conservation, la congélation et la lyophilisation.



Références

V. Références bibliographiques

Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M., (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5) : 2001-2005.

Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. 17: 454-461.

Antonio M.A.D., Hawes S.E. and Hillier S.L., (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus species* and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species; 180: 1950-6.

Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G. et Penna, T. C. V. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20 : 146-154.

Aslam S. et Qazi J.I., (2010). Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool.* 42(5) : 567-573.

Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle". *Science & Technology* .23 : 30-37.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Hennic, D.E., Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21: p 579–588.

Balla, E., Dicks, L.M., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J., Holzappel, W.H. (2000). Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Applied and Environmental Microbiology*; 66(4):1298–1304.

Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F et Obert JP. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques de la

génétique aux ferments (Carrieu G et Luquet FM). Technique et documentation. Lavoisier, Paris :p 1-144.

Belkheir, K., Centeno, J. A., Zadi-Karam, H., Karam, N. E., Carballo, J. (2016). Potential technological interest of indigenous lactic acid bacteria from Algerian camel milk. *Italian Journal of Food Science*, 28(4): 598–611.

Bellil Y. (2020). Caractérisation et évaluation des aptitudes technologiques des *Leuconostoc*isolés du lait de chamelle Algérien et leurs applications. Thèse de doctorat, Université d'Oran Algérie.

Blom, H. Mortvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food-associated microorganisms. *BiochemSocie Transaction*, 19(3): 694-698.

Bourgeois C.M. et Larpent J.P., (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Technique et documentation, Lavoisier. Paris. 432-704.

Bourgeois C-M, Larpent J-P. (1996). Microbiologie alimentaire T2; aliments fermentes et fermentations alimentaire. Ed. Technique et documentation, 523p.

Boussouar N. (2016). Caractérisation technologique et sanitaire des *Enterocoques* isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest algérien. Thèse de doctorat, Université de Tlemcen Algérie.

Carmen. M ., Jan Kok, EH ., Pelaez, C., requena., T et Buist G., (2000). *Applied and Environmental Microbiologie*, Aug., Pp: 3174-3179.

Carr FJ, Hill D, Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 281-370.

Centeno, J.A., Karam, N. E., Carballo, J. (2016).potential technological interest of indigenous lactic acid bacteria

Charlier C., Cretenet M., Even S. and Le Loir Y., (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 30-39.

Chilliard Y., (1982). Variations physiologiques des activités lipasiques et de la lipolyse spontanée dans les laits de vache, de chèvre et de la femme. Le Lait, l'institut national de recherche pour l'agriculture, Edition, p126.

Cholet O., (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES). UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires l'institut national de recherche pour l'agriculture, l'institut national de l'audiovisuel.

De Arauza, L.J, A.F Jozalaa, P.G Mazzolab , et T.C.V Penna. (2009). Nisin biotechnological production and application. Trends Food Sci Technol 20: 146-154. Kalchayanand, N., Hanlin, M. & Ray, B. 1992.

De Man. J.C, Rogosa. M et Sharpe. E.M, (1960): A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. Applied and Environmental Microbiologyol, 23: 130-135.

De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 13, 194-199.

Deeth H.C. and Touch V., (2000). Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. Australian Journal of Dairy Technology, 55: 153–168.

Delgado A, Brito D, Fevereiro P, Marques JF. 2001. Anti- microbial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. Lait 81, 203-215.

Delgado A, Dulce B, Pedro F, Cidalia PJ et Figueiredo M. (2001). Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives laits. 81, 203-215.

Doleyres Y., (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.

Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. And Shaha N.P. (2007). Proteolytic activity of Dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and invitro angiotensin Converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. L'institut national de recherche pour agriculture, équation aux dérivées partielles sciences. 86: 21-38.

Doumandji, A., Hellal, A. et Saidi, N. (2010). Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnement, 2 : 25-47.

Ewe JA, Loo SY. (2016). Effet de la crème fermentation sur les propriétés microbiologiques, physicochimiques et rhéologiques du beurre de *L. helveticus*. Chimie alimentaire 201, 29-36.

Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B. Poli, A. (2014). Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. Marine drugs, 12: 3005- 3024.

Fleming, H.R., Etehell, G.L., Costilow, R.N. (1975). Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. Apple and Microbiology, 30:104-1042.

Francois, Z. N., El Hoda, N., Florence, F. A., Paul, M. F., Felicite, T. M. et El Soda, M. (2007). Biochemical properties of some thermophilic Lactic Acid Bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starter culture. Biotechnology, 6: 14-21.

Ganzele G, Michael, Alexndra Holtzel, Jens Walter, Gunther Jung, Et Walter P, Hammes. (2000). Characterization of Rentericyclin Producet By *Lactobacillus Reuter* Lth 2584. Applied and Environmental Microbiology. 4325-4333.

Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., (2005). Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. Federation of European Microbiological Societies. Rev. 29: 591-610.

Ghazi, F., Henni, D. E., 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 & Food Sciences, 4(1): 78-87.

Ghozlane Dj. (2012). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle), magister : Science Alimentaire, Ecole national supérieure d'agronomie El-Harrach, Algérie, p 30.

Guessas. B. (2006). Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *staphylocoques aureus*.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie Alimentaire. Technique et documentation, Dunod. Paris. 90-292.

Guiraud J.P., (2003). Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques, Dunod, Paris, 2003, 651 p

Guiraud J.P., (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod-Pris., p696.

Guiraud JP. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, 143-144.

Guiraud J.P. et Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. 1-239

Hansal N., (2015). Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostocmesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre. Thèse de magistère en Biologie, Option: Microbiologie fondamentale et appliquée. Université d'Oran1. P109.

Hassaïne, O., Zadi-Karam, H., Karam, N., (2007). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milks of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). African Journal of Biotechnology. 6, 1720-1727.

Hemme D. and Foucaud-Scheunemann C., (2004). Review *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal 14, 467-494.

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

Huggins, A.R., Sandine, W.E., (1984). Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of lactic streptococci. *Journal. Dairy Science.*, 67: 1674-1679.

Huyghebaert. (2006) Stratégies des produits à base de lait cru, Bruxelles.

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

ISO 6887-4 :2003. Microbiologie des aliments Préparation des échantillons de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

Jeanson, S. (2000). La maturation du lait dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite : le rôle des *Lactocoques*. Thèse de doctorat. Université de Dijon France.

Kalchayanand, N., Hanlin, M. and Ray, B. (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocinA_{CH} and nisin. *Letters in Applied Microbiology*, 15 : 239-243.

Karam N-E., Dellali A et Karam Z.H. (2012). Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. *Renc. Rech. Ruminants*, 2012, 19.

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A et Zinedine, A., (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* 10, 10-16.

Khue, N. T. H. Ngoc, N. H. (2013). Exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* Pn04 after co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* Vtcc-B-643. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 14.

Kihal M., Prevost H., Lhotte M. E., Huang D. Q. et Diviès C. (1996). Instability of plasmid encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Journal. Application. Microbiologie.* 22: 219-223.

Kihel, M., (1996). Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides* élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de docteur d'état, université d'Oran Es-senia.

Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta C. et Divya., (2009). Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MTCC3038. International Journal of Statistics and Probability. 4(3): 1-6.

Labaoui H, Elmoualdi L, El yahiaoui M et Ouhssine M. (2005). Sélection de souches des bactéries lactiques antibactérienne. Bal doc Dparm. Bordeaux, 144, 237-250.

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144 : 237-250.

Larpent J.P., G.M., (1990). Mémento technique de microbiologie. 2^{ème} édition. Lavoisier Tecet Doc. Paris. PP471.

Leroy F et De Vuyst L, (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Science. 15: 67-78.

Leroy F. et De Vuyst L., (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Microbiol. Biotechnol 13 : 194-199.

Leuschner J., Stiles M., Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. A review Journal. Food Microbiol. 36:1-29.

Leveau J.Y., Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Technique et documentation, Lavoisier. Paris.

Liu, C. F., Pan, T. M. (2010). In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. Journal Food Drug Analysis, 18: 77–86.

Maghnia Djamil A., (2011). Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels Algériens. Thèse de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran.

Makhloufi, K. M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Mannu L., Paba A., Pes M et Scintu M. F. (2000). Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Lactococci* isolated from traditional Pecorino Sardo cheeses. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(2): 191- 197.

Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3^{ème} Ed. ,Doin éditeurs, Paris.

Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 45, 655–660.

MC Sweeney P.L.H. and Sousa M.J., (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80: 293-324.

Meghoufel N. (2019). Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager. Thèse de doctorat, Université de Mostaganem Algérie.

Monnet V., Latrille E., Beal C. et Corrieu G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : bactéries lactiques de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquetf.m.). Technique et documentation, lavoisier. Paris. 512-592.

Montville T.J., Meyer M.E., Hsu A.H.M. and Huang G.T.C., (1987). High pressure liquid chromatography and wide bore capillary gas-liquid chromatography methods for quantification of acetoin and diacetyl from bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods* 7: 1- 8.

O'sullivan L., Ross R.P. et Hill C., (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84: 593- 604.

Papagianni M. and Anastasiadou S., (2009). Pediocins: the bacteriocins of pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8:1– 16.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *MeatSci*. 65: 859–867.

- Raccach M., (1987).** Pediococci and biotechnology. *CritRevMicrobiol* 14:291–309.
- Raynaud S., (2006).**Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcuslactis*. Thèse de doctorat Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries; Université de Toulouse. 27-35.
- Raynaud S., Perrin R., Cocaign-Bousquet M., Loubière P., (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcuslactis* subsp. *Lactisbiovardiacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8016- 8023.
- Rodriguez JM, Martínez MI, Horn N et Dodd HM. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International. Journal. Food Microbiologie*. 80, 101-116.
- Roudj S., BelkheirK., Zadi-Karam H. et Karam N.E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux *Lactobacilles* isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. Journal of Scientific Research* 34 (2): 218-227.
- Mosbah S., AnnouG.,Bouricha M., Mekkaoui S., Boudjenah-Haroun S. (2022).** Physicochemical and microbiological study of fresh cream and fermented butter (Smen) made from camel milk. *International Journal of Biosciences (IJB)*. 20(03): 52-59.
- Saidi N, Guessas B, Bensalah F, Badis A, Hadadji M, Henni JE, Prevost H, Kihal M. (2002).** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides*, 01 :01-14.
- Sanchez J.I., Martinez B. & Rodriguez A. (2005).** Rational selection of *Leuconostocs* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *International. Journal. Food Microbiology*. 105, 377-387.
- Schillinger, U, R Geisen, and W.H Holzapfel. (1996).** "Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods." *Trends Food Science Technologies* 71 .58-64.
- Seifu, E., Abraham, A., Kurtu, M. Y., &Yilma, Z. (2012).** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Ititu : Ethiopian traditional fermented camel milk. 82–98.

Serhan M, Cailliez-Grimal C, Borges F, Revol-Junelles AM, Hosri C et Fanni J.(2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiology*. 26 : 645-652.

Tabak S., Djamil M. and Bensoltane A., (2012). The antagonistic activity of the lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus bulgaricus*) against *Helicobacter pylori* responsible for the gastroduodenal diseases. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 12: 709-715.

Tailliez P. (2001). Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, 81 : 1-11

Tailliez P., (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Actualités microbiologiques*. 35-41. Tamime.

Taylor M.J., Bandi C. and Hoerauf A., (2005). Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol*. 60: 245-284.

Thomas T.D. (1973). Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *N.Z.J. Dairy Science Technologies*. 8, 70-71.

Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., (1996). Antimicrobial substance produced by lactobacillus sp. TGR-2 isolated from Growol. Indonesian. *Food Nutr. Prog*. 3(2) : 29-34.

Turpin W. (2011). Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté traditionnel à base de mil par une approche moléculaire : Biotechnologie, microbiologie. Thèse de doctorat, Université de Montpellier 2, France .

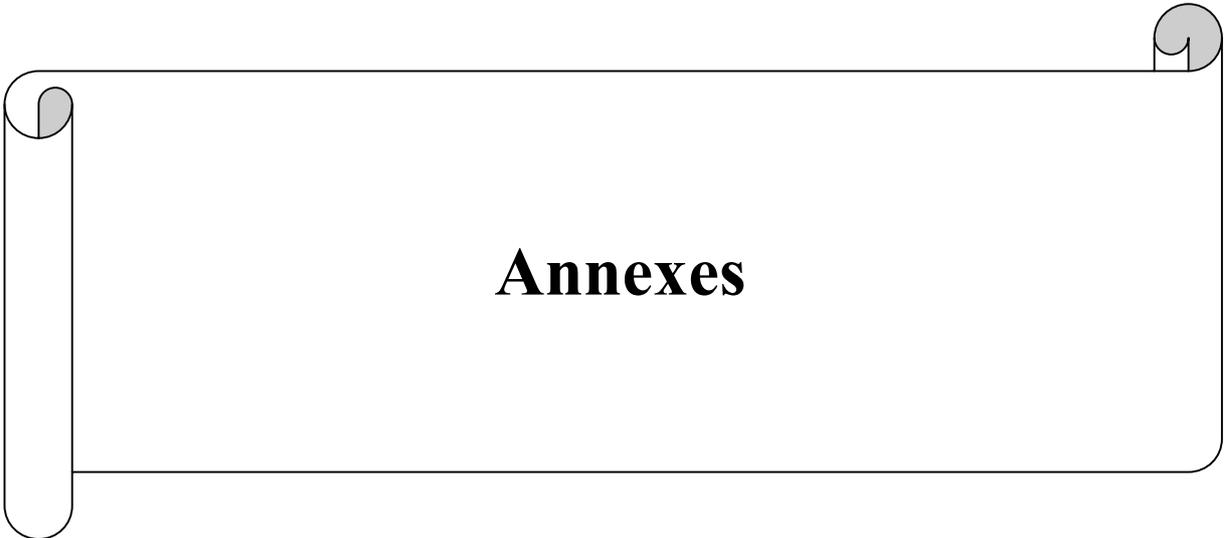
Van Den Berg, J. C., Smits, A., Pot B., Zedeboer, M., Kersters, K., Verbakel, J. M. A. & Verrips, C. T. (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnol* 7, 189-20.

Vedamuthu ER (1994). Les *Leuconostocs* laitiers : utilisation dans les produits laitiers. *Journal of Dairy Technology*. 77 (9):2725.

Veuillemard, J.C. (1986). Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des lactiques. Technique et documentation. Lavoisier edition. Paris 3, France.

Zadi-Karam, H. et Karam, N.E. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: Mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. Tropicultura. 24(3): 153-156.

Zarour, K., Llamas, M. G., Prieto, A., Ruas-Madiedo, P., Dueñas, M. T., De Palencia, P. F., Aznar, R., Kihal, M. Lopez, P. (2017). Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. Carbohydrate polymers, 174 : 646-657.



Annexe 01 : Milieux de cultures

Milieux solides

- **Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Est utilisée pour la culture et le dénombrement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale.

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1g
MnSO ₄	0.05 g
Agar	12g
Tween80	1ml
Eau distillée	1000ml
pH=6.5 à 37°C	Autoclavage : 121°C pendant 20min.

- **Milieu M16 BCP (Thomas et *al.*, 1973) Pour le test de l'ADH**

Extrait de levure.....	2,5g
Extrait de viande.....	5g
Lactose	2g
Biopolytone	5g
Peptone papainique de soja.....	5g
Acide ascorbique.....	0,5g
Acétate de sodium.....	1,8g
L-Arginine... ..	4g

Pourpre de bromocrésol.....	0,05
Agar.....	10g
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH 6,5	

Autoclavage 120°C / 20 minute

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

Tryptone.....	20 g
Gélatine.....	2.5 g
Extrait de levure.....	5 g
Saccharose.....	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium.....	1 g
Azide de sodium	0.075 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 6,8	Autoclavage 120°C/ 20 minute

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

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2,5g
Glucose.....	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 20 minutes à 121°C. Au moment de l'emploi on ajoute : 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v). Et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

- **Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH 7.4	Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- ❖ **Milieus liquides**

- **Bouillon nutritif Pour** les cultures jeunes des bactéries pathogènes

Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillé q.s.p	1000 ml
pH=7.4	Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

- **Milieu MRS**

MRS (milieu solide) sans agar	12 g
-------------------------------------	------

- **Milieu MRS-BCP (Kihal, 1996)**

Utilisé pour l'étude du profil fermentaire, composition en g/l.

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre	1000 ml
Bromocrésol pourpre	0,025 mg
pH7.0	Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Annexe 02 : Solution, Reactifs et Tampons Phosphate

- **Eau physiologie 9 /ml**

Na Cl	9g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 03 : Protocole de coloration de Gram (Baldent., 1997).

1. Réaliser un frottis et fixer.
2. Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
3. laver la lame à l'eau distillée.
4. plonger la lame dans une solution de lugol pendant 30 secondes.
5. Laver à l'eau distillée.
6. Décolorer 10 secondes à l'alcool.
7. Rincer immédiatement a l'eau distillée.
8. Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute.
9. Laver la lame à l'eau distillée.
10. Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
11. Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile.

Annexe 04 : Matériels utilisé

- Agitateur magnétique à plaque chauffante
- Anse de platine
- Autoclave
- Bain marie
- Barreaux magnétique
- Bec benzène
- Balance
- Boites de pétri
- Centrifugeuse
- Éprouvette
- Erlenmayer
- Etuve Four pasteur
- Micropipette
- Microplaquettes
- Mortier pH mètre
- Pipettes pasteurs
- Réfrigérateur
- Tubes à essai
- Tubes eppendorf
- Tubes sec en plastique
- Tubes sec en verre

Annexe 05 : Examen macroscopique et microscopique



Photo 8: Aspect macroscopique des souches lactique sur gélose MRS

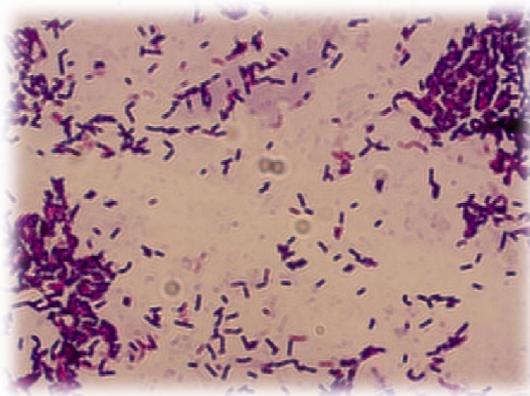


Photo 9: Observations microscopiques des souches isolées après une coloration de Gram à grossissement (x100)

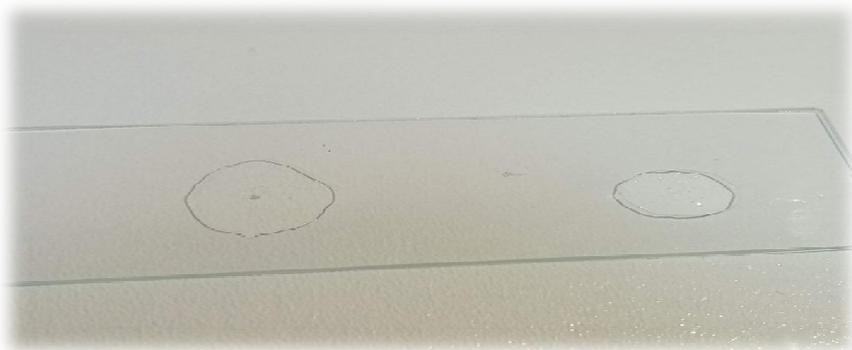


Photo 10: Résultat du test de catalase (test négatif)

Annexe 06 : Tests physiologiques et biochimiques

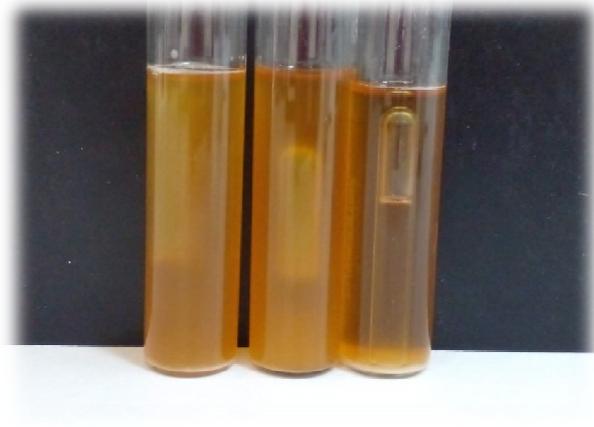


Photo 11: Test de recherche type fermentaire (CO₂ +)

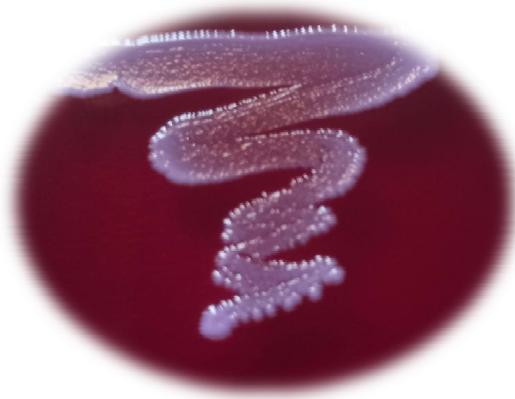


Photo 12: Aspect des colonies a ADH positif sur milieu MRS-BCP

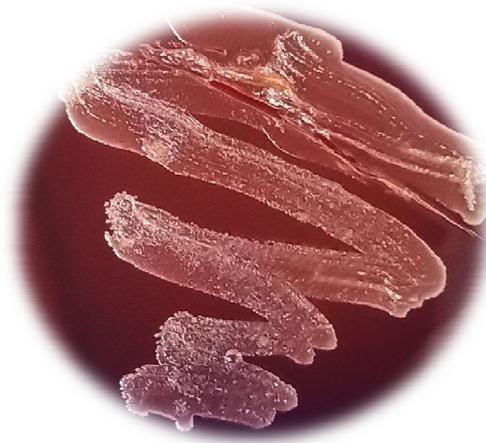


Photo 13: Aspect des colonies a ADH négatif sur milieu MRS-BCP

Tableau VII: Les résultats de fermentation des sucres par les souches isolées

Sucres Souches	Raffinose	Mannose	Xylose	Mannitol	Ribose	Galactose	Fructose	Lactose	Arabinose	Maltose	Amidon	Rhamnose
S3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S20	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
M1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

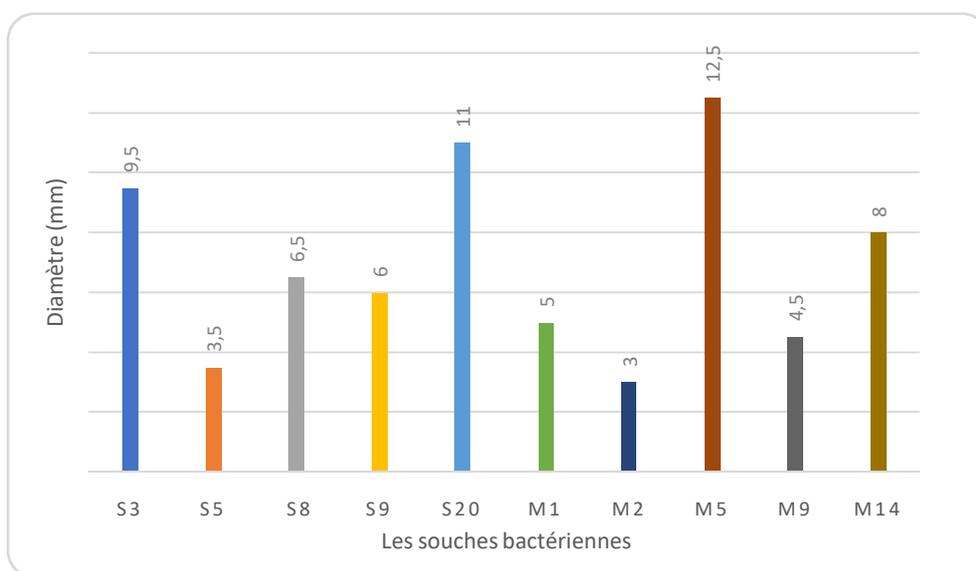
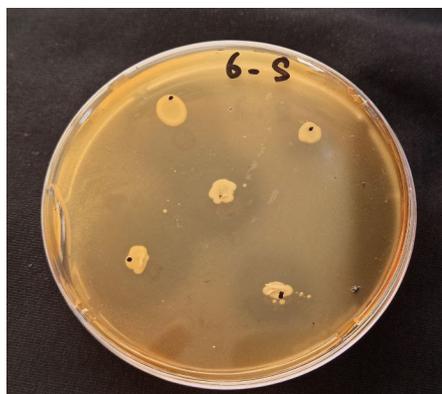
**Figure 3:** Les diamètres des zones claire d'Activité protéolytique des souches isolées**Annexe 07 : Tests technologique**

Tableau VIII: Les diamètre d'activité protéolytique des souches isolées

Souche	Genre	Diamètre de protéolyse(mm)
S3	<i>Streptococcus sp</i>	9,5 ±0,5
S5	<i>Leuconostocsp</i>	3,5±1
S8	<i>Lactobacillus sp</i>	6,5 ±1
S9	<i>Streptococcus sp</i>	6 ±0,5
S20	<i>Lactobacillus sp</i>	11 ±1
M1	<i>Enterococcusp</i>	5±0,5
M2	<i>Lactococcusp</i>	3 ±1
M5	<i>Enterococcusp</i>	12,5 ±1
M9	<i>Leuconostocsp</i>	4,5 ±0,5
M14	<i>Lactobacillus sp</i>	8±1



S: souches lactique isolées à 30



M: souches lactique isolées à 37

Photo 14: Résultats d'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre *Salmonella enterica* ATCC6017



S: souches lactique isolées à 30



M: souches lactique isolées à 37

Photo 17: Résultats de l'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027

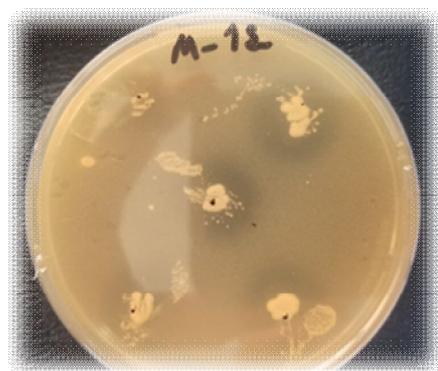


S: souches lactique isolées à 30



M: souches lactique isolées à 37

Photo 16: Résultats de l'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923



S: souches lactique isolées à 30



M: souches lactique isolées à 37

Photo 15: Résultats de l'activité antibactérienne (méthode directe) des souches isolées contre *Escherichia coli* ATCC25992

Tableau IX: Diamètre d'activité antibactérienne des isolats vis-à-vis des bactéries pathogènes

S,Pathogène S,lactique	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
S3	9,5±2	14,5±3,5	9,5±1,5	10,5±0,5
S5	13±2	15±1,5	13,5±2,5	10,5±1,5
S8	12±1	13,5±2,5	16,5±1,5	11,5±1,5
S9	8±1	13,5±1,5	11±1	9,5±0,5
S20	14±1	14	17	13±1
M1	8,5±0,5	14,5±3,5	16	8±2
M2	14±1	16,5±0,5	16	12,5±0,5
M5	7,5±0,5	13,5±0,5	19	11,5±3,5
M9	11±2	15,5±2,5	13	12±1
M14	14,5±1,5	16,5±0,5	17	13,5±0,5

Résumé

Le Smen est un produit largement utilisé par les peuples nomades Algériens, pour ses usages thérapeutiques. Le but de ce travail consiste à l'étude de certains pouvoirs technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du Smen camelin.

La pré-identification des souches isolées est basée sur les tests phénotypiques, biochimiques et physiologiques. Ainsi quedes tests technologiques sont recherchées tel que l'activité protéolytique, lipolytique et l'activité antimicrobienne. Ces tests ont permis d'identifier 10 isolats.

Ces isolats ont été affiliés à cinq genres bactériens, qui correspondent aux *Lactobacillus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactococcus sp*, *Streptococcus sp* et *Enterococcus sp*. Le genre *Lactobacillus sp* est le plus dominant avec un pourcentage de 30% des isolats, dont la plupart sont des homo-fermentaires, thermorésistantes et capable de se croitre à pH 9,6. Ces souches sont capables de dégrader le citrate et possèdent une faible activité lipolytique et une forte activité protéolytique avec une activité antimicrobiennepuissante vis-à-vis des souches pathogènes testées.

Mots clés : Smen camelin, lait, bactéries lactiques, pouvoir technologique.

Abstract

Smen is a product widely used by Algerian nomadic peoples, and has been presented for many therapeutic purposes. The aim of this work consists in the study of certain technological powers of the lactic acid bacteria isolated from the camel Smen.

The pre-identification of isolated strains is based on phenotypic, biochemical and physiological tests. As well as, technological tests are sought such as proteolytic, lipolytic activity and antimicrobial activity. These tests identified 10 isolates.

These isolates were affiliated to five bacterial genre, which correspond to *Lactobacillus sp*, *Leuconostocsp*, *Lactococcus sp*, *Streptococcus sp* and *Enterococcus sp*. The *Lactobacillus sp* genre is the most dominant with a percentage of 30%. Most of which are homofermentative, heat-resistant and able to grow at pH 9.6. These strains are able to degrade citrate and have low lipolytic activity and high proteolytic activity with powerful antimicrobial activity against pathogenic strains.

Key words: Smen, camelmilk, lactic acid bacteria, technological powers.

ملخص

السمن هو منتج يستخدم على نطاق واسع في شعوب البدو الجزائريين ، ويحتوي على للعديد من الهدف من هذا العمل دراسة بعض القوى التكنولوجية لبكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من , الأغراض العلاجية سمن الجمل ، وللتحديد المسبق للسلاسل المقدمة ، فإننا نعتمد على الاختبارات التالية: اختبارات النمط الظاهري والكيمياء الحيوية والفسيلوجية. حدد اختبار تخمير السكر 10 عزلات تنتمي هذه العزلات إلى خمسة أجناس *Streptococcus* ، *Leuconostocsp* ، *Lactobacillus sp* بكتيرية هي هي لاكثر تواجد بنسبة 30 % ، ويتم إجراء *Lactobacillus sp* وتعتبر *Lactococcus sp* و *Enterococcus sp* الاختبارات التكنولوجية لتحديد وتقييم هذا النشاط في سلالات الإبل المعزولة .

بشكل عام ، تكون السلالات في أشكال مختلفة (*Cocci* ، *Bacillus* ، *couque*) مقاومة للحرارة ، تخمر متجانس مع كاتلاز سالب وقادرة على النمو عند pH 9.6 و 3 % من NaCl وجميعها قادرة على تحلل السترات ولديها نشاط تحلل دهون منخفض ونشاط تحليلي مرتفع عند *Lactobacillus sp* وجميع العزلات قادرة على تثبيط السلالات الممرضة المختبرة .

كلمات مفتاحية: سمن, حليب الإبل, بكتيريا حمض اللاكتيك, القوى التكنولوجية .