

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

**Université Abdrrahmane MIRA Béjaia
Faculté des sciences de la nature et de la vie**

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

**En biochimie- microbiologie
Option : microbiologie**

THEME

**Isolement et identification de bactéries
lactiques productrices de protéases
coagulant le lait.
Essai de caractérisation des coagulases.**

**Présenté par : ^{Mme} SAHRAOUI LYNDA.
Epouse RAHIM GUEALIA.**

Jury :

- | | | | |
|----------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
| ✓ Présidente : | Pr. SADOUN. D | Professeur | Université de Béjaia |
| ✓ Promoteur : | Pr. BELLAL. M | Professeur | INA - Alger |
| ✓ Examineurs : | Pr. BENALLAOUA. S | Professeur | Université de Béjaia |
| | Dr. KECHA. M | Maître de conférences | Université de Béjaia |
| ✓ Invité | Dr. HARHOURA. K | Chargé de cours | ENV- Alger |

**Année Universitaire :
2008-2009**

REMECIEMENTS

Mes profonds et sincères remerciements :

- ✓ **A Monsieur le Professeur BELLAL. M pour avoir proposer ce sujet si intéressant et avoir accepter de m'encadrer, de m'orienter et de m'aider tout au long de mon travail.**
- ✓ **A Madame le Professeur SADOUN. D pour sa haute considération en acceptant de présider ce jury.**
- ✓ **A Monsieur le Professeur BENALLOUA. S et Monsieur le Docteur KECHA. M qui ont accepté d'examiner ce modeste travail.**
- ✓ **A Monsieur le Docteur vétérinaire HARHOURA. K pour ses précieux conseils et encouragements et d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.**
- ✓ **A Monsieur le Professeur BAKOUR. R pour ses précieux conseils et encouragements pour pouvoir accéder à ce diplôme de MAGISTER.**
- ✓ **Je remercie également Madame le Professeur HELLAL. A pour ses précieux conseils et monsieur le Docteur vétérinaire ZOUAMBI. B de m'avoir accepté au sein de son laboratoire de biochimie.**
- ✓ **A tout le personnel de l'Ecole Nationale Vétérinaire – Alger, en particulier celui de la bibliothèque et des laboratoires de microbiologie, biochimie, zootechnie et parasitologie.**
- ✓ **A tout le personnel du département de technologie de l'Institut National Agronomique – Alger, en particulier les techniciens des laboratoires de microbiologie et de biochimie.**
- ✓ **A tous les enseignants de l'université de Béjaia qui ont participé à ma formation.**
- ✓ **A madame KACIMI, madame LOUNIS ainsi que M^{elle} BOUGAM pour leur aide très précieuse et leur grande gentillesse.**
- ✓ **Je n'oublierais pas de remercier vivement tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.**

DEDICACES

Je dédie ce travail

A mes très chers parents qui m'ont appris à ne jamais me décourager et toujours progresser dans la connaissance. En témoignage de toute mon affection

A mon très cher époux RAHIM qui m'a encouragé et œuvré pour ma réussite.

A mon bout de chou Salem

A mon cher frère et mes chères sœurs

A mes adorables tantes

A tous les membres de ma belle- famille

A mes meilleures amies Nadia et baya

A tous mes amis et mes chers étudiants

A notre cher NOUNOUR et son équipe

A tous mes collègues de l'ENV

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Composition moyenne (en %) du lait de différentes espèces.	4
2	Exemples de quelques succédanés de présure d'origine bactérienne.	9
3	Exemples de quelques succédanés de présure d'origine fongique	10
4	Exemples de quelques succédanés de présure d'origine animale	12
5	Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait	13
6	Recherche et dénombrement des différentes flores dans le lait utilisé comme source d'isolement des bactéries recherchées	29
7	Les différentes étapes d'isolement et de purification du genre <i>Lactobacillus</i>	30
8	Les différentes étapes d'isolement et de purification du genre des <i>Streptocoques</i> thermophiles et mésophiles	31
9	Les différentes étapes d'isolement et de purification du genre <i>Leuconostoc</i>	32
10	Les différentes étapes d'identification des souches de <i>Lactobacillus</i>	33
11	Les différentes étapes d'identification des souches de <i>Streptococcus</i> et <i>Lactococcus</i>	34
12	Les différentes étapes d'identification du genre <i>Leuconostoc</i>	35
13	Résultats de l'analyse microbiologique des échantillons de lait de vache utilisé comme source d'isolement des souches recherchées	43
14	Caractères cultureux et morphologiques des espèces isolées des bactéries lactiques	45
15	Caractères biochimiques d'identification des espèces de <i>Lactobacillus</i>	46
16	Caractères biochimique d'identification des espèces du genre <i>Streptococcus</i> et du genre <i>Lactococcus</i>	47
17	Caractères biochimiques d'identification des espèces de <i>Leuconostoc</i>	48
18	Nombre des souches des différentes espèces de bactéries lactiques isolées et identifiées	50
19	Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans les cultures des diverses souches des bactéries lactiques thermophiles isolées	62
20	Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans les cultures des diverses souches des bactéries lactiques mésophiles isolées	63
21	Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans le milieu après action des extraits enzymatiques bruts souches de <i>Lc lactis ssp cremoris</i>	68
22	Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans le milieu après action des extraits enzymatiques bruts souches de <i>Lb helveticus</i> , et <i>Lb delbrueckii ssp bulgaricus</i>	68
23	Activité coagulante maximale des extraits bruts issus des souches de <i>Lb helveticus</i> , et <i>Lb delbrueckii ssp bulgaricus</i> et <i>Lc lactis ssp cremoris</i>	70

Listes des figures

Figure	Titre	Page
1	Pourcentage des différentes protéines du lait.	5
2	Modèle de la représentation de la micelle et de la sous- unité micellaire de caséine.	6
3	Différentes phases de coagulation enzymatique du lait et formation du réseau.	15
4	Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques.	24
5	Schéma de l'extraction des protéases pariétales chez les biomasses du genre <i>Lactococcus</i> et les biomasses de <i>Lactobacillus</i> cultivées en fermenteur.	41
6	Cinétique de croissance en pré- culture dans le lait des souches de <i>Lactobacillus</i> (a), <i>Lactococcus</i> (b), <i>Streptococcus</i> (c) et <i>Leuconostoc</i> (d)	53
7	Evolution de l'acidité Dornic du milieuensemencé par les souches de <i>Lactobacillus</i> (a) <i>Lactococcus</i> (b), <i>Streptococcus</i> (c) et <i>Leuconostoc</i> (d) en fonction du temps.	55
8	Evolution de l'acidité du pH du milieuensemencé par les souches de <i>Lactobacillus</i> (a) <i>Lactococcus</i> (b), <i>Streptococcus</i> (c) et <i>Leuconostoc</i> (d) en fonction du temps.	56
9	Evolution de l'activité protéolytique par le dosage de la tyrosine (ppm) en fonction du temps de croissance des souches de <i>Lactobacillus</i> (a) <i>Lactococcus</i> (b), <i>Streptococcus</i> (c) et <i>Leuconostoc</i> (d).	59
10	Cinétique de croissance des souches de <i>Lb helveticus</i> et <i>Lb delbrueckii ssp bulgaricus</i> en fermenteur à 45°C sans agitation et sans aération.	66
11	Cinétique de croissance des souches de <i>Lc lactis ssp cremoris</i> cultivées en fermenteur à 30°C sans agitation et sans aération.	66
12	Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut issu des souches de <i>Lactobacillus</i> (a) et <i>Lactococcus</i> (b).	73
13	Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut issu des souches de <i>Lactobacillus</i> (a) et <i>Lactococcus</i> (b).	74
14	Influence de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité coagulante de l'extrait brut issu des souches de <i>Lactobacillus</i> (a) et <i>Lactococcus</i> (b).	76
15	Stabilité thermique de l'extrait enzymatique issu des souches de <i>Lc lactis ssp cremoris</i> (LcC3 et LcC*) après 30mn d'incubation.	78
16	Stabilité de l'extrait brut issu des souches de <i>Lc lactis ssp cremoris</i> (LcC3 et LcC*) en fonction du pH après 60mn d'incubation.	79
17	Stabilité de l'extrait brut des souches de <i>Lc lactis ssp cremoris</i> (LcC3 et LcC*) au cours de la conservation à +4°C.	79
18	Stabilité de l'extrait brut des souches de <i>Lc lactis ssp cremoris</i> (LcC3 et LcC*) au cours de la conservation à -18°C.	80

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- Le lait	3
1- définition	3
2- caractéristiques.....	3
3- composition du lait.....	3
3-1- les matières azotées.....	4
3-2- les glucides.....	6
3-3- les matières grasses.....	6
II- Les coagulants du lait	7
1- Généralités	7
2- La présure.....	7
2-1- la chymosine.....	8
2-2- la pepsine.....	8
3- Les succédanés de présure.....	8
3-1- Les succédanés de présure extraits de microorganismes.....	9
3-1-1- Les succédanés de présure d'origine bactérienne.....	9
3-1-2- Les succédanés de présure d'origine fongique.....	9
3-2- Les succédanés de présure d'origine animale.....	11
3-3- Les succédanés de présure d'origine végétale.....	12
III- La coagulation du lait	14
1- Définition de la coagulation.....	14
2- Les différents types de coagulation.....	14
2-1- La coagulation par voie enzymatique.....	14
2-1-1- enzymes coagulantes.....	14
2-1-2- Le mécanisme de la coagulation par la présure.....	14
2-1-3- Influence de différents paramètres sur l'activité coagulante....	16
2-2- La coagulation par abaissement du pH	17
2-3- La coagulation mixte.....	17
IV- Les bactéries lactiques	17
1- Historique	17
2- Définition	18

3- Origine et habitat.....	18
4- Taxonomie et classification des bactéries lactiques.....	18
4-1- Genre Lactococcus et Streptococcus.....	19
4-2- Genre Lactobacillus.....	21
4-3- Genre Pediococcus	21
4-4- Genre Leuconostoc.....	22
5- Métabolisme général des bactéries	22
5-1- Besoins nutritionnels des bactéries lactiques.	22
5-2- Métabolisme des sucres et d'autres substances carbonées.....	22
5-3- Métabolisme azoté des bactéries lactiques.....	23
5-3-1- protéases.....	23
5-3-1-1- Protéases extracellulaires.....	23
5-3-1-2- Protéases membranaires.....	24
5-3-1-3- Protéases intracellulaires.....	25
5-3-2- Peptidases	25
5-4- Métabolisme des lipides.....	25
6- Fonction et sélection des bactéries lactiques en technologie laitière.....	25
6-1- La production d'acide lactique.....	25
6-2- La production de substances aromatiques.....	25
6-3- La production d'agents épaississants.....	26
6-4- Activité protéolytique.....	26
6-5- Production des antimicrobiens et bactériocines.....	26
7- Propriétés thérapeutiques	27

MATERIEL ET METHODES

1 ^{ère} partie : Obtention des souches.....	28
1- Sources des prélèvements des souches.....	28
2- Contrôle du lait d'isolement.....	28
2-1- Analyse microbiologique du lait.....	28
2-2- Recherche des résidus d'antibiotiques	28
3- Techniques d'isolement des bactéries lactiques	29
3-1- Milieu d'isolement.....	29
3-2- Phase d'isolement.....	30
3-2-1- Isolement et purification des Lactobacillus.....	30
3-2-2- Isolement et purification des Streptocoques.....	31
3-2-3- Isolement et purification des Leuconostoc.....	32
4- Techniques d'identification.....	32
4-1- Techniques d'identification des Lactobacillus.....	32
4-2- Techniques d'identification des Streptococcus et Lactococcus.....	33
4-3- Techniques d'identification des Leuconostoc.....	35

2 ^{ème} partie : Sélection et caractérisation des souches productrices de protéases.....	36
1- Culture en fiole	36
2- Meure de la croissance.....	36
3- Mesure du pH et de l'acidité	36
3-1- Mesure du pH.....	36
3-2- Mesure de l'acidité titrable.....	36
4- Dosage des activités enzymatiques avec les cellules entières.....	37
4-1- Etude de l'action des bactéries lactiques sur les constituants azotés du lait.....	37
4-2- Etude du pouvoir protéolytique par dosage de la tyrosine.....	37
3 ^{ème} partie : Extraction des protéases et étude des activités enzymatiques..	38
1- Culture en fermenteur	38
2- Cinétique de croissance des biomasses.....	38
3- Extraction des protéases pariétales.....	38
3-1- Extraction des protéases pariétales chez Lactococcus	38
3-2- Extraction des protéases pariétales chez Lactobacillus.....	39
4- Dosage des activités enzymatiques avec l'extrait brut des protéases de la paroi.....	39
4-1- Etude de l'action des protéases de la paroi sur les constituants azotés du lait.....	39
4-2- Détermination de l'activité coagulante.....	39
4-2-1- Conditions standard de mesure.....	40
4-2-2- Définition de la force coagulante.....	40
4-2-3- Mesure du temps de coagulation	40
4 ^{ème} partie : Caractérisation de l'extrait enzymatique brut	
1- Détermination de la température optimale d'activité.....	42
2- Détermination du pH optimum.....	42
3- Détermination de la concentration optimale de CaCl ₂	42
4- Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique brut.....	42
4-1- Stabilité thermique.....	42
4-2- Stabilité au pH	42
4-3- Stabilité au cours de la conservation.....	42

RESULTATS ET DISCUSSION

1^{ère} partie : Isolement et identification de bactéries lactiques

I- Analyse microbiologique du lait.....	43
II- Recherche des résidus d'antibiotiques.....	43
III- Isolement et identification des souches de bactéries lactiques.....	44
1- Isolement et purification des souches.....	44
2- Identification des souches.....	45
Conclusion.....	49

2^{ème} partie : Sélection et caractérisation des souches productrices de protéases

I- Cinétique de croissance des souches.....	51
II- Evolution du pH et acidité titrable.....	52
1- Evolution du pH et acidité titrable chez les souches de Lactobacillus.....	52
2- Evolution du pH et acidité titrable chez les souches de Lactococcus.....	54
3- Evolution du pH et acidité titrable chez les souches de Streptococcus.....	54
4- Evolution du pH et acidité titrable chez les souches de Leuconostoc.....	54
III- Mesure de l'activité protéolytique avec les cellules entières.....	57
1- Dosage de la tyrosine.....	57
2- Action des bactéries lactiques sur les constituants azotés.....	60
2-1- Variation selon les souches.....	60
2-2- Variation selon les espèces.....	60
Conclusion.....	64

3^{ème} partie : Extraction des protéases et étude des activités enzymatiques

I- Culture en fermenteur.....	65
1- Cinétique de croissance des souches.....	65
2- Extraction des protéases de surface.....	67
II- Activité enzymatique des extraits bruts de paroi.....	67
1- Activité protéolytique des extraits bruts de paroi.....	67
2- Mesure de l'activité coagulante.....	69
Conclusion.....	70

4^{ème} partie : Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

1- Influence de la température du lait.....	71
2- Influence du pH du lait	72
3- Influence de la concentration en CaCl ₂	75
4- Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique brut.....	77
4-1- Stabilité à la température.....	77
4-2- Stabilité vis-à-vis du pH	77
4-3- Stabilité au cours de la conservation à +4°C et -18°C.....	78
CONCLUSION GENERALE.....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	
ANNEXES	

Introduction

Introduction

Les produits laitiers, tels que yaourts et fromages sont les produits laitiers les plus anciens et les plus intéressants au regard de leur haute valeur nutritive et de leurs qualités organoleptiques particulières. Leur élaboration est réalisée grâce à l'emploi de bactéries lactiques et d'enzymes coagulantes dont le tonnage et la diversité sont en constante évolution.

Ainsi, de multiples protéases capables d'hydrolyser la caséine du lait peuvent provoquer la coagulation de ce dernier et permettre la fabrication de produits dérivés. Toutefois, cette condition n'est pas toujours suffisante pour une large utilisation en industrie de transformation du lait car le choix de l'enzyme sélectionné est déterminé par le rapport de l'activité coagulante et l'activité protéolytique.

L'agent le plus utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages est la présure. Cette préparation enzymatique est extraite de caillettes de jeunes veaux non sevrés. Son utilisation est confrontée à la contrainte majeure du sacrifice de jeunes veaux et donc d'obtention de quantités de plus en plus importantes d'enzymes susceptibles de répondre à des besoins sans cesse croissants.

En effet, depuis quelques années, on note une baisse progressive de la disponibilité de la présure. Cette situation a poussé de nombreux chercheurs à s'intéresser aux nouvelles sources potentielles d'enzymes de remplacement notamment les enzymes d'origine animale, végétale et microbienne.

Toutefois, l'utilisation des molécules de substitution sont limitées par plusieurs inconvénients à savoir les enzymes d'origine végétale résident dans leur inaptitude technologique, les enzymes d'origine microbienne demeurent dans leur toxicité et leur prix de revient élevé.

En revanche, Les ferments lactiques, largement étudiés de par le monde constituent de nos jours la base même de l'industrie laitière. Leur culture, leur qualité, leur choix ainsi que le judicieux équilibre des souches qui les composent revêtent une importance considérable dans la mesure où ils conditionnent la maîtrise de la production et la qualité des produits finis. Les bactéries lactiques sont largement utilisées pour leurs propriétés technologiques notamment pour l'acidification et l'affinage dans la fabrication des fromages. Des recherches concernant ces bactéries méritent toute l'attention afin de découvrir chez ces bactéries une activité coagulante et cela est en relation avec plusieurs avantages quant à l'utilisation de cette flore, notamment :

- Ø Leur large utilisation et leurs conditions d'utilisation réglementées,
- Ø Leur innocuité car elles ne produisent pas de toxines,
- Ø Et leurs rendements de production qui peuvent être augmentés par

l'amélioration génétique des souches et l'optimisation des conditions de fermentation.

L'Algérie demeure dépendante des laboratoires étrangers fournisseurs de présure et de ferments lactiques; d'où l'intérêt de rechercher des sources locales de production d'enzymes coagulantes, en particulier celles d'origine bactérienne.

Le but de notre étude est la contribution à la recherche des enzymes de remplacement de la présure d'origine bactérienne.

Dans cette optique, nous avons étudié la possibilité d'obtention de protéases coagulant le lait à partir de culture de bactéries lactiques.

Notre étude comporte quatre parties:

- Ø L'isolement et identification de souches locales de bactéries lactiques du lait cru et de ferments lyophilisés,
- Ø La sélection et caractérisation de bactéries lactiques,
- Ø L'extraction de protéases pariétales coagulant le lait,
- Ø La caractérisation de l'extrait enzymatique à l'état brut.

Etude bibliographique

I- Le lait

Le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques est indispensable à la compréhension de sa transformation et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (VIGNOLA., 2002).

1- Définition

Le lait a été défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme suit :

« Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ». (LUQUET., 1985 ; DEBRY., 2001).

Le lait est synthétisé dans les acini à partir d'éléments puisés dans le sang et, le plus souvent remanié pour donner les substances spécifiques du lait dont les principales, en masse, sont le lactose, les caséines, la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, les acides gras courts (C4 à C10) et l'acide citrique (DEBRY., 2001).

2- Caractéristique

Le lait est un fluide aqueux, opaque, blanc, d'une odeur peu prononcée, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité. Ce liquide hétérogène est ainsi le seul aliment des mammifères nouveaux-nés et il y a autant de laits différents qu'il existe de mammifères dans le monde (ALAIS., 1984 ; POUGHEON et GOURSAUD., 2001).

Parmi les aliments, le lait et ses dérivés, riches à la fois en protéines, en lipides, en sels minéraux et en vitamines, sont les plus à même de pouvoir apporter la quantité journalière correspondant aux apports nutritionnels conseillés (DEBRY., 2001). Compte tenu de la richesse du lait et produits laitiers, ils constituent un milieu favorable à la croissance de différentes espèces microbiennes lactiques exigeantes en facteurs de croissances.

3- composition du lait

Le lait est un système complexe, hétérogène dans lequel trois phases distinctes coexistent.

- ∅ La phase aqueuse, qui contient l'eau (87% du lait) et les éléments solubles donnant naissance au lactosérum, (lactose, sels, protéines solubles, composés azotés non protéique, vitamines et enzymes).
- ∅ La suspension colloïdale micellaire (2,6%), donnant naissance au caillé obtenu par la coagulation des caséines suite à l'action de microorganismes ou d'enzymes.

Ø L'émulsion (4,2%), donnant naissance à la crème, une couche de globules gras rassemblés à la surface du lait, par effet de gravité (DEBRY., 2001).

La composition moyenne des principaux constituants des divers types de laits est indiquée dans le tableau1. La composition de ces laits est assez voisine. Mais il existe quelques variations entre espèces animales en fonction de la race, l'âge, l'alimentation, la saison et le moment de la traite (AGABRIEL et al ., 1993 ; MARTIN et COULON.,1995 ; KREVZET et al., 1996).

Tableau 1 : Composition moyenne (en %) du lait de différentes espèces.
(Selon DEBRY., 2001 et VIGNOLA., 2002)

Espèce	Eau	Matière grasse	Protéines	Lactose	Sels minéraux
Vache	87,5	3,7	3,2	4,6	0,8
Chèvre	86,7	4,5	3,2	4,3	0,8
Brebis	82	7,2	4,6	4,8	0,9
Bufflesse	82,8	7,4	3,8	4,8	0,8
Jument	88,8	1,9	2,5	6,2	0,5
Femme	87,1	4,5	0,9	7,1	0,2

Chaque constituant du lait possède une structure spécifique et des propriétés physico-chimiques qui le distinguent des autres. Les plus importants sont l'eau, les matières grasses, les protéines, les glucides, les minéraux, les vitamines et les enzymes.

3-1- Les matières azotées

L'analyse du lait par minéralisation, montre que 95% de la quantité totale d'azote est présente dans les protéines dont la concentration moyenne est de 3,2%. Les composés azotés non protéiques, principalement des protéoses, des peptones et de l'urée, ne représentent que 5% (BRUNNER., 1981 ; LINDEN et LORIENT., 1994).

Différentes structures et propriétés physicochimiques distinguent les protéines du lait (Figure1). On les classe en deux catégories d'après leur solubilité dans l'eau et leur stabilité : d'une part, les différentes caséines qui sont en suspension colloïdale, qui se regroupent sous forme de micelles et d'autre part, les protéines du sérum qui sont en solution colloïdale et qui précipitent sous l'action de la chaleur (AMIOT et al., 2002).

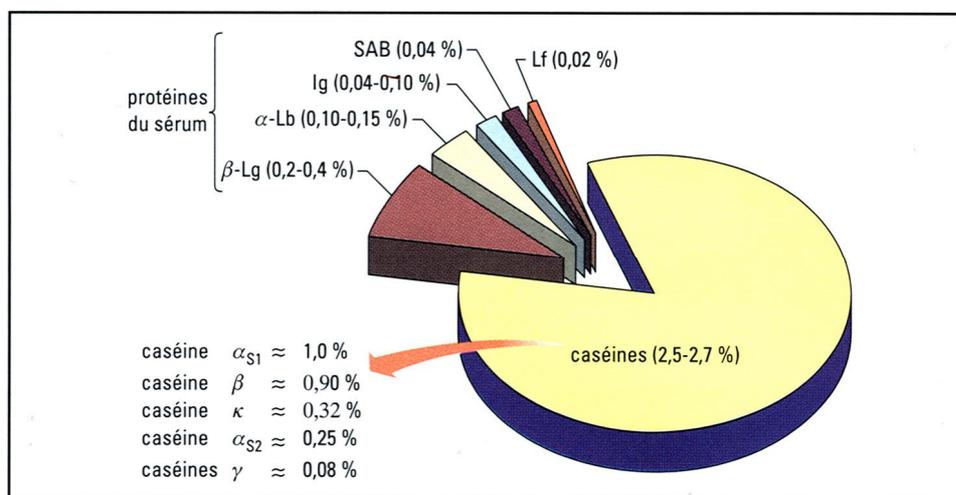


Figure 1 : Pourcentage des différentes protéines du lait (CAYOT et LORIENT., 1998).

Les caséines constituent la fraction protéique la plus déterminante dans le processus de coagulation du lait. Pour cela, nous allons passer en revue leurs principales caractéristiques.

3-1-1- Les caséines

Les caséines représentent 80 % des protéines totales du lait de vache. Elles sont associées à des phosphates et citrates de calcium et contiennent une faible proportion de sucre, ce sont des phospho-glycoprotéines appelées aussi phospho-caséinates de calcium (VEISSEYRE., 1975).

Les caséines sont formées de 40% d' α_{s1} - caséines, 10% d' α_{s2} - caséines, 30% d' β - caséines, 15 % d' κ - caséines et de 5% de γ - caséines (GOURSEAUD., 1993). Ces fractions caséiques (α_{s1} , α_{s2} , β et γ) représentent les constituants les plus importants en raison de leurs propriétés qui interviennent dans le phénomène de coagulation, et constituent de ce fait, la base de la fabrication fromagère. A cet effet, les caséines sont phosphorylées par une liaison ester avec la serine ou la thréonine. Elles sont précipitées à pH 4,6, à température ambiante et ne sont pas insolubilisées à 100°C (LEFFIER et COLLIN., 1982).

Les caséines s'associent pour donner des agrégats sphériques reproductibles, de poids moléculaire élevé, appelés micelles (LIDEN et LORIENT., 1994). Les mécanismes de formation sont décrits par plusieurs auteurs, entres autres SCHMIDT., (1980).

Ainsi, selon SCHMIDT., (1980), la micelle serait constituée d'un ensemble de sous- unités, associées les unes aux autres par les éléments minéraux (calcium, magnésium et phosphate). Elles sont organisées de telle manière que les pôles hydrophobes soient à l'intérieur et les pôles hydrophiles à l'extérieur. Elles s'agrègent entre elles par l'intermédiaire du calcium et du

phosphate minéral (figure 2). La caséine • localisée à l'extérieur de la micelle, joue un rôle protecteur grâce à sa faible teneur en phosphore et à sa richesse en glucides, elle est hydrophile et assure la stabilité de la micelle (GOURSEAUD., 1993).

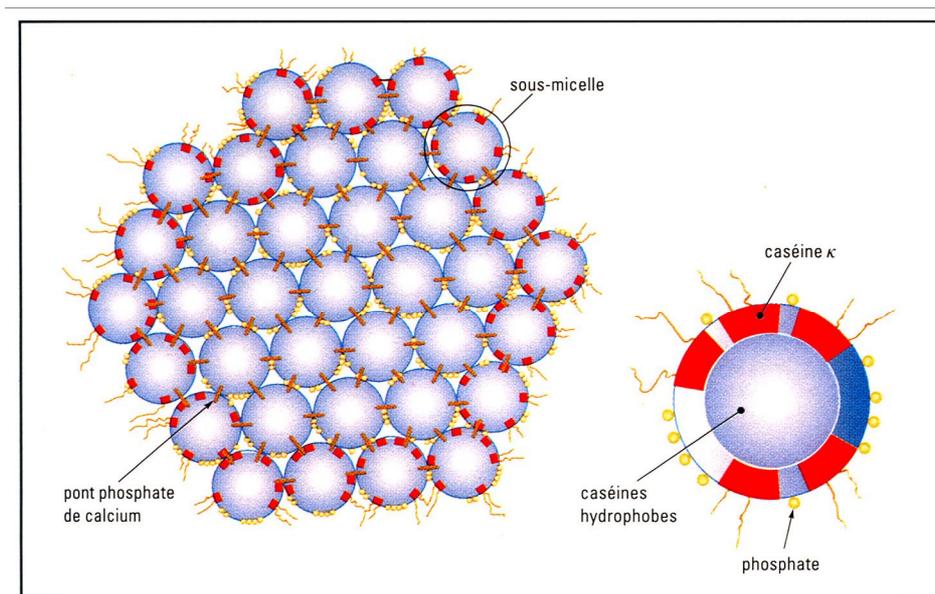


Figure 2 : Modèle de représentation de la micelle de caséine et sous- micelle de caséine (AMIOT et al ., 2002).

3-2- Les glucides

Les glucides du lait de vache sont constitués essentiellement de lactose : •-D-galactopyranosyl (1-4) D-glucopyranoside • ou •. Seulement 1,0 à 1,6 g/l sont des oligosides libres ou combinés aux protéines (ALAIS et al ., 2003).

Le lactose est le glucide, ou l'hydrate de carbone, le plus important du lait puisqu'il constitue environ 40% des solides totaux (VIGNOLA., 2002).

On distingue selon un classement basé sur leur polarité électrique :

- Ø Les glucides neutres : lactose, glucose, galactose ;
- Ø Les glucides azotés : glucosaminesN-acétylées et galactosaminesN-acétylées ;
- Ø Les glucides acides toujours liés aux glucides neutres ou azotés (acide sialique) (DEBRY., 2001).

3-3- Les matière grasses

Les matières grasses du lait se composent principalement de triglycérides 98%, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de •- carotène (AMIOT et al., 2002 ; ALAIS., 2003). Ces lipides se solidifient à température ambiante BOYAVAL., 1995).

Les matières grasses du lait se présentent sous forme de petits globules sphériques qui sont invisibles à l'œil nu. La dimension des globules gras est d'environ 0,1 à 20 μm , elle varie selon l'espèce, la race et selon la période de lactation. Le diamètre moyen des globules étant de 3 à 4 μm , on estime qu'il a environ de trois à quatre milliards de globules de gras par millilitre de lait entier (AMIOT et al., 2002 ; ALAIS., 2003).

Les globules gras dans le lait sont en émulsion, formés de différentes couches de triglycérides : triglycérides liquides, à bas point de fusion, ils sont au centre du globule et les triglycérides solides, à plus haut point de fusion, se superposent aux précédents. Le globule est formé à la périphérie d'une d'enveloppe contenant des phospholipides et des protéines (lipoprotéines, enzymes, agglutinine). La présence de charges négatives sur la structure des protéines de membrane empêche les globules de matières grasses de s'agglomérer (AMIOT et al., 2002 ; ALAIS., 2003).

II- Les coagulants du lait

1- Généralités

De multiples protéases sont des enzymes capables de coaguler le lait (ST-GELAIS., 2002). Elles peuvent être de différentes origines ; animale (GARNOT et MARTIN., 1980), végétale (GUTFELD et ROSENFELD., 1975) et microbienne (FOLTMANN., 1981).

2- La présure

Le lait et l'enzyme coagulante représentent les deux facteurs les plus importants dans la fromagerie (CHEFTEL et CHEFTEL., 1980). Il existe plusieurs types de coagulants utilisés en fromagerie. Le plus important et le plus connu est la présure d'origine animale.

La présure est une enzyme protéolytique, extraite de la quatrième caillette des jeunes ruminants avant sevrage. Elle est utilisée traditionnellement comme principal agent de coagulation dans la majeure partie des fabrications fromagères (PIEN., 1974 ; ALAIS., 1984 et WINGLEY., 1996). Selon BOUDIER., (1974) et GUTCHOS., (1979), le nom présure est réservé à l'enzyme extraite de la caillette des veau.

La chymosine et la pepsine sont les deux fractions actives de la présure, avec une prédominance de la chymosine (BRULE et al., 1997). Le rapport chymosine/pepsine a une incidence sur la vitesse de coagulation et sur les caractéristiques rhéologiques du gel (MIETTON et al., 1994).

2-1- La chymosine

La chymosine constitue la composante majeure de la présure synthétisée au niveau des caillottes des jeunes bovidés non sevrés. Elle possède une faible activité protéolytique et une activité coagulante plus importante.

Cette substance est sécrétée inactive sous forme de pro-chymosine dans la caillotte, elle est activée sous l'action de l'acidité. C'est une holoprotéine dont le poids moléculaire est voisin de 30700 Da, constituée de 323 acides aminés, stable à pH 5,3-6,3, inactive à pH basique vers 7,5 et dénaturée à pH 8,0. L'inactivation thermique de la chymosine a lieu dès 50°C et elle est totale à 61°C. Son activité optimale est observée à la température de 42°C (ALAIS., 1984 et GOURSAUD., 1996).

2-2- La pepsine

La pepsine est synthétisée dans les cellules principales de la muqueuse gastrique (PERCHERON et al., 1991). Sa sécrétion devient prépondérante qu'après sevrage des bovidés (RAMET., 1987). Elle possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante.

La pepsine est caractérisée par un poids moléculaire de 33400Da (GOURSEAUD., 1999). Elle est relativement stable à des pH comprises entre 5 et 5,5 et instable à des pH 2. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat. C'est une enzyme thermosensible en solution après 55°C. Elle est dénaturée à des températures supérieures à 70°C (GRAINDAY., 1978).

Il existe différentes pepsine celle utilisée dans la présure est d'origine bovine. Selon MATHIEU., (1981) et CUVERLLIER., (1999), dans certains cas de la fabrication fromagère, la pepsine (ovine, porcine ou autre) est utilisée comme substitut de la présure.

3- Les succédanés de présure

Ces dernières années, un certain nombre de raisons ont incité de multiples recherches concernant de nouvelles sources de remplacement de la présure. A savoir : prix élevé des préparations commerciales de la présure, la forte demande de produits dérivés du lait (fromage), l'obligation d'éviter l'abattage de veaux de lait et l'interdiction de l'utilisation de la présure pour des raisons philosophiques ou religieuses dans certains pays.

Les enzymes de remplacement, qui coagulent le lait sont du groupe des protéases. Leur action sur la caséine est analogue à celle de la présure. Les inconvénients majeurs pour l'utilisation des protéases de substitution de la présure sont dans certains cas la baisse du rendement fromager (HURTAND., 1995) et l'apparition d'un goût d'amertume (VASSAL et GRIPON., 1984 ; LEMIEUX et al., 1991 et MOLINARD et al., 1994) d'où l'intérêt accordé par plusieurs auteurs à l'activité protéolytique non spécifique (BARBOZA et al.,

GARNIER., 1977; SHAKER et BROWN., 1985).

3-1- Les succédanés de présure extraits de microorganismes

Le développement de la microbiologie et les processus de fermentation industriels ont conduit à une meilleure connaissance et utilisation des mécanismes de synthèse des enzymes chez les micro-organismes (SHARMA et MATHUR., 1988 et MARGESIN et SHINNER., 1994).

Les succédanés d'origine microbienne présentent des avantages par rapport à ceux d'origine animale et végétale qui sont liés aux propriétés des micro-organismes à savoir : la croissance rapide sur substrat bon marché, la maîtrise et l'optimisation des conditions de fermentations.

3-1-1- Les succédanés de présure d'origine bactérienne

De multiples recherches en biologie moléculaire et en biotechnologie ont permis de mettre en évidence les potentialités des bactéries à produire des coagulases (GREEN., 1977). Parmi les bactéries étudiées, signalons les espèces appartenant au genre *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*. De nombreuses espèces productrices de protéases ont été répertoriées par BOUDIER., (1974). Dont les principales sont indiquées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Exemples de quelques succédanés de présure d'origine bactérienne (BOUDIER., 1974)

Origine	Nom de l'enzyme
Bacillus B. subtilis B. stearothermophilus	Subtilysine thermolysine
Lactobacillus helveticus	
Streptococcus faecalis var. Liquefaciens	
Micrococcus lipoliticus	

3-1-2- Succédanés d'origine fongique

De nombreux travaux ont été réalisés sur les protéases fongiques à effet coagulant (REPS et al., 1979 ; ORTIZ et al., 1994 et PAQUET., 1997) (Tableau 3). La quantité de ces protéases et leur aptitude technologique sont controversées. En effet, selon certains auteurs, en l'occurrence WAHBA et ABBASSY., (1989) et LEMIEUX et SIMAR., (1991) ont montré que l'emploi de protéases fongiques conduit à un développement d'amertume plus ou moins marquée, lié à la production de peptides de faibles poids moléculaires

responsables du goût amer des fromages.

Néanmoins, certaines moisissures ont été utilisées pour la production de protéases coagulant le lait, les principales espèces sont *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Edothia parasitica*. Ces espèces de moisissures sont utilisées par les usines de fermentation pour produire des coagulases (ROTINI et SEQUI., 1972 ; et LAGRANGE et al., 1980).

- Ø *Mucor pusillus* : moisissure banale du sol, mésophile ; la préparation enzymatique est produite par la firme Japonaise MEITO- SANGYO et commercialisée par NOURY.
- Ø *Endothia parasitica* : moisissure parasite du châtaignier, à partir de laquelle la firme américaine PFIZER produit et commercialise la préparation enzymatique sous le nom de Serecurd et Saparen.

Tableau 3 : Exemples de quelques succédanés de présure d'origine fongique. (BOUDIER., 1974)

Origine	Nom commercial de l'enzyme
Ascomycetes <i>Endothia parasitica</i>	Sure Curd (Pfizer Supareu)
Phycomycetes <i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i> lindt <i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Rhizopus chinensis</i>	Novo Novadel Hanilase (Bell- Hansen)
Deuteromycetes <i>Aspergillus candicus</i> <i>Penicillium citrinium</i> <i>Fusarium</i> sp	

Ces préparations enzymatiques ont été soumises à des contrôles hygiéniques et toxicologiques sévères, afin de déterminer l'absence d'antibiotiques et d'aphlatoxines (NOOR-DEVILLET et al., 1983).

Des travaux ont été réalisés sur la production de coagulases à partir de levures génétiquement modifiées. Ainsi, BERG et al., (1990) ; O'SULLIVAN et FOX., (1990) et plus récemment DEMERDASH et al., (1997) ; se sont intéressés aux levures, en l'occurrence l'espèce *Kluyveromyces lactis* qui a fait l'objet de modifications génétiques pour améliorer ses performances de production de protéases coagulant le lait. Ces auteurs ont montré que les levures constituent une source potentielle de coagulases de remplacement de la présure.

3-2- Les succédanés de présure d'origine animale

En plus de la présure extraite de la caillette de veau non sevré, d'autres tentatives d'extraction de l'enzyme coagulante à partir du système digestif de d'autres animaux (bœufs, buffles, moutons, chèvre, porcs) et volailles ont été réalisées (BOUDIER., 1974 ; SMEETS., 1995 ; MORSLI et al., 1996 ; BENGANA et al., 2001). Plusieurs formes purifiées ont été utilisées et commercialisées (tableau 4).

Le tube digestif de certains mammifères sécrète des protéases autres que la présure, notamment la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. La trypsine et la chymotrypsine donnent un fromage de mauvaise qualité suite à une activité protéolytique trop élevée qui donne un coagulum très mou et un affinage rapide accompagné d'un goût désagréable (RICHARDSON et CHAUDARI., 1970 et ALAIS., 1971). Par contre, la pepsine, en particulier celle du bœuf et du porc, a fait l'objet de très nombreuses études (KOPELMAN et COGAN., 1983). Selon EMMONS et al., (1970), et MATHIEU., (1981), l'utilisation de la pepsine porcine en mélange 50/50 avec la présure est autorisée aux USA et au Canada. La pepsine bovine a été utilisée dans la fabrication des fromages à pâte molle.

De nombreuses études ont été réalisées sur la pepsine d'origine avicole (GORDIN et al., 1978 ; HUSEK et SEDEK., 1981 et SMEETS., 1995). Cette enzyme a été utilisée dans la fabrication des fromages cheddar et emmenthal ; peu de différence d'arôme, de goût ou de consistance ont été remarquées par rapport aux mêmes types de fromages fabriqués avec la présure (FINDLAY et al., 1984 ; HASSAN et al ., 1984 et HAMED., 1990).

Une étude plus récente réalisée par MORSLI., (1996) sur la pepsine du pro- ventricule du poulet *Gallus gallus* a conduit à la préparation d'un fromage à pâte molle (camembert) dont la qualité organoleptique ainsi que le rendement étaient comparables au fromage témoin préparé avec la présure.

Récemment, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'extraction de l'enzyme coagulante à partir de l'estomac d'autres animaux, en l'occurrence l'extrait de la pepsine obtenu à partir de la paroi interne de l'estomac de la morue de l'Atlantique (BREWER et al., 1984), ainsi que celui de la muqueuse gastrique du phoque (SHAMSUZZAMAN et al., 1985 et HAARD et al., 1985). Alors que RAMMAN., (1994) a étudié à lui, la pepsine extraite de l'estomac de lapin.

Tableau 4 : Exemples de quelques succédanés de présure d'origine animale (BOUDIER., 1974)

Origine	Enzyme	Marque commerciale
Préparation de présure de veau	Chymosine - pepsine	Rennet Hausen
Présure de veau pur, cristallisé	Chymosine	Stersen (Bengeas)
Pepsine de porc	Pepsine	Pantex- Peptilac (Hausen)
Pepsine de bœuf	Pepsine	Colepsine
Mélange enzymatique animal	Chymosine	Metroclor (pfizer)

3-3- Les succédanés d'origine végétale

De nombreuses plantes ont un pouvoir coagulant et constituent une source essentielle d'enzyme de remplacement de la présure. Ainsi, plusieurs études ont été effectuées pour l'obtention et la purification des enzymes de substitution de la présure, tout particulièrement dans les pays où l'animal est vénéré (GUTFELD et ROSENFELD., 1975 ; GUTCHOS., 1979 ; MORSLI et al., 1985 et AL AMIR et al., 2002).

Depuis deux décennies, de nombreux extraits enzymatiques d'origine végétale coagulant le lait ont fait l'objet d'étude, en l'occurrence l'extrait du figuier (*Ficus carica*) de l'artichaut (*Cynara scolymus*) et du chardon (*Cynara cardunculus*) (TSOULI., 1974 ; OSNASKI et al., 1975 ; BARBOSA., 1976 et CORDERIO et al., 1992). D'autres extraits à pouvoir coagulant ont été signalés ; ainsi BROWN., (1974) a montré que l'extrait des baies de *Carica papaya* présente une activité coagulante, néanmoins les résultats sont moins satisfaisant que les extraits de d'autres végétaux cités précédemment.

Selon VERISSIMO et al., (1995), l'extrait enzymatique du chardon présente beaucoup de propriétés coagulantes déterminées, il n'en demeure pas moins que leur application industrielle est actuellement très limitée. Un des inconvénients majeurs de ces extraits réside dans leur forte activité protéolytique qui est à l'origine des défauts de goût et d'amertume observés dans les fromages préparés avec ces extraits (ALAIS., 1971 ; RAMET et HARDY., 1973 ; ROSEIRO., 1991 et WILKINSON., 1993). Ainsi, une utilisation efficace de ces extraits oblige à les purifier au préalable, ce qui augmente le prix de revient.

Tableau 5 : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait
(MIETTON et al., 1994)

Origines		Enzymes
Animaux	Ruminants § Veaux * § Chevreaux * § Agneaux *] chymosine + pepsine
	§ Bovins adultes *	Pepsine + chymosine
	Monogastriques § Porcs	Pepsine
	Oiseaux § Poulets	Pepsine
Végétaux	§ Figuiers (suc) § Ananas (tige) § Chardon, artichaud § Gaillet § Courge...	Ficine Broméline
Moisissures	§ Endothia parasitica* § Mucor pusillus * § Mucor miehei * § Aspergillus niger	Protéase Protéase Protéase Chymosine
Levures	§ Kluyveromyces lactis	Chymosine
Bactéries	§ Escherichia. coli § Bacillus subtilis	Chymosine Subtilisine

*autorisé déjà en France

III- La coagulation du lait

1- Définition de la coagulation

C'est une étape primordiale dans la fabrication du fromage. La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines qui flocculent puis se soudent pour former un gel emprisonnant le liquide de dispersion c'est à dire le sérum (VIGNOLA., 2002).

2- Les différents types de coagulation

Nous distinguons divers types de coagulations qui peuvent être obtenus par action enzymatique, abaissement du pH ou par action mixte.

2- 1- La coagulation par voie enzymatique

2-1-1- Enzymes coagulantes

Il existe un grand nombre d'enzymes protéolytiques (tableau 5), d'origine animale, végétale ou microbienne, qui ont la propriété de coaguler le lait (ST-GELAIS., 2002).

Les plus utilisées sont de loin les protéases d'origine animale (mélange de chymosine avec une teneur variable en pepsine), et les protéases d'origine microbienne (principalement celles extraites de *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, et *Mucor miehei*). Les préparations coagulantes d'origine végétale sont rarement utilisées, en raison de leur pouvoir coagulant très variable et de leur activité protéolytique excessive (MIETTON et al ., 1994).

2-1-2- Mécanisme de la coagulation par la présure

La coagulation par la présure a généralement lieu à des pH compris entre 6,7 et 6,2 (TARODO DE LA FUENTE et al., 1999) et à une température de 40°C à 42°C. Le mécanisme d'action de la présure comporte les phases suivantes :

√ La phase primaire

La phase primaire, ou phase enzymatique, correspond à une attaque de l'enzyme sur la composante qui stabilise la micelle, c'est-à-dire que l'enzyme hydrolyse la caséine-• au niveau de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆. La chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments inégaux : le segment 1-105 est la paracaséine-• et le segment 106-169, le caséinomacropéptide (CMP) (figure 3). La paracaséine-• liée aux caséines • et • reste intégrée à la micelle hydrophobe, insoluble à caractère basique.

Le CMP contenant tous les glucides est libéré et passe dans le lactosérum, hydrophile à caractère acide (LENOIR et VEISSEYRE., 1987 ; KHALID et al ., 1992 ; DALGLEISH., 1993 ; TARODO et al., 1999 et ST-GELAIS., 2002).

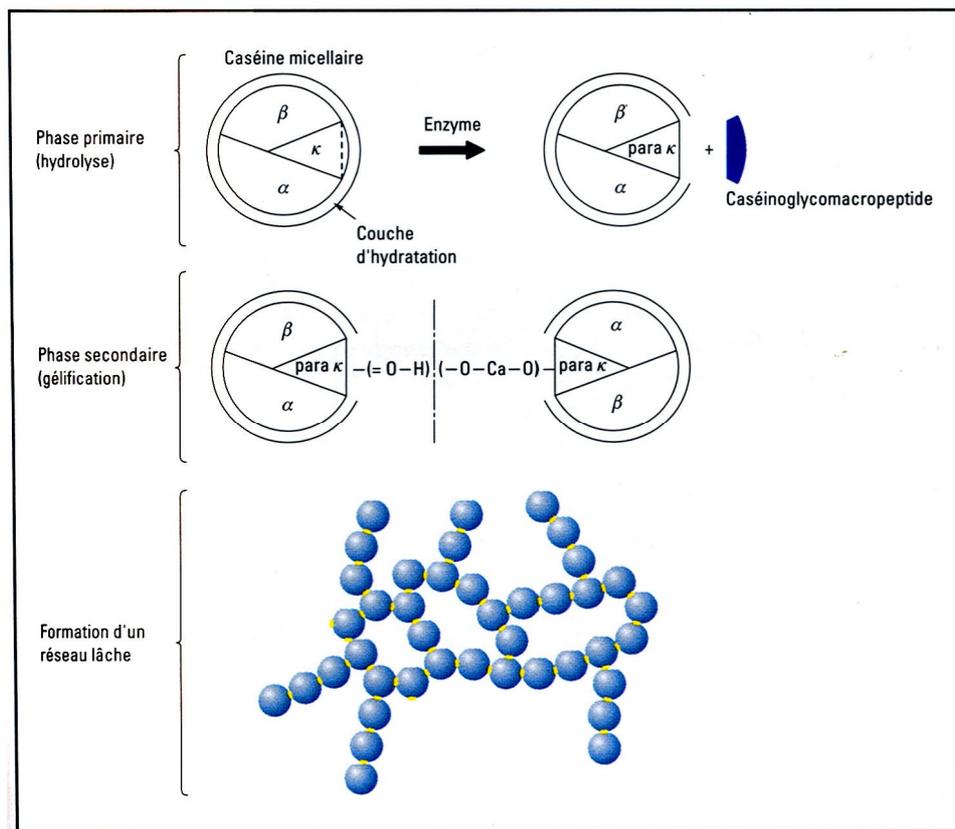


Figure 3 : Différentes phases de la coagulation enzymatique du lait et formation du réseau (MIETTON., 1995).

✓ La phase secondaire

Lors de la libération du CMP, il se produit une diminution importante de la charge électrique (négative) des micelles et de leur degré d'hydratation. Du fait de la suppression de ces deux facteurs essentiels, les micelles se déstabilisent, se rapprochent et forment des liens hydrophobes qui permettent leur agrégation et finalement la formation d'un gel (MIETTON et al., 1994 ; ST- GELAIS et al 2002).

Cependant, pour que cette phase d'agglomération débute, il faudrait qu'au moins 85 à 90 % de la caséine-• soit hydrolysée et atteint son maximum lorsque la totalité est hydrolysée (ST-GELAIS et al., 2002).

✓ La phase tertiaire

C'est une phase durant laquelle les micelles déstabilisées et agrégées sont soumises à une réorganisation profonde qui mobilise la fraction

phosphocalcique (BRULE et al., 1997).

Selon BENEDEK., (1981) et ALAIS et al., (2003) cette phase correspond à une protéolyse générale ou non spécifique et lente.

Durant le phénomène de coagulation, les trois réactions démarrent en même temps mais, à chaque étape, une réaction prédomine par rapport aux deux autres.

2-1-3- Influence de différents paramètres sur l'activité coagulante

a- Influence de la température

La vitesse de coagulation du lait est maximale à 40-42 °C avec la présure de veau. En-dessous de 10 °C le gel ne se forme pas. L'inactivation thermique de l'enzyme commence à 50 °C, et à 61°C elle est totale. L'enzyme de *Mucor miehei* est plus sensible que la présure de veau aux variations de la température ; en revanche, la protéase de *Endothia parasitica* est moins sensible. Comme l'enzyme de *Mucor miehei* est plus thermorésistante que la présure ou l'enzyme de *Endothia parasitica*, elle se retrouve dans les sérums de fromagerie (notamment ceux issus de la fabrication d'emmentals), et entraîne des accidents lors de leur utilisation dans les aliments d'allaitement pour veaux. C'est pourquoi les producteurs d'enzymes ont développé des préparations modifiées présentant une sensibilité thermique comparable à celle de la présure (LARRETA., 1997).

b- Influence du pH

Son incidence est considérable. Globalement l'abaissement du pH réduit le temps de prise, augmente la vitesse de raffermissement du gel et influe tant sur l'activité de l'enzyme coagulante (GRET et BRULE., 1993 ; MARTIN et COULON., 1995).

L'optimum d'hydrolyse de la caséine par la chymosine est compris entre 5,4 et 5,7 (MIETTON et al., 1994).

L'enzyme coagulante de *Mucor miehei* réagit comme la présure animale aux variations de pH du lait. Par contre l'enzyme de *Endothia parasitica* est moins sensible (LARRETA., 1997).

c- Influence de concentration en CaCl_2

La présence d'ions calcium en quantité suffisante est indispensable à la floculation des micelles modifiées par l'action de la présure. La coagulation se produit lorsque la concentration initiale en Ca^{++} du lait est de l'ordre de $(0,15 \text{ à } 0,2) \times 10^{-2} \text{ M}$. Ainsi, un lait pauvre en calcium coagule lentement et le gel obtenu est mou, l'addition de chlorure de calcium peut restaurer l'aptitude du lait à la coagulation (BALCONES et al., 1996).

A pH 6,51 l'enzyme de *Endothia parasitica* est la moins sensible au calcium, suivie par la présure animale et l'enzyme de *Mucor miehei*. La protéase de *Mucor pusillus* est la plus sensible (LARRETA., 1997).

2-2- La coagulation par abaissement du pH

L'abaissement du pH du lait conduit à la précipitation des caséines (pH isoélectrique, voisin de 4,6). Cette acidification du lait peut être obtenue de deux façons :

- Ø La coagulation par des bactéries lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique. Cette acidité provoque une solubilisation du phosphate de calcium colloïdal, un élément important dans la stabilité des micelles de caséines. Dépourvues de phosphate de calcium, les micelles se défont en sous-unités. Ces dernières s'associent par liaisons électrostatiques et hydrophobes pour former un gel lactique qui emprisonne toute l'eau (ST-GELAIS et al., 2002).

La coagulation peut intervenir à pH 5,1-5,2 si la température est relativement élevée (37 à 45°C) (TARODO., 1999), à pH 5 à 20°C et à pH 4,6 à 4°C (MIETTON et al 1994).

- Ø La coagulation par abaissement du pH peut être aussi obtenue par l'addition d'un acide ; le plus couramment utilisé est l'acide chlorhydrique. La réaction est réalisée à une température voisine de 50°C. Cette méthode est appliquée pour obtenir la caséine acide pauvre en éléments minéraux, en particulier le phosphate de calcium (CALVO et al., 1993 ; HURTAND., 1995).

2-3- La coagulation mixte

En fromagerie, la coagulation du lait résulte le plus souvent de l'action combinée de la présure et de l'acidification. Trois types de caillés peuvent être obtenus suivant l'intensité du mode de coagulation utilisé, soit par acidification d'un caillé présure, soit par emprésurage d'un lait en cours d'acidification soit par ensemencement par un ferment et emprésurage en même temps (WEBER., 1990 ; ST-GELAIS et al., 2002). Ce caillé présente des caractéristiques intermédiaires du caillé lactique et du caillé enzymatique.

IV- Les bactéries lactiques

1- Historique

Les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (SALOFFE COSTE., 1994). Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certains chercheurs ont pu isoler un *Streptocoque* (POULLAIN., 1994).

Dès 1919 les bactéries lactiques ont été définies par Orla- Jensen comme étant un groupe qui réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides pour produire de l'acide lactique.

Très rapidement, les bactéries lactiques s'avèrent utiles à l'homme et contribuent à la production de nombreux produits alimentaires fermentés comme le fromage, le pain, le vin, légumes et fruits, poisson et viandes. Aujourd'hui, on estime à 25 % la proportion d'aliments provenant de fermentation dans le régime alimentaire d'un européen et à 60 % pour celui d'un habitant d'un pays en voie de développement (HOLZAP-FEL et al., 1995). L'industrialisation des processus de fermentation depuis les années 60 a entraîné une grande exigence sur la qualité, la constante et la conservation du produit. Ceci s'est aussi traduit par un important développement des recherches concernant non, seulement les propriétés biotechnologiques des souches, mais aussi leur connaissance fondamentale (voies métaboliques, sensibilité aux bactériophages, production de bactériocines, taxonomie) (ATLAN et al., 2000).

2- Définition

Les bactéries lactiques sont des Gram positives. Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, ayant pour caractéristique commune la production d'acide lactique par fermentation des hydrates de carbone (NOVEL., 1993). Ces bactéries, en forme sphérique ou en bâtonnet, sont immobiles, asporulées, et dépourvues de catalase, de nitrate réductase et cytochrome oxydase (LARPENT et LARPENT-G., 1997).

3- origine et habitat

Grâce à leurs capacités d'adaptation physiologique et biochimique, les bactéries lactiques sont distribuées largement dans la nature. Elles sont ubiquistes sont distribuées dans différentes niches écologiques (DROUVAULT et CORTIER., 2001). Néanmoins, Certaines espèces semblent être adaptées à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leur habitat naturel (tableau 3 ; annexe2).

Le lait par sa composition riche en substances nutritionnelles et en facteurs de croissance constitue un excellent milieu de culture pour les bactéries lactiques aptes à assimiler ces constituants par différentes voies métaboliques (ALAIS., 1984).

4- Taxonomie et classification des bactéries lactiques

La taxonomie des bactéries lactiques a longtemps classé et identifié des espèces bactériennes au niveau des genres, en se basant sur leurs propriétés morphologiques, température optimale de croissance, tolérances, métaboliques et biochimiques (AMIEL et al., 2001 ; KIRSCHNER et al., 2004).

La détermination de la taxonomie et la classification actuelles font appel à

des techniques génétiques et moléculaires. Ainsi, plusieurs méthodes ont été utilisées pour caractériser les bactéries lactiques, telles que l'estimation du contenu en GC%, technique d'hybridation des acides nucléiques, séquençage de l'ARNr-16s et autres techniques de génétiques moléculaire (GEVERS et al., 2001).

Les bactéries lactiques appartenant à la subdivision Clostridium avec un pourcentage en guanine et cytosine inférieur ou égal à 50 %, présentant néanmoins une forte diversité (de 34 à 50 %). Aujourd'hui, les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire sont regroupées en 11 à 12 genres Carnobactérium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella et Aerococcus (STILES et HOLZAPFEL., 1997 ; ATLAN., 2000 ; GEVERS et al., 2001 ; GARRITY et al., 2004).

Parmi les genres les plus importants et les plus connus :

4-1- Genre Lactococcus et Streptococcus

Il s'agit de bactéries en forme de coques ayant pour principale caractéristique la présence, dans leur enveloppe, d'antigène spécifique qui a permis l'établissement de la classification de Lancefield.

Le genre "Lactococcus" anciennement appelé Streptococcus, représente les streptocoques lactiques qui forment un groupe différent des autres espèces qui peuvent être soit pathogènes soit saprophytes. Ce genre appartient au groupe N de Lancefield. Les streptocoques lactiques ou les lactocoques peuvent être isolés à partir du lait ou de certains végétaux (LARPENT., 1991), et ils représentent la flore dominante du lait, de la crème et du fromage frais (ALAIS., 1984).

Ces bactéries lactiques sont différentes entre elles par la présence d'un antigène de Lancefield, par leur capacité à se développer à des températures extrêmes : 42 à 45°C pour les thermophiles et 30°C pour les mésophiles (NOVEL., 1993).

Avant les années 80 les streptocoques lactiques mésophiles regroupés deux espèces : Streptococcus lactis et S. cremoris ; et une sous espèce : S. lactis subsp

diacetylactis caractérisée par sa capacité à produire de l'acétyle (JONES., 1978). En 1982, GARAVIE et FARROW ; BOURGEOIS et LEVEAU., (1991) ; NOVEL., (1993) ont proposé de regrouper sous le nom commun de Streptococcus lactis trois sous espèces Streptococcus lactis subsp lactis, Streptococcus lactis subsp cremoris et Streptococcus lactis subsp diacetylactis, en se basant sur leur propriétés moléculaires communes (leur ADN contient 34 à 36 % de G+C...).

La création du genre *Lactococcus*, regroupant les Streptocoques lactiques mésophiles, a été proposée par SCHLEIFER et ses collaborateurs en 1985 et 1987 en se basant sur des critères moléculaires. Ce nouveau genre regroupe donc l'ancienne espèce *Streptococcus lactis*, ses trois sous espèces et d'autres espèces telles *S. raffinolactis*, *S. plantarum* et *S. garviae*. Cependant, la sous espèce *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis* devient le biovar *diacetylactis* de la sous espèce *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (DESMAZEAUD., 1992).

Lactococcus lactis est l'une des espèces les plus importantes dans l'industrie laitière. Elle est utilisée dans la fermentation de la plupart des fromages (Voir annexe 2).

Ainsi, les espèces les plus importantes sont les suivants :

- Ø *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (anciennement *Streptococcus lactis*) : c'est l'espèce la mieux caractérisée et la mieux connue jusqu'à présent (BOLOTIN et al., 2001). Plus répandue que les deux autres espèces, elle peut être isolée à partir du lait de certains végétaux et peut également provenir des mamelles ou des fourrages. Cette variété est acidifiante et est très utilisée dans les ferments lactiques (ALAIS., 1975).
- Ø *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (anciennement *Streptococcus cremoris*) : cette bactérie est plus délicate, plus fragile et donc plus difficile à se multiplier par rapport aux deux autres espèces. Sa morphologie est assez caractéristique et se présente sous forme de longues chaînettes. On ne la retrouve pratiquement que dans le lait c'est une espèce acidifiante qui peut également passer pour une espèce aromatisante (ALAIS., 1975).
- Ø *Streptococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* (anciennement *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*) : son rôle principal est de produire l'acétoïne et du diacétyle ; composés qui lui confèrent son pouvoir aromatisant (ALAIS., 1984 et LARPENT., 1991). Elle colonise surtout les végétaux.
- Ø *Streptococcus thermophilus* : cette espèce lactique qui appartient toujours au genre *Streptococcus*, peut se développer à 45°C. elle se caractérise par une absence d'antigène de groupe, une thermo résistance à 60°C pendant 30 mn, une forte sensibilité au NaCl et une activité fermentaire réduite à quelques sucres (NOVEL., 1993). Elle est également largement utilisée comme ferment lactique soit en association avec le genre *Lactobacillus* (le plus souvent), soit avec des Lactocoques *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ou subsp *cremoris* pour la production du cheddar par exemple (MICHEL et MARTELY., 2001).

4-2- Genre *Lactobacillus*

Ces bactéries en forme de bâtonnets, sont microaérophiles et leur croissance en surface sur les milieux solides est favorisée en anaérobiose (LECLERC et MOSSEL., 1989). Elles sont donc anaérobies aérotolérantes et on distingue deux types : homo et hétéro fermentaires qui libèrent de l'acide lactique D, L ou DL. Elles peuvent être thermophiles ou mésophiles. Les espèces les plus utilisées en industrie laitière sont *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. plantarum* (LARPENT., 1987 ; LARPENT et LARPENT-GOURGAUD., 1997) (Voir annexe 2).

Les *Lactobacillus* possèdent de nombreuses protéases, qui expliquent leur activité caséolytique marquée. Cependant l'acidification, du lait par ces bactéries, est plus lente mais plus poussée qu'avec les Lactocoques. Les *Lactobacilles* mésophiles sont plus abondants dans le lait cru que les thermophiles (ALAIS., 1984). Ils sont souvent utilisés en association avec différentes espèces du genre *Lactococcus* (MENEDEZ et al., 2000) ou avec *Streptococcus thermophilus* pour la production de yaourt par exemple. Selon LARPENT (1991) ; GASSER et al (1994) ; LARPENT et LARPENT-GOUREAUD., (1997) ; ce genre *Lactobacillus* est subdivisé en trois groupes :

- Ø Groupe I anciennement appelé *Thermobactérium* : bactéries à métabolisme strictement homofermentaire pouvant se développer à 45°C mais pas à 15°C.
- Ø Groupe II anciennement appelé *Streptobactérium* : bactéries à métabolisme hétérofermentaire facultatif se développant à 15°C.
- Ø Groupe III anciennement appelé *Betabacterium* : bactéries à métabolisme strictement hétérofermentaire.

4-3- Genre *Pediococcus*

Ces bactéries ont un métabolisme homofermentaire et produisent, à partir des hexoses, de l'acide lactique DL ou L(+), selon les espèces. Cellules se présentent sous formes sphérique, jamais allongées, regroupés par paires et tétrades. Elles sont exigeantes en facteur de croissance et en acides aminés et requièrent, pour leur croissance, des milieux enrichis. Toutes les espèces poussent bien à 30°C (DELLAGLIO et al., 1994 ; LARPENT et LARPENT-GOUREAUD., 1997). Leur faible activité protéolytique et, chez la plupart des espèces, leur incapacité à utiliser le lactose ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait (LARPENT., 1997).

Ce sont des bactéries qu'on trouve dans le lait, certaines boissons et dans des végétaux en décomposition (NOVEL., 1993).

4-4 Genre *Leuconostoc*

Ce sont des bactéries en forme de coque à métabolisme hétéro-fermentaire ; elles produisent, à partir des hexoses monophosphates, du CO₂, de l'éthanol ou de l'acide acétique et de l'acide lactique lévogyre (DEVOYOD et POUILLAIN., 1988 ; DELLAGLIO., 1994; LARPENT et LARPENT-GOUREAUD., 1997).

Les cellules des *Leuconostoc* sont de forme lenticulaire ou sphérique, disposées en paires ou en chaînes. Leur croissance est lente elles ont des exigences nutritionnelles complexes et une température optimale de multiplication de 25 à 30°C.

Les expressions d'hybridation ADN-ADN révèlent quatre groupes génétiques. Leur utilisation reste axée sur le beurre et les fromages frais et ceci est lié à leur production de diacétyl. Toutefois la production de CO₂ est largement exploitée. *Leuconostoc oenos* est responsable de la fermentation malolactique des vins (LARPENT et LARPENT-GOUREAUD., 1997).

5- Métabolisme général des bactéries

5-1- Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules exigeantes du point de vue nutritionnel. Elles requièrent des substances carbonées, azotées, phosphatées et soufrées, des nucléotides et des acides gras, mais aussi des facteurs de croissances comme les vitamines et les oligo-éléments (DE ROISSART., 1986 et KONNING., 1994).

5-2- Métabolisme des sucres et d'autres substances carbonées

Chez les bactéries lactiques les glucides sont transportés et accumulés soit sous forme de radicaux libres, par transport actif, soit sous forme de dérivés phosphorylés, par des systèmes phosphotransférase-phosphoénolpyruvate dépendant (PEP-PT) (THOMPSON et GENTRY-WEEKS., 1994).

Les bactéries lactiques, dans les domaines industriel et médical, sont connues pour leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. Les principales voies métaboliques des sucres sont les voies Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) et pentose-phosphocétolase (PPC) qui correspondent à la voie homofermentaire et la voie hétérofermentaire (THOMPSON et GENTRY-WEEKS., 1994). Pour ces bactéries, le lactose est transporté par un système perméase, coupé par une β -galactosidase pour donner du galactose et du glucose qui sont dégradés par différentes voies métaboliques :

- Ø Homofermentaire où le sucre est catabolisé à 90% en acide lactique,
- Ø Hétérofermentaire où le lactose aboutit à la formation de quantités équimoléculaires d'acide lactique, d'éthanol, et de CO₂ (GUIRAUD et GALZY., 1982 ; DEROISSART., 1986).

Les bactéries lactiques métabolisent plusieurs acides et surtout l'acide citrique qui est considéré comme le principal précurseur du diacétyle, de l'acétaldéhyde, de l'acétate et du CO₂ qui sont les principaux responsables de l'arôme (DEROISSART., 1986). Le métabolisme du citrate par ces bactéries se fait en plusieurs étapes :

- Ø Le transport actif du citrate est effectué à travers la membrane cellulaire grâce à une citrate perméase,
- Ø Le clivage du citrate par une citrate lyase (ou citratase) avec formation de pyruvate,
- Ø La transformation du pyruvate en butanédiol par des produits intermédiaires (LARPENT et LARPENT-G., 1997) (Voir annexe 2).

5-3- Métabolisme azoté des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse de presque tous les acides aminés et doivent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (MONNET et GRIPPON., 1994). Les bactéries lactiques sont peu protéolytiques comparativement à de nombreux groupes bactériens (*Bacillus*, *Pseudomonas*, bactéries coliformes) ou de fungi (levures, *Penicillium*) (LARRETA., 1997). Cependant, avec les substrats spécifiques et les tests sensibles, leur activité est tout à fait détectable.

Durant ces dernières années, la connaissance des systèmes protéolytiques des bactéries lactiques a conduit à une compréhension plus détaillée du mode d'utilisation de l'azote. Ces systèmes protéolytiques sont complexes de par leur nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais aussi de par leur localisation cellulaire.

5-3-1- Protéases

5-3-1-1- Protéases extracellulaires

Les protéases extracellulaires connus chez les bactéries lactiques sont des enzymes associées à la paroi (figure 4). Ces dernières années, les connaissances concernant les protéases pariétales des bactéries lactiques se sont considérablement accrues notamment grâce au développement des techniques de génie génétique. En effet, différents auteurs ont localisé un seul gène responsable de l'activité protéasique et ils ont établi sa séquence pour 3 souches de *Lc.lactis* subsp *cremoris* Wg2 (KOK et al., 1988), subsp, *cremoris* SK11 (VOS et al., 1989; MARUGG., 1996), subsp *lactis* NCDO 763 (KOK et VENEMA., 1988). Une homologie de 98% a été trouvée entre les différentes séquences nucléotidiques de ce gène chez les trois bactéries. Le gène code pour une protéine de 200kDa dont le site actif est très similaire à celui de la

subtilisine. Cette dernière connue et extraite chez le *Bacillus subtilis* est l'une des enzymes bactériennes de remplacement de la présure la plus étudiée. En effet, plusieurs auteurs, FODA., (1977), RAO et MATHUR., (1979) et TAWARI., (1988) ont étudié les fromages obtenus avec des préparations enzymatiques de *Bacillus subtilis* et indiquent que les produits finis présentent une qualité appréciable.

La protéase la plus connue est présente chez de nombreuses bactéries lactiques est dénommée PrtP (ANONYME., 2000). Chez *L. lactis* plusieurs auteurs décrivent cette seule protéase de surface, PrtP. Cette protéase PrtP est codée par un gène plasmidique. Mais POQUET et al en 2001 mettent en évidence l'unicité de HtrA en tant que protéase de surface chez *L. lactis* avec un intérêt de point de vu appliqué. De plus, il existe des protéases de surface différentes de PrtP chez d'autres bactéries lactiques : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* possède une métallo-protéase de surface (STEFANITSI et GAREL., 1997), et *Lactobacillus. helveticus* a un homologue de HtrA, dont le gène est inductible en condition de stress (SMEDS et al., 1998).

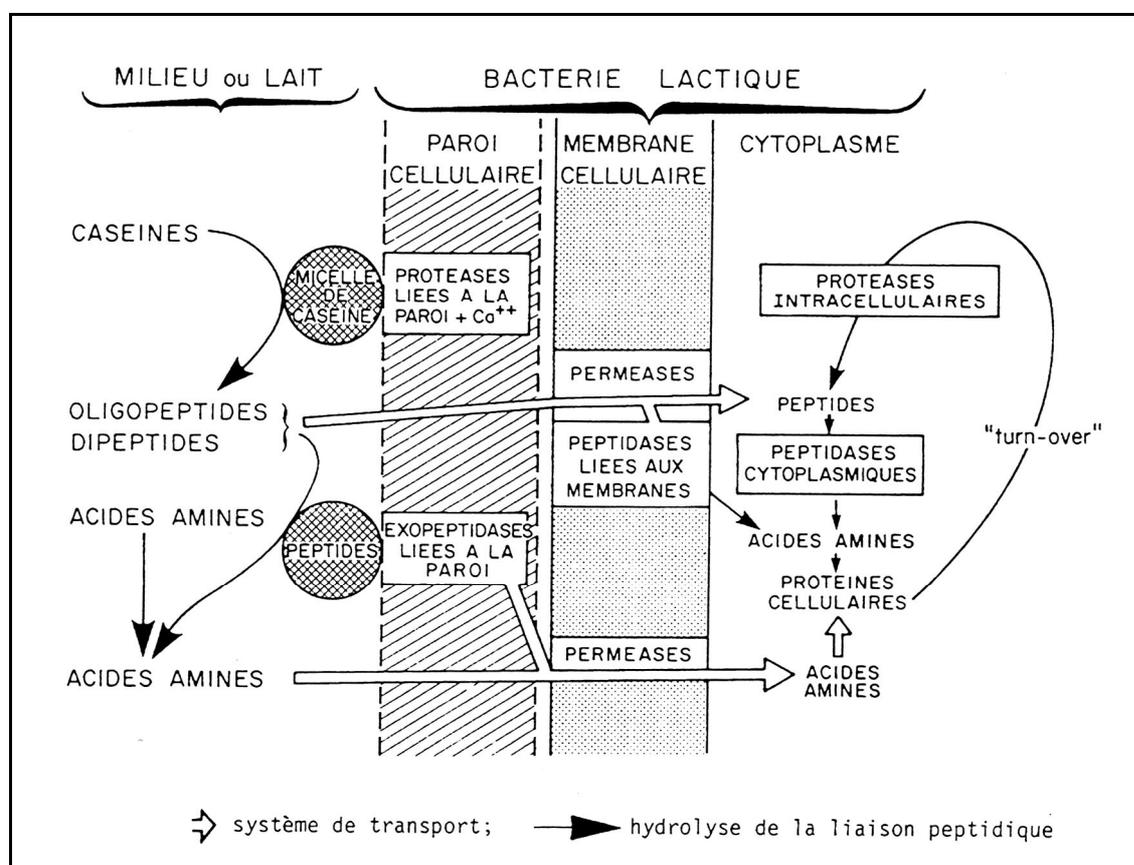


Figure 4 : Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (DESMAZEAUD., 1983).

5-3-1-2- Protéases membranaires

EXTERKATE (1976, 1984) a décrit deux enzymes capables d'hydrolyser des substrats synthétiques pour *Lc. Lactis* ssp *cremoris* : une activité à 37°C et une autre active à 50°C. Cependant, ces enzymes n'attaquent pas la

caséine mais seulement des substrats de synthèse ce qui remet en cause le caractère protéasique de ces protéines (figure 4).

5-3-1-3- Protéases intracellulaires

Ce type de protéases sert à la maturation des protéines intracellulaires et joue un rôle non négligeable dans la dégradation des protéines du lait après lyse des cellules. Plusieurs d'entre elles sont responsables de l'affinage des fromages (figure 4).

5-3-2- Peptidases

La dégradation de la caséine, par les protéases des bactéries lactiques, est complétée par l'action des peptidases. Chez ces bactéries on a pu mettre en évidence plusieurs activités peptidasiques (amino-peptidasiques, di-peptidasiques, tri-peptidasiques) (figure 4). Ce sont toutes des enzymes de type métallo-enzymes dont les propriétés varient selon leur localisation (MONNET et GRIPPON., 1994). Outre leur rôle nutritionnel pour les bactéries lactiques, ces activités vont permettre de limiter l'amertume des peptides libérés par les protéases, que celles-ci viennent du lait, de la présure ou des micro-organismes (LARRETA., 1997).

5-4- Métabolisme des lipides

Parmi les activités métaboliques des bactéries lactiques, les estérasiques et lipolytiques sont les plus mal connues. Cependant, elles participent à l'élaboration de la flaveur de nombreuses denrées alimentaires, bien que parfois elles soient à l'origine d'altérations. Les estérases hydrolysent les esters d'alcools, de phénols et d'acides gras de courte chaîne tandis que les lipases sont spécialisées dans l'attaque des triglycérides en émulsion, donc des triglycérides insolubles (TALON et MONTEL., 1994)

6- Fonction et sélection des bactéries lactiques en technologie laitière

6-1- La production d'acide lactique

L'une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière est la production d'acide lactique, qui permet de concentrer, et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien, 30% du lactose du lait est dégradé en acide lactique et aboutit à une forte diminution du pH, parfois inférieur à 4 (LOONES., 1994).

6-2- La production de substances aromatiques

La fermentation lactique ne conduit pas uniquement à la production d'acide lactique, elle aboutit également à la formation de quantités plus au moins importantes de composés secondaires dont les principaux sont les suivants : l'acide formique, l'éthanol, l'acide acétique, le diacétyle, l'acétoïne, l'acétaldéhyde et le gaz carbonique (LEVEAU et al., 1991). Ces composés

volatiles participent au développement de l'arôme et de la saveur des produits fermentés ACCOLAS et al ., 1980).

6-3- La production de polysaccharides

Les bactéries lactiques comme d'autres micro-organismes, synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans les cellules ou/et élaborés et excrétés dans le milieu de culture.

Les polysaccharides excrétés par les bactéries lactiques contribuent au développement de la texture des produits laitiers (PETRY et al., 2000 ; FRENGOVA et al 2002 ; VANINGELGEM et al., 2004). L'utilisation d'exopolysaccharides dans l'industrie laitière est basée essentiellement sur leurs aptitudes épaississantes, gélifiantes, stabilisantes et émulsifiantes (DEVUYST et al., 1998 ; FABER et al., 2001).

6-4- Activité protéolytique

L'activité protéolytique des bactéries lactiques, bien que relativement faible, est réelle et joue un rôle important en technologie fromagère, mais aussi dans la nutrition et les interactions des bactéries du yaourt (ZOURARI et al., 1992 ; SCHMIDT et al 1994).

Les bactéries lactiques contribuent au développement des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (FERNANDEZ-ESPLA et RUL., 1999), en libérant des systèmes enzymatiques, en particulier protéolytiques. La protéolyse est un phénomène impliqué au cours de la fabrication de laits fermentés. Il se traduit par la libération successive de peptides de différentes tailles et d'acides aminés qui sont d'importants substrats d'une grande variété de réactions cataboliques produisant des composés volatils essentiels à la saveur, la texture et à la saveur (MC SWEENEY et SOUSA., 2000).

6-5 Production des antimicrobiens et bactériocines

Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes qui influent sur la conservation des aliments en inhibant le développement de germes indésirables. L'effet antimicrobien principal exercé par ces bactéries résulte de la production d'acides organiques (acide lactique et acétique), le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines.

Ces bactériocines sont définies comme étant des molécules de natures protéiques. Le nombre de bactériocines des bactéries lactiques caractérisées a augmenté de façon exponentielle au cours des dix dernières années (nisine, lactocine, hélvéticine, plantaricine...etc) (voir annexe 2). Elles sont actives contre des bactéries Gram positives, phylogénétiquement proche de la souche productrices (MORISSER.D et al., 2005). La nisine, la plus étudiée produite par *Lactococcus lactis* est le seul anti-bactérien à être utilisé comme additif alimentaire, et a récemment été proposée comme alternative aux antibiotiques

(BREUKINK et DE KRUIJFF., 1999).

7- propriétés thérapeutiques

Les bactéries lactiques jouent des rôles d'aspects thérapeutiques. En effet, certaines souches de bactéries lactiques s'avèrent bénéfiques pour la santé humaine et sont appelées probiotiques (Atlan., 2000). Les probiotiques sont capables de survivre dans le système digestif humain voire de le coloniser et sont utilisées pour le traitement des diarrhées. Elles peuvent être considérées comme un moyen pour véhiculer des principes actifs (enzymes, composants de paroi, peptides ou nucléotides immunomodulateurs, protéines antibactériennes...) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif (MARTEAU et SEKSIK., 2005).

De nombreux chercheurs ont mis en évidence des propriétés de stimulation de la réponse immunitaire spécifique ou non spécifique chez les bactéries lactiques. Chez la souche de *Lactococcus lactis* les expériences ont montré sa capacité à réduire les réactions d'allergie alimentaire, en particulier aux protéines du lait (Atlan., 2000 ; LE LOIR et al., 2001; CHRISTIANE MOREAU., 2005).

Aussi de nouvelles hypothèses ont été proposées sur l'effet potentiellement protecteur des produits laitiers fermentés de la cancérogenèse colorectale. Les bactéries lactiques pourraient moduler la flore colique et influencer son activité enzymatique en réduisant la conversion de pro-cancérogènes en cancérogènes actifs dans le côlon. Des études *in vitro* ont également montré que les bactéries lactiques avaient la capacité d'absorber des mutagènes d'aliments cuits (SLIMANI et al., 2001).

FLAMBARD., (2002 et 2005) a étudié le rôle important des bactéries lactiques dans les maladies cardiovasculaires, en effet, chez *Lb helveticus* (CPN4, CP790), *Lb delbrueckii* (SS1) et *Lc lactis* (FT4), elle a décrit le mode d'action de ces bactéries dans la baisse de tension par la production de peptides (AHP) anti-hypertensifs. Aussi ALGARON et al., (2004) ont montré que la biodiversité du système protéolytique des bactéries lactiques mène à l'obtention des peptides ayant des activités immuno-modulatrices ou anti-hypertensives et donc une ouverture sur la production naturelle de peptides bioactifs dans les produits laitiers fermentés par ces bactéries.

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1^{ère} partie : Obtention des souches

1- Source des prélèvements

Le lait cru de vache a été utilisé comme source de prélèvements. Il provient de la ferme centrale de l'Institut National Agronomique (INA- El Harrach- Alger) et de différentes fermes de la wilaya de Blida (lait de collecte).

Le prélèvement de chaque échantillon de lait a été réalisé aseptiquement. Avant la traite nous avons procédé à la désinfection des mains du vacher et des mamelons de la vache. Le lait a été recueilli dans des flacons stériles selon les méthodes préconisées par AFNOR., (1987).

Des ferments lactiques commerciaux ont été également utilisés dans cette étude, leur provenance est citée en complément de milieux de culture (annexe1).

2- Contrôle du lait d'isolement

2-1- Analyse microbiologique du lait

Avant de procéder à l'isolement des souches, nous avons effectué un contrôle de la qualité microbiologique du lait prélevé selon le protocole décrit par BERENS et LUQUET., (1987) ; LEBRENS., (2004) résumé dans tableau 6. Cette recherche a porté sur les microorganismes suivants : la flore mésophile totale, coliformes fécaux, *Eshérichia coli*, *Staphylococcus aureus*, germes sulfito-réducteurs, *Enterocoques*, *Salmonella*, moisissures et levures.

2-2- Recherche des résidus d'antibiotiques

Les résidus d'antibiotiques ont été recherchés dans les échantillons de lait utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques. Pour la réalisation de cette recherche 2 souches dites sensibles *Streptococcus thermophilus* et *Bacillus subtilis* ont été ensemencées en boîte de Pétri successivement sur milieu M17 et sur gélose nutritive. Des disques de papier absorbant stérile (wathman) imprégnés des échantillons de lait à analyser sont déposés à la surface des géloses des deux boîtes préparées. Ces deux dernières sont ensuite incubées à 42°C pendant 72 h pour la souche *Str. thermophilus* et à 30°C pendant 24h pour la souche de *B. subtilis*. La lecture de ce test est basée sur l'apparition des zones d'inhibitions des souches sensibles utilisées.

Tableau 6: Recherche et dénombrement des différentes flores dans le lait utilisé comme source d'isolement des bactéries recherchées. (BERENS et LUQUET., 1987 ; LEBRES., 2004)

Microorganismes recherchés et/ou dénombrés	Milieux de culture	Température (°C) et durée (h) d'incubation
Germes aérobies à 30°C	Gélose Plate Count Agar (PCA)	30°C/ 72h
Coliformes totaux	Bouillon lactose bilié au vert brillant (VBL) par la méthode du NPP.	37°C/ 48h
E. coli	Repiquage à partir du VBL positif sur VBL et eau peptonée exempte d'indole test de confirmation par la production d'indole par le réactif de Kovacs.	44°C/ 24h
Enterocoques	Test de présomption sur milieu ROTHE test de confirmation sur milieu LITSKY.	37°C/24h
Staphylococcus aureus	Recherche et dénombrement sur milieu Baird Paker additionné de tellurite de potassium (1%) et d'une émulsion de jaune d'œuf (10%).	37°C/ 48h
Germes sulfite-réducteurs à 46°C	Viande foie additionné d'Alun de fer plus sulfite de sodium.	Pré-traitement à 80°C/10mn 46°C/72h
Salmonella	- Pré- enrichissement dans du TSE. - Enrichissement dans le bouillon sélénite plus cystéine. - Isolement sur gélose Hecktoen et gélose S-S	37°C/ 24h 37°C/24h 37°C/24h
Levures et moisissures	Gélose à l'oxytétracycline glucosée (OGA)	20°C /5jours

3- Techniques d'isolement des bactéries lactiques

3-1- Milieu d'isolement

Les milieux d'isolement utilisés pour les différents genres sont décrits par: PETRANSXIENE et LAPIELD., (1981); DEROISSART., (1986) ; LEVEAU et al., (1991); CURK MC et al., (1994) ; LARPENT et LARPENT-G., (1997)

Les milieux sont les suivants:

- milieu M17 pour les Streptocoques thermophiles et mésophiles (Lactocoques).
- milieu MRS à pH 5,4 pour les Lactobacilles thermophiles et mésophiles.
- milieu MAYEUX pour les Leuconostoc.

*La composition des milieux est donnée en annexe 1.

3-2- Phase d'isolement

L'isolement a concerné les genres suivants : Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus et Leuconostoc selon le protocole décrit par PETRANSXIENE et LAPIELD., (1981) ; BOURGEOIS et LEVEAU (1991). La recherche des bactéries lactiques a été réalisée à partir des ferments lactiques commerciaux et des prélèvements du lait cru de bonne qualité microbiologique.

3-2-1- Isolement et purification des Lactobacillus

Les étapes d'isolement et de purification sont récapitulées dans le tableau 7.

Tableau 7: Les différentes étapes d'isolement et de purification du genre Lactobacillus.

Différentes étapes	Modes opératoires
1	Lait cru mis à cailler pendant 24h à température ambiante (20°C) en vue d'accélérer le processus d'acidification favorable à la prolifération de Lactobacillus
2	1ml de ce lait a été prélevé et dilué dans de l'eau physiologique stérile
3	Les dernières dilutions (10^{-5} et 10^{-6}) ont étéensemencés en double couches et en profondeur dans des boites de Pétri, contenant la gélose M.R.S à pH 5,4
4	Les boites de Pétriensemencées ont été mises à l'intérieur d'une jarre d'anaérobiose et incubées à 43°C pendant 72h pour les thermophiles et à 30°C pour les mésophiles
5	Les boites ayant des colonies bien développées, bien séparées et non contaminées par les levures et les moisissures ont été retenues
6	Après avoir effectué une coloration de Gram pour les colonies bien distinctes et caractéristiques pour confirmer l'aspect pariétal et la forme cellulaire, une colonie a été prélevée etensemencée dans du lait écrémé reconstitué à 10% (p/v) et incubée à 43°C/24h pour les thermophiles et à 30°C/ 24h pour les mésophiles
7	Plusieurs repiquages successifs ont été faits jusqu'à obtention d'une souche pure suivie par une observation microscopique
8	Plusieurs colonies ont été prélevées et conservées dans du lait écrémé stérile (UHT) et mise par la suite au congélateur (-20°C) en attendant leur identification

3-2-2 Isolement et purification des Streptocoques

L'isolement et la purification des Streptocoques thermophiles et mésophiles (Lactocoques) ont été réalisés, selon le protocole résumé dans le tableau 8

Tableau 8: Les différentes étapes d'isolement et de purification des Streptocoques thermophiles et mésophiles.

Différentes étapes	Modes opératoires
1	1ml de lait cru a été prélevé et dilués dans 9ml d'eau physiologique (TSE)
2	Les dernières dilutions (10^{-5} et 10^{-6}) ont étéensemencées en profondeur dans des boites de Pétri contenant la gélose M17 puis incubées à 42°C pendant 48h pour les Streptocoques thermophiles et à 30°C pendant 48h pour les Lactocoques
3	Les boites de Pétri ayant des colonies bien distinctes ont été retenues, une coloration de Gram a été effectuée pour observer la forme des cellules et l'aspect de leur paroi
4	Une colonie bien distincte et caractéristique a été prélevée aseptiquement et mise dans du lait écrémé stérile (UHT) reconstitué à 10% (p/v) et incubé à 42°C pendant 24h pour les Streptocoques thermophiles et 30°C pendant 24h pour les Lactocoques
5	Plusieurs repiquages ont été faits jusqu'à s'assurer de la pureté totale de la souche, confirmé par des observations microscopiques
6	Les souches pures ont été conservées dans du lait écrémé stérile et mises au congélateur à -20°C en attendant leur identification

3-2-3- Isolement et purification des Leuconostoc

Le milieu Mayeux a été utilisé pour l'isolement des Leuconostoc selon le mode opératoire résumé dans le tableau 9

Tableau 9: Les différentes étapes d'isolement et de purification du genre Leuconostoc.

Différentes étapes	Modes opératoires
1	1ml de ce lait a été prélevé et dilué dans de l'eau physiologique stérile
2	Les dernières dilutions (10^{-5} , 10^{-6}) ont étéensemencées en surfaces puis incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours
3	Les boites de Pétri ayant des colonies bien distinctes ont été retenues, une coloration de Gram a été effectuée pour observer la forme des cellules et l'aspect de leur paroi
4	Une colonie bien distincte a été par la suite prélevée aseptiquement et mise dans du lait écrémé stérile (UHT) reconstitué à 10% (p/v) enrichi à 0,3% d'extrait de levures et incubé à 30°C pendant 24h
5	Des colorations de Gram ont été effectuées après chaque repiquage afin de s'assurer de la pureté de la souche
6	En attendant d'être identifiées les souches isolées et purifiées sont conservées au congélateur à -20°C

4- Techniques d'identifications

Suite à l'étape d'isolement, d'autres tests physiologiques et biochimiques sont réalisés dans le but d'identifier les souches isolées.

Les tests d'identification sont ceux décrits par GUIRAUD et GALZIY., (1980); CHERPRENET et CAU., (1982); DE ROISSART., (1986); DEVOYOD et POUILLAIN., (1988); DELLAGLIO., (1994) ; LARPENT., (2000).

4-1-Techniques d'identification de Lactobacillus

Les souches isolées conservées ont été repiquées sur bouillon MRS et incubées à 43°C/24h pour les thermophiles et 30°C/24h pour les mésophiles. Les différentes étapes d'identification sont résumées dans le tableau 10.

Tableau 10: Les étapes d'identification des souches de Lactobacillus.

Tests	Modes opératoires	Test positif
Catalase	Un inoculum + eau oxygénée à 10 volumes	Effervescence
Culture aux différentes températures	5ml de bouillon MRS estensemencé par les différentes souches à identifier puis Incubé à 45°C/48h à 72h et à 15°C/72h	Trouble
Thermo-résistance	5ml de bouillon MRSensemencé, mis au bain Marie à 60°C/30mn. Refroidir les tubes. Incuber à 43°C/48h pour les Lactobacilles thermophiles et à 30°C/48h pour les lactobacilles mésophiles	Trouble
Culture en présence de NaCl	5ml de bouillon MRSensemencé à 2% et 4% de NaCl. Incuber à 43°C/48h pour les Lactobacilles thermophiles et à 30°C/48h pour les lactobacilles mésophiles	Trouble
Type fermentaire	Milieu Gibson et Abdelmalekensemencé est recouvert par une couche de gélose blanche stérile formant un bouchon. Incuber à 43°C/ 7jours pour les Lactobacilles thermophiles et à 30°C/7 jours pour les lactobacilles mésophiles	Montée de la gélose blanche vers le haut du tube
Hydrolyse de l'arginine	5ml de bouillon MRSensemencé à 0,3% d'arginine. Incuber à 43°C/48h pour les Lactobacilles thermophiles et à 30°C/48h pour les lactobacilles mésophiles	Avec goutte du réactif de Nessler, il y'a développement d'une couleur rouge
Hydrolyse de l'esculine	Milieu à l'esculine estensemencé. Incuber à 43°C/48 à 72h pour les Lactobacilles thermophiles et à 30°C/48 à 72h pour les lactobacilles mésophiles	Noircissement du milieu
Fermentation des sucres	Milieu Mevag sans sucre a été utilisé auquel sont rajoutées quelques gouttes de solution stérile de sucre pour concentration finale de 5g/l. Incuber à 43°C/72h pour les Lactobacilles thermophiles et à 30°C/72h pour les lactobacilles mésophiles Laver les cellules	L'indicateur vire au jaune dans les tubes où le sucre est fermenté

4-2-Techniques d'identification de Streptococcus et Lactococcus (tableau 11).

Les souches isolées conservées ont été décongelées, repiquées sur

bouillon M17 et incubées à 42°C/24h pour les Streptococcus et 30°C/24h pour les Lactococcus. Les différentes étapes d'identification sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11: Les étapes d'identification des souches de Streptococcus et Lactococcus.

Tests	Modes opératoires	Tests positifs
Catalase	Un inoculum + eau oxygénée à 10 volumes.	Effervescence.
Culture aux différentes températures	5ml de bouillon M17 estensemencé. Incubé à 45°C/24h, 37°C/ 72h et à 10°C/10jours.	Trouble.
Croissance en milieu alcalin	5ml de bouillon M17 à pH 9,6 estensemencé. Incubé à 42°C/24h pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/24h pour les Lactocoques.	Trouble.
Culture en présence de NaCl	5ml de bouillon M17 à 4% (p/V) et à 6,5% NaCl (p/v) estensemencé. Incubé à 42°C/24h pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/24h pour les Lactocoques.	Trouble.
Thermo-Résistance	5ml de bouillon M17ensemencé, mis au bain Marie à 60°C/30mn. Refroidir les tubes. Incubé à 42°C/24h pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/24h pour les Lactocoques.	Trouble.
Croissance sur bleu de Shermann	Lait écrémé stérile à 1% de bleu de méthylèneensemencé. Incubé à 42°C/48h pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/48h pour les Lactocoques.	Coagulation du lait.
Type de fermentation	Milieu Gibson et Abdelmalekensemencé est recouvert par une couche de gélose blanche stérile. Incubé à 42°C/10 jours pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/10 jours pour les Lactocoques.	Montée de la gélose blanche vers le haut du tube.
Hydrolyse de l'arginine	5ml de bouillon M17 à 0,3% d'arginineensemencé. Incubé à 42°C/48h pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/48h pour les Lactocoques.	Avec goutte du réactif de Nessler, il y'a développement d'une couleur rouge.
Production d'acétoïne	Tube de 5ml de lait écrémé stérileensemencé. Incuber 24h. le test est révélé par le réactif VPI et VPII.	Coloration rose à rouge après 30mn à température ambiante.
Citratase	0,1ml de culture et 4ml de gélose blanche sont ajoutés à 10ml de lait écrémé et 0,5ml de citrate. Incuber à 42°C/7jours pour les Streptocoques thermophiles et à 30°C/7jours pour les Lactocoques.	Apparition de bulles gazeuses dans la gélose.
Lait tournesolé	Lait tournesoléensemencé. Incuber à 42°C/48h pour les Streptocoques thermophiles et à 30°C/48h pour les Lactocoques.	-virage au rose + coagulation : acidification - décoloration de l'indicateur : réduction
Fermentation des sucres	Milieu Mevag additionné de solution stérile de sucre pour concentration finale de 5g/l estensemencé puis Incubé à 42°C/48h pour les Streptocoques thermophiles à 30°C/48h pour les Lactocoques.	Virage au jaune dans les tubes où le sucre est fermenté.

4-3-Techniques d'identification de Leuconostoc

Les souches isolées conservées ont été décongelées, repiquées sur bouillon MRS et incubées à 30°C/24h. Les différentes d'identification étapes sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12: Les étapes d'identification du genre Leuconostoc.

Tests	Modes opératoires	Tests positifs
Catalase	Un inoculum + eau oxygénée à 10 volumes.	Effervescence.
Culture aux différentes températures	5ml de bouillon MRS estensemencé. Incubé à 45°C/24h, 37°C/à 72h et à 10°C/10jours.	Trouble.
Culture à pH acide	5ml de bouillon MRS à PH6,5 et pH4,8ensemencés. Incubé à 30°C/48h.	Trouble.
Culture en présence de NaCl	5ml de bouillon MRS à 3% et 6,5% NaClensemencés. Incubé à 30°C/24h	Trouble.
Thermo-Résistance	5ml de bouillon MRSensemencé est mis au bain marie à 60°C/30mn. Refroidir. Incubé à 30°C/48h.	Trouble.
Type fermentaire.	Milieu Gibson et Abdelmalekensemencé est recouvert par une couche de gélose blanche stérile formant un bouchon. Incubé à 30°C/10jours	Montée de la gélose blanche vers le haut du tube.
Hydrolyse d'arginine.	5ml de bouillon MRS à 0,3% D'arginine estensemencé. Incubé à 30°C/48h.	Avec goutte du réactif de Nessler, il y'a développement d'une couleur rouge.
Hydrolyse de l'esculine.	Milieu d'esculineensemencé. Incuber à 30°C/72h.	Noircissement du milieu.
Synthèse de dextrane	Milieu de dextraneensemencé. Incuber à 30°C/72h.	Colonies gluantes.
Fermentation des sucres	Milieu Mevag additionné de solution stérile de sucre pour concentration finale de 5g/l estensemencé puis Incubé à 30°C/48h	Virage au jaune dans les tubes où le sucre est fermenté.

2^{ème} partie : Sélection et caractérisation de bactéries lactiques productrices de protéases.

1- Culture en fiole

Les souches des bactéries lactiques isolées et identifiées sont décongelées, repiquées deux fois à 24h d'intervalle dans du lait écrémé stérile reconstitué à 10%(p/v). Pour les *Leuconostoc* le lait est enrichi à 0,3% d'extrait de levure

Une pré- culture de 100ml de lait écrémé estensemencée, avec chaque souche à raison de 1% (v/v), selon le protocole décrit par plusieurs auteurs (CHAMBA et PROST., 1989; AMOROSO et al., 1989; OBERG et BROADBENT., 1993). Les pré- cultures sont incubées à 30°C, 42-45°C respectivement pour les mésophiles et les thermophiles pendant 24h.

Durant toute la période de sélection des différentes souches, des prélèvements stériles sont effectués périodiquement afin d'évaluer la croissance bactérienne et la caractérisation des souches par l'étude de l'évolution du pH, l'acidité titrable et les activités protéolytiques.

2- Mesure de la croissance

La cinétique de la croissance bactérienne a été suivie par la méthode de turbidimétrie, en mesurant la densité optique (DO) dans un volume de 5 ml de lait chaque heure, à 650nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS type DGK.

3- Mesure du pH et de l'acidité

Pour estimer l'activité acidifiante des souches isolées, 10 ml de lait sont répartis dans des tubes à essais à partir des pré- cultures. La mesure du pH ainsi que l'évaluation de l'acidité titrable sont effectuées chaque heure.

3-1- Mesure du PH

Le pH de la culture a été suivi durant la croissance bactérienne à l'aide d'un pH- mètre type HANNA.

3-2- Dosage de l'acidité titrable

L'acidité du milieu de culture a été réalisée par la mesure du degré Dornic (°D) selon la méthode décrite par MATHIEU., (1998). L'acidité Dornic est mesurée par la neutralisation de 10 ml de lait, par l'hydroxyde de sodium (NaOH, N/9), en présence d'un indicateur de pH, la phénolphthaléine.

Ainsi, 1°D = 0,1g d'acide lactique par litre de lait, ce qui est équivalent à 0,1 ml d'hydroxyde de sodium.

4- Dosage des activités protéolytiques des bactéries lactiques

Cette étape a été réalisée afin de caractériser d'une manière globale l'activité protéolytique avec des cellules entières des bactéries lactiques.

Pour estimer l'activité protéolytique au cours de la croissance par les souches isolées, deux méthodes différentes ont été utilisées:

- Ø L'analyse des différentes fractions azotées obtenues à partir de culture des bactéries lactiques dans du lait,
- Ø Et le dosage d'un acide aminé la tyrosine.

4-1- Etude de l'action des bactéries lactiques sur les constituants azotés du lait

L'estimation des différentes formes d'azote a été réalisée selon le protocole décrit par KIKUCHI et al., (1973) : 50 ml de lait de chacune des fiolesensemencée et des témoins sont mélangés à 50 ml d'une solution de citrate 0,5 M à pH 7 afin de mettre en solution les protéines précipitées. Ensuite, les différentes formes d'azote solubilisé sont fractionnées sur ce mélange de la manière suivante :

L'azote non protéique (NPN) a été obtenu après une précipitation à l'aide de l'acide trichloracétique (TCA) 12%.

L'azote non caséique (NCN) a été obtenu après une précipitation à pH 4,6.

L'azote total (NT), la culture n'a subi aucun traitement.

Les fractions d'azote ainsi obtenues ont été dosées à l'aide d'un distillateur de type IDKA par la méthode classique Kjeldahl (1883), réalisée en trois étapes : la minéralisation, la distillation et le titrage.

4-2- Etude du pouvoir protéolytique par dosage de la tyrosine

La mesure de cette activité est réalisée selon la technique de ANSCON., (1938) cité par TOURNEUR., (1972) qui consiste à doser la tyrosine acide aminé porteur d'un groupement phénol.

La mesure a été faite selon le protocole suivant :

A 5ml d'une pré-culture sur lait de la souche à étudier, on ajoute, 5ml d'acide trichloracétique à 4% (p/v), on laisse reposer, avant de filtrer sur papier wathman n°114.

A 1ml de filtrat sont ajoutés :

- 6,5 ml d'eau distillée
- 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 15%
- 0,5 ml de réactif de FOLIN

Une coloration bleue est développée pendant 5 heures à température ambiante et son intensité est mesurée à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS type Jenway6105, selon le protocole décrit par BOUTON et al., (1993).

La teneur en tyrosine est déterminée par rapport à une courbe étalon, exprimée en ppm/ml de filtrat (annexe 3).

3^{ème} partie : Extraction des protéases et étude des activités enzymatiques

1- Culture en fermenteur

A la suite des expériences effectuées dans la deuxième partie de ce travail sur les cellules entières, une extraction des protéases des parois des bactéries lactiques a été réalisée afin de déterminer leur activité enzymatique spécifiquement coagulant le lait. Pour cela une culture de biomasse a été effectuée selon le protocole suivant :

La pré-culture préparée précédemment a servi à ensemercer un réacteur sans agitation et sans aération d'un volume de 2 litres contenant 1 litre de lait UHT à un taux de 1% (v/v). La culture des biomasses est préparée dans les mêmes conditions et incubée à 30°C pour les mésophiles et 43°C pour les thermophiles pendant 8 h.

2- Cinétique de croissance des biomasses

La cinétique de croissance de biomasses a été suivie par la méthode de turbidimétrie, en mesurant la densité optique (DO) chaque heure, à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS type DGK.

3- Extraction des protéases pariétales

L'extraction des protéases a été effectuée à partir des biomasses. Ces dernières récupérées, par centrifugation dans différents tampons ont subi un traitement au lysozyme.

3-1- Extraction des protéases pariétales chez *Lactococcus*

L'extraction des protéases à partir des biomasses des *Lactococcus* a été effectuée selon le protocole décrit par COOLBER et al ., (1992). Les biomasses cultivées en fermenteur ont subi trois phases de traitement afin d'obtenir les extraits enzymatiques bruts :

- ∅ La croissance de biomasses a été réalisée à 30°C à pH 5,0-5,2 dans du lait UHT reconstitué à 10 % de •- glycéro- phosphate de sodium (70 mM). Suit à cette incubation une solution de citrate de sodium a été additionné à raison de 25 % avec une concentration de 60 ml/l le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH 10 M. Ces traitements ont été effectués afin de favoriser la multiplication des cellules par l'effet tampon.
- ∅ Les cellules sont récoltées en phase exponentielle par centrifugation 13000 tr/mn pendant 10 mn à +4°C puis lavées 3 fois successivement dans un tampon phosphate de sodium à 80 mM à pH 6,4. Les cellules ainsi obtenues ont été lavées dans un bouillon (tris- I annexe1) à raison de 25 ml/litre de la culture mère.

- ∅ La suspension cellulaire ainsi obtenue a été traitée avec la solution lysozyme dans du tampon saccharose tris à une concentration finale de 1 mg/ml. Cette suspension cellulaire a été incubée 3 fois successivement à 30°C pendant 30mn. Après chaque incubation la phase soluble est éliminée par centrifugation à 13000 tr/mn pendant 10 mn à 20°C. Les extraits enzymatiques bruts sous forme de pelotes sont stockés dans le même tampon COOLBER et al., (1992).

3-2- Extraction des protéases pariétales chez Lactobacillus

L'extraction des protéases a partir des biomasses des Lactobacillus a été effectuée selon le protocole décrit par COOLBER et al., (1992) ; HEBERT et al., (2000). La culture de biomasses a subi les traitements suivants :

- ∅ Les cultures de biomasses ont été conduites dans du lait écrémé UHT incubées à 43°C à pH 5,5.
- ∅ En phase exponentielle l'élimination du bouillon de culture et la récolte des cellules ont été réalisées par centrifugation à 8000 tr/mn pendant 15 mn, puis à 10000 tr/mn pendant 10 mn à +4°C. Les cellules ainsi obtenues ont été lavées deux fois dans un tampon salé à raison de 0,85 % (P/V) additionné de CaCl₂ à 10 mM et stockées dans un tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,0.
- ∅ La suspension cellulaire ainsi obtenue a été traitée avec la solution lysozyme. Cette suspension cellulaire a été incubée 3 fois successivement à 40°C pendant 30mn. Après chaque incubation la phase soluble est éliminée par centrifugation à 10000 tr/mn pendant 10 mn à 20°C. Les extraits enzymatiques bruts sous forme de pelotes sont stockés dans le même tampon.

4- Dosage des activités enzymatiques des extraits pariétaux

3-1- Etude de l'action des extraits pariétaux sur les constituants azotés de lait

La recherche a été réalisée sur le même protocole cité précédemment dans les études des cellules entières par la méthode Kjeldhal dans un distillateur de type IDKA.

3-2- Détermination de l'activité coagulante

Le dosage de cette activité a été étudié que pour les souches les plus protéolytiques obtenues précédemment.

L'expérience est réalisée avec les extraits enzymatiques bruts des protéases de la paroi obtenues des bactéries lactiques étudiées.

3-2-1- Conditions standard de mesure

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de SOXHLET décrite par ALAIS., (1984). Cette méthode permet d'exprimer l'activité enzymatique en force coagulante représente le volume de lait coagulé par unité de la solution enzymatique en 40 mn, à 35°C et à pH 6,4.

Les conditions standard de la détermination de l'activité enzymatique sont les suivantes :

Volume de la solution enzymatique1ml
Volume du lait à coaguler.....10ml
Température du lait35°C
PH6, 4
Temps40mn = 2400s

3-2-2- Définition de la force coagulante

La force coagulante (activité coagulante) est calculée selon l'expression suivante :

$$F = \frac{2400 \times V}{T \times v}$$

F : force de l'enzyme

V : volume de lait ajusté à pH 6,4 et porté à une température de 35°C (substrat BERRIDGE)*

v : volume de la solution enzymatique

T: temps de coagulation du lait (en secondes)

*Le substrat de BERRIDGE est préparé par introduction de 12 g de lait en poudre écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium à 0,01 M ; après 30mn d'agitation lente, le pH est ajusté à 6,4 avec une solution de HCL ou NaOH à 0,1N. la température du lait est ramenée à 35°C pour pouvoir mesurer le temps de coagulation (BERRIDGE., 1945 rapporté par COLLIN et al., 1977).

3-2-3- Mesure du temps de coagulation

Le temps de coagulation est déterminée selon le protocole décrit par COLLIN et al ., (1977) qui consiste à ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 10 ml du substrat de BERRIDGE. Le temps de coagulation correspond à l'apparition des premiers flocons sur la paroi interne du tube dans les conditions de réaction.

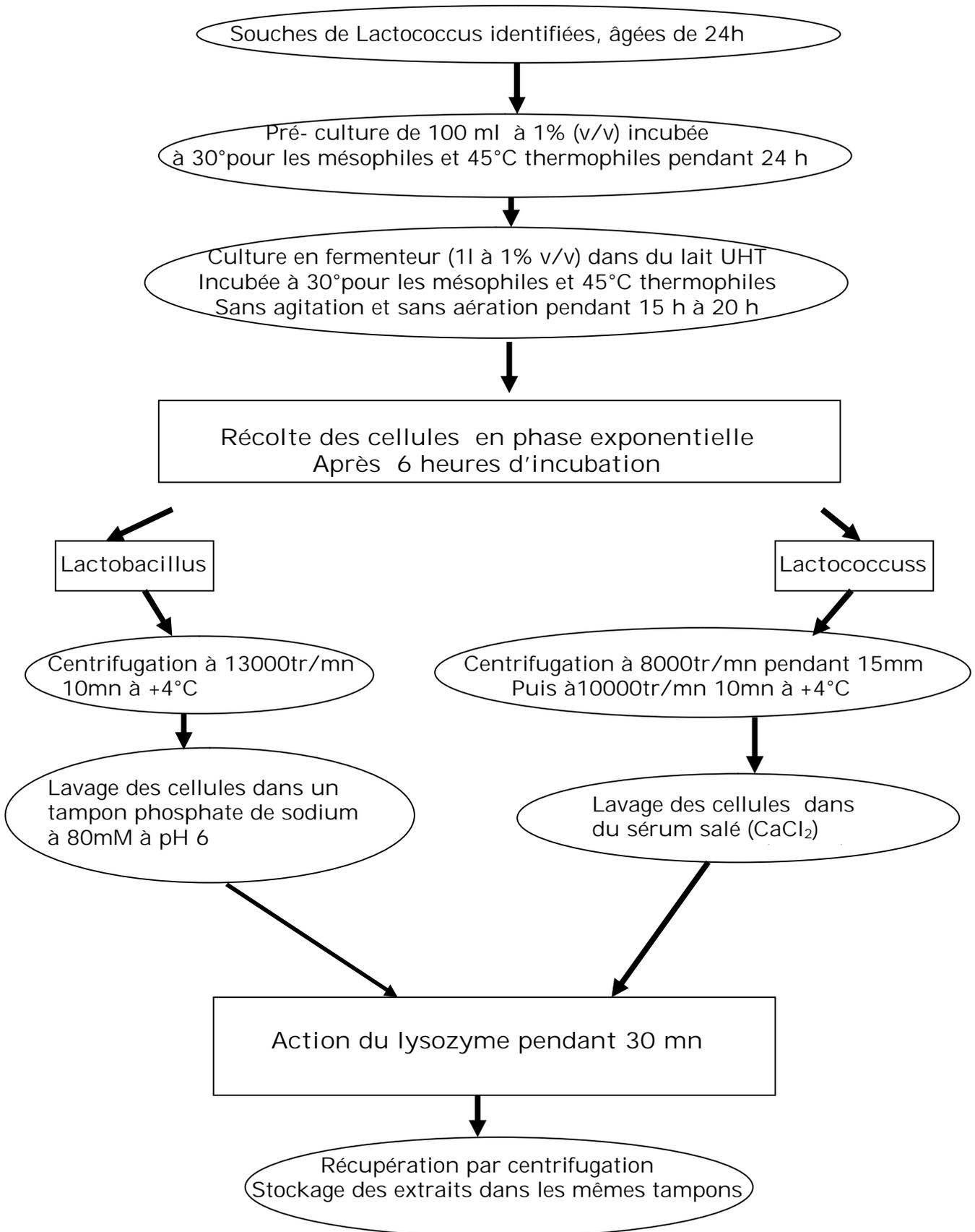


Figure 5 : Schéma de l'extraction des protéases pariétales chez les biomasses du genre Lactococcus et Lactobacillus cultivées en fermenteur (COOLBER et al., 1992 ; HEBERT et al., 2000).

4^{ème} partie : Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

La caractérisation des extraits enzymatiques bruts consiste à déterminer les conditions optimales d'activité coagulante en fonction de certains facteurs (la température, le pH et concentration en CaCL₂).

1- Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de coagulation du lait par l'extrait enzymatique est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait porté à des températures variables (30 à 75°C).

2- Détermination du pH optimum

Le pH optimum de coagulation du lait est déterminé en mesurant le temps de coagulation à différent PH variant de 4,3 à 9 par addition de NAOH 1N.

3- Détermination de la concentration optimale de CaCL₂

La concentration optimale en CaCL₂ du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné de quantités de CaCl₂ de 0,01 à 0,1M.

4- Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique brut

L'étude de la stabilité de l'extrait enzymatique est réalisée en fonction de la température, du pH, et au cours de la conservation à +4°C et à -20°C.

4-1- Stabilité thermique

La stabilité thermique est déterminée par l'incubation de l'extrait enzymatique à des températures variant de 30 à 75°C pendant 30mn. L'activité coagulante résiduelle est déterminée selon les conditions standards décrites précédemment.

4-2- Stabilité au pH

La stabilité au pH est déterminée par la mesure de l'activité coagulante résiduelle de l'extrait enzymatique maintenu à différents pH dans différents tampons en fonction des bactéries étudiées, les extraits sont incubés à +4°C pendant 60 mn.

4-3- Stabilité au cours de la conservation

L'extrait coagulant est conservé à +4°C et à -20°C pendant trois mois. L'activité résiduelle est mesurée périodiquement dans les conditions décrites précédemment.

Résultats et discussion

I- Analyse microbiologique du lait

La qualité microbiologique du lait utilisé comme source d'isolement des souches recherchées a été estimée. Les résultats rapportés dans le tableau 13 indiquent l'absence de germes pathogènes, la présence dans les normes des germes d'altération ce qui montre que le lait d'isolement est de bonne qualité microbiologique.

Tableau 13: Résultats de l'analyse microbiologique des échantillons de lait de vache utilisé comme source d'isolement des souches recherchées.

Micro-organismes	Nombre de germe /ml	Normes Algériennes du lait cru Journal Officiel 1998
		N° JORA : 035 du 27-05-1998
- Germes aérobies à 30°C	10 ⁴	10 ⁵ - 10 ⁶
- Coliformes fécaux	<10	10 ³
- Streptocoque fécaux	absence	absence/0,1ml
- Staphylococcus aureus	absence	absence
- Clostridium sulfito-réducteur à 46°C	06	50
- Salmonella*	absence	absence/25g
- Levures et moisissures	120	-

* Les résultats de la recherche de Salmonella ont été interprétés selon la norme décrite par JOFIN., 1985.

II- Recherche d'antibiotiques dans le lait

Les substances inhibitrices (antibiotiques) se retrouvant dans le lait peuvent être à l'origine de la perte de la flore lactique. Elles agissent en inhibant la croissance des bactéries lactiques, empêchant aussi leur développement. (VIGNOLA., 2002)

Nous avons recherché ces substances dans le lait. Les résultats obtenus

indiquent que le lait ne contient pas d'antibiotiques. En effet, les souches de *B. subtilis* et *S. thermophilus* ensemencées se développent en présence des disques imprégnés de lait.

III- Isolement et identification des souches

1- Isolement et purification

L'isolement des bactéries lactiques a été effectué pour les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Les espèces du genre *Pediococcus* n'ont pas été recherchées. Leur faible activité protéolytique et, chez la plupart des espèces, leur incapacité à utiliser le lactose ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait (LARPENT et GRIPPON., 1997).

L'examen microscopique que nous avons réalisé a montré que toutes les colonies prélevées à partir de milieu M17, MRS et MAYEUX quelle que soit leur taille ou leur morphologie, sont respectivement des *Streptocoques*, *Lactocoques*, *Lactobacillus* et des *Leuconostoc*.

L'aspect des colonies et des cellules : des *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et des *Leuconostoc* concordent avec ceux rapportés par Guiraud et Galzy., (1980) ; Cherpenet et Can., (1982) ; LEVEAU et al., (1991).

Le tableau 14 rapporte les observations macroscopiques et microscopiques des souches isolées du lait cru de vache et ferment lyophilisé.

Tableau 14 : Caractères cultureux et morphologiques des espèces isolées des bactéries lactiques.

Origine	Souches isolées	Nombres	Milieu de culture	Aspect des colonies	Aspect des cellules	Gram
Lait cru de vache	Streptocoques thermophiles	13	M17	Blanches, rondes, ou lenticulaires	Cocci Diplocoques Chaînettes	+
	(Lactocoques) Streptocoques mésophiles	18	M17	Blanches, rondes, ou lenticulaires	Cocci Diplocoques Chaînettes	+
	Leuconostoc	10	Mayeux	Transparentes très petites rondes	Cocci Diplocoques Chaînettes	+
	Lactobacilles Thermophiles	14	MRS	Blanches, rondes, ovales à centre marron et bombées	Bâtonnet long ou enroulés filamenteux, isolés ou en chaînettes	+
	Lactobacilles mésophiles	12	MRS	Blanches, rondes, ou lenticulaires	Petits bâtonnets en chaînette	+
Ferment lyophilisé	Streptocoques thermophiles	02	M17	Rondes et blanches	Coccies en chaînettes ou en paires	+
	Lactobacilles thermophiles	04	MRS	Rondes et blanches	Bâtonnets longs isolés en chaînettes	+
	(Lactocoques) Streptocoques mésophiles	06	M17	Blanches, rondes, ou lenticulaires	Cocci Diplocoques Chaînettes	+

2- Identification des souches

Parmi les souches isolées et purifiées, 23 souches ont été identifiées sur la base de critères biochimiques et physiologiques spécifiques (tableaux 15, 16 et 17). Les résultats obtenus sont en accord avec ceux décrits par DEROISSART et LUQUET., (1994) ; BOURGEOIS et LARPENT., (1996) ; LARPENT., (2000).

Tableau 15: Caractères biochimiques d'identification des espèces de Lactobacillus.

Critères phénotypiques	Résultats				
Gram	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-
Croissance à :					
• 45°C	+	+	+	+	-
• 15°C	-	-	-	-	+
Thermorésistance 60°C/90mn	+	-	-	+	-
Croissance à :					
2%NaCl	-	-	-	+	+
4%NaCl	-	-	-	-	+
Gibson et Abdelmalek	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Hydrolyse de l'arginine	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'esculine	-	-	-	-	+
Fermentation des sucres					
- Lactose	+	+	+	+	+
- Glucose	+	+	+	+	+
- Saccharose	-	-	-	+	+
- Galactose	+	-	-	+	+
- Sorbitol	-	-	-	-	+
- Mannose	-	-	-	+	+
- Mélibiose	-	-	-	-	+
- Raffinose	-	-	-	-	+
- Arabinose	-	-	-	-	+
- Xylose	-	-	-	-	+
Espèces	LbH	LbB*	LbB	LbL	LbP
Nombres	03	01	01	02	01

+: réaction positive, -: réaction négative, homo: homofermentaire

LbH: Lactobacillus helveticus

LbB: Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus

LbB*: Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus (ferment)

LbL: Lactobacillus delbrueckii subsp lactis

LbP: Lactobacillus plantarum

Tableau 16: Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre Streptococcus et du genre Lactococcus

Critères phénotypiques	Résultats							
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à :								
• 45°C	+	+	-	-	-	-	-	-
• 37°C	+	+	-	-	+	+	+	+
• 10°C	-	-	+	+	+	+	+	+
Croissance à :								
6,5%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
4%NaCl	-	-	-	-	+	+	+	+
Croissance à PH=9,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 60°C/30mn	+	+	-	-	-	-	-	-
Gibson et Abdelmalek	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Hydrolyse de l'arginine	-	-	-	-	+	+	+	+
Acétoïne	-	-	-	-	-	-	+	+
Citratase	-	-	-	-	-	-	+	+
Lait tournesolé	AC	AC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
Fermentation des sucres	+	+	+	+	+	+	+	+
- Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
- glucose	+	+	-	-	+	+	-	-
- Saccharose	-	-	+	+	+	+	+	+
- Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
- Sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+
- Maltose	-	-	-	-	+	+	+	+
Espèces	ScT	ScT*	LcC	LcC*	LcL	LcL*	LcD	LcD*
Nombres	01	01	03	01	01	01	01	01

+: réaction positive, -: réaction négative, homo: homofermentaire,
AC : acidification+coagulation, ARC : acidification+coagulation +réduction.

ScT: Streptococcus thermophilus

ScT*: Streptococcus thermophilus (ferment)

LcC: Lactococcus lactis subsp cremoris

LcC*: Lactococcus lactis subsp cremoris (ferment)

LcL: Lactococcus lactis subsp lactis

LcL*: Lactococcus lactis subsp lactis (ferment)

LcD: Lactococcus lactis subsp diacetylactis

LcD*: Lactococcus lactis subsp diacetylactis (ferment)

Tableau 17: Caractères biochimiques d'identification des espèces de *Leuconostoc*.

Critères phénotypiques	Résultats		
Gram	+	+	+
Catalase	-	-	-
Croissance à :			
• 45°C	-	-	-
• 37°C	-	+	-
• 10°C	+	+	
Croissance à :			
3% NaCl	-	+	+
6,5% NaCl	-	-	-
Croissance à 60°C/30mn	-	+	
Gibson et Abdelmalek	Hétéro	Hétéro	Hétéro
Dextrane	-	-	+
Hydrolyse de l'arginine	-	-	-
Esculine	-	-	-
Citratase	+	-	-
Fermentation des sucres			
- Lactose	+	+	+
- Saccharose	-	+	+
- Arabinose	-	-	+
- Xylose	-	-	-
- Fructose	-	+	+
- Galactose	+	+	+-
- Mannose	-	+-	+-
Espèces	LnC	LnL	LnM
Nombres	02	02	01

+: réaction positive, -: réaction négative, hétéro: hétérofermentaire

LnC: *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*

LnL: *Leuconostoc mesenteroides* subsp *lactis*

LnM: *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*

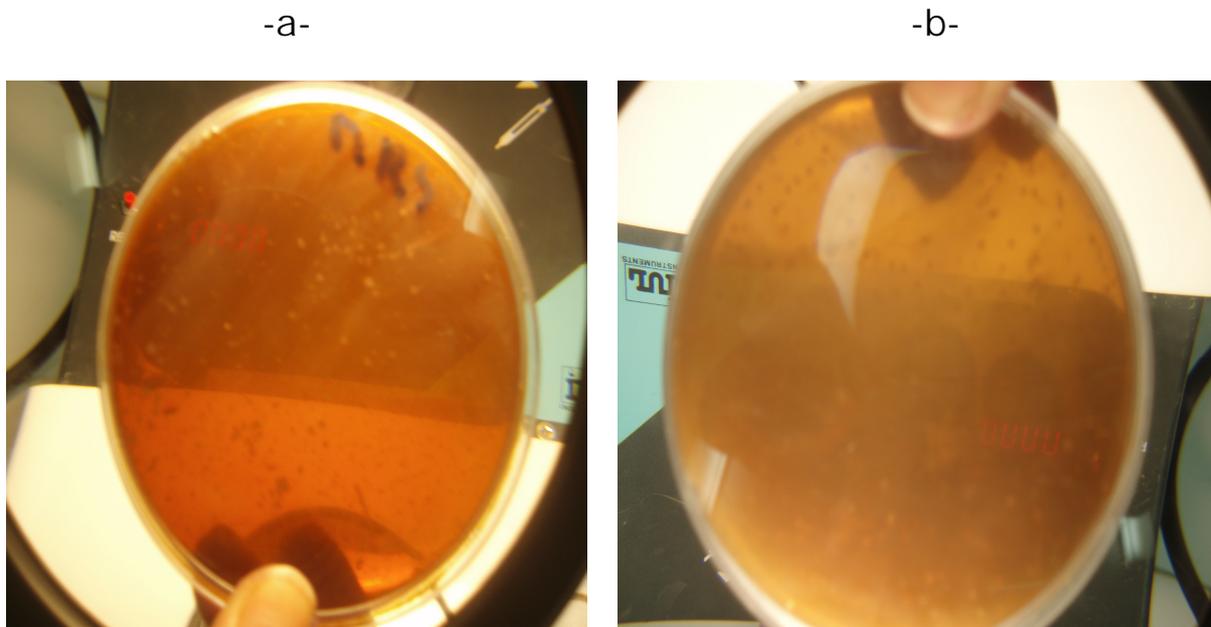


Figure 1 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques isolées sur MRS (a) et M17 (b)

Conclusion

Parmi les souches identifiées, 11 espèces de bactéries lactiques ont été répertoriées :

- 04 espèces appartenant au genre *Lactobacillus*
- 01 espèce appartenant au genre *Streptococcus*
- 03 espèces appartenant au genre *Lactococcus*
- 03 espèces appartenant au genre *Leuconostoc*

*Les différentes espèces isolées et identifiées sont indiquées par le tableau 18.

Si on considère que la possibilité d'isoler des espèces d'un genre donné reflète leur présence relative dans le lait cru, on peut dire que la flore bactérienne du lait cru comporte toujours des bactéries lactiques.

Cette première partie nous a permis de mettre en place une collection de souches appartenant aux bactéries lactiques, isolées du lait cru de vache et de ferments lactiques. Néanmoins, il s'agit là d'une distinction qui ne répond pas à la rigueur de la systématique bactérienne basée sur d'autres tests plus performant, en l'occurrence la recherche de composés caractéristiques de la membrane cytoplasmique ou de l'hybridation ADN-ADN avec des souches types, etc....

Toutefois, selon plusieurs auteurs cette distinction reste suffisante quand

il s'agit d'isoler et d'identifier des souches du lait appartenant aux espèces de bactéries lactiques sur la base des caractères physiologique et biochimiques (BOURGEOIS et LEVEAU., 1991 ; LARPENT et LARPENT-G., 1997). Ceci répond au premier objectif de notre étude. En effet, cette distinction permet d'orienter les souches vers des bactéries lactiques, nous avons dénombré 23 souches appartenant à ce groupe. Elles feront l'objet de la suite de notre étude.

Tableau 18: Nombre des souches des différentes espèces de bactéries lactiques isolées et identifiées.

Genres	Espèces	Nombre de souches locales	Nombre de souches lyophilisées
Lactobacillus	- Lactobacillus helveticus	03	00
	- Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus	01	01
	- Lactobacillus delbrueckii subsp lactis	02	00
	- Lactobacillus plantarum	01	00
Streptococcus	- Streptococcus salivarius subsp thermophilus	01	01
Lactococcus	- Lactococcus lactis subsp cremoris	02	01
	- Lactococcus lactis subsp lactis	02	01
	- Lactococcus lactis subsp diacetylactis	01	01
Leuconostoc	- Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris	02	00
	- Leuconostoc mesenteroides subsp lactis	02	00
	- Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides	01	00
04 genres	11 espèces	Total = 23 souches	

2^{ème} partie : Sélection et caractérisation de bactéries lactiques productrices de protéases.

La présente étude étant orientée vers la recherche de bactéries lactiques, la deuxième partie consiste en la recherche de souches de bactéries lactiques productrices de protéases spécifiquement des coagulases. Pour sélectionner les souches performantes, nous avons retenu dans cette deuxième partie les critères de la croissance, de l'évolution du pH, l'acidité titrable et l'activité protéolytique.

I- Cinétique de croissance des souches

Dans du lait écrémé UHT, toutes les cultures bactériennes sont conduites à un taux de 1%, sans aération et sans agitation. Les pré-cultures sont incubées à 30°C, 42-45°C respectivement pour les mésophiles et les thermophiles pendant 24h. La croissance est évaluée périodiquement (chaque heure) par la mesure de la densité optique (DO) à 650 nm.

Après 24 heures d'incubation, les courbes de la cinétique bactérienne montrent une évolution classique de croissance. Les résultats illustrés par la figure 6, indiquent que les 23 souches de bactéries lactiques testées, présentent des courbes de mêmes allures; néanmoins, la cinétique de croissance de certaines souches est plus élevée par rapport à d'autres. Le maximum de croissance est obtenu pour l'ensemble des souches entre six heures et huit heures d'incubation.

1- Cinétique de croissance des souches de *Lactobacillus*

Les quatre souches de l'espèce *Lactobacillus helveticus* montrent une croissance rapide. En effet, on note les valeurs maximales d'une DO de 1,19 ; 1,18 ; 1,12 chez les souches LbH3, LbH1 et LbH2. La croissance des souches des espèces de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* et *Lactobacillus plantarum* est plus lente avec des valeurs d'une DO allant de 0,76 à 0,96.

2- Cinétique de croissance des souches de *Streptococcus* et *Lactococcus*

La croissance de *Streptococcus* et *Lactococcus* évolue de la même manière que les souches de *Lactobacillus* mais l'intensité de croissance est plus élevée. En effet, elle atteint au bout 7 heures d'incubation une valeur d'une DO de 1,58 et 1,56 respectivement chez les souches ScT et ScT* de l'espèce *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*. Aussi, chez *Lactococcus lactis* les souches évoluent rapidement avec des DO allant de 1,12 à 1,45.

3- Cinétique de croissance des souches de *Leuconostoc*

La croissance des *Leuconostoc* est plus lente, par rapport aux espèces des autres genres. Le maximum est observé chez la souche LnC1 avec une DO de 0,52 de l'espèce *Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris*. Les

valeurs observées chez les autres souches de *Leuconostoc* sont plus lentes avec des DO de l'ordre de 0,47 à 0,49. En outre, ceci nous laisse conclure que ces bactéries ne se développent pas correctement dans le lait. Il est établi par certains auteurs que *Leuconostoc mesenteroides* est une bactérie adaptée au milieu panair (INFANTE et TOURNEUR., 1991).

La cinétique de croissance des bactéries lactiques montre des résultats comparables. En effet, les souches des *Streptococcus* et *Lactococcus* se développent rapidement, les souches du genre *Lactobacillus* se multiplient moins rapidement. COURTAINE et RUL., (2004) ont décrits des résultats similaires qui ont été observés chez des souches de *S. thermophilus* / *Lb bulgaricus* isolées de yogourt.

Par contre, les espèces de *Leuconostoc* selon les résultats observés, montrent des souches non adaptées au milieu utilisé.

II- Evolution du pH et de l'acidité titrable

Les figures 7 et 8 illustrent l'évolution du pH et de l'acidité titrable au cours de la croissance en fiole sur du lait écrémé UHT. La stabilité de l'acidité, en début de culture correspond à une période nécessaire aux bactéries pour s'adapter aux nouvelles conditions de culture (DEROISSART, 1986; BEAL et al., 1994). Pour l'ensemble des souches on note une diminution du pH, une augmentation d'acidité titrable. Les valeurs de l'activité acidifiante mesurée chez les différentes souches des espèces étudiées étaient variables à savoir : activité acidifiante élevée, moyenne et faible.

1- Evolution du pH et acidité titrable chez *Lactobacillus*

En ce qui concerne les *Lactobacillus*, les profils d'acidification ont montré deux comportements différents: des souches qui se caractérisent par une acidité forte à savoir LbH1, LbH3, LbB* et LbL1 et des souches à acidité moyenne LbB, LbH2, LbL2 et LbP.

Bien que l'ensemble des espèces aient la même phase de latence (2 heures), l'acidité maximale diffère au bout de 24 heures d'incubation. En effet, la souche LbH3 produit au bout de 24 heures de culture un maximum de 83°D correspondant à un pH de 4,1. Les souches LbB et LbP, produisent, durant le même temps d'incubation une acidité de 65°D et 55°D correspondant à un pH de 4,8 et 5 respectivement.

Le profil de l'évolution du pH et de l'acidité titrable étudié au cours de 24 heures de croissance montre que l'espèce *Lactobacillus helveticus* LbH3 a une activité acidifiante plus élevée que les autres espèces du même genre. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par DESMAZEAUD et BOUILLANCE., (1981) qui ont montré que les quantités d'acide formé par *Lactobacillus helveticus* sont nettement plus importantes que *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis*.

Selon DESMAZEAUD., (1983,1990) les cultures de *Lactobacillus helveticus* sont les plus utilisées dans la fermentation industrielle des

produits laitiers et cela est en relation avec leur capacité d'utiliser galactose et le glucose issu du lactose ce qui permet une production lactique importante.

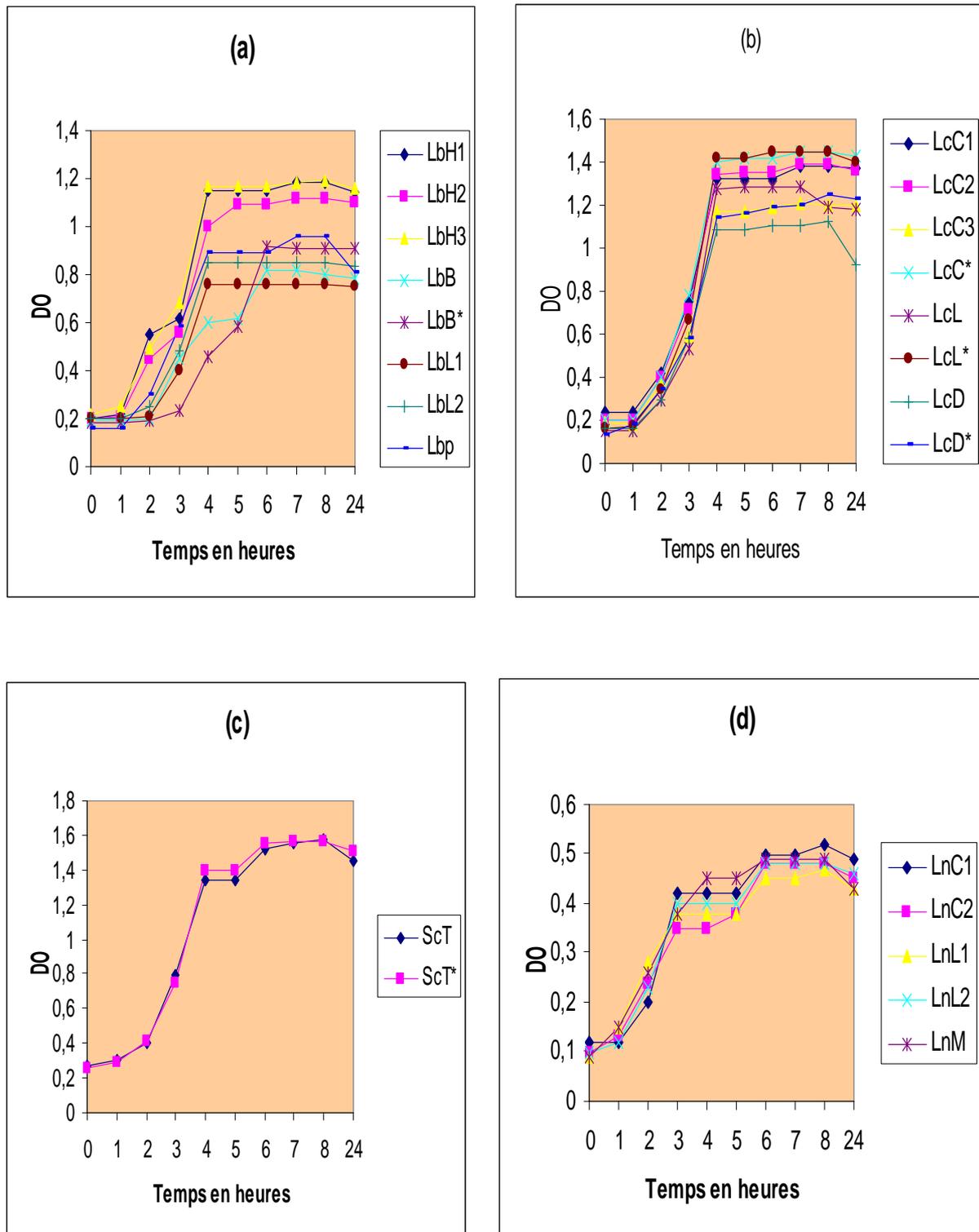


Figure 6 : Cinétique de croissance en pré-culture dans le lait des souches de Lactobacillus (a), Lactococcus (b), Streptococcus (c) et Leuconostoc (d).

2- Evolution du pH et acidité titrable chez Lactococcus

La figure 7(b) indique l'évolution de l'acidité Dornic et celle du pH en 24 heures de culture des espèces du genre Lactococcus.

Nous observons chez le genre Lactococcus des souches à activité acidifiante forte et d'autres à activité acidifiante moyenne. Pendant 2 heures l'acidité du lait est de 18 à 19°D pour l'ensemble des souches avec un pH variant de 6,2 et 6,3 sauf pour la souche LcC2 qui donne une acidité de 17°D avec un pH 6,5.

L'acidité titrable maximale 68°D enregistrée en 24 heures de temps est produite par la souche locale LcL correspondant à un pH de 4,7, la souche du ferment commercial LcL* atteint 82°D à un pH de 4,3.

3- Evolution du pH et acidité titrable chez Streptococcus

Pour les Streptocoques thermophiles l'activité est moyenne, la souche du ferment commercial ScT* en 24 heures de croissance produit une acidité titrable de 64°D, la souche locale ScT donne 62°D. Dans les mêmes conditions de température (42°C) et taux d'inoculum (1%) ZOURARI et DESMAZEAUD 1991 ont obtenu à 24 heures d'incubation avec les souches de Streptococcus salivarirus ssp thermophilus isolées de gruyère de comté des acidités de 50°D et 65°D respectivement.

4- Evolution du pH et acidité titrable chez Leuconostoc

Les souches appartenant au genre Leuconostocs montrent une activité moyenne 56°D correspondant à un pH 5,1 chez LnM et une activité faible 41°D correspondant à pH 5,6 chez LnC2.

Mis à part Leuconostoc mesentéroïdes subsp lactis qui capable d'acidifier le lait, les autres espèces de Leuconostocs l'acidifient que très lentement (DEVOYOD et POUILAIN., 1988; ROGINSKI., 1988).

En effet, différents auteurs SANDINE et al., (1962); LACRAMPE et WEBBER., (1973); DEVOYOD et POUILLAIN., (1988) ont expliqué la faible production d'acide lactique, par la nature même de ces espèces qui sensible aux faibles pH, et ne fermentent le lactose qu'en très faible quantité par voie hétérofermentaire aboutissant seulement à 50% d'acide lactique à partir des glucides.

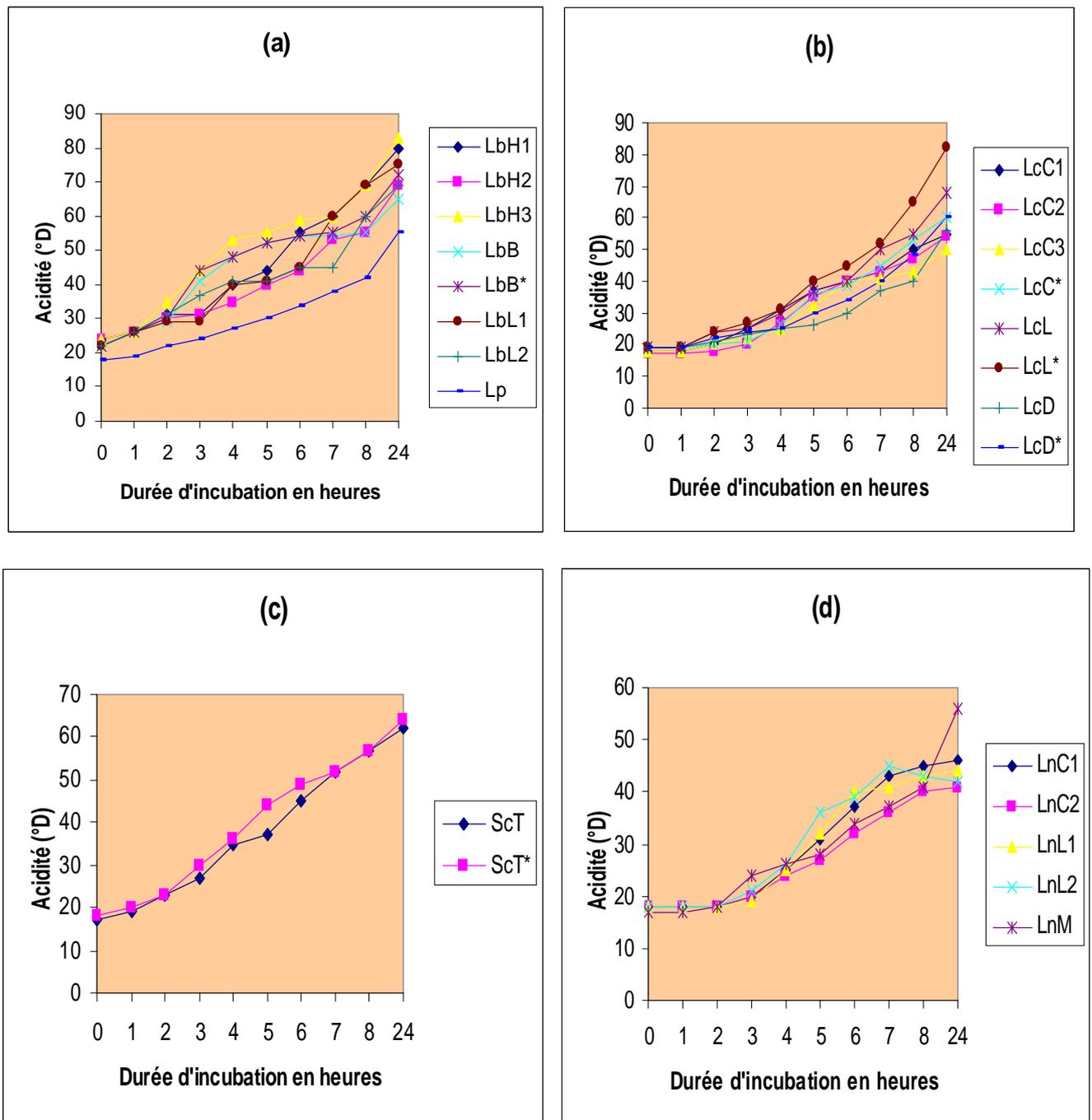


Figure 7: Evolution de l'acidité Dornic du milieu ensemencé par les souches de Lactobacillus (a), de Lactococcus (b), de Streptococcus (c) et de Leuconostoc (d) en fonction du temps.

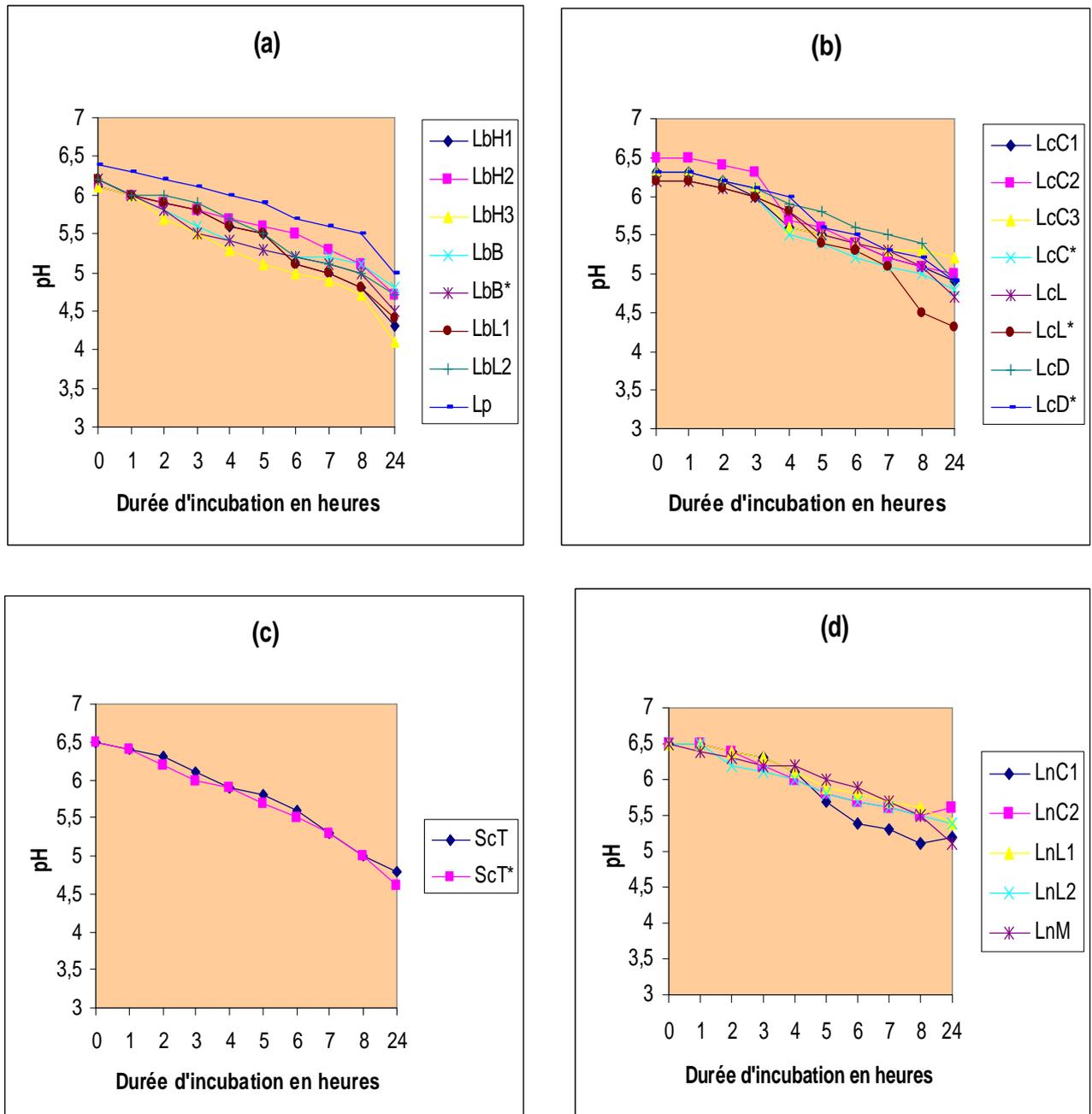


Figure 8: Evolution du pH du milieu ensemencé par les souches de Lactobacillus (a), de Lactococcus (b), de Streptococcus (c) et de Leuconostoc (d) en fonction du temps.

III- Mesure de l'activité protéolytique avec les cellules entières

Plusieurs études ont été effectuées pour la meilleure connaissance des systèmes protéolytiques des bactéries lactiques qui ont conduit à une compréhension plus détaillée de leur mode d'utilisation des sources d'azote (MONNET et GRIPPON., 1994 ; LARPENT et LARPENT-G., 1997).

Dans cette étude l'évaluation de l'activité protéolytique a été effectuée au cours de la croissance des bactéries lactiques sur lait écrémé UHT chez les espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc*.

Le choix du lait comme milieu de culture revient à la pauvreté de ce milieu en acide aminé. L'azote aminé disponible dans le lait existe sous forme de protéine (caséines et protéines du lactosérum) et de composés de bas poids moléculaire (acide aminés libres et peptides). Ces derniers sont beaucoup moins abondants que les protéines, et présents à faibles teneurs.

En, effet de nombreux auteurs ont montré que la production de protéase était plus importante lorsque les cellules étaient cultivées sur un milieu riche en caséine que sur un milieu riche en peptides (HUGENHOLTZ et al 1987 ; MONNET et al 1987a). Aussi des études concernant l'expression et la régulation des gènes codant pour la protéase extracellulaire chez *L. lactis* SK11 est réprimée jusqu'à 10 fois quand la concentration en peptides du milieu augmente (GUEDON., et al 2001).

Concernant notre étude l'activité protéolytique a été réalisée par deux méthodes de dosage et les résultats obtenus ne sont pas rigoureusement comparables. En effet, le rendement en tyrosine ne représente pas la totalité des constituants azotés.

1- Dosage de la tyrosine

Le profil des activités protéolytiques des bactéries lactiques étudiées révèle (figure 9) des différences appréciables entre les espèces et entre les souches appartenant à la même espèce.

L'activité protéolytique des espèces de *Lactobacillus* par dosage de la tyrosine est maximale au bout de 120 à 144 heures d'incubation donnant respectivement des teneurs en tyrosine de: 5,9-7,1-7,3ppm; 5,6ppm; 6,9ppm et 7,1ppm pour *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp *lactis*, et *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* (ferment). D'après BEAUQUESNE et CAUTERI., (1980), ceci pourrait correspondre à une lyse cellulaire qui libère ainsi les enzymes intracellulaires et les enzymes liées aux enveloppes.

On remarque que la souche *LbH3* montre une activité protéolytique la plus élevée par rapport aux autres espèces. Cette même constatation a été précisée par FREY et al., (1986) et par SCHMIDT et al., (1994), les souches de *Lb. helveticus* manifestent une activité protéolytique spécifique la plus

élevée notamment les activités aminopeptidase et protéase que les autres espèces *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus*, et *Lb delbrueckii* subsp *lactis*.

Chez *Lactococcus* l'activité protéolytique est maximale, au bout de 144 heures d'incubation, elle est respectivement de: 6,8-6,9-7ppm; 6,5-6,9ppm et 5,9-4,5-4,4ppm pour *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.

On constate que les souches du *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* LcC1 et LcC* souches locales et ferment commerciale montre une activité plus importante par rapport aux autres espèces.

Les espèces du genre *Streptococcus* et celle de *Leuconostoc* sont faiblement protéolytiques.

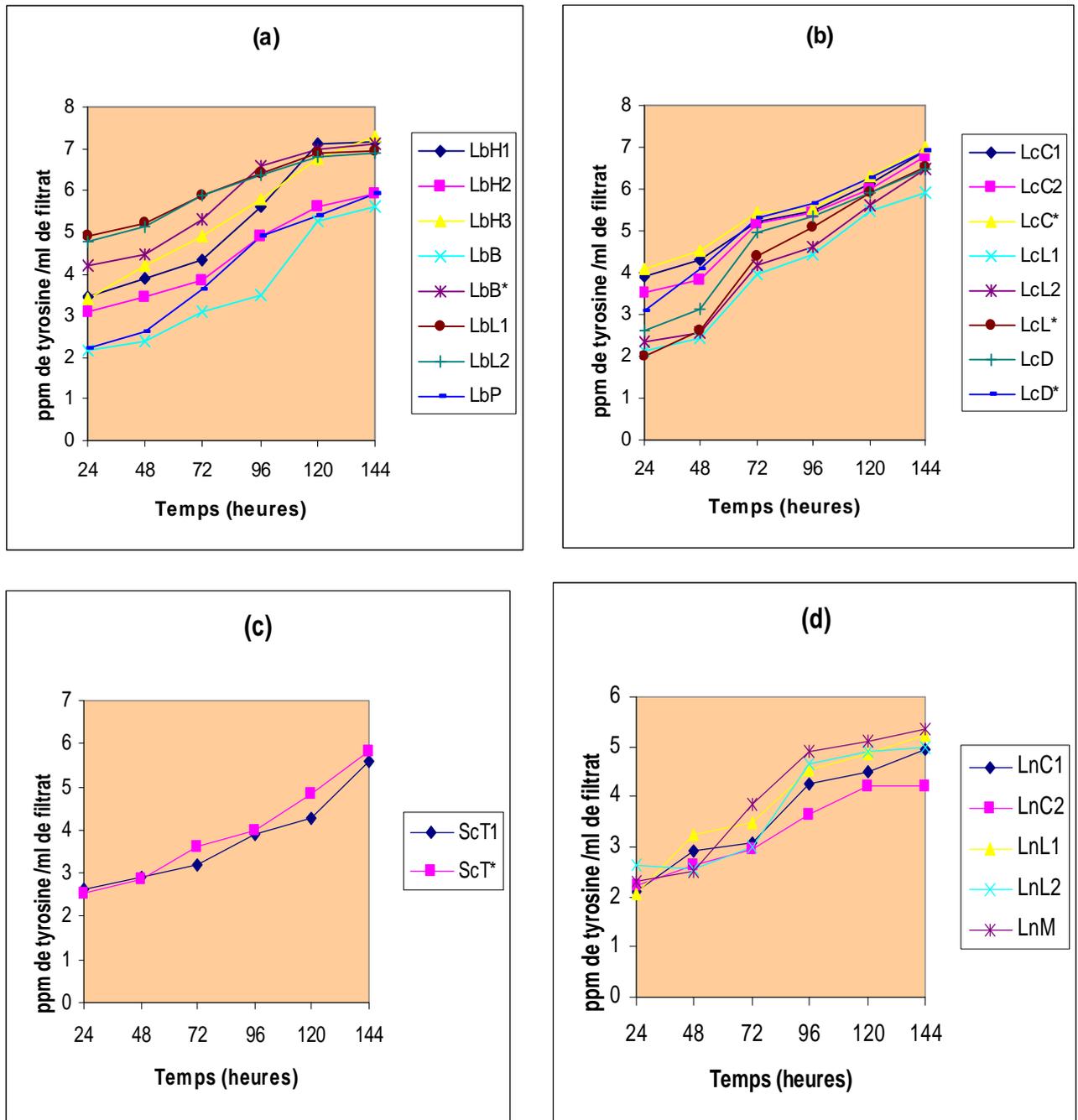


Figure 9 : Evolution de l'activité protéolytique par le dosage de la tyrosine (ppm) en fonction du temps de croissance des souches de Lactobacillus (a), Lactococcus (b), Streptococcus (c) et Leuconostoc (d) en fonction du temps.

2- Action des bactéries lactiques sur les constituants azotés

2-1- Variation selon les souches

Les quantités des différentes formes d'azotes présentes dans le lait après 5 jours d'incubation en présence de différentes souches figurent dans les tableaux 19 et 20.

A l'intérieur d'une même espèce la comparaison des résultats montre assez peu de différences entre les diverses souches pour chaque fraction d'azote soluble les écarts observés sont de l'ordre de 2% ou inférieur à cette valeur. Néanmoins COURTIN et RUL., (2004), dans leur étude sur l'activité protéolytique chez deux souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* cultivées dans le lait (1038 et CNRZ397), montrent des capacités protéolytiques différentes des deux souches. OZCALP et al., (2007), dans leurs recherches concernant la caractérisation technologique des souches sauvages de *Lactococcus lactis*, décrivent des activités protéolytiques faible, modérés et fortes chez les souches étudiées.

2-2- Variation selon les espèces

Les espèces étudiées ont été comparées en considérant les moyennes établies à partir des résultats des différentes souches pour la teneur en azote.

En ce qui concerne les variations de la teneur en azote les principales différences entre espèces portent sur 2 fractions :

∅ L'azote totale soluble l'azote non caséique (NCN) augmente pour toutes les espèces qui se classent dans l'ordre suivant : *Lb helveticus*/ *Lc lactis* subsp *cremoris*/*Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus*/ *Lc lactis* subsp *diaceylactis*/ *Lb delbrueckii* subsp *lactis*/*Sc thermophilus*, alors qu'il diminue pour les 3 espèces de *Lc mesenteroides*, *Lc lactis* subsp *lactis* et *Lb plantarum*.

∅ L'azote non protéique (NPN) augmente pour toutes les espèces.

On note à partir de ces résultats que l'espèce *Lb helveticus* développe une action importante sur les composés azotés du lait. Aussi PIVITEAU et al., (2002) confirment que la croissance de *Lb helveticus* dans le lait entraîne une augmentation significative en peptides et acides aminés.

Les résultats concernant l'évolution du pH et l'acidité titrable ont montré que les bactéries lactiques étudiées avaient des activités acidifiantes différentes avec des teneurs variables à savoir : élevées, moyennes et faibles. On remarque que les souches à forte et moyenne acidité sont les plus protéolytiques. En effet, SHAHBAL., (1991) chez les souches de *Streptococcus thermophilus* trouve une grande corrélation entre la forte vitesse d'acidification et l'activité protéinasique qui été 7 à 10 fois plus forte. Aussi

ST-GELAIS., (2006) chez *Lactococcus lactis* constate que toutes les souches protéinase-positives ont un taux d'acidification (acide lactique) plus élevé que les variantes protéinase-négatives.

A ce stade de l'étude, les résultats montrent que les cellules entières de *Lactobacillus* sont plus protéolytiques que les cellules entières de *Lactococcus*, *Streptococcus* et de *Leuconostoc*. MONNET et GRIPON., (1994) ont montré que l'activité protéolytique globale des lactobacilles est supérieure à celle observée chez les lactocoques et *Leuconostoc*. LARPENT et LARPENT-G., (1997) signalent chez *Leuconostoc* une activité protéolytique faible et chez *Streptococcus thermophilus* la plupart des souches sont dépourvues de protéase de paroi.

On s'aperçoit encore que les espèces thermophiles d'une manière générale sont les plus protéolytiques que les mésophiles. Aussi PAPPA et al., 2006 dans leur travail portant sur l'activité protéolytique, estimée par les fractions azotées, distinguent un degré de protéolyse différent. Les thermophiles avaient les degrés les plus élevés par rapport aux mésophiles.

Il est aussi à noter que l'action sur les constituants azotés et le dosage de la tyrosine donnent des taux élevés pour les mêmes espèces et les mêmes souches.

Tableau 19: Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans les cultures des diverses souches des bactéries lactiques thermophiles isolées.

Espèce et souches	NCN	NPN
Lait incubé à 42°C Témoin	18,5	4,78
Sc thermophilus ScT ScT*	18,4 18,9	10,1 10,5
Moyenne	18,65	10,3
Lb helveticus LbH1 LbH2 LbH3	22,2 21,6 23,4	13,1 13,0 14,8
Moyenne	22,40	13,63
Lb delbrueckii subsp bulgaricus LbB LbB*	20,2 21,6	11 12,3
Moyenne	20,9	11,65
Lb delbrueckii subsp lactis LbL1 LbL2	20 19,1	12,5 11,8
Moyenne	19,55	12,15

- Les résultats sont exprimés en % de l'azote total.

Tableau 20: Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans les cultures des diverses souches des bactéries lactiques mésophiles isolées.

Espèce et souches	NCN	NPN
Lait incubé à 30°C Témoin	18,9	5,1
Lb plantarum LbP	17	11,8
Lc lactis subsp cremoris LcC1	20,9	12,5
LcC2	20,4	12,2
LcC3	21,2	12,9
LcC*	21,6	13,1
Moyenne	21,02	12,67
Lc lactis subsp lactis LcL*	15	10
LcL	17	10,1
Moyenne	16	10,05
Lc lactis subsp diaceylactis LcD	20,7	11,9
LcD*	20,2	11,3
Moyenne	20,45	11,6
Lc mesenteroides subsp cremoris LnC1	14,6	9,2
LnC2	15	10,1
Moyenne	14,8	9,65
Lc mesenteroides subsp lactis LnL1	15	9,2
LnL2	-	-
Moyenne		
Lc mesenteroides subsp mesenteroides LnM	15	5,2

- Les résultats sont exprimés en % de l'azote total.

Conclusion

Les bactéries lactiques isolées et identifiées sur la base des caractères biochimiques et physiologiques ont été caractérisées par l'étude de la cinétique de croissance, l'évolution du pH, l'acidité titrable et l'activité protéolytique. La mise en évidence des protéases détectables chez les bactéries lactiques a permis de sélectionner les souches les plus actives.

A ce stade de l'étude, à l'exception des espèces de *Leuconostoc*, les résultats montrent chez toutes les souches une cinétique de croissance rapide et importante avec des valeurs élevées. Aussi l'évolution de l'acidité du milieu a donné des résultats rapides et significatifs par rapport aux propriétés recherchées chez les bactéries lactiques. L'étude de l'activité protéolytique a montré une activité protéolytique détectable avec des taux élevés chez les espèces de *Lactobacillus* et *Lactococcus*.

L'ensemble de ces résultats a permis de sélectionner les souches les plus performantes, présentant les valeurs les plus élevées en cinétique de croissance, acidité et activité protéolytique.

Les bactéries retenues à savoir : *Lc lactis* subsp *cremoris* (LcC1, LcC2, LcC3, LcC*), *Lb heleveticus* (LbH1, LbH2, LbH3) et *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* (LbB*, LbB) vont subir une extraction de leurs protéases pariétales en les cultivant en biomasses en fermenteur. Les extraits enzymatiques bruts obtenus feront l'objet d'une 3^{ème} partie dans notre étude. En effet, cette étude a pour objectif de déterminer l'activité enzymatique des extraits bruts spécifiquement coagulant le lait.

I- Culture en fermenteur

1- Cinétique de la croissance des souches

Une culture en fermenteur a été réalisée pour toutes les souches sélectionnées dans la deuxième partie de ce travail à savoir : l'espèce *Lc lactis* subsp *cremoris* (LcC1, LcC2, LcC3, LcC*), *Lb helveticus* (LbH1, LbH2, LbH3) et *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* (LbB*, LbB).

La culture des cellules a été réalisée dans un réacteur sans agitation et sans aération d'un volume de 2 litres contenant 1 litre de lait UHT écrémé à un taux de 1%. La température de culture a été conditionnée par un incubateur, 30°C pour les mésophiles et 42°C pour les thermophiles. La croissance des biomasses a été évaluée par la mesure de la densité optique. L'allure des courbes de croissance des biomasses, après 8 heures d'incubation montre 3 phases principales (figures 10 et 11) :

- Ø Une phase de latence : elle correspond à une période d'adaptation au milieu de culture. Cette phase dure une heure de temps pour toutes les souches.
- Ø Une phase exponentielle : elle est caractérisée par une accélération de la croissance des biomasses et cela entre 3 et 6 heures de temps, la vitesse de croissance est très élevée. En effet on constate une DO maximale de l'ordre de 2,30, 2,21 et 1,96 pour les biomasses de LbH3, LbH2 et LbH1 chez *Lb helveticus*. Elle est de l'ordre de 2,15 et 1,98 pour les biomasses de LbB et LbB* chez *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus*. Chez l'espèce de *Lc lactis* subsp *cremoris*, les valeurs étaient les plus élevées avec 2,19 ; 2,36 ; 2,45 ; 2,63 pour les biomasses de LcC1, LcC2, LcC3 et LcC*.
- Ø Une phase stationnaire qui apparaît à partir de la septième heure d'incubation. Ceci peut être de l'épuisement des nutriments dans le fermenteur.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les conditions de culture en fermenteur sont plus favorables pour la croissance des souches cultivées, ceci peut s'expliquer par le volume du milieu de culture relativement élevé. Les bactéries lactiques sont anaérobies facultatives, mais elles ont une préférence pour les conditions d'anaérobies. La densité du milieu empêche la présence d'O₂. Selon JUILLARD et al., 1987, tout facteur diminuant la quantité d'oxygène dans le milieu de culture stimule leur croissance.

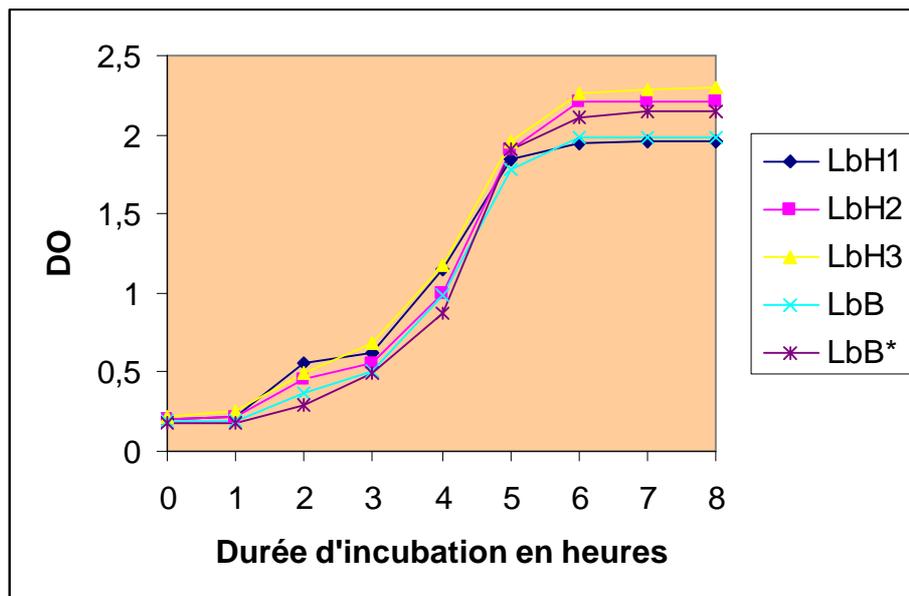


Figure10 : Cinétique de croissance des souches de *Lb helveticus* et *Lb delbrueckii subsp bulgaricus* en fermenteur à 42°C sans agitation et sans aération.

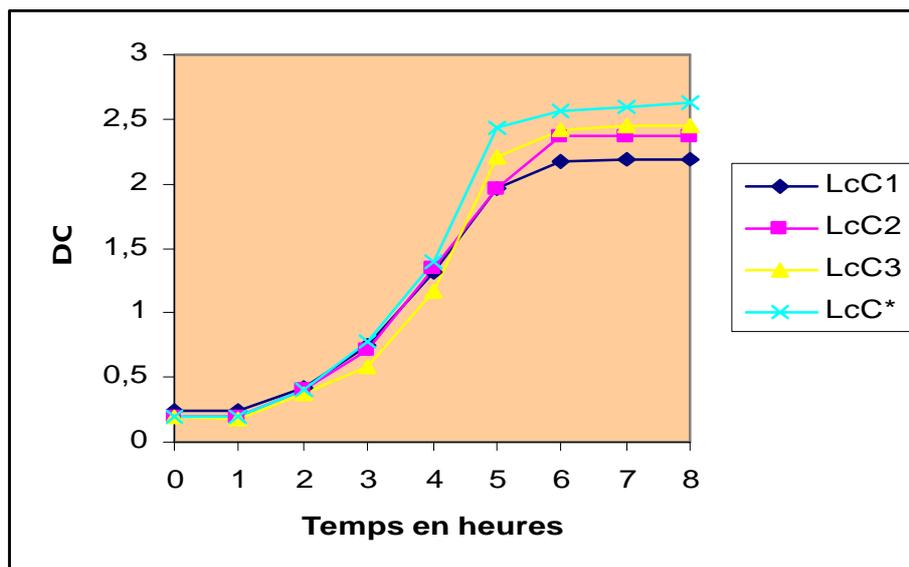


Figure11: Cinétique de croissance des souches de *Lc lactis subsp cremoris* cultivées en fermenteur à 30°C sans agitation sans aération.

2- Extraction des protéases de surface

Après la constatation de l'activité protéolytique (décrite dans la deuxième partie) chez les espèces de bactéries lactiques étudiées une troisième partie a été réalisée qui consiste à une tentative d'étude des protéases extracellulaires. Les seules protéases extracellulaires qui ont été décrites pour les bactéries lactiques sont des enzymes associées à la paroi. En effet, la production d'une protéase existant à l'état libre dans le milieu de culture n'a jamais pu être prouvée avec certitude (MONNET et GRIPPON., 1994).

Dans cette évaluation, l'extraction des parois a été effectuée en pleine phase exponentielle. On pense que c'est la phase la plus favorable à l'activité des protéases de surface. Car la phase de croissance influe sur l'activité protéolytique. En effet SIMOVA et BESHKOVA., (2007) dans leur étude, effet de la phase de croissance et du milieu de culture sur les activités peptidasiques des extraits intracellulaires des souches à activité protéolytique élevée. Ils ont montré que les peptidases étaient plus actives en fin de phase exponentielle et leur activité fait suite à une première étape où les protéases de surface sont plus actives et donc surtout en pleine phase exponentielle.

Pour cela une extraction des protéases de la paroi a été effectuée à partir des cultures en fermenteur afin de doser leur activité protéolytique et spécifiquement coagulante.

II- Activité enzymatique des extraits bruts de paroi

1- Activité protéolytique des extraits bruts de paroi

L'activité protéolytique des extraits enzymatiques bruts a été effectuée pour une étude comparative par rapport à l'activité protéolytique des cellules entières des bactéries lactiques (tableau 19 et 20). L'estimation de cette activité a été réalisée par action de l'extrait enzymatique brut sur les constituants azotés du milieu. L'étude a été effectuée pour les biomasses de *Lactobacillus* et *Lactococcus*,

Les résultats obtenus (tableau 21 et 22) montrent clairement que la somme de l'activité des protéases de la paroi (extrait enzymatique brut) égale pratiquement l'activité protéolytique totale des cellules entières. THOMAS et al (1974) ont aussi montré que l'activité endopeptidasique obtenue à partir de cellules de *Lc. Lactis subsp lactis* (ML3) cultivées sur milieu peptoné constitue la majeure partie (80%) de l'activité totale des cellules.

Tableau 21: Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans le milieu après action des extraits enzymatiques bruts des souches *Lc lactis* subsp *cremoris*.

Espèce et souches	NCN	NPN
Lait incubé à 30°C	18,9	4,98
<i>Lc lactis</i> subsp <i>cremoris</i>		
LcC1	18,5	11,2
LcC2	18,4	10,7
LcC3	19,7	11,1
LcC*	20,3	12,1
Moyenne	19,22	11,27

- Les résultats sont exprimés en % de l'azote total.

Tableau 22: Teneurs des différentes formes d'azotes présentes dans le milieu après action des extraits enzymatiques bruts des souches de *Lb helveticus* et *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus*.

Espèce et souches	NCN	NPN
Lait incubé à 42°C	18,5	4,98
<i>Lb helveticus</i>		
LbH1	20,2	12,3
LbH2	19,3	11,6
LbH3	21,4	13,5
Moyenne	20,3	12,46
<i>Lb delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>		
LbB*	18,9	9,6
LbB	20,21	10,9
Moyenne	19,55	10,25

- Les résultats sont exprimés en % de l'azote total.

2- Mesure de l'activité coagulante

La mesure de l'activité coagulante des extraits bruts pariétaux a été effectuée, selon la méthode de SOXLET préconisée par ALAIS., (1984). Pour cela, les biomasses retenues ont été cultivées dans du lait écrémé UHT en fermenteur, récoltées en phase exponentielle ont subi plusieurs traitements cités dans matériel et méthode afin d'extraire les protéases de paroi.

Les résultats rapportés dans le tableau 23 indiquent que l'activité coagulante varie selon les espèces et les souches. Parmi, les 9 souches de bactéries testées, l'extrait brut de 4 souches n'ont pas produit de coagulase. Les différentes espèces testées, présentent une activité +/- faible. Néanmoins il y a des espèces qui montrent une activité détectable par rapport à d'autres. On a mis en évidence une activité coagulante chez LbH3, LbH1, LcC*, LcC3 et LbB*.

Ainsi, l'extrait enzymatique des espèces *Lc lactis* subsp *cremoris*, *Lb heleveticus* et *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* cultivées sur du lait écrémé possède une activité maximale coagulante de l'ordre 43, 29, 23 et 20 respectivement.

Les résultats montrent que la présence de l'activité coagulante chez les bactéries lactiques est faible par rapport aux activités connues de la présure et les succédanées de cette dernière. En effet, MORSLI., 1996 a montré des activités coagulantes variables, de l'ordre de 400, 3200 et 80000 respectivement pour les extraits obtenus à partir de l'artichaut, des abats de poulet et du latex de figuier. MATOUB., (2000) a trouvé chez les souches de *B subtilis* 667 et 364. Cette constatation peut être expliquée par l'action non spécifique des protéases des bactéries lactiques sur la caséine.

En effet, la spécificité des protéinases de surfaces a été analysée par plusieurs chercheurs, en utilisant différents types de caséines comme substrat (•, •, •). EXTERKATE (1975,1976) sur différentes souches de *Lc lactis* ssp *cremoris*, cultivées aussi sur lait, a mis en évidence 3 enzymes protéolytiques dissemblables (PI, PII acide et PIII neutre). Les souches qui possèdent l'activité de paroi de type PI, attaquent préférentiellement la caséine • ; l'activité PII serait une forme de stabilité différente de l'activité PI ; les souches qui possèdent l'activité de type PIII capable de dégrader également les caséines •_{s1}, •, • (AM1 et SK11). Les souches possédants un mélange des deux activité (VISSER et al ., 1986 ; ATLAN., 2000). Les souches de type PI qui sont souvent sélectionnées pour une capacité d'acidification rapide du milieu, sont aussi considérées comme produisant plus de peptides amers que celles de type PIII (BRUINENBERG et LIMSOWTIN., 1995 ; BOUTRON et al ., 1998).

Chez les espèces du genre *Lactobacillus* l'hydrolyse des caséines (•, •, •) a aussi été effectuée in vitro avec différentes protéinases purifiées. Une diversité des spécificités des protéinases a été mise en évidence par rapport

au *Lactococcus* (EXTERKATE et al., 1993).

Tableau 23: Activité coagulante maximale des extraits bruts issus des souches de *Lactobacillus helveticus*, *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.

Espèces souches	Milieu de culture lait écrémé			
	pH de la culture	Temps de culture (Heures)	Temps de coagulation (Seconde)	Activité coagulante (force)
<i>Lb helveticus</i>				
LbH1	5,1	6	15500	1,54
LbH2	5,5	6	-	-
LbH3	5,0	6	1025	23,41
<i>Lb delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>				
LbB	5,2	6	-	-
LbB*	5,2	6	1214	19,76
<i>Lc lactis</i> subsp <i>cremoris</i>				
LcC1	5,2	7	-	-
LcC2	5,2	7	-	-
LcC3	5,3	7	818	29,33
LcC*	5,1	7	558	43,01

Conclusion

En tenant compte de tous ces résultats il est évident que l'hydrolyse de la caséine par les protéases des bactéries lactiques ne montre pas la même spécificité que la présure.

4^{ème} Partie : Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

Afin de déterminer les conditions optimales d'activité de l'extrait brut précédemment obtenu, issu à partir des souches LbH3, LbB*, LcC* et LcC3 nous avons déterminé l'influence de certains paramètres physico-chimiques.

1- Influence de la température du lait

L'influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été étudiée dans un intervalle de température de 30 à 75°C.

L'activité coagulante maximale est mesurée à 45°C chez LbB*, à 50°C chez LbH3. Pour les souches LcC*et LcC3 l'activité maximale est obtenu à 40°C. Les résultats rapportés par la figure 12 indiquent que l'activité coagulante augmente pour les températures inférieures à ces maxima et pour les températures supérieures, on note une baisse rapide de l'activité de l'extrait brut de toutes les souches étudiées.

Rappelons que la température optimale d'activité d'une enzyme dépend de plusieurs facteurs, en l'occurrence l'origine et le degré de purification. En effet, ZEVACO et GRIPPON., (1988) ; YAMAMOTO et al., (1993) ; ONO et al., (1997) ont montré un optimum à 42°C pour l'enzyme purifiée issue des parois de *Lb heleveticus* CP790 et CP53. Des résultats similaires ont été obtenus par LALOI et al ., (1991). En revanche, MARTIN-HERNANDEZ et al ., (1994) ; GOBETTI et al., (1996) ont obtenu avec les protéases de paroi purifiées de *Lb heleveticus* L89 et CB1une activité optimale à 40°C.

Par contre NAES et NISSEN-MEYER.,(1992) ; HOLCK et NAES., (1992) ont montré un optimal à 37°C chez *Lb casei* NCDO151, chez la même espèce *Lb casei*IFPL731 FERNANDEZ DE PALENCIA et al., (1997) ont obtenu un optimal à 40°C.

Par ailleurs chez d'autres micro-organismes l'activité enzymatique est variable. En effet, YANG et al., (1987) ont montré, chez *Bacillus subtilis*, un optimal à 65°C ; MATOUB., (2000) chez la même espèce a trouvé un maximum d'activité à 70°C. De même CHOPRA et MATHUR., (1985) ont trouvé un maximum à 70°C chez *Bacillus stearothermophilus*. Chez *Micrococcus*, GARDA DE FERNANDO et FOX., (1991) dans leur étude relative à la caractérisation d'une protéinase extracellulaire décrivent un optimum à 45°C.

La présure est caractérisée par une activité optimale à une température voisine de 42°C (GARNOT et MARTIN., 1980). Les résultats des travaux de MORSLI., (1996) relatifs aux préparations enzymatiques purifiées de l'artichaut, du figuier et du poulet indiquent des températures optimales de 60°C, 80°C et 40°C respectivement.

GOURSAUD en 1999, a indiqué un optimum thermique de 58°C à 62°C pour les préparations fongiques coagulantes de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et d'*Endothia parasitica*.

Les résultats de différents auteurs indiquent, en générale, que les coagulases d'origine végétale et microbienne sont plus résistantes à la température que les coagulases d'origine animale.

D'après FEDERICI., (1982), la température optimale d'activité relativement élevée des coagulases végétales et microbiennes résulterait du fait que ces coagulases soient plus souvent exposées aux températures élevées que les enzymes animales.

Mais nos résultats et les travaux de plusieurs chercheurs cités précédemment, portants sur les protéases de paroi (sérine- protéases et cystéine- protéases) chez les bactéries lactiques indiquent un optimale plus bas au voisinage du maximum obtenu pour la présure.

2- Influence du pH du lait

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'enzyme est illustrée par la figure 13. Les résultats indiquent une activité coagulante optimale au pH 5,5 chez LcC3, LcC* et LbB* ; 6,5 chez LbH3.

Des résultats similaires avec des sérine protéases et cystéine protéases ont été obtenus par YAMAMOTO et al., (1993) ; ONO et al., (1997) pour l'enzyme purifiée issues des parois de *Lb heleveticus* CP790 et CP53 ainsi que LALOI et al., (1991) chez *Lb bulgaricus* CNRZ397. En revanche, MARTIN-HERNANDEZ et al., 1994 ; GOBETTI., (1996) ont obtenu avec les protéases de paroi purifiées de *Lb heleveticus* L89 et CB1 une activité optimale à pH 6,2 ; ZEVACO et GRIPPON., (1988) avaient obtenu un optimale à 7,5-8 chez *Lb heleveticus* CNRZ303 ; STEFANITSI et GAREL., (1997) a obtenu un optimale à pH 6 chez *Lb bulgaricus* ACA-DC235 . NAES et NISSEN-MEYER., (1992) ; HOLCK et NAES., (1992) ont trouvés un optimale à pH 5,8 chez *Lb casei* NCDO151, chez la même espèce *Lb casei* FPL731 FERNANDEZ DE PALENCIA et al., (1997) ont obtenu un optimale à pH 6. GOBETTI et al., (1996) a trouvé un optimum à pH 7 chez *Lb sanfrancisco* CB1.

Aussi chez d'autres micro-organismes l'activité enzymatique est variable. En effet, YANG et al., (1987) ont montrés chez *Bacillus subtilis* un optimale à pH 5,8 ; MATOUB., (2000) chez la même espèce a trouvé un maximum d'activité à pH 6,2. Aussi CHOPRA et MATHUR., (1985) ont trouvé un maximum à pH 8 chez *Bacillus stearothermophilus*.

Selon SAFARIK., (1984), l'activité optimale de la coagulase issue de *Mucor meihie* est obtenue à un pH 5,2. En revanche, MORSLI., (1996) a indiqué un pH optimal de 6,5 ; 6,2 ; 6,3 et 6,5 pour les préparations enzymatiques purifiées de l'artichaut, du figuier et du poulet respectivement. Par contre, GARNOT et MARTIN ., (1980) indique que le pH optimum de la présure est de l'ordre de 5,8.

On remarque que le pH optimum des coagulases varie selon l'origine des enzymes dans un intervalle de 5,2 à 8.

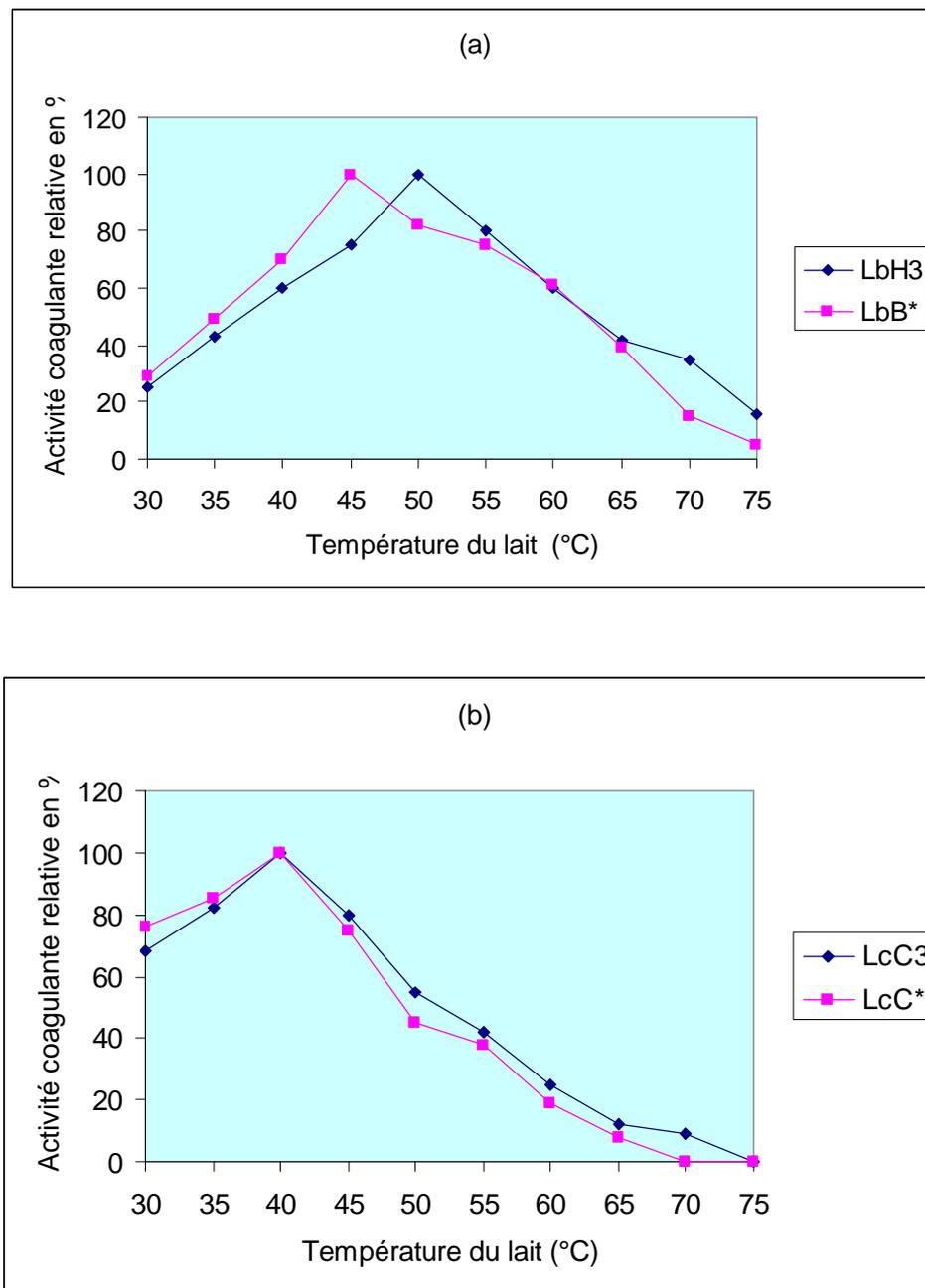


Figure 12 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut issu des souches de Lactobacillus (a) et de Lactococcus (b).

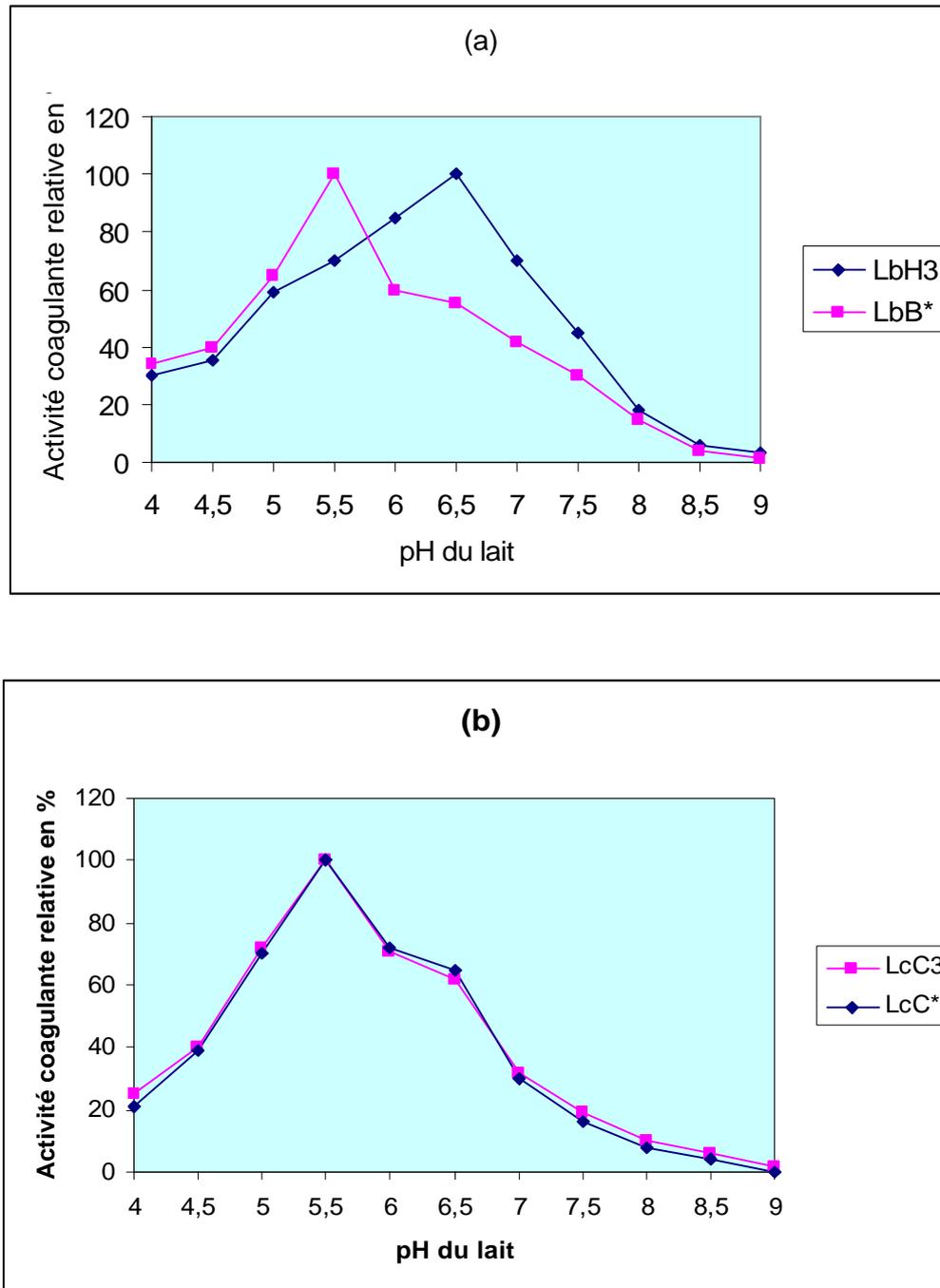


Figure 13 : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut issu des souches de Lactobacillus (a) et de Lactococcus (b).

3- Influence de la concentration en CaCl_2

L'ion calcium est un activateur des protéases. Il est indispensable pour la coagulation du lait et joue le rôle de ciment dans la polymérisation des caséines par la formation de ponts calciques, après hydrolyse de la caséine –• par la protéase coagulante (LENOIR., 1985).

Un taux de calcium adéquat est nécessaire pour favoriser l'action des protéases coagulantes. Le calcium est généralement additionné au mélange du lait sous forme de CaCl_2 . L'étude de l'influence de la concentration en CaCl_2 a été réalisée en faisant varier cette concentration (0,01 à 0,8). Les solutions de cette dernière sont préparées à partir d'une solution mère de CaCl_2 (COLLIN et al., 1977).

Les résultats illustrés par la figure 14 montrent que l'activité coagulante relative atteint son maximum avec le taux de 0,01M chez toutes les souches étudiées. Pour les concentrations supérieures, l'activité baisse par un effet inhibiteur des ions Ca^{++} (COLLIN et al., 1977). L'inhibition est expliquée par la précipitation d'une partie de la caséine du lait (CHEFTEL et CHEFTEL1977).

Nos résultats sont similaire a ceux de COOLBER et al., (1992) obtenus chez la souche H2 de *Lc lactis* ssp *cremoris*. Chez *B subtilis* MATOUB., (2000) montre un maximum à 0,02 M ainsi que YANG et al., (1987). Par contre chez la même espèce HOUINS et al., (1973) et plus récemment PREETHA et BOOPOLTHY., (1997) signalent des concentrations optimales de l'ordre de 0,01 M. COLLIN et al., (1977) préconise pour une coagulation parfaite avec la chymosine et la pepsine bovine un ajustement à 0,01M de CaCl_2 doit effectuer avec précision, aussi MORSLI., 1996 rapporte dans son travail une valeur de 0,01 M pour la présure.

MONNET et al., (1987) dans une étude sur les protéases de paroi chez des souches de *Streptococcus lactis*, préconise que le milieu de culture influe fortement sur la production d'activité protéolytique de paroi, plus la concentration en calcium du milieu est élevée, plus le relargage des protéases est faible.

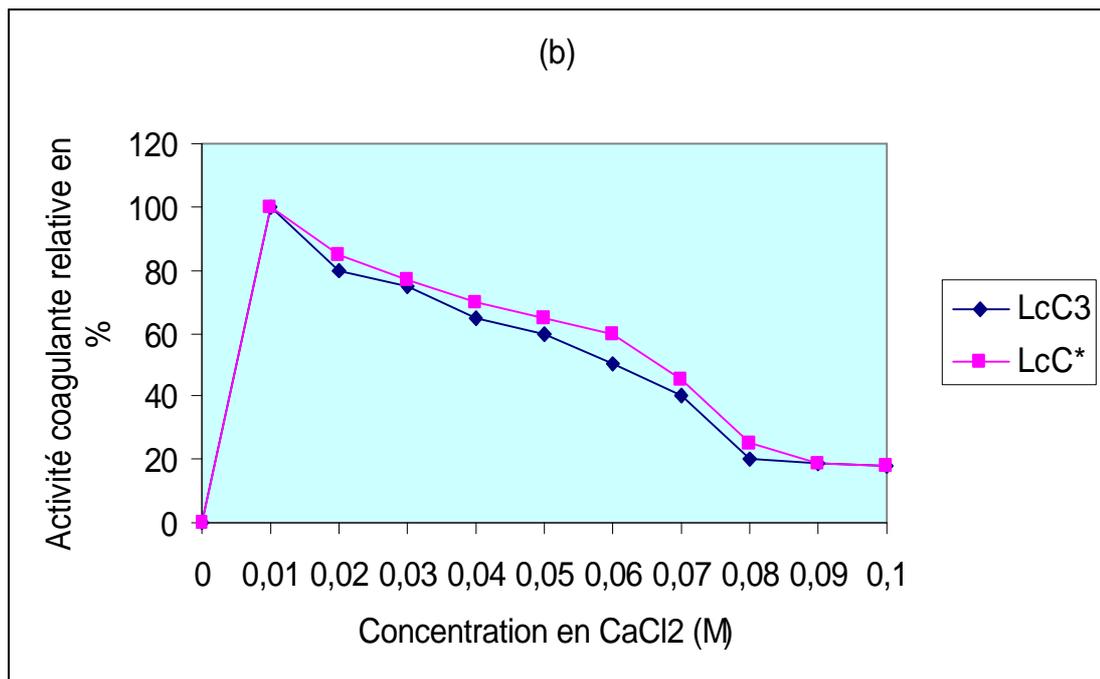
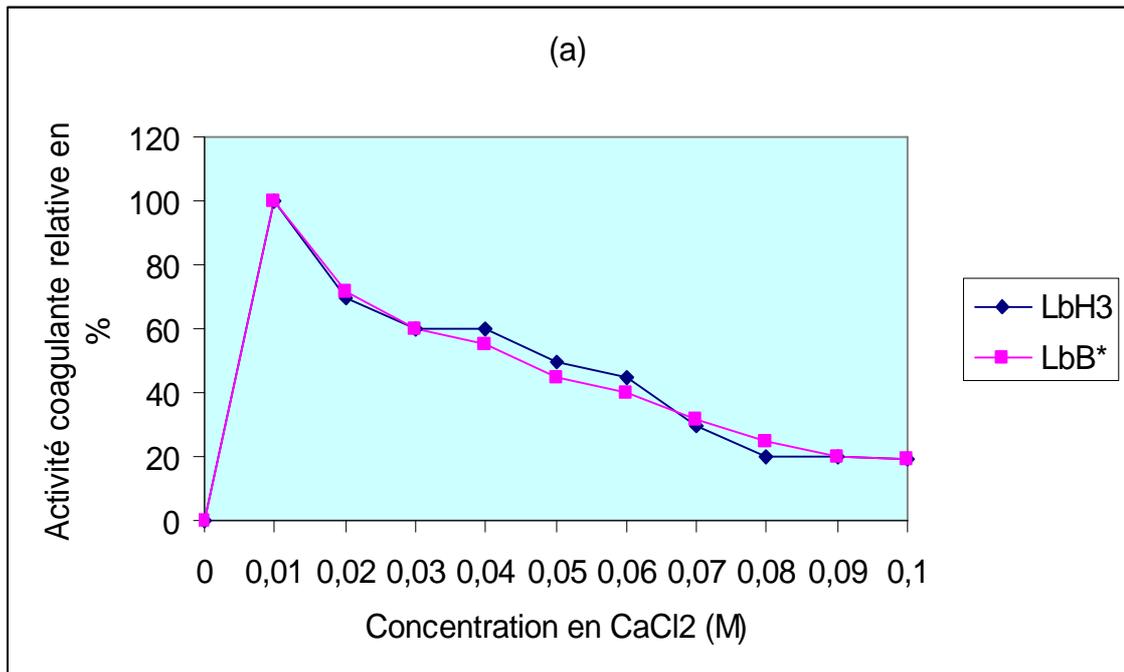


Figure 14 : Influence de la concentration en CaCl₂ sur l'activité coagulante de l'extrait brut issu des souches de Lactobacillus (a) et de Lactococcus (b).

4- Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique chez les souches de *Lc lactis* subsp *cremoris*

4-1- La stabilité à la température

Cette étude de l'influence de la température sur la stabilité de l'extrait brut a été réalisée en maintenant l'extrait à des températures allant de 30°C à 80° l'exposition est de 30mn.

Les résultats rapportés par la figure 15 indiquent que l'activité coagulante est stable dans un intervalle de 30 à 45°C. Pour les températures supérieures à 45°C, l'activité diminue progressivement. Une inhibition presque totale est observée à 55°C on observe une baisse à 12%. Cette inhibition résulte de la dénaturation de la protéine enzymatique. COOLBER et al., (1992) ont montré une bonne stabilité à 37°C chez *Lc lactis* subsp *cremoris*.

D'après YANG et al., (1987), la température de stabilité maximale est comprise entre 30 à 45°C pour les coagulases de *Bacillus subtilis*. Cependant, CHOPRA et al ., 1984 l'avait trouvée comprise entre 30°C et 50°C et plus récemment MATOUB., (2000) a montré chez la même espèce une stabilité entre 30°C et 50°C .

Par ailleurs, PREETHA et BOOPATHY., (1997) ont montré que la température varie dans intervalle de 30°C à 46°C pour les protéases fongiques. MORSLI., (1996) note une stabilité plus élevée des enzymes végétales (artichaut et figuier). La stabilité thermique des enzymes varie selon leur origine.

4-2- La stabilité vis-à-vis du pH

La stabilité de l'extrait vis-à-vis du pH est déterminée par l'incubation de l'extrait dans différents tampons dont le pH varie de 3,5 à 9. Les solutions sont maintenues à +4°C pendant 60 mn. L'activité coagulante résiduelle est ensuite déterminée. D'après la figure 16, l'enzyme conserve son activité initiale 100% à pH 5,5 durant 60 mn d'exposition. Pour des pH inférieurs ou supérieurs à 5,5 on note une baisse plus au moins rapide. Ainsi, à pH 8 l'activité résiduelle est presque nulle 6% et 9% pour les deux extraits alors qu'elle est de l'ordre de 22% et 23% pour un pH de 4 pendant 60mn. D'après nos résultats, les pH acides ne semblent pas dénaturer fortement l'enzyme dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, nos résultats confirment ceux COOLBER et al 1992 qui observent un pH optimal de stabilité de l'ordre de 5,5 pour une protéase de paroi purifiée chez la même espèce.

Chez *B subtilis* MATOUB., (2000) a trouvé un pH de stabilité de l'ordre de 6,4 alors que YANG et al., (1987) ont noté un Ph de stabilité de l'ordre de 6 pour une coagulase de *B. subtilis*. Signalons enfin que le pH de stabilité de la présure est compris entre 5,3 et 6,3 (GARNOT et MARTIN 1980).

4-3- La stabilité au cours de la conservation à +4°C et -18°C

L'estimation de la stabilité au cours de la conservation a été déterminée par l'entreposage de l'extrait brut à +4°C et -18°C pendant 3 mois. L'activité résiduelle coagulante est évaluée périodiquement.

Les résultats indiqués par la figure 17 montrent une stabilité de l'activité à partir de 12 jours pour une conservation à +4°C. Au-delà on constate une perte d'activité qui baisse au bout de 32 jours à une activité résiduelle de 63 %, puis, l'activité reste plus au moins stable. En revanche, lorsque l'extrait coagulant est conservé à -18°C comme le montre la figure 18, on note une faible baisse d'activité de l'ordre de 6% et l'enzyme garde 94% d'activité pendant toute la période de conservation (3mois).

Aussi MATOUB., (2000) pour une coagulase purifiée de *B. subtilis* a montré une perte d'activité de 25% lors d'une conservation à +4°C durant 3mois, alors que cette perte n'est que de 2% à -18°C. Cependant MORSLI., (1996), a montré une perte d'activité des coagulases purifiées du poulet, de l'artichaut, du figuier et de la présure, respectivement de 75%, 45%, 25% et 18% lors d'une conservation à +4°C durant 3mois, alors ces pertes ne sont que de 10% et 5% après 3 mois à -18°C respectivement pour l'enzyme de l'artichaut et celle du poulet, alors que la présure est stable à cette température pour la même période. D'une manière générale, la température de -18°C stabilise les coagulases, néanmoins ce mode de conservation est coûteux pour une enzyme industrielle telle que la présure.

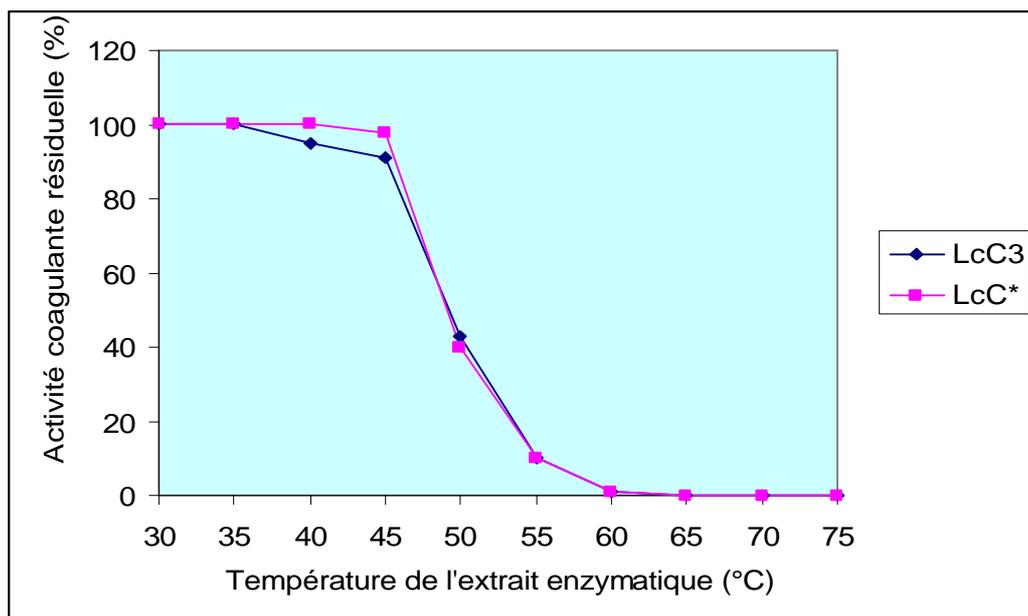


Figure 15 : Stabilité thermique de l'extrait enzymatique issu des souches de *Lc lactis subsp cremoris* (LcC3 et LcC*) après 30mn d'incubation.

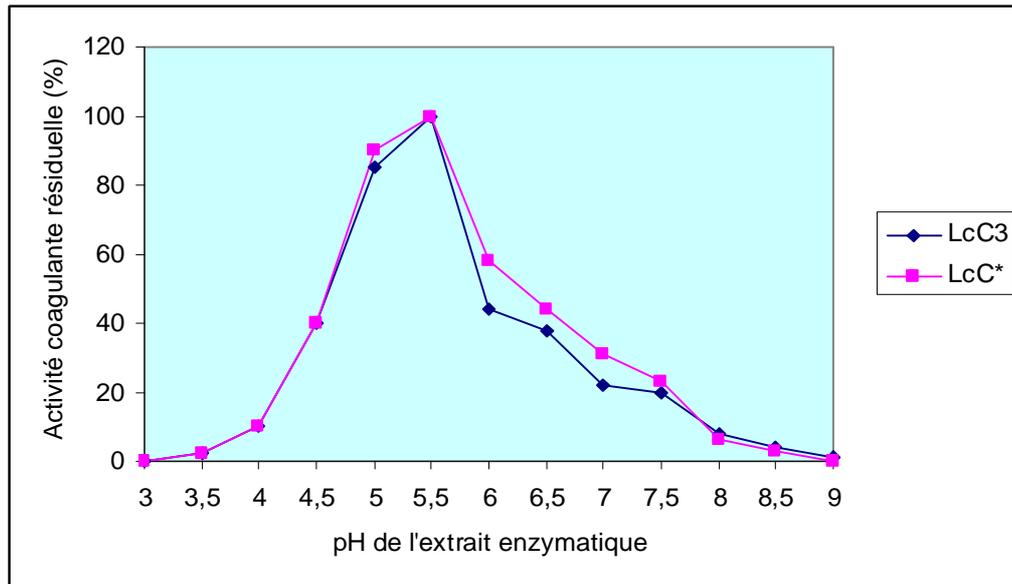


Figure 16 : Stabilité de l'extrait brut issu des souches de *Lc lactis* subsp *cremoris* (LcC3 et LcC*) en fonction du pH après 60mn d'incubation.

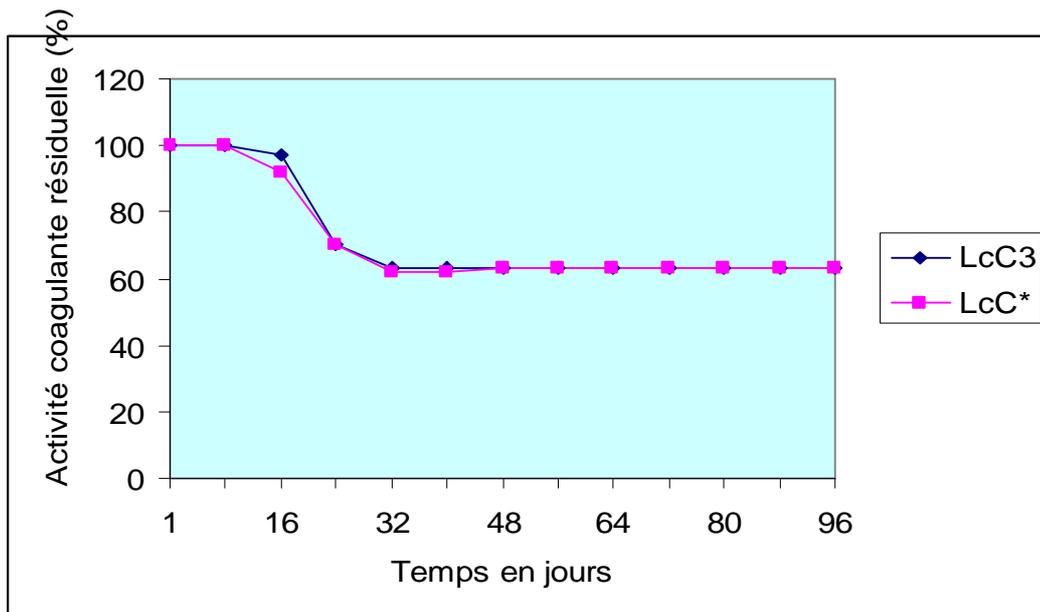


Figure 17 : Stabilité de l'extrait brut des souches de *Lc lactis* subsp *cremoris* (LcC3 et LcC*) au cours de la conservation à +4°C.

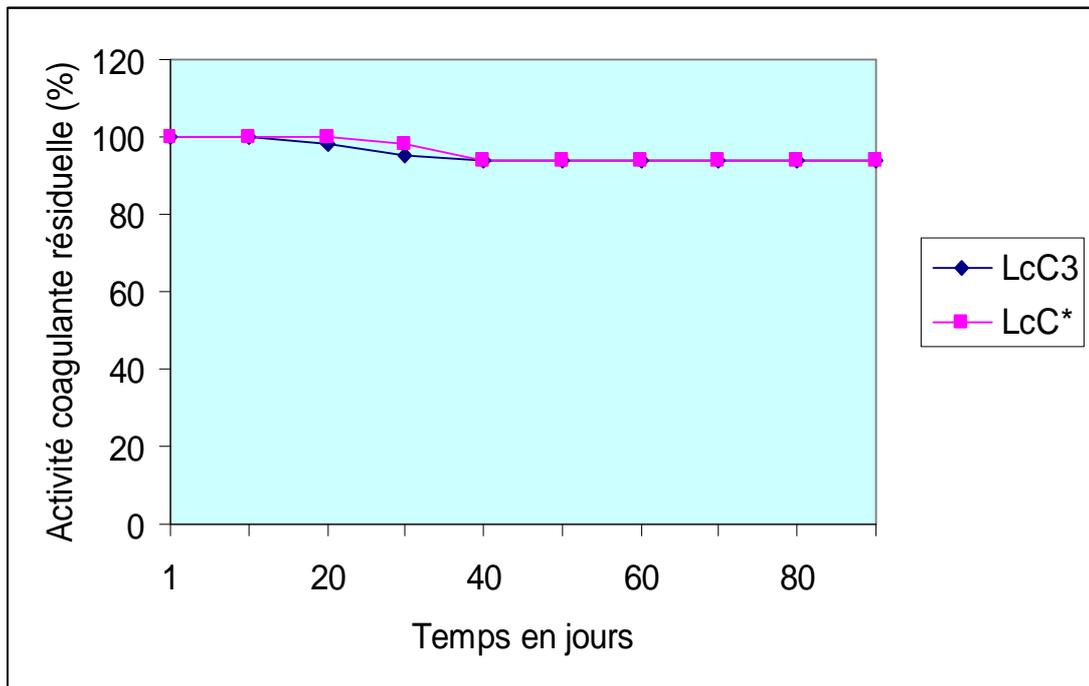


Figure 18 : Stabilité de l'extrait brut des souches de *Lc lactis subsp cremoris* (LcC3 et LcC*) au cours de la conservation à -18°C.

Conclusion générale

Conclusion générale

La présente étude a pour objectif de contribuer à la connaissance des protéases coagulant le lait, issues de souches de bactéries lactiques sélectionnées.

Au cours de notre travail, des bactéries lactiques ont été isolées à partir de lait cru de vache et de ferments lactiques commerciaux. Parmi les souches isolées, 23 souches ont été identifiées sur la base de caractères biochimiques et physiologiques. La flore lactique isolée de lait cru était diversifiée, synonyme de la richesse du lait cru par les bactéries lactiques. Les résultats d'identification indiquent que les souches appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Ces souches ont été caractérisées du point de vue technologique par l'étude de la cinétique de croissance, de l'évolution du pH, de l'acidité titrable et l'activité protéolytique.

La culture des souches réalisée sur le lait écrémé UHT a montré que ce milieu était favorable pour la multiplication des bactéries lactiques avec des valeurs de croissance très appréciables sauf pour les *Leuconostoc*. L'évolution du pH du lait ensemencé avec les souches était rapide pour les espèces de *Lactobacillus*, de *Streptococcus* et *Lactococcus* avec une aptitude acidifiante non négligeable.

D'autre part, l'activité protéolytique chez les bactéries lactiques était appréciable. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation des taux de l'activité enzymatique avec le prolongement du temps d'incubation des cellules entières. Les différentes espèces étudiées ont été classées dans l'ordre suivant: *Lb helveticus*/ *Lc lactis* subsp *cremoris*/*Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus*/ *Lc lactis* subsp *diaceylactis*/ *Lb delbrueckii* subsp *lactis*/*Sc thermophilus*. Néanmoins les espèces de *Lc mesenteroides*, *Lc lactis* subsp *lactis* et *Lb plantarum* montrent une faible activité.

L'extraction de protéases pariétales obtenues par centrifugation et action de lysozyme a été effectuée sur les cellules récupérées de biomasses en phase exponentielle cultivées en fermenteur sur du lait UHT. En effet, cette phase de croissance a permis l'extraction des protéases et de montrer leur activités enzymatiques.

Il ressort des résultats que les préparations enzymatiques (extraits enzymatique bruts) testées ainsi que les cellules entières utilisées donnaient des valeurs d'activité protéolytiques comparables. La somme de la protéolyse des extraits enzymatiques bruts était égale à 80% de l'activité protéolytique totale des cellules entières.

L'activité coagulante des extraits enzymatiques bruts a été mise en évidence chez les espèces : *Lc lactis* subsp *cremoris* (*LcC1*, *LcC2*, *LcC3*, *LcC**) ; *Lb helveticus* (*LbH1*, *LbH2*, *LbH3*) et *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* (*LbB*, *LbB**). Parmi les 9 extraits enzymatiques testés, seuls 4 extraits

enzymatiques des souches suivantes : *Lc lactis* subsp *cremoris* (LcC*, LcC3), *Lb helveticus* (LbH3) et *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* (LbB*) ont montré une activité maximale coagulante de l'ordre 43, 29, 23 et 20 en force coagulante respectivement.

En outre, les conditions optimales d'activité des 4 extraits enzymatiques bruts sont déterminées. L'activité coagulante est maximale à un pH de 5,5 pour les extraits des souches de LcC3, LcC*, LbB* et atteint son maximum à un pH de 6,5 pour LbH3. Le maximum de l'activité coagulante est obtenu avec une température optimale de 40°C chez LcC* et LcC3. Les extraits bruts des souches LbH3 et LbB* ont donné un maximum d'activité à des températures optimales de 50°C et 45°C successivement. L'influence de la concentration en CaCl₂ révèle un maximum d'activité enzymatique obtenu à 0,01M pour tous les extraits enzymatiques testés.

La détermination des conditions de stabilité étudiées avec l'extrait enzymatique brut qui présente l'activité coagulante maximale la plus élevée (souche LcC*) montre que son activité est stable dans un intervalle de 30°C à 45°C pendant 30mn et elle est à 100% à un pH de 5,5. La conservation à +4°C n'est pas très favorable pas au delà d'une douzaine de jours en revanche, l'entreposage à une température de -18°C pendant 3 mois d'essais permet une meilleure conservation.

La somme des essais réalisés sur les espèces isolées des ferments lyophilisés montre des souches plus performantes avec des extraits enzymatiques plus actifs et plus stables par rapport aux souches locales isolées du lait cru, ce résultat peut être expliqué du fait que les souches des ferments lactiques ont subi une étape d'amélioration et de sélection.

Au terme de cette étude, les résultats montrent que les bactéries lactiques possèdent une activité protéolytique détectable et une activité coagulante faible. Ceci peut être lié à l'action non spécifique des protéases de bactéries lactiques sur la caséine. Il est évident qu'elles ne montrent pas la même spécificité que la présure.

Nous estimons dans le cadre des perspectives que d'autres essais méritent d'être entrepris afin de compléter cette initiative d'approfondir les axes de recherches suivants :

- Ø Améliorer les méthodes de sélection et de caractérisation des bactéries lactiques locales,
- Ø Optimiser les conditions d'extraction, de purification et de conservation des extraits enzymatiques chez les bactéries lactiques,
- Ø Analyser et identifier la nature des protéines hydrolysées et des peptides libérés afin de cibler le site d'action des protéases de bactéries lactiques,

∅ Améliorer les performances des souches par manipulation génétiques,

Références bibliographiques

- **ACCOLAS.J.P., BLOQUEL.R., DIENNE.R., et REGNIER.J., (1977).**

Propriétés acidifiants des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt.

Le Lait., 561-562, 1-23.

- **ACCOLAS.J.P., HEMME.D., DESMAZEAUD.M.J., VASSAL.L., BOUILLANNE.C et VEAUX.M., (1980).**

Les levains lactiques thermophiles : Propriétés et comportement en technologie laitière.

Le Lait., 60 ; 487.

- **AFNOR., (1987).** Association Française de Normalisation.

- **AGABRIEL. C., COULON.J.B et HARTY.G., (1993).**

Facteurs de variation de la composition chimique du lait dans les exploitations.

Production animale. 6, 53-60

- **ALAIS.C., (1984).**

Principes des techniques laitières, Science de lait.

Ed. SEPAIC.4^{ème} édition. 814p.

- **ALAIS. C., LINDEN. G., et LAURENT. M., (2003).**

Biochimie alimentaire 5^{ème} édition DUNOD.

- **ALGARON.F., MIRANDA., LE BARS.D. et MONNET.V., (2004).**

Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic systems to accumulate potentially bio-active peptides.

Le Lait., 84; 115-123.

- **AMIOT.J., FOURNIERS., LEBEUF.Y., PAQUIN.P., et SIMPSON.R., (2002).**

Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In VIGNOLA.C.L : Science et technologie du lait.

Fondation de Technologie Laitière du Québec inc.

Presses internationales POLYTECHNIQUE

- **AMOROSO.M.J., MANCA DE NADRA.M.C., et OLIVIER.G., (1989).**

The growth and sugar utilization by *L. actobacillus delbrieckii* ssp *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* isolated from market yogourt.

Le Lait., 69, 519-528.

- **ANONYME , (2000).**

Gram –positive bacteria deprived of HtrA protease activity and their uses

World Intellectual Property Organisation.

- **ATLAN. D., AUBEL. D., GILBERT. C., (2000).**

La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases de surface.

Sciences des Aliments., 20, 5-17

- **BALCONE. E., OLANO.A. et CALVO.M.M., (1996).**

Factors affecting the rennet clotting properties of ewe' s milk.

J.of agricult. Food. Biochem., 44, 8, 1993-1996

- BARBOSA. M., VALLES. E. VASSAL. C et MOCQUOT. G., (1976).

L'initialisation de l'extrait de *cynara cardunculus* comme agent coagulant en fabrication de fromage.

Le Lait., 1-2, 14-16.

- BEAL C., DESCHAMPS N., JUILLARD V., DE ROISSART H., RECHARD J., et SARAUX B., (1994).

Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M : Bactéries Lactiques. Volume 1.

Lorica ., 367-401

- BEAUQUESNE. D., et CAUTRI .G., (1980).

Etude de l'activité protéolytique des souches et mélanges de souches de bactéries lactiques fournies à l'industrie laitière.

Revue Laitière Française., 407, 19- 23.

- BENEDEK.HD., (1981).

Stady of the actionof coagulating enzymes on acid casein and its alpha, betta and kappa casein.

Alimentos e agricola., 9. 7-9

- BERENS. L. et LUQUET. F .M., (1987).

Guide pratique d'analyses microbiologiques des lait et produits laitiers.

APRIA, Paris., 143.

- BERG.G., VAN-DEN et KONING.P.J., (1990).

GOUDA cheesmaking with purifed calf chymosin and microbially produced chymosin.

Dairy Technology pappers., 44, 189-191.

- BOUDIER J. F., (1974).

Présure et succédanés de la présure. Série de synthèse bibliographique.

Edition Technique et Documentation., APRIA, France., 3, 873.

- BOURGEOIS. C. M et LEVEAU.J.Y., (1991).

Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires.

Edition. Technique et documentation Lavoisier. Le contrôle microbiologique. Tome 3

- BOURGEOIS. C. M et LARPENT.J-P., (1996).

Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2.

Edition. Technique et documentation Lavoisier.

- BOUTON.Y., GUYOT.P., DASEN.A., et GRAPPIN.R., (1993).

Activité protéolytique des souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de comté.

Validation sur miniformages des techniques de laboratoire.

Le Lait., 73, 265-279.

- BOUTRON.R., SEPULCHRE.A., GRIPPONJ.H. et MONNET.V., (1998).

Simple tests for pridicting the lytic behavior and proteolytic activity of lactococci strains in cheese.

J. Dairy Sci ; 2321-2328.

- BOYAVAL. P., CORRE. C., DEPUIS. C. et ROUSSEL. F., (1995).

Effect of free fatty acids on propionic acid bacteria.

Le Lait., 75, 17-29.

- BREUKINK.E. et DE KRUIJFF.B., (1999).

The lantibiotic nisin, a special case or not ?
Biochim . Biophys. Acta., 1462; 223-234.

- BREWER.P., HELBIG.N. et HAARD.N.N., (1984).

Atlantic cod pepsine. Characterisation and use as a rennet substitute. Canadian Inst.
Food Science Technology. ., 17, 38- 42.

- BRUINENBERG.P., et LIMSOWTIN.G., (1995).

Diversity of proteolytic enzymes among lactococci.
Ausstr. J. Dairy. Technol., 50; 47-50.

- BRUNNER. J.R., (1981).

Row milk proteins: twenty five years of progress.
Journal. Dairy. Science., 64, 1038-1044.

- BRULE ., LENOIR.J., et REMEUF., (1997).

La micelle de caséine et la coagulation du lait. In ECK.A., GILLIS.J.C. Le fromage de la science
à l'assurance qualité.
Edition. Technique et documentation Lavoisier., 7-14.

- CAYOT.P et LORIENT.D., (1998).

Structures et technologie des protéines du lait.
Arilait recherche, Technique et documentation.

- CALVO. M.M. et BALCONES. E., (1993).

Influence of heat treatment on rennet clotting properties of mixtures of cow's, ewe's and goat's
milk and on cheese yield.
Journal Agric Food chemistry., 46, 2957-2962.

- CHAMBA.J.F., et PROST., (1989).

Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication
des fromages à pâte cuite.
Le Lait., 669, 417-431.

- CHEFTEL.J.C. et CHEFTEL. H., (1977).

Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments . volume 1.
Edition Technique et documentation Lavoisier. , 381.

- CHEFTEL.J.C. et CHEFTEL. H., (1980).

Introduction à la technologie des aliments. Tome 2.
Edition Lavoisier, Technique et documentation. Paris., 54-60.

- CHERPRENET J., et CAU J., (1982).

Contrôles du lait et produits laitiers. Les bactéries lactiques.
Edition CRDP DIJON, 156-170

- CHOPRA.A.K. et MATHUR.D.K., (1984).

Isolation, screening and characterisation of thermophilic Bacillus species isolated from dairy
products.
J. Appl. Bacteria., 57, 263-271

- **COLLIN J.C., GRAPPIN R., et LEGAET Y., (1977).**

Etude de la méthode de mesure selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique.

Revue Laitière Française., 355, 389-394

- **COOLBEAR TIM., JULIAN R. REID and GRAHAM G. PRITCHARD., (1992).**

Stability and specificity of de cell wall-associated proteinase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* H2 released by treatment with lysozyme in the presence of calcium ions

Applied and Environmental Microbiology. Oct., 3263-3270

- **CORDERIO.M., JACOB.E., PUHAN.Z. et PAIS.M.S., (1992).**

Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*.

Milchwissenschaft., 52, 3, 150-153.

- **COURTAIN.P et RUL.F., (2004).**

Interaction between microorganisms in a simple ecosystem : yogurt bacteria as a study model.

Lait 84, 125- 134.

- **CURCK.M.C., BOEUFGRAS.J.M., DECARIS.B., GAVIN.F., KERSTERS.K., LARPENT.J.P., LE BOURGOIS.P., RENAUT.T., DE ROISSART.H., et ROUVIER.C., (1994).**

Méthodes d'identification des bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M : Bactéries Lactiques. Voll.

Lorica., 141-168.

- **CUVELLIER.G.F., (1999).**

Production des enzymes. In Biotechnologie. SCRIBAN. R.

5^{ème} édition., 345-363.

- **DALGLEISH.D.G., (1993).**

The enzymatique coagulation of milk. In FOX.P.Fed. Cheese chemistry physic and microbiology. 2ème ed. Vol 1. Chapman and Hall.

London., 69-100.

- **DEBRY G., (2001).**

Lait, nutrition et santé.

Edition Technique et Documentation.

- **DELLAGLIO.F., DE ROISSART. H., TORRIANIS., CURK M.C et JANSSENS.D., (1994).**

Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M. Bactéries Lactiques. Volume1.

Lorica., 25-116.

- **DEMERDASH.M. et ABD-EH-GHANY.F.H.F., (1997).**

Enzymes of fermented derived chymosin from *Kleferomyces lactis*.

Egyp. Journal dairy science., 25, 11-15.

- **DE ROISSART. H et LUQUET. F. M., (1994).**

Bactéries lactiques volume 1.

Lorica

- **DE ROISSART. H et LUQUET. F. M., (1994).**

Bactéries lactiques volume 2.

Lorica

- **DE ROISSART H. B., (1986).**

Bactéries lactiques in lait et produits laitiers

Edition Technique et Documentation, Lavoisier Paris. Tome 3; 343- 408

- **DESMAZEAUD M.J., GRIPPON J.C., LEBARS O et BERGER J.L., (1976).**

Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages.

Influence des microorganismes.

Le Lait., 557, 379-396.

- **DESMAZEAUD M.J., et VASSAL L., (1979).**

Activité protéolytique intracellulaire de Streptocoques lactiques mésophiles

Le Lait., 587, 327-344

- DESMAZEAUD M.J., et BOUILLANCE ., (1981)

- **DESMAZEAUD M.J., (1983).**

L'état de connaissance en matière de nutrition des bactéries lactiques.

Le Lait., 629-630, 269-307.

- **DESMAZEAUD M.J., (1990).**

Le Lait milieu de culture.

Microbiologie- Aliments- Nutrition., 8, 313-325.

- **DESMAZEAUD M.J., (1992).**

Les bactéries lactiques. In HERMIER.J., LENOIR.J., WEBER.F. : Les groupess microbiens d'intérêt laitier.

Edition CEPIL., 9bis-60.

- **DEVOYOD J.J., et POUILLAIN F., (1988).**

Les Leuconostocs propriétés: leur rôle en technologie laitière.

Le Lait., 68(3), 249-280.

- **DE VUYST.L., VANDERVEKEN.F., VAN DE VEN.S. et DEGEEST.B., (1998).**

Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis.

J . Appl . Microbiol., 84 ; 1059-1068.

- **EMMONS.D.O., PETRASOIRTS.A et CILLAM.R.H., (1970).**

Fromage Cheddar fait à la présure et à la pepsine.

Congrès Int. Lait. SYDNEY.,40.

- **EXTERKATE. F.A., ALTING., et BRUINENBERG.P., (1993).**

Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region.

Appl . Environ. Microbiol., 59, 3640-3647.

- **EXTERKATE. F.A., (1975).**

An introductory study of the proteolytic system of *Streptococcus cremoris* strain HP.

Neth. Milk. Dairy.J., 29, 303-318.

- EXTERKATE. F.A., (1976).

Comparaison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytique activities associated with cell wall.

Neth. Milk. Dairy J., 30, 95-105.

- EZZAT. N., EL SODA.M., DESMAZEAUD. M. J., et ISMAIL.A., (1982).

Milchwissenschaft., 3, 563.

- FABER.E.J., HAAK.M.J., et Vliegenthart.J.F.G., (2001).

Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3.

Carbohydr. Res., 331; 173-182.

- FERNANDEZ-ESPLA.M.D et RUL.F., (1999).

PepS from *Streptococcus thermophilus*: A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria.

Eur. J. Biochem., 263; 502-510.

- FRENGOVA.G.I., SIMOVA.E.D., BESHKOVA.D.M et SIMOV.B.Z.I., (2002).

Exopolysaccharides produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains.Z.

Naturforsch., 57c; 805-810.

- FERNANDEZ DE PALENCIA.P., PEALEZ.C. et MARTIN-HERNANDEZ.M., (1997).

Specificity of the bound and free forms of the cell-envelope proteinase of *Lactobacillus casei subsp casei* IFPL 731 towards the s1-casein-(1-23)-fragment.

Lett. Appl. Microbiol., 25, 388-392.

- FINDLAY.C.I., STANLAY.D.W. et EMMONS.D.B., (1984).

Chicken pepsin as a rennet substitute.

Canadian Inst Food Science Technology. J., 17, 97-101.

- FLAMBARD.B., (2005).

Lactic acid bacteria and cardiovascular health. In LUQUET.F.M et CORRIEU.G., Bactéries lactiques et probiotiques.

Lavoisier, Technique et Documentation ; 291-302.

- FODAM. S., (1977).

Biochemical properties of bacterial rennin produced from whey.

Milchwissenschaft., 32, 21-24

- FOLTMANN. B., (1981).

Milk clotting proteases: structure, fonction.

Neth. Milk. Dairy. J., 35, 223-231.

- FREY.J.P., MARTHE.H., JOHNSON.M.E., et OLSON.N.F., (1986).

Heat and freeze shocking cause changes in peptidases and protease activity of *Lactobacillus helveticus*.

Milchwissenschaft., 41, 681-685.

- FEDERICI.F., (1982).

Comparative study of some properties of a new milk coagulating enzyme and two commercial rennets. In utilisation des enzymes en industrie alimentaire

Edition PLUQUET., 303-310.

- **GARDA DE FERNANDO.G.D et FOX.P.F., (1991).**
Extracellular proteinases from *Micrococcus* GF: II. Isolation and characterization.
Le Lait., 71 ; 371-382.
- **GASSON.M.G et DAVIES.F.L., (1984).**
Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.
Applied science publishers p99
Edition .F.L. DAVIES.B.A LAW. Elsevier.
- **GARNOT. P. et MARTIN. P., (1980).**
La pression: composition, activité, son rôle en fromagerie.
La Technique Laitière., 930, 27-30.
- **GARRITY.G.M., BELL.J.A et LIBRUN.T.G., (2004).**
Taxonomic outline of the prokaryotes. 2ème Edition.
Bergey's manual of systematic bacteriology., 1- 401.
- **GARVIE.E.T., et FARROW.J.A.E., (1982).**
Streptococcus lactis cremoris ORLA JENSEN and *Streptococcus lactis ssp diacetylactis*.
J. Syst. Bacteriol., 32, 453-455.
- **GEVERS.G., HUYS.G., SWINGS.J., (2001).**
Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of lactobacillus species.
FEMS. Microbiology letters., 205; 31-36
- **GOBBETTI. M., SMACCHI. E., et CORSETTI. A., (1996).**
The proteolytic systems of *Lactobacillus sanfransisco*.CB1: purification and characterization of a
proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase
Appl. Environ. Microbiol., 62, 3220-3226.
- **GOURSSAUD. J., (1999).**
Réacteurs traditionnels à enzymes libres: cas de l'industrie laitière. Coagulation enzymatique du
lait. In Biotechnologie. SCRIBAN. R.
5^{ème} édition., 365-401.
- **GORDIN.S., ROSENTHAL.I., BERNSTEIN.S. et NOVROT.C., (1978).**
Pepsine du poulet utilisée comme succédané de la pression de veau dans la production du
fromage.
Congrès Int. Laitier ., 11, 447-448.
- **GRAINDAY.P., (1978).**
Détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale.
Technicien du Lait., 83, 5-47.
- **GUEDON.E., MARTIN.C., GOBERT.F.X., EHRLICH.S.D., RENAUT.P., et
DELORME.C., (2001) .**
Réseau de regulation de la transcription des gènes du système protéolytique de *Lactococcus*
lactis.
Le Lait., 81 ; 65-74

- **GUTCHO. S.J., (1979).**

Microbial enzyme production.

Chemical technology review., 28, 260-277.

- **GUTFELD.M. et ROSENFELD.P.P., (1975).**

The solution to Israel's rennet shorage.

Dairy Industries., 40, 52-55.

- **GUIRAUD.J., et GALZY.P., (1980).**

L'analyse microbiologique dans les industries agroalimentaires.

Les éditions de l'Usine Nouvelle, Paris.

- **HAARD.N.F., SHAMSUZZAM.K. et BREWER.P., (1985).**

In use of enzymes in food technology.p. DUPUY.237-240.

- **HAMANN.W.T. et MARTH.E.H., (1984).**

Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts.

Journal of Food Protection., 781-786.

- **HAMED.A.I., (1990).**

Comparative investigation between various milk clotting enzymes obtained from chicken's.

Processing of ento food chem., 15, 1835-1840.

- **HASSAN.H.N., EL-DEED.S.A. et MASHAL.R., (1984).**

Utilisation d'extrait de gésier en remplacement de la présure de veau.

Processing of ento food chem., 111, 319-323.

- **HOLCK.A., et NAES.H., (1992).**

Cloning sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* NCDO151.

J. Gen. Microbiol., 138, 1353-1364.

- **HOLZAPFEL.W., GEISEN.R., et SCHLILLIGER.U., (1995).**

Biological preservation of foods with reference to protective culture, bacteriocins and food-grade enzymes.

Int. J. Food. Microbiol.,24, 343-362

- **HOUINS.G.,DEROANNE.C.et COPPEN., (1973).**

Etude comparative de l'activité coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure animale et de trois de ses succédanés.

Le Lait., 610-611.

- **HUGENHOLTZ. J., EXTERKATE. F., KONINGS.W., (1984).**

The proteolytic systems of *Streptococcus cremoris*:an immunological analysis.

Applied and environmental microbilology. Vol.48, N°.6., 1105-1110.

- **HURTAND.C., RULGUIN.H., DELAITE.M. et VERITE.R., (1995).**

Prediction of cheese yielding efficiency of individual milk of dairy cow correlation with coagulation parameters.

Annales de zootechnie., 385-389.

- **HUSEK.U., et SEDEK.M., (1981).**

Expérience avec la pepsine du poulet et utilisation en fromagerie.
Netherlands Milk Dairy Journal., 35, 302-306.

- **INFANTE.M. et TOURNEUR.C., (1991).**

Etude de la flore lactique de levains naturels de panification provenant de différentes régions Françaises.
Sciences des Aliments., 11, 3, 525-545.

- **JOFIN.C., (1985).**

Microbiologie alimentaire.
Centre régional de documentation pédagogique ., 100.

- **JUILLARD.V. et RICHARD.J (1989).**

Etude de l'interaction entre souches protéolytiques de Streptocoques lactiques et leurs variants non protéolytiques au cours de leur croissance dans le lait.
Le Lait., 69, 299-304.

- **JUILLARD.V., FOUCAUD.C., DESMAZEAUD.M. et RICHARD.J., (1996).**

Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*
Le Lait., 76, 13-24.

- **KHALID.M., SHAMMET.R.J., BROWN.T. et MC MAHON.D., (1992).**

Protéolytic activity of some milk-clotting enzymes on Kappa-caseine.
J. Dairy. Scienc., 75, 1373-1378.

- **KIKUCHI. T., DESMAZEAUD. M., BERGERE. J.L., (1973)**

Aptitude des Streptocoques lactiques à la protéolyse: Etude de l'action de Streptocoques lactiques mésophiles sur les constituants azotés du lait.
Le Lait N°527.

- **KOK.J., LEENHOUTS.K., HAANDRIKMAN.A., LEDEBOER.A., et VENEMA.G., (1988).**

Nucleotide sequence of the cell-wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* wg2.
Appl. Environ. Microbiol., 54, 231-238.

- **KONING.S., (1994).**

Mécanisme de transport des nutriments dans les bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET .F.M : Bactéries lactiques. Vol 1.
Lorica ., 198-218p

- **KOPELMAN.I.J. et COGAN.U., (1983).**

Etude de la pepsine.
Journal Dairy Science., 66, 5, 981-983.

- **KREVZET.M.V., SIEBENTHAL.AM et KANFMAN.A., (1996).**

Determination of the relative efficacy to enhance milk renneting properties of alteration in dietary and stage of lactation.
Milchwissenschaft., 51, 11, 403-413.

- **LACRAMPE J.L., et WEBBER., (1973).**

Teneur en diacétyle de levain et caillés maigres fabriqués à partir de bactéries lactiques concentrées, congelées, conservées sous azote liquide.

Le Lait., 528, 491-519.

- **LAGRANGE.A., PAQUET.G. et ALAIS.C. (1980).**
Comparative study of two *Mucor miehei* acide proteases.
Ind. J. biochem., 11, 347-350.

- **LALOIP., ATLAN.D., BLANC.B., GILBERT.C., PORTALIER.R., (1991).**
Cell-wall associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CNRZ397 :
differential extraction, purification and properties of the enzyme.
Appl. Environ. Biotechnol., 36, 196-204.

- **LARPENT. J.P., (1991).**
Microorganismes intervenants dans la fabrication et la maturation des fromages, leur rôle sur les
propriétés organoleptiques. In Annales du colloque : biotechnologies et industrie laitières.
APRIA., 11 Mars 1987 Clermont-Ferrand., 128p.

- **LARPENT. J.P., (1991).**
Les ferments microbiens dans les industries agro alimentaires : produits laitiers et carnés.
Actualités Scientifiques et Technologiques en Industries Agroalimentaires., N°46, 242

- **LARPENT. J.P. et LARPENT- GOURGAUD. M., (1997).**
Mémento technique de microbiologie.
Edition Technique et Documentation. 3^{ème}

- **LARPENT. J.P., (2000)**
Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens.
Edition Technique et Documentation.

- **LARRETA-GARDE.V., (1997).**
Enzymes en agroalimentaire.
Edition Technique et Documentation., Lavoisier.

- **LEBRES., (2004).**
Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. « Microbiologie des laits et produits
laitiers ». Institut Pasteur d'Alger.

- **LECLERC.H., et MOSSEL.D.A.A., (1989).**
Microbiologie : Le tube digestif, l'eau et les aliments.
DOIN éditeurs. Paris.

- **LEMIEUX.L. et SIMARD.R.E., (1991).**
Better flavour in dairy products.I.A review of the factors likely to influence its development.
Le Lait., 135, 503-504.

- **LE LOIR.Y., NOUAILLE.S., RIBEIRO.L., COMMISSAIRE.J., CORTIER.G.,
GILBERT.S., CHATEL.J.M., L'HARIDON.R., GRUSS.A et LANGELLA.P., (2001).**
Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*.
Le Lait., 81 ; 217-226.

- **LENOIR.J. et VEISSEYRE.R., (1987).**
Coagulation du lait par la présure et correction des laits en fromagerie. In Le lait matière
première de l'industrie laitière. CEPIL. INRA., 329-341.

- **LEVEAU.J.Y., BOUIX.M., et DE ROISSART.H., (1991).**
La flore lactique. In Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. Vol 2 APRIA.
Ed Technique et Documentation, 152-183.
- **LINDEN. G. et LORIENT. D., (1994).**
Biochimie agro- alimentaire : valorisation alimentaire de la production agricole.
Edition Masson, Paris, Milan, Barcelone., 141- 163.
- **LOONES.A., (1994).**
Laits fermentés par les bactéries lactiques. In bactéries lactiques. Vol 2
Lavoisier. Edition Loriga., 135-154.
- **LUQUET.F.M., (1985).**
Lait et produits laitiers, vache, brebis, chèvre.
Lavoisier, Technique et Documentation., Tomes I et II.
- **LUQUET.F.M et CORRIEU.G., (2005).**
Bactéries lactiques et probiotiques.
Lavoisier, Technique et Documentation ; p 307.
- **MARCHAL.N ., BOUDRON.J.L. et RICHARD.C.L., (1987).**
Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimiques des bactéries.
Doin éditeur. Paris.
- **MARGESIN.R. et SCHINNER.F., (1994).**
Properties of cold adapted microorganismes and their potential role in biotechnology.
Journal. of biotechnology., 33, 1-6.
- **MARTEAU.P et SEKSIK.P., (2005).**
Probiotiques et alicaments. In LUQUET.F.M et CORRIEU.G., Bactéries lactiques et probiotiques.
Lavoisier, Technique et Documentation ; 225-290.
- **MARTIN.B et COULON.J.B., (1995).**
Milk production and cheese characteristics. 1 : Influence of milk production condition on herd milk clotting ability.
Le Lait., 75 ; 61-68.
- **MARTIN-HERNANDEZ.C., ALTING.A. et EXTERKATE.F., (1994).**
Purification and characterization of the mature, membrane associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89.
Appl. Environ. Biotechnol., 40, 828-834.
- **MARUGG.J.D., KRANENBURG.R., LAVERMAN.P., RUTTEN.G.A., et DEVOS.W.M., (1996).**
Identical transcriptional control of the divergently transcribed PrtP and PrtM genes that are required for proteinase production in *Lactococcus lactis* SK11.
J. Bacteriol., N°6; 1525-1531
- **MATHIEU.U., (1981).**
Présure, pepsine bovine et protéases acides en fromagerie.

Circulaire de 28 janvier 1981. Technique Laitières., 954, 51-52.

- MATHIEU.J., (1998).

Initiation à la physicochimie du lait.

Lavoisier, Technique et Documentation. 214 p.

- MATOUB. L., (2000).

Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (LC33).

Thèse de Magistère. INA., 91.

- MENEDEZ.S., CENTENOJ.A., GODINEZ.R., et RODRIGUEZ-OTERO.J.L., (2000).

Effects of Lactobacillus strains on the ripening organoleptic characteristics of Arzua-Ulloa cheese.

Int. J. Food. Microbiol., 25, 37-46.

- MONNET.V., et GRIPPON.J.C., (1994).

Métabolisme azoté des bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M. Bactéries Lactiques. Vol 1.

Lorica., 331-347.

- MONNET.V.,LEBARS.D., NEVIANI.E. et GRIPON.J.C., (1987).

Partial characterization and comparaison of cell wall proteases 5 strains of Streptococcus lactis.

Le Lait., 51-61.

- MOREAU.M.C., (2005).

Bactéries lactiques probiotiques et immunité. In LUQUET.F.M et CORRIEU.G., (2005)

Bactéries lactiques et probiotiques.

Lavoisier, Technique et Documentation ; 211-253

- MICHEL.V., et MARTLEY.F., (2001).

Streptococcus thermophilus. In cheddar cheese-production and fate of galactose.

Journal Draiy Reseach., 68, 317-325.

- MIETTON.B., DESMAZEAUD. M., DEROISSART.H et WEBER.F., (1994).

Transformation du lait en fromage. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M. Bactéries Lactiques. Volume 2.

Lorica., 55-133.

- MIETTON.B., (1995).

La typologie des fromages, Symposium organise par la Fondation des Gouverneurs et le Centre de recherche et le developpement sur les aliments d'Agriculture Agroalimentaire Canada., octobre, 245p

- MOLINARD.P., LESSCHAEVE.I., BOUVI.I.,VASSAL.L.et SCHLICH.P., (1994).

Amertume et fraction azotées de fromages à pâte molle de type Camembert.

Le Lait., 74, 361-369.

- MORISSET.D., BERJEAUD.J.M., FRERE.J. et HECHARD.Y., (2005).

Bactériocines de bactéries lactiques. In LUQUET.F.M et CORRIEU.G. Bactéries lactiques et probiotiques.

Lavoisier, Technique et Documentation ; 113-194.

- **MORSLI.A., BELLAL.M.M. et HAMMOUCHE.A., (1985).**

Etude du pouvoir coagulant sur le lait de quelques plantes locales.
Ann. Inst. Nat. Agro. Alger., 9, 63-70.

- **MORSLI.A., (1996).**

Recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus sarica* et du proventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère.
Thèse de Magistère. INA., 181.

- **NES.IF., DIEP.DB., HARVARSTEIN.LS., BRUBERG.MB., EIJSINKK.V. et HOLO.H., (1996).**

Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria.
Antonie Van Leeuwenhoek., 70; 113-128.

- **NOOR-DEVILLET.P.E., GIST6BROCADES.N.N. et DELFT.N.C.D., (1983).**

Les enzymes alimentaires : utilisation et innocuité.
Microb. Alim. Nut., 1, 1-5.

- **NOVEL.G., (1993).**

Les bactéries lactiques. In LEVEAU.J.Y., BOUIX.M., (1993): Microbiologie Industrielle: Les micro-organismes d'intérêt industriel. APRIA.
Edition Technique et documentation Lavoisier., 170-374.

- **ONO.H., YAMAMOTO.N., MAENO.M., TAKANO.T., et MOMOSE.H., (1997).**

Purification and characterization of cell-wall associated proteinase of *Lactobacillus helveticus* CP53.
Milchwissenschaft., 52; 373-377.

- **ORTIZ.M.J., APODOCA.D., AMIGOL.L. et RAMOS.L., (1994).**

Study of the milk clotting and proteolytic activities of calf rennet fermentation produced chymosin.
Milchwissenschaft., 49; 13-16.

- **O'SULLIVAN.M. et FOX.F.F., (1990).**

Evaluated of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*.
Food biotechnology., 5; 19-23.

- **OZCALP.B., OZDEN.B., TUNNER.Y., SANLIBABA. et AKCELLE.M., (2007).**

Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products Turkey.
Le Lait., 87; 521-534.

- **PAPPA.E.C., KANDARAKIS.G.I., ZERFIRIDIS.K.G., ANIFANTAKIS.E.M., et SOTIRAKOGLOU.K., (2006).**

Influence of starter cultures on the proteolysis of Teleme cheese made from different types of milk.
Le Lait., 4; 273-290.

- **PAQUET.D., (1977).**

Etude d'une protéase acide produite par *Mucor meihei*.
Doctorat Biochimie Université. Nancy-France., 54-61.

- **PEDERSON. J.A., MILESKI. G. J., WEIMER.B. C., et STEELE.J .L., (1999).**
Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.
Journal of bacteriology Vol.181, N°15., 4592-4597.
- **PERCHERON.F., PERLES.R. et FOGLIETTI.M.J., (1991).**
Les enzymes. In Biochimie Structurale et Métabolique.
Edition MASSON., édition Paris.
- **PETRANXIENNE.D., et LAPIED.L., (1981).**
Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers.
Edition Technique Documentation., 224.
- **PETRY.S., FURLAN.S., CREPEAU.M.J., CERNING.J. et DESMAZEAUD.M., (2000).**
FACTORS AFFECTING EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* grown in a chemically defined medium.
Appl. Env. Microbiol., 66 ; 3427-3431.
- **PIEN.J. (1974).**
Etude de la coagulation du lait par la présure.
La Techniques Laitière., 819,21-29.
- **PIVITEAU.P., CALLAGHAN.J.O., LYONS.B., CONDON.S. et COGAN.M.T., (2002).**
Characterisation of the stimulants produced by *Lactobacillus helveticus* in milk for *Propionibacterium freudenreichii*.
Le Lait., 82 ; 69-80.
- **POQUET.I., BOLOTIN.A., et GRUSS.A., (2001).**
Optimisation de la production de protéines hétérologues exportées chez *Lactococcus lactis* par inactivation de HtrA, son unique protéase de ménage de surface.
Le Lait., 81 ; 37-47.
- **POUGHEON.S et GOURSAUD.J (2001).**
Le lait : caractéristiques physicochimiques in Lait, nutrition et santé.
Edition Technique et Documentation.
- **POULLAIN.F., (1994).**
Evolution des préparations commerciales de ferments lactiques. In DEROISSART.H., LUQUET.F.M : Les bactéries lactiques.vol2.
Edition Technique et Documentation Lavoisier., 495-498.
- **POZNANSKI.S., REPS.A.et DOWLASEWICZ., (1975).**
Propriétés coagulantes et protéolytiques de la protéase extraite de *Cersium arvense*.
Le Lait., 11; 669-682.
- **PREETHA.S., et BOOPATHY.R., (1997).**
Purification and characterisation of a milk clotting proteases from *Rysomucor meihei*.
W. J. Microb. Bio., 13, 573-578.
- **RAMET.J.P. et HARDY.J., (1973).**
Les enzymes coagulantes en fromagerie.
Technique du Lait., 4, 7-10.

- RAMET.J.P.et WEBER.F., (1980).

Contribution à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué.

Le Lait., 60; 1-13.

- RAMET.J.P., (1997b).

Les agents de transformation du lait. In ECK.A., GILLIS.J.C : Le fromage de la science à l'assurance qualité.

Edition Technique et documentation, Lavoisier., 334-364.

- RAMMAN.AM., (1994).

Rabbit pepsin as a rennet substitute.

Minu. J. Agric. Res. Dev. Egypt., 1685-1690.

- RAO.K et MATHUR.D.K., (1979).

Assesment of purified bacterial milk clotting enzyme from *Bacillus substilis* -26, for cheddar cheese making.

Journal of Fermentation., 62, 378-383.

- REPS.A. et POZNANZKI., (1979).

Main properties of milk coagulating preparation of microbial origin.

Milchwissenschaft., 30, 2, 65-68.

- RICHARDSON.G. et CHAUDAR.R., (1970).

Difference between clf and adult bovine rennet.

Journal . dairy. Research., 1367-1370.

- ROGINSKI H.,(1988).

Fermented milks.

The Australian journal of dairy technology., Novembre., 37-46.

- ROSEIRO.M.D., (1991).

Ewe's milk cheesmaking in Portugal using a vegetal rennet.

Dairy News., 74-75.

- ROTINI.O.T. et SEQUI.P., (1972).

Recherche sur l'enzyme coagulante de l'*Endothia parasitica*.

Ann., Inst. Agric., 21, 367-369.

- SAFARIK.I., (1984).

Rapid isolation of micrbial protease.

J. of Chromat., 531-533.

- SANDINE W. E., ELLIKER P.R., et HAYS H.R., (1962).

Cultural studies on *Streptococcus diacetylactis* and other members of the lactic Streptococcus group.

Can . J. Microbiol., 8, 161-174.

- SCHMIDT. D.J et PAYEN. T. A. J., (1980).

Micellar aspects of casein. In surface and colloid science.

Edition. E. Mtijevic.9. Wiley, New-York.

- SCHMIDT. J.L., TURNER.C., et LENOIR.J., (1994).

Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. In "Bactéries lactiques".
Volume 2.

Edition. Loriga Lavoisier., 37- 54.

- SHAMSUZZAM.K et HAARD.N.F., (1985).

Coagulation du lait et aptitude en technologie fromagère d'une enzyme analogue à la chymosine extraite de la muqueuse du phoque.

Journal. Food. Biochemistry., 9, 173-180.

- SHAHBAL.S., HEMME.D et DESMAZEAUD.M., (1991).

High cell wall-associated proteinase activity of some Streptococcus thermophilus strains (H-strains) correlated with a high rate in milk.

Le Lait., 71; 351-357.

- SHAKER.A. et BROWN.J.R., (1985).

Proteolytic milk clotting fraction in milk clotting preparation.

Journal Dairy Sciences., 68, 1939-1942.

- SHARMA.S.C. et MATHUR.B.N., (1988).

Perspectives in biotechnology engineering fermented systems and processes.

Indian dairy man ., 40, 671-675.

- SIMOVA.E et BESKOVA.D., (2007).

Effect of growth phase and growth medium on peptidase starter lactic acid bacteria.

Le Lait., 87; 555-573.

- SLIMANL.N., NORAT.T., HIETANEN.E., VAINIO.H., et RIBOLIE., (2001).

Lait et cancer. In DEBRY : Lait, nutrition et santé.

Edition Technique et Documentation.

- SMEDS.A., VARMANEN.P., PALVA., (1998).

Molecular characterization of a stress-inducible gene from Lactobacillus helveticus.

J. Bacteriol., 180; 6148-6153.

- SMEETS.S.R., (1995).

Enzyme coagulation.

Dairy technology pappers ., 14-16.

- STEFANITSLD et GAREL .G.R., (1997).

A zinc-dependent proteinase from the cell-wall of L actobacillus delbrueckii subsp bulgaricus.

Lett . Appl. Microbiol., 24, 180-184.

- ST-GELAIS.D et TIRARD-COLLET.P., (2002).

Fromage.

In Science et technologie du lait. Fondation de Technologie Laitière du Québec inc.

Presses internationales POLYTECHNIQUE.

- ST-GELAIS.D et HACHE.S., (2006).

Growth of proteinase-positive and proteinase-negative lactococci strains in reconstituted goat and cow milks.

Le Lait.,5 ; 373-386.

- **STILES.M., et HOLZAPFEL.W., (1997).**

Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.
Int.food.J.microbiol., 36, 1629.

- **TAILLIEZ. P., (2001).**

Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années.
Le Lait., 81 ; 1-11.

- **TALON.R. et MONTEL.M.C., (1994).**

Activités estérases et lipolytiques des bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M. Bactéries Lactiques. Vol 1.
Lorica., 349-352.

- **TARODO DE LA FUENTE.B., LABLEE.J., et CUQ.J.L., (1999).**

Le lait coagulation et synérèse.
Industries Alimentaires et Agricoles., 116, 19-26.

- **TAWARI.B.D. et CHAKRABORTY.B.R., (1988).**

Curd forming properties of microbial rennets.
Ind. J. Dairy. Scien., 44, 462-466.

- **THOMPSON.J. et CENTRY-WEEKS.C.R., (1994).**

Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In DEROISSART.H et LUQUET.F.M. Bactéries Lactiques. Vol 1.
Lorica., 239-290.

- **TOURNEUR. C., (1972).**

Aptitude à la protéolyse des lactobacilles présents dans les fromages et les lactosérums de fromagerie.
Le Lait., 513-514, 149-172.

- **TSOULI.J., (1974).**

Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara scolymus* sur la coagulation du lait.
Le Lait., 541-542, 415-417.

- **VANINGELGEM.F., ZAMFIR.M., MOZZI.F., ADRIANY.T., VANCANNETY.T.M., SWINGS.J. et DE VUYS.L , (2004).**

Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics.
Appl. Env. Microbiol. 70 ; 900-912.

- **VASSAL.C. et GRIPON.J.C., (1984).**

L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert.
Le Lait., 64, 397-410.

- **VERISSIMO.P., ESTEVEZ.C., FARO.C. et PIERS.E., (1995).**

The vegetebal rennet of *Cynara cardunculus* . L. containtstwo proteinases with chymosin and pepsine like specifities.
Biotechnology letters., 621-625.

- **VIGNOLA. CAROLE. L., (2002).**

Science et technologie du lait. Transformation du lait.

Fondation de technologie laitière du Québec inc. Presses internationales polytechnique.

- **VISSER.S., EXTERKATE.F., SLANGEN.C. et DEVEER.G., (1986).**

Comparative study of action of cell wall proteinase from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine κ -s1- κ - and κ - caseins.

Appl. Environ. Microbiol., 52, 1162-1166.

- **VRINAUD.Y., (1982).**

Les ferments lactiques dans les industries. Importance dans la flore intestinale. Supplémentation des aliments d'allaitement en culture de ferments lactiques. Les ferments lactiques chez l'homme.

Industries Alimentaires et Agricoles., Janvier., 147-160.

- **WAHBA.A. et EL-ABBASSY.F., (1989).**

Bitterness in Ras cheese made with soluble and immobilized calf rennet and *Mucor meihei*. Egyptian J. dairy. Sciences., 17, 207-211.

- **WEBER.F., (1990).**

L'égouttage du coagulum. In ECK.A : Le fromage.

Edition Technique et Documentation Lavoisier., 22-34.

- **WILKINSON.M.G., (1993).**

Acceleration of cheese reopening . In FOX.P.Fed. Cheese chemistry physic and microbiology. Chapman and Hall.

London., 523-530.

- **WINGLEY. R.C., (1996).**

Cheese and whey in industrial enzymology.

Second edition. Chapitre. 27. Edition Godfreyand wiest., 135-142.

- **YAMAMOTO.N., AKINO.A. et TAKANO.T., (1993).**

Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790.

J. Biochem., 114, 740-745.

- **YANG. w.p., KOBAYASHI.H. et KUSAKABE.I., (1987).**

Purification and characterisation of soymilk –clotting enzymes from *Bacillus sp* K-2956-7.

Agri. Bio. Chem., 2343-2349.

- **ZEVACO.C., GRIPON.J.C., (1988).**

Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*.

Le Lait., 68, 393-408.

- **ZOURARI A., et DESMAZEAUD M.J., (1991).**

Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux Grecs. I. Souches *Lactobacillus delbrueeiki ssp bulgaricus* et culture mixte avec *Streptococcus salivarius ssp thermophilus*.

Le Lait., 71, 463-482.

- **ZOURARI A., ACCOLAS J.P et DESMAZEAUD M.J., (1992).**

Métabolisme and biochemical characteristics of yogourt bacteria. Le Lait ., 72, 1-34.

Annexes

Annexe1

1. Composition des milieux de cultures

- Gélose MRS

Poly peptone.....	10,00g
Extrait de levure.....	10,00g
Extrait autolytique de levure.....	5,00g
Glucose.....	20,00g
Tween 80.....	1,00ml
Phosphate dipotassique.....	2,00g
Acétate de sodium.....	5,00g
Sulfate de magnésium.....	2,00g
Sulfate de manganèse.....	0,05g
Agar agar bactériologique.....	5,00g
Eau distillée.....	1000,00ml

Ajuster le pH à 5,4
Stérilisation à 120°C pendant 20mn

- Bouillon MRS

Même composition que la gélose MRS, sans addition d'agar.
Ajuster le pH à 5,4 pour Lactobacillus et à pH 6,2 pour les Leuconostocs.
Stérilisation à 120°C pendant 20mn

- Gélose M17

Tryptone.....	2,50g
Peptone pepsique de viande.....	2,50g
Peptone papaïque de soja.....	5,00g
Extrait autolytique de levure.....	2,50g
Extrait de viande.....	5,00g
Lactose.....	5,00g
Glycérophosphate de sodium.....	19,00g
Sulfate de magnésium.....	0,25g
Acide ascorbique.....	0,50g
Agar agar bactériologique.....	15,00g
Eau distillée.....	1000,00ml

Ajuster le pH à 7,1-7,2.
Stérilisation à 120°C pendant 20mn.

- Bouillon M17

Même composition que la gélose M17, sans addition d'agar.
Ajuster le pH à 7,2.
Stérilisation à 120°C pendant 20mn.

- Milieu de MAYEUX, SANDINE et ELIKER

- Milieu de base

Tryptone.....	10,00g
Extrait de levure.....	5,00g
Saccharose.....	100,00g
Citrate de sodium.....	1,00g
Glucose.....	5,00g
Gélatine.....	2,50g
Agar agar bactériologique.....	15,00g
Eau distillée	1000,00ml

- Milieu complet

A la gélose de base ajouter une solution d'azothydrate de sodium

Solution d'azothydrate

Azothydrate de sodium.....	1,00g
Eau distillée.....	100,00ml

- Milieu GIBSON et ABDELMALEK

Préparation de trois milieux de base

*lait écrémé à 10 %(p/v).....	800 ml
*gélose nutritive ordinaire.....	200 ml
*jus de tomate à pH6,5.....	100 g
Glucose.....	50 g
Extrait de levure.....	2,50g

- Gélose hecktoen

Proteose peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfite de sodium.....	5g
Sels biliaires.....	9g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuschine acide.....	0,1g

Bleu de bromothymol.....0,005g
Agar14g
Eau distillée.....1000ml
pH=7,5

- Plat Count Agar (PCA)

Tryptone5g
Extrait de levure.....2,5g
Glucose1g
Agar5g
Eau distillée.....1000ml
pH=7

- Baird-Paker

Peptone tryptique de caséine.....10g
Extrait de viande.....5g
Extrait de levure.....2g
Pyruvate de sodium.....10g
Glycocolle.....12g
Chlorure de lithium.....5g
Agar.....14g
Eau distillée.....1000ml
pH=7,2

- BLBVB (bouillon lactosé bilié au vert brillant)

Peptone bactériologique.....10g
Bile de bœuf20g
Lactose.....10g
Vert brillant.....0,0133g
Eau distillée.....1000ml
pH=7,2

- Gélose esculine

Tryptone.....20g
Extrait de levure.....5g
Glucose1g
Na Cl.....5g
Citrate de fer ammoniacale.....0,5g
Citrate de sodium.....1g
Azide de sodium.....0,15g
Sulfate de kanamycine.....0,02g
Agar.....10g
Eau distillée.....1000ml

- Eau physiologique ou eau physiologique tryptone (TSE)

Na Cl.....8 à 9g
Eau distillée.....1000ml
Tryptone1g

- Lait tournesolé

Lait écrémé reconstitué à 10%(p/v).....1000ml
 Teinture de tournesol 4%(p/v).....10ml
 Milieu réparti en tube et tyndallisé

- Lait écrémé reconstitué

Poudre de lait écrémé.....100g
 Eau distillée.....1000ml

- Lait écrémé reconstitué enrichi

Poudre de lait écrémé.....100g
 Extrait de levure..... 3g
 Eau distillée.....1000ml

- Milieu à l'arginine

Tryptone.....5g
 Extrait de levure.....2,5g
 Glucose.....0,5g
 Phosphate dipotassique.....2g
 L'arginine chlorydrate..... 3g
 Eau distillée.....1000ml
 pH=7

- Milieu Rothe

Hydrolisat trypsine de caséine12,6g
 Peptone bactériologique.....8g
 Glucose5g
 Chlorure de sodium.....5g
 Phosphate dipotassique.....2,7g
 Phosphate monopotassique.....2,7g
 Azide de sodium.....0,2g
 Eau distillée.....1000ml
 pH final :6,8+-0,2

- Milieu de LITSKY

Peptone.....20g
 Glucose5g
 Chlorure de sodium.....5g
 Phosphate dipotassique.....2,7g
 Phosphate monopotassique.....2,7g
 Azothydrate de sodium.....0,3g
 Ethyle violet.....0, 0005g
 Eau distillée..... 1000ml
 pH final :6,8+-0,2

2. Réactifs

- Réactif de Neessler
 - Iodure de potassium.....70,00g
 - Iodure de mercure.....100,00g
 - Potasse.....100,00g
 - Eau distillée.....1000,00ml
- SoudeN/9
 - NaOH.....4,44g
 - Eau distillée.....1000,00ml
- Carbonate de sodium
 - NaCO₃.....15,00g
 - Eau distillée.....100,00ml
- Acide trichloracétique
 - Acide trichloracétique12,00g
 - Eau distillée.....100,00ml
- Réactif de Folin
 - Tungstate de sodium100g
 - Molybdate de sodium25g
 - Ces deux éléments sont mélangés dans 700ml d'eau distillée auquel on ajoute
 - Acide phosphorique à 85%.....50ml
 - Acide chloridrique concentré.....100ml
 - Le mélange est porté à ébullition sous le reflux pendant 10 heures, puis sont ajoutés 150g de sulfate de lithium et quelques gouttes de brome.
 - Le mélange est porté de nouveau à ébullition durant 15 minutes, après refroidissement il est complété à 100ml avec de l'eau distillée.
 - Le réactif est conservé à l'abri de la lumière.
- Réactif de Kovacs
 - Paradiméthyl amino-benzaldéhyde.....5g
 - Alcool amylique.....75ml
 - HCl pur.....25ml
- Réactif de Voges-Proskauer (VP)
 - VPI : hydroxyde de potassium.....40g
 - Eau distillée.....1000ml
 - VPII : alpha naphthol.....6g
 - Ethanol1000ml
- Tampon-tris-H (pH7)
 - Phosphate de sodium.....50mM
 - HCl-tris.....50mM
 - Saccharose.....20mM
 - CaCl₂.....50mM

Annexe 2

Tableau N°1 : Caractères différentiels des bactéries lactiques.

Caractères	Bâtonnets		Coques							
	Cb	Lb	Ae	Ec	Lc, Vg	Ln Oen	Pc	Sc	Tc	W
Tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance à 6,5 % NaCl	.	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance à 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	.	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9,6	-	±	+	+	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL

Cb = *Carnobacterium*
 Lb = *Lactobacillus*
 Ae = *Aerococcus*
 Lc = *Lactococcus*
 Vg = *Vagococcus*
 Ln = *Leuconostoc*

Oe = *Oenococcus*
 Pc = *Pediococcus*
 Sc = *Streptococcus*
 Tc = *Tetragenococcus*
 W = *Weissella*
 Ec = *Enterococcus*.

Tableau N°2 : Caractères distinctifs des bactéries lactiques.

Caractères	Lb		Sc, Lc, Ec	Pc	Cb	
	Ln	Hétérof.				Homof.
Morphologie	CB	B	B	C CB	C tétrades B	
Gaz à partir du glucose	+	+	-	-	-	(+)
Hydrolyse de l'arginine	-	±	-/+	- ou +	- ou +	+
Dextrane à partir du glucose	- ou +	-/+	-/+	-/+	-	-
Type d'acide lactique	D(-)	DI	D(-), DL, ou L(+)	L(+)	DL ou L(+)	L(+)

B = Bâtonnet Lb = *Lactobacillus* Sc = *Streptococcus* Pc = *Pediococcus*
 C = *Coccus* Ln = *Leuconostoc* Lc = *Lactococcus* Cb = *Carnobacterium*
 CB = Coccobacille Ec = *Enterococcus* Hétérof. = hétérofermentaire
 Homof. = homofermentaire

Tableau N°3 : Ecologie et habitat des bactéries lactiques

Genre	Habitat	Exemples d'espèces	Références
<i>Lactococcus</i>	Lait cru, lait caillé, végétaux frais, laits fermentés, rumen .	<i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Lactococcus lactis. subps lactis</i> <i>Lactococcus garviae</i> <i>Lactococcus plantarum</i>	Novel,1993 ; Langella et al, 2001 ; Romeo et al, 2001.
<i>Streptococcus</i>	Lait chauffé à 45 et 50C°,lait pasteurisé, produits laités , et se rencontre généralement, chez l'homme et les animaux	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Novel,1993 ; Burrus et al.,2001 ; Bascomb et Manafi, 1998.
<i>Enterococcus</i>	Sol, plante, lait et les produits laitiers et ils font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Novel,1993 ; Dellaglio et al, 1994.
<i>Leuconostoc</i>	Laits et produit laitiers, fruits,et légumes(betterave), végétaux en fermentation (choucroute).	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Novel,1993 ; Dellaglio et al, 1994 ; Bourel et al, 2001.
<i>Pediococcus</i>	Végétaux en décomposition, bière, vin, lait et produits laitiers, fromage.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus acidilactis</i> <i>Pediococcus damnosus</i>	Novel,1993 ; Stiles et al, 1997 ; Bascomb,1998 ; Walling et al , 2001.
<i>Vagococcus</i>	Poisson et eau douce	<i>Vagococcus fluvialis</i> <i>Vagococcus salmonarum</i>	Bascomb,1998 ; Stiles et al,1997.
<i>Carnobacterium</i>	Viande réfrigérées ,viande , viande de volaille,lait présentant une odeur de malt.	<i>Carnobacterim divergens</i> <i>Carnobacterium.</i> <i>Gallinarum</i>	Stiles et al ,1997 ; Euzeby , 2003.
<i>Lactobacillus</i> (mesophiles)	Lait, fromage ,lait fermenté, vin, Viande fraîche ou fermenté et font partie de la flore intestinal de l'homme ou des animaux.	<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Novel,1993 ; Stiles et al,1997 ; Romeo et al. 2001 ; Stentz et al , 2001.
<i>Lactobacillus</i> (thermophiles)	Laits fermentés, fromages fabriqués à une température supérieure à 40 °C.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus delbrueckii. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii .subsp lactis</i>	Amrane, 2001 Gouesbet et al ,2001 Lamarque et al,2001

Tableau N° 4: Tests d'identification des espèces et sous espèces du genre Lactococcus

Espèces	<i>lactis</i>				<i>raffinolactis</i>	<i>plantarum</i>	<i>garvieae</i>
	<i>lactis</i>	<i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>hordniae</i>			
Croissance à 40 °C	+	+	-	-	-	±	+
4 % NaCl	+	+	-	-	-	+	+
pH 9,2	+	+	-	.	.	.	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	+	±	-	+
Maltose	+	+	-	-	+	+	±
Sorbitol	-	-	-	-	-	+	-
Acétoïne	-	+	-	-	-	-	-
Citratase	-	+	-	-	-	-	-

Tableau N°5 : Divers types de bactériocines produits par les bactéries lactiques.

Bactériocines	Micro-organismes producteurs	Spectre d'inhibition
helvéticine J	<i>Lb. helveticus</i> 481	<i>Lb.</i>
lactocine 27	<i>Lb. helveticus</i> LP 27	<i>Lb.</i>
lactacine B	<i>Lb. acidophilus</i> N2	<i>Lb.</i> , <i>Cl. botulinum</i>
acidophilucine A	<i>Lb. acidophilus</i> LAPT1060	<i>Lb.</i>
bactériocine	<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb.</i>
bactériocine	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb.</i>
casécicine 80	<i>Lb. casei</i> B 80	<i>Lb.</i>
lacticine A	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1106 et 1107	<i>Lb.</i>
lacticine B	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1248	<i>Lb.</i>
brévicine 37	<i>Lb. brevis</i> B37	Bactéries lactiques
plantaricine SIK-83	<i>Lb. plantarum</i> SIK-83	<i>Lb.</i> , <i>Ln.</i> , <i>Pc.</i>
lactocine S	<i>Lb. sake</i> L45	<i>Lb.</i> , <i>Ln.</i> , <i>Pc.</i>
lactacine F	<i>Lb. acidophilus</i> 11088 (NCK 88)	<i>Lb.</i> , <i>Ec.</i>
diplococcine	<i>Lc. cremoris</i>	<i>Lc.</i>
nisine	<i>Lc. lactis</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B.</i> , <i>Cl.</i>
lactostrepcines	<i>Lc. lactis</i> et <i>Lc. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	<i>Lc.</i> , <i>Lb.</i> , <i>Ec.</i>
bactériocines	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
sakacine A	<i>Lb. sake</i> LB 706	<i>L. monocytogenes</i>
bactériocine	<i>Ec. faecium</i> NCIB 2699 et 2702	<i>Listeria</i> spp
bactériocine	<i>Leuconostoc.</i> UAL 14	<i>Listeria</i> spp
pédiocine PA-1	<i>Pc. acidilactici</i>	Bactéries lactiques <i>L. monocytogenes</i>
pédiocine ACH	<i>Pc. acidilactici</i> <i>St. aureus</i> ,	<i>Lb.</i> , <i>Ln.</i> , <i>Cl. perfringens</i> <i>L. monocytogenes</i>

Cl = *Clostridium*, B = *Bacillus*, Lb = *Lactobacillus*, Lc = *Lactococcus*, Ln = *Leuconostoc*, Ec = *Enterococcus*, Pc = *Pediococcus*, S = *Salmonella* L = *Listeria*.

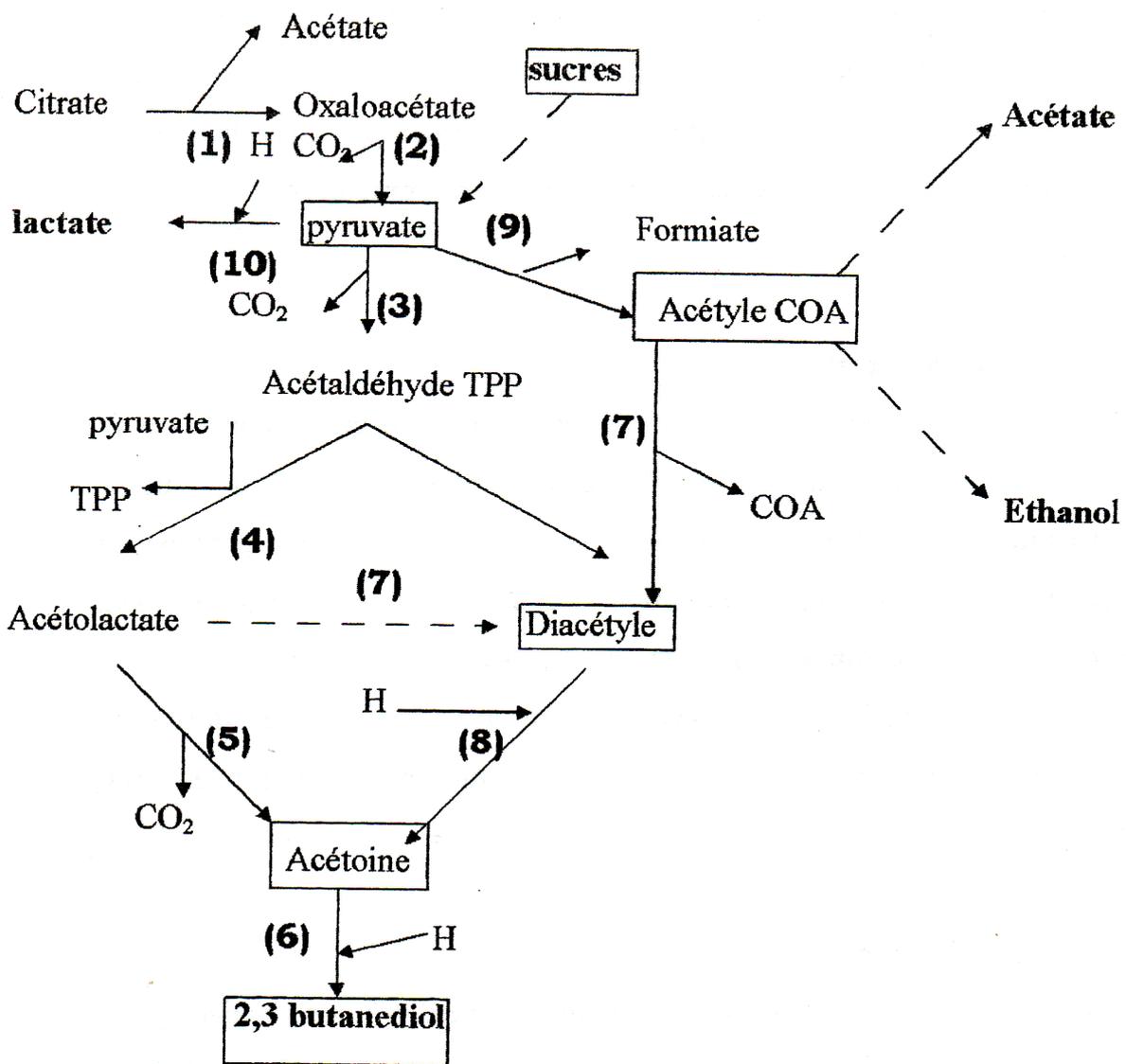


Figure N° 1 : Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques.

Résumé

Un screening sur 23 souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru et de ferments lactiques commercialisés a conduit à une sélection de quatre souches productrices de protéases coagulant le lait.

La culture des souches réalisée sur le lait écrémé UHT a montré que ce milieu était favorable pour la multiplication des bactéries lactiques. Ce milieu est également adapté à la recherche des protéases (activité protéolytique) chez ces bactéries, au vu de sa pauvreté en acide aminé et peptide libre.

L'extraction de protéases pariétales a été effectuée sur les cellules récupérées de biomasses en phase exponentielle cultivées en fermenteur sur du lait écrémé UHT. Cette extraction a été réalisée par l'utilisation de la centrifugation associée à l'action du lysozyme.

L'activité protéolytique chez les bactéries lactiques a été réalisée par le dosage de la tyrosine et les différentes fractions d'azote par la méthode de kjedhal. Les résultats ont montré des valeurs relativement élevées. En outre, la recherche de l'activité coagulante mesurée par la méthode de SOXHLET a montré des valeurs faibles. Sur les 9 extraits bruts testés, seule 4 extrait enzymatiques des souches des espèces suivantes : *Lc lactis subsp cremoris* (LcC3, LcC*) ; *Lb helveticus* (LbH3) et *Lb delbrueckii subsp bulgaricus* (LbB*) ont montré une activité maximale coagulante.

Les conditions optimales d'activité des 4 extraits enzymatiques bruts ont été déterminées. L'activité coagulante est maximale à un pH de 5,5 pour les extraits des souches LcC3, LcC* et LbB* et atteint son maximum à un pH de 6,5 pour LbH3. Le maximum de l'activité coagulante est obtenu avec une température optimale de 40°C chez LcC* et LcC3. Les extraits bruts des souches LbH3 et LbB* ont donné un maximum d'activité à des températures optimales de 50°C et 45°C successivement. L'influence de la concentration en CaCl₂ révèle un maximum d'activité enzymatique obtenu à 0,01M pour tous les extraits enzymatiques testés. L'extrait enzymatique brut qui présente une activité coagulante maximale (souche LcC*) montre une stabilité relative à un pH de 5,5 et lors de sa conservation à basse température.

Mots clé : bactéries lactiques, protéases, coagulases, sélection, caractérisation

Summary

A screening realised over 23 strains of lactic acid bacteria isolated from raw milk and milk enzymes sold commercially led to a selection of four producing protease strains coagulating milk. The culture of strains realised on UHT milk has shown that this medium was favourable for the multiplication of lactic acid bacteria.

This medium is also suitable for the research of bacterial proteases (proteolytic activity), since its poverty in amino acids and free peptides.

The Extraction of parietal proteases was carried out on cells got back from biomasses in exponential phase (of growth) grown in fermenters on UHT skimmed milk. This extraction was performed by the use of centrifugation associated with the action of the lysozyme.

The proteolytic activity among lactic acid bacteria was carried out by the determination of tyrosine and different fractions of nitrogen by kjedhal method. The results showed relatively high values. where as, the research of clotting activity measured by soxhlet method showed low values.

Of the 9 crude extracts tested, only 4 enzymatic extracts strains of the following species: *Lc lactis subsp cremoris* (LcC3, LcC*); *Lb helveticus* (LbH3) and *Lb delbrueckii subsp bulgaricus* (LbB*) showed a maximum activity clotting.

The optimal conditions for activity of the 4 raw enzymatic extracts were determined. The clotting activity is the highest at pH 5.5 for strains extracts LcC3, LcC* and LbB and reaches its maximum at pH 6.5 for LbH3. The maximum clotting activity was obtained with a temperature of 40°C for LcC* and LcC3. The crude strains extracts of LbH3 and LbB* gave a maximum activity at optimum temperatures at successively 50°C and 45°C. The influence of the CaCl₂ concentration reveals a maximum enzymatic activity obtained at 0.01M for all the enzymatic tested extracts.

The crude enzymatic extract which presents a maximum clotting activity (LcC* strain) shows a relative stability at pH of 5.5 and its preservation at low temperature.

Key words: acid bacteria, protease, clotting enzyme, selection, characterization.