

## SOMMAIRE

Liste des figures	i
Liste des tableaux	iii
Liste des abréviations	iv
Introduction	1
Analyse bibliographique	
1.1. Produits alimentaires artisanaux étudiés	4
1.1.1. Le « klila »	4
• fabrication de « klila »	5
• modes de conservation de klila	6
• modes de consommation et d'utilisations	6
1.1.2. L'abricot sec ou <i>Afermes</i>	8
• description de l'abricot	8
• méthode traditionnelle de séchage des abricots	10
1.1.3. Le blé fermenté « El Hamoum »	10
• production algérienne du blé	10
• fermentation des céréales :	10
• blé fermenté « El Hamoum » :	11
1.1.4. Couscous aux herbes	12
1.1.5. Miel	13
• types de miel	14
• composition du miel	14
• la fermentation du miel	16
1.2. La production alimentaire artisanale dans le monde et notamment en Afrique	17
1.3. La fermentation lactique de l'artisanal à l'industriel... !	19
1.4. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques	21
1.4.1. Habitats des bactéries lactiques	22
1.4.2. Position taxonomique actuelle des bactéries lactiques	23
1.4.3. Méthodes d'identification des bactéries lactiques	25
1.4.3.1. Méthodes phénotypiques	26
1.4.3.2. Méthodes génotypiques	29

• Ribotypage	30
• Polymorphisme de taille des fragments de restriction (AFLP)	30
• Méthodes de typage basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	31
• Analyse de restriction d'adn ribosomique amplifiée (ARDRA)	31
1.4.4. Le genre <i>Lactobacillus</i>	31
1.4.5. Le genre <i>Lactococcus</i>	37
1.4.6. Le genre <i>Enterococcus</i>	40
1.5. Activités d'intérêt biotechnologique des bactéries lactiques	42
1.5.1. Pouvoir acidifiant et métabolisme des sucres	43
1.5.2. Activité protéolytique des bactéries lactiques	47
1.5.3. Activité lipolytique et ésterasique des bactéries lactiques	50
1.5.4. Production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques	53
1.5.5. Production d'arôme par les bactéries lactiques	55
1.5.5.1. Métabolisme du citrate	56
1.5.5.2. Production de diacétyl	60
• Propriétés physicochimiques du diacétyl	60
• Production du diacétyl par les bactéries lactiques	60
• Principaux facteurs affectant la production de diacétyl et d'acétoïne	61
✓ Effet du pH	61
✓ Effet de la température	62
✓ Effet de l'oxygène	63
✓ Effet du citrate	63
✓ Effet des sucres	64
• Différentes utilisations du diacétyl	64
<b>Matériel et Méthodes</b>	
2.1. Echantillonnage et isolement des bactéries	66
2.1.1. Collecte des échantillons	66
2.1.2. Préparation des échantillons	66
2.1.3. Isolement et purification des souches bactériennes	66
2.2. Conditions de culture	66

<b>2.3.</b>	<b>Conservation des souches</b>	<b>66</b>
<b>2.3.1.</b>	<b>Conservation de courte durée</b>	<b>67</b>
<b>2.3.2.</b>	<b>Conservation de longue durée</b>	<b>67</b>
<b>2.4.</b>	<b>Pré-identification par étude morphologique, physiologique et biochimique des souches</b>	<b>67</b>
<b>2.4.1.</b>	<b>Etude morphologique</b>	<b>67</b>
<b>2.4.2.</b>	<b>Etude physiologique</b>	<b>67</b>
<b>2.4.2.1.</b>	<b>Croissance a différentes températures</b>	<b>67</b>
<b>2.4.2.2.</b>	<b>Test de thermorésistance</b>	<b>67</b>
<b>2.4.2.3.</b>	<b>Croissance à différents pH</b>	<b>68</b>
<b>2.4.2.4.</b>	<b>Croissance à différentes concentrations de NaCl</b>	<b>68</b>
<b>2.4.2.5.</b>	<b>Croissance sur lait bleu de Sherman</b>	<b>68</b>
<b>2.4.3.</b>	<b>Etude biochimique</b>	<b>68</b>
<b>2.4.3.1.</b>	<b>Etude du type fermentaire</b>	<b>68</b>
<b>2.4.3.2.</b>	<b>Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)</b>	<b>68</b>
<b>2.4.3.3.</b>	<b>Test de fermentation des sucres</b>	<b>69</b>
<b>2.5.</b>	<b>Identification des bactéries a l'aide de galeries biochimiques API50 CHL</b>	<b>70</b>
<b>2.6.</b>	<b>Identification des bactéries a l'aide des cartes VITEK2GP (biomerieux)</b>	<b>70</b>
<b>2.7.</b>	<b>Etude des caractéristiques technologiques des souches</b>	<b>72</b>
<b>2.7.1.</b>	<b>Mesure de l'acidité produite par les bactéries</b>	<b>72</b>
<b>2.7.2.</b>	<b>Recherche de l'activité protéolytique cellulaire</b>	<b>73</b>
<b>2.7.3.</b>	<b>Recherche de l'activite lipolytique</b>	<b>73</b>
<b>2.7.4.</b>	<b>Production d'exopolysaccharides (eps)</b>	<b>73</b>
<b>2.7.5.</b>	<b>Recherche de l'activite aromatique</b>	<b>73</b>
<b>2.7.5.1.</b>	<b>Recherche de l'acetoïne : (hydroxy-3-butanone-2 ou acetylmethyl-carbinol)</b>	<b>73</b>
<b>2.7.5.2.</b>	<b>Recherche de la citratase</b>	<b>74</b>
<b>2.8.</b>	<b>Identification des bactéries par MALDI-TOF</b>	<b>74</b>
<b>2.9.</b>	<b>Cinétique d'acidification</b>	<b>75</b>
<b>2.10.</b>	<b>Cinétique de croissance</b>	<b>75</b>
<b>2.11.</b>	<b>Dosage du glucose consommé</b>	<b>75</b>
<b>2.12.</b>	<b>Etude de la production de diacétyle</b>	<b>76</b>

<b>2.12.1. Optimisation de la production de diacétyle</b>	<b>76</b>
2.12.1.1. Recherche de la température optimale a la production de diacetyle	77
2.12.1.2. Recherche du pH optimum de la production du diacetyle	78
2.12.1.3. Recherche de la concentration optimale en glucose	78
2.12.1.4. Recherche de la concentration optimale en citrate	78
<b>2.12.2. Etude de la cinétique de croissance et de production de diacétyle</b>	<b>78</b>
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>3.1. Isolement et purification des souches bactériennes</b>	<b>80</b>
3.2. Pré-identification par étude morphologique, physiologique et biochimique des souches	80
3.2.1. Etude morphologique	80
3.2.2. Etude physiologique et biochimique	82
3.3. Identification des bactéries a l'aide de galeries API50 CHL et de cartes VITEK2GP (biomerieux)	87
3.4. Identification des bactéries par MALDI-TOF-MS	90
3.5. Etude des caractéristiques technologiques des souches	95
3.5.1. Activite acidifiante	95
3.5.2. Activite proteolytique cellulaire	101
3.5.3. Activite lipolytique extracellulaire	106
3.5.4. Production d'exopolysaccharides (EPS)	110
3.5.5. Activite aromatique	114
3.5.5.1. Utilisation du citrate	114
3.5.5.2. Recherche de l'acétoïne : (hydroxy-3-butanone-2 ou acetylmethyl-carbinol)	117
3.6. Cinétique d'acidification, de croissance et de consommation de glucose	119
3.7. Production de diacétyle	123
3.7.1. Dosage du diacétyle	123
3.7.2. Optimisation de la production de diacétyle	123
3.7.2.1. Effet de la temperature	124
3.7.2.2. Effet du pH	126
3.7.2.3. Effet du glucose	127
3.7.2.4. Effet du citrate	128

<b>3.7.3. Cinétique de croissance et de production de diacétyle</b>	<b>131</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>134</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>137</b>
<b>Annexe</b>	<b>190</b>

## Liste des figures

Figure 1: Le « Klila », fromage traditionnel algérien.....	4
Figure 2: Fabrication de « Klila » traditionnel .....	7
Figure 3: « Afermes » ou abricots secs.....	8
Figure 4: Abricots à maturité ; entier et en coupe.....	9
Figure 5: Formes typiques du « matmor » .....	11
Figure 6: Blé fermenté « hamoum ».....	12
Figure 7: Couscous aux herbes.....	12
Figure 8: Composition moyenne du miel .....	15
Figure 9: Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques en avril 2017.....	25
Figure 10: Schéma général pour l'analyse Maldi Tof-MS des isolats microbiologiques ionisés et du matériel clinique.....	29
Figure 11: Images au microscope électronique à balayage de certains lactobacilles.....	32
Figure 12: Voie glycolytique chez les bactéries lactiques.....	33
Figure 13: Voie des pentoses phosphates (fermentation hétérolactique) chez les bactéries lactiques.....	35
Figure 14: Applications des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie.....	43
Figure 15: Ingénierie métabolique pour la production du L-lactate, du D-lactate, du 2,3-butanediol et du 1,3-propanediol.....	46
Figure 16: Métabolisme du raffinose chez <i>Lc. lactis subsp lactis</i> .....	47
Figure 17: Représentation schématique de l'action des peptidases trouvées dans les bactéries lactiques .....	50
Figure 18: Mécanismes de synthèse des hétéropolysaccharides (HePSs), des homopolysaccharides (HoPSs) et du $\beta$ -glucane chez les bactéries lactiques.....	54
Figure 19: Représentation schématique de la voie métabolique stimulant la production d'arôme .....	56
Figure 20: Métabolisme du citrate par les bactéries lactiques .....	58
Figure 21: Schéma d'une carte du système Vitek.....	70
Figure 22: Automate Vitek2 Compact.....	71
Figure 23: Le MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltonic.....	75
Figure 24: Protocole du dosage de la somme du diacétyle-acétoïne.....	77
Figure 25: Aspect des colonies bactériennes sur milieu MRS.....	81
Figure 26: Observation microscopique des isolats après coloration de Gram.....	81
Figure 27: Caractères physiologiques de la souche MTK55 .....	85
Figure 28: Profil fermentaires des souches MTK.....	85
Figure 29 : Exemple de résultats du test d'identification sur carte Vitek.....	90
Figure 38: Spectres de masse des souches obtenus par MALDI-TOF-MS .....	91
Figure 30: Pouvoir acidifiant des souches.....	97
Figure 31: Pouvoir protéolytique des souches .....	102
Figure 32: Activité protéolytique sur MRS-lait (2%).....	103

Figure 33: Activité lipolytique sur milieu MRS privé de tween et additionné de 1% de matière grasse du lait.....	108
Figure 34: Pouvoir lipolytique des souches .....	109
Figure 35: Exemples de souches productrices d'EPS.....	112
Figure 36: Production de CO <sub>2</sub> par KTK9 cultivée en gélose au lait citaté.....	114
Figure 37: Production de l'acétoïne.....	118
Figure 38: Cinétique d'acidification, de croissance et de consommation du glucose pour la souche HMTK8.....	120
Figure 39: Cinétique d'acidification, de croissance et de consommation du glucose pour la souche HMTK21.....	121
Figure 40: Effet de la température sur la production du diacétyle. ....	124
Figure 41: Effet du pH sur la production du diacétyle.....	126
Figure 42: Effet de la concentration du glucose sur la production du diacétyle. ....	127
Figure 43: Effet de la concentration en citrate sur la production du diacétyle .....	129
Figure 44: Cinétique de la croissance bactérienne et production du diacétyle pour HMTK8.....	132
Figure 45: Cinétique de la croissance bactérienne et production du diacétyle pour HMTK21.....	132

Rapport-Gratifik.com

## Liste des tableaux

Tableau 1: Valeur nutritive pour 100 g d'abricot sec .....	9
Tableau 2: Les composants mineurs du miel.....	16
Tableau 3: Exemples de la diversité des fermentations alimentaires sur le continent africain .....	18
Tableau 4: Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques .....	24
Tableau 5: Les Lactocoques dans les produits laitiers fermentés .....	39
Tableau 6: Propriété physique du diacétyle.....	60
Tableau 7: Niveaux de confiance pouvant être associés à un résultat d'identification avec la carte Vitek2 GP. ....	72
Tableau 8: Préparation de la gamme étalon pour le dosage du glucose.....	76
Tableau 9: Caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques isolées de différents produits artisanaux. ....	83
Tableau 10: Profil fermentaire des souche .....	88
Tableau 16: Résultats de l'identification par MALDI-TOF-MS.....	91
Tableau 11: pH final du milieu.....	99
Tableau 12: moyenne $\pm$ standard de déviation de l'acidité produite durant les différents essais ( $^{\circ}$ D) .....	100
Tableau 13: Diamètre des zones de protéolyse durant les différents essais .....	105
Tableau 14: Rapport du halo clair sur le diamètre de la colonie (h/c) .....	106
Tableau 15: Souches productrices de citratase .....	115
Tableau 17: Paramètre d'état des cultures .....	120
Tableau 18: paramètres de croissance des cultures en conditions optimale de la production du diacétyle. ....	133

## Liste des abréviations

°D : degré Dornic  
g, mg : gramme, milligramme  
h : heure  
ml, µl : millilitre, microlitre  
M, mM : mole, millimole  
N : normale  
ADP, ATP : adénosine diphosphate, adénosine triphosphate  
AFLP : polymorphisme de taille des fragments de restriction  
ARDRA : analyse de restriction d'ADN ribosomique amplifiée  
BCP : Porpre de bromocrésol  
DNS : acide 2-hydroxyde-3,5-dinitrobenzique  
DO : densité optique  
*En.* : *Enterococcus*.  
*Lc.* : *Lactococcus*  
*Lb.* : *Lactobacillus*  
*Ln.* : *Leuconostoc*  
*St* : *Streptococcus*  
HCl : acide chloridrique  
min : minutes  
v/v : volume par volume  
nm : nanomètre  
*O* : *Oenococcus*  
°C : degré Celsius  
p/v : poids par volume  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
ppm : partie par million  
EPS : exopolysaccharides  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADH : arginine dihydrolase.  
ssp : sous espèce

L'Algérie est un pays de traditions culinaires jalousement conservées et de plus en plus remises au goût du jour. Le cas de plusieurs produits artisanaux tels que *Afermes*, *Klila*, couscous aux herbes, *hamoum*, encore consommés de nos jours illustre parfaitement le propos. Il en est de même pour les produits fermentés, qui étaient jusqu'à une date récente fabriqués en milieu rural, principalement pour l'autoconsommation, par fermentation spontanée de différents substrats (laits, céréales, fruits, ...). Ce savoir traditionnel ancestral est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuse pour les chercheurs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base d'aliments naturels sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques.

L'urbanisation a transformé les modes de production, rendant l'ajout de levains incontournable, et en premier lieu celui de levains lactiques. L'Algérie importe actuellement ses levains lactiques, qui ont un coût de revient élevé et qui n'ont pas été conçus pour fabriquer les produits fermentés traditionnels ; alors pourquoi ne pas essayer de réaliser nos propres levains adaptés à la fabrication des produits artisanaux traditionnellement consommés en Algérie ?

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré de dégrader les protéines et les lipides, mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés. La caractérisation des bactéries lactiques a favorisé le développement de souches bactériennes définies, connues sous le nom de levains ou de cultures starters. Elles remplacent de plus en plus depuis quelques décennies les mélanges non définis traditionnellement employés en industrie laitière (**Crow et al., 1994 ; Soomro et al., 2002**). Les ferments lactiques jouent un rôle technologique fondamental en transformation laitière et la recherche de nouvelles souches possédant des activités biologiques particulières est en pleine expansion dans le secteur de l'industrie laitière (**Zadi-Karam et al., 2004 ; Hassaine et al., 2008 ; Roudj et al., 2009 ; Belkheir et al., 2016 ; Boublenza et al., 2018**). Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les laits fermentés, les fromages, les olives fermentées, les saucissons, etc ...

Parmi ces applications, l'industrie laitière est sans doute le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (**Axelsson, 2004**). Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la

production de bactériocines et des protéines thérapeutiques. Ces bactéries inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs tels que les bactériocines et en abaissant le pH par la production d'un produit majeur, l'acide lactique (Ameen et Caruso, 2017).

Parmi les molécules aromatisantes produites par ces bactéries, on peut citer le diacétyl, qui est responsable du goût typique de noisette dans le beurre, dans les crèmes et certains laits fermentés. De ce fait, sa synthèse et son accumulation par voie microbiologique ont fait l'objet de nombreuses études afin de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes de régulation mis en jeu. Ces études ont été menées aussi bien à l'échelle de la cellule, avec l'étude du protéome et du métabolome, qu'au niveau du procédé avec la conception de modes de mise en œuvre adaptés. Afin d'augmenter la production de diacétyl, deux axes de recherche ont été explorés : le génie métabolique et le génie des procédés. Ainsi, depuis la dernière décennie de nombreuses équipes se sont intéressées à la sélection et à la production de souches surproductrices de diacétyl *via* la voie du génie génétique. Pour plusieurs souches, la totalité de la carte génétique a été identifiée et les résultats obtenus conduisent souvent à l'amélioration des performances. Néanmoins, des limitations subsistent, d'ordre réglementaire pour les mutagenèses non aléatoires, ou économique ou encore liées à la mauvaise image des microorganismes génétiquement modifiés dans l'esprit des consommateurs. En conséquence, la deuxième alternative consiste à identifier les meilleures conditions opératoires physico-chimiques favorables à la production de composés d'arômes et de les maîtriser tout au long du procédé et à choisir un mode de conduite adéquat. C'est la voie que nous avons choisi d'exploiter au cours de cette étude. Cependant, la mise en œuvre optimale de ce type de procédé demeure assez complexe. La multitude des variables opératoires (température, pH, concentration des substrats, ...), qui régissent le comportement métabolique et l'état physiologique des systèmes biologiques utilisés, rend difficile la maîtrise des bioprocédés.

Cette étude s'inscrit dans la thématique de recherche du laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie de l'université Oran1 dont l'objectif est l'élaboration de ferments lactiques à partir de souches de bactéries lactiques issues de diverses sources locales.

Dans un premier temps, après fermentation spontanée de différents produits artisanaux largement consommés, dont ceux mentionnés plus haut, la recherche de bactéries lactiques permettra de distinguer parmi celles-ci des souches pouvant exprimer des caractéristiques technologiques importantes et donc qui pourront être proposées pour des fins industrielles. La procédure déployée est l'étude de leurs caractéristiques métaboliques et technologiques. Ce plan d'expériences servira à définir les groupes bactériens largement répandus dans la majorité des produits du terroir et présentant des caractéristiques performantes, puis retenir les souches lactiques révélant le maximum de production de composés d'arôme.

Dans un second temps une analyse pertinente du comportement métabolique des souches bactériennes étudiées devra être réalisée afin de déceler les effets de divers facteurs expérimentaux (pH, température, concentration en glucose et en citrate) sur le métabolisme de la bactérie afin d'aboutir à une optimisation de la production de diacétyle.

## 1.1. Produits alimentaires artisanaux étudiés

Dans cette étude nous avons recherché des bactéries lactiques dans les produits artisanaux suivants : *Afermes* (abricot séché), *Klila* (produit laitier), couscous d'herbes, *hamoum* (blé fermenté) et miel toutes fleurs.

### 1.1.1. Le « Klila »

En Algérie, le « Klila » est le fromage traditionnel le plus populaire à la campagne, et sa méthode traditionnelle de fabrication est encore en usage de nos jours. Il y a une augmentation de la demande des consommateurs pour ce type de fromage, en raison de ses agréables propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Il existe des fromages similaires au « Klila » dans divers pays tel que le « Jameed » au Moyen-Orient et le « Chhanai » en Inde. Ils sont bien caractérisés et produits à l'échelle industrielle par des procédés continus utilisant l'atomisation et la lyophilisation (**Dharam *et al.*, 2007 ; Shaker *et al.*, 1999 ; Mazahreh *et al.*, 2008 ; Al Omari *et al.*, 2008**). Peu d'études ont été menées sur le fromage algérien « Klila », et il n'y a que peu de données sur leurs caractéristiques biochimiques et microbiologiques et sur les techniques de transformation. Le « Klila » (**figure 1**) est un fromage fermenté produit empiriquement dans plusieurs régions en Algérie. Il est fabriqué par chauffage modéré (55-75 °C) du « Lben » jusqu'à obtention d'un caillé (10-15 min). Le caillé est ensuite égoutté spontanément ou pressé à l'aide d'une pierre. Le fromage obtenu est consommé tel que, c'est-à-dire frais, ou après séchage où il est utilisé comme un ingrédient après réhydratation dans les préparations culinaires traditionnelles. Pratiquement, pendant le processus de transformation fromagère tous les procédés unitaires sont influencés par la température (maturation du lait, coagulation, égouttage et affinage), ainsi un lait à 20°C se déstabilise à pH 5, tandis qu'à 40°C, la déstabilisation se produit à pH 5.2 (**Gelais *et al.*, 2002**).



Figure 1: Le « Klila », fromage traditionnel algérien. (Kalbaza, 2018).

La composition chimique du « Klila » varie considérablement entre les différentes régions, et surtout en ce qui concerne la composition en matière grasse. Selon **Boubekri et Ohta (1996)** un échantillon avec une teneur de 138 g / kg peut être considéré comme un fromage allégé, alors qu'un autre avec une teneur de 210g / kg est inclus dans le groupe des fromages semi gras. Vu la teneur élevée en protéines et la teneur en eau très basse, le « Klila » peut être considéré comme un fromage extra dur avec une teneur en protéines élevée. Les microorganismes de « Klila » varient considérablement entre les régions (**Boubekri et Ohta, 1996**). Cela est dû aux conditions d'hygiène lors de la préparation et à la nature du lait utilisé pour la préparation qui est un lait non pasteurisé, et cela confirme que la fermentation spontanée du lait dépend des microorganismes, de l'environnement particulier et de la région dans laquelle il est produit.

- **Fabrication de « Klila »**

La **figure 2** montre le procédé de fabrication de « Klila » tel que réalisé dans les zones rurales où les familles disposent d'un élevage laitier et d'une production laitière abondante. Généralement la période de production du lait en excès est au printemps.

La population rurale est aussi connue par son activité de l'élevage des brebis, c'est ce qui explique qu'à l'origine la matière première de la fabrication de « Klila » était le lait de brebis. Le lait de chamelle, de chèvre ou de vache peuvent aussi être utilisés. Le procédé de fabrication comporte les étapes suivantes :

- **Préparation du lait acidulé traditionnel ou «Lben»** : la préparation du « Lben » débute par la coagulation en «Rayeb» suivi d'un barattage et d'un écrémage dans une peau de chèvre ou de brebis appelé «Chekoua». Pour obtenir cette Chekoua la peau de l'animal est tannée puis confectionnée sous forme de sac imperméable en nouant les différentes ouvertures, l'ouverture du cou de l'animal constituera le col ou la bouche de la « Chekoua ».  
L'écémage est réalisé généralement le matin ; la « Chekoua » est remplie à moitié de « Rayeb » puis tendue par gonflement. Ensuite, la « Chekoua » est bien nouée et secouée vigoureusement durant une demi-heure. La formation des globules gras (beurre) est jugée par le changement de son qui se produit à l'intérieur de la « Chekoua ». Pour aider l'agglomération des particules du beurre, de l'eau est habituellement ajoutée, chaude ou froide en fonction de la température du lait. Le beurre est retiré manuellement en une seule motte. Le petit lait restant selon ce procédé est appelé « Lben ».
- **Traitement thermique du Lben** : Le « Lben » subit un chauffage modéré pendant environ 10 à 20 minutes pour faciliter l'agglomération des caséines et la séparation du lactosérum, les températures de chauffage sont comprises entre 50 et 75°C.

- **Egouttage et pressage :** Le caillé obtenu après refroidissement à température ambiante est filtré dans une mousseline « chèche » jusqu'à égouttage complet. Dans certaines régions l'égouttage est amélioré par pressage à l'aide d'une pierre. La durée de l'égouttage varie selon la saison et peut aller d'une heure à une journée.
- **Découpage et séchage :** La masse obtenue après égouttage est découpée en petit cubes de 1 à 2cm d'arêtes pour augmenter la surface d'échange et faciliter le séchage. Ces cubes sont ensuite passés sur un tamis de 0.3 à 0.5 cm de porosité. Le produit fini sous forme de granules est exposé au soleil pour le séchage à l'abri des insectes (produit déposé généralement dans un tamis ou dans une mousseline) jusqu'à la dessiccation totale ; la durée de séchage varie selon les saisons et dure de 2 à 15 jours.

- **Modes de conservation de Klila**

La conservation de « Klila » peut durer plusieurs années à température ambiante; il est conservé sous forme de granules, après le séchage. Le « Klila » peut être aussi broyé et conservé sous cette forme. Il peut aussi être conservé sous forme de morceaux. Pour la conservation du fromage on utilise soit des sacs constitués de peau de chèvre ou de brebis appelé «Mezzouad» soit des jarres en poterie ou en verre.

- **Modes de consommation et d'utilisations**

Le fromage « Klila » peut être consommé frais ou utilisé sous forme sèche, pour assaisonner certaines sauces. Il améliore la qualité nutritionnelle de certains plats traditionnels à base de céréales comme le « Aich » et le « Couscous ». Le « Klila » peut avoir des applications thérapeutiques. Il a été utilisé depuis longtemps par les pèlerins lors de leurs voyages pour le traitement des diarrhées.

Bien que la conservation de « Klila » puisse aller jusqu'à plusieurs années à température ambiante, des altérations peuvent intervenir. Ces altérations sont essentiellement l'altération du goût qui devient rance à cause de la présence de la matière grasse ou celles causées par les attaques par les insectes.

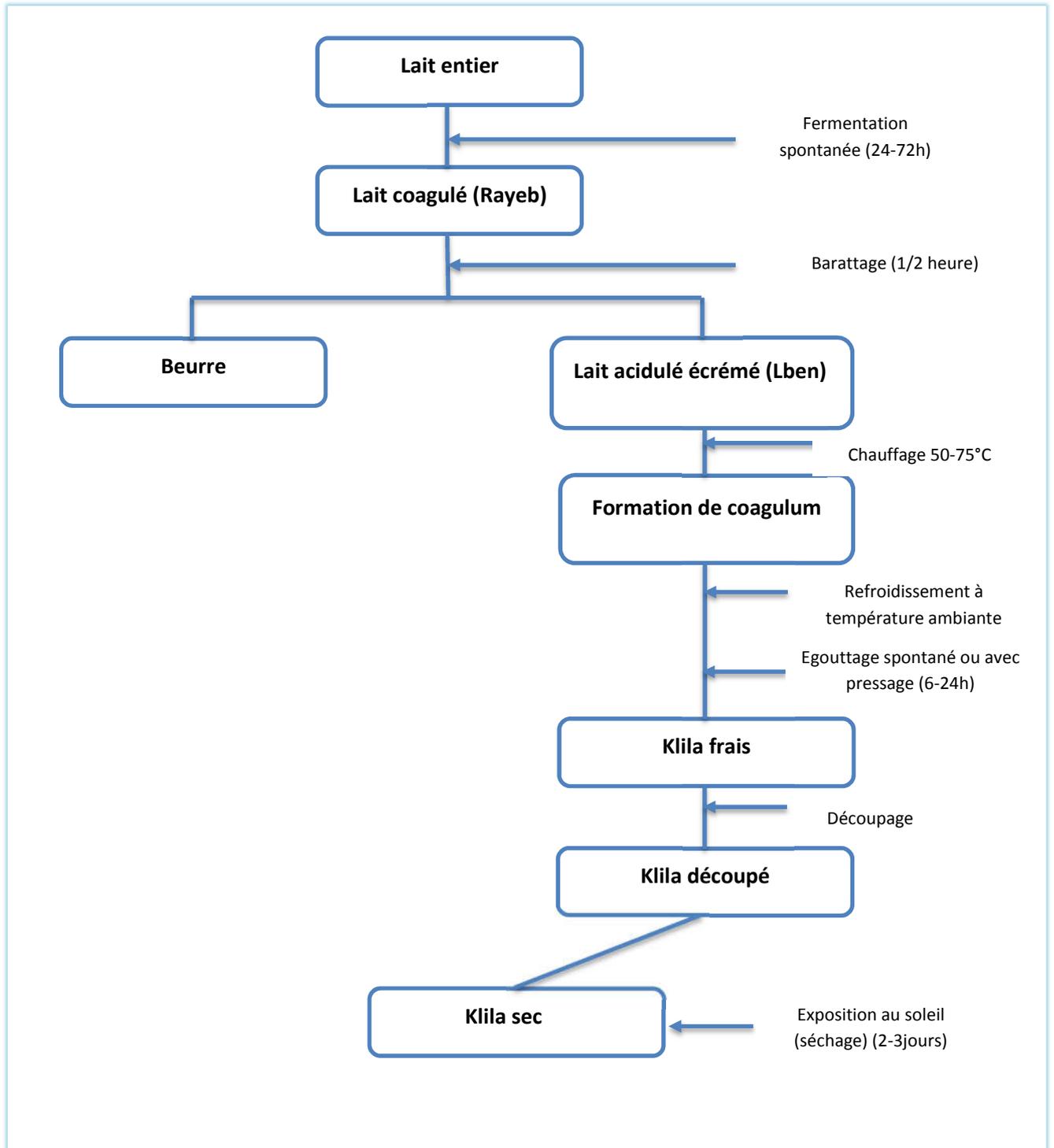


Figure 2: Fabrication de « Klila » traditionnel (Lahsaoui, 2009).

### 1.1.2. L'abricot sec ou Afermes

« Afermes » est le nom berbère le plus populaire donné aux abricots secs dans la région des Aurès en Algérie. Dans l'Ouest algérien, plus précisément dans la wilaya de « Tiaret », il est appelé « Hermes » ou « Fermes » en arabe parlé (**Figure 3**). On en met dans les soupes, en particulier si l'on manque de tomates. Sa méthode traditionnelle de fabrication est encore en usage de nos jours. L'abricot sec vient essentiellement de Turquie (goût de muscat, belle couleur), de Californie (peu sucré, goût acidulé), d'Australie (acidulé, parfois trempé dans un bain de sucre) ou d'Iran (de couleur jaune-pâle). L'abricot sec est largement consommé seul par les sportifs et les cosmonautes, ou associé comme dans nos recettes de « Tajines » en Algérie et dans tout le Maghreb, ou encore dans la région du « Ladakh » en Inde.



Figure 3: « Afermes » ou abricots secs. (Kalbaza, 2018)

- **Description de l'abricot**

L'abricotier (*Prunus armeniaca*) possède une place privilégiée dans la vie des agriculteurs en Algérie. Vu la superficie qu'il occupe et son importance dans le marché national, c'est l'espèce fruitière la plus cultivée devant le pommier, le poirier et le pêcher. L'abricot, fruit ou drupe de l'abricotier (**figure 4**), est caractérisé par une peau veloutée, une chair charnue, peu juteuse, sucrée, parfumée, de couleur jaune orangée. Il se sépare aisément en suivant le sillon médian.



**Figure 4: Abricots à maturité ; entier et en coupe.**

L'abricot peut être consommé frais, séché ou sous forme de jus, de marmelade et de confiture. Son contenu en fibres, en antioxydants et en plusieurs autres nutriments fait de l'abricot un fruit particulièrement intéressant pour la santé. Plusieurs études prospectives et épidémiologiques ont démontré qu'une consommation élevée de fruits diminuait le risque de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques. Les abricots contiennent différents antioxydants, particulièrement des flavonoïdes. Le contenu en antioxydants des abricots séchés serait plus élevé que celui des abricots frais (**Tableau 1**). L'abricot contient principalement du bêta-carotène, un caroténoïde contribuant largement à sa couleur orangée ainsi qu'une petite quantité de lycopène. Dans l'organisme, le bêta-carotène a la capacité de se transformer en vitamine A. L'abricot sec apporte des éléments essentiels comme les glucides vite utilisables, les vitamines du groupe B, du fer, du cuivre et du potassium (**Lahbari, 2015**).

**Tableau 1: Valeur nutritive pour 100 g d'abricot sec (Lahbari, 2015).**

Eléments nutritifs			
Eau : 29,4 g	Fibres : 5,70 g	Protéines : 3,14 g	Lipides : 0,80 g
Glucides : 53 g	Sucres : 40,5 g	Valeur énergétique : 271 g	
Sels minéraux et oligo-éléments			
Potassium : 1090 mg	Phosphore : 68,3 mg	Calcium : 61,2 mg	Magnésium : 36,5 mg
Sodium : 39 mg	Fer : 4,33 mg	Zinc : 0,295 mg	Cuivre : 0,306 mg
Vitamines			
Vitamine C : 1 mg	Vitamine B1 : 7,5 µg	Vitamine B2 : 67 µg	Vitamine B3 : 2690 µg
Vitamine B5 : 608 µg	Vitamine B6 : 157 µg	Vitamine B9 : 22 µg	Vitamine B12 : 0 µg
Bêta-carotène : 2160 µg	Rétinol : 0 µg	Vitamine E : 4000 µg	Vitamine K : 3,1 µg

- **Méthode traditionnelle de séchage des abricots**

Le séchage se fait traditionnellement par exposition des abricots au soleil sur le toit des maisons, à l'air libre pendant trois semaines. La période de séchage des abricots se déroule durant les mois de juin, juillet et août. Durant cette période, les données climatiques sont favorables au séchage. En effet, l'ensoleillement est d'environ 350 heures par mois (pour les mois de juin, juillet, août). C'est un système de séchage solaire peu coûteux et permettant une optimisation de la qualité des abricots secs.

### 1.1.3. Le blé fermenté « El hamoum »

- **Production algérienne du blé**

Depuis la naissance de l'agriculture, Les céréales et leurs dérivés constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins. En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière (**Djermoun, 2009**). Parmi toutes les espèces céréaliers, les blés sont considérés comme les produits alimentaires les plus importants pour la population algérienne, elles présentent à elles seules 73,6% de l'apport calorique globale et fournissent en moyenne 80% des protéines totales consommées (**Ait Kaki, 2008**).

- **Fermentation des céréales :**

Les produits fermentés à base de céréales présentent actuellement un intérêt scientifique particulier, car ils contribuent aux apports énergétiques et nutritionnels des populations. Ils sont élaborés à partir d'une variété de céréales donnant naissance à une grande diversité d'aliments à travers le monde. La fermentation naturelle des bouillies ou pâtes de céréales par les levures et les bactéries lactiques assure une augmentation des teneurs en vitamines et acides aminés, une amélioration de la digestibilité et de la qualité microbienne (**Doukani, 2013**). A la différence des baies et des fruits qui peuvent être rapidement consommées à l'état frais, les céréales peuvent être stockées mais doivent être préparées pour être agréables à consommer. Le stockage des grains est une opération complexe qui demande la prise en compte de multiples paramètres (température, humidité, etc.) lors des différentes étapes, entre la récolte et l'expédition (**Zouaoui, 2011**). Les premiers systèmes de stockage étaient de grands paniers faits de roseaux ou fioles d'argiles qui sont enfoncées dans le sol, ainsi que des puits, des structures de bois et des puits garnis de paille (**Druvefords, 2004**).

Le stockage souterrain des céréales est une des techniques largement utilisées en milieu rural dans plusieurs régions céréaliers du monde. Ce système ancestral est très bien connu pour les avantages qu'il présente : coût réduit, discrétion du stockage, réduction des

effets excessifs des variations extérieures de température, création d'atmosphère confinée et enfin limitation des risques de parasitisme (Bartali et Debbarh, 1991).

- **Blé fermenté « El hamoum » :**

Le blé est une plante herbacée annuelle appartenant à la classe des monocotylédones commélinoides, à la famille des Poacées ou Graminées et au genre *Triticum*. Il existe de nombreuses espèces de blé dont les deux principalement cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*). Le blé dur est utilisé principalement pour la fabrication des semoules. Celles-ci sont utilisées dans la fabrication des pâtes alimentaires sèches et du couscous. En Algérie, le blé dur était historiquement conservé dans des silos souterrains appelés « matmor » (figure 5).

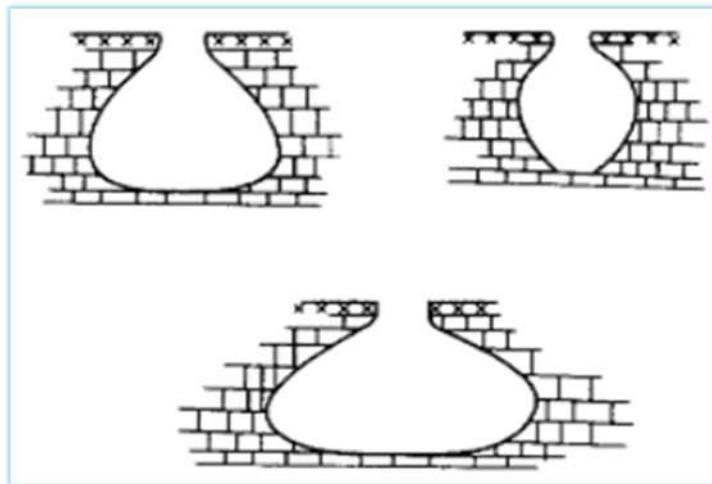


Figure 5: Formes typiques du « matmor ». (Bartali, 1987)

Dans le « matmor », la fermentation du blé est un phénomène naturel causé par les conditions de stockage, notamment par l'humidité suite aux fortes pluies qui favorisent l'infiltration de l'eau dans les parois du « matmor », l'augmentation progressive de la température en raison de la fermentation du blé et la faible présence d'air. Les phénomènes de fermentation d'origine microbienne peuvent durer plusieurs années ( $\leq$  neuf années).

Le goût du blé fermenté est entré dans les habitudes alimentaires pour la fabrication de pain de blé fermenté ou de couscous « lemzeiet », « elmechroub » ou encore « hamoum » (Mokhtari, 2012). Ce blé est caractérisé par une variété de saveurs, de textures et d'arômes particuliers très convoités par les consommateurs des régions spécifiques (Bekhouche *et al.*, 2013).

Historiquement utilisé contre certaines pathologies digestives et autres complications physiologiques, le blé fermenté traditionnel type « hamoum » (Figure 6) renferme des

microorganismes ayant des vertus nutritionnelles et diététiques bénéfiques pour la santé de l'intestin.



Figure 6: Grains de blé fermenté « hamoum ».

#### 1.1.4. Couscous aux herbes

En Algérie le couscous est une vraie institution, un savoir-faire ancestral qui se transmet de génération en génération. C'est l'une des pâtes alimentaires les plus antiques développées par les habitants indigènes (Berbères) de l'Afrique du Nord (Kaup et Walker, 1986 ; Debbouz et Donnelly, 1996 ; Ugrinovits *et al.*, 2004). Il est issu d'une longue histoire et porteur de signification profonde (Beji-Becheur, 2008). Plusieurs variétés de couscous existent en Algérie dont l'un est le couscous aux herbes (Figure 7).



Figure 7: Couscous aux herbes. (Kalbaza, 2018)

A la belle saison, l'engouement pour les plantes aromatiques augmente, leur usage s'inscrivait dans les pratiques saisonnières du temps où l'on vivait en symbiose avec la

nature. L'utilisation des herbes est loin d'être une fioriture culinaire. Elle relève d'une véritable médecine selon le concept « nourrir, c'est soigner ». Les « hchaouch » ou « hchaich » ou herbes médicinales constituent le fonds de la cuisine algérienne de tradition et sont utilisés pour la préparation d'un couscous d'herbes très particulier nommé aussi « hammama », qui, selon les explications locales, tirerait son nom de « hammam » à cause des grandes sudations qu'il provoque après sa consommation. Il a tout l'air d'être une fusion entre les savoir-faire berbère et andalous. La composition du bouquet destiné à la préparation de ce couscous diffère d'une cuisinière à l'autre. Il semble qu'il y en ait plusieurs versions, selon les vertus qu'on voudrait en tirer. On cherchera saisonnièrement dans une « hammama » de printemps une action dépurative, une immunité en prévision des agressions du froid en automne... Il y en aurait même pour les femmes en relevailles de couches ou des hommes déclinants. Ce plat ancestral est à base de semoule mélangée à des herbes sauvages comme le Halhal (lavande sauvage), Fliou (menthe pouliot), Timersat (marrube noir), Benaâman (coquelicot), Zeitra (thym), Aklil (romarin), souak ennebi ou m'rimiya (sauge)... On raconte que ce plat contenait jusqu'à 70 variétés de plantes et herbes lorsqu'il était préparé par les montagnardes. Toutes ces herbes sont soigneusement nettoyées, effeuillées et roulées avec de la semoule hydratée par l'eau salée à la main plusieurs fois, en ajoutant chaque fois une quantité de la semoule fine et parfois de la farine de blé dur. Dans certaines régions, la semoule grosse et les herbes sont antérieurement traitées à la vapeur d'eau avant de les passer à l'étape de l'hydratation. L'agglomérat est par la suite tamisé pour obtenir le couscous humide qui est ensuite précuit à la vapeur d'eau, émotté, calibré et séché à l'air libre.

#### **1.1.5. Miel**

Le miel est connu et employé depuis l'antiquité pour sa valeur nutritive et énergétique. L'Homme a ensuite accentué, de manière empirique, sa connaissance sur le miel, avec la découverte de propriétés cicatrisantes, antibactériennes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques ou encore antivirales.

La production algérienne de miel est encore fréquemment artisanale. Les ruches utilisées sont des ruches primaires avec des rendements considérés comme bas, de quelques kilos par ruche. On évoque à cet effet, le peu de moyens financiers des apiculteurs qui sont généralement des fellahs n'ayant pas forcément accès à la technologie, ni à l'achat de ruches modernes.

Le miel porte l'empreinte de son terroir, ce produit est un aliment énergétique de la ruche et une denrée fabriquée par les abeilles à partir du nectar et/ou du miellat. L'intervention de l'homme dans la fabrication de ce produit se situe "en amont" puis "en aval" de l'élaboration du miel par les abeilles : (i) en amont, du nectar au miel operculé, l'apiculteur intervient par la préparation des colonies et la mise en place du cheptel et (ii) en aval, du miel operculé au conditionnement, l'apiculteur intervient au niveau des procédés de

récolte, d'extraction, de conditionnement et de stockage. Cette conduite apicole implique une connaissance du cheptel, des conditions du milieu (sol, flore, climat).

- **Types de miel**

La détermination de l'origine géographique du miel repose sur l'analyse pollinique. En général, on admet qu'un miel provient principalement d'une certaine source de nectar lorsque le pollen correspondant est au stade dominant (**Chauvin, 1968**). Selon **Louveaux (1970)** les pollens représentent une preuve des plus sérieuses de l'origine botanique du miel. **Donadieu (1978)** signale que selon cette origine on distingue les miels monofloraux et les miels multifloraux.

Les miels dits « monofloraux » sont élaborés à partir d'une seule espèce végétale, qu'il s'agisse de miel de nectar ou de miellat. Ils sont relativement difficiles à obtenir car pour que les abeilles s'intéressent à une variété en particulier, il faut que sa floraison soit abondante et localisée sur une étendue suffisante. Pour qu'un miel soit considéré comme monofloral, il doit être composé à 80 % d'une même espèce végétale. Afin d'obtenir ce résultat, les ruches doivent être placées près de l'espèce végétale considérée, au cours de sa floraison, et la récolte doit avoir lieu dès la fin de la miellée.

Les miels multifloraux, comme leur nom l'indique, sont issus de plusieurs espèces végétales différentes, ils sont donc, en règle générale, désignés soit par leur origine géographique (région, massif, etc.) « Miel de haute montagne », soit par un type de paysage floral : « Miel de garrigue », « Miel de forêt ». On trouve également les appellations « Miel toutes fleurs » ou « Miel de printemps », qui se composent le plus souvent de colza mélangé à d'autres types floraux. L'origine florale d'un miel est importante car elle détermine les propriétés organoleptiques de celui-ci (couleur, goût, texture).

- **Composition du miel**

Le miel est un produit complexe (**figure 8**) riche de plusieurs centaines de composés à la fois d'origine végétale et animale. Sa composition chimique dépend de multiples paramètres : origine botanique et géographique, nature du sol, race d'abeille, état physiologique de la colonie, climat, conditions de récolte et mode de stockage (**Prost, 1987 ; Kaskoniené et al., 2010**).

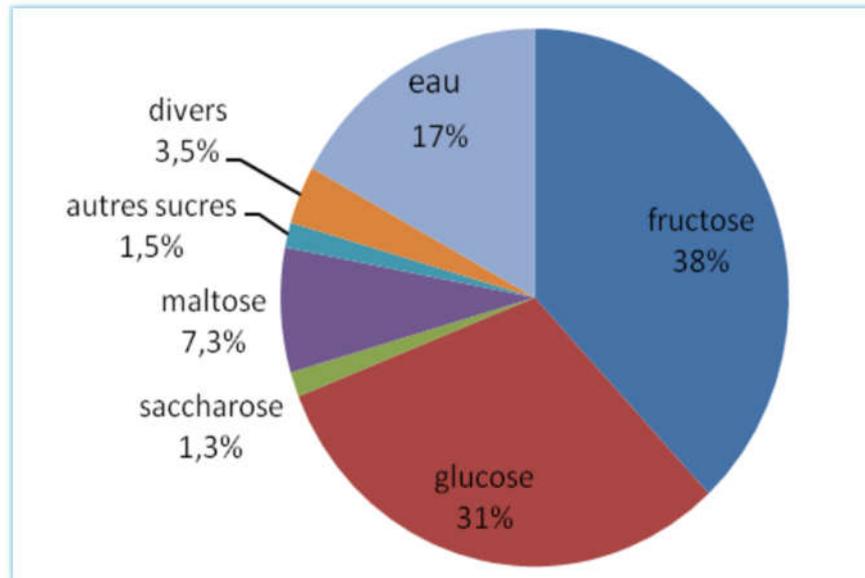


Figure 8: Composition moyenne du miel (Bruneau, 2002).

- **L'eau** : La teneur en eau des miels varie entre 14 et 25%. L'optimum se situe autour de 17%, car un miel trop épais est difficile à extraire et à conditionner, tandis qu'un miel trop liquide riche en eau risque de fermenter (Huchet et al., 1996).
- **Les hydrates de carbones** : D'après Louveaux (1968) les glucides représentent de 95 à plus de 99% de la matière sèche des miels. Une quinzaine de sucres différents ont été identifiés dans les miels par chromatographie, mais ils ne sont jamais tous présents simultanément. Parmi eux, on retrouve des monosaccharides avec en moyenne 31% de glucose et 38% de fructose (ou lévulose), des disaccharides comme le maltose (7,3%) et le saccharose (1,3%) et des tri et polysaccharides qui représentent 1,5 à 8% du total. On peut citer parmi eux : l'erlose (glucosylsucrose), le raffinose, le mélétoze, le kojibiose (diholoside constitué de deux unités de glucose reliées par une liaison osidique  $\alpha 1 \rightarrow 2$ ), le dextrantriose (isomaltotriose), le mélibiose etc.
- **Composants mineurs** : Ce sont des acides, protéines et aminoacides, vitamines, enzymes, minéraux. Ces différents éléments sont montrés dans le **tableau 2**.

La consommation de miel est donc un très bon complément à la ration alimentaire habituelle. Elle assure un meilleur équilibre en éléments vitaux indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Elle facilite la digestion et l'assimilation des autres aliments, débouchant globalement sur un meilleur métabolisme. Elle permet d'avoir une plus grande résistance à la fatigue physique et intellectuelle. Enfin, elle permet d'obtenir un meilleur rendement physique.

Tableau 2: Les composants mineurs du miel.

Acides 0,3%	Protéines Amino acides 0,4%	Vitamines	Minéraux 0,2%	Divers	Enzymes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide gluconique</li> <li>• A-acétique</li> <li>• A-citrique</li> <li>• A-lactique</li> <li>• A-malique</li> <li>• A-oxalique</li> <li>• A-butyrique</li> <li>• A-pyroglytamique</li> <li>• A-succinique</li> <li>• A-formique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matières albuminoïdes</li> <li>• Matières azotées</li> <li>• Traces : Trypsine Leucine Histidine Alamine Glycine Méthionine A-Aspartique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thiamine</li> <li>• Riboflavine</li> <li>• Pyridoxine</li> <li>• A. pantothénique</li> <li>• A-ascorbique</li> <li>• A-nicotinique</li> <li>• Biotine</li> <li>• A-folique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcium</li> <li>• Chlore</li> <li>• Cuivre</li> <li>• Fer</li> <li>• Magnésium</li> <li>• Manganèse</li> <li>• Phosphore</li> <li>• Potassium</li> <li>• Silicium</li> <li>• Sodium</li> <li>• Soufre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esters volatiles</li> <li>• Acétylcholine</li> <li>• Pigments</li> <li>• Colloïdes</li> <li>• Facteur antibiotique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invertase</li> <li>• Amylase</li> <li>• Catalase</li> <li>• Phosphatase</li> <li>• Gluco-oxydase</li> </ul>
Huchet et al. (1996)	Khenfer et Fettal. (2001)	Louveaux (1968)	Donadieu. (1978)	Khenfer et Fettal. (2001)	Louveaux. (1985)

#### • La fermentation du miel

Tous les miels naturels contiennent des levures, responsables des fermentations alcooliques. Une teneur en eau trop importante (à partir de 18%) et une température excessive leur permettent de se développer, ce qui provoque la fermentation du miel. D'autres micro-organismes présents dans le miel peuvent engendrer différentes fermentations (lactique, butyrique, acétique, etc.). Toutes ces fermentations altèrent fortement les miels qui possèdent alors une acidité supérieure à la normale (**Rossant, 2011**), et comme tout produit d'origine animale, le miel possède une flore microbienne qui lui est propre. Elle fait partie intégrante du produit et dépend de ses propriétés physico-chimiques. Elle est représentée par la flore mésophile totale (bactéries qui croissent à des températures comprises entre 25 et 40°C), des levures banales et des levures osmophiles. La flore mésophile totale est sans pouvoir pathogène pour l'homme et n'a pas d'action néfaste sur le miel. Elle est constituée presque exclusivement de *Bacillus* qui sont souvent retrouvés sous forme de spores. Les levures banales sont constituées de champignons filamenteux du genre *Aspergillus*, les levures osmophiles qui sont des champignons capables de se développer dans des environnements très concentrés en sucre, c'est à dire à pression osmotique élevée. Parmi elles, il y a *Saccharomyces* qui est l'agent de la fermentation alcoolique et qui altère la conservation du miel. Ces levures proviennent des pattes, langues et jabots des abeilles, et des pollens et nectars floraux. On peut tolérer un seuil de levures allant jusqu'à 100 germes par gramme; au-delà, le miel risque de fermenter. Le miel peut également être contaminé

au cours des manipulations par l'homme notamment pendant ou après l'extraction, ou par l'air et la poussière. Il peut s'agir de contamination entérique, les germes incriminés sont alors des coques à Gram positif, comme les Entérocoques, ou des bacilles à Gram négatif, comme *Escherichia coli* (Assie, 2004 ; Snowdon et al., 1996).

## **1.2. La production alimentaire artisanale dans le monde et notamment en Afrique**

Dans le monde, différents produits artisanaux issus des fermentations alimentaires sont connus, allant des fermentations dominées par les bactéries lactiques sur le continent africain aux fermentations asiatiques principalement associées aux moisissures et aux levures. De plus, les bactéries lactiques sont associées à différentes traditions de production alimentaire selon les régions dans une large gamme de matières premières et divers processus sont utilisés. Les fermentations, et notamment la fermentation lactique, offrent de nombreux avantages, dont plusieurs sont vitaux pour la survie et la nutrition sans danger des populations dans les communautés traditionnelles. Elles offrent la stabilité et prolongent la durée de conservation des principaux constituants alimentaires dans les conditions ambiantes, ainsi qu'elles assurent leur sécurité et leur acceptabilité traditionnelle. En plus de ces avantages fondamentaux, les sociétés modernes des pays industrialisés apprécient l'enrichissement de l'alimentation par ces produits vu les attributs d'aspects bénéfiques pour la santé largement proclamés des aliments lactiques-fermentés (Steinkraus 1995 ; Holzapfel 1997 ; Leroy et De Vuyst 2004).

Les caractéristiques typiques des aliments artisanaux varient selon la tradition, la région, la disponibilité de matières premières et les préférences gustatives. Par exemple, il semble que la viande fermentée telle que le « salami » n'est pas appréciée dans la plupart des régions d'Afrique. D'autre part, la fermentation lactique des céréales, en particulier, est largement acceptée sur tout le continent africain, mais dans une moindre mesure en Asie, où domine la fermentation (essentiellement non lactique) des légumineuses.

Il existe environ 5000 variétés d'aliments et de boissons fermentés dans le monde préparés et consommés par des milliards de personnes (Tamang, 2010). La vaste gamme et la diversité des aliments fermentés traditionnels dans le monde entier reflètent leur valeur nutritionnelle et leur faible coût de préparation car les procédures de traitement sont accessibles aux populations défavorisées (Oyewole, 1997). En ce qui concerne les aliments fermentés, le continent africain est caractérisé par la domination des fermentations lactiques à prédominance céréalière. La technologie de la fermentation lactique s'est développée pour inclure une large gamme de matières premières, offrant une gamme impressionnante de produits (Oyewole, 1997). Des exemples de fermentation de différents types des matières premières sont donnés dans le **tableau 3**, illustrant la diversité des fermentations lactiques en Afrique.

**Tableau 3: Exemples de la diversité des fermentations alimentaires sur le continent africain (Franz et Holzapfel, 2013).**

A	B	C	D	E
ogi <sup>1, 2, 3</sup>	kenkey	dawadawa <sup>5</sup>	palm wines <sup>13</sup>	
uji <sup>1, 2, 3, 4</sup>	uji <sup>1, 2, 3</sup>	soumbala <sup>5</sup>		injera <sup>1, 2, 3</sup>
mawe <sup>1</sup>		ugba <sup>5</sup>	traditional beers <sup>3, 2, 1</sup>	
mahewu <sup>1</sup>		ogiri <sup>11</sup>	tej <sup>12</sup>	kisra <sup>3</sup>
gari <sup>4</sup>		okpehe <sup>5</sup>	sherbote <sup>14</sup>	kocho <sup>9</sup>
kivunde <sup>4</sup>			mwenge <sup>3, 15</sup>	
kule naoto <sup>10</sup>				kishk <sup>10+7</sup>
ergo <sup>10</sup>				
hulumur <sup>3</sup>				

Toutes les catégories représentent des fermentations où les bactéries lactiques dominent (A, B et E), ou peuvent typiquement constituer un groupe mineur (C) ou un groupe majeur ensemble avec les levures (D). Matières premières: 1 = maïs; 2 = millet; 3 = sorgho; 4 = manioc; 5 = légumineuses; 6 = tef; 7 = blé; 8 = légumes; 9 = ensete; 10 = lait; 11 = graines de melon d'eau; 12 = miel; 13 = le jus de palmier; 14 = dates; 15 = bananes. A = fermentation LAB en une seule étape; B = trempage suivi d'une fermentation lactique; C = fermentation alcaline, bactérienne; D = fermentation lactique / alcoolique; E = pâte avec dominance des bactéries lactiques.

Contrairement aux continents asiatique et européen, les poissons, la viande et les légumes ne sont pas les matières premières typiques pour la fermentation en Afrique. D'autre part, une variété de céréales et de racines servent de matières premières typiques pour la fermentation lactique dans la plupart des régions d'Afrique. Le lait de bovins, de moutons et de chèvres est généralement fermenté en Afrique orientale et australe, et certaines régions d'Afrique du Nord, où l'élevage de bovins, de moutons et de chèvres a une longue tradition. La fermentation du lait de chamelle est pratiquée depuis l'Antiquité en Afrique du Nord et au Soudan. Les légumineuses telles que la caroube, la mesquite (*acacia*), mais aussi le soja, servent de matières premières pour une fermentation "alcaline" dominée par *Bacillus subtilis* pour la production d'un condiment (*soumbala*, *dawadawa*, *okpehe*) typique de l'Afrique de l'Ouest. Ce produit a une similarité avec *kinema*, un condiment typique de l'Himalaya produit à partir de soja (Sarkar *et al.*, 2002).

De nombreux produits fermentés en Afrique sont encore produits à l'échelle du ménage et puis vendus sur les marchés locaux. Même la production par les petites et moyennes entreprises est rare. Les variations régionales dans les matières premières ainsi que les recettes et les méthodes de production compliquent encore la production standardisée. Ceci montre le besoin considérable à la fois de la recherche et du financement afin de développer des souches en vue d'une utilisation comme démarreur de cultures dans la production de ces aliments fermentés. La fermentation lactique dans les produits artisanaux offre des modèles d'étude intéressants et précieux pour comprendre les mécanismes sous-jacents de l'élaboration de ferments lactiques aboutissant à la protection

et l'enrichissement de notre alimentation quotidienne. Comprendre ces mécanismes fournit une précieuse base scientifique pour des approches biologiques de la conservation des aliments et pour la protection des consommateurs.

### **1.3. La fermentation lactique de l'artisanal à l'industriel... !**

La fermentation est un processus dans lequel les changements chimiques sont provoqués dans un substrat organique par l'action d'enzymes produites par des micro-organismes (**Psoni et al., 2003**). Bien qu'il soit extrêmement difficile d'identifier les débuts précis de la conscience humaine de la présence et le rôle des micro-organismes dans les aliments, les preuves disponibles indiquent que cette connaissance a précédé l'établissement de la bactériologie ou de la microbiologie dans la science. L'exploitation de la fermentation dans la société humaine a une longue histoire. On croit que les Sumériens ont été les premiers grands éleveurs et producteurs de lait et ont été parmi les premiers à faire du beurre (**Tamime, 2002**). Le lait, le beurre et le fromage étaient également consommés par les Égyptiens dès 3000 av JC (**Jay et al., 1996**). En Chine, « Le koumiss » a une longue histoire d'utilisation en tant que boisson populaire apparue pendant la dynastie de Han (202 av JC-202 apr JC) et il atteint la popularité répandue pendant la dynastie de Yuan (1271-1368 apr JC).

Tout au long de l'histoire, les aliments fermentés traditionnels ont été considérés comme les principales sources de nutrition pour de nombreuses communautés rurales et les populations nomades. Ils jouent actuellement un rôle important dans l'amélioration de l'économie, des finances et des affaires des sociétés locales. Cependant, avec l'accélération de l'urbanisation, il y a de moins en moins d'aliments fermentés préparés traditionnellement à la maison. En outre, afin de satisfaire la demande de produits traditionnels des populations urbaines et d'améliorer la qualité, la sécurité et l'efficacité de la production, ces technologies de fermentation domestique sont passées à une échelle industrielle. Cependant, cette transition de la production familiale à petite échelle à la fabrication industrielle a été un défi pour les microbiologistes. Des progrès ont été réalisés dans la compréhension de la richesse, la diversité et le comportement des espèces microbiennes présentes dans les aliments fermentés. Cependant, plus de travail devrait être fait pour identifier plus de bactéries lactiques, pour augmenter notre connaissance des mécanismes de la fermentation, pour comprendre les rôles de chaque espèce et pour caractériser les bactéries en vue de leur utilisation industrielle. Les investigations sur les interactions bénéfiques des aliments fermentés ont aussi clairement pointé vers les aliments issus de fermentations lactiques et l'étude des mécanismes sous-jacents des effets bénéfiques du microbiote autochtone constitue un champ stimulant et passionnant de la recherche multidisciplinaire.

Au cours du dernier siècle, de nombreux micro-organismes ont été isolés à partir des aliments fermentés de manière traditionnelle. Ces bactéries ont beaucoup attiré l'attention de l'industrie pharmaceutique et de l'industrie alimentaire à cause de leur potentiel biotechnologique. Elles ont un rôle essentiel dans l'industrie alimentaire en raison des

niveaux élevés de consommation humaine de plusieurs produits alimentaires, principalement du fromage et des laits fermentés. Les plus importants représentants appartiennent aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Streptococcus*. De nombreuses souches de ces genres ont été isolées à partir de produits laitiers, produits céréaliers, la viande et les poissons, bière, vin, fruits et jus des fruits, légumes marinés, purée, choucroute, ensilage, levain, etc.

L'effet compétitif bien adapté des bactéries lactiques permettra d'éliminer ou d'inhiber les altérations et les pathogènes. De même les produits métaboliques issus de la fermentation lactique présentent un large éventail de propriétés antimicrobiennes et donc permettent la conservation des aliments. L'acide lactique, le principal métabolite de l'homofermentation inhibera ou détruira les bactéries putréfactives et gram-négatives et certains champignons, qui sont aussi inhibées par l'acide acétique, produit pendant l'hétérofermentation en plus de l'acide lactique. Le diacétyle, associé à l'arôme de beurre désiré dans les produits laitiers fermentés inhibera les bactéries Gram-négatives. Les acides gras, résultant des activités lipolytiques douces, sont inhibiteurs ou toxiques pour différentes bactéries. Les bactériocines qui sont des substances antimicrobiennes de nature protéique agissent contre certaines bactéries pathogènes (**Balciunas et al., 2013 ; Cizeikiene et al., 2013 ; Yang et al., 2018**).

L'ingénierie métabolique peut être aussi un outil alternatif pour rechercher des nouvelles souches ayant des caractéristiques biotechnologiques améliorées, par exemple le réacheminement efficient du métabolisme des sucres vers des produits finaux autres que l'acide lactique, tels que les composés aromatiques, sucres hypocaloriques et édulcorants naturels (**Hugenholtz et al., 2002**). Différentes espèces de *Lactobacillus* ont été métaboliquement modifiées pour la production d'acide L (+) lactique, de mannitol, de pyruvate et de L-ribulose (**Nikkilä et al., 2000; Aarnikunnas et al., 2003; Helanto et al., 2007**). D'autres exemples incluent l'amélioration de la production de diacétyle par *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* dans le babeurre par réorientation du catabolisme du pyruvate (**Henriksen et al., 1999; Hugenholtz et al., 2000**), la production d'acétaldéhyde par *Strep. thermophilus* (**Chaves et al., 2002**). En plus la disponibilité actuelle de plus de 100 génomes de bactéries lactiques complets ou presque sur des bases de données publiques élargit les capacités génétiques et métaboliques de ces bactéries et permettant aux chercheurs d'effectuer des études génomiques fonctionnelles et comparatives (**Zhu et al., 2009; de Vos, 2011**). Le séquençage du génome et les études de la génomique fonctionnelle d'une variété de bactéries lactiques donne maintenant rapidement un aperçu de leur diversité et de leur évolution et révèle la base moléculaire pour des caractères importants tels que la formation d'arômes, le métabolisme du sucre, la réponse au stress, l'adaptation et les interactions (**Siezen et al., 2004**). Les analyses phylogénétiques indiquent une combinaison de perte de gènes étendue et des acquisitions de gènes clés par transfert horizontal des gènes (**Bolotin et al., 2004; Hols et al., 2005 ; Makarova et al., 2006**).

Dans l'ensemble les séquences des génomes des bactéries lactiques ont déjà fourni des informations sur le contenu génétique qui établit des plateformes pour l'ingénierie métabolique et donc une meilleure utilisation industrielle (**Klaenhammer et al., 2005**). De plus, les outils bioinformatiques ont été appliqués, dans une approche génomique, à la recherche des gènes codant pour des métabolites essentiels, tels que les protéases, peptidases, aminotransférases, enzymes pour la biosynthèse des acides aminés, et les systèmes de transport pour les peptides et les acides aminés, ce qui peut optimiser les performances dans un environnement industriel (**van Kranenburg et al., 2002**).

#### 1.4. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les aliments fermentés avec des bactéries lactiques présentent une part importante de l'alimentation humaine. Ces bactéries jouent un rôle essentiel dans la conservation des aliments ce qui a entraîné un intérêt scientifique de leur étude au cours des quelques dernières décennies alors que le concept de bactéries lactiques (LAB) a été mis au point au début des années 1900. La première culture pure de *Bacterium lactis*, maintenant connue sous le nom de *Lactococcus lactis*, a été obtenue en 1873 par Lister (**Fennema et al., 2004**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisés en industrie alimentaire, dans une grande variété de fermentations. En effet, ces bactéries participent à la transformation de produits animaux tels le lait et certains produits carnés ainsi qu'à l'élaboration de produits végétaux. Elles sont aussi connues pour leur rôle probiotique (**Braegger, 2002**). Ce groupe bactérien regroupe un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides. La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé, et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO<sub>2</sub>, etc ...) (**Larpen, 1996**).

Ce sont des microorganismes hétérotrophes et chimio-organotrophes, non sporulés, habituellement aéro-anaérobies et catalase négatives. Acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 5,5 ces bactéries sont généralement immobiles. Elles peuvent avoir différentes formes : sphériques (coques/genre *Streptococcus*, *Lactococcus*, ...), en bâtonnets (bacilles/genres *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc* ssp.) (**Corrieu et Luquet, 2005 ; Galvez et al., 2011**). Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes (**Salminen et al., 2004 ; Fröhlich et König, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011**).

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994**). Elles sont très fréquentes dans la nature, ubiquistes, et on les trouve donc dans différentes niches écologiques. Elles se trouvent généralement associées à des

aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées des produits laitiers, de la viande, des fruits en décomposition, du poisson fermenté, des eaux usées et des cavités (buccale, les organes génitaux, les voies intestinales et respiratoires) des humains et des animaux (**König et Fröhlich, 2009**).

L'application majeure de ces bactéries, concerne l'industrie laitière où leur principale fonction consiste à produire de l'acide lactique à partir des sources de carbone disponibles. L'acidification du milieu qui résulte de l'accumulation du lactate, est à l'origine de la concentration et de la conservation de la matière sèche du lait et de la production de bactériocines (**Wardani et al., 2006**). Ceci confère aux bactéries lactiques leur rôle coagulant et antimicrobien. Ces bactéries peuvent donner d'autres caractéristiques aux produits comme la flaveur et la texture (**Kleerebezem et Hugenholtz, 2003 ; De Vos et Hugenholtz, 2004**). Au niveau des propriétés organoleptiques, le diacétyl est responsable de l'arôme de noisette caractéristique du beurre, des laits fermentés, des crèmes aigres et de certains fromages frais (**Marshall et Law, 1984**). La formation de cette molécule aromatisante est associée à la capacité des souches à fermenter le citrate, composé présent dans le lait (**Hugenholtz, 1993**). La production de diacétyl est caractéristique de souches bactériennes mésophiles très répandues dans l'industrie laitière tels *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.

#### 1.4.1. Habitats des bactéries lactiques

Très ubiquistes, les bactéries lactiques colonisent de nombreux habitats. Toutefois, il semble que chaque espèce ou groupe d'espèces ait un métabolisme bien adapté à son environnement. Les bactéries lactiques se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples (**Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001 ; Mechai, 2009**). Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Makhloufi, 2011**). Par exemple, dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages,...). Elles peuvent aussi vivre en symbiose entre elles et avec un hôte dans la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (**Lopez-Diaz et al, 2000; Navarro et al, 2000; El Shafei et al., 2000 et Mathara et al., 2004**). Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weisseilla*. L'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* pathogène responsable de la trichomonase vaginale (**Bjorkroth et Holzapfel, 2006 ; Ruiz et al, 2009**) et *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (**Makhloufi, 2012**).

Les bactéries lactiques peuvent aussi être associées aux plantes (fruits, légumes et céréales) (König et Fröhlich, 2009).

#### 1.4.2. Position taxonomique actuelle des bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques est basée sur la taxonomie polyphasique (Cowan, 1971), qui est généralement considérée comme un synonyme de la systématique et peut être divisée en classification (organisation ordonnée des organismes en groupes taxonomiques sur la base de similitude), nomenclature (étiquetage des unités) et identification (processus consistant à déterminer si un inconnu appartient à l'une des unités définies). La classification bactérienne devrait refléter le plus possible les relations entre les bactéries, qui sont traditionnellement considérées comme les relations phylogénétiques établies suite à l'étude d'ARNr 16S ou 23S (Woese, 1987).

Depuis la description de *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008). La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques (Tableau 4). Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001 ; Holzapfel *et al.*, 2001). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers, 2002). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que les Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (Holzapfel *et al.*, 2001).

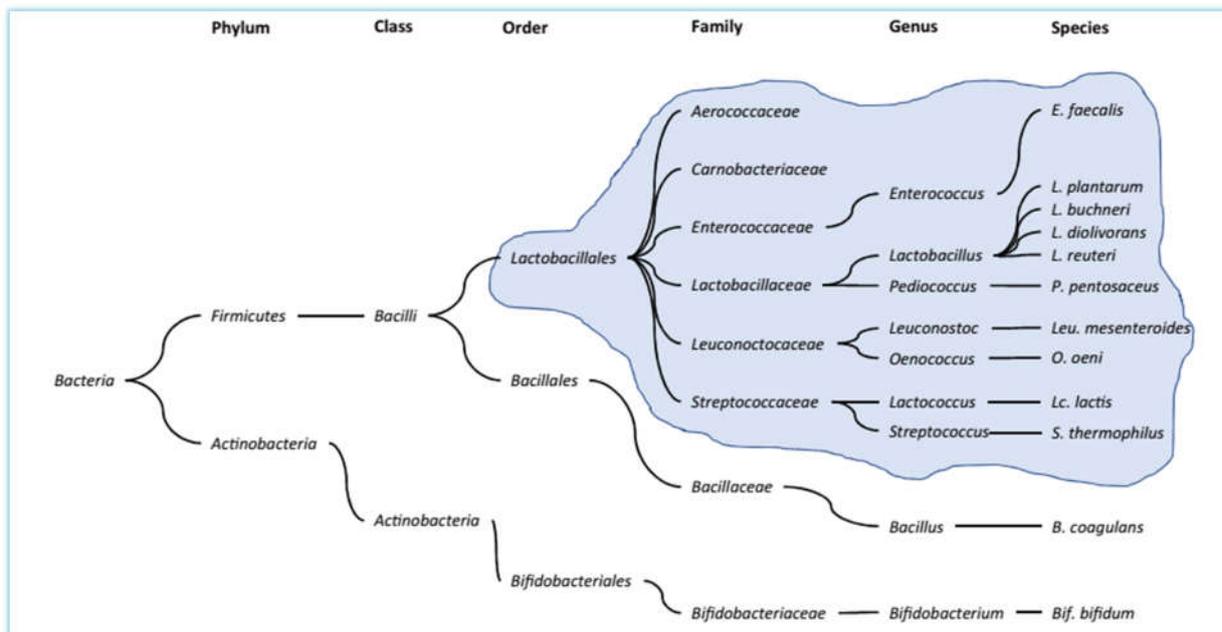
**Tableau 4: Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques  
(Von Wright et Axelsson , 2012)**

famille	genre	forme	CO2 à partir du glucose	croissance à 10°	croissance à 45°	croissance à 6,5% Nacl	croissance à 18% Nacl	croissance à pH 4,4	croissance à pH 9,6	acide lactique
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	cocci	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobactereaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	bâtonnet	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	cocci		+	-	+	+	variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	cocci		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	batonnet	variable	variable	variable	variable	-	variable	-	D,L,DL
	<i>Pediococcus</i>	cocci	-	variable	variable	variable	-	+	-	L,DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	cocci	+	+	-	variable	-	variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	variable	-	variable	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	variable	-	variable	-	D,DL
<i>Streptococaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	cocci	-	+	-	-	-	variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	variable	-	-	-	-	L

+ : Positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé. Production d'acide lactique D, L, ou DL acide variable selon les espèces. a : Certaines souches de *Weissella* sont en forme de tige. b : Dans la littérature plus ancienne, les lactocoques sont appelés streptocoques du groupe N.

En 2002, un nouveau comité *ad hoc* pour la réévaluation de la définition de l'espèce en bactériologie a formulé des recommandations actualisées concernant la définition de l'espèce (**Stackebrandt et al., 2002**). Les développements particulièrement intéressants incluent les méthodologies comprenant l'analyse de séquences multilocus (MLSA) et l'analyse de la séquence du génome entier (**Holzappel et Brian, 2014**).

Les bactéries lactiques sont trouvées dans deux phylums distincts, à savoir *Firmicutes* et *Actinobacteria* (**figure 9**). Au sein des *Firmicutes*, les genres les plus importants sont : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (**Carine et al., 2009**), qui appartiennent à l'ordre des *Lactobacillales* et sont des organismes à faible teneur en GC (31-49%). Au sein du phylum *Actinobacteria*, on trouve le genre *Bifidobacterium*, qui a une teneur élevée en GC (58-61%) (**Klaenhammer et al., 2005; Pfeiler et Klaenhammer 2007; Schleifer et Ludwig 1995; Horvath et al. 2009**).



**Figure 9: Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques en avril 2017. (Sauer et al., 2017).**

La liste des noms de procaryotes contient 30 phylums pour le domaine *Bacteria*. Seulement deux d'entre eux sont représentés pour plus de clarté. L'ordre des lactobacilles comprend six familles, qui sont toutes représentées. Chaque famille se compose de divers genres, dont seuls les plus connus sont montrés. Seule une sélection d'espèces est illustrée.

La taxonomie des bactéries lactiques est un domaine de recherche actif, et plusieurs ajouts et améliorations ont été apportés au cours des dernières années. Parmi eux, l'annexion de plusieurs nouveaux genres répondant à la définition phylogénétique et physiologique d'une bactérie lactique (par exemple *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Vagococcus*...). Ces révisions taxonomiques, qui montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres, sont présentées dans le *Bergey's Manual Trust* (2008).

#### 1.4.3. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

L'application de méthodes biochimiques et moléculaires modernes a montré que pour les bactéries lactiques les schémas d'identification classiques ne sont pas entièrement d'accord avec leurs relations phylogénétiques. L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimio-taxonomiques (acides gras cellulaires), analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (Holzapfel et al., 2001 ; Temmerman et al., 2004).

Généralement les caractéristiques phénotypiques comprennent une réaction positive de Gram, absence d'endospores, activité oxydase et catalase généralement absente, les produits de fermentation du glucose, la fermentation des glucides, la production d'acide lactique D(-) et L(+), hydrolyse de l'esculine et de l'arginine, réduction de nitrate, liquéfaction de gélatine, croissance à différentes températures, valeurs tolérées de pH et de concentration de NaCl et la tolérance à l'oxygène. Ces tests physiologiques simples, sont utiles pour la différenciation des genres (**Axelsson, 2004**). Cependant, les études taxonomiques utilisent de plus en plus des méthodes génotypiques pour différencier les espèces. Une identification fiable est dépendante de l'information génotypique issue de différentes méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr, ribotypage, Random Amplified polymorphic DNA (RAPD), rep-PCR fingerprinting, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré. Ces méthodes sont plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue et constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (**Holzappel et al., 2001 ; Gevers, 2002 ; Temmerman, 2003 ; Temmerman et al., 2004 ; Mancini et al., 2012 ; Chao et al., 2013**).

#### 1.4.3.1. Méthodes phénotypiques

Les premières identifications des bactéries lactiques étaient exclusivement basées sur des caractéristiques morphologiques et physiologiques. Sur la base de la fermentation des sucres hexose et pentose, les espèces du genre *Lactobacillus* pourraient être divisées en homofermentaires obligatoires (pas de pentoses fermentés, hexoses fermentés par la voie Embden-Meyerhof-Parnas), hétérofermentaires obligatoires (hexoses et pentoses fermentés par voie phosphogluconate) et hétérofermentaires facultatifs (hexoses fermentés via la voie Embden-Meyerhof-Parnas et pentoses via la voie phosphogluconate) (**Hammes et al., 1991**). Cette analyse des modèles de fermentation des glucides en tant qu'outil d'identification présente beaucoup d'inconvénients, car les résultats des tests peuvent dépendre de la procédure, et des variations inter-laboratoires. La présence d'acide méso-diaminopimélique dans la paroi cellulaire était l'un des paramètres clés d'identification biochimique antérieure (**Hammes et al., 1991, Hammes et Vogel, 1995**). Les parois cellulaires des bactéries Gram positives contiennent divers types de peptidoglycanes (**Schleifer et Stackebrandt, 1983**), qui diffèrent par la séquence d'acides aminés de la fraction peptidique des peptidoglycanes et le type de réticulation. Pour de nombreuses espèces, le type peptidoglycane est spécifique à l'espèce mais il existe une diversité très limitée entre les espèces, le type Lys-D-Asp étant le type prédominant dans le genre *Lactobacillus*, *Pediococcus* et plusieurs autres genres (**Hammes et Hertel, 2009 ; Holzappel et al., 2009**). La détermination de la composition de peptidoglycane est, par exemple, utile pour différencier le genre *Weissella* (**Björkroth et Holzappel, 2003**), et certaines espèces comme, par exemple, *Lb. sanfranciscensis* et *Lb. rossiae*, ont plutôt des peptidoglycanes spécifiques, à savoir Lys-Ala et Lys-Ser-Ala<sub>2</sub>, respectivement (**Hammes et Hertel, 2009**). L'analyse des antigènes de Lancefeld (**Lancefeld, 1933**), de la composition en acide téichoïque (**Schleifer et Stackebrandt, 1983**), des esters

méthylliques d'acides gras (**Björkroth et Holzapfel, 2003**), de la mobilité électrophorétique des déshydrogénases d'acide lactique et d'autres enzymes ont tous été appliquées comme approches phénotypiques de la taxonomie des bactéries lactiques. Malgré que ces techniques sont laborieuses et encombrantes (**Gasser, 1970 ; London et Chace, 1976, 1983, Chace et al., 1981, Schleifer et al., 1985**).

Parmi les méthodes biochimiques utilisées, les microméthodes ont connu un développement important, avec la commercialisation de systèmes d'identification associant, pour un groupe bactérien donné, une galerie miniaturisée de tests biochimiques, et des documents ou des programmes informatiques permettant d'interpréter les résultats obtenus (**De Roissart et Luquet, 1994**). La première galerie biochimique miniaturisée destinée à l'identification des bactéries lactiques a été la galerie API (Analytic Programme Index) 50 CHL, commercialisée en 1970 pour l'étude des souches du genre *Lactobacillus*, puis rapidement étendue à d'autres genres (*Leuconostoc* et *Lactococcus*). Cette technique nécessite une durée d'incubation plus ou moins longue (12 heures à 48 heures) mais exige l'emploi d'un inoculum de faible charge bactérienne. L'analyse et la lecture des tests biochimiques peuvent aussi être automatisées. Des appareils travaillant en milieu liquide (exemple : Vitek2<sup>®</sup> BIOMERIEUX, BD PHOENIX<sup>®</sup>) permettent à partir d'une suspension bactérienne standardisée, d'automatiser et d'optimiser les étapes d'inoculation, d'incubation, de lecture et d'interprétation des tests. Par comparaison des résultats obtenus à la base de données informatisée de l'automate, le logiciel propose une identification avec un score de fiabilité. Cette technique est actuellement la plus utilisée en pratique courante (**Martiny et al., 2012**).

Une technique qui s'est révélée particulièrement utile pour l'identification précise des bactéries lactiques au niveau de l'espèce est l'analyse des protéines totales par électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide (**Pot et al., 1993 ; Laursen et al., 2005; Ricciardi et al., 2005; Piraino et al., 2006; Benito et al., 2008; De Bruyne et al., 2008**). Cette technique a également été largement appliquée en tant que méthode de criblage pour grouper un grand nombre de souches, dont un nombre limité de souches représentatives ont ensuite été sélectionnées pour une analyse plus poussée par des méthodes génotypiques ou phénotypiques (**Dalgaard et al., 2003**). La comparaison des profils des protéines totales de la cellule obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), s'est révélée être extrêmement fiable pour l'identification au niveau de l'espèce voir même de la sous-espèce, à condition d'avoir une base de données des profils protéiques numérisés et normalisés de toutes les espèces connues de bactéries lactiques (**Pot et al., 1994 ; Vandamme et al., 1996**). Pour certaines espèces, le pouvoir discriminatoire de cette technique est limité, c'est le cas de *Lactobacillus acidophilus* (**Gancheva et al., 1999**), et les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus paraplantarum* (**Torriani et al., 2001**).

Une nouvelle méthode d'identification à haut débit basée sur l'analyse des protéines à cellules entières, spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice/ ionisation-temps de vol (MALDI-TOF MS) (**figure 10**), a été introduite et appliquée avec succès dans la taxonomie bactérienne (**Mellmann et al., 2008 ; Bizzini et Greub, 2010**). Son application est principalement limitée au domaine de la microbiologie médicale (**Friedrichs et al., 2007**); cependant, **Tanigawa et al. (2010)** ont utilisé les spectres de masse MALDI-TOF pour la différenciation des espèces et des sous-espèces de *Lactococcus*, et **De Bruyne et al. (2011)** ont développé un protocole standard pour générer des spectres de masse MALDI-TOF pour les souches *Leuconostoc*, *Fructobacillus* et *Lactococcus*. Le rôle de MALDI-MS est d'identifier la protéine suite à sa modification par ionisation. Cela entraîne la formation d'ions sans perte significative de l'intégrité de l'échantillon et permet une information précise sur la masse des protéines et des peptides à déterminer dans leur état naturel (**Graves et Haystead, 2002**). La protéine est d'abord digérée par la trypsine en peptides plus petits, puis mélangée avec des molécules de matrice. Après irradiation en utilisant des longueurs d'onde spécifiques du laser, l'échantillon peut être ionisé en absorbant l'énergie des molécules de la matrice. Le rapport masse/charge ( $m/z$ ) des ions peut alors être mesuré en déterminant le temps nécessaire pour qu'ils traversent la longueur d'un instrument de temps de vol (TOF). Le spectre des peptides présents peut alors être identifié en les comparant avec des spectres théoriques qui ont été calculés à partir de séquences de protéines disponibles dans les bases de données, utilisant l'empreinte de masse peptidique (PMF) et les outils de bioinformatique (**James et al., 1993, Jensen et al., 1997, Mann et al., 1993, Yates et al., 1993; Pappin et al., 1993**). Combiner des techniques MS avancées avec la recherche dans une base de données a joué un rôle crucial dans l'identification des protéines pour les études protéomiques (**Singh et Nagaraj, 2006**).

Une fois les échantillons traités de manière appropriée, ils sont ajoutés à la plaque MALDI, recouverts de matrice, et séchés, puis l'échantillon est bombardé par le laser. Ce bombardement entraîne la sublimation et l'ionisation des échantillons et matrice. Les ions générés sont séparés en fonction de leur rapport masse / charge via un tube TOF, et une représentation spectrale de ces ions est générée et analysé par le logiciel MS, générant un profil MS. Ce profil est ensuite comparé à une base de données de spectres MS de référence et apparié aux spectres identiques ou les plus apparentés contenus dans la base de données, générant une identification des bactéries ou des levures contenues dans l'échantillon.

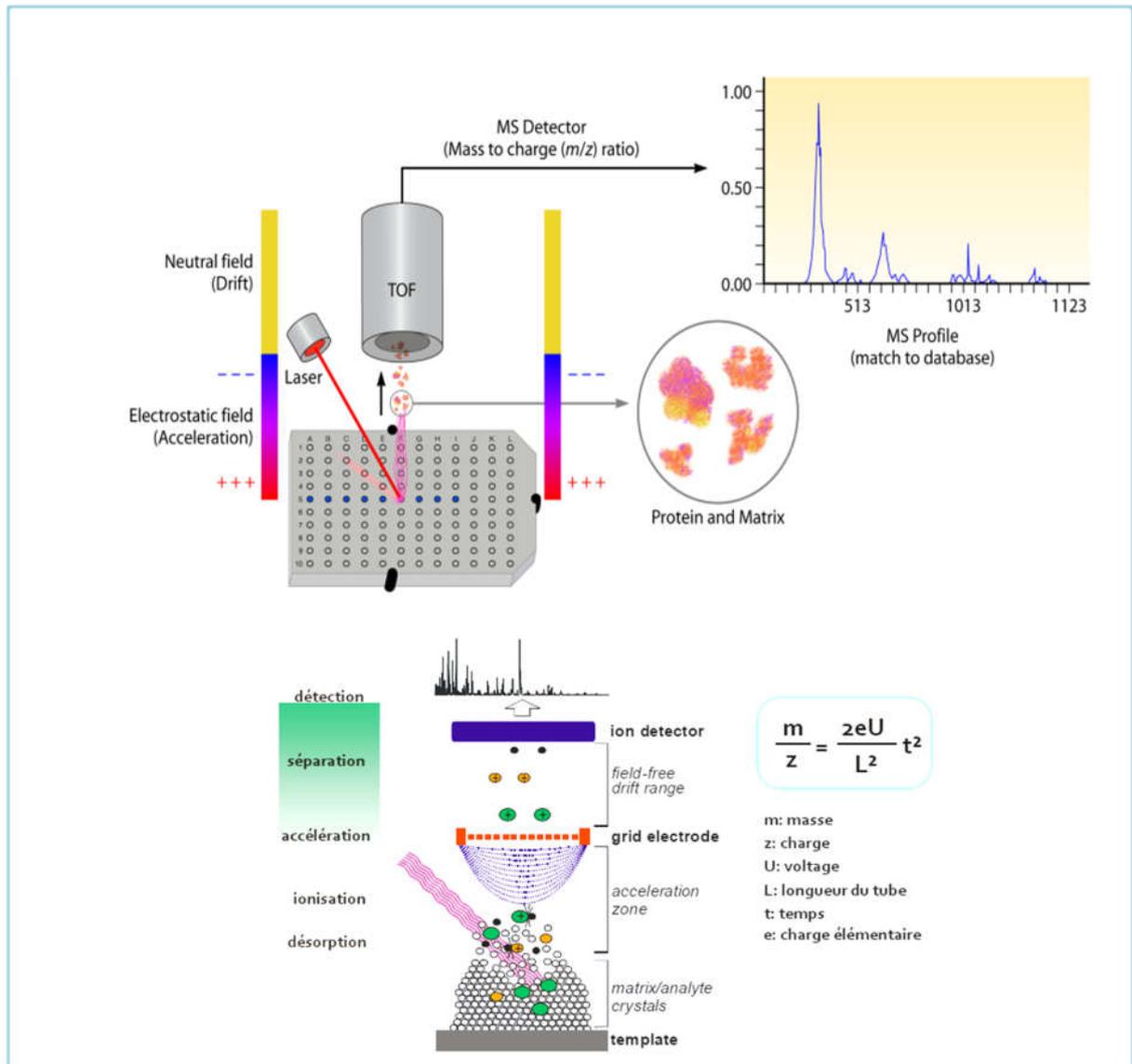


Figure 10: Schéma général pour l'analyse Maldi ToF-MS des isolats microbiologiques ionisés et du matériel clinique (Clark *et al.*, 2013).

#### 1.4.3.2. Méthodes génotypiques

De nombreuses techniques génotypiques sont utilisées pour l'identification des bactéries lactiques (Ludwig, 2007). L'hybridation ADN-ADN a été largement utilisée et représente la pierre angulaire de la délimitation des espèces en attendant la définition plus moderne basée sur l'information de séquence du génome entier (Simonds *et al.*, 1971 ; Dellaglio *et al.*, 1973 et 1975 ; Hontebeyrie et Gasser, 1977 ; Vescovo *et al.*, 1979 ; Johnson *et al.*, 1980 ; Lauer *et al.*, 1980 ; Dellaglio *et al.*, 1981 ; Garvie et Farrow, 1981 ; Garvie *et al.*, 1981 ; Jarvis et Jarvis, 1981 ; Kilpper-Balz *et al.*, 1982 ; Collins *et al.*, 1984 ; Garvie, 1984 ; Dellaglio et Torriani, 1986). Le contenu en bases de l'ADN est considéré comme faisant partie de la description standard des bactéries. Selon Schleifer et Stackebrandt

(1983), la variation de la teneur en G + C dans l'espèce ne dépasse pas 5%, et dans le même genre est inférieure à 10%. Pour le genre *Lactobacillus*, la dernière limite est dépassée (Hammes et Hertel, 2009), ce qui reflète sa diversité phylogénétique. En dehors de cette technique traditionnelle, une gamme de tests de PCR spécifiques ou multiplex a été décrite pour la détection et l'identification des espèces (Ludwig, 2007). Aussi, des méthodes de marquage d'ADN, telles que la formation de plasmides et l'électrophorèse sur gel à champs pulsés des fragments de macrorestriction d'ADN génomique ont été développées et utilisées dans des études taxonomiques des bactéries lactiques. Ces techniques ont été développées comme méthodes de typage pour les études épidémiologiques (van Belkum *et al.*, 2007).

- **Ribotypage**

Le ribotypage est basé sur l'hybridation différentielle d'une sonde d'ADN à des fragments de restriction d'ADN séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose. Après digestion de l'ADN génomique et séparation électrophorétique des fragments sur un gel d'agarose, des bandes d'ADN sont transférées du gel sur une membrane et hybridées avec une sonde marquée, typiquement constitué de gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S (ribotypage). Puisque la sonde s'hybridera avec seulement un nombre limité de fragments, un motif de bandes simplifié (le ribotype) est obtenu, qui peut être utilisé pour l'identification, en comparant les profils de bandes avec un ensemble de souches de référence (Ludwig, 2007). Cette technique est employée pour révéler les hétérogénéités entre des souches à faible homologie, sa fiabilité étant fonction du nombre et du type de sondes et d'enzymes de restriction utilisées (Roussel *et al.*, 1993 ; Lyhs *et al.*, 1999). Le ribotypage a été utilisé dans des études taxonomiques de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella* (Björkroth *et al.*, 2000, 2002 ; Schlegel *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2004 ; Endo *et al.*, 2007). La technique est un système automatisé commercialisé comprenant une base de données limitée pour l'identification des bactéries lactiques.

- **Polymorphisme de taille des fragments de restriction (AFLP)**

L'analyse AFLP est une méthode de marquage à haute résolution utile pour l'identification des souches (Kunene *et al.*, 2000). Le principe de l'AFLP est l'analyse du polymorphisme de la taille des fragments de restriction, modifiée en utilisant une amplification par PCR pour sélectionner des fragments d'ADN particuliers dans le pool de fragments de restriction. La restriction est effectuée avec deux enzymes de restriction, ce qui donne des fragments d'ADN avec deux types différents d'extrémités collantes qui sont combinées de manière aléatoire. A ces fins, des oligonucléotides courts (adaptateurs) sont ligaturés pour former des matrices pour la PCR. La réaction d'amplification sélective est réalisée en utilisant deux amorces différentes qui contiennent la même séquence que les adaptateurs mais dont les séquences sont étendues pour inclure une ou plusieurs bases sélectives à côté du site de restriction de l'amorce. Seulement ceux des fragments qui correspondent complètement à la séquence d'amorce sont amplifiés. Le processus d'amplification aboutit à environ 30 à 40 fragments d'ADN, dont certains sont spécifiques à

une espèce ou à un genre, tandis que d'autres sont spécifiques à la souche (**Janssen et al., 1996**). Les bandes obtenues seront séparées par électrophorèse sur gel ou par électrophorèse capillaire.

- **Méthodes de typage basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Les méthodes basées sur l'amplification sélective des fragments d'ADN de l'organisme cible sont largement utilisées pour l'identification des bactéries lactiques. La séquence cible est typiquement un élément répétitif comme dans ERIC-PCR, (GTG) 5-PCR ou Box-PCR (**Gevers et al., 2001; Kostinek et al., 2005; Scheirlinck et al., 2009**) ou peut être une séquence aléatoire comme RAPD-PCR (**Moschetti et al., 1997, Torriani et al., 1999, Booyen et al., 2002, Rossetti et Giraffa, 2005; Ludwig, 2007**). Ces techniques sont très simples à réaliser et peu coûteuses mais affichent des degrés variables de reproductibilité, Elles peuvent être utilisées pour comparer rapidement un grand nombre d'isolats. En incluant un ADN de référence, la technique peut révéler des relations au niveau des espèces et des sous-espèces (**van Belkum et al., 2007**).

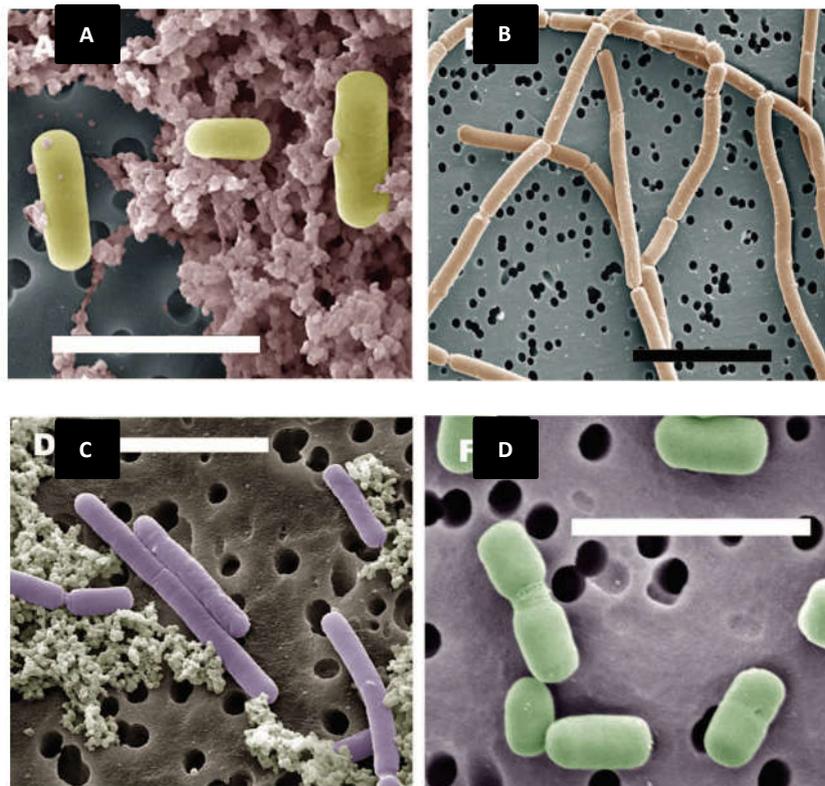
- **Analyse de restriction d'ADN ribosomique amplifiée (ARDRA)**

L'ARDRA consiste en une amplification par PCR d'une partie des gènes de l'ARNr (16S, 23S) avec une analyse subséquente de l'enzyme de restriction de l'amplicon. L'identification est effectuée en comparant les modèles de restriction obtenu avec une bibliothèque composée d'ARDRA de souches de référence représentant les espèces cibles pour l'identification (**Giraffa et al., 1998, Ventura et al., 2001, Rodas et al., 2003, Ludwig, 2007**).

#### **1.4.4. Le genre *Lactobacillus***

Le genre *Lactobacillus* est le groupe le plus important et le plus diversifié parmi les bactéries lactiques. Les membres de ce genre sont à Gram positif dont la morphologie peut varier de bâtonnets courts et dodus à des bâtonnets longs et élancés et donc généralement ils ont une forme de bâtonnets ou coccobacilles (**Figure 11**); les cellules sont souvent organisées en chaînettes, les colonies sont petites ou de taille moyenne. Ces bactéries sont non sporulées, la plupart du temps non mobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La température de croissance optimale est principalement entre 30 et 40 °C et la température de croissance globale peut aller de 2 à 53 °C; la gamme de pH pour la croissance est entre 3 et 8 (**Salvetti et al. 2012 ; Hammes et Hertel, 2009**).

Les lactobacilles sont fermentaires, bien que l'analyse de la séquence du génome entier, pour *Lb. plantarum* WCFS1 (**Brooijmans et al., 2009**), a indiqué le potentiel pour la respiration. En général, ils tolèrent l'oxygène mais se développent bien dans des conditions anaérobies.



**Figure 11: Images au microscope électronique à balayage de certains lactobacilles.**  
A, *Lb. helveticus*; B, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; C, *Lb. casei*; D, *Lb. brevis*.  
(Broadbent et Steele, 2005).

Ils produisent de l'acide lactique comme principal produit de fermentation à partir des sucres. Cette fermentation a été à la base de la taxonomie antérieure du genre, Orla-Jensen (1919) distinguant trois groupes : « Thermobacterium » et « Streptobacterium » pour les bactéries homofermentaires et hétérofermentaires facultatives respectivement et « Betabacterium » pour les hétérofermentaires obligatoires (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004).

Les membres du groupe 1, homofermentaires obligatoires, possèdent l'aldolase mais pas la phosphocétolase et ne peuvent pas fermenter les pentoses ou le gluconate; ils fermentent les hexoses exclusivement par la voie glycolytique (figure 12) en DL-, L- et / ou D-lactate. Ce groupe comprend tous les lactobacilles thermophiles trouvés dans les cultures starter, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *Lactis* (Hammes et Hertel, 2009).

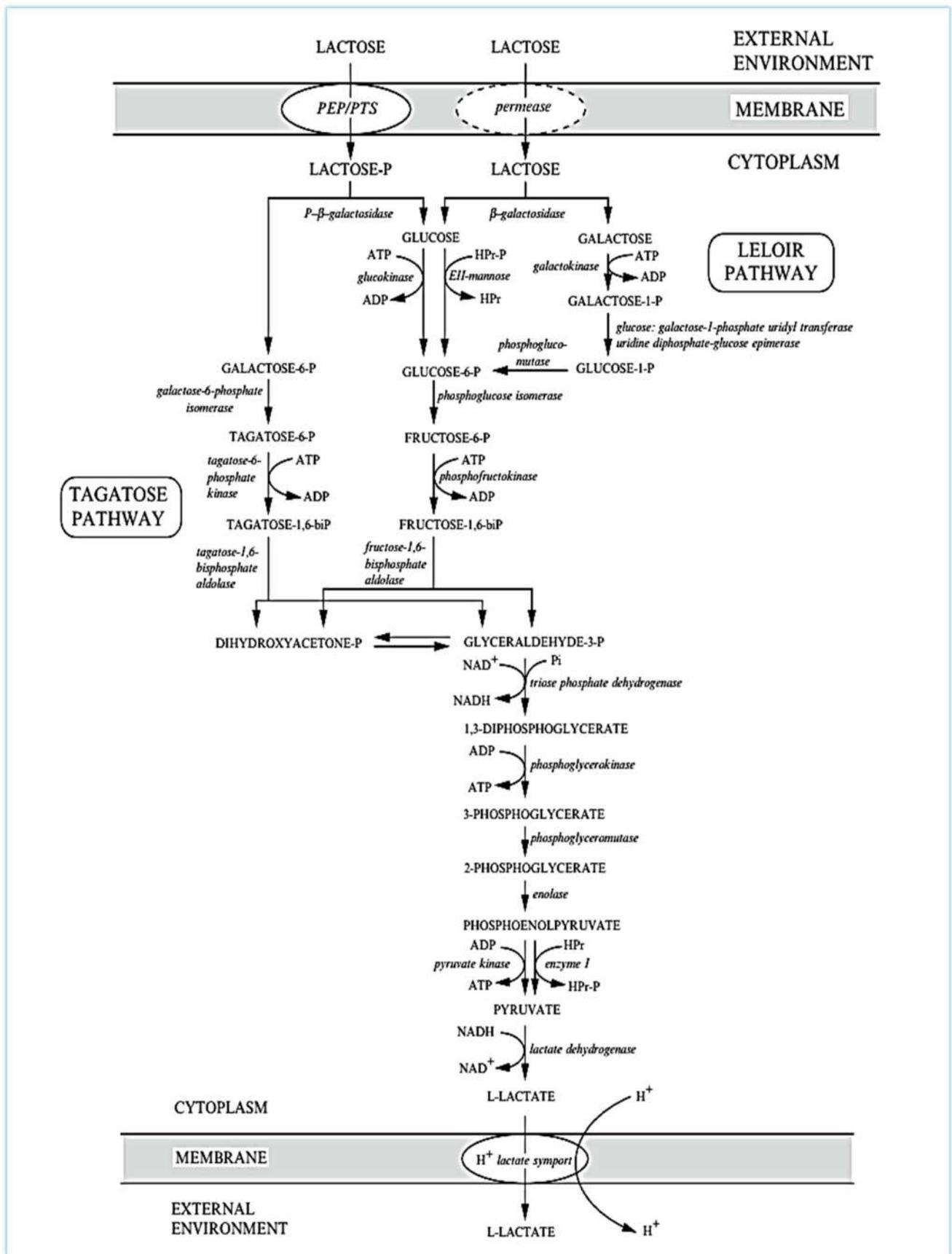


Figure 12: Voie glycolytique chez les bactéries lactiques (Fox *et al.*, 2017).

Les membres du groupe 2, hétérofermentaires facultatifs, contiennent de l'aldolase et de la phosphokétolase. Ils fermentent presque exclusivement les hexoses en lactate par la voie EMP (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) et les pentoses en lactate et acétate à des concentrations équimolaires via une phosphocétolase inductible. La croissance sur le glucose réprime la formation de phosphocétolase. Ce groupe comprend *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* qui sont trouvés dans le fromage à maturation, où ils sont appelés bactéries lactiques non-starter (NSLAB) (Rodas *et al.*, 2006).

Les bactéries du groupe 3, hétérofermentaires obligatoires, possèdent la phosphocétolase mais pas l'aldolase et donc, comme *Leuconostoc*, fermentent les sucres de manière hétérofermentaire en lactate, éthanol et CO<sub>2</sub> à concentration équimolaire. De petites quantités d'acétate peuvent également être produites (figure 13). Les membres de ce groupe produisent du NH<sub>3</sub> à partir de l'arginine comme *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*; ils sont considérés comme non-starter (NSLAB) (Schütz et Radler 1984 a, b).

Le lactose est absorbé par le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate-dépendant (PTS) et pénètre dans le cytoplasme sous forme de lactose phosphate (Chassy et Alpert, 1989) où il est clivé en glucose et galactose-6-phosphate. Le galactose-6-phosphate est métabolisé par la voie du tagatose-6-phosphate (Bisset et Anderson, 1974), tandis que la voie de Leloir est utilisée par les bactéries lactiques fermentant le galactose (Konings *et al.*, 1989). Le glucose est phosphorylé et métabolisé soit par la voie du pentose phosphate, soit par la voie EMP (glycolyse).

La glycolyse, dans certaines conditions, peut conduire à une fermentation hétérolactique, et certaines bactéries lactiques, considérées comme homofermentaires, utilisent la voie du pentose phosphate (Axelsson, 2004). L'étape clé dans la voie des pentoses phosphates est la scission par la phosphocétolase du xylulose-5-phosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate (GAP) et l'acétyl-phosphate. Le GAP est ensuite converti en lactate et l'acétyl-phosphate en acétate et éthanol. Les lactobacilles trouvés dans le levain sont principalement hétérofermentaires et dégradent le glucose par cette voie. Dans des conditions microaérophiles, l'oxygène et le fructose peuvent être utilisés comme accepteurs d'électrons, entraînant la formation de métabolites supplémentaires tels que l'acétate et le mannitol (Hammes et Gänzle, 1998).

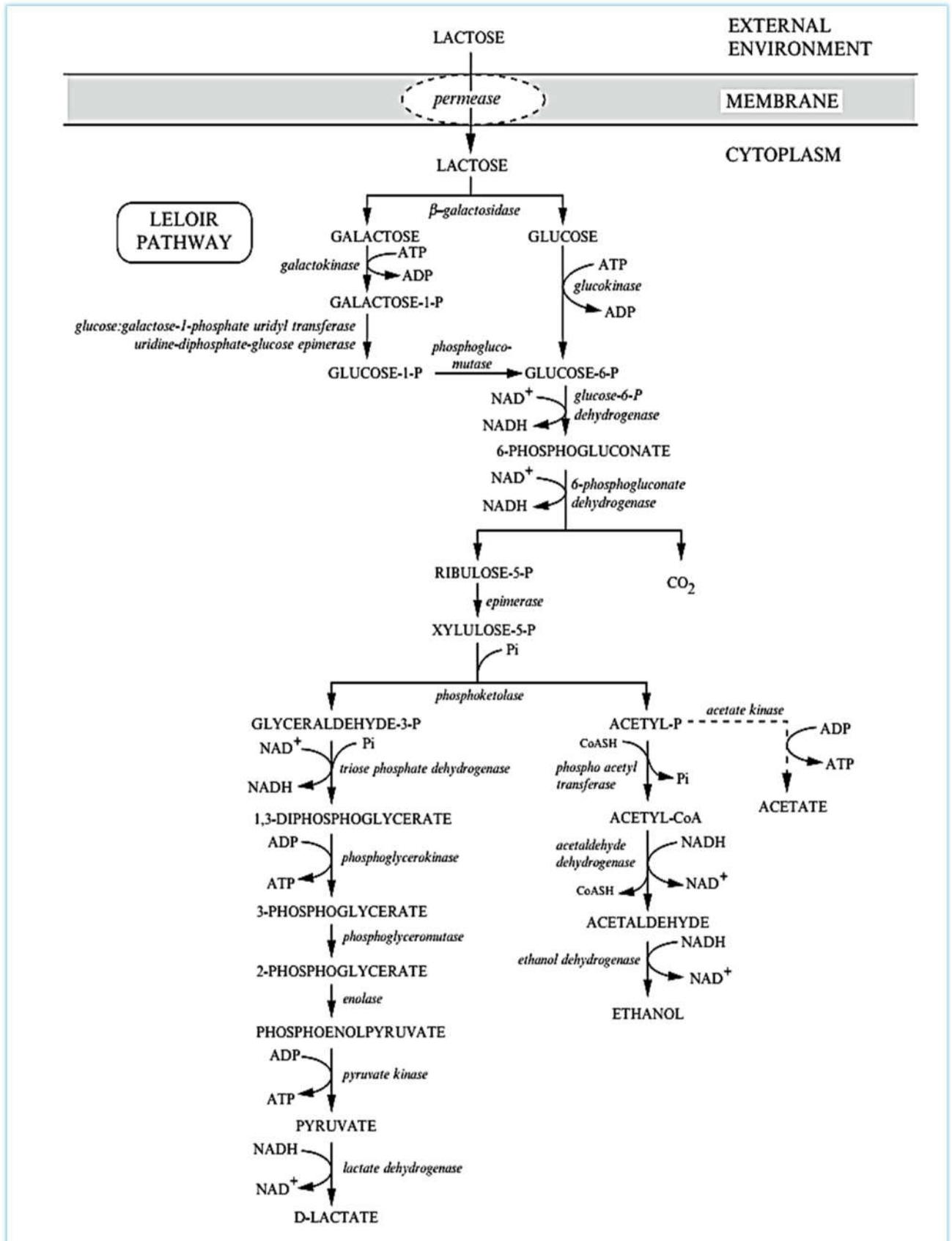


Figure 13: Voie des pentoses phosphates (fermentation hétérolactique) chez les bactéries lactiques (Fox *et al.*, 2017).

La teneur en G + C de l'ADN chez les lactobacilles varie de 32 à 53% en moles. Ils ont des besoins nutritionnels complexes en hydrates de carbone, acides aminés, peptides, acides gras, dérivés d'acides nucléiques, vitamines et minéraux. Certaines espèces possèdent une pseudocatalase et certaines souches peuvent absorber des porphyrinoïdes, puis présenter des activités de catalase, de nitrite réductase et de cytochrome (**König et al., 2009**).

Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* peuvent être trouvées dans différents habitats, elles peuvent être caractérisées dans huit types de niches biologiques:

- dans les plantes ou produits de fermentation des végétaux, comme *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus fermentum* (**Hammes et Hertel, 2003**),
- dans le levain, présentant une source de plusieurs souches appartenant à *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus hammesii*, *Lactobacillus acidifarinae*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus paralimentarius* and *Lactobacillus frumenti* (**De Vuyst et Neysens, 2005; Ehrmann et Vogel, 2005**),
- dans les produits à base de viande, les espèces les plus communes sont *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus versmoldensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius* (**Hammes et al., 1990 ; Krockel et al., 2003**),
- dans les produits laitiers, on trouve *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*,
- dans les jus des fruits,
- dans les voies gastro-intestinales de l'homme et des animaux (cas de *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus antri*) (**Roos et al., 2005**), d'autres isolats sont d'origine animale à l'exclusion des voies gastro-intestinales,
- dans l'environnement en général (**Zhang et Cai, 2014**).

Bien que technologiquement le produit final le plus important de la fermentation par les lactobacilles est l'acide lactique, différents paramètres vont changer la composition des produits finaux. En plus des différences dans le métabolisme des glucides, d'autres propriétés métaboliques des lactobacilles, tels que leurs activités protéolytiques et lipolytiques, entraînent une vaste variation des produits finaux ce qui est important pour une fermentation alimentaire. Les lactobacilles occupent une position particulière, car de nombreuses espèces de ce genre sont activement utilisées comme cultures de départ de plusieurs fermentations alimentaires, ou ont été isolés à partir de produits alimentaires fermentés (**Sanders, 1994**).

Certains Lactobacilles peuvent avoir des propriétés probiotiques ayant un effet bénéfique pour la santé comme *Lb. iners*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* et *Lb. crispatus*, *Lb. casei* et *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius* et *Lb. oeni*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* et *Lb. fermentum* (Isolauri et al., 2004 ; Vankerckhoven et al., 2008). La plupart des probiotiques actuellement disponibles appartiennent au genre *Lactobacillus*. Cependant, peu de souches sont disponibles sur le marché pour une application probiotique. La technologie génétique et la génomique comparative jouent un rôle dans la recherche rapide et le développement de nouvelles souches (Reid, 2008).

Beaucoup d'autres espèces ont été impliquées dans les processus de production alimentaire, par exemple dans la fermentation et la maturation des produits laitiers (fromage, yaourt, koumiss, babeurre, madzoun, kefir, etc.) dont certaines souches de *Lactobacillus* sont capables d'accentuer et d'accélérer l'affinage des fromages (El Soda et al., 2003), des légumes (choucroute, olives, kimchi, cornichons, radis, concombres, navets, carottes, chou-fleur, céleri, gombo, oignons, piments doux et piquants, etc.), des fruits, dans la panification (levain, tempeh, tofu puant, miso, natto, etc.), production des viandes fermentée (salami, pepperoni, chorizo, etc.) et des poisson fermentés, boisson à base de thé fermenté (kombucha), la sauce soja, etc (Kandler et Weiss 1986, Hammes et al., 1991 ; Pot et al., 2014).

Dans ces processus de fermentation, les glucides sont convertis en acides organiques (qui en hétérofermentation peuvent s'accompagner de formation d'alcool), abaissant le pH de la nourriture et prolongeant sa durée de conservation de manière naturelle. Du CO<sub>2</sub> peut se former au cours de ce processus, ce qui est important, par exemple, dans le cas du levain de pain. Les lactobacilles peuvent également avoir des effets importants sur le métabolisme des protéines (par exemple les caséines du lait) ou des lipides et donc déterminer la texture et la saveur du produit fermenté, et par conséquent, améliorer la digestibilité de substrats protéiniques tout en aboutissant à la production d'acides aminés essentiels ou de vitamines. Les propriétés désirées sont obtenues par la sélection de souches de démarrage spécifiques et donc déterminer en grande partie le résultat de la fermentation en faisant appel aux outils bioinformatiques (De Vuyst et al., 2002 ; Diaz-Muniz et al., 2006).

#### 1.4.5. Le genre *Lactococcus*

En 1873, Joseph Lister a obtenu et décrit la première culture bactérienne pure de *Lactococcus lactis*, appelée *Bacterium lactis*. Lister a étudié les lactocoques afin de prouver « la théorie des germes » de Pasteur. Actuellement, Le genre *Lactococcus* comprend 14 espèces reconnues ([http:// www.bacterio.net/lactococcus.html](http://www.bacterio.net/lactococcus.html), mai 2018), *Lactococcus lactis* (incluant quatre sous espèces *cremoris*, *lactis*, *hordniae* et *tractae*), *Lactococcus garvieae* (incluant les sous espèces *bovis* et *garvieae*), *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus raffinolactis* (Doménech et al. 1993; Schleifer et al. 1985; Williams et al., 1997 ; Batt, 2000 ; Pérez et al., 2011 ; Varsha et Nampoothiri, 2016), *Lactococcus chungangensis* (Cho et al., 2008). Plus récemment d'autres espèces ont été

caractérisées : *Lactococcus fujiensis* (Cai, 2011), *Lactococcus taiwanensis* (Chen et al., 2013), *Lactococcus formosensis* (Chen et al., 2014), *Lactococcus hircilactis* et *Lactococcus laudensis* (Meucci et al., 2015), *Lactococcus nasutitermitis* (Yan et al., 2016), *Lactococcus petauri* (Goodman et al., 2017), *Lactococcus reticulitermitis* (Yuki et al., 2018).

Les lactocoques ont une forme cellulaire sphérique ou ovoïde, à Gram positif se présentent isolément, par paires ou en chaînes et sont souvent allongés dans la direction de la chaîne, immobiles et non  $\beta$ -hémolytique, anaérobies facultatifs; peuvent croître à 10 °C mais pas à 45 °C. Ils se développent en présence de 4% de NaCl à l'exception de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* qui ne tolère que 2% (p / v) de NaCl. Le produit final prédominant de la fermentation du glucose est l'acide L (+) lactique.

Les bactéries appartenant à ce genre ont été isolés à partir de matières végétales (Cai et al., 2010), de lait ou d'autres sources animales, y compris l'intestin humain (Kubota et al., 2010). Les habitats les plus reconnus sont le lait cru, le fromage et d'autres produits laitiers pour *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. *Lc. plantarum* est principalement isolé à partir de plantes (Collins et al., 1983), *Lc. garvieae* de mammite bovine et à partir de poisson et de produits laitiers (Collins et al., 1983 ; Kusuda et al., 1991 ; Fortina et al., 2003). Des résultats assez récents suggèrent que les souches de *Lc. garvieae* isolées de poisson ne fermentent pas le lactose contrairement aux isolats laitiers (Fortina et al., 2009). *Lc. piscium* provenant du saumon est présent à des températures inférieures à 15 °C (Venderell et al., 2006, Williams et al., 1990). *Lc. chungangensis* était à l'origine isolé de la mousse de boue activée (Cho et al., 2008). *Lc. fujiensis* est isolé du chou chinois (Cai et al., 2011).

Les principales fonctions technologiques dans l'industrie laitière des espèces de *Lactococcus* sont la production d'acide lactique à partir du lactose, l'hydrolyse de la caséine, la lipolyse des lipides par des activités estérasiques et la fermentation de l'acide citrique. Leurs produits métaboliques finaux et leurs enzymes ont une influence directe ou indirecte sur la texture et la saveur des produits (Wegmann et al., 2007 ; Siezen et al., 2010). Les lactocoques souvent associés à *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, sont essentiels pour la production des laits fermentés et des fromages (Courtney, 2000). Les starters mésophiles sont souvent classés en fonction de leur composition en espèces, les starters contenant une seule souche de *Lc. lactis* étant appelés 0-starters, tandis que les starters D, L ou DL contiennent également des producteurs d'arômes, soit *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lc. mesenteroides*, ou les deux.

Jusqu'à présent, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *cremoris* sont les seuls lactocoques utilisés pour la production des produits laitiers (tableau 5), *Lc. cremoris* étant le plus largement utilisé pour la fabrication du fromage cheddar. Leurs principaux rôles dans la fermentation du lait incluent le développement de la texture en produisant les EPS et de l'arôme en produisant des composés aromatiques (alcools, cétones et aldéhydes) et / ou par le métabolisme du citrate, des acides aminés et des lipides (Cogan et Accolas, 1996 ; Teuber,

2000). Ils peuvent également être utilisés pour la conservation des aliments en raison de leur capacité à produire des acides organiques et des bactériocines, la nisine étant le conservateur le mieux caractérisé et reconnu parmi eux. Des espèces de *Lactococcus* ont également été utilisées comme probiotiques (Kimoto *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2008).

Tableau 5: Les Lactocoques dans les produits laitiers fermentés (Teuber, 2015).

Type du produit	Composition de la culture de départ
Fromage (Cheddar, Camembert, Tilsit)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95–98%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 2–5%
Fromage blanc, quark, lait fermenté, fromage avec petites ouvertures (par exemple, Edam)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95% et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5% ou <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 85–90%, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 3%, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%
Beurre, lait fermenté, babeurre, fromage avec des yeux ronds (par exemple, Gouda)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 70–75%, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> biovar diacetylactis, 15–20%, et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 2–5%
Taette (lait fermenté scandinave caractérisé par sa viscosité)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (production des EPS)
Villi (lait fermenté finlandais)	<i>Oidium lactis</i> (levure couvrant la surface); <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (assurant la viscosité par production des EPS)
Caséine	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Kéfir	Grains de kéfir contenant des levures fermentant le lactose ( <i>Candida kefir</i> ), <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefirianofaciens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

Le potentiel de quelques souches de *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. piscium* et *Lc. plantarum* dans des applications laitières ont été évalués par Holler et Steele (1995). Les souches ont été caractérisées pour la résistance aux phages, la fermentation du lactose et la croissance dans le lait additionné de glucose et d'hydrolysate de caséine. Les plus prometteuses étaient les souches de *Lc. raffinolactis*; cependant, elles manquaient d'activité protéolytique, et l'activité n'était pas exprimée même après l'introduction du plasmide de la protéinase de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. *Lc. garvieae* a été proposé pour les préparations de culture starter, en raison de sa prévalence dans les fromages artisanaux italiens et de sa contribution aux caractéristiques organoleptiques

typiques des fromages traditionnels (**Fortina et al., 2007**). Un champ d'application possible pour les nouveaux lactocoques pourrait être les fermentations végétales et d'ensilage, compte tenu de l'association fréquente des lactocoques et des matières végétales (**Cai et al., 2010**).

Les lactocoques étaient les premiers organismes génétiquement modifiés utilisés pour le traitement de maladies humaines (**Braat et al., 2006**). Des progrès significatifs ont été réalisés dans le domaine de la génétique des lactocoques et leurs systèmes d'expression protéique (**Mills et al., 2006**). Tout à fait distincte de son utilisation traditionnelle dans les industries laitières, l'utilisation de *Lc. lactis* dans de nouvelles applications biomédicales évolue rapidement à mesure que de nouvelles zones émergent pour l'application de *Lc. lactis* pour l'expression des protéines, la délivrance des gènes, l'administration du vaccin et l'administration de médicaments (**Bahey-El-Din et al., 2010**). En raison de sa sécurité bien établie, *Lc. lactis* a un attrait significatif en tant que vecteur d'apport protéique sûr. De nombreuses études récentes ont montré des résultats prometteurs en utilisant des modèles *in vitro*. Assez récemment, l'administration orale de l'interleukine humaine 10 (hIL-10) sécrétée par *Lc. lactis* pour la prise en charge et le traitement de la maladie inflammatoire intestinale a fait l'objet d'essais cliniques (**Steidler et al., 2009 ; Vandebroucke et al., 2010**). Ces essais représentent les premières étapes vers l'utilisation de *Lc. lactis* génétiquement modifié en pratique clinique. Le développement de stratégies de confinement biologique ouvre la voie à des applications potentielles chez l'homme. Cependant, des études cliniques plus contrôlées et à plus grande échelle sont nécessaires pour une évaluation correcte de l'efficacité et de la sécurité de ces souches chez l'homme.

#### 1.4.6. Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus*, représentant de la famille des *Enterococcaceae*, division des *Firmicutes* (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009**), constitue un genre majeur des bactéries lactiques. Les espèces de ce genre ont des attributs communs : les cellules sont ovoïdes, à Gram-positif et se présentent isolées, par paires ou en courtes chaînes, à catalase négative, anaérobies facultatives, capables de croître dans un bouillon de NaCl à 6,5% (p / v), montrent une bonne croissance sur des milieux contenant 0,04% d'azide de sodium et se développent à pH 9,6. Leurs températures de croissance sont de 10 °C à 45 °C. Quelques espèces d'*Enterococcus* ne donnent pas de résultats positifs avec certains de ces tests, par exemple *Ec. dispar* et *Ec. sulfureus* ne poussent pas à une température de 45 °C; la croissance de *Ec. italicus* à cette température est variable tandis que *Ec. cecorum*, *Ec. columbae* et *Ec. italicus* ne poussent pas à 10 °C ou en présence de 6,5 % de sel et peuvent donc être confondus avec *Lactococcus*. De plus, quelques souches de *Lactococcus* poussent à 45 °C et en présence de 6,5% de NaCl (**Fox et al., 2017**).

Les entérocoques jouent un rôle positif dans le développement de l'arôme. Cependant, leur utilisation dans la production des fromages a été mise en doute parce qu'ils peuvent indiquer une contamination fécale des aliments (**Franz et al., 2003**). *Ec. faecalis* fut

d'abord identifié en 1906 par Andrews et *Ec. faecium* en 1919 par Horder et Orla-Jensen, comme *Sc. faecalis* et *Sc. faecium*, respectivement. En 1984, Les études d'hybridation de l'ADN ont montré que ces deux organismes étaient éloignement liés aux streptocoques, et ils ont été transférés à un nouveau genre : *Enterococcus* (Kilpper-Balz et Schleifer, 1987). Lorsque le genre *Enterococcus* a été établi, il ne contenait que ces deux espèces, mais depuis lors, 58 nouvelles espèces ont été caractérisées (<http://www.bacterio.net/enterococcus.htm>). Tous les entérocoques ne sont pas d'origine fécale, par exemple *Ec. mundtii*, *Ec. sulfureus* et *Ec. casseliflavus* ont été isolés des plantes (Collins et al., 1984 ; Collins et al., 1986 ; Martinez-Murcia et Collins, 1991), *Ec. durans* de lait et de viande (Collins et al., 1984), *Ec. pseudoavium* provenant du tissu d'une vache présentant une mammite (Collins et al., 1989), *Ec. raffinosus* d'une source clinique (Collins et al., 1989), *Ec. lactis* et *Ec. italicus*, de fromage italien et *Ec. malodoratus*, à partir d'un fromage Gouda (Morandi et al., 2012 ; Fortina et al., 2004 ; Collins et al., 1984). Par conséquent, l'utilité des entérocoques comme indicateurs de la pollution fécale est discutable.

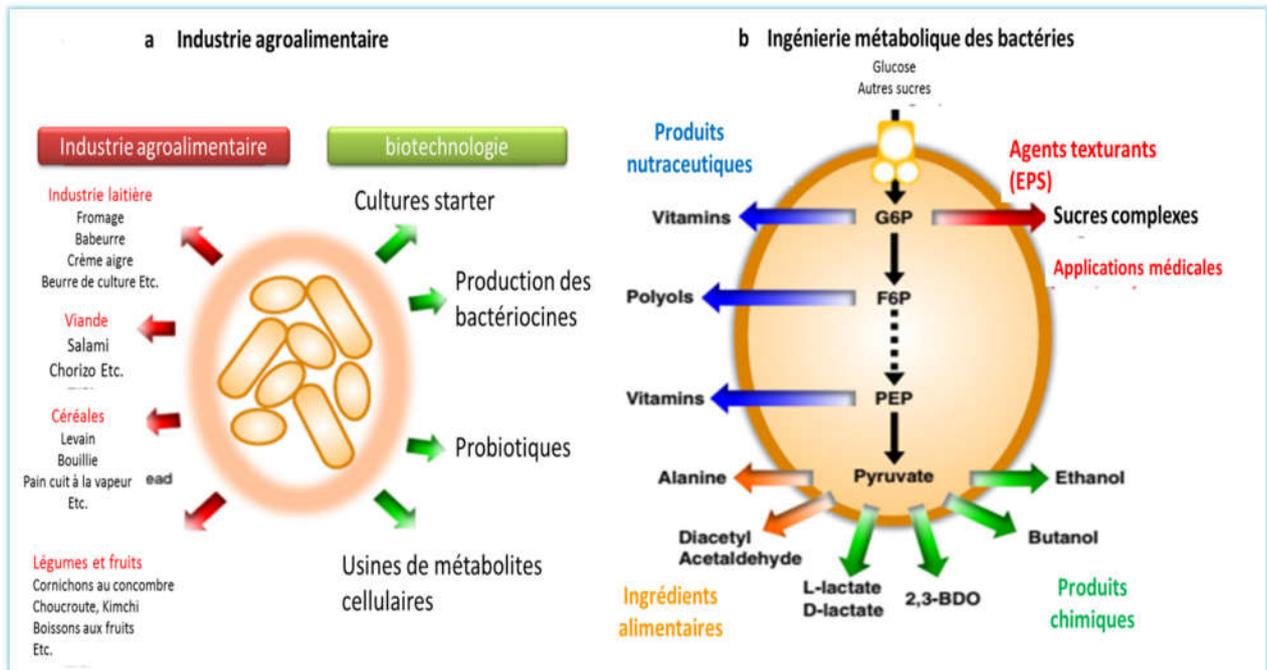
Les entérocoques se retrouvent dans un large éventail d'environnements écologiques différents, y compris le sol, les eaux de surface, les eaux usées (Švec et al., 2001 et 2005 ; Niemi et al., 2012 ; Sístek et al., 2012 ; Sedláček et al., 2013), dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux (Ruoff, 1990 ; Devriese et al., 1994 ; Devriese et Pot, 1995 ; Leclerc et al., 1996 ; Strompfová et Lauková, 2009). Certaines espèces d'*Enterococcus* sont typiquement associées aux plantes comme *Ec. faecium*, *Ec. faecalis*, *Ec. sulfureus*, *Ec. mundtii*, *Ec. casseliflavus* et *Ec. plantarum* (Müller et al., 2001 ; Ott et al., 2001 ; Švec et al., 2012). Leur large distribution dans la nature, par rapport aux autres genres, s'explique probablement par leur persistance et leur résistance aux facteurs inhibant la croissance tels que l'acidité, le sel, le séchage, la chaleur et les désinfectants chimiques (Holzapfel et al., 2002).

L'importance industrielle des entérocoques repose sur leur utilisation comme probiotiques, ainsi que comme cultures de départ dans les fermentations alimentaires. Les entérocoques utilisés comme probiotiques sont principalement préparés sous forme de préparations pharmaceutiques pour soulager les symptômes et réduire la durée des maladies diarrhéiques gastro-intestinales causés par des pathogènes, ainsi que la diarrhée associée aux antibiotiques (Buydens et Debeuckelaere, 1996 ; D'Souza et al., 2002 ; Allen et al., 2004). De nombreuses études ont porté sur l'utilisation des entérocoques, en particulier des souches productrices de bactériocines, en tant que cultures protectrices dans les fermentations des viandes et des légumes pour inhiber les agents pathogènes d'origine alimentaire tels que *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* (Foulquie-Moreno et al., 2006 ; Franz et al., 2007 ; Gálvez et al., 2008 ; Giraffa, 2003 ; Hugas et al., 2003 et Khan et al., 2010). Les entérocoques produisent une vaste gamme de bactériocines ce qui leur fait de bons candidats pour la préservation des aliments, il a été suggéré que les entérocoques améliorent les caractéristiques sensorielles des fromages et saucisses pendant la maturation (Giraffa, 2003 ; Hugas et al., 2003). Ils ont généralement une faible capacité d'acidification

(Aymerich *et al.*, 2000 ; Sarantinopoulos *et al.*, 2001 ; Giraffa, 2003). L'activité protéolytique vis-à-vis de la caséine du lait est très importante pour la maturation du fromage (Giraffa, 2003). L'activité lipolytique des entérocoques aboutie à la maturation du fromage et du développement de l'arôme et de la texture (Giraffa, 2003). Ils produisent des EPS pour protéger le processus de fermentation et pour développer la texture crémeuse de certains produits alimentaires. Enfin, dans l'application actuelle, plusieurs entérocoques sont des cultures d'adjuvants probiotiques appliquées au fromage Cheddar (Jamaly *et al.*, 2010).

### **1.5. Activités d'intérêt biotechnologique des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont importantes pour l'industrie alimentaire car elles sont utilisées comme starters ou non-starter au cours de la production d'aliments fermentés. Elles jouent un rôle reconnu dans la préservation et la sécurité microbienne des aliments fermentés (Caplice et Fitzgerald, 1999), favorisant ainsi la stabilité microbienne des produits finaux (Mensah *et al.*, 1991). Les effets de protection sont issus de la production d'acides organiques, de CO<sub>2</sub>, d'éthanol, de peroxyde d'hydrogène et de diacétyl, des composés antifongiques, les bactériocines et les composés protéiques apparentés, et les antibiotiques (De Vuyst et Vandamme, 1994; Hölzel *et al.*, 2000; Lavermicocca *et al.*, 2000; Atrih *et al.*, 2001). Pendant le processus de fermentation, les bactéries lactiques influencent également les propriétés sensorielles d'un produit, y compris le développement du goût. Les composés aromatiques sont formés par divers processus, tels que les conversions de lactose et de citrate (glycolyse et le métabolisme du pyruvate), la lipolyse et la protéolyse (van Kranenburg *et al.*, 2002). Bien que le lactose est principalement converti en lactate, une fraction du pyruvate intermédiaire peut également être convertie en divers composés aromatiques tels que le diacétyl, l'acétoïne, l'acétaldéhyde ou l'acide acétique, dont certains, avec des quantités bien équilibrées, contribuent avantageusement aux saveurs typiques des aliments fermentés (Pastink *et al.*, 2008). Pour ces raisons, de nombreuses espèces de bactéries lactiques ont de grandes applications industrielles dans plusieurs fermentations alimentaires (Pot, 2008).



**Figure 14: Applications des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie.**

Abréviations : G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; et PEP, phosphoenolpyruvate.

### 1.5.1. Pouvoir acidifiant et métabolisme des sucres

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne et, par conséquent, de la chute du pH (**Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Klingberg *et al.*, 2005 ; Visessanguan *et al.*, 2006 ; Monnet *et al.*, 2008**). Ces carbohydrates peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). Le catabolisme des sucres fournit l'énergie nécessaire à l'anabolisme sous forme d'ATP et génèrent des coenzymes réduits sous forme de NADH essentiellement (**Loubière et Bousquet, 2009**). Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphoenolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide et le système perméase énergie dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (**Konings *et al.*, 1994**). Trois voies du métabolisme des sucres sont utilisées chez les bactéries lactiques : la voie homofermentaire, la voie hétérofermentaire et la voie bifide (**Thomson et Gentry-Weeks, 1994**). Ces voies métaboliques aboutissent au pyruvate, intermédiaire clé du métabolisme des bactéries lactiques. Chez les lactocoques et les lactobacilles homofermentaires, le pyruvate est converti majoritairement en lactate via la lactate déshydrogénase LDH, cette réaction

permettant la régénération du D-lactate, du L-lactate ou un mélange racémique de D/L est produit. Les bactéries qui forment la forme L (+) ou la forme D (-) ont deux lactate déshydrogénases (LDH), qui diffèrent par leur stéréospécificité. Certains lactobacilles produisent la forme L (+) induisant par son accumulation une racémase, qui le convertit en acide D (-) lactique jusqu'à l'obtention de l'équilibre (**Narayanan et al., 2004**). Les bactéries hétérolactiques possèdent le système glycéraldéhyde-P déshydrogénase, mais sont en général dépourvues des autres enzymes de la glycolyse et en particulier de fructose-6P kinase. Par contre, elles ont une phosphocétolase. Parmi les lactobacilles hétérolactiques, certains sont dits "obligatoires" : ils produisent 50% d'acide lactique à partir du glucose ; d'autres sont dits "facultatifs" : ils produisent 85% d'acide lactique. Du fait de l'activité acidifiante, la dose d'adjonction des ferments lactiques dépend principalement de leur potentiel à se développer dans le produit cible. Pour la plupart des fermentations (**Lücke, 2000**).

Le lactose absorbé par le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate-dépendant (PTS) pénètre dans le cytoplasme sous forme de lactose phosphate (**Chassy et Alpert, 1989**) où il est clivé en glucose et galactose-6-phosphate. Le galactose-6-phosphate est métabolisé par la voie du tagatose-6-phosphate, tandis que la voie de Leloir est utilisée par les bactéries lactiques fermentant le galactose (**Konings et al., 1989**) Le glucose est phosphorylé et métabolisé soit par la voie des pentoses phosphates, soit par la voie EMP (glycolyse). Ceci se produit chez toutes les bactéries lactiques, sauf les leuconostocs, les lactobacilles obligatoirement hétérofermentaires, les oenocoques et les weissellas, et donne deux moles d'acide lactique pour une mole de glucose (**Axelsson, 2004**).

Le maltose, l'hydrate de carbone fermentescible le plus abondant dans les céréales, est dégradé par un certain nombre de bactéries lactiques. Un clivage du maltose donne du  $\beta$ -glucose-1-phosphate et du glucose (**Vogel et al., 1994**). Le glucose-1-phosphate est ensuite transformé en glucose-6-phosphate, qui est ensuite métabolisé par la voie des pentoses phosphates (**Stolz et al., 1993; Gobbetti et al., 1994**).

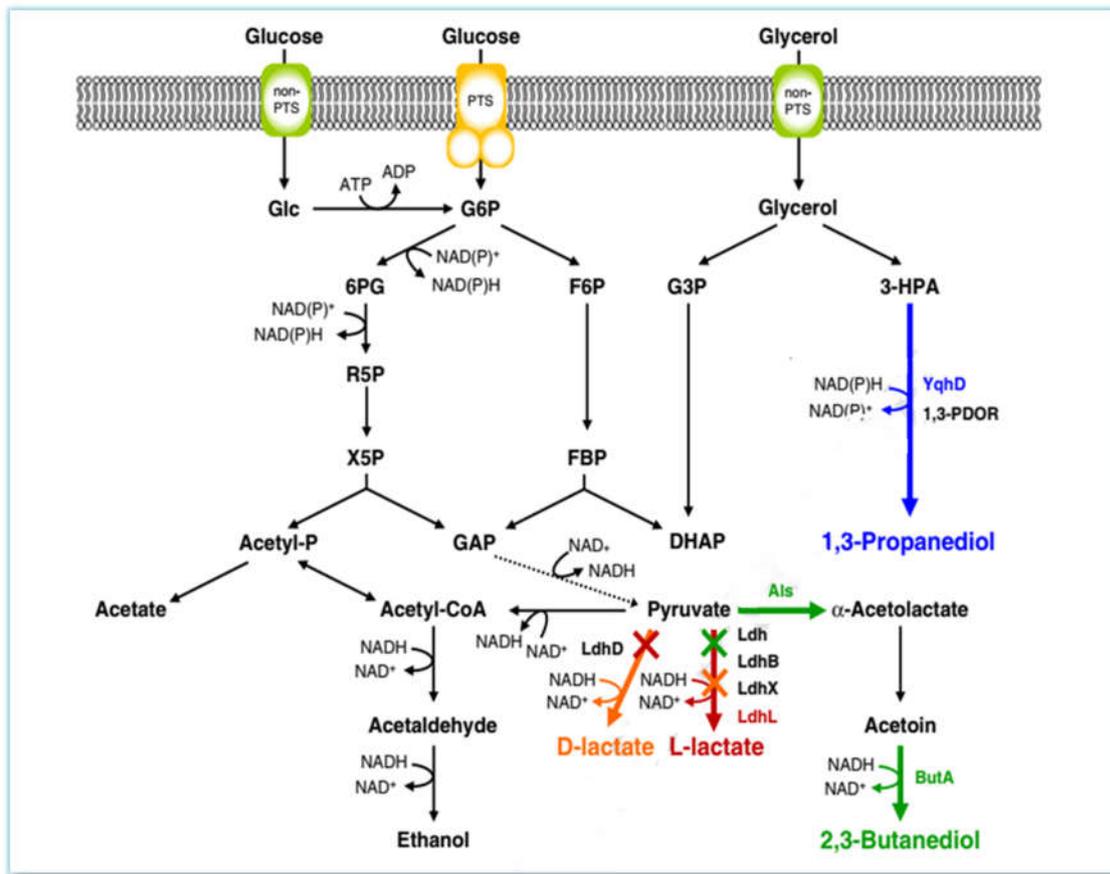
Le fructose peut être utilisé comme source de carbone par *Lb. sanfranciscensis* et *Lb. pontis*. Cependant, en présence du maltose ils l'utilisent principalement comme accepteur d'électrons, produisant du mannitol, notamment lorsque l'oxygène est épuisé (**Gobbetti et al., 1995; Stolz et al., 1995 ; Wolfrum et Vogel, 1999**).

La production d'acide lactique à partir d'hexoses est une activité métabolique particulière des bactéries fermentatives tels que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* qui sont couramment employées comme cultures de départ pour la transformation industrielle de produits laitiers fermentés, de viande, de céréales et de légumes. D'autre part, L'acide lactique a été traditionnellement utilisé dans l'industrie alimentaire en tant qu'agent de conservation et d'arôme. Cependant, le marché mondial de cet acide organique est principalement alimenté par la demande croissante des industries pharmaceutiques et des entreprises de production des plastiques biodégradables, qui

utilisent l'acide lactique comme précurseur pour la production d'acide polylactique et de lactate d'éthyle. L'acide polylactique (PLA) est une matière première importante pour améliorer les propriétés physiques dans la production des emballages alimentaires, ustensiles en plastique, sacs à ordures et feuilles de plastique agricole et, par conséquent, un bon substitut aux plastiques synthétiques dérivés actuellement de matières premières pétrolières (**Ajioka et al., 1995 ; Ohara, 2003 ; Datta et Henry, 2006**).

Le développement de nouveaux polymères tels que l'acide polylactique stéréocomplexe, un polymère hautement thermostable composé à la fois de monomères d'acide lactique (L) et (D), a suscité un nouvel intérêt pour la production de la forme (D) de l'acide lactique (**Okano et al., 2009; Yoshida et al., 2011**). L'ingénierie métabolique des souches de bactéries lactiques a été considérée comme un moyen améliorant le rendement de l'acide lactique et la pureté optique dans les processus de fermentation (**figure 15**). Par exemple, la production d'acide L-lactique par une souche de *Lactobacillus helveticus* a été réalisée par délétion du gène *ldhD* (**Bhowmik et Steele, 1994**). Aussi par *Lb. helveticus*, la production de la forme (L) a été obtenue avec un rendement élevé en remplaçant le gène *ldhD* par une copie supplémentaire du gène *ldhL* (**Kylä-Nikkilä et al., 2000**). Chez *Lactobacillus johnsonii*, l'inactivation du gène *ldhD* a également entraîné la production d'acide L-lactique, mais le diacétyle et l'acétoïne se sont formés comme produits secondaires (**Lapierre et al., 1999**). La délétion du gène *ldhL* dans *Lb. plantarum* a abouti à la production de l'acide D-lactique pur, mais dans cet organisme, la surexpression du gène *ldhL* n'a pas eu d'effet significatif sur la production d'acide L- et D-lactique (**Ferain et al., 1994**).

La production fermentaire d'acide lactique à partir de ressources renouvelables, telles que les résidus agro-industriels, a attiré beaucoup d'attention ces dernières années. En particulier, des hydrolysats lignocellulosiques ont été proposés comme substrats pertinents. Comme dans d'autres procédés destinés à utiliser ce type de résidus pour la production de produits chimiques, le développement d'organismes utilisant tous les types de sucres présents dans les hydrolysats, c'est-à-dire les hexoses et les pentoses, est un enjeu majeur. (**Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000 ; Tanaka et al., 2002**). Dans ce contexte, l'accent mis sur les approches d'ingénierie métabolique pour l'utilisation des pentoses est pleinement justifié (**Okano et al., 2009; Yoshida et al., 2011**). À cette fin, **Yoshida et al. (2011)** ont introduit deux copies de l'opéron *xylAB* de *Lactobacillus pentosus* dans le génome de *Lb. plantarum*, La souche résultante était capable de fermenter un mélange de 25 g.l<sup>-1</sup> de xylose et de 75 g.l<sup>-1</sup> de glucose et de produire de l'acide D-lactique avec un rendement de 0,78 g.g<sup>-1</sup> de sucre consommé. Une stratégie réussie également été mise en œuvre pour *Lb. plantarum* dont la fermentation de l'arabinose et la production d'acide lactique avec un rendement de 0,82 g.g<sup>-1</sup> d'arabinose consommé (**Okano et al., 2009**). En supprimant le gène de la phosphocétolase et en sur-exprimant un gène hétérologue de la transcétolase, les auteurs ont pu déplacer le flux de carbone de la voie de la phosphocétolase à la voie du pentose phosphate, évitant ainsi la coproduction de l'acétate.



**Figure 15: Ingénierie métabolique pour la production du L-lactate (rouge), du D-lactate (orange), du 2,3-butanediol (vert) et du 1,3-propanediol (bleu) (Gaspar *et al.*, 2013).**

Les enzymes surproduites ou inactivées sont représentées par des flèches ou des croix épaisses, respectivement. Abréviations: Glc, glucose; G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; FBP, fructose 1,6-bisphosphate; GAP, glycéraldéhyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; 6PG, 6-phosphogluconate; R5P, ribulose 5-phosphate; X5P, le xylulose 5-phosphate; G3P, glycérol 3-phosphate; 3-HPA, 3-hydroxypropionaldéhyde; LdhD, D-lactate déshydrogénase (*Lactobacillus* spp.); LdhL, L-lactate déshydrogénase (*Lactobacillus* spp.); Ldh, L-lactate déshydrogénase (*Lc. lactis*); LdhB, L-lactate déshydrogénase B (*Lc. lactis*); LdhX, L-lactate déshydrogénase X (*L. lactis*); Als -  $\alpha$ -acétolactate synthase (*Lc. lactis*); ButA - acétoïne réductase (*Lc. lactis*); 1,3-PDOR, 1,3-propanediol oxydoréductase; et YqhD, alcool déshydrogénase. Les flèches pointillées représentent plusieurs étapes consécutives.

Plusieurs travaux sur l'aptitude des entérocoques à acidifier le lait ont été rapportés. En général, les entérocoques présentent une faible activité acidifiante du lait. **Morea *et al.* (1999)** ont montré que le pH du lait après 24 h d'inoculation avec des souches isolées à partir du fromage Mozzarella n'a pas baissé en dessous de 5,5. Des recherches sur des entérocoques isolés du lait ont confirmé leur faible pouvoir acidifiant dans le lait avec seulement quelques souches présentant un pH inférieur à 5,0-5,2 après 16-24 h d'incubation à 37 °C (**Andrighetto *et al.*, 2001 ; Durlu-Ozkaya *et al.*, 2001 ; Sarantinopoulos *et al.*, 2001**). Il a été également observé que l'espèce *E. faecalis* est généralement plus acidifiante que l'espèce *E. faecium*. (**Suzzi *et al.*, 2000**). Il semble donc y avoir effectivement chez les entérocoques une aptitude à l'acidification caractéristique de l'espèce.

On croit que l'habitat original de *Lc. lactis* est des plantes puisque ces souches ont la capacité de métaboliser de nombreux hydrates de carbone dérivés de plantes comme le raffinose (figure 16).

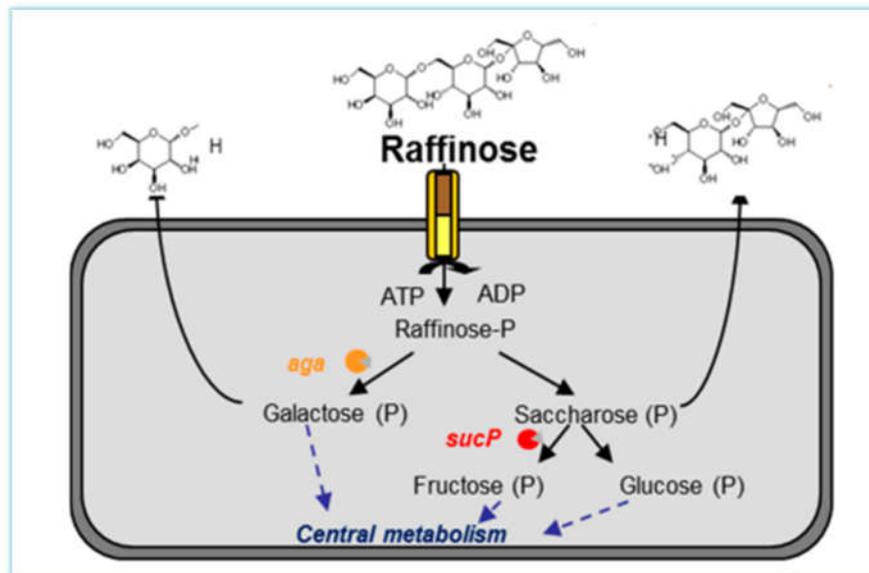


Figure 16: Métabolisme du raffinose chez *Lc. lactis subsp lactis* (Laroute *et al.*, 2017).

La capacité de la fermentation du lactose est une caractéristique typique des lactocoques codées par des plasmides (Mills *et al.*, 2010). Des données plus récentes suggèrent que certains lactocoques emploient un système lactose perméase- $\beta$ -galactosidase codé chromosomiquement (Aleksandrak-Piekarczyk, 2013). *Lc. lactis* a été la principale cible de l'ingénierie métabolique parmi les bactéries lactiques. La régulation de la glycolyse et le déplacement entre les différents modes de fermentation ont été largement étudiés chez *Lc. lactis* (Even *et al.*, 2001), et il a été démontré que l'activité de la phosphofructokinase (PFK) joue un rôle important dans le flux glycolytique (Andersen *et al.*, 2001). Des souches de *Lc. lactis* présentant une activité PFK modifiée ont été construites grâce à l'introduction du gène *pfkA* d'*Aspergillus niger* et les effets de l'augmentation des niveaux d'activité PFK sur la capacité glycolytique de *Lc. lactis* ainsi que la production d'acide lactique ont été examinés (Papagianni et Avramidis, 2011). Une double augmentation de l'activité PFK spécifique a entraîné une augmentation proportionnelle du taux maximum d'absorption du glucose et de formation de lactate (Papagianni et Avramidis, 2011).

### 1.5.2. Activité protéolytique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques nécessitent, selon l'espèce, de 6 à 14 acides aminés différents qu'elles ne sont pas capables de synthétiser (Kunji *et al.*, 1996; Letort *et al.*, 2002). Les souches fortement adaptées à la niche laitière nécessitent de nombreux acides aminés mais les souches environnementales en nécessitent généralement moins (Ayad *et al.*, 1999). La croissance de nombreuses espèces est diauxique: un taux de croissance initial rapide, pendant que les acides aminés libres et les peptides sont utilisés, suivi d'une vitesse

légèrement plus lente pendant laquelle d'autres peptides et acides aminés sont obtenus par protéolyse (**Letort et al., 2002 ; Niven et al., 1998**). Les concentrations d'acides aminés dans le lait est trop faible ce qui favorise les bactéries lactiques à hydrolyser la caséine en petits peptides et acides aminés pour répondre à leurs besoins nutritionnels (**Steele, 1995**).

Bien qu'il existe des différences marquées dans la capacité protéolytique entre les différentes espèces de bactéries lactiques, de nombreuses souches sont connues pour posséder des systèmes protéolytiques qui leur permettent de se développer sur des substrats riches en protéines tels que la viande, certains légumes et le lait. Les bactéries lactiques ont une large gamme d'enzymes protéolytiques incluant une protéinase et une large gamme de peptidases ; les oligo-endorpeptidases, les di- et tri-peptidases, aminopeptidases, et un certain nombre de peptidases spécifiques à la proline (**Upadhyay et al., 2004 ; McSweeney, 2007**). De nombreux composants du système protéolytique des bactéries lactiques ont été purifiés et caractérisés et les gènes correspondants ont été clonés et séquencés (**Callanan et al., 2008**). Les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* ont un système protéolytique fonctionnel pour acquérir les acides aminés provenant du milieu de croissance ou de leurs habitats naturels. Ces systèmes protéolytiques sont constitués de protéinases, de systèmes de transport et de peptidases. Les protéinases sont sécrétées extracellulairement pour hydrolyser les protéines en oligopeptides, qui sont ensuite pris dans la cellule par les transporteurs, afin d'être dégradée par des peptidases intercellulaires (**Christensen et al., 1999, Fadda et al., 1998**). Les entérocoques ont une activité protéolytique faible par rapport à d'autres bactéries lactiques comme *Lactobacillus* et *Lactococcus* (**Ahmadova et al., 2011**).

Les souches appartenant à *Lactobacillus* présentent une activité plus faible que celles appartenant à *Lactococcus*, mais une activité plus élevée que les propionibactéries (**Tobiassen et al., 1997**). Néanmoins, les caractéristiques de l'activité protéolytique ont été décrites pour plusieurs souches appartenant à diverses espèces, dont *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum* et *Lb. acidophilus* (**Oneca et al. 2007 ; El-Ghaish et al., 2010**). Le système protéolytique été caractérisé génétiquement et biochimiquement pour certaines espèces (*Lb. plantarum* et *Lb. sanfranciscensis*) (**Vermeulen et al., 2005**). Le niveau et la spécificité de l'activité protéolytique entre les espèces de *Lactobacillus* varient, même pour des souches de la même espèce (**Pereira et al., 2001 ; Oberg et al., 2002**); certaines souches peuvent avoir une activité 15 fois plus élevée que d'autres (**Awad et al., 2001**). Les principaux facteurs affectant l'activité protéolytique des souches de *Lactobacillus* sont le pH, la température, les ions métalliques et la présence d'inhibiteurs (**Abraham et al., 1993**).

La plupart des lactocoques ont besoin de glutamate, de méthionine, de valine, de leucine, d'isoleucine et d'histidine pour la croissance et de nombreuses souches présentent des exigences pour la phénylalanine, la tyrosine, la lysine et l'alanine. Cette demande en acides aminés est due à l'absence des gènes nécessaires à la biosynthèse ou à la mutation

dans les gènes (**Bolotin et al., 2001**). Le système protéolytique des lactocoques se compose d'une protéase de l'enveloppe cellulaire (CEP), de systèmes de transport des peptides et de peptidases intracellulaires (**Savijoki et al., 2006 ; Doeven et al., 2005**). La CEP de *Lc. lactis* été la première CEP clonée et caractérisée (**Kok et al., 1988 ; Siezen, 1999**). L'enzyme est une protéase à sérine de type subtilisine, ancrée à la paroi cellulaire par l'extrémité C-terminale, elle clive la caséine en oligopeptides de tailles variables. Les peptides générés peuvent être transporté à l'intérieur de la cellule par plusieurs systèmes de transport dont les plus importants d'entre eux sont Opp et Dpp. Le système Opp est responsable du transport de peptides dont la taille peut aller jusqu'à 18 acides aminés. Plus petit, les peptides sont manipulés par des transporteurs di- et tripeptidiques, tels que DtpT et Dpp (**Hagting et al., 1994; Foucaud et al., 1995**). Une fois à l'intérieur, les peptides sont décomposés par un grand nombre de peptidases (**figure 17**) y compris au moins deux aminopeptidases (Pep N et Pep C), 2 tripeptidases (Pep T et Pep 53) et deux dipeptidases (Pep V et Pep D) qui libèrent des acides aminés uniques à partir de l'extrémité N-terminale des substrats appropriés et une oligopeptidase (Opp). Deux endopeptidases différentes (Pep O et Pep F) ont également été identifiées chez *Lc. Lactis*, elles hydrolysent les liaisons peptidiques internes dans les peptides mais pas dans les caséines. La teneur en proline de la caséine est assez élevée et beaucoup de peptides contenant de la proline ont un goût amer. Des peptidases spécifiques, appelées prolidases (Pep Q), aminopeptidase P (Pep P), X-prolyl-dipeptidyl amino peptidase (Pep X), prolinase (Pep R) et proline iminopeptidase (Pep I) hydrolysent les peptides à partir de la proline et aident ainsi à réduire l'amertume (**Christensen et al., 1999**).

Les systèmes protéolytiques contribuent aux changements biochimiques au cours de la maturation de divers produits laitiers fermentés et produits non laitiers, ce qui aboutit à la production de peptides bioactifs avec des effets immunologiques et sanitaires (**Matar et al., 2001**). L'activité protéolytique des souches de *Lb. plantarum* peut jouer un rôle dans la prévention de la formation de la toxine de *Clostridium botulinum* dans les aliments réfrigérés (**Skinner et al., 1999**). Des travaux assez récents suggèrent que l'activité protéolytique de certaines souches de *Lb. bulgaricus* peut aider à développer des produits laitiers hypoallergéniques (**Pescuma et al., 2011**). La dégradation des protéines est l'événement majeur de la maturation du fromage. Cette dégradation modifie les aspects texturaux du fromage et favorise le développement du goût. Par la rupture des liaisons protéiques, le caillé est transformé en une masse molle qui contient un certain nombre de peptides et d'acides aminés de bas poids moléculaire qui sont des précurseurs d'un certain nombre de composés aromatiques (**McSweeney et Sousa 2000 ; Sousa et al., 2001; Yvon et Rijnen, 2001 ; Ganesan et al., 2007**).

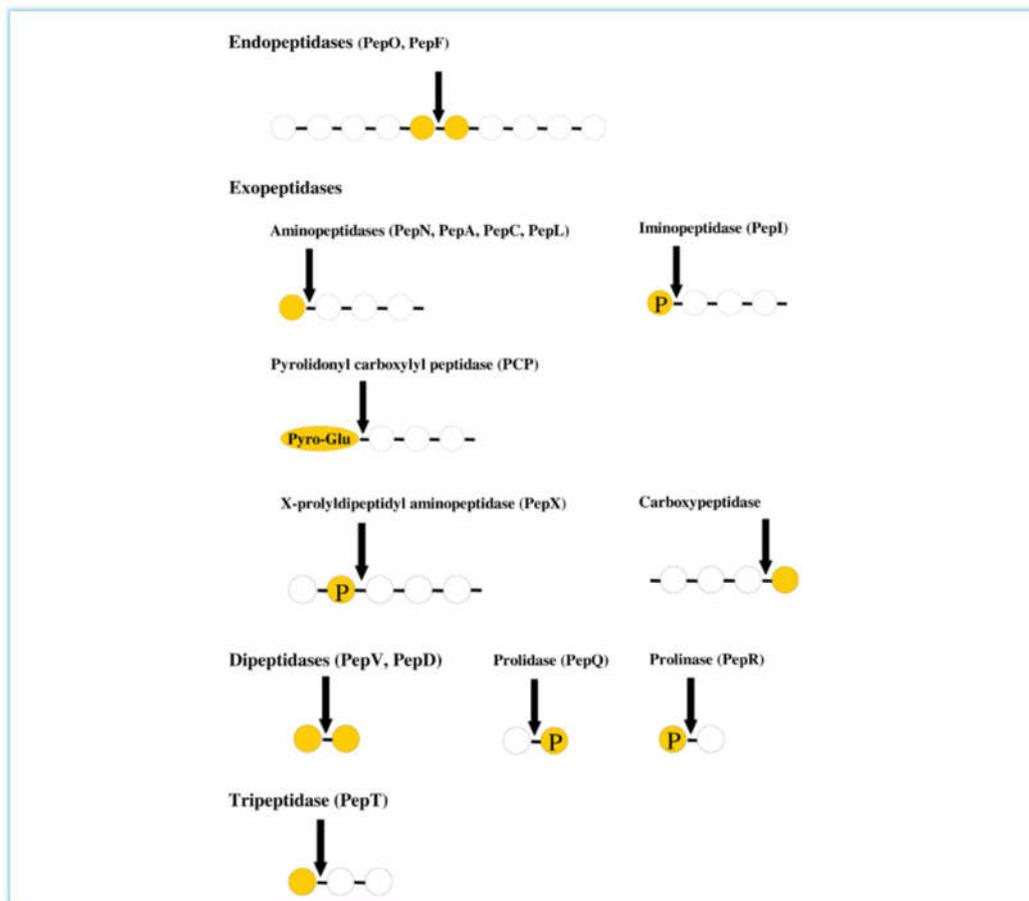


Figure 17: Représentation schématique de l'action des peptidases trouvées dans les bactéries lactiques (McSweeney *et al.*, 2017).

Dans le yaourt, la protéolyse ne détermine pas les propriétés organoleptiques, mais l'activité protéolytique est fortement impliquée à la fois dans la nutrition et dans les interactions des bactéries de yaourt, puisque les bactéries lactiques ne peuvent pas synthétiser les acides aminés essentiels. Donc, ils ont besoin d'une source d'azote exogène et utilisent des peptides et des protéines dans leur milieu de croissance par des systèmes enzymatiques plus ou moins complexes (Vasiljevic et Shah, 2008 ; Swaisgood, 2010).

Le système protéolytique des bactéries lactiques peut être modifié génétiquement par exemple, l'expression recombinante de différentes peptidases dérivées de *Lb. helveticus* ou *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* contrôlée par des promoteurs inductibles améliore l'activité protéolytique de *Lc. lactis* (Desfossés-Foucault *et al.*, 2013). La surexpression du gène de la peptidase pepN ou pepC dans *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NM1 a augmenté le niveau des acides aminés libres spécifiques dans le fromage et améliore les propriétés aromatisantes (McGarry *et al.*, 1994).

### 1.5.3. Activité lipolytique et estérasique des bactéries lactiques

La matière grasse du lait (constituée à 98 % de triglycérides) joue un rôle important dans l'aromatisation des fromages; non seulement du fait de leur pouvoir aromatisant, mais

aussi en tant que précurseur d'arômes. L'hydrolyse des lipides, lors de l'affinage, est un phénomène qui a été largement décrit (**Molimard et Spinnler, 1996 ; Fox et Wallace, 1997 ; Mc Sweeney, 2004**). Tout comme les bleus, le Camembert est le fromage présentant une forte dégradation de la matière grasse suite à la lipolyse, ce qui entraîne la libération de substances saturées, insaturées, et d'acides gras libres. Les acides gras saturés libèrent des méthylcétones et des alcools secondaires (pentan-2-ol, heptan-2-ol) à travers une série de réactions enzymatiques. Les acides gras insaturés libèrent des lactones, des aldéhydes, des alcools et des acides. Les lactones sont des composés cycliques trouvés pour améliorer l'arôme du fromage, du yogourt, et des produits laitiers. Les alcools libérés pendant la lipolyse par les bactéries lactiques peuvent se combiner avec des acides gras libres pour libérer des esters aromatiques comme l'acétate d'éthyle et l'acétate de butyle (**Marilley et Casey, 2004**). Mais il est à noter que l'hydrolyse des lipides comme origine d'une grande diversité de composés volatils rencontrés dans les produits laitiers peut entraîner l'apparition de saveurs rance, d'amertume ou de goût de savon (**Molimard et al., 1997**). Les acides gras volatils à chaîne courte sont responsables de l'arôme rance du lait (**El Soda et al., 1995**).

La lipolyse est la dégradation de la matière grasse suite à l'action des lipases qui décomposent les glycérides en glycérol et acides gras libres. La dégradation des triglycérides est souvent partielle avec production des mono et diglycérides intermédiaires (**Jamotte, 1967**). La lipolyse affecte en premier lieu le lait lui-même et les produits frais. Mais elle peut aussi se développer dans les beurres, les crèmes et les produits de haute teneur en matière grasse. L'incidence de la lipolyse peut être moindre pour les fromages car c'est un phénomène qui peut apparaître naturellement au cours de l'affinage.

Les lipases et les estérasés des bactéries lactiques sont intracellulaires et des bactéries comme *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et subsp. *lactis* montrent des niveaux élevés d'activité estérasique par rapport à l'activité lipasique (**Hofi et al., 2011**). Le contenu en enzymes lipolytiques des bactéries lactiques a tout d'abord été exploré à l'aide de zymogrammes : électrophorèse en conditions natives des protéines totales suivi d'une détection de l'activité à l'aide de substrats chromogènes. Diverses études suggèrent l'existence de plusieurs enzymes lipolytiques de type estérasés chez les bactéries lactiques. Plusieurs de ces estérasés ont été purifiés et caractérisés à des degrés divers chez *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Streptococcus thermophilus* (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Certains lactocoques ont des activités estérasiques qui attaquent les mono- et les diglycérides du lait, libérant préférentiellement des acides gras à chaîne courte et des esters (**Holland et al., 2002 ; Nardi et al., 2002**). Certains estérasés sont extracellulaires (**Crow et al., 1994**). Une activité lipolytique significative peut se produire dans la cuve de fabrication des fromages, car ces enzymes ont un accès plus facile aux lipides pendant la maturation (**Hickey et al., 2006**). La contribution des estérasés des starters lactiques été signalée comme

plus importante que la contribution des bactéries non starter à la lipolyse dans le fromage cheddar fabriqué à partir de lait pasteurisé de bonne qualité (**Hickey et al., 2006**). Chez *Lactococcus lactis*, une seule estérase a été décrite et purifiée. Les données génétiques indiquent que parmi les protéines codées par des gènes du chromosome de *Lactococcus lactis*, une seule est homologue à des estérases (**Bolotin et al., 2001**). Pour d'autres espèces de bactéries lactiques, jusqu'à deux ou trois estérases ont été identifiées et caractérisées dans une même souche (**Fenster, 2003**). Trois points communs se dégagent pour les estérases de bactéries lactiques :

1. elles hydrolysent préférentiellement des esters comportant des chaînes d'acides gras en C4 et C6 ; Certains esters sont des composés aromatiques volatils importants que l'on trouve le plus souvent dans le fromage. Ils contribuent non seulement au goût mais aussi à l'arôme des produits laitiers. En général, de faibles concentrations en esters sont souhaitables pour l'équilibre global de la saveur ;
2. elles sont inhibées par des inhibiteurs d'enzymes à sérines ce qui permet de les classer dans la famille des hydrolases possédant une sérine dans leur site actif ;
3. elles sont très majoritairement décrites comme étant des enzymes localisées à l'intérieur de la bactérie ce qui est confirmé par des données génétiques.

Les lipases et les estérases des lactocoques et des lactobacilles sont probablement les principaux agents lipolytiques dans les fromages de type cheddar et hollandais fabriqués à partir de lait pasteurisé. L'activité lipasique et estérasique des bactéries lactiques semblent être intracellulaires (**Khalid et al., 1990, Gobbetti et al., 1996**). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a une activité lipolytique plus élevée que *Lc. lactis* subsp. *lactis* (**Kamaly et al., 1990**). De plus, il existe des différences entre les enzymes libérées par les deux souches (**Collins et al., 2004**). Les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sont connues pour induire une saveur fruitée dans le fromage cheddar en raison de la production d'esters (**Nardi et al., 2002**).

De nombreuses études ont été réalisées sur les activités lipolytiques et estérolytiques de *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. fermentum* et *Sc. thermophilus* (**Upadhyay et al., 2004**). Bien que les bactéries starters de yogourt aient une capacité lipolytique limitée, la lipolyse contribue au développement de l'arôme et du goût dans le yogourt. La lipase de *Sc. thermophilus* hydrolyse la tributyrine et la trioléine, mais cette enzyme montre une activité assez faible sur la matière grasse du lait (**Tamime et Deeth, 1980**). *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* possède une estérase intracellulaire qui agit sur l'ortho- et le para-nitrophényle (**El-Soda et al., 1986 ; Khalid et al., 1990**).

Concernant l'activité lipolytique des entérocoques, les données sont limitées et souvent contradictoires. Le premier travail concernant la lipolyse chez les entérocoques a été réalisé par **Lund (1965)**, qui a déterminé par électrophorèse la présence d'estérases dans des extraits sans cellules de *En. faecalis*, *En. faecium* et *En. durans*. **Carrasco de**

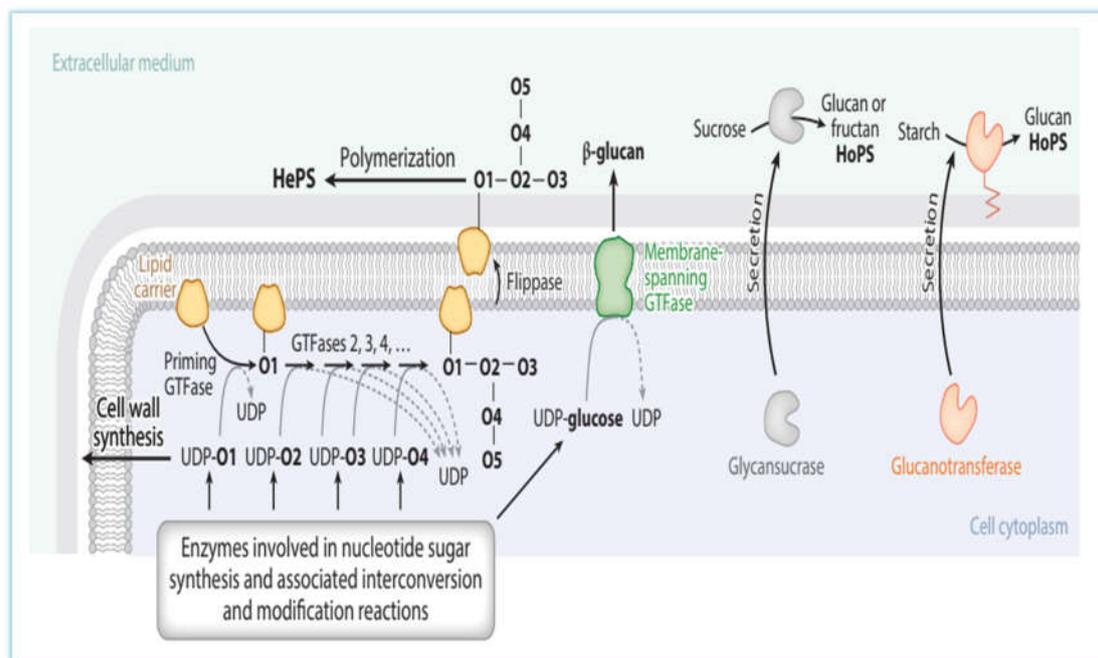
**Mendoza et al. (1992)** ont conclu que l'activité lipolytique des entérocoques dans le lait dépendait de la souche. La plupart des souches examinées ont montré une faible activité et seulement quelques souches appartenant à l'espèce *En. faecalis* ont été caractérisées comme lipolytiques. **Tsakalidou et al. (1994)** ont décrit la purification et la caractérisation d'une estérase intracellulaire d'*En. faecium* isolée du fromage Feta. L'enzyme, avec une masse moléculaire de 45 kDa, a une activité optimale 35 °C et pH 8,0. **Villani et Coppola (1994)** ont signalé que les entérocoques ont montré une faible activité lipolytique lorsqu'ils étaient cultivés en lait. Cependant, **Tavaria et Malcata (1998)** ont suggéré qu'une souche d'*En. faecium* isolée du fromage a pu hydrolyser les graisses du lait mieux que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Ceci a été confirmé par divers travaux sur des entérocoques isolés de fromages qui montrent une bonne activité estérolytique (**Hemati et al., 1998 ; Suzzi et al., 2000 ; Durlu-Ozkaya et al., 2001**).

#### 1.5.4. Production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques

Les exopolysaccharides sont des polysaccharides à longue chaîne constitués d'unités ramifiées répétées de sucres ou de dérivés de sucres. Ces unités de sucre sont principalement le glucose, le galactose et le rhamnose, dans des rapports différents. La longueur et la composition des ramifications affectent fortement les propriétés rhéologiques des EPS (**Vincent et al. 2001**). Les EPS produits par les bactéries lactiques sont une source importante d'alternatives naturelles aux additifs commerciaux d'origine végétale ou animale. La plupart des additifs utilisés sont modifiés chimiquement pour améliorer les propriétés rhéologiques du produit (**Gibson et Roberfroid, 1995**). L'utilisation des EPS des bactéries lactiques peut aboutir à un produit final sûr, naturel et sain avec une texture et une stabilité améliorées, ce qui peut avoir un impact important sur le développement de nouveaux produits. Les EPS sont sécrétés dans l'environnement externe sous forme de mucus (exopolysaccharides visqueux) ou adhèrent à la surface bactérienne cellulaire formant une capsule (exopolysaccharides capsulaires). Le rôle écologique des EPS pour la bactérie productrice peut avoir plusieurs facettes, comme fournir une protection et permettre la persistance dans diverses niches (formation de biofilms), ou elles peuvent être associées au catabolisme du carbone (**Schwab et al., 2007; Walter, 2008 ; Zannini et al., 2016**). Certaines souches de *Lactobacillus* productrices d'exopolysaccharides ont suscité l'intérêt des chercheurs (**Gajewska et Błaszczuk, 2010; Górska et al., 2007**) ; jusqu'à récemment environ 30 espèces de *Lactobacillus* productrices d'EPS ont été identifiées, les plus connues étant *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* et *Lb. johnsonii* (**Badel et al., 2011**). Les EPS diffèrent non seulement en termes de structure chimique, mais aussi d'arrangement spatial et de réactivité avec diverses protéines (**Welman et Maddox, 2003**).

Les EPS peuvent être divisés en hétéropolysaccharides (HePS) et en homopolysaccharides (HoPS), en fonction de la composition de la chaîne principale et de leurs mécanismes de synthèse. En général, Les HePS sont constitués de plus d'un type de

monosaccharide et synthétisés de manière intracellulaire, tandis que les HoPS sont composés d'un seul type de monosaccharide et sont produits par une enzyme sécrétée par la bactérie (**Badel et al., 2011**). Les HePS sont produits par des membres des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium*. Pour les souches de la même espèce, la teneur en monosaccharides des HePS produits peut varier. Par exemple, l'analyse de la composition en polymères des HePS produits par un certain nombre de souches de *Lactococcus lactis* indique la variation de la composition du sucre, allant de trois à six monosaccharides différents (**Suzuki et al., 2013**). Les HePS sont produites par la polymérisation de précurseurs sucre-nucléotide (par exemple, UDP-glucose et UDP-galactose) qui sont formés dans la cellule. Ces nucléotides ne sont pas entièrement impliqués dans la production d'EPS et sont utilisés dans la synthèse d'une variété de polysaccharides (**Welman et Maddox, 2003**) (**Figure 18**). En revanche, la formation d'EPS à partir de ces précurseurs est contrôlée par des gènes de glycosyltransférases qui, avec les gènes impliqués dans la régulation, la détermination de la longueur de chaîne et la polymérisation et l'exportation, sont généralement organisés en opéron et forment ce qu'on appelle un cluster de biosynthèse d'EPS (**Werning et al., 2012**).



**Figure 18: Mécanismes de synthèse des hétéropolysaccharides (HePSs), des homopolysaccharides (HoPSs) et du  $\beta$ -glucane chez les bactéries lactiques (Lynch et al., 2018).**

Les HePS sont synthétisés par l'action des glycosyltransférases intracellulaires. En revanche, HoPSs sont formés par les enzymes glycanases ou glucanotransférases sécrétés. Abréviations : GTFase, glycosyltransférase; UDP, uridine diphosphate; O1-O5, glycoside 1-glycoside 5.

Les HoPS sont des polymères d'un seul monosaccharide, soit le glucose ou le fructose, et sont appelés glucanes ou fructanes, respectivement. Ils sont synthétisés extracellulairement à partir de saccharose par l'action d'une enzyme unique connue sous le nom de glycanase (**Monsan et al., 2001**). Les HoPS sont produits par divers genres

lactiques, y compris *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* (van Hijum *et al.*, 2006 ; Dimopoulou *et al.*, 2016).

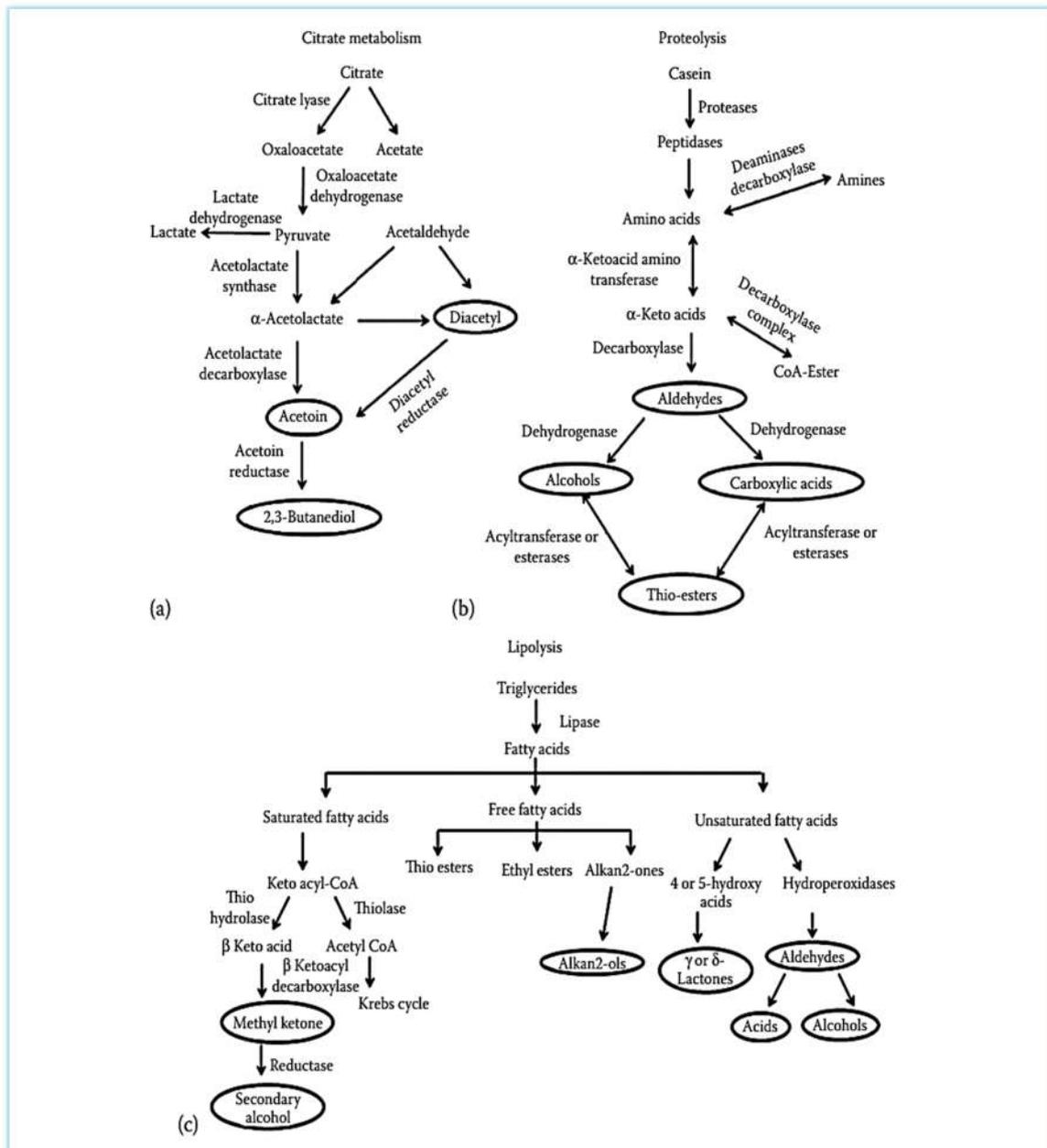
Depuis de nombreuses années, les EPS sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour améliorer la texture, les qualités sensorielles, les propriétés nutritionnelles et la stabilité des produits fermentés (Vuyst *et al.*, 2001 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Górska *et al.*, 2007). Les exopolysaccharides des bactéries lactiques sont principalement utilisés comme agents épaississants, stabilisants, liants et structurants grâce à leur comportement non newtonien et à leur viscosité en milieu aqueux (Freitas *et al.*, 2011). Ils jouent un rôle clé dans la production d'aliments fermentés, tels que les légumes, la viande et surtout les produits laitiers, améliorant également la consistance et le goût. Ils augmentent les sensations gustatives des consommateurs (Bernardeau *et al.*, 2008 ; Hamet *et al.*, 2015 ; Vinogradov *et al.*, 2015 ; Mende *et al.*, 2016). Ces aspects techno-fonctionnels des EPS sont généralement liés à leur capacité à lier l'eau et à retenir l'humidité (Costa *et al.*, 2010). En outre, l'utilisation des cultures productrices d'EPS a suscité l'intérêt de l'industrie des céréales et de la boulangerie, où leur nature hydrocolloïdale est étudiée comme un remplacement naturel pour les gommes alimentaires commerciales comme l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) (Galle *et al.*, 2012). Ils sont également largement utilisés dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques comme les biofloculants, les bioabsorbants. La recherche a également montré que les EPS de certaines souches de *Lactobacillus* peuvent être bénéfiques pour la santé et peuvent être utilisées dans la prévention des maladies humaines grâce à leurs propriétés anticancéreuses, antiulcéreuses, immunomodulatrices, antivirales et hypocholestérolémiantes (Freitas *et al.*, 2011; Malang *et al.*, 2015).

La connaissance des propriétés physiques et chimiques des exopolysaccharides et de leurs interactions avec d'autres ingrédients alimentaires est cruciale dans le développement des applications des EPS. Malgré le fait que les EPS de *Lactobacillus* sont des agents épaississants prometteurs, leur production n'est pas économique. Le concept récent de «démarrateurs fonctionnels» a été caractérisé comme des cultures qui «peuvent contribuer à la sécurité microbienne, ou offrir un ou plusieurs avantages organoleptiques, technologiques ou nutritionnels.» Cette définition correspond à *Lactobacillus* parce que, si ajouté aux aliments, ils peuvent produire des polymères *in situ*, créant des produits naturels aux propriétés rhéologiques améliorées (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Salazar *et al.*, 2009).

#### 1.5.5. Production d'arôme par les bactéries lactiques

L'activité métabolique des bactéries lactiques a un effet important sur le développement du goût pendant la fermentation. Elle comprend la conversion du sucre par la glycolyse et le métabolisme du pyruvate, en plus du métabolisme des lipides et des protéines. Le pyruvate agit comme un précurseur de plusieurs composés aromatiques, qui comprennent le diacétyl, l'acétaldéhyde et l'acétoïne. La lipolyse contribue au développement du goût dans le caillé, le yogourt, le babeurre et le fromage. De même, la

propriété protéolytique contribue à la formation de saveur et de texture (**figure 19**) (Marilley et Casey, 2004 ; Irygoyen *et al.*, 2007).



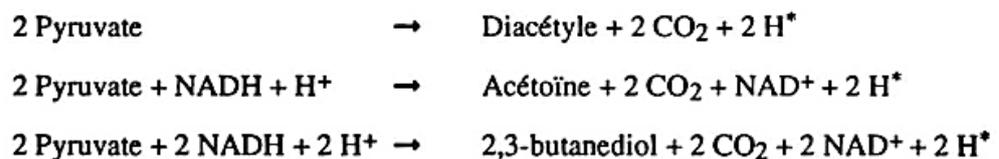
**Figure 19: Représentation schématique de la voie métabolique stimulant la production d'arôme: (a) métabolisme du citrate, (b) protéolyse et (c) lipolyse (Puniya, 2015).**

### 1.5.5.1. Métabolisme du citrate

Le citrate peut être trouvé dans les produits alimentaires fermentescibles tels que les fruits, les légumes, les céréales et le lait. La capacité de certaines souches à fermenter le citrate et à former le diacétyle est une propriété importante. Chez les bactéries lactiques l'utilisation du citrate est le plus souvent associée à *Leuconostoc* et des souches

sélectionnées de *Lactococcus*. Chez *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, elle est liée à des gènes portés par un plasmide de 8 kb, alors que chez *Leuconostoc*, ces gènes sont associés à des plasmides de 22 kb. La façon dont les bactéries lactiques fermentent le citrate a fait l'objet de débats considérables. Deux voies ont été proposées. Dans les deux voies, le citrate est transporté par CitP, dépendant du pH, qui a une activité optimale entre pH 5 et 6 (**Magni et al., 1996**). Le citrate est ensuite clivé par la citrate lyase pour former de l'acétate et de l'oxaloacétate (**figure 20**). Bien que l'acétate soit habituellement libéré dans le milieu, l'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate par l'oxaloacétate décarboxylase. Les bactéries lactiques peuvent théoriquement réduire tout excès de pyruvate en lactate via la lactate déshydrogénase (**figure 19 a**), mais cela ne se produit pas normalement car la réduction du pyruvate nécessite du NADH, qui est fait pendant la glycolyse, mais qui ne se forme pas dans la voie de fermentation du citrate. L'excès du pyruvate est décarboxylé par la pyruvate décarboxylase dans une réaction dépendante de la thiamine pyrophosphate (TPP) et l'acétaldéhyde-TPP est formé. Certains chercheurs ont proposé qu'une enzyme (diacétyl synthase) soit responsable de la conversion de l'acétaldéhyde TPP (en présence d'acétyl-CoA) directement en diacétyle. Cependant, aucune preuve de la présence de la diacétyl-synthase n'existe actuellement. Au lieu de cela, la voie alternative acceptée pour la synthèse du diacétyle implique d'abord une réaction de condensation de l'acétaldéhyde-TPP et la production de l' $\alpha$ -acétolactate à partir du pyruvate catalysé par l' $\alpha$ -acétolactate synthase. Cette enzyme a apparemment une faible affinité pour le pyruvate. Ainsi, des concentrations élevées de pyruvate sont nécessaires pour conduire cette réaction (**Snoep et al., 1992**). Le produit, l' $\alpha$ -acétolactate, est instable en présence d'oxygène et est ensuite décarboxylé de manière non-enzymatique pour former du diacétyle, et l'acétoïne est produit par décarboxylation de l' $\alpha$ -acétolactate par l' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase, par la réduction du diacétyle par la diacétyl réductase, ou par décarboxylation chimique non oxydative (**Boumerdassi et al., 1996**).

Quelle que soit la voie empruntée, les bilans de production des composés en C4 à partir du pyruvate sont les suivants :



\* : accepteur des électrons provenant de l' $\alpha$ -acétolactate non identifié.

Ces bilans montrent que les voies des composés C4 peuvent tout à fait être utilisées pour la régénération du NAD<sup>+</sup> dans le cas où du 2,3-butanediol serait formé, ou servir à évacuer un excès de pyruvate potentiellement toxique sous forme d'acétoïne sans affecter le rapport NADH + H<sup>+</sup> / NAD<sup>+</sup> (**Speckman et Collins, 1968**).

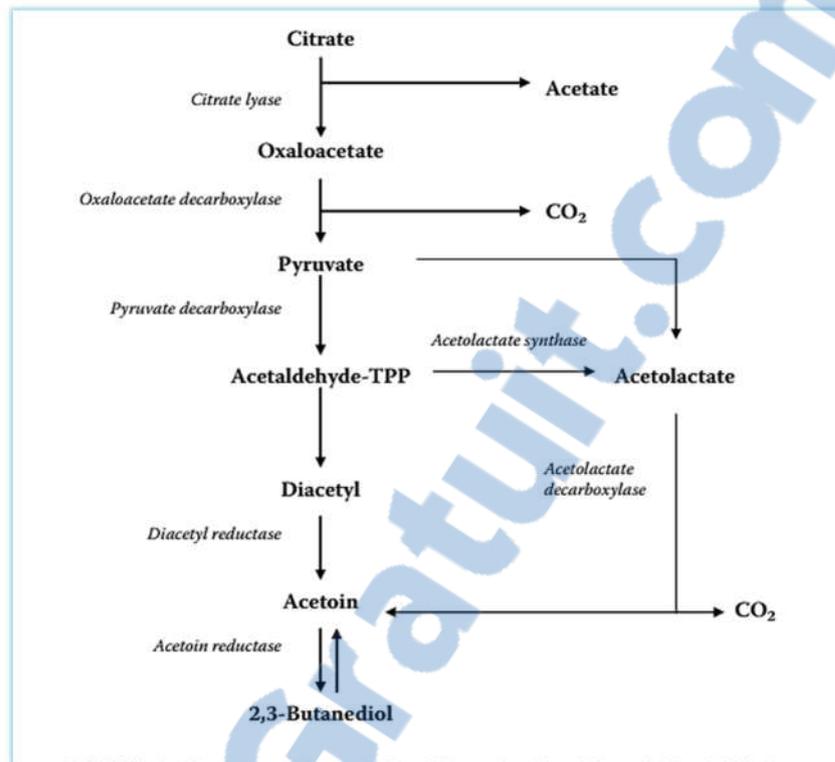


Figure 20: Métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (Novel, 1993).

De nombreuses études ont montré que le co-métabolisme du citrate et du glucose modifie le métabolisme pendant la fermentation par les bactéries lactiques: L'acide lactique provient principalement du glucose, mais le diacétyle et l'acétoïne sont principalement produits à partir du citrate (de Vos et Hugenholtz, 2004). L'implication du citrate dans la croissance bactérienne reste l'objet de désaccords. Certains auteurs déclarent que le citrate ne participe pas à la croissance chez les Lactocoques (Collins, 1972 ; Cogan, 1981) et d'autres, au contraire, affirment que le citrate stimule la croissance de ces bactéries, en présence d'un sucre fermentescible, ou qu'il contribue seul à la croissance des cellules, quand il constitue l'unique source d'énergie (Cogan, 1987; Schmitt et Diviès, 1991; Starrenburg et Hugenholtz, 1991 ; Hugenholtz *et al.*, 1993; Boumerdassi *et al.*, 1996). Le co-métabolisme du lactose et du citrate, qui permet d'apporter à la cellule un flux supplémentaire de pyruvate en même temps que d'assurer des fonctions essentielles telles que la régénération de coenzymes d'oxydo-réduction ou la production d'énergie, conduit à la production d'autres molécules que l'acide lactique. En effet, Le citrate est considéré comme le principal précurseur des composés aromatisants (Hugenholtz, 1993).

Divers facteurs affectent le métabolisme du citrate. La production des composés aromatiques associés au métabolisme du citrate est un processus complexe qui dépend du taux d'utilisation du citrate, de la proportion du pyruvate produit et condensé pour la formation de l'  $\alpha$ -acétolactate, du taux de transformation de ce dernier en diacétyle et

acétoïne, ainsi que du taux de réduction de ces composés en 2,3-butanediol (Cachon et Diviès, 1993).

Les facteurs environnementaux et biologiques ayant une influence sur le métabolisme du citrate et la formation du diacétyle sont principalement :

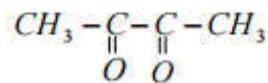
- ✓ **Le pH** : L'augmentation de l'activité de la citrate perméase et de la citrate lyase à pH acide a été rapportée par **Garcia-Quintâns et al. (1998)** et **Martin et al. (2004)**. Ainsi **Garcia-Quintâns et al. (1998)** démontrent que les opérons plasmidiques et chromosomiques codant respectivement pour le transport du citrate et pour la citrate lyase auraient tous deux une réponse similaire au stress acide et que leur transcription serait induite à pH acide.
- ✓ **La présence du citrate** : L'ampleur de la stimulation varie selon les espèces et les conditions de croissance (**Cogan, 1987 ; Starrenburg et Hugenholtz, 1991 ; Haddad, 1997 ; Garcia-Quintâns et al, 1998**). Les études de **Magni et al. (1999)** ont permis de mettre en évidence certaines portées du co-métabolisme du citrate et du glucose sur la croissance de *Lc. diacetylactis*. La présence de citrate n'a pas d'effet inducteur sur la citrate lyase chez *Lc. diacetylactis* (**Hugenholtz et Starrenburg, 1992 ; Magni et al, 1999 ; Martin et al, 2000, 2004**). L'expression des gènes codant pour CitP ainsi que son activité ne sont pas influencées par la présence du citrate, à l'opposé de ce qui a été observé chez *Leuconostoc* (**Magni et al, 1994**).
- ✓ **Température et oxygénation du milieu** : Les effets combinés de l'oxygène et de la température sur l'acidification et la production de composés C4 via le citrate ont été étudiés par **Bassit et al (1993, 1994)**. Le maximum de l'utilisation du citrate dans le milieu de culture était obtenu avec des variables température et concentration d'oxygène de 18°C et 100% respectivement.
- ✓ **Les ions métalliques** : Les études de **Harvey et Collins (1961)** ont démontré que l'activité de la citrate lyase (citratase) nécessite la présence de cations divalents, particulièrement les cations Mg<sup>+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>. Dans une publication ultérieure, ces auteurs ont démontré que le taux de réaction de cette enzyme dépendait de la concentration du complexe formé par le citrate et les cations, établissant ainsi que ce complexe est le substrat de l'enzyme, et non le citrate libre (**Harvey et Collins, 1963**).
- ✓ **Le genre bactérien** : Bien que le métabolisme du citrate soit un processus similaire chez *Lc. diacetylactis* et *Leuconostoc* il existe certaines différences entre leurs caractéristiques respectives de fermentation de ce composé. Ces différences sont principalement le caractère inductible de la citrate lyase chez *Leuconostoc*, l'enzyme étant constitutive chez *Lc. lactis* (**Mellerick et Cogan, 1981**), la concentration relative des produits issus de la fermentation des sucres et du citrate et le bilan énergétique de ce métabolisme (**Starrenburg et Hugenholtz, 1991**). Les caractéristiques métaboliques du genre *Leuconostoc* ont fait l'objet d'une revue par **Cogan et Jordan (1994)**.

### 1.5.5.2. Production de diacétyle

- **Propriétés physicochimiques du diacétyle**

Le diacétyle est une cétone liquide, également désigné sous le nom de biacétyle, diméthylidicétone, dicétobutane, butanedione, diméthylglyoxal (**Ott, 1999 ; Sergent, 1998**).

Sa formule de constitution est la suivante :



Le diacétyle est un liquide huileux de coloration jaune très légèrement verdâtre, coloration due à la présence des deux groupements carbonyle C = O en position  $\alpha$  qui jouent le rôle de chromophores. Sous l'influence de l'excitation par la lumière de Wood, les solutions de diacétyle, même diluée à 1 p 1000, présentent une belle fluorescence jaune verdâtre. Sa vapeur présente la couleur du chlore et possède une odeur désagréable prononcée, rappelant celle de la quinone. Le diacétyle à l'état de traces se caractérise au contraire par une odeur agréable rappelant l'odeur de la crème fermentée ou du beurre frais (**Oscar et al, 2001**). Il bout sans décomposition. Il est un peu plus léger que l'eau, il est soluble à température ordinaire dans un peu moins de quatre fois son poids d'eau, il est miscible à l'alcool et à l'éther et est très soluble dans les corps gras (**tableau 6**) (**F.E.M.A, 2006**).

Tableau 6: Propriété physique du diacétyle (F.E.M.A, 2006).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire (g/mol)	86,09
Température de fusion (°C)	-2,4
Température d'ébullition (°C)	88
Densité (g/cm <sup>3</sup> )	0,990 à 15°C
Solubilité	Dans l'eau : miscible

- **Production du diacétyle par les bactéries lactiques**

Le diacétyle (2,3-butanedione) et l'acétoïne (3-hydroxy-2-butanone) sont des composés aromatiques majeurs dans de nombreux produits laitiers, y compris certains fromages tels que le Cheddar ou Gouda ; les deux ont l'arôme du beurre mais l'arôme du diacétyle est 100 fois plus puissant que celui de l'acétoïne (**Curioni et Bosset, 2002**). Ils sont synthétisés par certaines bactéries lactiques à partir de pyruvate, mais ne sont produits en quantités importantes que lorsque le métabolisme normal du pyruvate est perturbé. En effet, la première étape de leur biosynthèse fait intervenir l'acétolactate synthase dotée

d'une très faible affinité pour le pyruvate ( $K_m = 50 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) par rapport à celle de la lactate déshydrogénase (LDH,  $K_m = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) et de la pyruvate déshydrogénase (PDH,  $K_m = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) (**van Niel et al., 2004**). Par conséquent, l'acétolactate synthase est seulement active dans des conditions d'accumulation de pyruvate, c'est à dire lorsque la LDH et la PDH ne sont pas entièrement actives. Il y a beaucoup d'intérêt à manipuler les conditions de croissance et les cultures pour améliorer la production de diacétyle par les bactéries lactiques. Étant donné que le transport du citrate *via* CitP nécessite un faible pH, les souches fermentant le citrate sont généralement associées à des souches productrices d'acide lors de la fabrication de produits laitiers. L'oxygène peut également stimuler la formation de diacétyle jusqu'à 30 fois (**Boumerdassi et al., 1996**). Il peut réduire l'activité de la lactate déshydrogénase et accélérer la réaction de décarboxylation oxydative responsable de la synthèse du diacétyle. De plus, l'oxygène peut oxyder le NADH, ralentissant ainsi la vitesse à laquelle le diacétyle est réduit en acétoïne ou en 2,3-butanediol. Une autre stratégie envisagée pour améliorer la formation de diacétyle implique une modification génétique des souches productrices. Plusieurs étapes métaboliques ont été identifiées au cours desquelles des mutations ou des blocs conduiront à une production accrue de diacétyle. L'inactivation de la lactate déshydrogénase, par exemple, entraîne un excès de pyruvate, et les cellules peuvent théoriquement produire plus de diacétyle. L'expression accrue de copies de gènes codant pour l' $\alpha$ -acétolactate synthase ou la NADH oxydase dans *Lc. lactis* améliore également la formation de diacétyle en augmentant la concentration d' $\alpha$ -acétolactate disponible pour la décarboxylation oxydative (**Benson et al., 1996 ; De Vos, 1996 ; de Felipe et al., 1998**). De même, l'inactivation du gène codant pour l' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase, l'enzyme qui forme l'acétoïne directement à partir de l' $\alpha$ -acétolactate, entraîne également une augmentation de la production de diacétyle (**Monnet et al., 1997; Swindell et al., 1996**).

- **Principaux facteurs affectant la production de diacétyle et d'acétoïne**

Plusieurs études ont mesuré l'effet de différentes conditions de fermentation sur la quantité de diacétyle et d'acétoïne produite par des bactéries lactiques. Les principaux facteurs ayant un impact sur la production de ces deux composés d'arômes sont : le pH, la température de croissance, l'oxygénation de la culture, la concentration de citrate et présence de sucre fermentescible.

- ✓ **Effet du pH**

Le pH a un effet significatif sur la production des composés d'arôme à partir de la fermentation du citrate. Plusieurs études relèvent une bonne production du diacétyle à faible pH. Selon **Cachon et Divies (1994)**, l'effet du pH provient d'un taux maximal de l'utilisation du citrate et la réduction continue du diacétyle et de l'acétoïne. Ainsi d'après ces auteurs, la production des composés d'arôme est un phénomène complexe qui résulte de l'interaction du pH, de la concentration de l'acide citrique et l'état physiologique des cellules. **Schmitt et al. (1988)** ont conclu qu'un pH de 4,8 augmente la production des composés en C4 (diacétyle, acétoïne et 2.3-butylène glycol), les composés en C2 (acétaldéhyde, éthanol et

acétate) ainsi que le formiate. D'après **Champagne et al. (1992)** la production de diacétyle s'effectue lorsque le pH est inférieur à 5,2. D'autres études montrent que chez *Lb. plantarum* le pH optimal de la production de diacétyle est inférieur à 4,5 (**Montville et al., 1987; Kennes et al., 1991; Palles et al., 1998**). Le pH du milieu affecte le transport du citrate qui est le principal précurseur de la production du diacétyle et d'acétoïne (**Díaz-Muñiz et Steele, 2006 ; Marty-Teyssset et al., 1995**). Il joue également un rôle dans la régulation de certains gènes impliqués dans le métabolisme du citrate. Ces gènes sont activés par des niveaux de pH acides plutôt que par la présence ou absence de citrate (**García-Quintáns et al., 1998a et 1998b ; Martín et al., 2004**). Le citrate est ainsi transporté dans la cellule à un rythme plus rapide par la citrate perméase ayant une activité optimale lorsque le pH est compris entre 4,5 et 5,5 (**Magni et al., 1996**). La transcription des autres gènes impliqués dans la conversion du pyruvate en arôme sont également influencés par le pH. Le gène codant pour l' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase est stimulé par des valeurs de pH inférieures à 4 entraînant une accumulation de l' $\alpha$ -acétolactate chez *Ln. lactis* (**Cogan et al., 1981**), *O. oeni* (**Ramos et al., 1995**), *Lc. lactis* (**García-Quintáns et al., 2008b**) et *Lb. casei* (**Branen et Keenan, 1971**). **Ramos et al. (1995)** et **Olguín et al. (2009)** ont observé une accumulation d'acétoïne à des valeurs de pH inférieures à 4,0.

#### ✓ Effet de la température

L'optimisation des paramètres physico-chimiques de biosynthèse est lié à la température et donc celle-ci influe directement sur le niveau de production des composés d'arôme (**Medina de Figueroa et al., 2001**). Selon **Oberman et al. (1982)** les souches de *Leuconostoc* produisent un niveau maximal de diacétyle après 24 h de culture, tandis que les souches de *Lc. diacetylactis* en produisent après 6 h de culture. La température de culture a une influence sur la cinétique de la biosynthèse du diacétyle et de l'acétoïne. L'étude d'**Oberman et al. (1982)** montre que quand la température d'incubation augmente de 23 °C à 28 °C, la production de diacétyle augmente d'environ 30%. Ces auteurs ont aussi remarqué qu'à ces températures, l'activité de l'enzyme diacétyle réductase diminue, mais qu'à la température de 28 °C ce processus est plus lent. La température a un effet sur la vitesse de l'acidification et sur la production de diacétyle et d'acétoïne. **Bassit et al. (1994; 1995)** ont montré que les taux de croissance et la production d'acide lactique diminue de 30% quand la température diminue à 18 °C. Les résultats de cette étude montrent que la concentration maximale de diacétyle est 1,7 fois plus élevée à 18 °C que celle produite à 30°C. Cependant, l'activité de NADH oxydase pour une température de 18 °C était 3,7 fois plus élevées qu'à 30°C, tandis que l'activité de diacétyle réductase à 30 °C est 2,7 fois plus élevée qu'à 18 °C. Ces auteurs ont révélé des concentrations maximales de diacétyle lorsque *Lc. lactis* été incubé à 18 °C, ce qui correspondait à diminution de l'activité de la diacétyl réductase. Cependant, ils ont observé un maximum de concentration d'acétoïne lorsque *Lc. lactis* été incubé à 30 °C, ce qui pourrait être lié à une augmentation dans l'activité  $\alpha$ -acétolactate synthase. D'autres auteurs ont observé une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase avec l'augmentation de la température (**Bassit et al., 1995; de Figueroa et**

*al.*, 2000). Les concentrations de lactate augmentent avec l'augmentation des températures selon **García et al. (1994)**, **Elena et al. (2006)**, **Trontel et al. (2010)** et **Wang et al. (2011)**.

✓ **Effet de l'oxygène**

L'oxygène est une condition de culture importante qui influence les concentrations de métabolites produites par le métabolisme du citrate. L'oxygène est un composant clé dans la formation spontanée du diacétyle à partir de l' $\alpha$ -acétolactate. **Nielsen et Richelieu (1999)** ont observé que dans les conditions semi-aérobies, les concentrations de diacétyle peuvent être jusqu'à six fois plus élevées que dans des conditions anaérobies. Cependant, les concentrations en diacétyle diminuent au cours d'une période où elles sont réduites en acétoïne qui peut finalement être réduit en 2,3-butanediol (**Kaneko et al., 1991**, **Bassit et al., 1993**, **Ramos et al., 1995**; **Boumerdassi et al., 1996**; **Elena et al., 2006**). **Cretenet et al. (2014)** ont observé que les gènes codant pour la sous-unité E1 $\alpha$  de la pyruvate déshydrogénase, de l' $\alpha$ -acétolactate synthase et de l' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase étaient surexprimés dans des conditions aérobies. Cela a entraîné une augmentation de l'acétoïne et du 2,3-butanediol en aérobiose. L'augmentation du diacétyle, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol dans des conditions aérobies peut également s'expliquer par une étude réalisée par **Ramos et al. (1995)** qui a observé que *O. oeni* et *Lb. plantarum* consomment le pyruvate plus rapidement en présence d'oxygène et produisent ainsi plus de composés aromatiques. L'oxygène peut également influencer la production d'acétate et de D-lactate à partir du pyruvate. Dans des conditions aérobies, l'activité de la lactate déshydrogénase diminue et moins de D-lactate est produit (**Bobillo et Marshall, 1991** ; **Bassit et al., 1993** ; **Boumerdassi et al., 1996** ; **De Felipe et al., 1997**).

✓ **Effet du citrate**

La concentration de citrate est un facteur crucial qui détermine la concentration des métabolites associés au métabolisme du citrate. **Branen et Keenan (1971)** ont rapporté des changements dans les concentrations de diacétyle lors de l'ajout de citrate dans le milieu de croissance de *Lb. casei*. Au cours de cette étude, ils ont observé une augmentation de l'activité de la diacétyle réductase entraînant une diminution du diacétyle et une augmentation des concentrations d'acétoïne. **Petit et al. (1989)** ont rapporté que la production de diacétyle par des cultures non proliférantes de *Lc. lactis* ssp. *lactis* CNRZ 124 a augmenté de 0,2 à 1,4 mM lorsque la concentration en citrate a été augmentée de 8,8 à 59 mM. Ces chercheurs ont montré que la production de diacétyle avait doublé lorsque l'ajout du citrate était fait à la fin de la croissance par rapport à l'ajout de citrate au début de la croissance. La croissance stimulée par le citrate, augmente le taux d'utilisation du lactose et de production de diacétyle, d'acétoïne et de 2,3-butanediol par *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (**Schmitt et Diviès, 1991**). **Kaneko et al. (1986)** ont suggéré que l'accumulation du diacétyle, dans une culture de *Lc. diacetylactis* en présence de citrate, est causée par une inhibition de diacétyle réductase et par la répression de l'enzyme synthétase due au citrate. Un bon nombre de bactéries lactiques est capable de convertir le citrate en diacétyle, en

acétoïne et en  $\alpha$ -acétolactate. D'après **Collins (1972)**, *Ln. diacetylactis* est responsable de la transformation du citrate particulièrement en diacétyle qui le rend utile dans les produits laitiers fermentés. La production de l'  $\alpha$ -acétolactate, du diacétyle et de l'acétoïne avait atteint leur niveau maximum quand 10 mmol/L de citrate avait été ajouté au milieu (**Jordan et Cogan, 1995**). En plus d'affecter la concentration finale des métabolites, le citrate régule également les niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du citrate (**Marty-Teyssset et al., 1995**).

✓ **Effet des sucres**

Diverses études ont rapporté que la production de composés aromatiques est affecté par le glucose et que cet effet dépend des espèces (**Rea et Cogan, 2003a et 2003b ; Cabral et al., 2007**). Des études ont indiqué que les espèces d'*Enterococcus* (**Rea et Cogan, 2003a**), certaines espèces de *Lactobacillus* telles que *Lb. rhamnosus* (**Médine de Figueroa et al., 2000; Jyoti et al., 2004**) et *Ln. mesenteroides* (**Levata-Jovanovic et Sandine, 1996**) présentent une croissance diauxique lorsqu'ils sont cultivées en présence de glucose et de citrate. Ces bactéries n'utilisent le citrate que lorsque le glucose est épuisé, puisque l'activité de la citrate perméase (**Levata-Jovanovic et Sandine, 1996; Medina de Figueroa et al., 2000; Rea et Cogan, 2003b**) ou de la citrate lyase (**Palles et al. 1998**) est supprimée par le glucose par répression des catabolites. Cependant, certaines bactéries lactiques comme *On. oeni* (**Ramos et Santos, 1996**), *Lb. plantarum* (**Palles et al., 1998**), *Lb. casei* (**Palles et al., 1998; Díaz-Muñiz et Steele, 2006**) et *Ln. lactis* (**Cogan et al., 1981**) sont encore capables d'utiliser une petite portion de citrate en présence de glucose. Ce co-métabolisme est généralement observé lorsque les bactéries sont pré-cultivées dans un milieu contenant à la fois du citrate et du glucose (**Palles et al., 1998 ; Jyoti et al., 2004**). La pré-culture des bactéries peut également augmenter la production de diacétyle et d'acétoïne pendant la fermentation (**Jyoti et al., 2004**). **Tsau et al. (1992)** ont observé que *Lb. plantarum* n'a pas produit d'acétoïne lorsqu'il était cultivé dans un milieu sans glucose. **Ramos et Santos (1996)** ont observé que de faibles concentrations de glucose stimulaient la production de diacétyle et d'acétoïne. **Palles et al. (1998)** ont rapporté que *Lb. plantarum* et *Lb. casei* sont capables de co-métaboliser le citrate et le lactose ainsi que le citrate et le galactose. Ils ont observé que le citrate était utilisé à un rythme plus rapide et que davantage d'acétoïne et d'acétate étaient produits lorsque le citrate était co-métabolisé avec du galactose, au lieu du glucose ou du lactose.

• **Différentes utilisations du diacétyle**

L'amélioration de la production de diacétyle représente un important enjeu industriel. Le diacétyle et l'acétoïne sont responsables de la saveur beurrée des produits laitiers tels que le beurre, la margarine, les crèmes glacées et le fromage. Le 2,3-butanediol donne une odeur fruitée. Des souches de bactéries lactiques productrices de diacétyle ont été sélectionnées puis développées et utilisées dans la production de certains fromages pour stimuler la saveur et l'odeur du beurre dans ceux-ci. Certaines souches ont entraîné des

concentrations significativement plus élevées de diacétyle et d'acétoïne (**Midje et al., 2000 ; St-Gelais et al., 2009 ; Milesi et al., 2010**) parmi lesquelles, à titre d'exemple, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* a été utilisé pour produire du cheddar frais.

Le diacétyle (2,3-butanedione) est un arôme important, de nature oxydative, il joue un rôle prédominant dans la saveur des produits laitiers et des fromages frais notamment de type cheddar (**Bassit et al., 1994**). Le diacétyle est aussi une substance antimicrobienne dont les propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens (**Yang, 2000**). Il est utilisé comme additif alimentaire que l'on trouve parfois dans de nombreux aliments et boissons fermentés (**de Azevêdo et al., 2007; Bartowsky et Henschke, 2004; Laurent et al., 1994**).

## **2.1. Echantillonnage et isolement des bactéries**

### **2.1.1. Collecte des échantillons**

Quinze échantillons de cinq différents produits alimentaires (*Afermes, Klila, couscous d'herbes, hamoum, miel toutes fleurs*) ont été collectés de plusieurs fermes de la wilaya de Tiaret (Ouest algérien) pendant le mois de Novembre 2013.

### **2.1.2. Préparation des échantillons**

Chaque échantillon de 25 g a été pesé de façon aseptique et homogénéisé (après broyage pour les échantillons solides) en ajoutant 225 ml de solution saline physiologique pour la première dilution. Des dilutions décimales de  $10^{-2}$  à  $10^{-8}$  ont été réalisées à l'aide d'une solution stérile d'eau physiologique, à partir de chaque dilution 0,1 ml sont déposés et étalés sur le milieu MRS solide (**de Man et al., 1960**) supplémenté de 100 mg/l de cycloheximide afin d'éviter la croissance des levures. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 24 à 72 heures.

### **2.1.3. Isolement et purification des souches bactériennes**

Les dilutions ayant donné moins de 10 colonies par boîte ont été retenues et repiquées sur milieu MRS solide. Les isolats sont purifiés par la méthode des stries sur milieu MRS solide. Les colonies obtenues après incubation à 30 °C pendant 24 h sont examinées macroscopiquement (aspect des colonies). Les cellules sont observées microscopiquement après coloration de Gram (Annexe). La catalase est recherchée. Les isolats montrant un Gram positif et une catalase négative sont retenus.

## **2.2. Conditions de culture**

La composition des milieux de culture utilisés durant cette étude est indiquée en Annexe. Ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 1 bar de pression pendant 20 mn à une température de 120 °C.

Le lait écrémé 10% est reconstitué à partir de poudre de lait et autoclavé 10 mn à 110 °C. L'incubation des cultures bactériennes est réalisée à 30 °C pendant 24 h ou 48 h.

## **2.3. Conservation des souches**

Dès l'obtention des cultures pures leur conservation est indispensable. Elle est réalisée selon deux techniques :

### **2.3.1. Conservation de courte durée**

Chaque souche estensemencée sur gélose MRS inclinée et incubée à 30 °C pendant 24 h. Les cultures sont conservées à 4 °C pendant plusieurs semaines. Mais un repiquage périodique reste nécessaire.

### **2.3.2. Conservation de longue durée**

Les souches pures sont cultivées sur lait écrémé stérile à 10% enrichi par 0,05% d'extrait de levure et incubé à 30 °C. Dès coagulation du lait la conservation est réalisée à -20 °C pendant plusieurs mois. Une deuxième conservation est réalisée dans les mêmes conditions par culture dans le milieu MRS additionné de 20% de glycérol stérile.

## **2.4. Pré-identification par étude morphologique, physiologique et biochimique des souches**

Cette étude a été faite pour des fins d'identification en se basant sur les différentes caractéristiques physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.

### **2.4.1. Etude morphologique**

L'observation macroscopique consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures (taille, forme, pigmentation, contour, aspect, ...).

Afin de décrire la morphologie, le mode d'association et de définir le Gram des cellules, un examen microscopique est réalisé après coloration de Gram. Les bactéries lactiques sont à Gram positif.

### **2.4.2. Etude physiologique**

#### **2.4.2.1. Croissance à différentes températures**

Ce test permet de différencier les souches thermophiles des mésophiles. Chaque souche a été inoculée dans 5 ml de milieu MRS liquide. 5 séries en double ont été préparées afin de tester la croissance à différentes températures : 10 °C, 15 °C, 30 °C, 37 °C et 45 °C. Après 72 heures (pour 30 °C, 37 °C et 45 °C) et 7 à 10 jours (pour 10 °C et 15 °C) d'incubation (**Guiraud et Galzy, 1980**), la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

#### **2.4.2.2. Test de thermorésistance**

Le test de thermorésistance est destiné aux coques, il permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches à tester sont préalablement réparties dans des tubes de milieu MRS. Ces tubes sont par la suite exposés à une température de 60 °C pendant 30 min.

A partir de chaque tube traité on aensemencé un nouveau tube de milieu puis on le porte à incubation à 30 °C pendant 24 heures. Les bactéries thermorésistantes donneront sur milieu un trouble démontrant ainsi leur croissance (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

#### 2.4.2.3. Croissance à différents pH

Les souches étaient cultivées dans trois séries de tubes en double contenant 5 ml de milieu MRS tamponné par le tampon citrate ( $C_6H_8O_7$ ,  $H_2O$  - 0,1 M/ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  - 0,2 M) à des pH différents : 4 ; 4,5 et 8. Une quatrième série est préparée afin de caractériser les bactéries du genre *Enterococcus*. Le bouillon MRS utilisé pour ce test est ajusté à pH 9,6 par du tampon glycine-NaOH (Annexe). L'incubation a été faite à 30 °C pendant 48 heures. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

#### 2.4.2.4. Croissance à différentes concentrations de NaCl

La croissance des bactéries a été testée dans le milieu MRS liquide en présence de 2%, 4% et 6,5% de NaCl. La quatrième série est préparée à 6,5% de NaCl afin de distinguer les entérocoques. Après incubation à 30 °C pendant 48 heures, la croissance se traduit par l'apparition de trouble.

#### 2.4.2.5. Croissance sur lait bleu de Sherman

Ce test est destiné aux coques. Des tubes de 10 ml de lait écrémé stérile contenant 0,1% de bleu de méthylène sontensemencés par des cultures pures puis incubés durant une période de 24 à 48 heures à 30 °C.

### 2.4.3. Etude biochimique

#### 2.4.3.1. Etude du type fermentaire

Pour dégrader les sucres les bactéries empruntent soit une voie homofermentaire soit une voie hétérofermentaire, dans ce dernier cas elles fermentent le glucose en produisant de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du  $CO_2$  comme le montre la réaction (De Roissart et Luquet, 1994).



Les souches sontensemencées dans des tubes contenant 10 ml de milieu MRS et une cloche de Durham, puis incubées à 30 °C pendant 48 heures. L'apparition de gaz dans la cloche de Durham montre que la voie de dégradation du sucre est hétérofermentaire, sinon la voie est homofermentaire.

#### 2.4.3.2. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citrulline à partir de l'arginine.

Les bactéries peuvent avoir des décarboxylases qui scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération du  $CO_2$ . Dans les milieux contenant de l'arginine, il se produit une dégradation de l'arginine aussi bien par l'action du

système dihydrolase que d'une décarboxylase. De ce fait sont libérés de l'ammoniac et une amine.



La mise en évidence de cette activité est basée sur le virage de l'indicateur coloré (Bromocrésol pourpre) suite à l'alcalinisation du milieu en cas de production d'amine.

Les souches sont ensemencées chacune dans deux tubes contenant le milieu Falkow (**Falkow et al., 1958**) (composition en annexe). L'un des tubes contient l'arginine ; l'autre, sans arginine, est considéré comme tube témoin. Après une incubation à 30 °C pendant 48 heures le virage de l'indicateur coloré vers le jaune dans le tube témoin indique la fermentation du glucose tandis que la production d'amine à partir de l'arginine conduit à l'alcalinisation du milieu, qui est révélée par le virage au violet de l'indicateur de pH.

#### 2.4.3.3. Test de fermentation des sucres

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique, bouillon MRS sans le glucose et l'extrait de viande, additionné de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (**Mannu et al., 2000**).

Les solutions de sucres ont été préparées dans 10 ml d'eau distillée contenant 1 g des différents sucres. Ces préparations sont stérilisées par chauffage au bain Marie à 100 °C pendant 10 min puis conservées au réfrigérateur (**Joffin et Leyral, 1996**).

Les sucres testés sont : Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Mannitol, Raffinose, Rhamnose, Saccharose, Sorbitol et Xylose.

Nous avons effectué l'identification des souches en nous référant au manuel de Bergey (**De Vos et al., 2009**).

Ce test est résumé dans les étapes suivantes :

Vu le nombre important de souches étudiées, des plaques d'Elisa ont été utilisées. Les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera testée pour différentes souches.

- On récupère les culots des cultures jeunes des souches étudiées après centrifugation et lavage par l'eau physiologique stérile, on y ajoute 1 ml (MRS-BCP) pour préparer la solution cellulaire.
- On dépose 100 µl de cette suspension bactérienne dans chaque puits avec 100 µl des différents sucres, et 100 µl du milieu (MRS-BCP).
- Le tout est recouvert par une goutte d'huile de paraffine stérile pour créer les conditions d'anaérobiose.

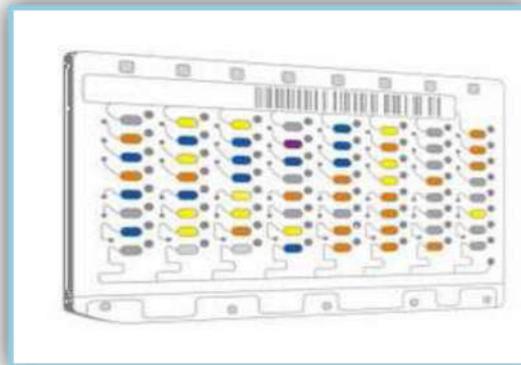
## 2.5. Identification des bactéries à l'aide de galeries biochimiques API50 CHL

La pré-identification des souches permet de les classer dans différents groupes selon la similitude de leurs caractéristiques, une ou plusieurs souches de chaque groupe ont été choisies pour une identification à l'aide de galeries API50 CHL.

Après avoir vérifié la pureté des souches sélectionnées sur gélose MRS, les colonies sont mises en suspension dans le milieu API50 CHL avec une opacité de Mc Farland 2 (BioMérieux) (densité des cellules équivalente à  $6.10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>), puis inoculées dans les cupules de la galerie API 50 CH, remplies ensuite d'huile de paraffine stérile. Durant l'incubation à 30 °C pendant 48h, le catabolisme des glucides conduit à la production d'acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH (bromocrésol pourpre). Les résultats de fermentation des 49 sucres de la galerie sont traités par le logiciel ApiWeb (BioMérieux) pour identifier les bactéries lactiques.

## 2.6. Identification des bactéries à l'aide des cartes Vitek2GP (BioMérieux)

L'identification par les cartes Vitek2GP (BioMérieux) a été effectuée pour les souches présentant les caractéristiques des bactéries appartenant au genre *Enterococcus*. Cette carte colorimétrique (**Figure 21**) contient 36 tests biochimiques: 17 enzymatiques (glycosidases et arylamidases), 13 tests d'acidification, deux tests d'alcalinisation et quatre tests divers.



**Figure 21: Schéma d'une carte du système Vitek.**  
(D'après <http://www.biomerieux-diagnostics>)

Les étapes d'inoculation, d'incubation (en aérobiose), de lecture et d'interprétation sont automatisées. Cette carte peut être utilisée avec les automates Vitek 2 Compact (capacité de 15, 30 ou 60 cartes) (**Figure 22**) destinée à de plus petits laboratoires.

Ces systèmes sont composés :

- d'un **Densichek**<sup>®</sup> : densitomètre permettant l'ajustement de l'inoculum,
- de **cassettes** pouvant contenir jusqu'à 15 cartes et les tubes contenant la suspension bactérienne à inoculer. L'inoculation de la carte est réalisée au moyen d'un tube

de transfert que l'on plonge dans le tube contenant la suspension bactérienne. Ces cassettes sont destinées à être incorporées dans l'automate (**Figure 22**).

- d'un **automate** réalisant les étapes de remplissage, de scellage, d'incubation, de lecture et d'interprétation des cartes. Une lecture est effectuée toutes les 15 minutes.

- d'un **ordinateur** et de **logiciels** spécialisés gérant et analysant les données générées par l'automate. Ce système permet une recherche rapide par échantillon, date de test, organisme identifié ou technicien manipulateur. Il peut être connecté à une interface centrale, il permet la validation automatique et le transfert des premiers résultats.

Les systèmes Vitek 2 comprennent également un lecteur de code à barres et un clavier.



**Figure 22: Automate Vitek2 Compact** (d'après <http://www.biomerieux-diagnostics>).

L'intervention du technicien est nécessaire pour :

- la préparation de l'inoculum de 0.42 à 0.60 Mc Farland à partir d'une culture jeune de 24h, qui doit être utilisé dans les 30 minutes suivant sa préparation.
- l'identification de la carte grâce à un lecteur de code-barres pour permettre de la relier à l'échantillon.
- le dépôt des cassettes dans l'automate.
- l'enregistrement de trois caractères – le type respiratoire, la morphologie et la coloration de Gram - dans l'ordinateur de l'automate.

Le profil réactionnel obtenu est comparé à ceux des taxons contenus dans la base de données et un calcul de probabilité d'identification correcte est effectué. Différents niveaux de confiance y sont associés (**Tableau 7**).

Tableau 7: Niveaux de confiance pouvant être associés à un résultat d'identification avec la carte Vitek2 GP.

Niveau de confiance d'identification	Probabilité d'identification correcte (%)	Commentaires
Excellent	96 – 99	Un seul taxon est proposé
Très bon	93 – 95	
Bon	89 – 92	
Acceptable	85 – 88	
Faible discrimination		Deux ou trois taxons présentent un profil similaire. Des tests complémentaires sont proposés par le système pour aboutir à une identification correcte.
Absence d'identification		Plus de trois taxons présentent un profil similaire ou le profil est atypique et ne correspond à aucune espèce de la base de données. Il est alors recommandé de vérifier la coloration de Gram et la pureté.

## 2.7. Etude des caractéristiques technologiques des souches

### 2.7.1. Mesure de l'acidité produite par les bactéries

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries lactiques est leur aptitude à l'acidification qui dépend de l'aptitude à la fermentation. La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude. Le résultat peut être exprimé selon différentes unités qui sont fonction de la molarité de la solution de soude utilisée comme agent alcalin neutralisant : degré Soxhlet Henkel (soude N/4), degré Therner (soude N/10) et degré Dornic (soude N/9) qui est l'unité la plus répandue. Le dosage de l'acidité titrable est de plus en plus souvent remplacé par la mesure du pH de l'échantillon.

Chaque bactérie estensemencée à 1% dans le milieu MRS, le pH initial est mesuré avant incubation ainsi qu'après inoculation du milieu et incubation à 30 °C pendant 24 heures. A partir de chaque flacon on prélève 30 ml du milieu que l'on répartit, après homogénéisation, dans 3 béchers à raison de 10 ml chacun.

Le pH est mesuré sous agitation magnétique tout en ajoutant la soude Dornic (N/9) goutte à goutte. Lorsque le pH initial est atteint, le volume de NaOH utilisé est noté. Les résultats sont exprimés en degrés Dornic selon la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = n \times 10$$

n = volume moyen de soude pour titrer 10 ml de lait  
 1 °D = 0,1 g/l d'acide lactique produit (**Accolas et al., 1971**).

### 2.7.2. Recherche de l'activité protéolytique cellulaire

L'aptitude des cellules à produire les protéases exocellulaires est recherchée en milieu MRS tamponné à pH7 à l'aide de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7) additionné de 2% de lait écrémé stérile reconstitué à 10%, selon la méthode décrite par **Van Den Berg *et al.* (1993)** et adaptée au laboratoire par **Hassaine et Beloufa (1998)**, **Zadi-Karam (1998)** et plus récemment par **Roudj *et al.* (2009)**. Le milieu est opacifié par le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) à 1% etensemencé par touches par une culture jeune (18 heures,  $\text{DO}_{600}=1$ ). Après incubation à 30 °C pendant 72 heures, l'activité protéolytique est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de chaque touche. La dimension de ce halo est mesurée.

### 2.7.3. Recherche de l'activité lipolytique

L'activité lipolytique est recherchée sur milieu MRS solide, tamponné à pH 7 à l'aide du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 M), privé de Tween 80 et supplémenté de matière grasse du lait à une concentration de 1%. Le milieu est opacifié par l'ajout de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) à 1% etensemencé en touches à l'aide d'un inoculateur multipoints par une culture jeune (18 heures). Après incubation à 30 °C pendant 72 h, l'activité lipolytique est détectée par l'apparition de halos clairs autour des colonies lipolytiques.

### 2.7.4. Production d'exopolysaccharides (EPS)

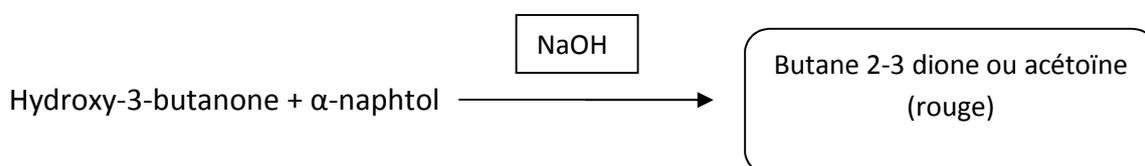
Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS) dont l'accumulation provoque une augmentation de la viscosité des milieux.

La production d'EPS est recherchée sur deux milieux : Mayeux (milieu spécifique des *Leuconostocs*) et MRS solide hypersaccharosé contenant 50 g de saccharose par litre (**Messens *et al.*, 2002**). Les souches bactériennes à tester sontensemencées par stries à la surface du milieu de culture. Après incubation à 37 °C pendant 48 heures, les colonies bactériennes productrices d'EPS ont un aspect gluant.

### 2.7.5. Recherche de l'activité aromatique

#### 2.7.5.1. Recherche de l'acétoïne : (Hydroxy-3-butanone-2 ou acétylméthyl-carbinol)

Elle est mise en évidence à l'aide de la réaction de Voges-Proskauer basée sur le principe que l'acétoïne se transforme en diacétyle sous l'action de la soude en présence d'oxygène. Ce dernier se combine avec l' $\alpha$ -naphthol en formant un complexe rouge détectable.



Les bactéries sont inoculées dans le milieu Clark et Lubs (composition en Annexe) ; après une incubation à 30 °C pendant 48 heures, 1 ml de chaque culture est transféré dans un tube stérile et additionné de 0.5 ml d'α-naphtol 6% dans l'éthanol absolu (VPI) et 1 ml de soude caustique 16% (VPII). Les tubes sont agités puis inclinés pendant 10 minutes à température ambiante. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une teinte rouge à la surface du milieu (**Speckman et Collins, 1982**).

#### **2.7.5.2. Recherche de la citratase**

Cette enzyme a été mise en évidence par culture sur gélose semi solide au lait citraté. La gélose a étéensemencée en masse et incubée à 37 °C pendant 3 à 5 jours. La fermentation du citrate se manifeste par la production de CO<sub>2</sub> qui est piégé dans la masse du milieu conduisant à l'apparition de bulles gazeuses.

C'est la première réaction de transformation du citrate en diacétyle et acétoïne.

### **2.8. Identification des bactéries par MALDI-TOF**

Le **MALDI -TOF Biotyper - CM** de **Bruker Daltonic (Figure 23)** permet l'identification et la différenciation de micro-organismes à partir de colonies isolées grâce à une analyse par spectrométrie de masse couplée à une source d'ionisation laser assistée par une matrice MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) et un analyseur à temps de vol TOF (Time Of Flight). La spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur une technique d'ionisation, mise au point dans les années 80, et conduisant à l'identification de biomarqueurs de poids moléculaires élevés : il s'agit d'une désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). L'échantillon à analyser est déposé sur une cible et est traité par une matrice appropriée. Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser. Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres.

Pour l'analyse MALDI-TOF MS, les souches ayant donné les meilleurs résultats pour la caractérisation technologique ont été cultivées sur milieu MRS pendant 24 h. chaque colonie est étalée sur la cible puis couverte de 1 µl d'acide formique et 1 µl de la matrice (Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique). On procède par la suite à l'identification par le MALDI-TOF.



Figure 23: Le MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltonic.

## 2.9. Cinétique d'acidification

Vu l'importance de la fonction acidifiante chez les bactéries lactiques la détermination de l'acidité des milieux de culture occupe une place centrale. Nous avons suivi la cinétique d'acidification des souches en fonction du temps. Deux flacons de 200 ml de MRS stériles, l'un ensemencé avec 6 ml d'une culture overnight et l'autre témoin, incubé à 30 °C. L'estimation de l'acidité se fait par pH métrie, tous les 3 heures aux intervalles de temps suivants : 0 h ; 3 h ; 6 h ; 9 h ; 15 h ; 18 h ; 21 h ; 24 h ; 27 h.....48 h.

## 2.10. Cinétique de croissance

La croissance était mesurée par la méthode turbidimétrique à une longueur d'onde 600 nm.

Un volume de 200 ml de MRS est ensemencé avec 6 ml d'une préculture ( $DO_{600nm}=1$ ), incubé à 30 °C. La croissance est estimée par mesure de la densité optique (longueur d'onde = 600 nm) sur des prélèvements effectués toutes les 3 heures.

## 2.11. Dosage du glucose consommé

L'estimation du glucose consommé est effectuée par dosage colorimétrique au DNS (acide 2-hydroxyde-3,5-dinitrobenzique) (Annexe) comme décrit par **Raemaekers et Vandamme (1997)**. On utilise les propriétés réductrices du glucose. À chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3, 5-dinitrosalicylique : DNS (acide 2-hydroxy-3, 5-

dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le glucose étant le réducteur réduit le DNS en acide 3,5-dinitrosalicylique (composé rouge).

Une gamme-étalon est établie avec une solution de glucose (100 mg/ml) préparée dans l'eau distillée. Une série de tube en double exemplaire est préparée comme suit (**tableau 8**) :

**Tableau 8: Préparation de la gamme étalon pour le dosage du glucose.**

<b>Tubes n°</b>	0	1	2	3	4	5
<b>Quantité de glucose (mg)</b>	0	1	2	3	4	5
<b>Solution de glucose (µl)</b>	0	10	20	30	40	50
<b>Eau distillée (µl)</b>	1000	990	980	970	960	950
<b>DNS (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

Après homogénéisation, les tubes sont incubés pendant 10 min à 100 °C puis refroidis rapidement et mis à l'obscurité pendant 5 min. La lecture de la densité optique est ensuite effectuée à 570 nm. Les résultats obtenus nous permettent d'établir une courbe étalon (Annexe) où la densité optique est en fonction de la concentration du glucose.

- **Dosage des échantillons**

Après l'ajout de 4 ml de réactif DNS à 1 ml de chaque échantillon à analyser, Les tubes sont traités de la même manière décrite précédemment, puis la concentration en glucose de chaque échantillon est déterminée à l'aide de la courbe étalon. Les lectures étaient effectuées toutes les 3 heures jusqu'à 48 heures d'incubation.

## **2.12. Etude de la production de diacétyle**

### **2.12.1. Optimisation de la production de diacétyle**

- **Dosage de la somme du diacétyle-acétoïne produits par la souche (figure 24)**

La somme de diacétyle-acétoïne produits est dosée dans des cultures réalisées dans le milieu MRS et dans le lait écrémé reconstitué à 10%. Le dosage se fait selon la méthode de **Mathot (1992)** qui permet de doser la somme de diacétyle-acétoïne produits. Cette méthode repose sur le test de Voges-Proskauer, rendu plus sensible par l'addition de créatinine.

- 1 ml d'une préculture en milieu MRS est additionné par 1 ml de TCA 2,5 M et 1 ml de NaOH 2,5 M ;
- Après incubation de 10 min à 4 °C, la préparation est centrifugée à 10000 tr/min pendant 20 min ; le surnageant peut être conservé à -20 °C jusqu'au moment du dosage.
- 0,05 ml de HCl 2,5 N est ajoutée à 0,25 ml du surnageant récupéré. Puis on incube à 70 °C pendant 20 min ;

- Après incubation, 0,3 ml du mélange est additionné par 0,5 ml de créatinine à 0,5% (p/v) et 0,5 ml du réactif  $\alpha$ -naphtol à 5% dans la solution NaOH 2,5 M ;
- Laisser incuber 1 h à la température ambiante ;
- Après centrifugation à 10000 tr/min pendant 1min ;
- L'absorption de la coloration développée est mesurée dans un spectrophotomètre à 420 nm. La concentration en diacétyle est déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage en utilisant le diacétyle pur dans l'intervalle de 0 à 3 ppm de concentration (**Westerfeld, 1945**).

Les résultats sont représentés en traçant la courbe :

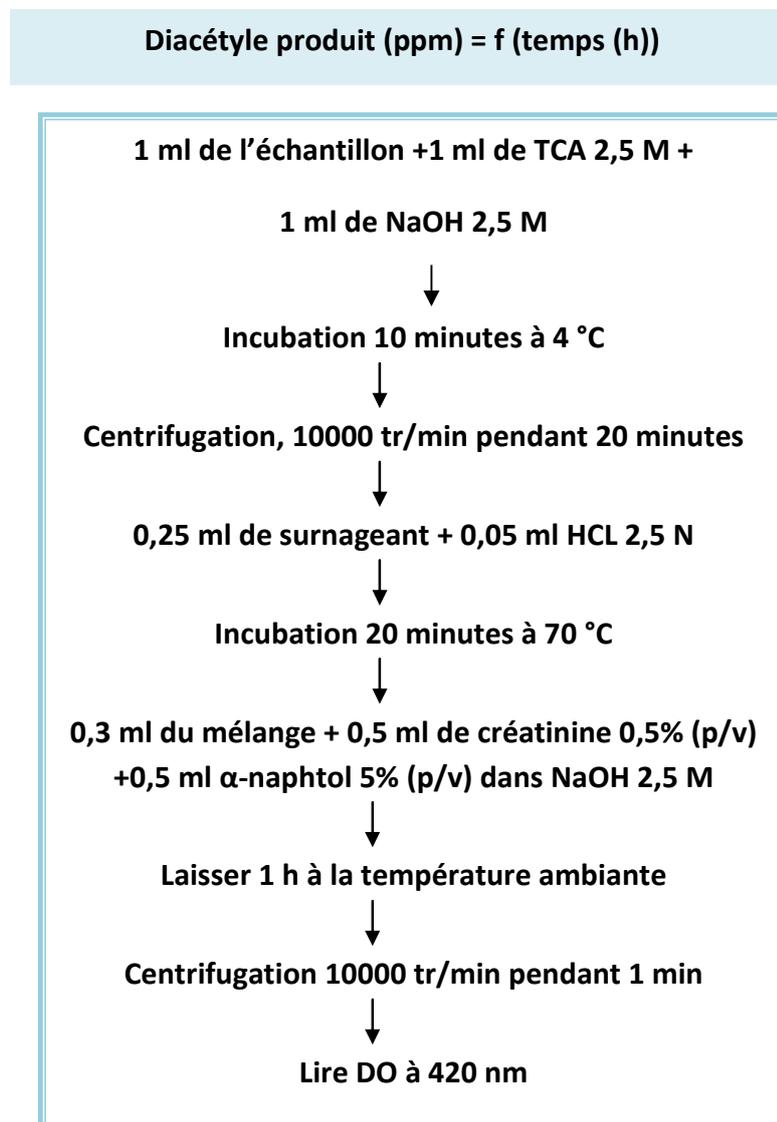


Figure 24: Protocole du dosage de la somme du diacétyle-acétoine.

#### 2.12.1.1. Recherche de la température optimale à la production de diacétyle

Chaque souche ( $DO_{600nm}=1$ ) est inoculée à 100 $\mu$ l dans 10ml de milieu MRS liquide et dans 10 ml de lait écrémé puis incubée à différentes températures : 18 °C, 21 °C et 25 °C.

Après 24 h d'incubation, la quantité de diacétyle produite est estimée par un dosage de la somme du diacétyle-acétoïne comme précédemment décrit (**Figure 24**).

#### 2.12.1.2. Recherche du pH optimum de la production du diacétyle

10ml de MRS ou de lait tamponnés par le tampon acétate de sodium ( $C_2H_4O_2 / C_2H_3O_2 Na, 2H_2O ; 0,2 M$ ) à des pH différents : 4,3 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 sontensemencés avec 100  $\mu l$  d'une préculture ( $DO_{600nm}=1$ ). Après incubation à température optimale pendant 24 h la quantité de diacétyle produite est estimée par dosage (**Figure 24**).

#### 2.12.1.3. Recherche de la concentration optimale en glucose

Après avoir déterminé la température et le pH permettant une bonne production de diacétyle, on recherche la concentration du glucose pour laquelle la production est la meilleure. Le milieu MRS et le lait écrémé tamponnés (tampon acétate de sodium  $C_2H_4O_2 / C_2H_3O_2 Na, 2H_2O ; 0,2M$ ) à pH optimal sont préparés à différentes concentrations de glucose : 10% ; 15% ; 20% et 25%. Les milieux sont ensuite inoculés par 100 $\mu l$  de chaque souche ( $DO_{600nm}=1$ ) et incubés à la température optimale pendant 24h. Après l'incubation, la quantité de diacétyle produite est estimée par dosage de la somme du diacétyle-acétoïne (**Figure 24**).

#### 2.12.1.4. Recherche de la concentration optimale en citrate

Les deux milieux MRS et lait écrémé tamponnés (tampon acétate de sodium  $C_2H_4O_2 / C_2H_3O_2 Na, 2H_2O ; 0,2M$ ) à pH optimal sont préparés à une concentration optimale de glucose puis additionnés par différentes concentrations de citrate : 0% (privé de citrate) ; 0,1% ; 0,3% ; 0,5% et 0,7%. Les milieux sont ensuite inoculés par 100  $\mu l$  de chaque souche ( $DO_{600nm}=1$ ) et incubés à la température optimale pendant 24 h. Après l'incubation, la quantité de diacétyle produite est estimée par un dosage de la somme du diacétyle-acétoïne (**Figure 24**).

#### 2.12.2. Etude de la cinétique de croissance et de production de diacétyle

Parallèlement à la croissance bactérienne, nous avons suivi la production de diacétyle chez les deux souches en fonction du temps, afin de déterminer à quel moment de la croissance le diacétyle est synthétisé. Pour cette étude nous avons donc utilisé un milieu MRS préparé aux concentrations optimales de glucose et de citrate, tamponné (tampon acétate de sodium) à pH optimal pour chaque souche. 100 ml du milieu sontensemencés avec 3 ml d'une culture ( $DO_{600nm}=1$ ) et incubés à la température optimale. La croissance bactérienne est estimée par mesure de l'absorption à 600nm, toutes les 3 heures pendant 24h. En parallèle, un dosage de diacétyle est effectué par la méthode de **Mathot (1992)** (**Figure 24**), afin de déterminer la quantité de diacétyle produite par la souche en fonction du temps.



### 3.1. Isolement et purification des souches bactériennes

Un nombre de 133 souches ont été isolées à partir de 15 échantillons et purifiées par repiquages successifs sur milieu MRS. Toutes ces bactéries se sont révélées positives à la coloration de Gram et catalase négative.

### 3.2. Pré-identification par étude morphologique, physiologique et biochimique des souches

Lors de cette étude nous avons identifié les souches par les techniques phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

#### 3.2.1. Etude morphologique

L'étude morphologique est effectuée dans un but de présomption du genre des souches isolées. **Les figures 25 et 26** montrent quelques exemples de résultats pour les aspects micro et macroscopiques des souches.

- Les colonies formées sur milieu MRS solide des 22 souches isolées de « Klila » sont de petite taille (diamètre inférieur à 1 mm), d'une couleur blanchâtre, elles sont rondes à contour régulier, lisses et légèrement bombées. L'observation microscopique des frottis après coloration de Gram montre que les bactéries sont des bâtonnets courts à bouts arrondis et de tailles variables, elles sont associées par paires ou en courtes chainettes rappelant les caractéristiques des bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*. Toutes ces bactéries sont à Gram positif et à catalase négative.
- A partir de « Afermes » trente-huit souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS. Les colonies sont de petite taille et de couleur blanchâtre, parfois même translucide, lisse et régulières, L'observation microscopique a révélé après coloration de Gram deux formes de cellules : 16 bactéries sont cocci et 22 des cocobacilles. Elles sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues. Toutes les bactéries sont Gram positif et catalase négative.
- Les souches isolées de « Hamoum » sont au nombre de 28. Après les séries de purification sur le milieu MRS (pH 5,4) les colonies des souches présentent les caractéristiques suivantes : petites, blanchâtres, lisses, bombées et de contour régulier. Les résultats des tests morphologiques montrent aussi que toutes les souches sont à un Gram positif et catalase négative. L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules : 7 souches se présentent sous forme de petits cocci regroupés en chaînettes rappelant la forme de cellules de *Lactococcus* et 21 souches dont les cellules sont des bâtonnets isolés ou en courtes chaînettes faisant partie du genre *Lactobacillus*.
- Les souches isolées de couscous d'herbes sont de l'ordre de neuf ; sous microscope les cellules se présentent sous forme de bâtonnet dispersés ou regroupés en petites

chainettes. Sur milieu MRS solide les colonies présentent les caractéristiques suivantes : de diamètre de 3 mm, blanchâtres et crémeuses, de surface convexe.

- A partir de miel toutes fleurs 36 souches ont été isolées et purifiées ; la culture des bactéries sur boîtes montre des petites colonies blanchâtres crémeuses ou laiteuses au contour régulier, sous microscope les cellules présentent la formes des bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*.



Figure 25: Aspect des colonies bactériennes sur milieu MRS.

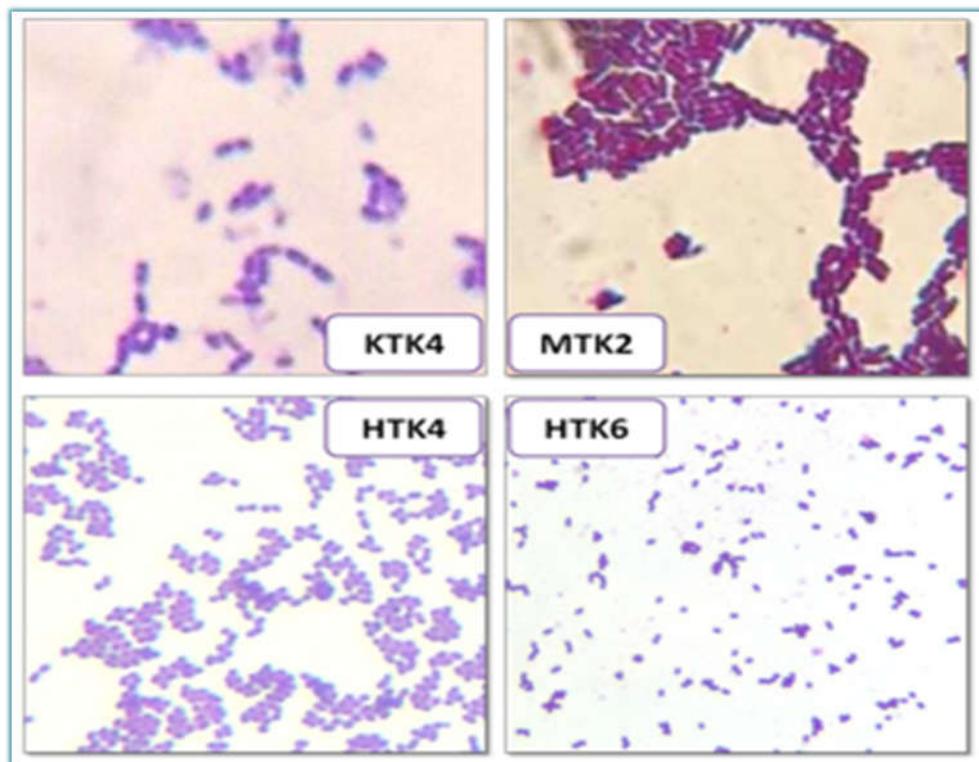


Figure 26: Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (G 10X100).

### 3.2.2. Etude physiologique et biochimique

Les caractéristiques phénotypiques sont illustrées dans le **tableau 9** et un exemple de résultats est montré dans les **figures 27** et **28**.

Les bâtonnets isolées de « Couscous d'herbes » et de « Miel » sont hétérofermentaires, à ADH positive, croissent à 10 °C mais pas à 45 °C. Ces bactéries peuvent être attribuées au groupe *Lactobacillus brevis* (**De Roissart, 1986 ; Klein, 2001**). Elles fermentent le galactose, le maltose, le fructose et le xylose mais n'utilisent pas le cellobiose ni le rhamnose (**Carr et al., 2002 ; Takahashi et al., 1999**).

Les bâtonnets isolés de « Klila » sont homofermentaires et peuvent croître à 15 °C ; 7 souches croissent à 45°C et 6 souches poussent à 10 °C. Toutes ces bactéries ne possèdent pas l'arginine dihydrolase et se développent à pH 4 et pH 8 mais seulement 5 souches peuvent supporter une concentration de 6,5% de NaCl. Elles aboutissent à la fermentation du raffinose, lactose, cellobiose, mannitol, sorbitol, lactose et galactose. Ces bactéries sont attribuées selon les recommandations de **Sharpe (1979), Carr et al. (2002)** et **Hammes et Hertel (2006)** à *Lactobacillus plantarum*.

Parmi les lactobacilles isolés de « Hamoum » 13 isolats sont homofermentaires et ne possèdent pas l'arginine dihydrolase. Toutes ces souches ne poussent pas à 10°C et croissent à 15°C et 37°C ; seulement 9 d'entre elles peuvent croître à 45°C. Les bactéries de ce groupe fermentent le mannitol, le sorbitol, le raffinose et le cellobiose. Ces isolats appartiennent selon **Axelsson (2004)** et **Hammes et Hertel (2006)** au groupe II des lactobacilles (Streptobacteria) et à *Lactobacillus plantarum*. Les huit autres souches de forme bacillaire sont classées dans le groupe III des lactobacilles (Betabacterium), car elles se révèlent hétérofermentaires à ADH positive, croissent à 15°C mais pas à 45°C. Ces bactéries donnent des résultats positifs pour la fermentation de : saccharose, xylose, lactose, galactose, fructose, cellobiose et maltose, ce qui permet de les attribuer à l'espèce *Lactobacillus brevis* (**Batt et al., 2014** et **Carvalho et al., 2014**). Sept souches de *Lactococcus* sont homofermentaires, possèdent l'ADH et croissent à 15°C, 37°C et 45°C. Elles fermentent le maltose, le lactose, le galactose, le raffinose et le cellobiose, tandis que l'utilisation du sorbitol, rhamnose et raffinose dépend de la souche. Le phénotype de ces bactéries semble très similaire à celui de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (**Sakala et al., 2002 ; Teuber et Geis, 2006** et **Azhari Ali, 2011**).

Toutes les bactéries isolées de « Afermes » semble avoir le phénotype des entérocoques : elles sont thermorésistantes, se développent à 10 °C et 45 °C et aux pH 5 et 9,6 mais pas à pH 4. Ces bactéries sont homofermentaires, croissent à 6,5% de NaCl, sont à ADH positive et réduisent le bleu de méthylène. Elles utilisent les sucres suivants : saccharose, lactose, galactose, fructose, cellobiose, maltose (**Devriese et al., 1993; Facklam et Collins, 1989 ; Manero et Blanch, 1999**).

Tableau 9: Caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques isolées de différents produits artisanaux.

		Hamoum		Klila	Miel	Couscous d'herbes	Afermes	
		cocci (n=7)	Bacille (n=8)	Bacille (n=13)	Bacille (n=22)	Bacille (n=36)	Bacille (n=9)	cocci (n=38)
Morphologie								
Gram		+	+	+	+	+	+	+
Catalase		-	-	-	-	-	-	-
CO <sub>2</sub>		-	+	-	-	+	+	-
ADH		+	+	-	-	+	+	+
Croissance à	10 °C	-	-	-	+ (16)	- (20)	-	+
	15 °C	+ (6) <sup>a</sup>	+	+	+	+ (34)	+	+
	37 °C	+	+ (7)	+	+ (16)	+	+	+
	45 °C	+	-	+ (8)	+ (7)	-	-	+
Croissance en présence de NaCl à	2%	+	+ (5)	+	+	+ (35)	+	
	4%	+ (6)	- (7)	+ (7)	+	+ (19)	+ (6)	
	6,5%	- (6)	-	- (11)	- (17)	- (33)	-	+
	15%							- (37)
Croissance à pH	4	- (7)	- (4)	- (10)	- (17)	+	+ (8)	-
	4,5	- (6)	- (6)	- (8)	+	+ (35)	+	+
	8	+ (5)	-	- (9)	+	+ (35)	- (6)	
	9,6	-						+
Survie à 60 °C								+
Test de sherman								+
Mannitol		+ (6)	+ (7)	+ (11)	+	+ (29)	+ (6)	-
Sorbitol		+ (4)	- (7)	- (9)	+	- (34)	- (8)	-
Saccharose		+	+	+ (12)	- (12)	+ (22)	+	+
Xylose		+	+	+	-	+	+	-
Lactose		+	+	+ (11)	+ (21)	+ (23)	+	+
Galactose		+	+	+	+	+ (35)	+	+
Rhamnose		+ (4)	- (4)	+ (8)	-	-	-	-
Raffinose		+ (6)	+ (7)	+ (9)	+	- (19)	- (7)	- (35)

Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+ (11)	+	-	-	+
Arabinose	-	- (6)	- (10)	-	- (33)	- (8)	-
maltose	+	+	+	+	+	+ (8)	+
Pré-identification	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Lactobacillus brevis</i>		<i>Enterococcus</i>

<sup>a</sup> : nombre des isolats      - : absence de croissance      + : présence de

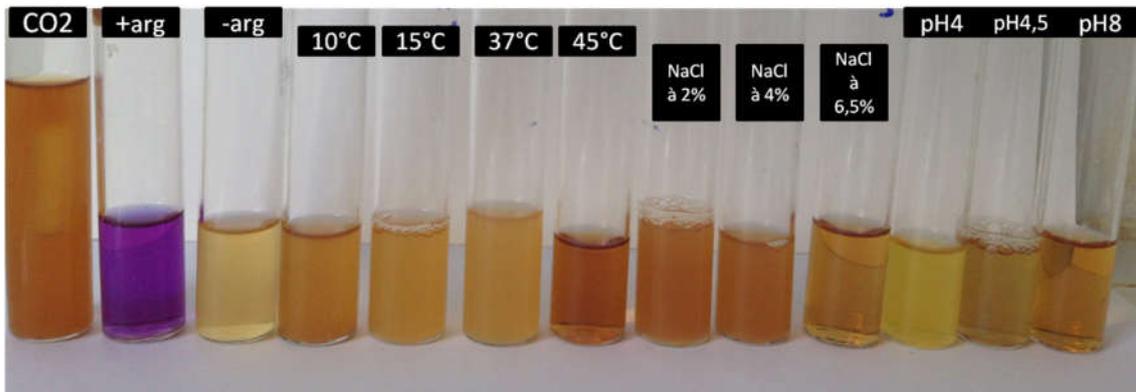


Figure 27: Caractères physiologiques de la souche MTK55

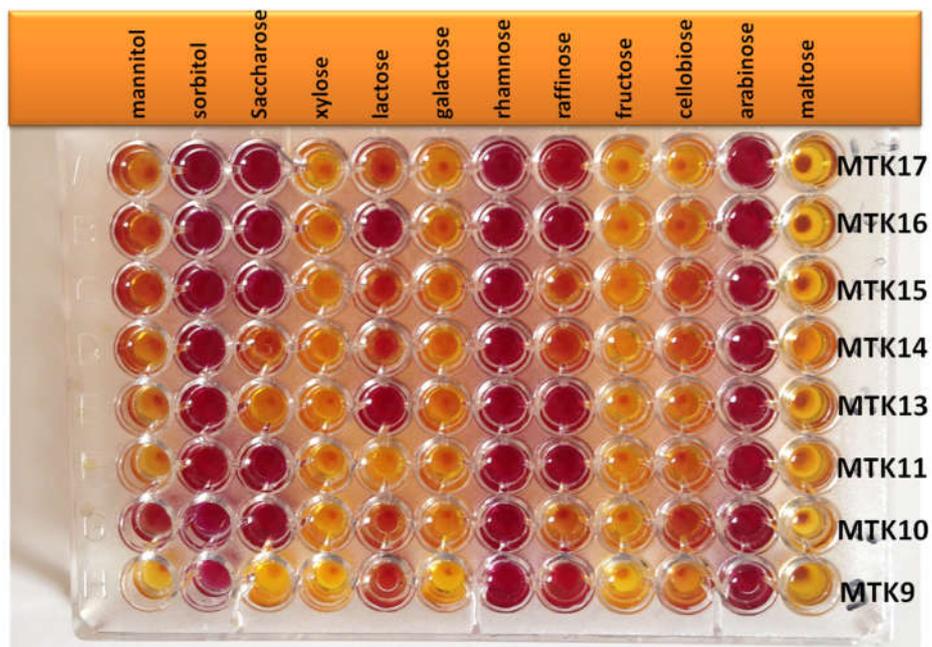


Figure 28: Profil fermentaires des souches MTK.



Couleur jaune : dégradation du sucre.



Couleur pourpre : résultat négatif.

Dans cette étude les tests effectués ont abouti à l'identification de 35 souches de *Lactobacillus plantarum* isolées de *Hamoum* et de *Klila*. Plusieurs études montrent la présence de ces bactéries dans les produits laitiers fermentés, ainsi dans les plantes (Torriani *et al.*, 2001; Siezen *et al.*, 2010b). Mathara *et al.* (2008) ont trouvé que *Lactobacillus plantarum* était l'espèce dominante parmi les bactéries lactiques isolées du lait fermenté de

Kenya. De même **Mathara et al. (2004)** ont noté que *Lactobacillus plantarum* était une espèce importante dans certains produits de fermentation à partir de légumes ou de produits laitiers. **Kaktcham et al. (2012)** ont noté que *Lactobacillus plantarum* représente (62%) des bactéries isolées de boissons de fermentation traditionnelle du Cameroun.

Les souches de *Lactobacillus plantarum* se caractérisent par une grande diversité phénotypique et génomique conduisant à une meilleure adaptation à la niche biologique (**van Kranenburg et al., 2005 ; Molenaar et al., 2005; Connelly, 2008**). *Lactobacillus brevis* est isolé à partir de miel, couscous d'herbes et hamoum. Cette bactérie est fréquemment trouvée sur les plantes ainsi que dans d'autres niches, y compris les boissons et le tractus intestinal humain (**Fukao et al., 2013**).

Les résultats montrent la présence de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* dans le blé fermenté. Cette espèce a été détectés par plusieurs chercheurs dans les plantes fermentées (**Uhlman et al., 1992 ; Cocaign-Bousquet et al., 1995 ; Salama et al., 1995 ; Cai et al., 1997 ; Franz et al., 1997 ; Kelly et al., 1998 ; Choi et al., 2000 ; Nomura et al., 2006 et Yang et al., 2010**).

Les bactéries isolées de « Afermes » présentent les caractéristiques des entérocoques. Ces derniers sont de nature ubiquiste, leur capacité d'adaptation à des environnements inhospitaliers permet de les retrouver dans différentes eaux (usées, douces et de mer), dans le sol, sur les végétaux et dans le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud (y compris celui de l'homme) (**Manero et al., 1999**). L'origine de la présence d'entérocoques dans le règne végétal n'est pas clairement définie. Elle peut être endogène comme elle peut résulter d'une contamination environnementale. Dans les olives vertes fraîches, *En. faecium* et *En. faecalis* sont des espèces prédominantes, elles sont retrouvées également dans les olives fermentées (**Fernández, 1983**). **Ben Omar et al. (2004)** ont signalé que les entérocoques trouvés dans les olives sont bien adaptés aux valeurs de pH initial (9,0) et à la concentration en sel de la saumure employée lors de la transformation. Dans les alimentations asiatique et africaine, *En. faecium* et *En. faecalis* sont généralement liés à la fermentation du sorgho (**Hamad et al., 1997 ; Yousif et al., 2005**) et du soja (**Mulyowidarso et al., 1990 ; Yoon et al., 2008**). De même, *En. mundtii* est retrouvé majoritairement dans le soja (**De Kwaadsteniet et al., 2005 ; Todorov et al., 2005 ; Zendo et al., 2005**), la chicorée fraîche (**Bennik et al., 1998**) et dans l'ensilage d'herbe (**Kawamoto et al., 2002**). Certaines de ces bactéries sont non seulement essentielles à la fermentation de ces aliments, mais elles possèdent également des propriétés technologiques intéressantes comme la dégradation du raffinose et du stachyose, sucres non digestibles, ou encore la production de bactériocines (**Yousif et al., 2005**).

### 3.3. Identification des bactéries à l'aide de galeries API50 CHL et de cartes Vitek2GP (BioMérieux)

Les isolats ont été regroupés en 30 groupes selon les résultats préliminaires de la pré-identification. La confirmation de l'identité des isolats lactiques est effectuée à l'aide des galeries API 50 CHL ou par cartes Vitek2GP. Le protocole recommandé par le fabricant pour l'inoculation et l'incubation des milieux est scrupuleusement suivi. Les profils de dégradation des hydrates de carbone obtenus par le système API 50 CHL des isolats sont répertoriés dans **le tableau 10**.

Les résultats de l'identification par galeries API 50 CHL confirment ceux de la pré-identification. Ils montrent que les souches appartenant à la même espèce présentent des profils fermentaires variables :

Les souches de l'espèce *Lactobacillus brevis* possèdent 7 caractères positifs communs : D-xylose, galactose, glucose, fructose, MDG (méthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside), D-maltose, D-mélibiose. Elles se différencient entre elles par 9 autres caractères : GNT (potassium gluconate), D-turanose, D-saccharose, esculine, NAG (N-acétylglucosamine), D-mannitol, MDX (méthyl- $\beta$ D-xylopyranoside), D-ribose, L-arabinose.

Les bactéries appartenant à *Lactobacillus plantarum* présentent des résultats positifs pour l'utilisation de : L-arabinose, D-ribose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, NAG (N-acétylglucosamine), esculine, salicine, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-tréhalose, gentiobiose. Les résultats obtenus pour la fermentation de 8 autres hydrates de carbone sont variables : GNT (potassium gluconate), D-tagatose, D-mélézitose, D-saccharose, D-melibiose, arbutine, MDG (méthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside), D-sorbitol.

Tableau 10: Profil fermentaire des souche

Origine Code de la souche	Hamoum						Miel										Couscou d'herbes						Klila								
	HMTK4	HMTK8	HMTK10	HMTK21	HMTK24	HMTK58	MTK2	MTK3	MTK7	MTK9	MTK13	MTK17	MTK32	MTK36	MTK50	CSTK38	CSTK50	CSTK53	CSTK54	CSTK56	CSTK58	KTK1	KTK2	KTK4	KTK5	KTK6	KTK7	KTK8	KTK9	KTK13	
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-ribose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-xylose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MDX	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-mannose	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
L-rhamnose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-mannitol	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-sorbitol	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
MDM	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MDG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Amygdaline	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arbutine	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
ESC	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Salicine	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Cellulose	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

D-lactose	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-melibiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
D-saccharose	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	
D-tréhalose	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Inuline	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-mélézitose	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-raffinose	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amidon	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Glycogène	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gentiobiose	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-tagatose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GNT	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Identifiée à	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> à 82%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 98,2%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99,8%	<i>Lactobacillus plantarum</i> à 99,8%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99,8%	<i>Lactobacillus plantarum</i> à 99,3%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99,9%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99,9%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 98%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99,9%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 82,3%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 99,9%	<i>Lactobacillus brevis</i> à 82,3%	<i>Lactobacillus plantarum</i> à 98%																	

La carte Vitek2 GP a permis l'identification correcte sans recours à des tests additionnels de 6 souches d'entérocoques isolées de « Afermes ».

Parmi les six souches testées : 5 appartiennent à *Enterococcus faecium* (HTK1, HTK3, HTK9, HTK38 et HTK60). La souche HTK 12 a été identifiée à *Enterococcus gallinarum* (99%).

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, et les souches ont toutes poussé à 6.5% de NaCl (Tamime, 2002 ; Ho et al, 2007 ; Devriese, 2006). Un exemple des résultats est montré dans la figure 29.

Informations sur l'identification		Heure de l'analyse :		5,75 heures		État :		Final	
Germe sélectionné		89% Probabilité		Enterococcus faecium					
Commentaires sur l'ident.		Profil biochimique :		002002065733771					

2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Figure 29 : Exemple de résultats du test d'identification sur carte Vitek

### 3.4. Identification des bactéries par MALDI-TOF-MS

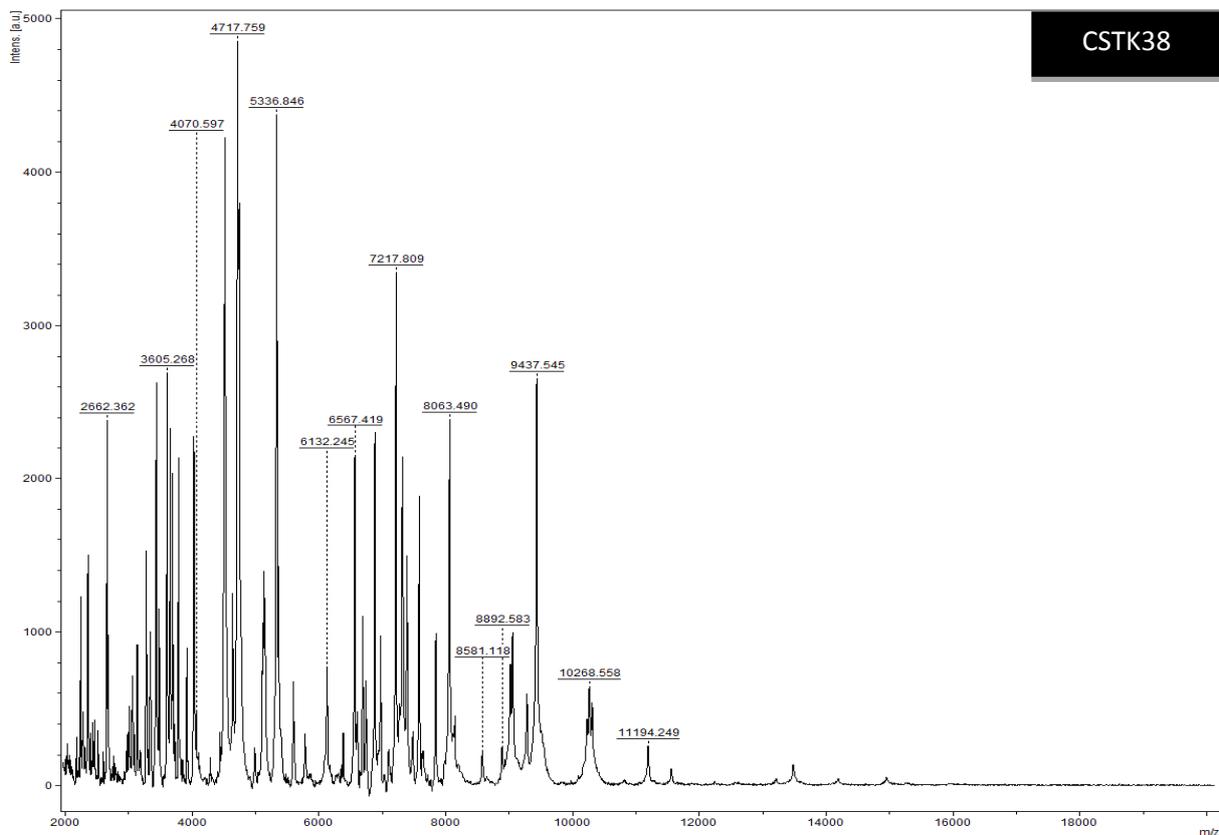
La spectrométrie de masse à temps de vol de désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF-MS) peut être utilisée pour la détection rapide des protéines bactériennes dans un mélange brut. Elle peut potentiellement être utilisée comme un outil pour l'identification bactérienne. Le profil MALDI-TOF-MS des cellules bactériennes intactes génère des empreintes digitales de masse des ions caractéristiques. De tels spectres varient dans leurs pics caractéristiques selon les genres et les espèces, voire même les souches. Les signaux des ions libérés de la surface des cellules bactériennes sont représentatifs des peptides et des protéines synthétisés par les cellules.

Les souches bactériennes ayant donné les meilleurs résultats pour plusieurs caractéristiques technologiques ainsi qu'une bonne croissance bactérienne après 24 h d'incubation à 30 °C ont été sélectionnées pour confirmer leur identification par MALDI-TOF-MS.

Les résultats obtenus confirment ceux de l'identification phénotypique après traitement des spectres obtenus par le logiciel BioTyper (BRUKER DALTONICS INC.). Les scores obtenus pour cette identification varient de 2,18 à 2,34 montrant une bonne identification par MALDI-TOF-MS. Le **tableau 11** montre les résultats de l'identification pour les sept souches et la figure 30 montre différents spectres de masse obtenus dans cette étude.

**Tableau 11: Résultats de l'identification par MALDI-TOF-MS.**

Code de la souche	Identifiée à	Score
CSTK38	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,346
HMTK8	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,213
HMTK20	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,279
HMTK21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,347
MTK2	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,181
MTK13	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,2
	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,287



**Figure 30 a: Spectres de masse des souches obtenus par MALDI-TOF-MS**

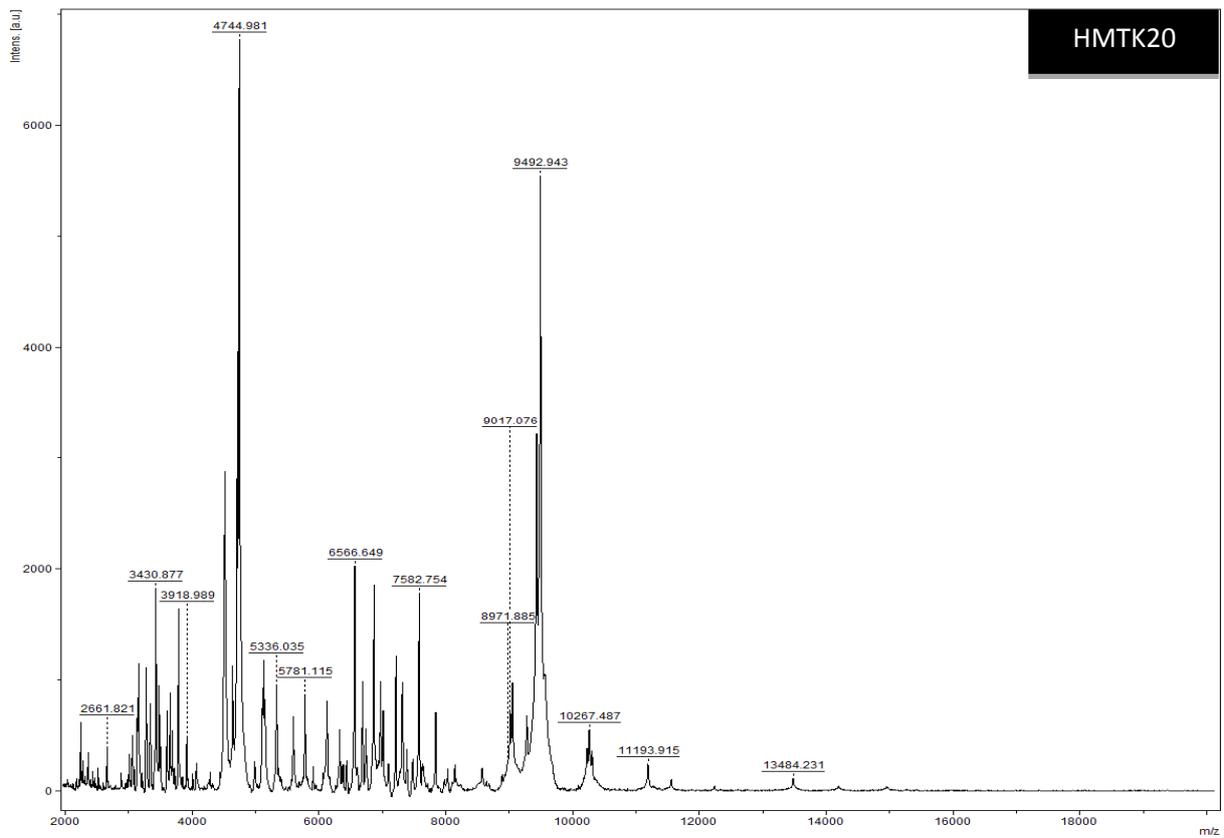
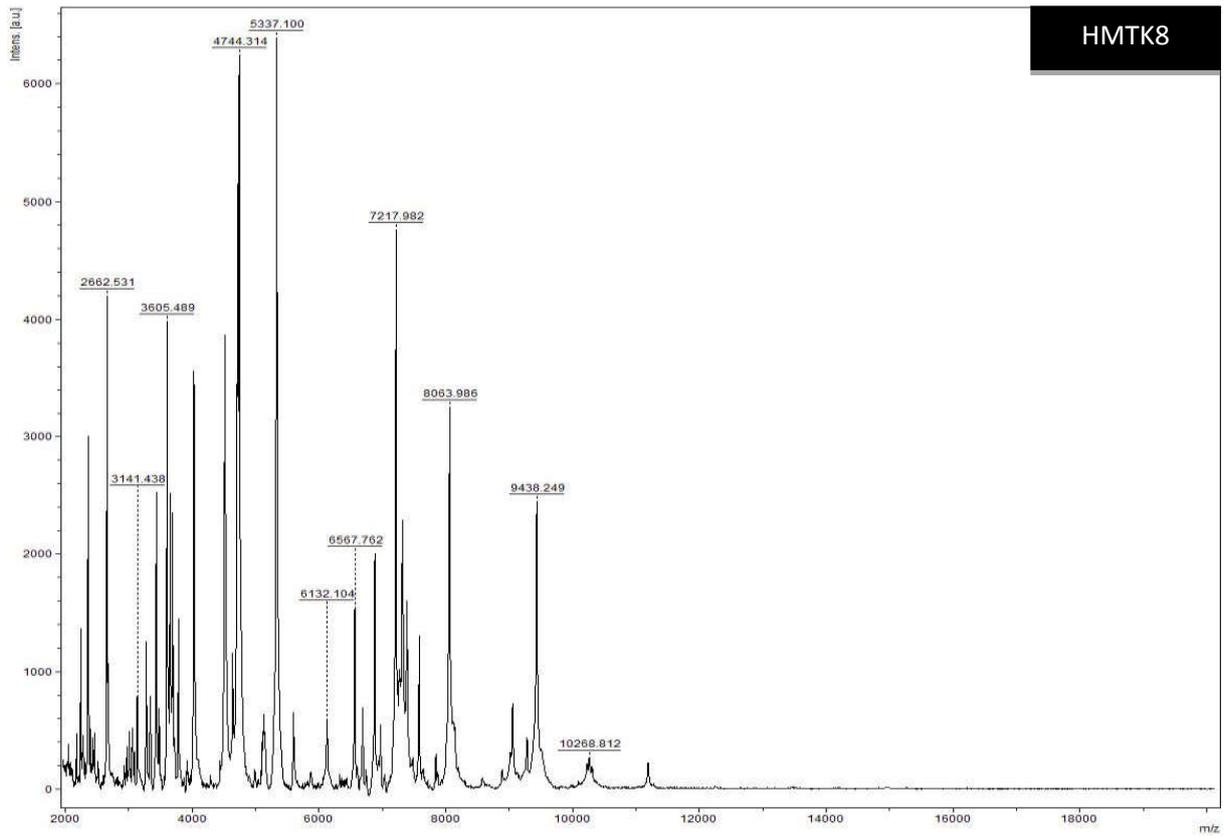


Figure 30 b: Spectres de masse des souches obtenus par MALDI-TOF-MS

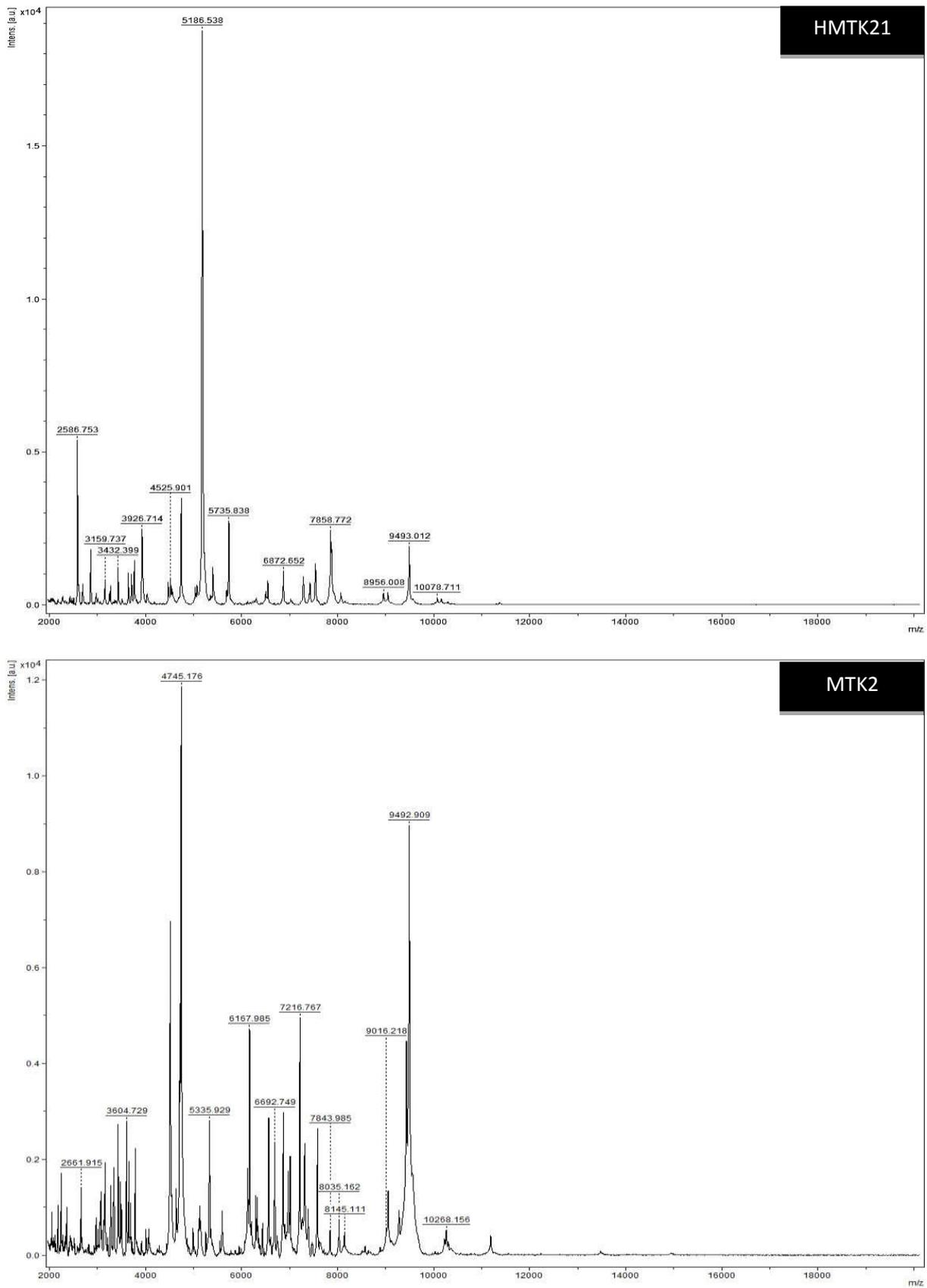


Figure 30 c: Spectres de masse des souches obtenus par MALDI-TOF-MS

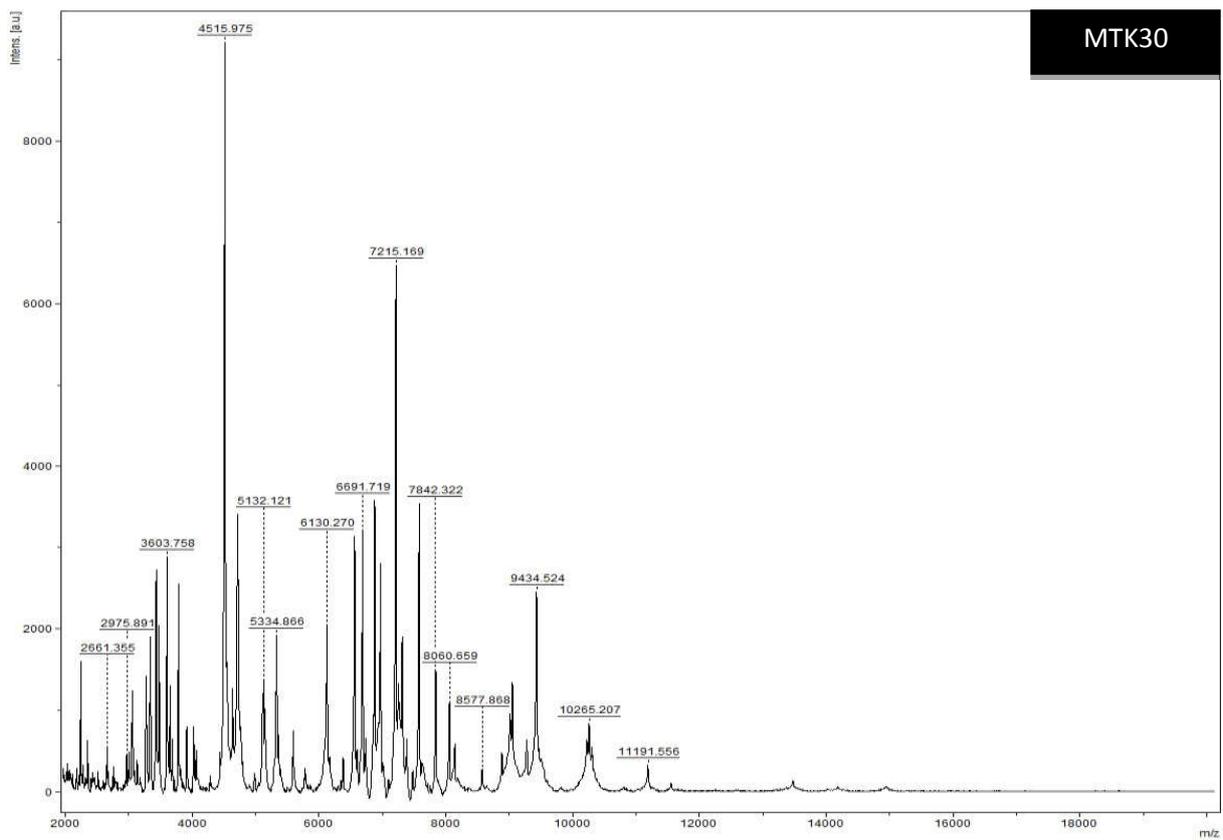
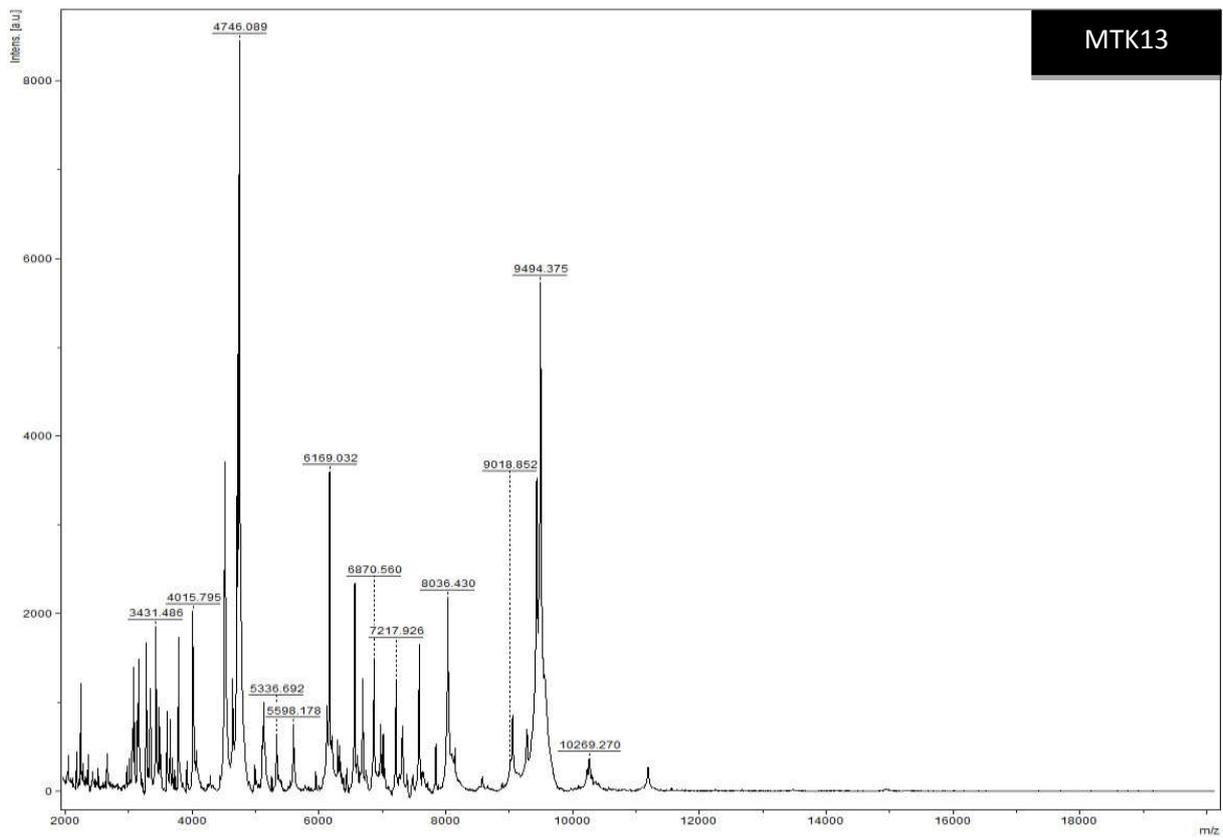


Figure 30 d: Spectres de masse des souches obtenus par MALDI-TOF-MS

Pour chaque spectre, une valeur correspondant à l'intensité a été donnée aux pics les plus représentatifs qui correspondent à des composants bactériens produits en grande quantité, principalement composés de protéines très abondantes, y compris de nombreuses protéines ribosomiques, qui sont supposées être caractéristique pour chaque espèce bactérienne. Les spectres sont très variables pour les souches de la même espèce. MALDI-TOF MS semble être une excellente alternative aux approches génétiques parce qu'il est fiable, rapide et rentable, et permet regroupement de nombreux échantillons en une seule analyse (jusqu'à 384 échantillons par lot). Au cours de la dernière décennie, la spectrométrie a été employée pour la caractérisation de différentes bactéries (**Welker et Moore, 2011 ; Barreau et al., 2013**). Il y a eu quelques rapports sur l'utilisation de MALDI-TOF-MS pour l'identification des bactéries lactiques isolées de viande fermentée (**Doan et al., 2012**), de produits laitiers (**Duskova et al., 2012 ; Angelakis et al., 2011**), des espèces de *Lactococcus* (**Tanigawa et al., 1010**), *Leuconostoc* (**De Bruyne et al., 2011**) et *Lactobacillus* (**Dec et al., 2014**). MALDI-TOF-MS a le potentiel de remplacer les techniques d'identification basées sur les empreintes génomiques, tel que (GTG) 5-PCR, et l'analyse de la séquence du gène *pheS* (**Barreau et al., 2013**). **Angelakis et al. (2011)**, qui a identifié des bactéries lactiques obtenues d'aliments probiotiques et yaourt, a déterminé que la spécificité de MALDI-TOF MS était de 92% en comparaison avec des méthodes moléculaires telles que l'étude de l'ADNr 16S et le séquençage du gène *tuf*.

### 3.5. Etude des caractéristiques technologiques des souches

#### 3.5.1. Activité acidifiante

La sélection des bactéries lactiques avec une capacité élevée de production d'acide parmi les aliments traditionnels fermentés a retenu l'attention de nombreux chercheurs (**Durlu-Ozkaya et al., 2001 ; Akabanda et al., 2014 ; Chen et al., 2017 ; Viana de Souza et Silva Dias 2017**). La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. En effet, l'acidification a pendant très longtemps constituée une méthode privilégiée de conservation des aliments traditionnels, depuis les laits fermentés jusqu'aux végétaux (choucroute, olives...). Elle contribue indirectement à la synérèse du caillé, l'expulsion du petit-lait et la texture du fromage (**Beresford et Williams, 2004; Cogan, 2004**). De plus, quand le pH descend il y a précipitation de la caséine et production de petites molécules organiques, y compris l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acide acétique et l'éthanol, qui contribuent à l'établissement du profil aromatique global du produit fini (**Vedamuthu, 2006 ; Hutkins, 2006**).

Les résultats obtenus sont montrés dans **la figure 31** et **le tableau 12** montre le pH du milieu après 24 heures d'incubation pour chaque souche. Ces résultats nous conduisent à constater que le comportement acidifiant de ces bactéries est variable d'une souche à l'autre dans la même espèce. Ces différences observées d'une bactérie lactique à l'autre ont

été expliquées par **De Roissart (1986)**. En fait, l'activité acidifiante de chaque souche est liée à sa capacité spécifique à décomposer et assimiler les nutriments ainsi qu'à la présence ou l'absence des systèmes de transports de ces nutriments (**Albenzio et al., 2001**).

Les souches de *Lactobacillus plantarum* produisent une acidité variant de 10 à 90 degrés Dornic. La possibilité de trouver des souches de *Lactobacillus plantarum* à capacités acidifiantes variables est rapportée par d'autres auteurs (**Xanthopoulos et al., 2000 ; Marroki et al., 2011**). On peut classer les bactéries selon leur pouvoir acidifiant (**Karam et Karam, 1994**) : 9 souches sont faiblement acidifiante dont l'acidité produite est inférieure à 40 °D, 11 souches sont moyennement acidifiantes produisant une quantité d'acide lactique ne dépassant pas 79 °D tandis que 15 sont fortement acidifiantes avec des taux d'acidification supérieures à 70 °D. De même on remarque que deux souches isolées de « Hamoum », (HMTK58 et HMTK59), arrivent à produire 70 °D ce qui abaisse le pH du milieu à pH 4, tandis qu'une seule souche isolée de « Klila » (KTK5) abaisse le pH jusqu'à 4,23 produisant 81 °D. Ces résultats sont assez différents de ceux rapportés par d'autres auteurs (**Marroki et al., 2011; Akabanda et al., 2014**). Selon **Dagdémir et Özdemir, (2008)** les souches de *Lactobacillus plantarum* aboutissent à l'abaissement du pH jusqu'à 5,32 après 24 h d'incubation.

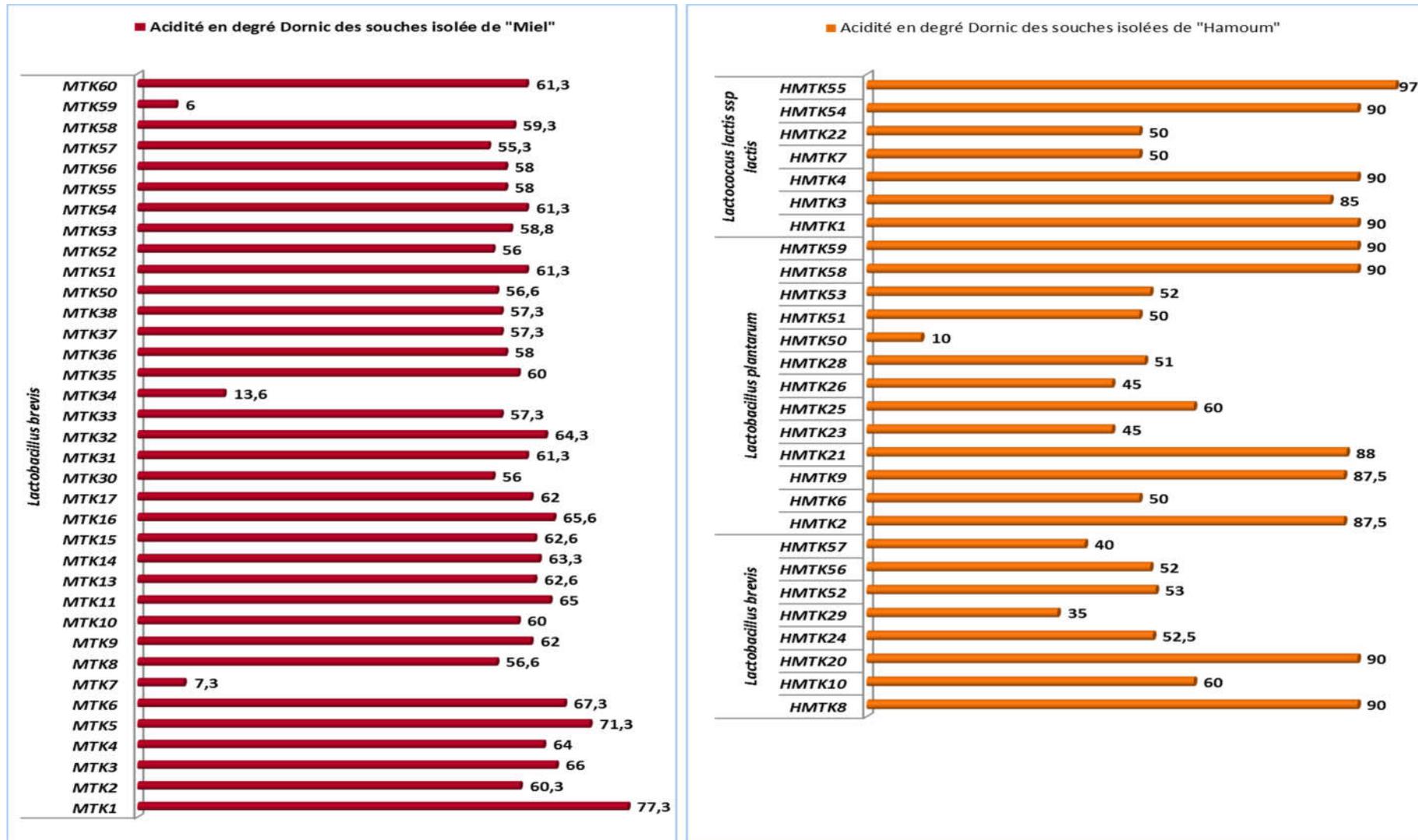


Figure 31 a: Pouvoir acidifiant des souches.

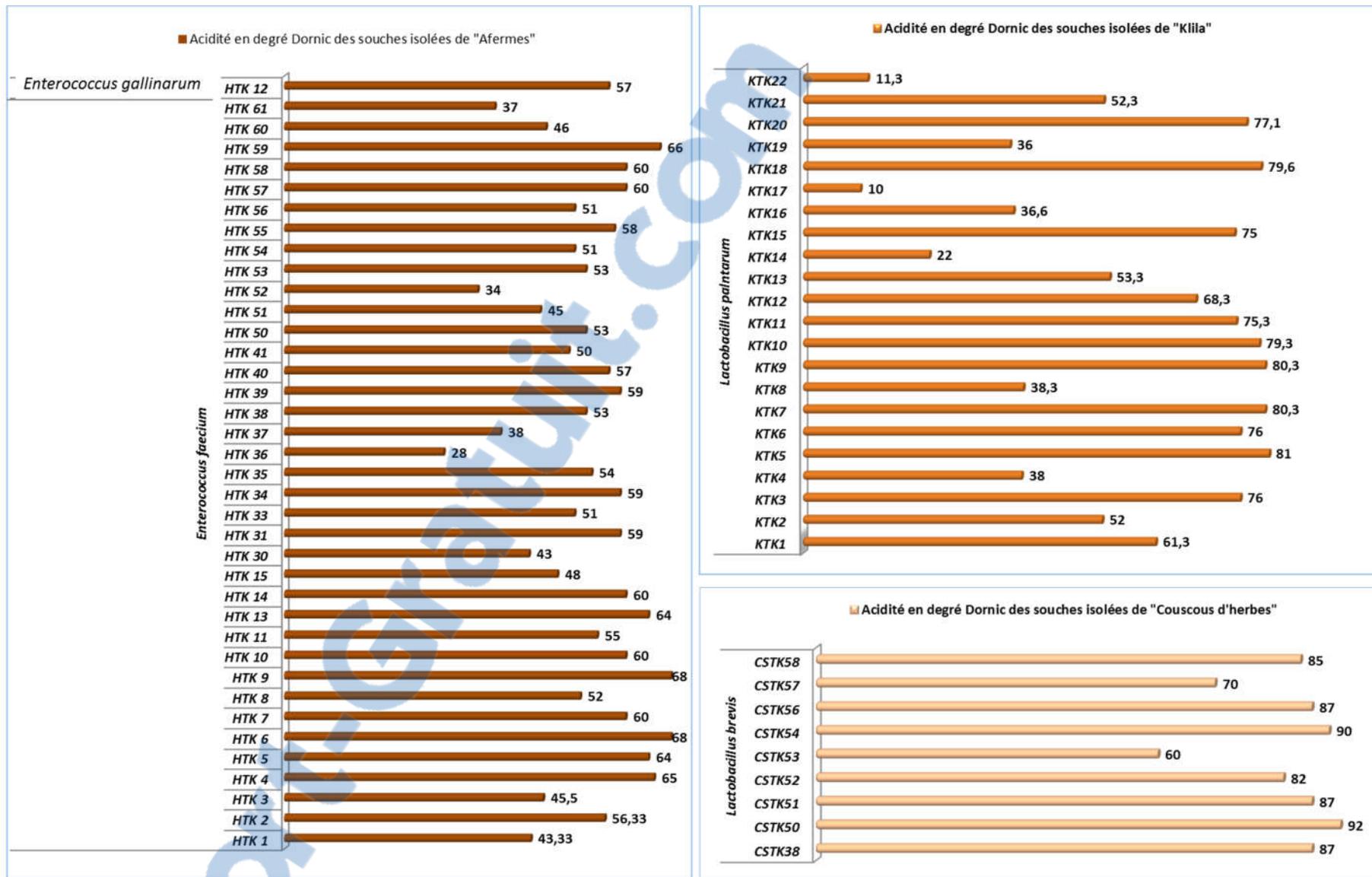


Figure 31 b : Pouvoir acidifiant des souches.

Tableau 12: pH final du milieu.

	Souche	ΔpH (24h)						
<i>Lactobacillus brevis</i>	MTK1	4,6	MTK15	4,6	MTK51	4,6	CSTK52	4,5
	MTK2	4,65	MTK16	4,5	MTK52	4,5	CSTK53	6,1
	MTK3	4,36	MTK17	4,6	MTK53	4,6	CSTK54	4,6
	MTK4	4,6	MTK30	4,53	MTK54	4,63	CSTK56	4,6
	MTK5	4,46	MTK31	4,53	MTK55	4,63	CSTK57	4,6
	MTK6	4,5	MTK32	4,5	MTK56	4,6	CSTK58	4,6
	MTK7	5,73	MTK33	4,6	MTK57	4,64	HMTK8	4
	MTK8	4,6	MTK34	5,8	MTK58	4,6	HMTK10	4,7
	MTK9	4,64	MTK35	4,6	MTK59	5,8	HMTK24	4,7
	MTK10	4,5	MTK36	4,63	MTK60	4,5	HMTK29	4,8
	MTK11	4,56	MTK37	4,6	CSTK38	4,7	HMTK52	4,7
	MTK13	4,6	MTK38	4,76	CSTK50	4,7	HMTK56	4,6
	MTK14	4,6	MTK50	4,56	CSTK51	6,1	HMTK57	6,3
							HMTK20	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HMTK2	4,1	HMTK50	5,8	KTK5	4,25	KTK16	4,97
	HMTK6	4,6	HMTK51	4,6	KTK6	4,34	KTK17	5,6
	HMTK9	4,2	HMTK53	4,7	KTK7	4,28	KTK18	4,29
	HMTK21	4,1	HMTK58	4	KTK8	4,8	KTK19	4,96
	HMTK23	4,7	HMTK59	4	KTK9	4,28	KTK20	4,3
	HMTK25	4,6	KTK1	4,45	KTK10	4,3	KTK21	4,5
	HMTK26	4,2	KTK2	4,55	KTK11	4,32	KTK22	5,65
	HMTK28	4,7	KTK3	4,32	KTK12	4,4		
			KTK4	4,87	KTK13	4,6		
<i>Enterococcus faecium</i>	HTK 1	4,76	HTK 11	4,36	HTK 36	5,39	HTK 53	4,62
	HTK 2	4,35	HTK 13	4,24	HTK 37	4,97	HTK 54	4,55
	HTK 3	4,59	HTK 14	4,26	HTK 38	4,50	HTK 55	4,38
	HTK 4	4,15	HTK 15	4,55	HTK 39	4,37	HTK 56	4,48
	HTK 5	4,26	HTK 30	4,78	HTK 40	4,46	HTK 57	4,36
	HTK 6	4,14	HTK 31	4,36	HTK 41	4,65	HTK 58	4,37
	HTK 7	4,39	HTK 33	4,45	HTK 50	4,62	HTK 59	4,22
	HTK 8	4,52	HTK 34	4,36	HTK 51	4,73	HTK 60	4,61
	HTK 9	4,15	HTK 35	4,40	HTK 52	4,94	HTK 61	4,95
	HTK 10	4,26						
<i>Enterococcus gallinarum</i>	HTK 12	4,37						
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	HMTK1	4	HMTK4	4,1	HMTK22	4,66	HMTK54	4,1
	HMTK3	4,2	HMTK7	4,7			HMTK55	3,9

Les lactobacilles métabolisent le lactose plus lentement que les lactocoques mais la quantité finale d'acide produite peut être similaire à celle des lactocoques (**Herreros et al., 2003**). *Lb. plantarum* est connu pour être homofermentatif pour les hexoses, produisant 2 moles d'acide lactique par mole d'hexoses (**Passos et al., 1994**). **Wardani et al. (2017)** ont signalé que la taille de l'inoculum et la température de croissance ont des effets significatifs sur la production de l'acide lactique par les souches de *Lactobacillus plantarum*.

**Tableau 13: moyenne ± standard de déviation de l'acidité produite durant les différents essais (°D)**

	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
1 <sup>er</sup> essai	61,56±17,97	59,01±23,81	78,86±20,02	53,45±9,44
2 <sup>ème</sup> essai	61,54±18,11	58,94±23,94	79,00±19,73	53,32 ±9,57
3 <sup>ème</sup> essai	61,60±17,86	59,08±23,81	78,71±20,33	53,58±9,36

Les souches de *Lactobacillus brevis* produisent des quantités plus importantes d'acide lactique avec une moyenne de 61 °D (**tableau 13**). En général ce sont des souches moyennement acidifiantes ; 36 souches produisent une acidité comprise entre 40 °D et 70 °D ce qui est en concordance avec plusieurs travaux (**Sonar et Halami, 2014 ; Kim et al., 2017 ; Aquilanti et al., 2007**). 13 souches sont fortement acidifiantes y compris les 9 souches isolées de couscous d'herbes produisant jusqu'à 92 °D. Les résultats obtenus dans d'autres études ont montré que *Lb. brevis* est un bon producteur microbien d'acide lactique. Plusieurs facteurs ont été signalés pour augmenter l'efficacité de la production d'acide lactique comme la source de carbone, la source d'azote, la température, le mode et la durée de fermentation, le pH, l'agent neutralisant et l'aération (**Abdel-Rahman et al., 2013 ; Toptaş et al., 2014**). Dans l'étude de **Garde et al., (2002)** *Lactobacillus brevis* peut produire une quantité d'acide lactique allant à 8 g/l.

Les souches de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* présentent l'activité acidifiante la plus élevée par rapport aux autres espèces. Elles sont fortement acidifiantes et produisent des quantités d'acide lactique allant jusqu'à 9,7 g/l ce qui est en concordance avec les travaux de **Akerberg et al. (1998), Zadi-Karam et al. (2004), Ma et al. (2011) et Handa et Sharma (2016)**. Les valeurs les plus élevées de l'acidification des isolats de *Lactococcus* peuvent être dues au fait qu'ils ont un taux de croissance plus élevé (**Ballesteros et al., 2006**). Le pH des cultures de *Lc. lactis* ssp *lactis* après 24 h était de 3 à 4,7 unités de pH, ce qui rappelle les résultats de **Dagdemir et Ozdemir, (2008) et González et al. (2010)**. D'une manière générale les lactobacilles fermentent le lactose en produisant des quantités moins importantes que *Lactococcus* et ceci est aussi suggéré par **Herreros et al. (2003)**. Dans notre étude

*Enterococcus* présente l'activité acidifiante la plus faible avec une moyenne d'acidité de 53,45 °D produite après 24 h d'incubation. Plusieurs auteurs suggèrent que la production de l'acide lactique est faible chez les entérocoques et notamment chez *Enterococcus faecium* (Freitas *et al.*, 1999 ; Suzzi *et al.*, 2000 ; Sarantinopoulos *et al.*, 2001 ; Durlu-Ozkaya *et al.*, 2001). De même La production par les lactobacilles est plus importante que celle par *En. faecium* (Akabanda *et al.*, 2014). Les souches ayant un pouvoir acidifiant rapide sont de bonnes candidates pour le processus de fermentation laitière comme culture de départ, tandis que les souches faiblement acidifiantes peuvent être utilisées comme flore additive en fonction de leurs propriétés technologiques (Ayad *et al.*, 2004). Généralement, les caractéristiques souhaitables pour les bactéries lactiques comme starter sont les capacités à convertir rapidement et complètement les matières premières en acide lactique avec un minimum d'exigences nutritionnelles. Une acidification rapide de la matière première empêche la croissance de micro-organismes indésirables et est également essentielle pour l'établissement de la texture et l'arôme du produit final (Singh *et al.*, 2006). Elle intervient aussi comme inhibiteur des micro-organismes indésirables (Leory *et al.*, 2002), ce qui permet l'explication de la présence de souches bonnes acidifiantes dans ces produits artisanaux.

### 3.5.2. Activité protéolytique cellulaire

La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de nombreux produits fermentés. La dégradation des protéines du lait par les protéases extracellulaires des bactéries lactiques joue un rôle important dans la génération des peptides et acides aminés essentiels pour la croissance bactérienne et dans la formation de métabolites contribuant à la saveur des produits fermentés (Courtin *et al.*, 2002).

Dans cette étude nous avons cherché la présence d'activité protéolytique extracellulaire en cultivant les souches sur le milieu MRS-lait, le caractère protéolytique est révélé par l'apparition de halos de protéolyse comme montré dans la figure 32. La figure 33 montre les diamètres des zones de protéolyse pour les souches testées. Selon Vuilleumard (1986), la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm : par comparaison à cette donnée, nos souches sont protéolytiques, avec des diamètres des zones de protéolyse compris entre 6 et 18 mm. Les résultats montrent que les souches appartenant à *Lactobacillus plantarum* présentent le pouvoir protéolytique le plus faible avec des diamètres de lyse entre 6 et 10 mm et une moyenne de 5,9 mm (Tableau 13). Ces résultats rappellent ceux de nombreux travaux (Sadi *et al.*, 2016 ; Vukotić *et al.*, 2016 ; Belkheir *et al.*, 2017 et Monika *et al.*, 2017) qui montrent la présence de protéases extracellulaires chez *Lactobacillus plantarum* dégradant les protéines du lait. Nos résultats diffèrent sensiblement de ceux d'Abubakr et Al-Adiwish, (2017) où les souches *Lactobacillus plantarum* isolées de raisins donnent une zone de lyse de 10 mm dans du lait écrémé.

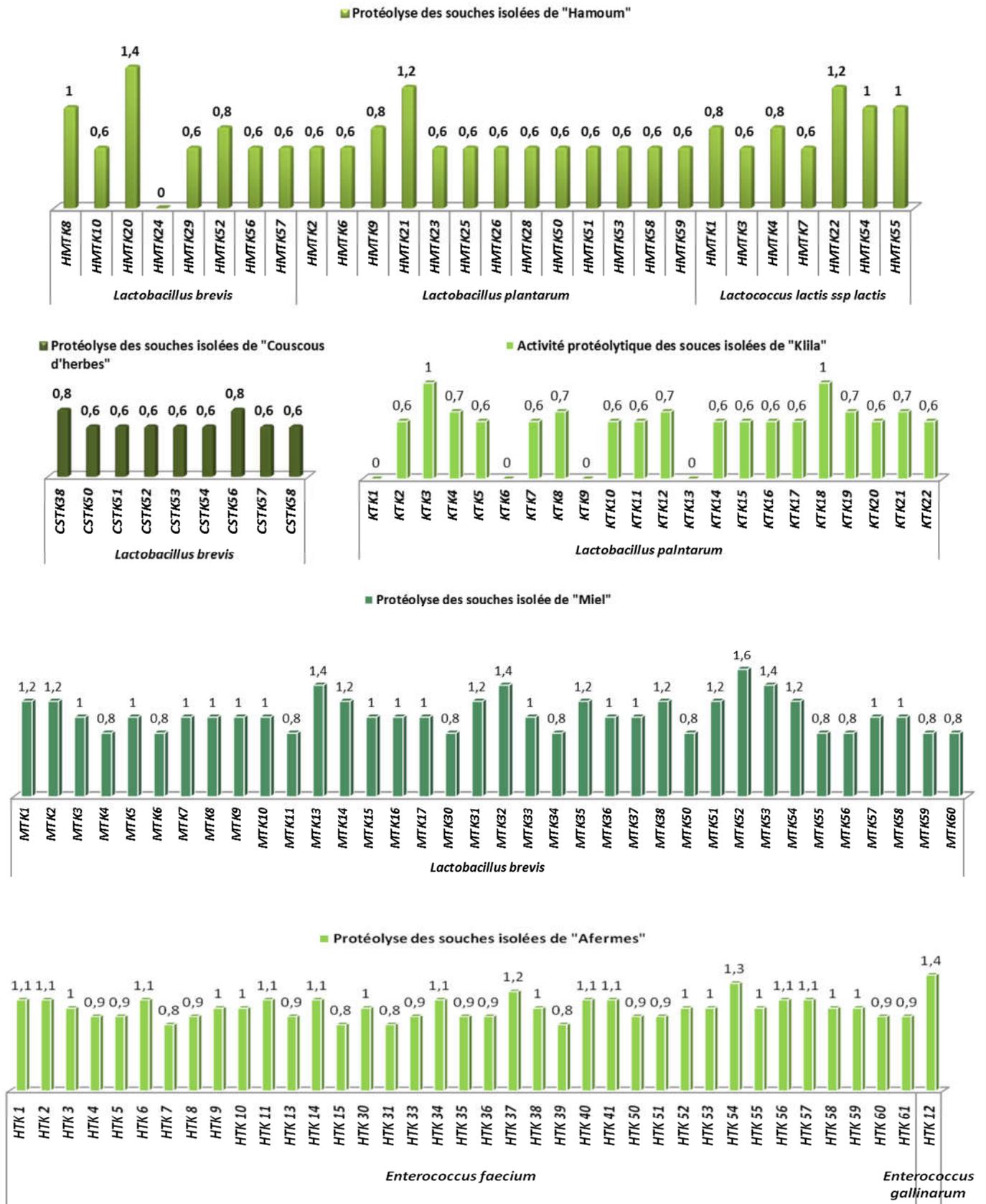


Figure 32: Pouvoir protéolytique des souches (Diamètre de la zone de protéolyse (cm))

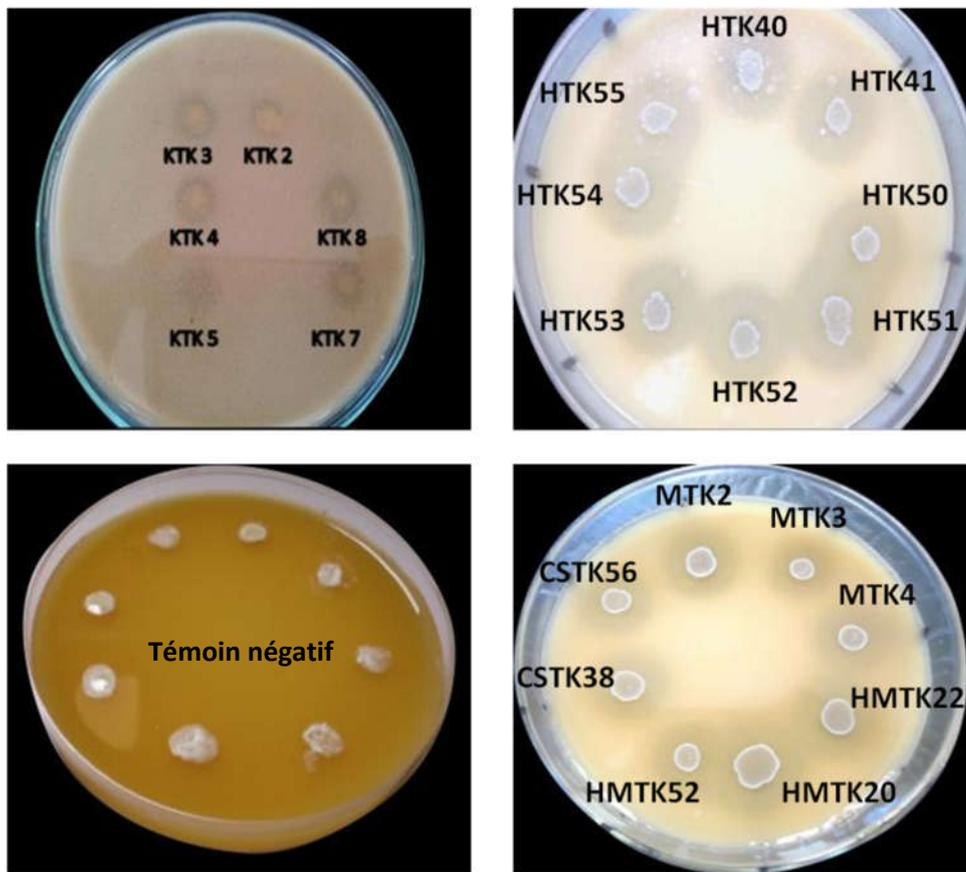


Figure 33: Activité protéolytique sur MRS-lait (2%).

De même pour **Seifu *et al.* (2002)** et **Yelnetty *et al.* (2014)** qui ont noté que des bactéries *Lactobacillus plantarum* isolées de produits laitiers fermentés présentent une activité protéolytique significative. Il est à noter que les souches isolées de « Hamoum » ont une activité protéolytique très proche de celle exprimée par les souches isolées de « Klila », dont la niche biologique contient essentiellement des protéines du lait. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'adaptation des bactéries lactiques à la niche biologique et sa composition en nutriments peut être la principale pression de sélection responsable de la perte ou l'acquisition des gènes codant pour les protéases. Il est tout à fait probable que ces bactéries en se produisant naturellement dans ces produits artisanaux ont gagné des gènes de protéinases d'organismes apparentés occupant déjà l'habitat. Ce qui peut témoigner cette proposition est le fait de la présence de plusieurs gènes *prt* dans un seul génome signalée par certains auteurs. On peut donc dire que ces gènes peuvent être originaires de différents hôtes. Cela aussi explique la distribution de ce qui était à l'origine considéré comme un gène spécifique à une espèce, chez d'autres moins apparentées. En outre, la distribution, la diversité et l'homologie des gènes *prtP* et *prtR* rapportées dans certains travaux peuvent témoigner du partage des gènes entre des espèces lointaines, tels que sont les groupes de *Lb casei* et *Lb plantarum* (**Vukotić *et al.*, 2016**). De même les travaux de **Ciocia *et al.* (2013)** et **Bi *et al.* (2017)** suggèrent que même des souches isolées

d'environnements très différents (levain, féculents, olives, légumes,...) sont capables de survivre et de proliférer dans le fromage grâce à leur capacité d'utiliser les sucres résiduels et les acides aminés. Leur résistance aux pH acides et leur haute tolérance au sel les aident à s'adapter à l'environnement pendant la maturation des fromages. L'utilisation d'une souche de *Lactobacillus plantarum* protéolytique isolée d'olive dans la fabrication de cheddar confirme que les souches provenant d'aliments non laitiers peuvent constituer une source de culture auxiliaire pour la fabrication de fromage.

**Fadda et al. (2002)**, **Basso et al. (2004)**, **Nie et al. (2014)** et **Wang et al. (2016)** ont montré la présence d'une activité protéolytique de *Lactobacillus plantarum* envers la viande notamment les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires. Ainsi **Silva Lopes et al. (1999)** montrent que les protéases extracellulaires de *Lactobacillus plantarum* ont un rôle important dans le processus de la régulation de l'activité lipolytique.

L'activité protéolytique exprimée par les souches de *Lactobacillus brevis* est plus importante que celle de *Lactobacillus plantarum* avec un diamètre de zone de lyse d'une moyenne de 9 mm. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Roudj et al. (2009)** et **Dib et al. (2014)**.

Nos résultats montrent que les souches isolées de « Hamoum » expriment une activité protéolytique à l'exception de la souche HMTK24, ce qui rappelle les résultats de **Di Cagno et al. (2002)** qui montrent que les bactéries *Lactobacillus brevis* isolées de levains présentent une activité protéolytique contre les polypeptides d'albumine et de globuline, ce qui a influencé positivement le ramollissement de la pâte pendant la fermentation. Les mêmes remarques peuvent être faites pour les souches isolées de « Couscous d'herbes » rappelant les observations de **Denkova et al. (2013)** montrant que *Lactobacillus brevis* isolé de végétaux exprime une activité protéolytique extracellulaire en présence des protéines du lait.

Les lactobacilles sont largement utilisés dans la production industrielle de différents produits laitiers fermentés au vu de leur pouvoir protéolytique. Leur potentiel technologique est indubitable ; en plus d'avoir un rôle crucial dans la maturation et la formation de saveurs des fromages et des autres produits laitiers, ils peuvent par protéolyse générer des peptides bioactifs à propriétés immunomodulatrices, antihypertensives, antithrombotiques, antioxydantes et antimicrobiennes (**Hayes et al., 2007; D'Arienzo et al., 2011; Wakai et Yamamoto, 2012**).

En raison de nombreuses auxotrophies aux acides aminés, les lactobacilles possèdent des systèmes protéolytiques bien développés permettant de fournir les peptides et les acides aminés à partir de milieu riche en protéines comme le lait. Ce système est composé de différentes protéases extracellulaires, de transporteurs de peptides et d'acides aminés, et peptidases intracellulaires. Les enzymes primaires dans ce système, nécessaires pour les premières étapes de l'utilisation d'un grand polypeptide, sont des sérines protéinases de

type subtilisine, ou des lactocepines. Ces enzymes sont de grandes protéines liées à la paroi cellulaire (~ 200 kDa) avec une structure en multi-domaine et une fine diversité dans la spécificité du substrat (Savijoki *et al.*, 2006, Kojic *et al.*, 1995).

**Tableau 14: Diamètre des zones de protéolyse durant les différents essais**

	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
1 <sup>er</sup> essai	0,92±0,28	0,59±0,25	0,85±0,22	1,00±0,13
2 <sup>ème</sup> essai	0,92±0,30	0,62±0,27	0,87±0,19	1,00 ±0,14
3 <sup>ème</sup> essai	0,91±0,29	0,58±0,25	0,84±0,26	0,98±0,16

Les lactocoques et les entérocoques donnent des zones moyennes de protéolyse très proches. Les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* se révèlent plus protéolytiques que *Lactobacillus plantarum* dont 50% donnent une zone de lyse supérieure ou égale à 10 mm. Ces résultats rejoignent ceux de Moulay *et al.* (2006) et Hassaine *et al.* (2008). Topisirovic *et al.* (2007) et Merzouk *et al.* (2013) suggèrent que *Lactococcus lactis ssp lactis* possède un bon pouvoir protéolytique extracellulaire, contrairement à Topisirovic *et al.* (2007) qui notent que l'examen de l'activité protéolytique a révélé que les isolats appartenant aux espèces *Lactococcus* et *Enterococcus* présentaient une faible activité protéolytique notamment *En. faecium* et *Lc. lactis ssp. lactis*. Selon Kunji *et al.* (1996) *Lc. lactis* possède un système protéolytique complexe composé de multiples peptidases intracellulaires et d'une seule protéase ancrée à la surface cellulaire, PrtP, dont le gène est plasmidique, et une protéase à sérine qui permet la croissance dans le lait en dégradant les caséines. *Lactococcus lactis* possède une protéase de surface spécifique à la maturation du précurseur de la nisine. Une protéase fonctionnelle de la famille HtrA a été mise en évidence chez *Lactococcus lactis* (Poquet *et al.*, 2001). Le diamètre de la zone de lyse noté pour les enterocoques atteint 14 mm ce qui rappelle les résultats de Hidayat (2017) qui montrent que les protéases extracellulaires des entérocoques dégradent le lait aboutissant à des zones de lyse de diamètre allant à 13 mm. Ces résultats ont indiqué que les isolats obtenus d'Afermes, qui est un fruit fermenté puis séché, ont une bonne activité protéolytique lorsqu'ils sont testés sur agar au lait écrémé. Des résultats similaires ont été rapportés pour les entérocoques isolés d'un fruit indonésien par Yelnetty *et al.* (2014). Plusieurs auteurs affirment que les entérocoques utilisés comme adjuvant dans la production du fromage contribuent à augmenter la dégradation de la caséine (Centeno *et al.*, 1999 ; Sarantinopoulos *et al.*, 2002). D'autres suggèrent que les souches d'*Enterococcus faecium* produisent les protéases extracellulaires en présence des protéines du lait (Tsakalidou *et al.*, 1994 ; Moreno *et al.*, 2006 ; Ramakrishnan *et al.*, 2012 ; Rasouli Pirouzian *et al.*, 2012 ; Dos Santos *et al.*, 2015). Cependant, d'autres études ont montré que l'activité protéinasique des entérocoques est

faible, avec *Enterococcus faecalis* comme étant la plus protéolytique (Suzzi *et al.*, 2000 ; Sarantinopoulos *et al.*, 2001 ; Psoni *et al.*, 2006 ; Veljovic *et al.*, 2009 ; Ahmadova *et al.*, 2011).

### 3.5.3. Activité lipolytique extracellulaire

Les bactéries lactiques représentent une source importante d'enzymes lipolytiques qui rendent possible la transformation des constituants du lait en composés aromatiques et précurseurs d'arômes. Les estérases et les lipases des bactéries lactiques sont responsables de la libération des acides gras libres à courte chaîne de la matière grasse du lait, ce qui affecte directement la saveur du fromage, et de la synthèse des esters à chaîne courte dans certaines conditions pendant la maturation (El Soda *et al.*, 1995 ; Lopez *et al.*, 2006 ; Aravindan *et al.*, 2007 ; Martin et Coton, 2017).

Nos résultats montrent que l'activité lipolytique des souches de la même espèce est très variable. Un exemple de résultat est montré dans la figure 34, le rapport du halo clair sur le diamètre de la colonie (h/c) exprimant l'activité lipolytique étant calculé pour chaque souche (figure 35).

Tableau 15: Rapport du halo clair sur le diamètre de la colonie (h/c)

	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
1 <sup>er</sup> essai	2,23±0,65	2,42±1,23	3,35±1,21	2,28±0,21
2 <sup>ème</sup> essai	2,21±0,70	2,37±1,18	3,28±1,29	2,24±2,28
3 <sup>ème</sup> essai	2,25±0,64	2,48±1,31	3,42±1,17	2,32±0,30

Les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* expriment une activité plus importante, avec des rapports allant de 2 à 5 en la comparant avec celle exprimée par *Lactobacillus plantarum*. Les deux espèces hydrolysent préférentiellement les acides gras à chaîne courte dont la matière grasse du lait est riche. *Lc. lactis* présente une activité estérasique plus forte que celle de *Lb. plantarum* selon Macedo *et al.* (2003) et Karam *et al.* (2012) ce qui confirme nos résultats. Les résultats révélant que *Lactococcus lactis ssp lactis* hydrolyse la matière grasse du lait confirment ceux de Ávila *et al.* (2007). Plusieurs études ont été menées sur l'activité lipolytique et estérasique de ces bactéries. Chich *et al.* (1997) et Holland *et al.* (1996) notent que les estérases de *Lc. lactis* NCDO 763 et E8 partagent plusieurs caractéristiques : elles sont intracellulaires, la masse moléculaire estimée du monomère est de 29 kDa, l'activité optimale est à pH 7,0 à 8,0, et les séquences N-terminales rapportées sont identiques. L'estérase ACA-DC 127 de *Lactococcus lactis*, une enzyme monomère de 68 kDa, appartient à la classe des sérine estérases et hydrolyse des substrats synthétiques

(esters plus courts ou égaux à C8) (Tsakalidou *et al.*, 1992). D'une manière générale les estérases des lactocoques peuvent hydrolyser les di- et les monoglycérides, mais pas les triglycérides, de la matière grasse du lait. Des résultats ont montré que ce sont les estérases des bactéries lactiques qui sont responsable de l'hydrolyse des di- et monoglycérides dans la matière grasse de lait partiellement hydrolysée et que ces estérases n'hydrolysent pas la matière grasse du lait intacte. Une hydrolyse partielle est nécessaire avant que la matière grasse du lait puisse être hydrolysée par les estérases des bactéries lactiques (Holland *et al.*, 2005).

Les souches de *Lactobacillus plantarum* isolées de « Hamoum » aboutissent à une lyse de la matière grasse du lait avec des rapports (h/c) allant à 4 ce qui est similaire aux données de la littérature (Katz *et al.*, 1997 ; Kenneally *et al.*, 1998 ; Katz *et al.*, 2002 ; Lopes *et al.*, 2002 ; Dinçer et Kivanç, 2017). Cependant aucune activité n'est détectée chez les bactéries isolées de « Klila » ce qui est en accord avec les résultats de Mechai *et al.* (2014). Plusieurs travaux ont caractérisé les estérases de *Lactobacillus plantarum* (Gobbetti *et al.*, 1997 ; Brod *et al.*, 2009 ; Esteban-Torres *et al.*, 2013 ; Esteban-Torres *et al.*, 2014 ; Esteban-Torres *et al.*, 2015 ; Khan *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2017). Les estérases et les lipases de *Lactobacillus plantarum* ont été partiellement purifiées (Andersen *et al.*, 1995), purifiées (Oterholm *et al.*, 1972; Gobbetti *et al.*, 1996; Gobbetti *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2002), ou produites par recombinaison (Brod *et al.*, 2010; Benavente *et al.*, 2013; Esteban-Torres *et al.*, 2013; Navarro-González *et al.*, 2013 ; Esteban-Torres *et al.*, 2015). Parmi les lipases décrites pour ce groupe (Oterholm *et al.*, 1967, 1968; Andersen *et al.*, 1995; Gobbetti *et al.*, 1996, 1997; Lopes *et al.*, 1999, 2002, Esteban-Torres *et al.*, 2013, 2014 et Alvarez *et al.*, 2014), aucune n'a été identifiée génétiquement jusqu'en 2017. Une nouvelle estérase de type SGNH (LpSGNH1) de *Lb. plantarum* a été identifiée, caractérisée et immobilisée pour la première fois (Kim *et al.*, 2017). La séquence du génome de *L. plantarum* WCFS1 a été publiée en 2003 (Kleerebezem *et al.*, 2003) et plus de 20 gènes d'estérases ou lipases ont été annotés sur la base de recherches de similarité.

Bien qu'une distinction opérationnelle est faite entre les estérases, qui rompent préférentiellement les liaisons ester de courts substrats de chaînes acylés, et les lipases, qui affichent une activité maximale envers les triglycérides à longue chaîne insolubles dans l'eau, aucune différence biochimique fondamentale n'a été trouvée (Bornscheuer, 2002). L'étude du génome de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* WCFS1 révèle la présence d'un riche répertoire d'estérases et de lipases soulignant leur rôle important dans le métabolisme cellulaire, parmi elles, la carboxylestérase LpEst (Alvarez *et al.*, 2014).

L'activité lipolytique de *Lactobacillus brevis* reste la plus faible. Les travaux de Herreros *et al.* (2004) suggèrent que les souches de *Lactobacillus plantarum* hydrolysent des acides gras C8 et C14 tandis que ceux de *Lb. brevis* ont montré une plus grande activité estérase sur les acides gras C4 et C8. L'étude de Khan *et al.* (2017) montre que *Lactobacillus brevis* exprime une lipolyse en présence de la tributyrine. Uppada (2010) a montré que

*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* expriment une activité lipolytique extracellulaire en présence de différentes huiles végétales. La lipase 152 de *Lactobacillus plantarum* peut aboutir à la synthèse de différents esters d'acides gras à chaîne courte qui sont utilisés comme agents aromatisants dans l'industrie alimentaire.

Les études de Freitas *et al.* (1999) ; Simonová *et al.* (2008) ; Ramakrishnan *et al.* (2012) ; Morandia *et al.* (2016) et Kivanç (2017) montrent que des souches de *En. faecium* présentent un haut pouvoir lipolytique, ce qui est comparable à nos résultats. *Enterococcus faecium* exprime une lipolyse de la matière grasse du lait avec une moyenne du rapport (h/c) de 2,28. Ces observations sont en accord avec celles d'Angela *et al.* (1997) et Mucchetti *et al.* (1982) qui ont trouvé que des entérocoques ont montré une activité lipolytique élevée après incubation dans du lait entier à 32 °C pendant 5 jours. Il est à noter qu'une autre étude révèle que *Lactococcus lactis* et *E. faecium* montrent une activité estérasique faible (Tapa *et al.*, 2006). Moreno *et al.* (2006) suggèrent que *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus durans* sont les souches les plus fréquemment isolées des fromages, et ils jouent un rôle important pour la maturation de ces fromages en fonction de leur pouvoir lipolytique. Ils favorisent l'établissement du goût et de la saveur typique du produit fini. De même l'étude de Pirouzian *et al.* (2010) montre que *E. faecium* améliore le taux de la lipolyse ainsi la saveur du fromage.

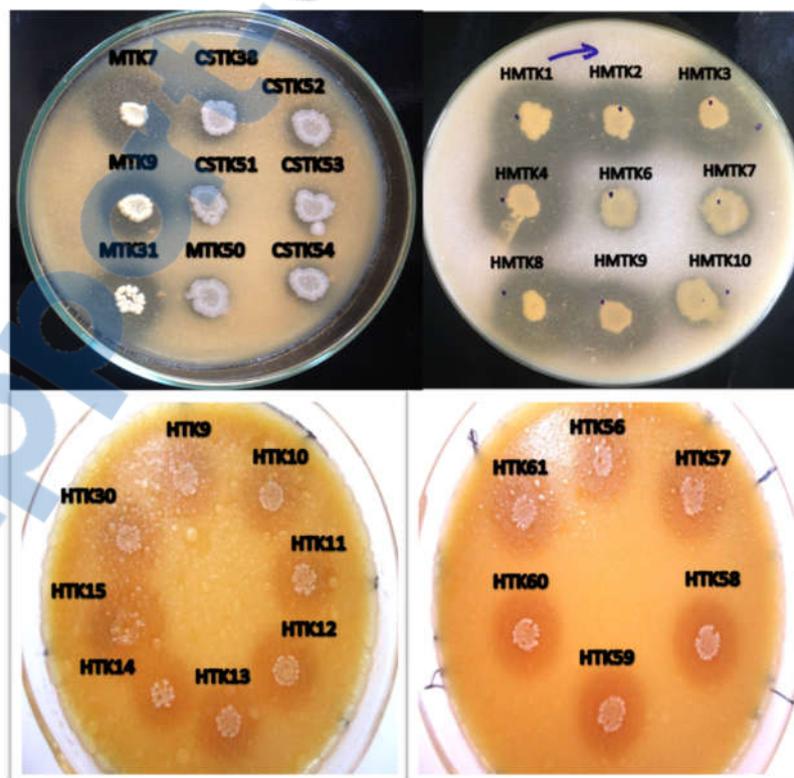


Figure 34: Activité lipolytique sur milieu MRS privé de tween et additionné de 1% de matière grasse du lait.

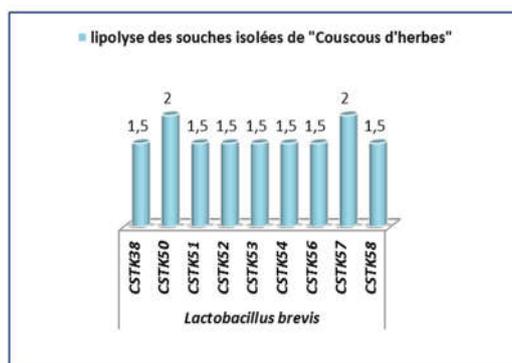
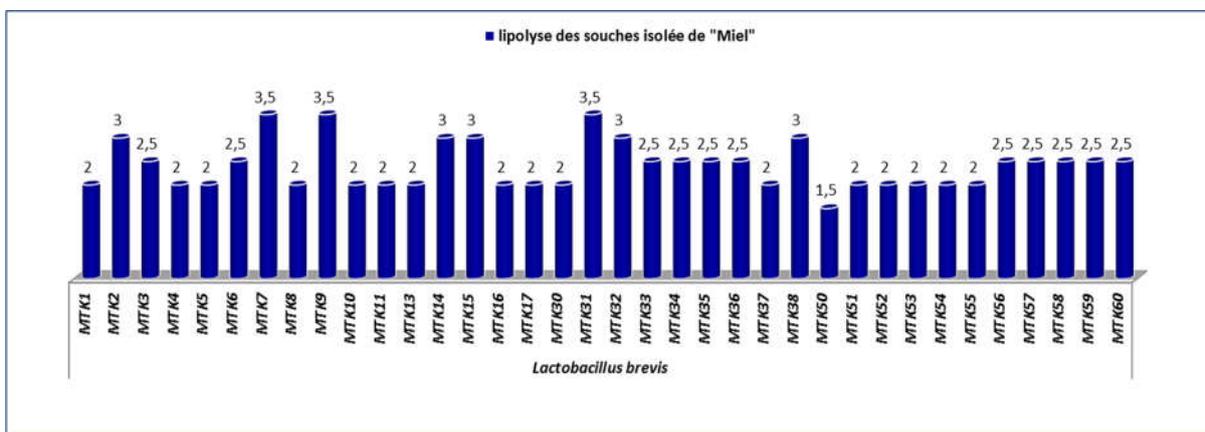
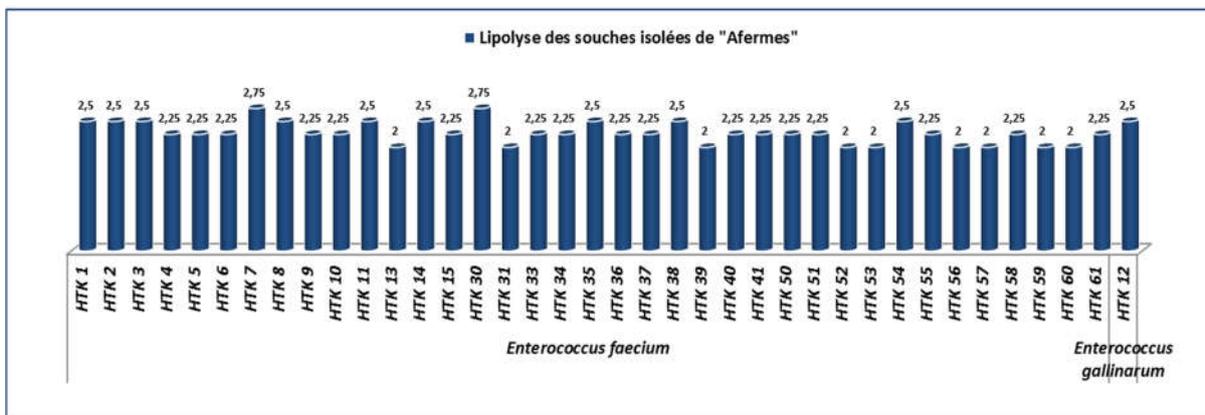
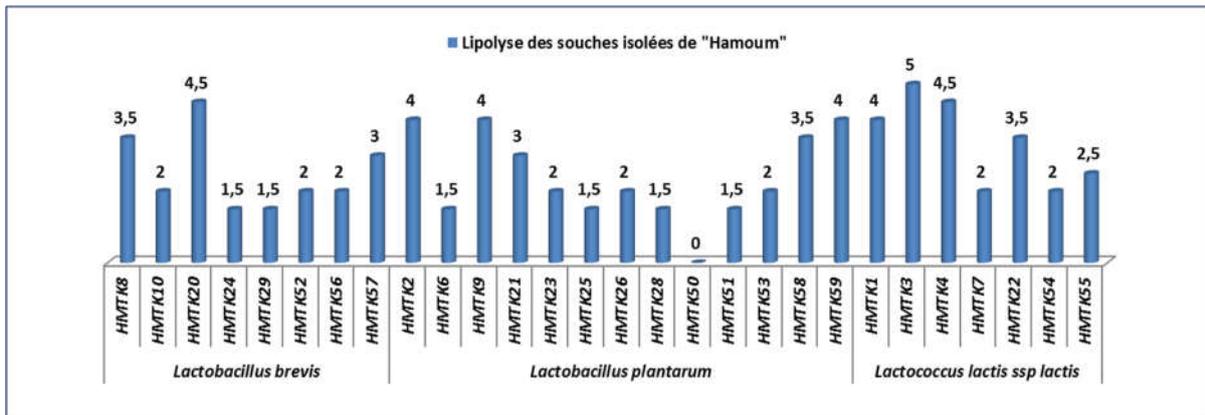


Figure 31: Pouvoir lipolytique des souches (rapport du halo clair sur le diamètre de la colonie (h/c)).

Le premier travail concernant l'activité lipolytique des entérocoques a été réalisée par **Lund (1965)**, qui a déterminé par électrophorèse la présence d'estérases dans des extraits sans cellules de *En. faecalis*, *En. faecium* et *En. durans*. Le profil électrophorétique des souches d'*En. faecalis* était différent par rapport aux profils des deux autres espèces. De plus, les souches d'*En. faecalis* ont montré une activité plus élevée, Quelques années plus tard, **Martinez-Moreno (1976)** a montré que des entérocoques (*En. durans*, *En. faecium* et *En. faecalis*) isolés du fromage Manchego, étaient actifs seulement contre la tributyrine et non contre la matière grasse du lait. Après 10 ans de silence sur le système lipolytique des entérocoques, de nouvelles études ont été publiées : **Carrasco de Mendoza et al. (1992)** ont conclu que l'activité lipolytique des entérocoques dans le lait dépendait de la souche. **Tsakalidou et al. (1994)** a décrit la purification et la caractérisation d'une estérase intracellulaire d'une souche d'*En. faecium* isolée du fromage Feta. L'enzyme, avec une masse moléculaire de 45 kDa, était hautement active à 35 °C et pH 8. En revanche, **Villani et Coppola (1994)** ont signalé que les entérocoques ont montré une faible activité lipolytique lorsqu'ils étaient cultivés en Lait. Cependant, **Tavaria et Malcata (1998)** ont suggéré qu'une souche *E. faecium* isolée du fromage Serra da Estrela a pu hydrolyser les graisses de lait plus largement que *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. **Hemati et al. (1998)** ont rapporté que les entérocoques isolés du fromage Domiati montrent une plus grande activité estérolytique en comparaison avec les lactobacilles. Dans une autre étude plus systématique, **Sarantinopoulos et al. (2001)** ont montré que parmi 129 entérocoques, la majorité (90%) hydrolyse tous les substrats de la tributyrine (C4) à la tristéarine (C18). Généralement, les souches d'*En. faecalis* étaient les plus lipolytiques et estérolytiques, suivie par *E. faecium* et *E. durans*. Enfin, tandis que les entérocoques isolés du fromage Beyaz ont montré une lipolyse prononcée (**Durlu-Ozkaya et al., 2001**), ceux isolés de fromage Semicotto Caprino n'ont pas pu hydrolyser la tributyrine (**Suzzi et al., 2000**). De même l'étude de **Favaro et al. (2014)** montre qu'aucune activité lipolytique n'est détectée chez les souches d'*En. faecium*. Selon **Bahy El-Din et al. (2002)** *Enterococcus faecium* présente un système estérasique actif : les dérivés 4-nitrophenyl des acides gras ont été hydrolysés plus rapidement que les dérivés 2-nitrophenyl. Les substrats de la lipase ont été hydrolysés dans l'ordre suivant : tributyrine, tricaproïne, tricapyline, matière grasse du beurre.

### 3.5.4. Production d'exopolysaccharides (EPS)

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de haut poids moléculaire et biodégradables. Ils sont biosynthétisés par une large gamme de bactéries. Les bactéries lactiques sont également capables de produire des EPS. Les EPS peuvent être classés en deux groupes : des homopolysaccharides et des hétéropolysaccharides. Les homopolysaccharides sont des polymères qui sont composés d'un type de monosaccharide, tandis que les hétéropolysaccharides sont des polymères d'unités récurrentes composées de deux ou plusieurs types de monosaccharides. Les EPS ont été utilisés comme épaississants, stabilisants, émulsifiants et agents gélifiants ou hydro-liants dans la production de plusieurs aliments fermentés. En outre, ils ont des effets positifs sur la santé : effets antitumoraux,

activité immunostimulante et diminution du cholestérol sanguin (**Sanalibaba et Çakmak, 2016**). La production des EPS par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (**Walling et al., 2001**). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans les ferments lactiques lors de la production des laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse.

La production d'exopolysaccharides sur milieu saccharosé (MSE et MRS hypersaccharosé) est un critère important pour différencier entre les espèces de bactéries lactiques (**Khedid et al, 2006**). Selon ce qui a été décrit dans la littérature (**Cerning et al., 1994 ; Grobber et al., 1995 ,1997; Dupont et al., 2000 ; Torino et al., 2000**), un milieu riche en minéraux, acides aminés et vitamine favorise la production d'EPS.

La production des EPS a été recherchée sur les deux milieux Mayeux et MRS hypersaccharosé ; le milieu MRS hypersaccharosé a été sélectionné par **Benasla (2012)** et **Kersani (2013)** comme étant un milieu favorable à la production d'exopolysaccharides par les lactobacilles (colonies plus grosses et plus visqueuses). Sur milieu Mayeux on n'observe pas de production d'EPS pour toutes les souches. Les souches de *Lactobacillus plantarum* isolées de « Klila » se révèlent productrices d'EPS sur milieu MRS hypersaccharosé. Quatre souches, HMTK2, HMTK4, HMTK10 et HMTK24, isolées de « Hamoum » en produisent sur le milieu MRS hypersaccharosé. Les souches productrices présentent un aspect gluant et visqueux, une taille grosse (entre 1 et 5mm), une surface bombée et une grande capacité à former de longs filaments visqueux quand nous touchons la colonie avec une anse à ensemercer. Par contre, aucune production n'est observée sur milieu Mayeux. Ce résultat rejoint ceux observés par **Benasla (2012)** et **Kersani (2013)**. Les résultats après 24 h d'incubation nous ont permis de classer presque la totalité des souches testées comme étant de bonnes productrices d'EPS à l'exception des souches KTK3, KTK4, KTK11, KTK12, KTK16 qui s'avèrent moyennement productrices de ces polymères. Alors que les souches KTK1, KTK13, KTK 15, HMTK2, HMTK4, HMTK10 et HMTK24 sont faiblement productrices d'EPS. Les résultats montrés dans **la Figure 36** nous permettent de comparer l'aspect des colonies entre une faible, une moyenne et une bonne production d'EPS (l'aspect gluant et visqueux ainsi que la taille des colonies). Les souches isolées de « Hamoum » restent moins productrices même après une prolongation d'incubation jusqu'à 72 heures. Plusieurs travaux se sont focalisés sur les EPS des lactobacilles (**Ismail et Nampoothiri, 2010 ; Dilna et al., 2015 ; Fontana et al., 2015 ; Salazar et al., 2015 ; Oleksy et Klewicka, 2016 ; Lingyi et al., 2017**) Jusqu'à présent, environ 30 espèces de *Lactobacillus* produisant des EPS ont été identifiées, les plus connues étant *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* et *L. johnsonii*.

Les déterminants génétiques des EPS sont portés par un ADN plasmidique ou chromosomique. Les gènes codant pour les protéines responsables de la synthèse des EPS par les bactéries lactiques mésophiles se situent sur un plasmide. Chez *Lactococcus* la production des EPS est moins stable, les principales raisons étant l'emplacement

plasmidique des gènes de production ainsi la présence d'une séquence d'insertion mobile (IS - par ex : ISS1, IS981) (**Sanlibaba et Çakmak 2016**). Les connaissances sur les EPS de *Lactococcus lactis* se sont développées de manière impressionnante au cours des dernières années. La production d'EPS par *Lc. lactis* est associée à des souches qui sont isolées à partir de produits laitiers visqueux. Les gènes *eps* spécifiques d'EPS sont codés sur de grands plasmides (> 20 kb) pouvant être transférés d'une souche de lactocoque à une autre par conjugaison, ce qui entraîne concomitamment le transfert de la production EPS (**Van Kranenburg et al. 1999**).

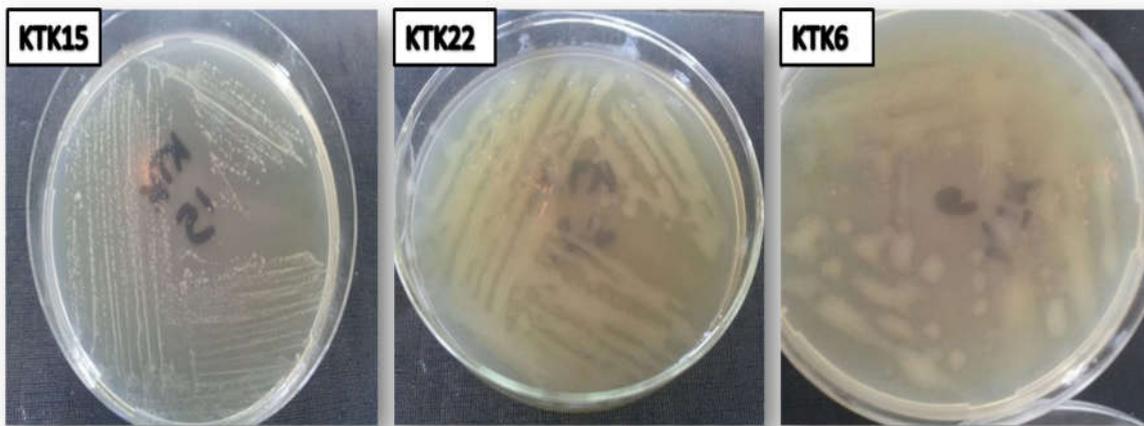


Figure 32: Exemples de souches productrices d'EPS

Les EPS sont des macromolécules composées de sucre et de dérivés de sucre, leur fonction ainsi que leurs applications dépendent principalement de leur composition en monosaccharides, de leur poids moléculaire et de leur ramification. Les EPS provenant des bactéries lactiques servent d'alternatives naturelles aux additifs commerciaux. Un hétéropolysaccharide produit par *Lactobacillus plantarum* RJF4 a été extrait et purifié : il est composé de glucose et mannose, tolérant une température allant jusqu'à 225 °C et possède une capacité antioxydante et d'élimination des radicaux. Il a également montré la propriété anti-diabétique et antiprolifération des cellules cancéreuses (**Dilna et al., 2015**). Des hétéropolysaccharides de composition similaires ont été rapportés par **Ismail et Nampoothiri (2010)**. Cependant, cette composition peut varier pour les souches de la même espèce : dans le cas de *Lb. plantarum* 70810 il s'agissait d'un homopolysaccharide de galactose sous forme d'exopolysaccharide capsulaire (**Wang et al., 2014**). **Tallon et al. (2003)** ont rapporté que le glucose et le galactose sont les principaux composants du c-EPS produit par *Lb. plantarum* EP56. *Lb. plantarum* KF5 produit un exopolysaccharide composé de mannose, fractions de glucose et de galactose (**Wang et al., 2010**). *L. plantarum* 70810 isolé du Paocai chinois a été signalé comme producteur d'EPS à haut rendement (0,859 g/l). Les EPS produits sont composés de résidus galactosylés, qui pourraient être utilisés pour

l'élimination des métaux lourds de l'environnement (**Feng et al., 2012 ; Wang et al., 2014**). L'EPS produit par *L. plantarum* KF5 était composé de mannose, de glucose et galactose dans un rapport approximatif de 1:5:7 (**Wang et al., 2010**). *Lactobacillus plantarum* EP56 produit deux EPS, l'un avec une faible masse moléculaire qui a été libéré dans le milieu de culture et un autre à haut poids moléculaire lié à la cellule (**Tallon et al., 2003**). La structure et la biocompatibilité du  $\alpha$ -D-glucane (dextran) de *Lb. plantarum* DM5 et ses propriétés physiques et rhéologiques uniques ont facilité son application dans l'industrie alimentaire comme agent viscosifiant et gélifiant (**Das et Goyal, 2014**). Une souche productrice d'EPS (C88) de *Lb. plantarum* était isolée du tofu laitier traditionnel en Mongolie intérieure de Chine. Ce dernier a montré une activité de piégeage *in vitro* des radicaux libres hydroxyle et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), ainsi qu'une activité antioxydante (**Li et al., 2012 ; Zhang et al., 2013**).

Les exopolysaccharides ne sont pas attachés en permanence à la surface de la cellule microbienne et sont sécrétés dans leur environnement pendant la croissance. Cela les distingue de la structure capsulaire similaire des polysaccharides, qui restent attachés en permanence à la surface cellulaire microbienne. Les EPS jouent un rôle essentiel dans la protection des microbes provenant de conditions défavorables comme la dessiccation, pénurie d'éléments nutritifs, composés toxiques, bactériophages, stress osmotique et antagonistes (**Looijesteijn et al., 2001**). Ils jouent aussi un rôle clé dans l'adhérence initiale et l'ancrage ferme de la bactérie sur les surfaces solides, la séquestration de cations, la formation de biofilms, la reconnaissance et la pathogénicité. Généralement les EPS ne sont pas utilisés comme nutriments par les bactéries qui les produisent (**Patel et al., 2012**).

Les EPS provenant de sources microbiennes peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur composition en monosaccharides et en fonction de la voie de biosynthèse (**Jolly et al., 2002**).

- Les homopolysaccharides (HoPS), qui comprennent le dextrane, le mutane, l'alternane, le reutérane, le pullulane, le lévane, l'inuline, le curdlane, etc. Les homopolysaccharides sont constitués de monosaccharides identiques, D-glucose ou D-fructose et peuvent être divisés en deux groupes principaux : glucanes et fructanes (**Monsan et al., 2001**).
- Les hétéropolysaccharides (HePS) qui comprennent le gellane, le xanthane, le kéfirane. Les hétéropolysaccharides des bactéries lactiques ont des unités répétitives montrant très peu de similitude structurelles les uns avec les autres (**Patel et al., 2012**).

La biosynthèse des EPS bactériens est un processus complexe impliquant un grand nombre d'enzymes et de protéines de régulation. Les gènes codant pour les protéines nécessaires à la synthèse des EPS sont d'origine plasmidique dans les bactéries lactiques mésophiles comme *Lactococcus* et chromosomique pour les espèces thermophiles de *Streptococcus* et *Lactobacillus* (**Laws et Marshall, 2001**).

### 3.5.5. Activité aromatique

#### 3.5.5.1. Utilisation du citrate

Le citrate est présent dans de nombreux substrats naturels, tels que le lait, les légumes et les fruits, et son métabolisme par les bactéries lactiques joue un rôle important dans la fermentation des aliments. Le citrate peut être utilisé comme source de carbone et d'énergie dans des conditions aérobies et anaérobies. Son utilisation dans des conditions aérobies se produit *via* le cycle de l'acide tricarboxylique, alors que diverses voies de fermentation bactérienne sont impliquées dans le métabolisme du citrate dans des conditions anaérobies (**Bott, 1997**). Chez les bactéries lactiques, le co-métabolisme du citrate et du lactose conduit à la production de diacétyle et de dioxyde de carbone. Le diacétyle est essentiel pour la saveur du beurre, du fromage frais et du babeurre et le dioxyde de carbone est responsable pour la formation de cavités dans certains types de fromage, comme les fromages bleus (**Dridier *et al.*, 2004**).

Nos résultats montrent que plusieurs souches peuvent utiliser le citrate (**Tableau 16**). Elles se sont révélées donc capables d'utiliser le citrate en produisant du CO<sub>2</sub>, ce dernier se manifeste par l'apparition de bulles gazeuses dans la masse de la gélose. **La Figure 37** montre un exemple positif de l'utilisation du citrate sur milieu gélosé au lait citraté.



Figure 37: Production de CO<sub>2</sub> par KTK9 cultivée en gélose au lait citraté

Tableau 16: Souches productrices de citratase

Espèce	Souches citratase positives
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HMTK2, HMTK21, HMTK50, HMTK51, HMTK58, KTK3, KTK8 et KTK9
<i>Lactobacillus brevis</i>	HMTK8, HMTK10, HMTK20, HMTK24, MTK3, MTK13, CSTK38, CSTK50 et CSTK51
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	HMTK4
<i>Enterococcus faecium</i>	HTK13, HTK14, HTK15, HTK31, HTK33, HTK36, HTK38, HTK41, HTK52, HTK60

On peut suggérer que cette production de CO<sub>2</sub> est le résultat d'une digestion enzymatique du citrate par les deux enzymes, citrate lyase et oxalacétate décarboxylase. Cette digestion enzymatique conduit donc à la formation d'oxalocétate puis du pyruvate avec un dégagement de CO<sub>2</sub>. D'après **Schmitt *et al.* (1990)**; **Starrenburg et Hugenholtz, (1991)**; **Bassit *et al.* (1993)**; **Hugenholtz *et al.* (1993)** le CO<sub>2</sub> produit pendant le métabolisme du citrate, est responsable de l'existence des trous dans certains types de fromage. Le co-métabolisme du citrate avec le glucose modifie le profil métabolique généré lors de la fermentation anaérobie par les bactéries lactiques : les données ont fréquemment indiqué que l'acide lactique est principalement dérivé du glucose, alors que le diacétyle et l'acétoïne sont principalement produits à partir du citrate. Cette vision trop simpliste est basée sur un certain nombre de lignes de preuve, notamment que: (1) des quantités négligeables de composés aromatiques s'accumulent en absence de citrate (**Hugenholtz, 1993**), (2) le diacétyle et l'acétoïne s'accumulent apparemment tard dans la période de fermentation, coïncidant avec la fin du catabolisme du citrate (**Petit *et al.*, 1989**) et (3) les fermentations aérobies favorisent l'accumulation de diacétyle et d'acétoïne avec le métabolisme oxydatif du citrate (**Boumerdassi *et al.*, 1997**).

Les résultats montrent que des souches de *Lactobacillus plantarum* arrivent à métaboliser le citrate ce qui est en accord avec les travaux de (**Palles *et al.*, 1998** ; **Skeie *et al.*, 2007, 2008** ; **Belkheir *et al.*, 2016** ; **Ouattara *et al.*, 2017** ; **Sadi *et al.*, 2017**). **Kennes *et al.* (1991)** ont montré que l'ajout du citrate au milieu de culture améliore la croissance bactérienne des souches de *Lb. plantarum* dans les milieux à pH acides. Néanmoins, des études montrent que certaines souches de *Lb. plantarum* ne possédaient pas les gènes de la citrate lyase (**Divol et du Toit, 2012**; **Mtshali *et al.*, 2010**), ce qui peut expliquer les résultats négatifs obtenus pour les autres souches.

L'effet bénéfique du co-métabolisme du citrate sur la croissance des bactéries lactiques à un pH acide est bien documenté dans la littérature. Plusieurs études font état d'une augmentation des taux de croissance ainsi de la biomasse finale dans des conditions de pH non contrôlées, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont mal compris (**Boquien *et al.*, 1988** ; **Hugenholtz, 1993**; **Starrenburg et Hugenholtz, 1991** ; **Salou *et al.*,**

1994). Des hypothèses suggèrent que l'alcalinisation de milieu de culture observée à la suite du métabolisme du citrate est la cause de la bonne croissance bactérienne (**Cogan et al., 1981 ; Ramos et al., 1994 ; Marty-Teyssset et al., 1996 ; Garcia-Quintans et al., 1998**). Mais il est à noter que cette l'alcalinisation n'était pas seule la cause principale de l'effet bénéfique du citrate au cours co-métabolisme à un pH bas : l'augmentation de la capacité du système de transport du citrate dans ces conditions de faible pH pourrait être un facteur déterminant, montrant une corrélation positive avec la meilleure performance de croissance (**Sanchez et al., 2008**).

Peu d'études ont été menées sur l'utilisation du citrate par les souches de *Lactobacillus brevis* : **Kaneuchi et al. (1988)** ont rapporté que des souches de *Lactobacillus brevis* sont citrate négatives. Cependant **Shimazu et al. (1985)** avaient relevé la présence de citrate lyase chez ces bactéries et **Fryer et al. (1970)** avaient montré que certaines souches utilisent le citrate, ce qui conforte nos résultats. Les souches de *Lactobacillus brevis* produisent le diacétyle et l'acétoïne préférentiellement à partir du pyruvate plutôt qu'à partir du citrate (**Keenan et Lindsay, 1968 ; El-Gendy et al., 1983**).

Les résultats de l'utilisation du citrate par *Lactococcus lactis* ssp *lactis* rejoignent ceux de nombreux auteurs (**Haddad et al., 1997 ; Curic et al., 1999 ; Gouptry et al., 2000 ; Augagneur et al., 2008 ; Sanchez et al., 2008**). Les bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis* jouent un rôle important dans de nombreux processus laitiers. Cette bactérie homolactique convertit les sucres en acide L-lactique via le pyruvate. Elle utilise également le citrate (**Starrenburg et Hugenholtz 1991 ; Hugenholtz, 1993**) qui contribue de manière significative à la croissance, la résistance au stress acide et la détoxification du lactate produit à partir des sucres (**Garcia-Quintans et al., 1998, Magni et al., 1999, Martin et al., 2004**). Chez cette bactérie, le transport du citrate est assuré par la citrate perméase plasmidique (CitP) qui catalyse son absorption (**Bandell et al., 1998**).

*Lactococcus lactis* ssp *lactis* peut fermenter à la fois le lactose et le citrate trouvé dans le lait, conduisant à l'accumulation d'un certain nombre de produits mineurs en plus de l'acide lactique (**Hugenholtz, 1993**). Ceux-ci, notamment le composé en C4, le diacétyle, et sa forme réduite, l'acétoïne, présentent un intérêt pour les propriétés organoleptiques et sont responsables des notes de saveur de beurre. La biosynthèse de l'acide lactique, du diacétyle et de l'acétoïne est variable en fonction des conditions de fermentation (**Hugenholtz, 1993**). Tous les trois ont en commun le pyruvate comme précurseur, ce dernier peut provenir de deux principales sources de carbone fermentescible dans le milieu de culture : le glucose ou le citrate (**Curic et al., 1999; Snoep et al., 1992**).

Le métabolisme du citrate par *Enterococcus* a reçu beaucoup d'attention (**Freitas et al., 1999 ; Rea et Cogan, 2003a ; Rea et Cogan, 2003b ; Sarantinopoulos et al., 2001a, 2001b ; Sarantinopoulos et al., 2003**). Nos résultats pour les souches *Enterococcus faecium* s'ajoutent à d'autres travaux scientifiques (**De Vuyst et al., 2011; Rea et Cogan, 2003, Sarantinopoulos et al., 2001, 2003; Vaningelgem et al., 2006 ; Cabral et al., 2007; Martino et al., 2016**). On a supposé que le métabolisme du citrate et la lipolyse par les entérocoques

sont responsables du développement des arômes des fromages méditerranéens (**Giraffa et al., 2003**). *E. faecium* K77D a été accepté pour être utilisé comme culture de départ dans les produits laitiers fermentés (**Advisory Committee on Novel Foods and Processes, 1996**). *En. faecium* FAIR-E 198, une souche isolée du fromage grec feta, est capable de consommer du citrate à la fois en l'absence ou en présence de glucose (**Sarantinopoulos et al., 2003**). Il a été montré que cette bactérie est capable de consommer du citrate, même à des concentrations élevées (50 mM) (**Vaningelgem et al., 2006**). De même l'étude de **De Vuyst et al. (2011)** montre que cette souche assure le co-métabolisme du lactose et du citrate et que la présence de lactose fermentescible et de glucose dans le milieu MRS dans des conditions microaérophiles a augmenté le rendement de conversion de l'acétate à partir du citrate, mais a diminué le rendement en acétoïne par rapport à une fermentation en présence de xylose non fermentescible.

Les gènes impliqués dans Le transport et le métabolisme du citrate ont été caractérisés chez les bactéries lactiques (**Bandell et al., 1998, Bekal et al., 1998b; Sender et al. 2004**), et la fermentation de l'acide citrique est un processus générateur de force motrice protonique (**Lolkema et al. 1995**). La fermentation du citrate par les bactéries passe par deux voies principales qui sont catalysées par une variété d'enzymes et de transporteurs. Les deux voies principales divergent à l'oxaloacétate produisant du succinate ou du pyruvate. La voie du succinate via le malate et le fumarate est retrouvée dans de nombreux lactobacilles (**Dudley et al., 2005**). La deuxième voie implique la décarboxylation de l'oxaloacétate, produisant du pyruvate, qui est ajouté au pool central de pyruvate dans la voie glycolytique (**Dimroth, 1982**). L'analyse génétique effectuée par **Martino et al. (2016)** a permis de classer les souches d'*En. faecium* citrate positives en deux grands groupes :

- le premier appartenant au génotype citrate de type I, qui est apparentée aux opérons *cit* présents dans *Lc. lactis* (**Magni et al., 1994, Martin et al., 2004**), *W. paramesenteroides* (**Martin et al., 1999, 2000**), et d'autres bactéries lactiques (**Bekal et al., 1999, Martin et al., 2005**). Cette grappe contient un transporteur de citrate putatif (CitP) appartenant à la famille 2-HCT (**Sobczak et Lolkema, 2005**), le soluble oxaloacétate décarboxylase membre de l'enzyme malique (**Sender et al., 2004; Espariz et al., 2011**) et l'activateur CitI membre de la DeoR facteur transcriptionnel (**Martin et al., 2005**).
- le deuxième type génétique avec le régulateur CitO (famille GntR), le complexe OAD à membrane oxaloacétate décarboxylase (famille d'enzymes Na<sup>+</sup> -transport décarboxylase) et le transporteur CitH citrate (famille CitMHS).

### 3.5.5.2. Recherche de l'acétoïne : (Hydroxy-3-butanone-2 ou acétylméthyl-carbinol)

Les bactéries lactiques citrate-positives sont des agents clés pour la production de diacétyl et d'acétoïne, qui confèrent les principales caractéristiques sensorielles au beurre et aux fromages à pâte molle (**McSweeney et Sousa, 2000; 2006**). Selon la méthode classique, la recherche de la somme diacétyl-acétoïne est effectuée par la réaction de

Voges-Proskauer où le diacétyle aboutit à la formation de l'acétoïne suite à l'action de la diacétyle réductase. Les souches HMTK 8, HMTK20, HMTK21, HMTK58, MTK3 et MTK13 présentent un résultat positif pour la production d'acétoïne (Figure 38).

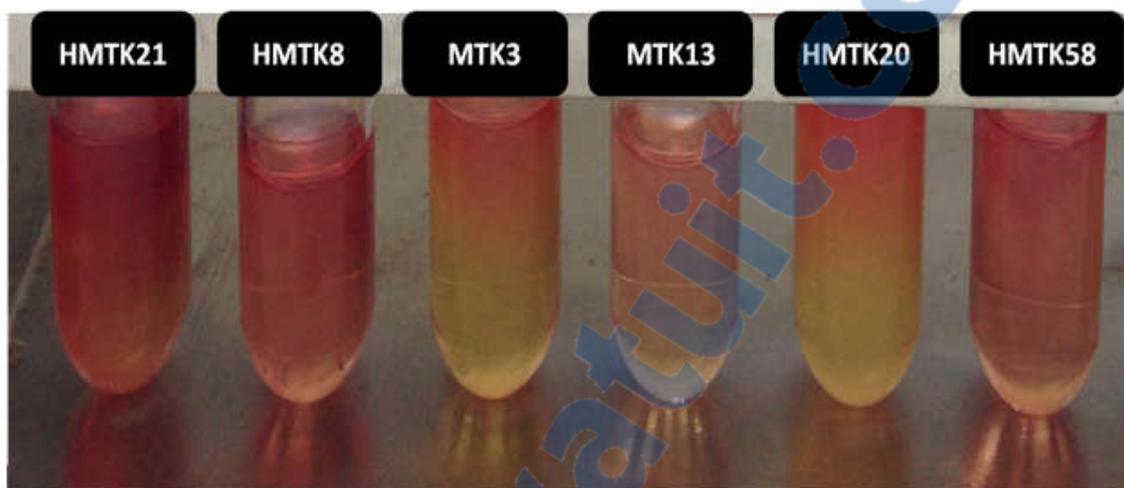


Figure 38: Production de l'acétoïne.

D'après ces résultats on remarque que l'activité aromatique est spécifique de chaque souche et dépend de sa capacité à dégrader et à assimiler les substances dans le milieu, d'où la variation de l'intensité de la couleur rose obtenue après le test de Voges-Proskauer (VP) pour les souches. Les souches appartenant à *Lactobacillus plantarum* (HMTK21 et HMTK58) présentent le pouvoir aromatisant le plus important, d'où l'importance de l'intensité de la couleur apparue après le test VP. Ces observations sont en accord avec celles de divers travaux (Boumehira, 2010 ; Milesi *et al.*, 2010 ; Zidani, 2015 ; Belkheir *et al.*, 2016 ; Boullouf, 2016 ; Mened, 2017 ; Goswami *et al.*, 2018).

Plusieurs chercheurs ont étudié la production de l'acétoïne chez *Lb. plantarum* (Tsau *et al.*, 1992 ; Sun *et al.*, 2016 ; Mukisa *et al.*, 2016). Milesi *et al.* (2010) ont montré que les fromages inoculés avec *Lb. plantarum* se caractérisent par une concentration significativement plus élevée de diacétyle, un composé aromatique clé, et une teneur accrue en acétoïne due à l'augmentation du catabolisme du citrate ou de l'aspartate. L'acétoïne, ainsi que le diacétyle, peuvent être produits par le catabolisme du citrate ou de l'aspartate par certaines souches lactobacilles mésophiles, comme cela a été observé *in vitro* comme indiqué dans une pâte de fromage (Kieronczyk *et al.*, 2004; Díaz-Muñiz *et al.*, 2006) et dans les fromages (Thage *et al.*, 2005; Skeie *et al.*, 2008a, b). Le diacétyle est un composant essentiel fournissant un arôme crémeux et beurré à nombreux produits laitiers. Ce composé est également un élément clé du Camembert, du Cheddar et de l'Emmental (Curioni et Bosset, 2002). L'acétoïne et le diacétyle peuvent être formés à la suite d'un catabolisme de l'aspartate ou de l'alanine par *Lc. lactis* en présence d' $\alpha$ -cétoglutarate dans le milieu, ces

bactéries lactiques présentant à la fois une activité glutamate déshydrogénase et une activité élevée de l'aspartate aminotransférase (**Le Bars et Yvon, 2008**).

La première étape de leur biosynthèse implique une acétolactate synthase dotée d'une très faible affinité pour le pyruvate ( $K_m = 50 \text{ mmol l}$ ) par rapport à celle de la lactate déshydrogénase (LDH,  $K_m = 1 \text{ mmol l}$ ) et la pyruvate déshydrogénase (PDH,  $K_m = 1 \text{ mmol l}$ ) (**Crow et Pritchard 1977, Snoep et al., 1992, van Niel et al. 2004**). Par conséquent, l'acétolactate synthase est seulement active dans des conditions d'accumulation de pyruvate, c'est à dire lorsque la LDH et la PDH ne sont pas entièrement actives (**Hugenholtz et al. 2000**). Le pyruvate produit à partir du catabolisme de l'acide citrique est en partie converti en  $\alpha$ -acétolactate et ensuite en acétoïne *via* l'acétolactate-décarboxylase (**Starrenburg et Hugenholtz, 1991; Hugenholtz et Starrenburg, 1992; Hugenholtz et al., 2000**), ou en diacétyle en l'absence d' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase (**Hugenholtz et Starrenburg, 1992; Swindell et al., 1996; Curic et al., 1999**). Le catabolisme de l'aspartate génère du pyruvate dans un processus en deux étapes. Au cours de la première étape, Asp est transformé par une aspartate aminotransférase (Asp-AT) en oxaloacétate (OAA), qui est ensuite décarboxylé en pyruvate par une O-décarboxylase (OAA-DC) Les deux enzymes sont présentes chez *L. lactis* (**Starrenburg et Hugenholtz, 1991 ; Dudley et Steele, 2001**).

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de sélectionner les deux souches HMTK8 et HMTK21 pour la suite de l'étude vu la bonne production de composés d'arôme chez ces deux bactéries en plus du pouvoir acidifiant significatif qu'elles présentent.

### 3.6. Cinétique d'acidification, de croissance et de consommation de glucose

La culture discontinue constitue la plus simple des fermentations mises en œuvre d'un microorganisme. Une fois le milieuensemencé, la fermentation évolue sans aucune intervention extérieure, régulations mises à part. Les conditions initiales sont donc de première importance. En culture discontinue, la composition du milieu change à chaque instant. Il est donc important de suivre l'évolution des concentrations en nutriments au cours du temps. A partir des profils cinétiques seront ensuite calculées les vitesses spécifiques.

Les figures 39 et 40 montrent les cinétiques d'acidification, de croissance et de consommation de glucose pour les deux souches HMTK8 et HMTK21. Les paramètres d'états des cultures ont été déterminés selon les données de la littérature (**Deneuille, 1991**) (**tableau 17**). Tous ces résultats montrent que les cinétiques bactériennes (évolution de la concentration en biomasse, en substrat et en produit en fonction du temps) dépendent de la souche étudiée. Pour une utilisation industrielle des bactéries lactiques, il est nécessaire et important de déterminer les paramètres d'état des cultures selon la bactérie et le milieu utilisés.

Tableau 17: Paramètre d'état des cultures

Paramètres d'état de la culture	HMTK 08	HMTK 21
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.54	0.55
G (h)	1.28	1.26
K ( $h^{-1}$ )	0.78	0.79
THC (h)	2.71	2.71
$V_s$ (g/l/h)	0.065	0.069
$P_{x/t}$ (g/l/h)	0.172	0.165
$Y_{x/s}$	2.620	2.403
$Y_{p/s}$	15.363	16.183

$\mu$  : Taux de croissance. G : Temps de génération. K : Fréquence de division. THC : Taux de croissance horaire.  $V_s$  : Vitesse de consommation du substrat.  $P_{x/t}$  : Productivité.  $Y_{x/s}$  : Rendement total de transformation du substrat en biomasse.  $Y_{p/s}$  : Rendement total de transformation du substrat en acide lactique.

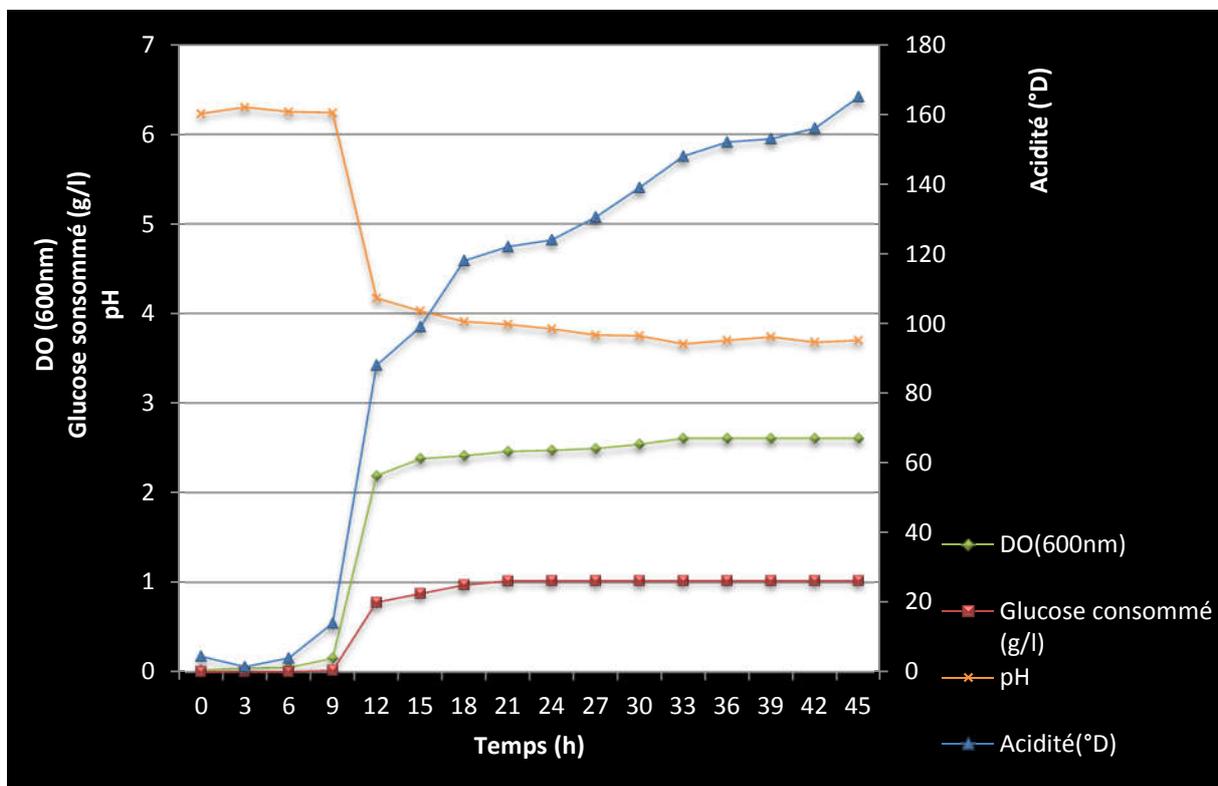


Figure 39: Cinétique d'acidification, de croissance et de consommation du glucose pour la souche HMTK8.

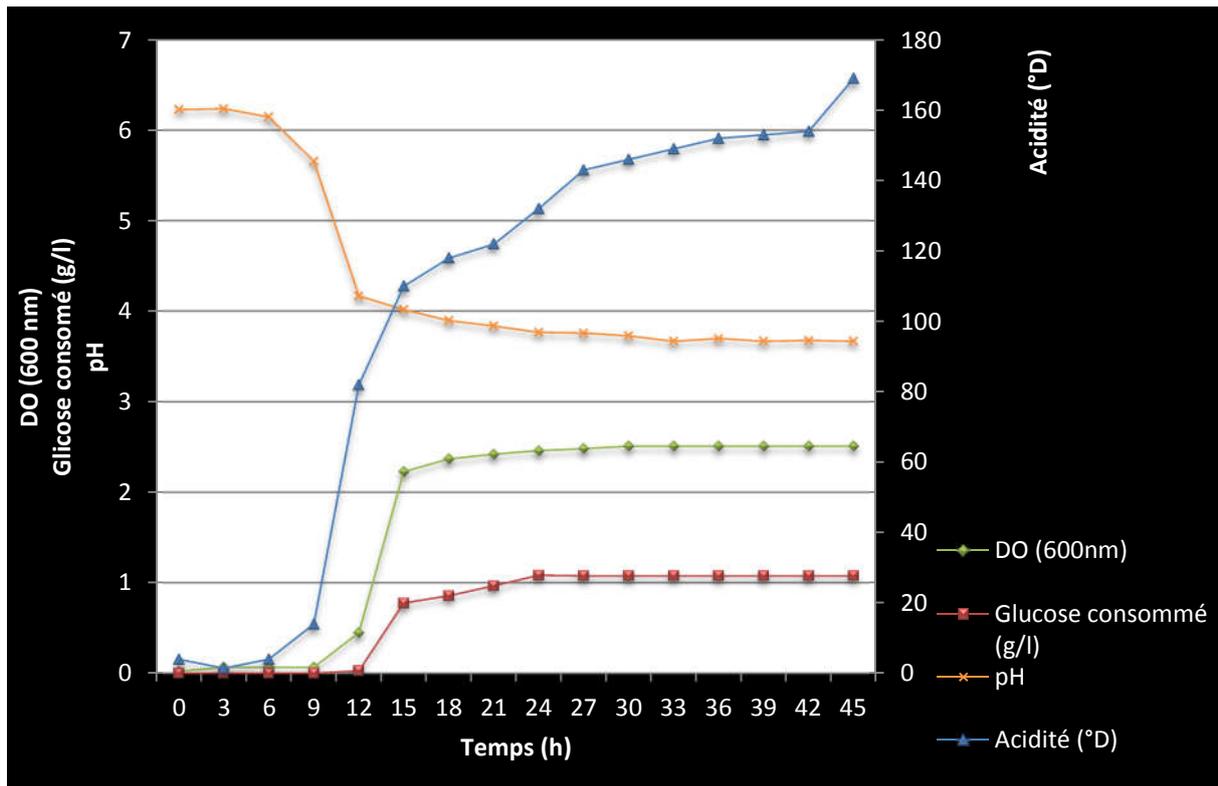


Figure 40: Cinétique d'acidification, de croissance et de consommation du glucose pour la souche HMTK21.

Ces résultats permettent de faire les remarques suivantes :

- La croissance bactérienne pour les deux souches se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue. Simultanément à la croissance bactérienne il y a consommation du glucose et production d'acide lactique. C'est le cas d'une production associée à la croissance. Les mêmes remarques ont été faites par d'autres auteurs pour des souches appartenant à *Lactobacillus* (Giraud *et al.*, 1991 ; Passos *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 2005 ; Zadi-Karam et Karam, 2007 ; Charalampopoulos *et al.*, 2009 ; Siragusa *et al.*, 2014 ; Xiong *et al.*, 2015).

- L'évolution de la croissance des bactéries durant 48 h de fermentation, nous a permis de distinguer les différentes phases de croissances de ces bactéries : on remarque que la phase de latence est courte ce qui est dû au fait que les souches se sont adaptées rapidement au milieu de culture, Ces observation ont été évoquées pour *Lactobacillus plantarum* (Rao *et al.*, 2004 ; Sharma et Mishra, 2014). Ceci est dû à l'âge des bactéries inoculées. Lorsque des cellules jeunes de quelques heures, sont introduites dans un milieu neuf, la phase de latence peut être extrêmement courte ; elle est, au contraire, retardée avec des bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire ou en phase de déclin (Amrane, 1991, 2005).

- On note une accélération de la croissance plus importante chez HMTK21 par rapport à HMTK8. Ainsi HMTK21 a un taux de croissance supérieur à celui de HMTK8 et donc un temps de génération plus court.

- Durant la phase exponentielle on observe que la valeur du pH du bouillon de culture a diminué de sa valeur initiale de 6,5 à 3,7, de même la croissance cellulaire a augmenté avec la consommation de glucose. La diminution du pH était due à la grande quantité d'acide lactique produite au cours du processus de fermentation. Les vitesses de consommation de glucose chez les deux souches sont faibles et pratiquement identiques (0.065 g/l/h et 0.069 g/l/h).

- On note pour la souche HMTK8 une productivité totale plus élevée (0.172 g/l/h) que celle observée pour la souche HMTK21.

- La phase stationnaire débute au bout de 12 h pour les deux souches. La croissance cellulaire reste stable malgré la présence de glucose dans le milieu, ce qui peut être dû à la faible valeur du pH dans le bouillon de culture, et qui est peut être critique à la croissance cellulaire, rappelant que les deux souches ont montré une absence de croissance à pH 4. Par conséquent, le contrôle approprié du pH dans le milieu peut conduire à l'augmentation de la concentration cellulaire. Des études antérieures montrent que la croissance sera arrêtée et entrera en phase stationnaire suite à plusieurs conditions de stress comme le froid, la chaleur, le stress osmotique, le stress oxydatif ou acide, ou l'appauvrissement du milieu de culture en nutriments. La plupart des espèces de bactéries lactiques sont neutrophiles, et l'effet du stress acide sur la physiologie bactérienne n'est pas connu en détail. Cependant, il est bien établi que les acides peuvent diffuser passivement à travers la membrane cellulaire et se dissocier rapidement en protons et dérivés chargés auxquels la membrane cellulaire est imperméable (**Axe et Bailey, 1995 ; Hutkins & Nannen, 1993 ; Presser et al., 1997**) ce qui perturbe le métabolisme bactérien. L'acide lactique, avec d'autres acides organiques, est connu pour son effet inhibiteur sur la croissance bactérienne (**Shelef, 1994**). Bien que *Lactobacillus* soit plus résistant à l'acide lactique que de nombreux autres micro-organismes, sa croissance est encore fortement inhibée par les concentrations élevées de cet acide organique durant la fermentation (**Giraud et al., 1991 ; Russell et Diez-Gonzalez, 1998 ; Pieterse et al., 2005 ; Šeme et al., 2014**).

- On remarque aussi qu'après la phase exponentielle, il y a encore production d'acide lactique durant la phase stationnaire ; une meilleure concentration d'acide lactique est marquée par la souche HMTK21 (16,9 g/l) en comparaison avec HMTK8 (16.5 g/l). Ces observations rejoignent celles faites par **Engasser (1993), Passos et al. (1994), Sharma et Mishra (2014)** qui, lors de la modélisation de la fermentation lactique par *Lactobacillus*, ont montré le maintien de la production de l'acide lactique alors que la croissance bactérienne est pratiquement arrêtée.

- Le rendement total de la transformation du substrat en acide lactique ne dépend pas de la concentration du sucre dans le milieu. Cette même remarque a été énoncée par d'autres auteurs (**Rao et al., 2004 ; Sharma et Mishra, 2014**). **Fu et Mathews (1999)** ont remarqué que les valeurs des rendements de la biomasse par rapport au substrat carboné

(YX/S) n'indiquent pas la quantité exacte du substrat qui a été transformée en produit, parce que le milieu utilisé ne contient pas seulement le glucose, mais aussi la peptone et l'extrait de levure. Ces matériaux contiennent des protéines, des vitamines et d'autres éléments nutritionnels nécessaires pour la croissance de la bactérie *Lactobacillus*.

Le choix d'un milieu approprié joue un rôle central dans la tentative d'amélioration de la biomasse et du rendement du produit durant le processus de fermentation. Les études montrent que les bactéries lactiques ont des capacités de biosynthèse limitées (**Kask et al., 1999**) et sont parfaitement adaptées aux environnements riches en nutriments. Pour *L. plantarum*, un bon taux de croissance était réalisé dans des milieux MRS supplémentés en glucose et en lactose comme source de carbone (**Danova et al., 2005 ; Georgieva et al., 2009**).

### 3.7. Production de diacétyl

Depuis que **Van Niel et al. (1929)** ont mis en évidence le rôle du diacétyl dans l'arôme des levains de boulangerie, de nombreuses études ont été entreprises sur ce composé. Il s'est avéré très bénéfique pour un certain nombre de produits laitiers et notamment les crèmes, laits fermentés et beurres alors que dans d'autres produits alimentaires il est à l'origine de mauvais goûts. C'est donc pour des raisons très différentes que les chercheurs se sont intéressés à l'optimisation de la production de ce composé par l'étude des différents facteurs influençant sa production. Le diacétyl (2,3-butanedione) et l'acétoïne, étroitement apparentée, (3-hydroxy-2-butanone) confèrent un arôme de beurre désirable et les deux sont essentiels pour la production de fromage, y compris le cheddar (**Clark et Winter, 2015; Curioni et Bosset, 2002**). Le diacétyl est présent seulement en petites quantités dans le fromage, allant de 0,02 à 13,68 ppm selon le type de fromage ; l'acétoïne est généralement présente à des concentrations 10 à 50 fois plus élevées à celles du diacétyl (**Clark et Winter, 2015; McSweeney et Sousa, 2000**). Le diacétyl est généralement considéré comme l'arôme le plus important pour l'établissement de la saveur du beurre en raison de son faible seuil d'odeur (**Smit et al., 2005**). En comparaison, l'odeur de l'acétoïne est 100 fois plus forte (**Le Bars et Yvon, 2008**). Le diacétyl à 1,5-5 ppm est suffisant pour conférer une saveur de beurre (**Hemme, 2012**).

#### 3.7.1. Dosage du diacétyl

Le dosage de la somme de diacétyl-acétoïne est fait selon la méthode de **Mathot (1992)**. La courbe d'étalonnage : Diacétyl produit (ppm) = f (temps (h)) est représentée en annexe.

#### 3.7.2. Optimisation de la production de diacétyl :

L'approche d'optimisation des procédés consiste à placer la bactérie utilisée dans des conditions environnementales spécifiques (mode de culture, nature des substrats, pH, température...), dans le but d'exploiter au mieux leur potentiel physiologique pour améliorer

la croissance et synthétiser les métabolites d'intérêt. Ainsi, la production de diacétyle dépend du mode de culture utilisé et des conditions opératoires appliquées. La quantité de diacétyle et de l'acétoïne produite dans un milieu est liée aux caractéristiques biologiques des souches bactériennes, les paramètres de croissances optimales, le mode d'ensemencement et l'optimisation des paramètres physico-chimiques de biosynthèse. Plusieurs chercheurs ont étudié l'effet de différentes conditions de fermentation sur la quantité de diacétyle et d'acétoïne produite par des bactéries lactiques. les facteurs tels que le pH, la température et la concentration de citrate (**Petit *et al.*, 1989**), l'oxygène et l'activité de l'eau (**Bassit *et al.*, 1993**; **Boumerdassi *et al.*, 1997**) affectent la formation de diacétyle et d'acétoïne.

Dans notre étude l'ensemble des résultats obtenus traduit pour tous les essais l'importance primordiale des quatre facteurs conditionnant la production du diacétyle, et qui sont le pH, la température, la concentration du glucose et du citrate. Les essais de l'optimisation ont été réalisés sur le milieu MRS et sur le lait écrémé.

### 3.7.2.1. Effet de la température :

La température de culture est un paramètre qui influence la croissance bactérienne et la cinétique de la biosynthèse du diacétyle, pour cela nous avons étudié le taux de diacétyle produit suite à l'incubation à trois températures différentes. **La figure 41** montre les résultats obtenus après 24h d'incubation.

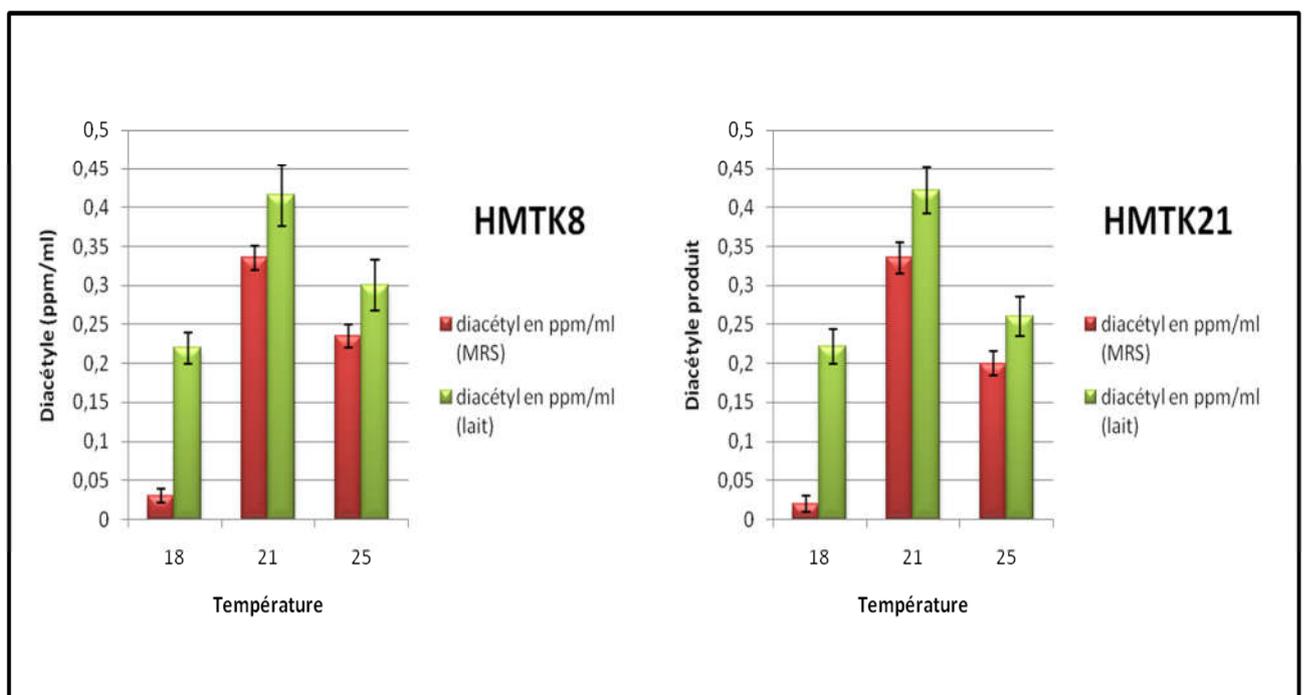


Figure 41: Effet de la température sur la production du diacétyle.

Nous remarquons que l'ensemble des résultats mentionnés dans la figure indique que l'optimum de la production de diacétyl est obtenu à une température de 21°C pour les deux souches et dans les deux milieux (MRS et lait) et que les quantités maximales produites par les deux bactéries sont pratiquement égales. Ce résultat rejoint celui de **Benazzouz (2012)**. L'étude d'**Oberman et al. (1982)** montre que quand la température d'incubation augmente de 23°C à 28°C, la production de diacétyl augmente d'environ 30%. Ces auteurs ont aussi remarqué qu'à une température de 28 °C l'activité de l'enzyme diacétyl réductase diminue significativement, Cette même constatation a été faite par **Lacrampe et Weber (1973)** qui montrent qu'une température supérieure à celle de la croissance conduit à la destruction rapide du diacétyl, et ainsi à la diminution du taux de production. Les études de **Bassit et al. (1994, 1995)** montrent que la concentration maximale du diacétyl est 1,7 fois plus élevée à 18°C que celle du diacétyl à 30°C. Nos résultats montrent que la production de diacétyl diminue d'une manière très remarquable dans la culture réalisée en milieu MRS à 18 °C, ce qui n'est pas le cas dans la culture réalisée dans le lait. Ceci peut être expliqué par la différence de composition des deux milieux, d'où la différence entre les voies cataboliques aboutissant à l'accumulation de l'acide pyruvique qui est l'origine de la production du diacétyl et de l'acétoïne. On peut suggérer que la voie enzymatique conduisant à ce composé est inactivée par la baisse de la température à 18°C dans le milieu MRS et que dans le lait l'acide pyruvique pourrait être produit via une autre voie non réprimée. On suppose aussi que la différence entre les sommes diacétyl-acétoïne dans les deux milieux est due à la richesse du lait en lactose. La production de diacétyl serait plus efficace à partir du lactose qu'à partir du citrate et du glucose, ceci a été l'objectif de plusieurs stratégies d'ingénierie métabolique (**Platteeuw et al., 1995 ; Papagianni et al., 2012**).

Selon les résultats obtenus par d'autres chercheurs on remarque que la température optimale de la production de diacétyl est très variable chez les bactéries lactiques. Chez *Lactobacillus* la production de diacétyl et d'acétoïne et d'utilisation du citrate étaient maximales à 37°C (**De Figueroa et al., 2001**). Cependant, **Escamilla et al. (2000)** montrent que la plus forte concentration de diacétyl (76 mg.l<sup>-1</sup>) était obtenue chez certains lactobacilles à 32 °C. D'autres bactéries lactiques ont montré une meilleure production de diacétyl à des températures allant de 18 à 24 °C (**Green et Manning 1982, Yadav et Srinivasan 1985, Escamilla et al., 1996a**). Des résultats similaires ont été obtenus pour *Lactococcus lactis* avec un optimum de production à 20°C (**Collins et al., 1977 ; Adamberg et al., 2003 ; Makhoulf, 2006**). **García et al. (1994)** et **Elena et al. (2006)** ont observé l'augmentation des concentrations de diacétyl à des températures plus élevées, mais à ces températures le diacétyl a été réduit plus rapidement en acétoïne entraînant une diminution globale des concentrations de diacétyl à la fin de la fermentation.

### 3.7.2.2. Effet du pH

La figure 42 montre la production du diacétyle à différents pH après incubation à la température optimale (21°C) pendant 24h.

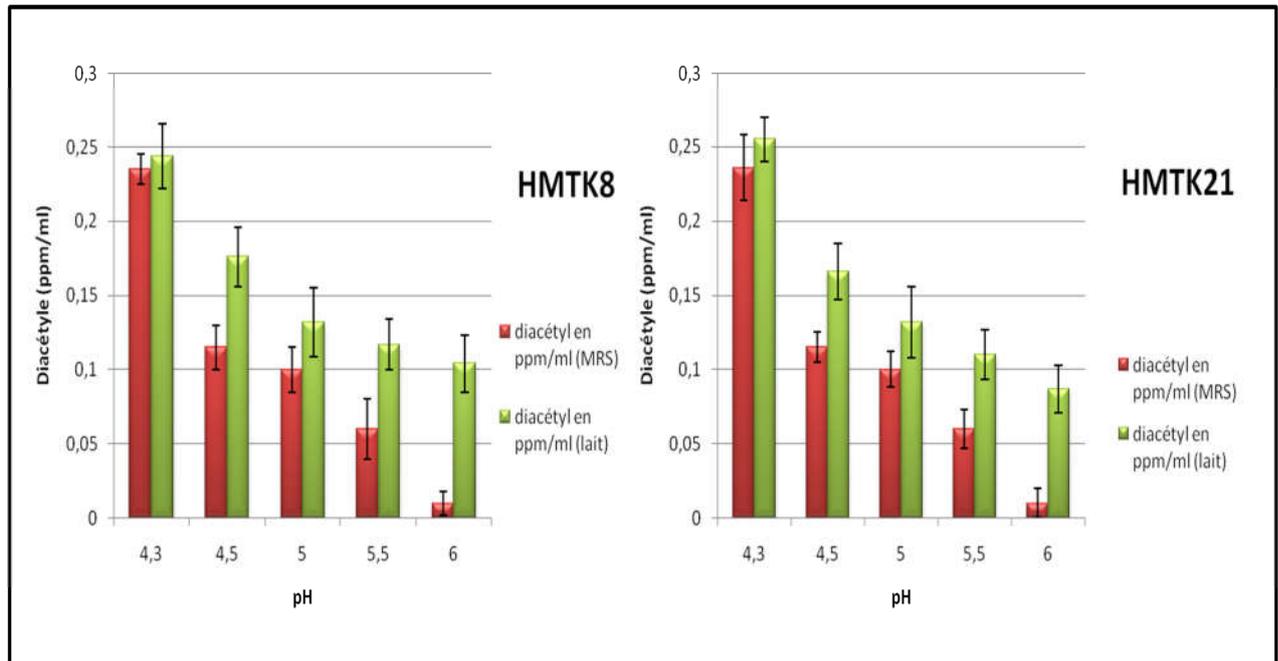


Figure 42: Effet du pH sur la production du diacétyle

On constate que le taux de production est variable d'un pH à l'autre et que le maximum de production est obtenu à pH 4,3 pour les deux souches sachant qu'elles ne poussent pas à pH 4. La meilleure production de diacétyle obtenue dans l'étude de **Benazzouz (2012)** était aussi à pH 4,3. D'autres travaux sur *Lb. plantarum* notent que la formation d'acétoïne était plus élevée à pH 4,5 et baisse à des valeurs de pH plus élevées (**Cogan et al., 1981, 1984 ; Montville et al., 1987**). L'optimum de la production du diacétyle chez *Lactococcus lactis* est à pH 4 (**Rondags et al., 1998 ; Cachon et al., 1994 ; Adamberg et al., 2003 ; Makhlouf, 2006**).

Nos résultats montrent que le pH du milieu affecte d'une façon très remarquable la production du diacétyle. L'initiation de la synthèse du diacétyle en milieu MRS n'a lieu que lorsque le pH est inférieur à pH 6. Les résultats d'une étude en 1973 relèvent que la transformation des citrates ne se produit qu'au-dessous de ce pH (**Lacrampe et Weber, 1973**). En plus il y a une relation linéaire entre le pH et l'absorption du pyruvate. Dans un milieu à pH acide, plus de pyruvate entre dans la cellule: l'acide pyruvique protoné à sa forme ionisée augmente son transport inter-membranaire par une diffusion facilitée. En outre, le gradient de pH devient plus élevé avec la diminution du pH externe (**McFall et Montville, 1989**). Chez *Lc. lactis* la production du diacétyle et de l'acétoïne dépend des gènes *alsS* (codant pour une  $\alpha$ -acétolactate synthase), *aldB* et *aldC* (deux  $\alpha$ -acétolactate isoformes de la décarboxylase) et *butA* et *butB* (butanediol déshydrogénase et diacétyl

réductase, respectivement) (García-Quintans *et al.*, 2008 ; Zuljan *et al.*, 2014). Ces gènes sont induits à faible pH avec d'autres gènes chromosomiques et plasmidiques impliqués dans le métabolisme du citrate. Des résultats antérieurs ont indiqué que la croissance dans un milieu à pH acide déclenche la conversion du citrate, mais non du glucose, en  $\beta$ -acétolactate via le pyruvate. De plus, les enzymes impliquées dans la conversion du pyruvate en composés aromatiques ont été induites à un pH bas (García-Quintans *et al.*, 2008). Ceci peut expliquer les taux de production élevés dans le lait suite à l'accumulation du pyruvate issu du catabolisme des sucres avec un maximum de production noté pour la HMTK21. En plus de toutes ces constatations, il faut noter que le pH optimal de l'utilisation du citrate est de 4,5 à 5,0. chez *L. plantarum* (Montville *et al.*, 1987; Kennes *et al.*, 1991; Palles *et al.*, 1998), soit inférieur à celui de *Lactococcus lactis* (pH6,0) (Harvey et Collins, 1962) ou *Leuconostoc lactis* (pH 5,4) (Cogan *et al.*, 1981) ce qui favorise la production des composés aromatiques *via* le métabolisme du citrate.

### 3.7.2.3. Effet du glucose

Nous avons recherché la concentration de glucose pour laquelle la production de diacétyle est optimale. Pour cela la production est testée sur milieu MRS à un pH 4,3 et à différentes concentrations de glucose, l'incubation était réalisée à 21 °C pendant 24 h. La figure 43 montre les résultats obtenus pour ce paramètre.

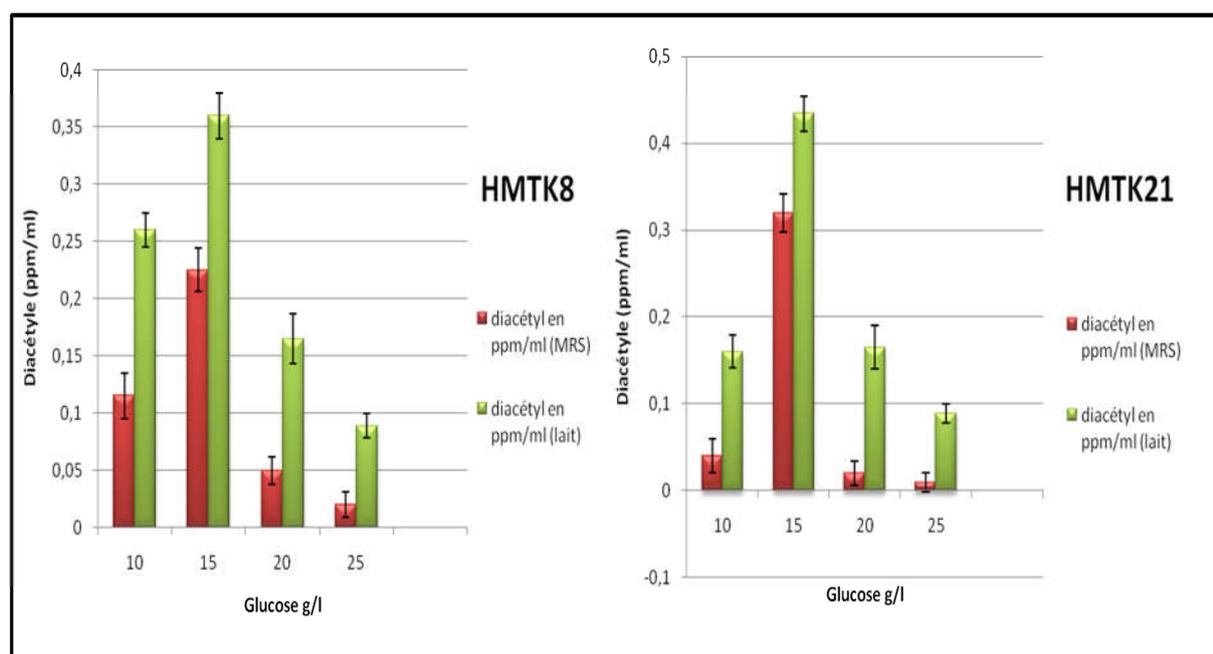


Figure 43: Effet de la concentration du glucose sur la production de diacétyle.

On observe que le taux de production est optimal en présence de 15 g/l de glucose pour les deux souches et la variation de cette concentration entraîne sa diminution ce qui rappelle les résultats de **Zhang et al. (2011)**. **Cogan et al. (1984)** rapportent que les faibles concentrations de glucose stimulent la production concomitante d'acétoïne à partir de pyruvate. Plusieurs stratégies visant une production accrue du diacétyle par les souches de *Lactobacillus* ont été étudiées. Celle-ci concernent principalement une redirection des voies cataboliques du pyruvate et visent ultimement l'accumulation d'une plus grande quantité d' $\alpha$ -acétolactate pour la production de diacétyle (**Hugenholtz et al., 2000**). Le transport du pyruvate est dépendant du glucose et la formation subséquente d'acétoïne semble liée.

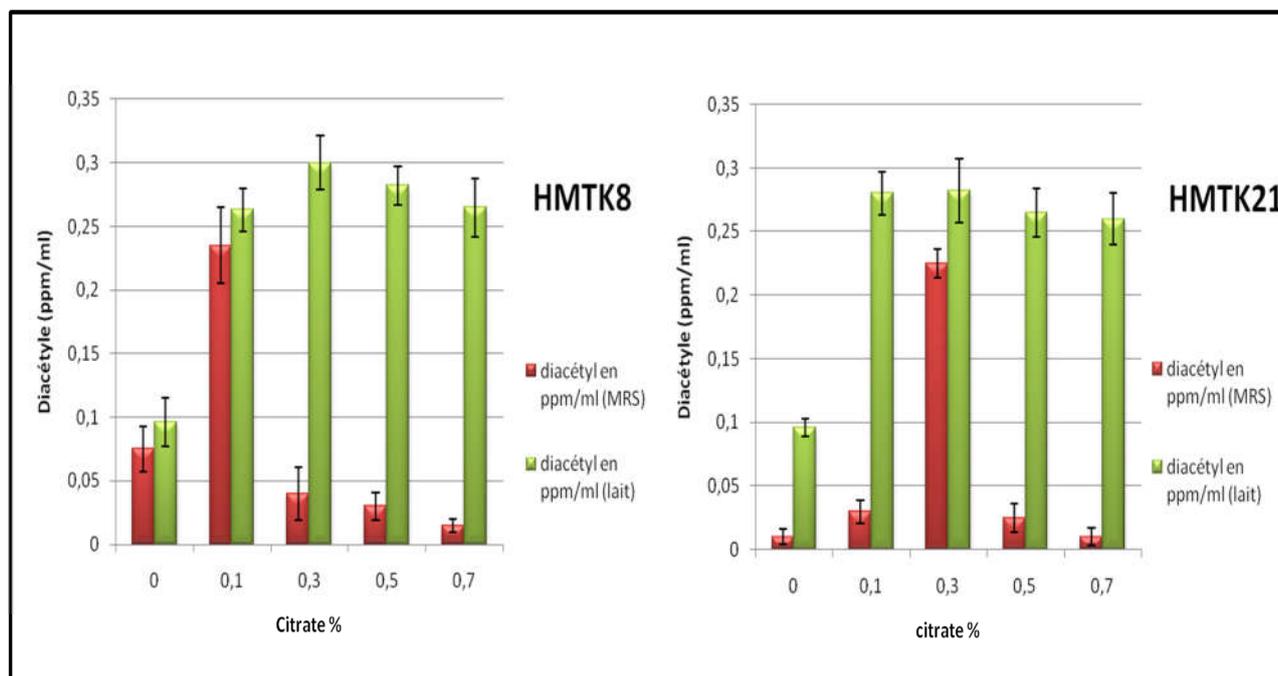
Les résultats indiquent une formation de diacétyle plus importante dans le lait, ce qui peut être expliqué par la richesse de ce milieu en lactose. On peut rappeler que les deux souches ont montré un bon pouvoir protéolytique ce qui peut aussi aboutir à la production du diacétyle via le catabolisme protéique qui aboutit à l'accumulation du pyruvate. Une étude montre que pendant la maturation, les fromages contenant des souches de *Lactobacillus plantarum* protéolytiques ont montré une augmentation significative du contenu total des acides aminés libres. De plus, les profils d'acides aminés ont été modifiés par des augmentations sélectives de certains acides aminés, tels que Asp, Ser, Arg, Leu et Phe. Ces fromages inoculés avec *Lactobacillus plantarum* I91 ont été également caractérisés par une concentration significativement plus élevée de diacétyle et une teneur accrue en acétoïne suite à une augmentation du catabolisme du citrate ou de l'aspartate (**Milesi et al., 2010**).

**Gosalbes et al. (2000)** ont montré que la production de diacétyle par *Lactobacillus casei* a été réprimée par le glucose et induite par le lactose. En revanche **Jyoti et al. (2003)** ont rapporté que la production de diacétyle dans le milieu contenant du glucose et du citrate était le double d'un milieu contenant uniquement du citrate. D'autre part, au cours de la synthèse des composés d'arôme par *E. faecalis* qui repose sur l'opéron bicistronique *alsSD* (qui code pour l' $\alpha$ -acétolactate synthase et la décarboxylase, respectivement) l'expression est renforcée par l'addition de pyruvate aux milieux de croissance (**Repizo et al., 2011**). Dans une étude réalisée par **Tsau et al. (1992)** il a été observé que *Lactobacillus plantarum* n'a pas produit de diacétyle et d'acétoïne dans un milieu privé de glucose. Une autre étude de **Ramos et Santos (1996)** rapporte que de faibles concentrations de glucose stimulaient la production de diacétyle et d'acétoïne et que des concentrations élevées de glucose stimulaient la réduction du diacétyle.

### 3.7.2.4. Effet du citrate

Un bon nombre de bactéries lactiques est capable de convertir le citrate en diacétyle, en acétoïne et en  $\alpha$ -acétolactate. Dans des conditions acides, l' $\alpha$ -acétolactate est instable et il est spontanément décarboxylé en acétoïne. Par contre, dans des conditions oxydantes l' $\alpha$ -acétolactate forme de façon concomitante du diacétyle et de l'acétoïne. Nous avons

recherché la concentration du citrate permettant une bonne production de diacétyle. Pour cela la production est testée sur milieu MRS ou sur lait à concentration optimal du glucose (15g/l), à pH 4,3 et à différentes concentrations de citrate, l'incubation s'est effectuée à 21 °C pendant 24 h. **La figure 44** montre les résultats obtenus pour ce paramètre.



**Figure 44: Effet de la concentration en citrate sur la production du diacétyle**

On observe pour les souches cultivées dans le milieu MRS que le taux de production est optimal en milieu supplémenté de 0,1% de citrate pour la souche HMTK8 et en milieu supplémenté de 0,3% pour la souche HMTK21. Tandis que pour celles cultivées dans le lait, la meilleure production est notée en présence de 0,3% de citrate dans le cas de la souche HMTK8. La souche HMTK21 produit la même quantité de diacétyle-acétoïne en présence de 0,1% et 0,3% de citrate. Ces résultats rappellent ceux de **Gagnon (2006)**. **Jordan et Cogan (1995)** montrent que la production de l' $\alpha$ -acétolactate, du diacétyle et de l'acétoïne avait atteint un niveau maximum quand 10 mmol/L de citrate a été ajouté au milieu de culture. **Boumerdassi et al. (1997)** rapportent que l'ajout de citrate au milieu de culture augmente la production de diacétyle et d'acétoïne. Cependant, le rendement de la bioconversion du citrate en diacétyle et en acétoïne diminue considérablement lorsque la concentration initiale de citrate est importante, ce qui peut expliquer la diminution de la production en présence de 0,7% de citrate. Chez les bactéries lactiques, le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par une citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par une citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate qui est transformé en diacétyle par le biais d'une série de réactions intermédiaires (**Bekal et al., 1998a**). Le pool du pyruvate disponible pour les voies de synthèse du diacétyle dépend de l'activité des enzymes impliquées dans la bioconversion du citrate en pyruvate, le

flux de carbone vers le pyruvate peut être modulé en jouant sur le niveau d'expression de la citrate perméase (Bourel *et al.*, 1996). Il est à noter aussi que le maintien du gradient de concentration dépend de la vitesse de disparition du citrate dans le milieu intracellulaire, donc de l'activité de la citrate lyase (dégradation du citrate en oxaloacétate et acétate) et de l'oxaloacétate décarboxylase (décarboxylation de l'oxaloacétate en pyruvate). L'activité de la citrate lyase est inductible par le citrate et disparaît rapidement après épuisement du citrate dans le milieu (Bekal *et al.*, 1998a). Nos résultats montrent qu'il y a quand même une production de diacétylène en absence du citrate ce qui s'explique par une production *via* d'autres voies métaboliques conduisant à la production du pyruvate. Chez *Lactobacillus plantarum*, le principal produit du catabolisme de pyruvate est l'acétoïne (Montville *et al.*, 1987). L'acétoïne est formée par la condensation de deux molécules de pyruvate en  $\alpha$ -acétolactate, ensuite décarboxylé en acétoïne. Le citrate, qui est clivé en acétate et une molécule d'oxaloacétate qui est décarboxylé en pyruvate, stimule également la production de l'acétoïne et du diacétylène (El-Gendy *et al.*, 1983). Il faut noter aussi que la production de diacétylène en absence du citrate est plus remarquable dans le lait, c'est-à-dire en présence du lactose, par contre elle diminue significativement en présence du glucose, dans le cas du milieu MRS. Diverses études ont rapporté que le métabolisme du citrate est affecté par le glucose (Rea et Cogan, 2003a, 2003b ; Cabral *et al.*, 2007). Les espèces d'*Enterococcus* (Rea et Cogan, 2003a) certaines espèces de *Lactobacillus* (Medina de Figueroa *et al.*, 2000; Jyoti *et al.*, 2004) et *Leuconostoc mesenteroides* (Levata-Jovanovic et Sandine, 1996) montrent une croissance diauxique lorsqu'elles sont cultivées en présence de glucose et de citrate. Ces bactéries n'utilisent le citrate qu'après épuisement du glucose, De même l'activité de la citrate perméase (Levata-Jovanovic et Sandine, 1996, Medina de Figueroa *et al.*, 2000; Rea et Cogan, 2003b) ou la citrate lyase (Palles *et al.*, 1998) est réprimée par le glucose. Cependant, certaines bactéries lactiques comme *O. oeni* (Ramos et Santos, 1996), *Lb. plantarum* (Palles *et al.*, 1998), *Lb. casi* (Palles *et al.*, 1998; Díaz-Muñiz et Steele, 2006) et *Lc. lactis* (Cogan *et al.*, 1981) sont encore capables de dégrader une petite portion de citrate en présence du glucose. Ce co-métabolisme est généralement observé lorsque les bactéries sont pré-cultivées dans un milieu contenant à la fois du citrate et du glucose (Palles *et al.*, 1998, Jyoti *et al.*, 2004) ce qui peut également augmenter la production d'acétate, de D-lactate, de diacétylène et d'acétoïne (Jyoti *et al.*, 2004).

Les faibles taux de production obtenus en présence du glucose dans le milieu MRS par rapport à ceux marqués en présence du lactose dans le lait peuvent être expliqués par une répression exercée par le glucose sur le métabolisme du citrate contre un co-métabolisme lactose-citrate dans le lait, ce co-métabolisme du citrate et du lactose décrit pour d'autres bactéries lactiques aboutit à produire du CO<sub>2</sub> et des composés d'arôme (diacétylène) (Bourel *et al.*, 2001). Récemment une étude de Martino *et al.* (2016) montre que le glucose a un effet répressif sur le métabolisme du citrate ce qui aboutit à la diminution de la production du diacétylène et de l'acétoïne : les cellules cultivées sur le citrate comme seule source énergétique affichent des niveaux élevés de production de diacétylène par rapport à

celles cultivées sur un milieu contenant le glucose et le citrate. En outre si les souches ont été cultivées en présence de pyruvate ou de pyruvate et glucose cette répression n'est pas observée. Cette même étude montre que la répression précédemment observée est associée à la voie catabolique du citrate mais pas à la production de diacétyle/acétoïne. En plus, le métabolisme du glucose se caractérise par une distribution simple chez *Lactobacillus plantarum*: une production majoritaire de lactate, accompagnée d'un faible pourcentage d'acétate (**Ferain et al., 1998**). Ainsi la fermentation lactique emprunte dans un premier temps la glycolyse. Le pyruvate qui en résulte est ensuite réduit en lactate de forme D et L grâce à l'activité de deux lactates déshydrogénases (LDH) distinctes et stéréospécifiques, avec réoxydation simultanée du cofacteur NADH en NAD<sup>+</sup>. Il existe néanmoins d'autres voies de dissipation du pyruvate qui donnent lieu à la formation de composés tels que l'acétoïne et le diacétyle mais en petites quantités (**Ferain et al., 1996**). La dégradation du citrate et de l'Asp par *Lb. plantarum* dans le fromage varie selon le type du starter utilisé. Dans du fromage fait avec des cultures starters citrate positives, la dégradation du citrate et Asp par *Lb. plantarum* était moins étendue, par contre en présence d'un starter citrate négatif, *Lb. plantarum* utilise le citrate principalement dégradé en Asp qui était ensuite converti en acétoïne et diacétyle (**Skeie et al., 2008b**).

### 3.7.3. Cinétique de croissance et de production de diacétyle

Une cinétique de croissance bactérienne et de production de diacétyle est réalisée dans les conditions optimales déterminées précédemment. **Les figures 45 et 46** montrent les résultats obtenus pour les deux souches. Le tableau 18 montre les deux paramètres de croissance : Taux de croissance et temps de génération relative à la croissance cellulaire.

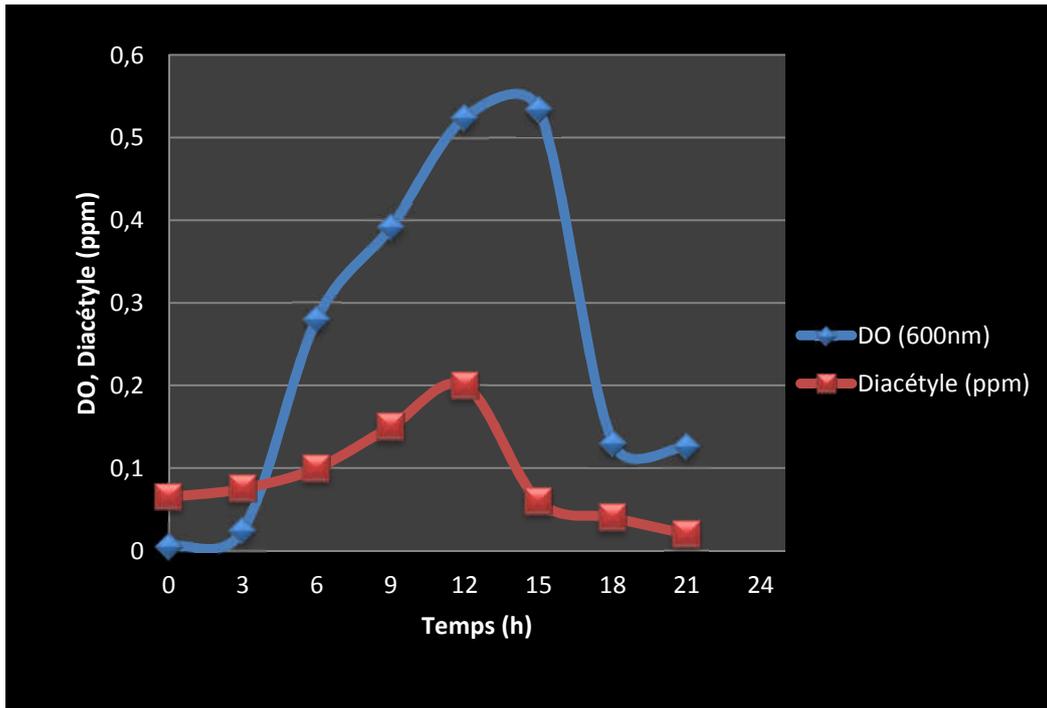


Figure 45: Cinétique de la croissance bactérienne et production du diacétyle pour HMTK8.

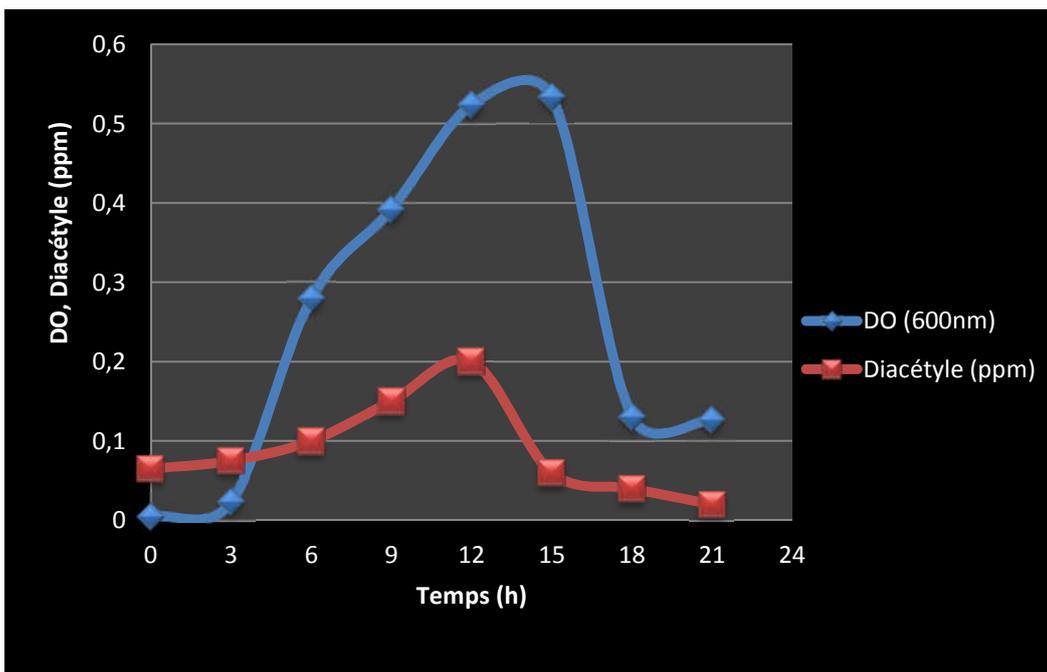


Figure 46: Cinétique de la croissance bactérienne et production du diacétyle pour HMTK21.

**Tableau 18: paramètres de croissance des cultures en conditions optimale de la production du diacétyle.**

Paramètre de croissance	HMTK8	HMTK 21
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,66	0,65
G (h)	1,05	0,99

$\mu$  : Taux de croissance ; G : Temps de génération.

D'après les résultats obtenus on peut faire les remarques suivantes :

La croissance bactérienne se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue, l'évolution du diacétyle est observée en phase exponentielle : la production du diacétyle est donc liée à la croissance bactérienne. Le maximum de la production de diacétyle (0,2ppm) pour les deux souches est atteint au bout de 12 h d'incubation. Une étude de **Meziane (2008)** montre que le taux maximal de production du diacétyle (0,075 ppm) chez *Lactococcus lactis* en conditions optimales était atteint après 16 h d'incubation.

Selon **Lacrampe et Weber (1973)** l'évolution de la production de diacétyle est la succession de deux phases :

- Une phase ascendante où la teneur de diacétyle augmente jusqu'à atteindre son maximum à 12 h d'incubation.
- Une phase d'allure descendante (déclin) au-delà de 12 h, pendant laquelle il y a appauvrissement du milieu en diacétyle, résultant de deux phénomènes se produisant simultanément : épuisement du milieu en composé précurseur du diacétyle (citrates) et l'action de la diacétyle réductase (**Divies et al., 1994 ; Schimidt et al., 1994**).

Selon nos résultats et en se basant sur les observations de **Lacrampe et Weber (1973)** on peut suggérer que l'abaissement de la production du diacétyle est due à l'un des phénomènes :

- l'appauvrissement du milieu en nutriments, ce qui conduit aussi à une phase de déclin rapide.
- La chute de la croissance cellulaire, et qui peut être due soit aux conditions défavorables de la croissance (température, pH) et optimales pour la production de diacétyle ou à l'abaissement du pH suite à la production de l'acide lactique (souches acidifiantes) rappelant que la production est liée à la croissance.
- L'action de la diacétyle réductase

Ces résultats s'avèrent plus importantes que d'autres obtenues pour des bactéries lactiques :

- **Cogan (1975)** a obtenu avec une *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* DRC3 (INRA Jouy En Josas), une teneur maximale de 1ppm/ml à 16h d'incubation.
- **Meribai (2008)** relève une production de diacétyle par des souches de *St. thermophilus* avec une teneur maximale de 0,15 ppm/ml à 8 h d'incubation.
- *Lactococcus lactis ssp cremoris*, *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Leuconostoc lactis* atteignent des teneurs maximales de 0,06-0,075 ppm, 0,045-0,055 ppm et 0,15 ppm respectivement (**Benazzouz, 2012**).

Le marché industriel des produits alimentaires est à la recherche permanente de nouveaux starters lactiques exprimant des caractéristiques technologiques performantes. Le but de cette étude était de mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant des applications alimentaires. Les produits artisanaux semblent le meilleur réservoir bactérien contenant des souches qui ont développé des mécanismes d'adaptation à la composition diversifiée de ces produits fermentés empiriquement et qui peuvent jouer le rôle de bactéries à intérêt biotechnologique. A l'issue de notre étude, 133 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de 15 échantillons de cinq produits artisanaux différents originaires de la Wilaya de Tiaret (Ouest d'Algérie).

Les souches ont été purifiées et identifiées phénotypiquement par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les représentants de *Lb. brevis* et *Lb. plantarum* sont les plus fréquents dans les produits artisanaux étudiés, ce qui est en accord avec les observations de plusieurs auteurs. Parmi ces bactéries, 35 souches ont été pré-identifiées à *Lactobacillus plantarum*, 53 à *Lactobacillus brevis*, 37 souches à *Enterococcus faecium*, 7 à *Lactococcus lactis* et une souche à *Enterococcus gallinarum*. Une confirmation de cette pré-identification était réalisée par utilisation des galeries biochimiques (API 50 CHL) ou par l'utilisation des cartes d'identification Vitek pour des souches représentatives de groupes établis suite aux résultats de la pré-identification.

Notre étude s'est ensuite développée autour de la mise en évidence des caractéristiques technologiques afin d'évaluer le potentiel d'un éventuel usage industriel de ces bactéries. Ce qui nous a conduits à s'intéresser à l'étude de l'activité acidifiante, protéolytique, lipolytique, texturante et aromatisante.

D'après les résultats de l'étude des caractères technologiques, nous avons distingué :

La production d'acidité est fonction de la souche bactérienne. Nos résultats ont permis de distinguer des souches fortement acidifiantes produisant des quantités allant à 97 °D, abaissant le pH du milieu à pH 3,9. Les souches appartenant à *Lactococcus lactis* sont les plus acidifiantes, celles-ci peuvent être de bonnes candidates pour une utilisation industrielle comme culture starter.

Une activité protéolytique qui s'exprime sur milieu MRS additionné de 2% de lait écrémé est trouvée chez la majorité des bactéries, ce qui explique leur pouvoir d'adaptation à leurs niches biologiques. Les lactocoques et les entérocoques donnent des zones de protéolyse de moyennes très proches. Les souches de *Lactobacillus brevis* se révèlent plus protéolytiques que *Lactobacillus plantarum*.

La lipolyse a été remarquable chez *Lactococcus lactis ssp lactis*. Cette activité s'exprime sur milieu MRS additionné de 1% de matière grasse du lait d'une façon très variable d'un groupe à un autre et pour les souches du même groupe. Les espèces douées de cette activité peuvent contribuer à l'établissement des caractéristiques organoleptiques des produits alimentaires.

L'intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans les ferments lactiques lors de la production des laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. Les souches de *Lactobacillus plantarum* isolées de « Klila » se révèlent productrices d'EPS sur milieu MRS hypersaccharosé. Néanmoins, quatre souches isolées de « Hamoum » en produisent sur le milieu MRS hypersaccharosé : HMTK2, HMTK4, HMTK10 et HMTK24.

L'activité aromatique des souches a été étudiée, Certaines souches se contentent de l'utilisation du citrate et d'autres arrivent à la production de composés d'arôme comme le diacétyle (HMTK 8, HMTK20, HMTK21, HMTK58, MTK3 et MTK13). Parmi ces souches deux bactéries HMTK8 et HMTK21 appartenant à *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* montrent un bon pouvoir aromatique ce qui nous a conduit à les sélectionner pour la suite de l'étude.

Les résultats enregistrés ont révélé que ces activités d'intérêt technologique se sont exprimées de manière très hétérogène, et montrent l'absence d'une éventuelle relation entre ces activités. D'après ces résultats nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante, l'activité protéolytique, lipolytique, texturante ou aromatisante. Cependant, les lactobacilles avaient de bonnes fonctionnalités technologiques. Les résultats suggèrent que les populations bactériennes ayant une importance industrielle devraient être préservées afin de protéger la production des produits traditionnels et de pouvoir les exploiter par le biais de leur utilisation industrielle. Ceci nous a poussé à identifier les souches ayant plusieurs caractéristiques industrielles par MALDI-TOF-MS et les résultats sont confirmatifs de ceux obtenus par pré-identification .

En deuxième partie cette étude à viser la caractérisation biochimique des deux souches de *Lactobacillus brevis* (HMTK8) et *Lactobacillus plantarum* (HMTK21) productrices d'arôme et l'optimisation de la production de diacétyle par ces bactéries dans le milieu MRS et dans le lait.

D'après les résultats nous avons distingué une production de diacétyle sur les deux milieux : MRS et lait écrémé. L'étude des cinétiques d'acidification, de croissance et de consommation du glucose des deux souches en fonction du temps montre que la croissance bactérienne se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue. Simultanément à la croissance bactérienne, il y a consommation du glucose et production d'acide lactique. En début de fermentation, les bactéries consomment le glucose pour la maintenance cellulaire. En fin de croissance, le glucose continue à être transformé en acide lactique et ceci bien que la croissance bactérienne soit pratiquement arrêtée. Les paramètres d'état des cinétiques bactériennes (évolution de la concentration en biomasse, en substrat et en produit en fonction du temps) dépendent de la souche étudiée. Pour une utilisation

industrielle des bactéries lactiques, il est nécessaire de déterminer les paramètres d'état des cultures selon la bactérie à l'échelle pilote.

L'optimisation de la production du diacétyle des deux souches montre une activité aromatisante variable. Les conditions optimales pour la production de diacétyle ont été précisées pour des cultures de ces bactéries en milieu MRS et dans le lait : il faut un pH de 4,3 ; une température de 21°C, une concentration de 15 g/l du glucose et une concentration de citrate de 0,03 g/l. Les quantités de diacétyle produites dans le lait étaient supérieures à celles dans le milieu MRS. Il faut noter que ces quantités sont variables d'une souche à l'autre.

L'étude de l'évolution de la croissance bactérienne et de la production de diacétyle en fonction du temps des deux souches montre que la production de diacétyle est liée à la croissance bactérienne. Le taux maximal de diacétyle produit est de 0,2 ppm au bout de 12 h d'incubation et son évolution est la succession de deux phases :

- A. Une phase ascendante au cours de laquelle, il y a synthèse maximale de diacétyle à 12 h d'incubation.
- B. Une phase descendante (déclin) au-delà de 12 h, pendant laquelle il y a appauvrissement du milieu en diacétyle, résultant de l'épuisement du milieu en composé précurseur de diacétyle (citrate) et l'action de la diacétyle réductase.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives de production de certains produits fermentés dont la qualité microbiologique et organoleptique est maîtrisée par une fermentation orientée à l'aide des souches identifiées et caractérisées.

Il sera aussi intéressant de faire une étude poussée sur le caractère inhibiteur des souches acidifiantes et productrices d'arôme et aussi d'évaluer leur potentiel de résistance aux différentes conditions de stress.

L'utilisation des deux souches productrices d'arôme en culture mixte sera probablement un moyen d'aboutir à la meilleure production de composé d'arôme dont il faut tester tous les paramètres affectant cette culture.

- **Aarnikunnas, J., von Weymarn, N., Rönholm, K., Leisola, M. & Palva, A. (2003).** Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of mannitol and pure L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnol. Bioeng.* **82**: 653–663.
- **Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. et Sonomoto, K. (2013).** Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31: 877–02.
- **Abraham, A.G., Deantoni, G.L. et Anon, M.C. (1993).** Proteolytic activity of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk. *J. Dairy Sci.* 76 (6): 1498–1505.
- **Abubakr, M.A.S., Al-Adiwish, W.M. (2017).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Different Fruits with Proteolytic Activity. *Int J of Microbiol and Biotechnol* 2:58.
- **Accolas, J. P., Veaux, M. et Auclair, J. (1971).** Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 51 : 249-272.
- **Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.M et Paalme, T. (2003).** The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J food Microbiol*; 85: 171-183.
- **Advisory Committee on Novel Foods and Processes. (1996).** Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. Advisory Committee on Novel Foods and Processes report. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, United Kingdom.
- **Ahmadova, A., Dimov, S., Ivanova, I., Choiset, Y., Chobert, J.-M., Kuliev, A., Haertlé, T. (2011).** Proteolytic activities and safety of use of *Enterococci* strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *Eur Food Res Technol* . 233: 131.
- **Ait Kaki S. (2008).** Contribution à l'étude de l'interaction génotypes x milieu pour la qualité technologique chez le blé dur en Algérie. Thèse de Doctorat d'Etat en Science, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie. 127p.
- **Ajioka, M., Enomoto, K., Suzuki, K., Yamaguchi, A. (1995).** The basic properties of poly (lactic acid) produced by the direct condensation polymerization of lactic acid. *J Polym Environ.* 3:225–34
- **Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Parkouda, C., Jespersen, L., (2014).** The Use of Lactic Acid Bacteria Starter Culture in the Production of Nunu, a Spontaneously Fermented Milk Product in Ghana. *International Journal of Food Science*.
- **AL omari, A., Quasem, J.A et Mazahreh, A.S., (2008).** Microbiological analysis of solar and freeze-dried jameed produced cow and sheep milk with the addition of carrageenan mix to the jameed paste. *Pakistan j nutrition*, 7(6): 726-729.
- **Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, S.U., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobetti, M. (2001).** Microbiological and biochemical characteristics of canestrato pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 35–48.

- **Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2013).** Lactose and beta-glucosides metabolism and its regulation in *Lactococcus lactis*: a review. In: Kongo, J.M. (Ed.), Lactic Acid Bacteria—R&D for Food, Health and Livestock purposes. InTech
- **Allen, S.J., Okoko, B., Martinez, E., Gregorio, G. et Dans, L.F. (2004).** Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2: 48.
- **Alvarez, Y., Esteban-Torres, M., Cortés-Cabrera, Á., Gago, F., Acebrón, I., Benavente, R., Mardo, K., Rivas, B., Muñoz, R., Mancheño, J.M. (2014).** Esterase LpEst1 from *Lactobacillus plantarum*: A Novel and Atypical Member of the  $\alpha\beta$  Hydrolase Superfamily of Enzymes. *PLOS ONE.* 9(3): e92257.
- **Ameen, S.M., Caruso, G. (2017).** Lactic Acid in the Food Industry, Chemistry of Foods. Springer International Publishing.
- **Amrane, A. (1991).** Optimisation de la productivité d'un fermenteur effectuant la conversion en acide lactique de perméat de lactosérum supplémenté. Thèse de doctorat, Université de Rennes I, France.
- **Amrane, A. (2005).** Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate, *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 345-352,
- **Andersen, H. J., H. Ostdal, et H. Blom. (1995).** Partial purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* MF32. *Food Chem.* 53:369–373.
- **Andersen, H.W., Solem, C., Hammer, K. (2001).** Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and in glycolytic flux. *J. Bacteriol.* 183: 3458–3467.
- **Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., (2001).** Phenotypic and genetic diversity of *Enterococci* isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research* 68: 303–316.
- **Angelakis, E., Million, M., Henry, M., Raoult, D. (2011).** Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Food Sci.* 76: 68-72
- **Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, E., Osimani, A., Santarelli, S., Clementi, F. (2007).** Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *J. Appl. Microbiol.* 103: 948–960.
- **Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007).** Lipase applications in food industry. *Ind J Biotech* 6:141–158.
- **Assie, B., Descottes B. (2004).** Le miel comme agent cicatrisant. Thèse d'exercice : Médecine. Toulouse. France. 115 p
- **Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A. et Lefebvre, G. (2001).** Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 93–104.

- **Ávila, M., Calzada, J., Garde, S., Nuñez, M. (2007).** Lipolysis of semi-hard cheese made with a lactacin 481-producing *Lactococcus lactis* strain and a *Lactobacillus helveticus* strain. *Lait* 87 : 575–585.
- **Awad, S., B. Bahey-El-Din et M. El-Soda. (2001).** Proteolytic activity of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Enterococcus* strains in pseudo-curd, casein hydrolysate and cheese slurry. *Egypt J. Dairy Sci.* 29 (1): 87–97.
- **Axe, D. D. et Bailey, J. E. (1995).** Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 47: 8–19.
- **Axelsson, L. (2004).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (eds), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc. 633: 1–66.
- **Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., El-Soda, M. (2004).** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21(6): 715–725.
- **Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., El-Soda, M. (2004).** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria," *Food Microbiology*, 21(6):715–725.
- **Ayad, E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J. (1999).** Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.* 9: 725–735
- **Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. et Hugas, M. (2000)** Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63: 721–6.
- **Azhari Ali, A. (2011).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk in Khartoum State, Sudan. *Int J Dairy Sci.* 6: 66-71.
- **Badel S., Bernardi T., Michaud P. (2011).** New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol Adv.* 29: 54–66.
- **Bahey-El-Din, M., Gahan, C.G. et Griffn, B.T. (2010).** *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr. Gene. Ther.* 10: 34–45.
- **Balciunas, E., Castillo, F., Dimitrov Todorov, S., Franco, B., Converti, A., Oliveira, R. (2013).** Novel biotechnological applications of bacteriocin: A review. *Food Control* 32: 134–142.
- **Ballesteros, C., Poveda, C. M., Gonzalez-Vinas, M. A. et Cabezas, L. (2006).** Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control.* 17: 249–255
- **Bandell, M., Ansanay, V., Rachidi, N., Dequin, S. et Lolkema, J.S. (1997).** Membrane potential-generating malate (MleP) and citrate (CitP) transporters of lactic acid bacteria are homologous proteins. Substrate specificity of the 2-hydroxycarboxylate transporter family. *J Biol Chem.* 272: 18140–18146.
- **Banks, J.M., Yvon, M., Gripon, J.C., de la Fuente, M.A., Brechany, E.Y., Williams, A.G., Muir, D.D. (2001).** Enhancement of amino acid catabolism in cheddar cheese

using a-ketoglutarate: amino acid degradation in relation to volatile compounds and other aroma character. *Int Dairy J.* 11: 235–243.

- **Barreau, M., Pagnier, I., La Scola, B. (2013).** Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. *Anaerobe.* 22:123-5.
- **Bartali, E.H. (1987).** Underground storage pits in morocco. *Tunnelling and Underground Space Technology.* 2: 381–383.
- **Bartali, H., Debbarh, A. (1991).** Evaluation et amélioration de la technique traditionnelle du stockage souterrain des céréales au Maroc, Hommes, Terre et Eaux, *Marocaine des Sciences et Techniques du Développement Rural.* 82 : 3-20.
- **Bartowsky, E. J., et Henschke, P. A. (2004).** The ‘buttery’ attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol.* 96(3): 235-252
- **Bassit, N., Boquien, C. Y., Picque, D. et Corrieu, G. (1995).** Effect of temperature on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis.* *J. Dairy Res.* 62: 123-129
- **Bassit, N., Boquien, C. Y., Picque, D., Corrieu, G. (1993).** Effect of oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis.* *Appl Environ Microbiol.* 59(6): 1893-1897.
- **Bassit, N., L. E., Boquien, C.Y., Picque, D., Corrieu, G. (1994).** Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis.* *Lait.* 74:115-126.
- **Batt, C.A. (2000).** *Lactococcus* introduction. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel, pp. 1164–1166. Academic Press, San Diego.
- **Batt, C.A. (2014).** *Encyclopedia of Food Microbiology.* Academic Press.
- **Beji-Becheur, A., (2008).** Couscous connexion: l’histoire d’un plat migrant. Session 2. P : 1-17.
- **Bekal S., Diviès C., Prévost H. (1998a).** Citrate lyases of lactic acid bacteria, *Lait.* 78: 3-10.
- **Bekal, S., van Beeumen, J., Samyn, B., Garmyn, D., Henini, S., Diviès, C., Prévost, H. (1998b).** Purification of *Leuconostoc mesenteroides* citrate lyase and cloning and characterization of the *citCDEFG* gene cluster, *J. Bacteriol.* 180: 647-654
- **Bekal-Si, A.S., Diviès, C., Prévost, H., (1999).** Genetic organization of the *citCDEF* locus and identification of *mae* and *clyR* genes from *Leuconostoc mesenteroides.* *J. Bacteriol.* 181: 4411–4416
- **Bekhouche, F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d’enzyme polygalacturonase, Thèse : Génie alimentaire, Institut de la nutrition de l’alimentation et des technologies agro-alimentaires, Université Mentouri, Constantine, Algérie, p29, 31.

- **Bekhouche, F., Merabti, R. et Bailly, J.D. (2013).** Traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria): investigation of the process and estimation of the technological and nutritional quality. *Afr J Sci Technol.* 167–175.
- **Belkheir, K., Centeno, J.A., Zadi-Karam, H., Karam, N.-E. et Carballo, J. (2016).** Potential technological interest of indigenous lactic acid bacteria from algerian camel milk . *Ital. J. Food Sci.*, 28 : 598-610.
- **Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., Charles, M., Franz, A. P., Holzapfel, W. H., Pérez-Pulido, R., Magdalena, M. C., Gálvez, A. (2004).** Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 118-130.
- **Benasla A., (2012).** Production d'exopolysaccharides par des souches de *Lactobacillus*. Mémoire de magister, Université d'Oran. Algérie.
- **Benavente, R., M., Esteban-Torres, I., Acebrón, B., de las Rivas, R. Muñoz. Et Mancheño, J. M. (2013).** Structure, biochemical characterization and analysis of the pleomorphism of carboxylesterase Cest-2923 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *FEBS J.* 280:6658–6671.
- **Benazzouz, D. (2012).** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle) . Mémoire de Magistère. Ecole National Supérieur d'Agronomie El-Harrach Alger. Algérie.
- **Benito, M.J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Perez-Navado, F. et Cordoba, M.G. (2008).** Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 80: 656-61.
- **Bennik, M.H.J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L.G.M., Smid, E.J. (1998).** A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1373, 47-58.
- **Benson, K.H., Godon, J.J., Renault., P., Griffin, H.G et Gasson, M.J. (1996).** Effect of i1vBN-encoded alpha-acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1(2): 107-111.
- **Beresford, T. et Williams, A. (2004).** The microbiology of cheese ripening. Pages 287–317. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology.* 3rd ed. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, ed. *Elsevier Academic Press, London, UK.*
- **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2009).** Volume 3: The | Paul Vos | Springer, n.d. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, Second edition.*
- **Bernardeau, M., Vernoux, P.J., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol.* 126: 278–285.
- **Bhowmik, T., Steele, J. L. (1994).** Cloning, characterization and insertional inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-)lactate dehydrogenase gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41:432–9

- **Bisset, D.L. et Anderson, R.L. (1974).** Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci: presence of enzymes for both the D-galactose-1-phosphate and D-tagatose-6-phosphate pathways. *J. Bacteriol.* 117: 318–20.
- **Bizzini, A. et Greub, G. (2010).** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 1614–19.
- **Björkroth, J. et Holzapfel, W. (2003).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin M. (ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York, Springer-Verlag. 267–319.
- **Björkroth, J. & Holzapfel, W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The Prokaryotes*, 3<sup>ème</sup> édition, 4: 267–319.
- **Björkroth, K.J., Geisen, R., Schillinger, U. (2000).** Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3764–72.
- **Björkroth, K.J., Schillinger, U., Geisen, R. (2002).** Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 141–8.
- **Bobillo, M. et Marshall, V.M. (1991).** Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol.* 8: 153-160.
- **Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P. (2004).** Complete genome sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnol.* 22: 1554–8.
- **Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. (2001).** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. *Genome Res*, 11: 731-753.
- **Booyen, C., Dicks, L.M.T., Meijering, I. et Ackermann, A. (2002).** Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 63–73.
- **Boquien, C. Y., G. Corrieu, and M. J. Desmazeaud. 1988.** Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2527–2531
- **Bornscheuer, U. T. (2002).** Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:73–81.
- **Bott, M. (1997).** Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch. Microbiol.* 167: 78-88.
- **Boubekri K., Ohta, Y. (1996).** Identification of lactic acid bacteria from algerian traditional cheese, El-Klila. *J. Sci. Food Agric.* 70 : 501-505.
- **Boublenza, F., Baghdad Belhadj F, Z., Zadi Karam, H., Karam, N, E. (2018).** The effects of thermal, osmotic and acid stress on *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Biosci.* 12 (1) : 51-64.

- **Boullouf, A. (2016).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « *Bouhezza* ». Mémoire de Magistère. Université Des Frères Mentouri Constantine. Algérie.
- **Boumehira, A. Z. (2010).** Identification et caractérisation technologique et fonctionnelle des souches *Lactobacillus plantarum* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle. Thèse de Doctorat. Université d'Oran. Algérie.
- **Boumerdassi, H., Desmazeaud, M., Monnet, C., Boquein, C., Corrieu, G. (1996).** Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control. *J Dairy Res* 79:775–781
- **Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B. (2012).** Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol.* 154: 87–97.
- **Bourel, G., Bekal, S., Diviès, C., Prévost, H. (1996).** Citrate permease gene expression in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains IL1403 and MG1363, *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 367–370.
- **Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D.W. (2006).** A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4: 754–9.
- **Braegger C., (2002).** Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aiguë chez l'enfant. *Paediatrica*, 13 : 50-53.
- **Branen, A.L. et Keenan, T.W. (1971).** Diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol.* 22: 517-521.
- **Broadbent, JR, Steele, JL (2005).** Cheese flavour and the genomics of lactic acid bacteria. *ASM News* 71:121–128
- **Brod, F.C.A., Vernal, J., Bertoldo, J.B., Terenzi, H., Arisi A.C.M. (2010).** Cloning, Expression, Purification, and Characterization of a Novel Esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Mol Biotechnol.* 44 : 242–249
- **Brooijmans, R.J.W., de Vos, W.M. et Hugenholtz, J. (2009).** The electron transport chains of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3580–5.
- **Bruneau, E. (2002).** Les produits de la ruche. In *Le traité rustica de l'apiculture*. Paris, *Rustica*, 354-384.
- **Buffa, M., Morais, J., Jimé'nez-Belenguer, A., Herná'ndezGime'nez, E. and Guamis, B. (2005).** Technological characterisation of lactic acid bacteria isolated from raw ewes' milk for cheese making. *Milchwissenschaft.* 61: 404–407.
- **Buydens, P. & Debeuckelaere, S. (1996).** Efficacy of SF68 in the treatment of acute diarrhea. *A placebo-controlled trial. Scand. J. Inf. Dis.* 31: 887–91.
- **Cabral, M.E., Abeijón Mukdsi, M.C., Medina de Figueroa, R. et González, S.N. (2007).** Citrate metabolism by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from goat's and ewe's milk: influence of glucose and lactose. *Can. J. Microbiol.* 53: 607-615.

- **Cachon, R et Diviès, C. (1994).** Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* biovar *Diacetylactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41: 694-699.
- **Cachon, R., Diviès, C. (1993).** A descriptive model for citrate utilization by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Biotechnology Letters* 15(8): 837-842.
- **Cai, Y., Ng, L.-K., Farber, J. m. (1997).** Isolation and characterization of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. *J Appl Microbiol.* 83, 499–507.
- **Cai, Y., Yang, J., Pang, H et Kitahara, M. (2011).** *Lactococcus fujiensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1590-1594.
- **Callanan, M., Kaleta, P., O’Callaghan, J. (2008).** Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J. Bacteriol.* 190: 727–735.
- **Caplice, E. et Fitzgerald, G.F. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131–49.
- **Caplice, E., Fitzgerald, G.F., (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- **Carine. D ; Tonart. P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Base.* 13.
- **Carr, F. J., Chill, D. et Maida, N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey *Critical Rev. Microbiol.* 28: 281-370.
- **Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C. (1992).** Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie, Aliments, Nutrition.* 10: 289– 293
- **Carvalho, B.F., Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Neri, J., Schwan, R.F. (2014).** Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. *Animal Feed Sci and Technol* 195: 1–13.
- **Centeno, J.A., Menendez, S., Hermida, M., Rodríguez-Otero, J.L. (1999).** Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48 : 97–111.
- **Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L. (1994).** Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG 11 and partial structure analysis of the polymer. *App. Environ Microbio.* 60: 3914-3919
- **Chace, N.M., Sgorbati, B. et London, J. (1981).** A comparison of the physical and biochemical properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from 3 lactic-acid bacteria. *Zbl. Bakt. Mik. Hyg. I C.* 2: 1–10.

- **Champagne, C. P., Lange, M., Blais, A., Goulet, J. (1992).** Caractéristiques et emplois de cultures lactiques en industrie laitière. Conseil des denrées alimentaires du Québec. Québec : Ministère de l'agriculture, de pêcheries et de l'alimentation.
- **Chao, S.H., Huang, H.Y., Kang, Y.H., Watanabe, K., Tsai, Y.C. (2013).** The diversity of lactic acid bacteria in a traditional Taiwanese millet alcoholic beverage during fermentation. *LWT - Food Sci Technol*, 51(1): 135–142.
- **Chassy, B.M. et Alpert, C.A. (1989).** Molecular characterization of the plasmid-encoded lactose-PTS of *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 157–66.
- **Chauvin, R (1968) :** *Actions physiologiques et thérapeutiques des produits de la ruche*, in *Traité biologique de l'abeille*, Tome 3. Édition Masson de Cie, Paris. Pp : 116-155.
- **Chaves, A.C.S.D., Fernandez, M., Lerayer, A.L.S., Mierau, I., Kleerebezem, M. et Hugenholtz, J. (2002).** Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5656–62.
- **Chen, X., Zhao, X., Qian, Y., Li, J., Chen, L., Chen, J., Zhang, Y., Suo, H. (2017).** Screening and identification of lactic acid bacteria strains with high acid-producing from traditional fermented yak yogurt. *BIO Web Conf.* 8: 03002.
- **Chen, Y. S., Chang, C. H., Pan, S. F., Wang, L. T., Chang, Y. C., Wu, H. C. et Yanagida, F. (2013).** *Lactococcus taiwanensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from fresh cummingcordia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63: 2405-2409.
- **Chen, Y. S., Otaguro, M., Lin, Y.H., Pan, S.F., Ji, S.H., YU, C.R., Liou, M.-S., Chang, Y.C., Wu, H.-C. et Yanagida, F. (2014).** *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from *yan-tsai-shin* (fermented broccoli stems). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 146-151.
- **Chich, J. F., Marchesseau, K. et Gripon, J. C. (1997).** Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: purification and characterization. *Int. Dairy J.* 7:169–174
- **Cho, S.-L. S.-W. Nam, J.-H. Yoon, J.-S. Lee, A. Sukhoom and W. Kim. (2008).** *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1844–1849.
- **Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.-B., Pyun, Y.R., (2000).** Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J Appl Microbiol.* 88: 563–571.
- **Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999).** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 217–246.
- **Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., Bartkiene, E. (2013).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control.* 31: 539–545.
- **Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M., (2013).** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 26: 547–603.

- **Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Novak, L., Lindley, N. d., Loublere, P. (1995).** Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J of Appl Bacteriol.* 79: 108–116.
- **Cogan, T. M. (1987).** Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp: effects on growth, substrates and products. *J Appl Bacteriol.* 63:551-558.
- **Cogan, T. M., Jordan, K. N. (1994).** Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J Dairy Sci.* 77:2704-2717.
- **Cogan, T. M., ODowd, M. et Mellerick, D. (1981).** Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1-8.
- **Cogan, T.M. (1981).** Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *J of Dairy Res.* 48: 489– 495
- **Cogan, T.M. et Accolas, J.P. (1996).** *Dairy Starter Cultures.* Verlag Chemie Publishers, New York.
- **Cogan, T.M., Fitzgerald, R.J., Doonan, S. (1984).** Acetolactate synthase of *Leuconostoc lactis* and its regulation of acetoin production. *J. Dairy Res.* 51: 597-604.
- **Collins, E.B. (1972).** Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.* 55:1002
- **Collins, E.B. (1977).** Influence of medium and temperature on end products and growth. *J Dairy Sci.* 60: 799-804
- **Collins, M.D., Facklam, R.R., Farrow, J.A.E., Williamson, R. (1989).** *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989, 57: 283-288.
- **Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Jones, D. (1986).** *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 8-12.
- **Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Kandler, O. (1983).** *Streptococcus garvieae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 8-12.
- **Collins, M.D., Jones, D., Farrow, J.A.E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K.H. (1984).** *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1984, 34: 220-223.
- **Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G. (2003).** Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13: 841–866
- **Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G. (2004).** Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol. 1. Elsevier Academic Press, London, UK.
- **Connelly, P. (2008).** *Lactobacillus plantarum*—a literature review of therapeutic benefits. *J Aust Tradit Med Soc* 14: 79–82.
- **Corrieu, G et Luquet, F. M. (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc*, p 849.

- **Costa, N.E, Hannon, J.A, Guinee, T.P., Auty, M.A, McSweeney, P.L., Beresford, T.P. (2010).** Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 93:3469–86
- **Courtney, P.D. (2000).** *Lactococcus lactis* Subspecies *lactis* and *cremoris*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel. Academic Press, San Diego. 1166–1171
- **Cowan, S.T. (1971).** Sense and nonsense in bacterial taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 67: 1-8.
- **Cretenet, M., Le Gall, G., Wegmann, U., Even, S., Shearman, C., Stentz, R., Jeanson, S. (2014).** Early adaptation to oxygen is key to the industrially important traits of *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* during milk fermentation. *BMC Genomics* 15: 1054.
- **Crow, V.L., Holland, R., Pritchard, G.G., Coolbear, T. (1994).** The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria: 2. The levels and subcellular distributions of peptidase and esterase activities. *Int. Dairy J.* 4: 723–742
- **Crow, V.L., Pritchard, G.G. (1977).** Fructose 1,6-diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*: kinetic properties and factors affecting activation. *J Bacteriol.* 131: 82-91.
- **Curic, M., Stuer-Lauridsen, B., Renault, P., Nilsson, D. (1999).** A general method for selection of alpha-acetolactate decarboxylase-deficient *Lactococcus lactis* mutants to improve diacetyl formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1202-1206.
- **Curioni, P. M. G., Bosset, J. O. (2002).** Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int Dairy J.* 12:959-984.
- **D’Arienzo, R., Stefanile, R., Maurano, F., Mazzarella, G., Ricca, E., Troncone, R., Auricchio, S. and Rossi, M. (2011).** Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy, *Scand. J. Immunol.*, 74: 335–341.
- **D’Souza, A.L., Rajkumar, C., Cooke, J. & Bulpitt, C.J. (2002).** Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: metaanalysis. *Brit. Med. J.* 324: 1361–4.
- **Dagdemi, E., Ozdemir, S. (2008).** Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese. *Int J of Dairy Technol* 61: 133–140.
- **Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Vilalta, N.E., Swings, J., Fruerkilde, P., Leisner, J.J. (2003).** Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *J. Appl. Microbiol.* 94: 80–9.
- **Das, D.; Goyal, A. (2014).** Characterization and biocompatibility of glucan: a safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. *J. Sci. Food Agric.* 94: 683–690.
- **Datta, R., Henry, M. (2006).** Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies. *J Chem Technol Biotechnol.* 81:19-29.
- **Davidson, B.E., Llanos, R.M., Cancilla, M.R., Redman, N.C., Hillier, A.J. (1995).**

- Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Inter Dairy J, Int Dairy LAB Conference* 5: 763–784.
- **de Azevêdo, L. C., Reis, M. M., Da Silva, L. A., De Andrade, J. B. (2007).** Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. [Effects of carbonylic compound presence and concentration on wine quality]. *Química Nova*. 30(8): 1968-1975.
  - **De Bruyne, K., Franz, C.M., Vancanneyt, M. (2008).** *Pediococcus argentanicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by pheS, rpoA and atpA sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2909–16.
  - **De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., Vandamme, P. (2011).** Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst Appl Microbiol.* 34:20e9.
  - **De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., Vandamme, P. (2011).** Bacterial species identification from MALDI-TOF spectra through data analysis and machine learning. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 20–9.
  - **De Felipe, F.L., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Hugenholtz, J. (1998).** Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J Bacteriol* 180:3804.
  - **De Felipe, F.L., Starrenburg, M.J., Hugenholtz, J. (1997).** The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 15-19.
  - **De Man J.C., Rogosa M. and Sharpe M.E. (1960).** A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J of appl bacterial.* 23 (1): 130-135.
  - **De MAN, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960).** A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23 : 130–135.
  - **De Roissart, H. B., (1986).** Bactéries lactiques. In lait et produits laitiers : vache, brebis et chèvre. Tome 3. Ed. *Technique et documentation Lavoisier*. Paris. 343-408.
  - **De Vos W. M. et Hugenholtz J. (2004).** Engineering metabolic highways in *lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.*, 22: 72-79.
  - **de Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 3 (The Firmicutes), Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
  - **de Vos, W. (2011).** Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microbial Cell Factories* 10: 2.
  - **De Vos, W., J. Hugenholtz. (2004).** Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology* 22:72–79.
  - **de Vos, WM. (1996).** Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:223.
  - **de Vries, M., Vaughan, E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. (2006).** *Lactobacillus plantarum* – Survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 16: 1018–28.

- **De Vuyst, L., P. Neysens. (2005).** The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 43–56
- **De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S. (2002).** The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6059–69.
- **De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994).** *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications.* London: Blackie Academic and Professional.
- **De Kwaadsteniet, M., Todorov, S., Knoetze, H., Dicks, L. (2005).** Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup> bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 105: 433-444.
- **Debbouz A. et Donnelly B.J. (1996).** Process effect on couscous quality. Engineering and processing. *Cereal chem.* 73: 668-671.
- **Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., CURK M.C. et JANSSENS D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.).Ed., *Lorica, Uriage.* 1 : 25-116.
- **Dellaglio, F., Bottazzi, V. & Trovatelli, L. D. (1973).** Deoxyribonucleic acid homology and base composition in some thermophilic lactobacilli. 1. *Gen. Microbiol.*, 74: 289-97.
- **Dellaglio, F., Bottazzi, V., Vescovo, M. (1975).** Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25: 160-72
- **Dellaglio, F., Torriani, S. (1986).** DNA: DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. 1. *Appl. Bacteriol.*, 60: 83-92.
- **Dellaglio, F., Trovatelli, L. D., Sara, P. G. (1981).** Deoxyribonucleic acid homology among representative strains of the genus *Pediococcus*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig.*, 2: 140-50.
- **Desfossés-Foucault, É., LaPointe, G., Roy, D. (2013).** Dynamics and rRNA transcriptional activity of lactococci and lactobacilli during Cheddar cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 166: 117–124
- **Devriese, L., Baele M., Butaye, P. (2006).** The genus *Enterococcus*: Taxonomy. The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd edn. New York: Springer. 4: 163-174.
- **Devriese, L., Baele, M., Butaye, P. (2006).** The genus *Enterococcus*: Taxonomy. The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd edn. New York: Springer. 4: 163-174.
- **Devriese, L.A., B. Pot and M.D. Collins. (1993).** Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399–408

- **Devriese, L.A., Hommez, J., Pot, B., Haesebrouck, F. (1994).** Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and feces of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 31–6
- **Devriese, L.A., Pot, B. (1995).** The genus *Enterococcus*. In: Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. (eds), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. London: Blackie Academic & Professional, pp. 327–67.
- **Dos Santos, K.M.O., Vieira, A.D.S., Salles, H.O., Oliveira, J. da S., Rocha, C.R.C., Borges, M. de F., Bruno, L.M., Franco, B.D.G. de M., Todorov, S.D. (2015).** Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Braz. J. Microbiol.* 46 : 237–249.
- **Dharam, P. et Narender, R.P (2007).** Indian traditional dairy products: an overview. *Inter Conf Tradit Dairy Foods*. November14-17. NDRI, KARNAL(INDIA).
- **Díaz-Muñiz, I. et Steele, J.L., (2006).** Conditions required for citrate utilization during growth of *Lactobacillus casei* ATCC334 in chemically defined medium and Cheddar Cheese extract. *A. van Leeuw.* 90: 233-243.
- **Díaz-Muñiz, I., D. S. Banavara, M. F. Budinich, S. A. Rankin, E. G. Dudley., J. L. Steele. (2006).** *Lactobacillus casei* metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: A bioinformatics approach. *J. Appl. Microbiol.* 101:872–882
- **Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., Nampoothiri, K.M. (2015).** Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT - Food Science and Technology* 2: 1179–1186.
- **Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.Y., Miot-Certier, C., Claisse O. (2016).** Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: from genomic and phenotypic analysis to technological valorization. *Food Microbiol.* 53:10–17
- **Dimroth P. (1982).** The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na-activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* 121:443–449.
- **Dimroth, P. (1982).** The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na-activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* 121:443–449.
- **Dinçer, E., Kıvanç, M. (2018).** Lipolytic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Pastırma. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi - C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji* 1–1.
- **Divies, C.F.L., Hubert, J.C et De Roissart, H. (1994).** Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Vol 1 Ed, *De Roissart H et Luquet F M. Lorica. Chap 1-7* : 291-307.
- **Djermoun, A. (2009).** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Nature et Technologie*, 01 : 45-53.

- **Doan, N.T., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., LeThanh, B., (2012).** Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Lett Appl Microbiol.* 55:26-73.
- **Doeven, M.K., Kok, J., Poolman, B. (2005).** Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol. Microbiol.* 57: 640-649.
- **Doménech, A., Prieta, J., Fernández-Garaizabal, J.F., Collins, M.D., Jones, D., Domínguez, L. (1993).** Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *L. garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiologia* 9: 63–68.
- **Donadieu, Y. (1978):** *Le miel thérapeutique*. 2ème Ed Maloine S.A .Paris.28 p.
- **Doukani, K., Tabak, S. Gourchala, F., Mihoub, F., Ounes, M., Benbaguara, M. (2013).**Caractérisation physico-chimique du blé fermenté par Stockage Souterrain (Matmora). *Revue Ecologie-Environnement.* 9.
- **Druvefors, U.Ä. (2004).** Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala*. Thèse de doctorat. Université des Sciences Agronomiques, Uppsala, Suède. 466 p.
- **Dudley, E.G., Steele, J.L. (2001).** *Lactococcus lactis* LM0230 contains a single aminotransferase involved in aspartate biosynthesis, which is essential for growth in milk. *Microbiology* 147: 215–224.
- **Dudley, E.G., Steele, J.L. (2005).** Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 98:14 –23.
- **Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *J. Appl. Microbiol.* 91: 861–870.
- **Duskova, M., Sedo, O., Ksicova, K., Zdrahal, Z., Karpířskova, R. (2012).** Identification of *lactobacilli* isolated from food by genotypic methods and MALDITOF MS. *Int J Food Microbiol.* 159:107-14.
- **Eddy, B.P. (1961).** The Voges-Proskauer Reaction and Its Significance: A Review. *Journal of Applied Bacteriology* 24, 27–41.
- **Ehrmann, M.A., R.F. Vogel. (2005).** Taxonomic note “*Lactobacillus pastorianus*” (Van Laer, 1892) a former synonym for *Lactobacillus paracollinoides*. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 54–56.
- **El Shafei H.A., abdel-Sabour H., Ibrahim N. et Mostefa Y.A. 2000.** Isolation, screening and characterisation of the bacteriocin-producing Lactic and bacteria isolated from traditional fermented. *Food Microbiol. Res.* 154: 4, 321
- **El Soda M., Ahmed N., Omran N., Osman G., &Morsi, A. (2003).** Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese making. *Emir. Agric. Sci,* 15: 51-71.
- **Elena, M., Muste, S., Tofană, M., Mureşan, C. (2006).** Risk management of beer fermentation-diacetyl control. *Bulletin USAMV-CN.* 62: 303–307.

- **El-Gendy, S.M., H. Abdel-Gahil et F.Z. Hegazi. (1983).** Acetoin and diacetyl production by *Lactobacillus plantarum* able to use citrate. *J. Food Protect.* 46:503-505
- **El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertle, T., Chobert, J.M. (2010).** Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *Eur. Food Res. Technol.* 230 (4): 635–643.
- **El-Soda, M., Korayem, M. et Ezzat, N. (1986).** The esterolytic and lipolytic activities of *lactobacilli*. III. Detection and characterization of the lipase system. *Milchwiss.* 41: 353–355.
- **El-Soda, M., Law, J., Tsakalidou, E. et Kalantzopoulos, G. (1995).** Lipolytic activity of cheese related microorganisms and its impact on cheese flavour. In: Charalambous, G. (ed.), *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. Elsevier Science BV. 1823–47.
- **Endo, A., Okada, S. & Morita, H. (2007).** Molecular profiling of *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 191–200.
- **Escamilla-Hurtado, M.L. Tomasini-Campocosió, A. Valdés-Martinez, S., Soriano-Santos, J. (1996).** Diacetyl formation by lactic bacteria. *Revista Latinoamericana de Microbiologia.* 38: 129-137.
- **Espariz, M., Repizo, G., Blancato, V.S., Mortera, P., Alarcon, S., Magni, C. (2011).** Identification of malic and soluble oxaloacetate decarboxylase enzymes in *Enterococcus faecalis*. *FEBS J.* 278, 2140–2151.
- **Esteban-Torres, M., Landete, J.M., Reverón, I., Santamaría, L., de las Rivas, B., Muñoz, R. (2015).** A *Lactobacillus plantarum* Esterase Active on a Broad Range of Phenolic Esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 3235–3242.
- **Esteban-Torres, M., Mancheño, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R. (2014).** Characterization of a Cold-Active Esterase from *Lactobacillus plantarum* Suitable for Food Fermentations. *J. Agric. Food Chem.* 62: 5126–5132.
- **Esteban-Torres, M., Reverón, I., Mancheño, J.M, de las Rivas, B., Muñoz, R. (2013).** Characterization of a Feruloyl Esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 5130–5136.
- **Even, S., Lindley, N.D., Coccagn-Bousquet, M. (2001).** Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* 183: 3817–3824.
- **Facklam, R.R. et Collins, M.D. (1989).** Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731–734.
- **Fadda, S., Vignolo, G., Holgado, A.P.R. et Oliver, G. (1998).** Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Sci.* 49 (1): 11–18.
- **Falkow, S. (1958).** Activity of Lysine Decarboxylase as an Aid in the Identification of Salmonellae and Shigellae. *American Journal of Clinical Pathology* 29 : 598–600.
- **FEMA: Flavor and Extract Manufacturers 'Association of the United States, Inc.**

- Fragrance Materials Association of the United States: FMA. (2006).** Flavor or fragrance regulation data sheet. Diacetyl CAS Registry Number 431-03-8.
- **Feng, M., Chen, X., Li, C., Nurgul, R., Dong, M. (2012).** Isolation and Identification of an Exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from Chinese Paocai and biosorption of Pb (II) by its exopolysaccharide. *Journal of Food Science* 77: T111-T117.
  - **Fennema, O.F., Hui, Y.H., Karel, M., Walstra, P., Whitaker, J.R. (2004).** Lactic acid bacteria (Microbiological and Functional Aspects) In: Salminen S, von Wright A, editors. *Food science and technology a series of monographs, textbooks, and reference books*. New York: Marcel Dekker, Inc. 19–30.
  - **Fenster, K.M., Parking, K.L., Steele, J.L. (2003).** Intracellular esterase from *Lactobacillus casei* LILA: nucleotide sequencing purification, and characterisation. *J Dairy Sci*, 86:1118-1129.
  - **Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P., Delcour, J. (1994).** *Lactobacillus plantarum* ldhL gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol.* 176:596–601
  - **Ferain, T., Schanck, K., Delcour, J. (1996).** 13C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an *ldhL-ldhD* doubleknockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178:7211–7315
  - **Fernández, M. (1983).** Olives. Rehm H. & Reed G., eds. *Biotechnology. Vol. 5. Food and feed production by microorganisms*. 379-397.
  - **Fontana, C., Li, S., Yang, Z., Widmalm, G. (2015).** Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydr. Res.* 402: 87–94.
  - **Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini, P. (2003).** Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma Piemontese. *Food Microbiol.* 20: 397-404.
  - **Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F. (2009).** A study on the lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes. *J. Food Prot.* 72: 1248–1254.
  - **Fortina, M.G., Ricci, G., Foschino, F., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L., Manachini, P.L. (2007).** Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J. Appl. Microbiol.* 103: 445-453.
  - **Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D., Manachini, P.L. (2004).** Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1717-1721.
  - **Foucaud, C., Kunji, E.R., Hagting, A., Richard, J., Konings, W.N., Desmazeaud, M., Poolman, B. (1995).** Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system, which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.* 177: 4652-4657.

- **Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food. Microbiol.* 106: 1-24.
- **Fox, P. F., Wallace, J. M. (1997).** Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology.* 45: 17-85.
- **Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2017).** Fundamentals of Cheese Science, 2nd ed. *Springer US.*
- **Franz, C., H. Holzapfel, W. (2011).** Examples of Lactic-Fermented Foods of the African Continent. 265-284.
- **Franz, C.M., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (1997).** Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic Microbiol.* 37: 187–196.
- **Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003).** Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105–122.
- **Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Galvez, A. (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- **Freitas, A. C., Pintado, A. E., Pintado, M. E et Malcata, F. X. (1999).** Role of dominant microflora of *Picante* cheese on proteolysis and lipolysis, *IntDairy J.* 9: 593–603.
- **Freitas, A. C., Pintado, A. E., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (1999).** Organic acids produced by lactobacilli, enterococci and yeasts isolated from *Picante* cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 209:434–438
- **Freitas, F., Alves, V.D., Reis, M.A. (2011).** Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 29: 388–98
- **Friedrichs, C., Rodloff, A.C., Chhatwal, G.S., Schellenberger, W. & Eschrich, K. (2007).** Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2392–7.
- **Fröhlich, J et König, H. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Fu, W., Mathews, A.P. (1999).** «Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen», *Biochemical Engineering Journal.* 3: 163-170.
- **Fukao, M., Oshima, K., Morita, H., Toh, H., Suda, W., Kim, S.W., Suzuki, S., Yakabe, T., Hattori, M., Yajima, N. (2013).** Genomic Analysis by Deep Sequencing of the Probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 Harboring Nine Plasmids Reveals Genomic Stability. *PLoS One.* 8.
- **Gagnon, D. (2006).** Formulation et propagation de ferments lactiques mésophiles à haut caractère aromatique. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences et technologie des aliments pour l'obtention du grade de maître en sciences (M.Se.)
- **Gajewska J., Błaszczyk M.K. (2012).** Bactéries probiotiques de fermentation lactique

- **Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Ganzle, M., Arendt, E. (2012).** Comparison of the impact of dextran and reuteran on the quality of wheat sourdough bread. *J. Cereal Sci.* 56:531–37
- **Galvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R. (2011).** Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications.* Springer Verlag. 253-390.
- **Gálvez, A., López, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N. (2008).** Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 125–52.
- **Gancheva, A., Pot, B., Vanhonacker, K., Hoste, B., Kersters, K. (1999).** A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 22(4):573-585.
- **Ganesan, B., Stuart, M.R., Weimer, B.C. (2007).** Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 73:3498-2512
- **García, A.I., García, L.A. et Díaz, M., (1994).** Modelling of diacetyl production during beer fermentation. *J. Inst. Brew.* 100: 179-183
- **Garcia-Quintàns, N., De Mendoza D., Lôpez, P. (1998).** The Citrate Transport System of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* Is Induced by Acid Stress. *Appl. Environ.Microbiol.* 64(3): 850-857.
- **Garcia-Quintans, N., Magni, C., de Mendoza, D., Lopez, P. (1998).** The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:850–857.
- **García-Quintàns, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., López, P. (2008).** Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyllactis* CRL264 by acidic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1988-1996.
- **Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A.S., Ahring, B.K. (2002).** Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology* 81: 217–223.
- **Garvie, E. I. (1984).** The separation of species of the genus *Leuconostoc* and the differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Meth. Microbiol.*, 16: 147-78.
- **Garvie, E. I., Farrow, J. A. E. (1981).** Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zentralbl. Bakteriol.Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig.*, 2: 299-310.
- **Garvie, E. I., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A. (1981).** A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10°C but not at 45°C including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig.*, C: 151-65.
- **Gaspar, P., Carvalho, A.L., Vinga, S., Santos, H., Neves, A.R. (2013).** From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid

- bacteria. *Biotechnology Advances*, “Bioenergy and Biorefinery from Biomass” through innovative technology development. 31: 764–788.
- **Gasser, F. (1970).** Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 62: 223–39.
  - **Gelais, ST-D. Tirrard-Coller, P., Belanger, G., Drapeau, R., Couture, R., (2002).** Le fromage. science et technologies du lait transformation du lait par Vignola Carole L. *presse internationale polytechnique.* 349-413.
  - **Gevers, D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
  - **Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 31–6.
  - **Gibson, G.R, Roberfroid, M.B (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 124:1401–1412
  - **Giraffa, G. (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.* 88: 215–22.
  - **Giraffa, G., De Vecchi, P., Rossetti, L. (1998).** Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.* 85: 918–24
  - **Giraud, E., Lelong, B., Raimbault, M. (1991).** Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 96–99.
  - **Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1994).** The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 456–60.
  - **Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1995).** Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 fructose negative strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 4: 939-44.
  - **Gobbetti, M., Fox, P. F., Smacchi, E., Stepaniak, L. et Damiani, P. (1996).** Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Food Biochem.* 20:227-246.
  - **Gobbetti, M., Fox, P. F., Stepaniak, L. (1997).** Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Dairy Sci.* 80:3099–3106.
  - **Gobbetti, M., Fox, P.F., Smacchi, E., Stepaniak, L., Damiani, P. (1996).** Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Food Biochem.* 220: 227–246.
  - **Gobbetti, M., Fox, P.F., Stepaniak, L. (1997).** Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Dairy Sci.* 80: 3099–3106.
  - **González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Eugenia Tornadijo, M. (2010).** Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.* 27: 592–597.

- **Goodman, L. B., Lawton, M. R., Franklin-Guild, R. J., Anderson, R. R., Schaan, L., Thachil, A. J., Wiedmann, M., Miller, C. B., Alcaine, S. D., et Kovac, J. (2017).** *Lactococcus petaurisp.* nov., isolated from an abscess of a sugar glider. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67: 4397-4404.
- **Górska, S., Grycko, P., Rybka, J., Gamian, A., (2007).** Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 61: 805–818.
- **Graves, P.R., Haystead, T.A.J. (2002).** Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol.Molecul.Biol.Rev.*66:39-63.
- **Green, M.L., Manning, D.J. (1982).** Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *Journal of Dairy Research* 49: 737-748
- **Grobben GJ, Sikkema J, Smith MR, Bont JAM de (1995).** Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *J Appl Bacteriol.* 79: 103-107.
- **Grobben, G. J., Van Casteren., Schls, W. H. M., Oosterveld, H. A, Sala, A, Smith, G, Sikkema, J. and Bont, J. A. M. (1997).** Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 516-521.
- **Guiraud, J., Galzy, P., (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Editions de l'Usine nouvelle.
- **Guiraud, J.P. et Rosec, J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237-251.
- **Haddad, S., Sodini, I., Monnet, C., Latrille, E. (1997).** Effect of citrate on growth of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* in milk. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 236-241.
- **Haddadin, J. S. Y. (2005).** Kinetic studies and sensorial analysis of Lactic Acid Bacteria isolated from white cheese made from sheep raw milk," *Pakistan Journal of Nutrition*, 4: 78–84.
- **Hadef S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister Université Kasdi Merbah-Ouargla.
- **Hagting, A.E., Kunji, K. Leenhouts, B. Poolman, W. Konings. (1994).** Te di-and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial transporter. *J. Biol. Chem.* 269: 11391–11399.
- **Hamad, S., Dieng, M., Ehrmann, A., Vogel, R. (1997).** Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 764-770.
- **Hamet, M.F., Piermaria, J.A., Abraham, A.G. (2015).** Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT - Food Sci and Technol.* 63: 129 -135.
- **Hammes, W.P., A. Bantleon and S. Min. (1990).** Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 165-173.

- **Hammes, W.P., Gänzle, M. (1998).** Sourdough breads and related products. In: Woods, B.J.B. (ed.), *Microbiology of Fermented Foods*, vol. 1. London: Blackie Academic & Professional. 199–216.
- **Hammes, W.P., Hertel, C. (2003).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M. (Ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, third ed. Springer, Berlin
- **Hammes, W.P., Hertel, C. (2006).** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, in: *The Prokaryotes*. Springer US. 320–403.
- **Hammes, W.P., Hertel, C. (2009).** Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. et al. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3: *The Firmicutes*. Springer. 465–511.
- **Hammes, W.P., Vogel, R.F. (1995).** The genus *Lactobacillus*. In: Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. (eds), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic & Professional, 19–54.
- **Hammes, W.P., Weis, N., Holzapfel, W.P. (1991).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds.) *The prokaryotes*, 2ème ed. Springer, New York. 1535–1594.
- **Hammes, W.P., Weiss, N. & Holzapfel, W.P. (1991).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation Identification, Applications*. New York: Springer. 1535–94.
- **Harrigan, W.F. (1998).** Laboratory Methods in Food Microbiology. *Gulf Professional Publishing*.
- **Harvey R. J., Collins E. B. (1961).** Rôle of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J of Bacteriol.* 82:954-959
- **Harvey, R. J., Collins, E. B. (1963).** The citritase of *Streptococcus diacetylactis*. Substrate, products and equilibrium. *J of Biological Chemistry.* 238(8):2648-2653
- **Harvey, R.J., Collins, E.B. (1962).** Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of Bacteriology.* 83: 1005–1009.
- **Hassaine, O. et Beloufa, H. (1998).** Contribution à l'étude de l'activité protéolytique des souches de *Lactococcus lactis*. Mémoire de DES, Université d'Oran. Algérie.
- **Hassaine, O. (2008).** Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées du lait camelin du sud Algérien. Thèse de Doctorat. Université d'Oran. Algérie
- **Hassan, A.N. et Frank, J.F., (2001).** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.
- **Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G., and Paul Ross, R. (2007).** Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions, *Biotechnol. J.*, 2: 435–449

- **Helanto, M., Kiviharju, K., Leisola, M. & Nyssölä, A. (2007).** Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for production of L-ribulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7083–91.
- **Hemati, B., Sussmuth, R., Ezzat, N., El-Shafei, H., El-Soda, M. (1998).** Isolation and characterization of an Enterococcus starter from Egyptian Domiati cheese. *Milchwissenschaft* 53: 198–202.
- **Henriksen, C.M., Nilsson, D., Hansen, S., Johansen, E. (1999).** Industrial application of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. *Int. Dairy J.* 9: 17–23.
- **Herreros, M. A., Fresno, J. M., Gonzalez Prieto, M. J., Tornadizo, M. E. (2003).** Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Int Dairy J.* 13: 469–479.
- **Herreros, M.A., Fresno, J.M., Sandoval, H., Castro, J.M., Tornadizo, M.E. (2004).** Esterolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat milk cheese). *Milchwissenschaft.* 59: 526–529.
- **Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Wilkinson, M.G. (2006).** Starter bacteria are the prime agents of lipolysis in Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 54 (21): 8229–8235.
- **Hidayat, H. (2017).** Analysis of 16S rRNA gene lactic acid bacteria (LAB) isolate from Markisa fruit (*Passiflora* sp.) as a producer of protease enzyme and probiotics. AIP Conference Proceedings 1823 : 020110.
- **Ho, T.N.T., Tuan N., Deschamps, A. et Caubet, R. (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- **Hofi, M.E., Tanboly, E.S.E., Rabou, N.S.A. (2011).** Industrial application of lipases in cheese making: A review. *Int J of Food Safety* 13: 293–302.
- **Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000).** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol.* 26:87-107
- **Hogg, T. (2005).** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.
- **Holland, R., Coolbear, T. (1996).** Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Res.* 63:131–140.
- **Holland, R., Liu, S.-Q., Wang, T., Bennett, M., Norris, G., Delabre, M.L., Lubbers, M.W., Dekker, J.W., Crow, V.L. (2002).** Esterases of lactic acid bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 57: 116.
- **Holler, B.J., Steele, J.L. (1995).** Characterization of lactococci other than *Lactococcus lactis* for possible use as starter cultures. *Int. Dairy J.* 5: 275–279.
- **Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L. (2005).** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophiles* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 435–63.

- **Höltzel, A., Gänzle, M.G., Nicholson, G.J., Hammes, W.P., Jung, G. (2000).** The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetrameric acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 2766–8.
- **Holzappel, W. H et Brian, J.B. (2014).** *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, Edition N 1 John Wiley & Sons.
- **Holzappel, W.H. (1997).** Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8: 241–258.
- **Holzappel, W.H., C. Guigas and C.H.M.A.P. Franz. (2002).** General overview of the enterococci. In *Programme and Book of Abstracts from Conference Enterococci in Foods*, 30–31 May, Berlin, Germany, p. 1.
- **Holzappel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W. & Dicks, L.M.T. (2009).** Genus III. *Pediococcus* Claussen 1903, 68AL. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. *et al.* (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3: *The Firmicutes*. Springer, pp. 513–32.
- **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. et Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S–73S.
- **Hontebeyrie, M. et Gasser, F. (1977).** Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Leuconostoc*. *Int. 1. Syst. Bacteriol.*, 27: 9-14.
- **Horvath, P., Coute-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R. (2009).** Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol.* 131(1):62–70.
- **Huchet, E., Coustel, J., Guinot, L. (1996):** *Les constituants chimiques du miel. Méthode d'analyse chimique.* Département de science et l'aliment. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. France. 16p.
- **Hugas, M., Garriga, M. et Aymerich, M.T. (2003).** Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food. Microbiol.* 88: 223–33.
- **Hugenholtz J., Perdon. L., Abee T. (1993).** Growth and Energy Génération by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during Citrate Metabolism. *Appl and Envir Microbiol.* 59(12): 4216-4222.
- **Hugenholtz, J. (1993).** Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12:165–178.
- **Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W. et Hols, P. (2000).** *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4112-4114.
- **Hugenholtz, J., Starrenburg, M. J. (1992).** Diacetyl production by différent strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38: 17-22.
- **Hugenholtz, J., Sybesma, W., Nierop Groot, M. (2002).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 217–35.

- **Hutkins, R. W. & Nannen, N. L. (1993)**. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 76: 2354–2365.
- **Hutkins, R.W. (2006)**. Cultured Dairy Products, in: Microbiology and Technology of Fermented Foods. *Blackwell Publishing*. 107–144.
- **Idoui, T. Karam, N. E. (2008)**. Lactic acid bacteria from *Jijel's* traditional butter: isolation, identification and major technological traits, *Grasas y Aceites*. 59: 361–367,
- **Irygoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M., and Torre, P. (2007)**. Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compound in a Roncal-type ewe's milk cheese. *Food Chemistry* 100: 71–80.
- **Ismail, B., Nampoothiri, K.M. (2010)**. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch. Microbiol.* 192: 1049–1057.
- **Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A. C. (2004)**. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:299-313.
- **Jamaly, N., Benjouad, A., Comunian, R., Daga, E., Bouksaim, M. (2010)**. Characterization of *Enterococci* isolated from Moroccan dairy products. *African J of Microbiol Res.* 4(16): 1768–1774.
- **James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet, G. (1993)**. Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun.* 195:58–64.
- **Jamotte, P. (1967)**. Dégradation de la matière grasse par lipolyse. *Le lait.* 461-462.
- **Janssen, P., Coopman, R., Huys, G. (1996)**. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**: 1881–93.
- **Jarvis, A. W., Jarvis, B. D. W. (1981)**. Deoxyribonucleic acid homology among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 77-83.
- **Jay, J.M. (1996)**. Modern food microbiology 5ème édition. New York: Chapman & Hall.
- **Jean-Prost, P. (1987)**. *L'Apiculture : Connaître l'abeille, conduire le rucher* (6ème édition). France : Tec & Doc Lavoisier.
- **Jensen, O.N, Podtelejnikov, A.V., Mann, M. (1997)**. Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal Chem.*69: 4741–50.
- **Joffin, J.N et Ieyral, G. (1996)**. Microbiologie technique. *Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France*, pp.219-223.
- **Johnson, J. L., Phelps, C. F., Cummins, C. S., London, J. & Gasser, F. (1980)**. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 53-68.
- **Jolly, L., Vincent, S.J., Duboc, P, Neeser, J.R. (2002)**. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82:367–374.
- **Jordan, K. N., et Cogan, T. M. (1995)**. Growth and Metabolite production by mixed-strainstarter cultures. *Irish J. Aaricul. Food Res.* 34: 39-47.

- **Jyoti, B.D., Suresh, A.K. & Venkatesh, K.V. (2004).** Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate. *Microbiol. Res.* 159: 35-42.
- **Kamaly, K.M., Takayama, K., Marth, E.H. (1990).** Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and their mutants. *J. Dairy Sci.* 73: 280–290.
- **Kandler, O., Weiss, N. (1986).** *Lactobacillus*. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, London, pp 1209–1034.
- **Kaneko, T., Suzuki, H. Takahashi M. (1986).** Diacetyl formation and degradation by *Streptococcus lactis* ssp. *Diacetylactis* 3022. *Agric. Biol. Chem.* 50:2639.
- **Kaneko, T., Watanabe, Y., Suzuki, H., (1991).** Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 and citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3040-3042.
- **Karam, N.-E., Dellali, A., Zadi-Karam, H. (2012).** Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. *Renc. Rech. Ruminants.* 19 : 415.
- **Kaskoniené, V., Venskutonis, P. R. (2010).** Floral markers in honey of various botanical and geographic origins : a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 620-634.
- **Katz, M., Medina, R., Gonzales, S., Oliver, G. (2002).** Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe' s milk and cheese. *J. Food Protect.* 65(12): 1997-2001.
- **Kaup, S.M. et Walker, C.E. (1986).** Couscous in North Africa. *Cereal Foods World.* 31: 179-182.
- **Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T. (2002).** Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3830–3840.
- **Keenan, T. W., Lindsay, R. C. (1968).** Diacetyl production and utilization by *Lactobacillus* species. 1. *Dairy Sci.* 51: 188-191.
- **Kelly, W.J., Davey, G.P., Ward, L.J.H. (1998).** Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables. *Inter. J. Food Microbiol.* 45: 85-92.
- **Kenneally, P.M., Leuschner, R.G., Arendt, E.K. (1998).** Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *J Appl Microbiol.* 84: 839-846.
- **Kennes, C., Veiga, M.C., Dubourguier, H.C., Touzel, J.P., Albagnac, G., Naveau, H. Nyns, E.J. (1991).** Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1046-1051.

- **Kersani, I. (2013).** Production d'exopolysaccharides par deux souches de Lactobacilles. Mémoire de master en Biotechnologie. Université d'Oran. Algérie
- **Khalid, N.M., El-Soda, M. Marth, E. (1990).** Esterases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 73: 2711.
- **Khalid, N.M., Marth, E.H., (1990).** Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 311–319
- **Khan, H., Flint, S., Yu, P.L. (2010).** Enterocins in food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 141: 1–10.
- **Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A et Zinedine, A. (2006).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol.Res.*10 : 10-16.
- **Khenfer A et Fettal M, (2001):** *Le miel.* . Ministère de l'agriculture. Direction de la formation de la recherche et de la vulgarisation.23.
- **Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le Bars, D. Yvon, M. (2004).** The nature of the aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *Int. Dairy J.* 14: 227–235.
- **Kilpper-Balz, R., Schleifer, K.H. (1987).** Description of *Streptococcus suis* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 160–162.
- **Kilpper-Bilz, R., Fischer, G., Schleifer, K. H. (1982).** Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Curro Microbiol.* 7: 245-50.
- **Kim, S.Y. (2017).** Production of Fermented Kale Juices with Lactobacillus Strains and Nutritional Composition. *Prev Nutr Food Sci.* 22, 231–236.
- **Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Mizumachi, K. & Okamoto, T. (2003).** Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Can. J. Microbiol.* 49: 707–11.
- **Klaenhammer, TR., Barrangou, R., Buck, BL., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (3):393–409.
- **Kleerebezem M. et Hugenholtz J. (2003).** Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.*14: 232-237
- **Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O.P., Kuipers, R. Leer, R., Tarchini, S. A., Peters, H. M., Sandbrink, M. W. E. J., Fiers, W., Stiekema, R. M., Klein Lankhorst, P. A., Bron, S. M., Hoffer, M. N., Nierop Groot, R., Kerkhoven, M., de Vries, B., Ursing, W. M., de Vos, R. J., Siezen. (2003).** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1990–1995
- **Klein, G. (2001).** International Comitée of Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of Bifidobacterium. Lactobacillus and Related Organisms. Minutes of the Meeting. *Int J of Sys and Evol Microbiol.* 51: 259-261.

- **Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B.B. (2005).** Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int J of Food Microbiol.* 105: 419-431.
- **Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovcic, B., and Topisirovic, L. (2006).** Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese, *Can. J. Microbiol.* 52: 1110–1120.
- **Kok, J., Leenhouts, K.J., Haandrikman, A.J., Ledebøer, A.M., Venema. G. (1988).** Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* WG2. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 231–238.
- **König, H., Fröhlich, J. (2009).** Lactic Acid Bacteria, in: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Berlin, Heidelberg. 3–29.
- **Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B. et AJMI, D. (1994).** Mécanisme du transport des nutriments dans bactéries lactiques *In : De Roissart, H. et Luquet, F. M., Bactéries lactiques. Lorica, uriage 1 : 209-238*
- **Konings, W.N., Poolman, B., Driessen, A.J.M. & Maloney, P.C. (1989).** Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16: 419–76.
- **Kostinek, M., Pukall, R., Rooney, A.P. (2005).** *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2485–9.
- **Krieg N.R. (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity G. M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore. 721: 33 - 38.
- **Krockel, L., Schillinger, U. Franz, C.M., Bantleon, A., Ludwig, W. (2003).** *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 513–517.
- **Kubota, H., Tsuji, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Asahara, T., Nojimoto. K. (2010).** Detection of human intestinal catalase-negative Gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription–PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5440–5451.
- **Kunene, N.F., Geornaras, I., von Holy, A. & Hastings, J.W. (2000).** Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fngerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1084–92.
- **Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996).** The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 187–221.
- **Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Fryer, J.L. (1991).** *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fsh pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol* 41: 406–9.
- **Kylä-Nikkilä K, Hujanen M, Leisola M, Palva A. (2000).** Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl Environ Microbiol.* 66:3835–41.

- **Lacrampe, J.L, Weber, F.(1973).** Teneur en diacétyle de levains et caillés maigres fabriqués à partir de bactérie lactique concentrées, congelées, conservées sous azote liquide. Le lait, *INRA. Edition.* 528 : 491 – 519.
- **Lahbari, M . (2015).** Etude et simulation du sechage de l’abricot : application a quelques varietes de la region des Aures. Thèse de Doctorat en Science. universite Hadj Lakhdar Batna.
- **Lahsaoui S. (2009).** Etude de procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel algérien "KLILA". Mémoire d'ingénieur d'état en Agronomie. Université de Batna Algérie.
- **Lancefeld, R.C. (1933).** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 59: 571–95.
- **Lapierre, L., Germond, J.E., Ott, A., Delley, M., Mollet, B. (1999).** D-lactate dehydrogenase gene (ldhD) inactivation and resulting metabolic effects in the *Lactobacillus johnsonii* strains La1 and N312. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4002–7
- **Laroute, V., Tormo, H., Couderc, C., Mercier-Bonin, M., Le Bourgeois, P., Coccagn-Bousquet, M., Daveran-Mingot, M.-L. (2017).** From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms* 5: 27.
- **Laroute, V., Tormo, H., Couderc, C., Mercier-Bonin, M., Le Bourgeois, P., Coccagn-Bousquet, M., Daveran-Mingot, M.L. (2017).** From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms* 5.
- **Larpent, J.P. (1996).** les bactéries lactiques *In* : Bourgeois, C.M., Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentation alimentaire. *Tec et Doc Lavoisier.*4.
- **Lauer, E. & Kandler, O. (1980).** *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig.*, 1: 75-8.
- **Laurent, M. H., Henick-Kling, T., & Acree, T. E. (1994).** Changes in the aroma and odor of chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Viticultural and Enological Science.* 49: 3-10.
- **Laursen, B.G., Bay, L., Cleenwerck, I. (2005).** *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 151-64.
- **Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2000).** Purification and characterisation of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4084–90.
- **Laws, A., Gu, Y., Marshall, V. (2001).** Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv.* 19: 597-625
- **Le Bars, D., Yvon, M. (2008).** Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *J. Appl. Microbiol.* 104:171–177

- **Leclerc, H., Devriese, L.A. Mossel, D.A.A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: Consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 459–66.
- **Leroy, F., et De Vuyst, L., (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* 15 : 67-78.
- **Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., Juillard, V. (2002).** Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3162.
- **Levata-Jovanovic, M., Sandine, W.E., (1996).** Citrate utilization and diacetyl production by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* 79: 1928-1935.
- **Leveau, J.Y. et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 85-87.
- **Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., Wang, Q. (2012).** Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem.* 135: 1914–1919.
- **Lingyi, D., Liu, Z., Zhengqi, L., Zhihong, Z., Xueying, T., Hua, W. (2017).** Progress and Development of Exopolysaccharides of Lactobacilli. *J Dairy & Veterinary Sci.* 1(4): 555570.
- **Lolkema, J.S., Poolman, B. and Konings, W.N. (1995).** Role of scalar protons in metabolic energy generation in lactic acid bacteria. *J Bioenerg Biomembr.* 27: 467-473
- **London, J., Chace, N.M. (1976).** Aldolases of lactic-acid bacteria – demonstration of immunological relationships among 8 genera of gram-positive bacteria using an anti-pediococcal aldolase serum. *Arch. Microbiol.* 110: 121–8.
- **London, J., Chace, N.M. (1983).** Relationships among lactic-acid bacteria demonstrated with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an evolutionary probe. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 723–37.
- **Looijesteijn, P.J., Trapet, L., De vries, E., Abee, T., Hugenholtz, J. (2001)** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64:71–80
- **Lopes, M. F., Cunha, A. E., Clemente, J. J., Teixeira Carrondo, M. J., Barreto Crespo, M. T. (1999).** Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 249–254
- **Lopes, M.F.S., Leitao, A.L., Regalla, M., Marques, J.J.F., Carrondo, M.J.T., Crespo, M.T.B. (2002).** Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol.* 76: 107-115.
- **Lopez, C., Maillard, M.B., Briard-Bion, V., Camier, B., Hannon, J.A. (2006).** Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria, *J. Agric. Food Chem.* 54: 5855–5867

- **Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia-Lopez M.L. et Moreno B. (2000).** Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17: 23-32.
- **Loubière, P. et Cacaïgn-Bousquet, M. (2009).** Métabolisme des bactéries lactiques. In Drider, D. et Prévost, H., Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica*: 29-46.
- **Louveaux J, (1985) :** *Les abeilles et leur élevage*. Edition Opida. Pp : 165-181.
- **Louveaux, J. (1968):** Composition propriété et technologie du miel. Les produits de la ruche, in Traité de biologie de l'abeille. Tome 03. Ed Masson et Cie. 389.
- **Louveaux. J, Maurizio. A et Vorwohl. G, (1970),** *Les méthodes de la méliisso-palynologie*, commission internationale de botanique apicole de l'U.I.S.B. 17.
- **Lücke, F.-K. (2000).** Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science.*, 56: 105-115.
- **Ludwig, W. (2007).** Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 225–36.
- **Lund, B.M. (1965).** A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci. *J of General Microbiol.* 40: 413– 419.
- **Lyhs, U., Bjorkroth, J., Korkeala, H. (1999).** Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 52 : 77–84.
- **Lynch, K.M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E.K., (2018).** Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9: 155–176.
- **Macedo, A.C., Tavares, T.G., Malcata, F.X (2003).** Esterase activities of intracellular extracts of wild strains of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *Food chemistry.* 81 :379–381.
- **Magni C, de Mendoza. D., Konings W.N., Lolkema J.S. (1999).** Mechanism of Citrate Metabolism in *Lactococcus lactis*: Résistance against Lactate Toxicity at Low pH. *J of Bacteriol.* 181(5): 1451-1457.
- **Magni, C., de Mendoza, D., Konings, W.N. Lolkema, J.S. (1999).** Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH. *J Bacteriol.* 181: 1451–1457
- **Magni, C., Lopez de Felipe, F., Sesma P., Lopez P., de Mendoza D. (1994).** Citrate transport in *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* : expression of the plasmid borne citrate permease. P. *FEMS Microbiology Letters.* 118:75-82
- **Magni, C., Lôpez, P., de Mendoza, D. (1996).** The properties of citrate transport catalyzed by CitP of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *FEMS Microbiol Lett* 142:265-269.
- **Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y. (2006).** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS.* 103: 15611–16

- **Makhlouf, A. (2006).** Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : Application à la production bactérienne d'arômes laitiers. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine.
- **Makhloufi, K.M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, France.
- **Malang, S.K., Maina, N.H., Schwab, C., Tenkanen, M., Lacroix, C. (2015).** Characterization of exopolysaccharide and ropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food Microbiol.* 46:418–27
- **Mancini, A., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M. (2012).** Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA<sup>A</sup>Ala–23S rDNA-RFLP. *J Microbiol Methods.* 91(3): 380–390.
- **Manero, A., Blanch, A.R. (2002).** Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridization with 16S rDNA probes. *J. Microbiol. Methods.* 50: 115–121.
- **Manero, A., Blanch, A. (1999).** Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10), 4425–4430.
- **Mann, M., Hojrup, P., Roepstorff, P. (1993).** Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass. Spectrom.* 22:338–45
- **Mannu, L., Comunian, R., et Scintu, M.F. (2000).** Mesophilic lactobacilli in Flore Sardo Cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *Int Dairy J.* 10: 383–389.
- **Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C., Holzapfel, W.H. (2008).** Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr. Microbiol.* 56 : 315–321.
- **Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Holzapfel, W.H. (2004).** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94 : 269–278.
- **Marilley, L., Casey, M.G. (2004).** Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International J of Food Microbiol.* 90: 139–159.
- **Marroki, A., Zúñiga, M., Kihal, M., Pérez-Martínez, G., (2011).** Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. *Brazilian J Microbiol.* 42, 158–171.
- **Marshall, V.M.E., et Law, B.A. (1984).** The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, éd. Elsevier Appl Sci Publish. 1: 67–98.
- **Martin M. G., Sender P. D., Peirù S., de Mendoza D., Magni C. (2004).** Acid-Inducible Transcription of the Operon Encoding the Citrate Lyase Complex of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* CRL264. *J Bacteriol.* 186(17):5649–5660.

- **Martin N., Savonitto S., Molimard P., Berger C, Brousse M., Spinnler H. E. (1999).** Flavor génération in cheese curd by coculturing with selected yeast, molds and bacteria. *J Dairy Sci*, 82:1072-1080.
- **Martin, M. G., Magni, C, Lôpez, P., de Mendoza, D. (2000).** Transcriptional Control of the Citrate-Inducible *citYMCDEFGRP* Operon, Encoding Genes Involved in Citrate Fermentation in *Leuconostoc parameseneroides*. *J Bacteriol.* 182(14):3904-3912.
- **Martin, M., Corrales, M.A., de Mendoza, D., Lôpez, P., Magni, C. (1999).** Cloning and molecular characterization of the citrate utilization *citMCDEFGRP* cluster of *Leuconostoc paramesenteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 231–238.
- **Martin, M., Corrales, M.A., de Mendoza, D., Lôpez, P., Magni, C. (1999).** Cloning and molecular characterization of the citrate utilization *citMCDEFGRP* cluster of *Leuconostoc paramesenteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 231–238.
- **Martin, M., Magni, C., de Mendoza, D., Lopez, P. (2005).** CitI, a transcription factor involved in regulation of citrate metabolism in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 187: 5146–5155
- **Martin, M., Magni, C., Lopez, P., de Mendoza, D. (2000).** Transcriptional control of the citrate-inducible *citMCDEFGRP* operon, encoding genes involved in citrate fermentation in *Leuconostoc paramesenteroides*. *J. Bacteriol.* 182: 3904–3912.
- **Martin, M., Magni, C., Lopez, P., de Mendoza, D., (2000).** Transcriptional control of the citrate-inducible *citMCDEFGRP* operon, encoding genes involved in citrate fermentation in *Leuconostoc paramesenteroides*. *J. Bacteriol.* 182: 3904–3912.
- **Martin, M.G., Sender, P.D., Peiru, S., de Mendoza, D., Magni, C. (2004).** Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* CRL264. *J Bacteriol* 186, 5649-5660.
- **Martinez-Moreno, J.L. (1976).** Microbial flora of Manchego cheese: III. Streptococci. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie General* 4: 41–56.
- **Martinez-Murcia, A.J., Collins, M.D. (1991).** *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 80: 69-74.
- **Martino, M.E., Bayjanov, J.R., Caffrey, B.E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S.A.F.T., Leulier, F. (2016).** Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Envir. Microbiol.* 18: 4974–4989.
- **Martiny, D., Busson, L., Wybo, I., El Haj; R.A., Dediste, A., Vandenberg, O. (2012).** Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50(4):1313-1325.
- **Marty-Teyssset, C., Lolkema, J.S., Schmitt, P., Diviès, C. & Konings, W.N. (1995).** Membrane potential generating transport of citrate and malate catalysed by CitP of *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.* 270 : 25370-25376.

- **Marty-Teyssset, C., Posthuma, C., Lolkema, J. S., Schmitt, P., Divies, C., Konings, W. N. (1996).** Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 178: 2178–2185
- **Matar, C., Valdez, J.C., Medina, M., Rachid, M., Perdigon, G. (2001).** Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J. Dairy Res.* 68 (4): 601–609.
- **Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K. et Holzapfel, W.H. (2004).** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *kulenaoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 269-278.
- **Mathot, A. (1992).** Caractérisation des bactéries du genre *Leuconostoc* et mise en œuvre de cultures mixtes représentatives Lactocoques-*Leuconostocs* pour la fabrication d'un caillé modèle de type fromage frais Thèse de Doctorat Université de Bourgogne, Dijon
- **Mayeux J.V., Sandine W.E, Alliker P.R (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures, *J. Dairy Sci.*45: 655-656.
- **Mäyrä-Mäkinen, A., Bigret, M. (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102
- **Mazahreh, A.S., AL-shawabkeh, F. et Quasem, JM., (2008).** Evaluation of the chemical and sensory attributes of solar and freeze-dried jameed produced from and sheep milk with the addition of carageenan mix to the jameed paste. *American j of agricul and biological sci.* 3 (3): 627- 632.
- **Mc Garry, A., Law, J., Coffey, A., Daly, C., Fox, P.F., Fitzgerald, G.F. (1994).** Effect of genetically modifying the lactococcal proteolytic system on ripening and flavor development in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4226–4233.
- **Mc Sweeney, P. L. H. (2004).** Biochemistry of cheese ripening. *Int J of Dairy Technol.* 57: 127-144.
- **McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening. *Le Lait.* 80:293–324.
- **McSweeney, P. L. H., Walsh, E. M., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D., Castelo-Gonzalez, M. (1994).** A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Ir. J. Agric. Food Res.* 33:183–192.
- **McSweeney, P.L.H. (2007).** Cheese manufacture and ripening and their influence of cheese flavour. Weimer [ed.]. Improving the Flavour of Cheese. CRC Press, Cambridge, England. 1–25.
- **McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (2017).** Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier Science.
- **Mechai, A. (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et

biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar- Annaba, Algérie.

- **Mechai, A., Debabza, M., Kirane, D. (2014).** Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *Inter Food Res J.* 21(6): 2451-2457.
- **Medina de Figueroa, R.B., Alvarez, F., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. & Sesma, F. (2000).** Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiol. Res.* 154: 313-320.
- **Medina de Figueroa, R.B., Oliver, G. & Benito de Cadenas, I.L. (2001).** Influence of temperature on flavor compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Microbiol. Res.* 155: 257-262.
- **Mellerick D., Cogan. T. M. (1981).** Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. *J Dairy Res.* 48:497-502.
- **Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T. (2008).** Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1946–54.
- **Menad, N. (2017).** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse de Doctorat en science. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
- **Mende, S., Rohm, H., Jaros, D. (2016).** Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *Int. Dairy. J.* 52:57–71
- **Mensah, P., Tomkins, A.M., Drasar, B.S., Harrison, T.J. (1991).** Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 203–10.
- **Merzouk, Y, Chahrour, W., Zarour, K., Kihel, M. (2013).** Physico chemical and Microbiological Analysis of Algerian raw camel's milk and identification of predominating thermophilic Lactic Acid Bacteria. *J Food sci Engin.* 3 : 55-63.
- **Messens, W., Neysens, P., Vansielegem, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L. (2002).** Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 1431–1435.
- **Meucci, A., Zago, M., Rossetti, L., Fornasari, M. E., Bonvini, B., Tidona, F., Povo, M., Contarini, G., Carminati, D. and Giraffa, G. (2015).** *Lactococcus hircilactis* sp. nov. and *Lactococcus laudensis* sp. nov., isolated from milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 : 2091-2096.
- **Meziane, M. (2008).** Production en continu de l'acide lactique et du diacétyle par *Lactococcus lactis* ssp immobilisée sur pouzzolane dans un bioréacteur à lit fixe. Mémoire de Magister. Université Hassiba Ben Bouali Chlef.

- **Midje, D.L., Bastian, E.D., Morris, H.A., Martin, F.B., Bridgeman, T., Vickers, Z.M. (2000).** Flavour enhancement of reduced fat cheddar cheese using an integrated culturing system. *J Agri Food Chemistry* 48: 1630-1636
- **Mills, S., McAuliffe, O.E., Coffey, A. (2006).** Plasmids of lactococci—genetic accessories or genetic necessities. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 243–273.
- **Mokhtari, S. (2012).** Mémoire de Magister : Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté type hamoum. Université El Senia (Oran, Algérie).
- **Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F.H., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M.(2005).** Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J Bacteriol.* 187: 6119–6127.
- **Molimard, P., Le Quere, J.L., Spinnler, H.E. (1997).** Rôle des lipides dans la perception olfactive des produits laitiers. *Int j food sci tech*, 30: 105-121.
- **Molimard, P., Spinnler, H. E. (1996).** Review: Compounds involved in the flavor of surface mold ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science.* 79: 169-184.
- **Monnet, C., Schmitt, P., Diviès, C. (1997).** Development and use of a screening procedure for production of  $\beta$ -acetolactate by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* strains. *Appl Environ Microbiol* 63:793, 1997.
- **Monnet, V., Latrille, E., Beal, C. et Corrieu, G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 512-592.
- **Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R., Remaud-Simeson, M. (2001).** Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 11:675–685
- **Montville, T.J., A.H.M. Hsu and M.E. Meyer. (1987).** Highefficiency of pyruvate to acetoin by *Lactohacillus plantarum* during pH-controlled and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1798-1802
- **Montville, T.J., M.E. Meyer., A.M.H. Hsu. (1987).** Influence of carbon substrate on lactic acid, cell mass and diacetylacetoin production in *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Protect.* 50: 42-46
- **Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. (2006).** Technological and molecular characterisation of Enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int Dairy J.* 16: 867–875.
- **Morandi, S., Cremonesi, P., Povoio, M., Brasca, M. (2012).** *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1992-1996.
- **Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P.S., (1999).** Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *J. Appl. Microbiol.* 87: 574– 582.
- **Moreno, M.R.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.

- **Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Mauriello, G., Villani, F. & Coppola, S. (1997).** Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and determination of the number and forms of *rrn* operons in *L. delbrueckii* and its subspecies. *Res. Microbiol.* 148: 501–10.
- **Mtshali, P. S., Divol, B., & du Toit, M. (2012).** Identification and characterization of *Lactobacillus* florum strains isolated from South African grape and wine samples. *Int J Food Microbiol.* 153(1): 106–113.
- **Mtshali, P. S., Divol, B., van Rensburg, P., du Toit, M. (2010).** Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. *J of Appl Microbiol.* 108(4): 1389–1397.
- **Mucchetti G, Neviani E, Todesco R, Lodi R (1982).** Ruolo degli enterococchi nei forrnaggi italiani. I1-Attivita caseinolitica e lipolitica. *Latte.* 7: 821–831.
- **Müller, M.R.A., Ehrmann, M.A. & Vogel, R.F. (2000).** *Lactobacillus frumenti* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from rye-bran fermentations with a long fermentation period. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2127–33.
- **Mulyowidarso, R., Fleet, H., & Buckle, K. (1990).** Association of bacteria with the fungal fermentation of soybean tempe. *J. Appl. Bacteriol.*, 68: 43-47.
- **Nanasombat, S., Treebavonkusol, P., Kittisrisopit, S., Jaichalad, T., Phunpruch, S., Kootmas, A., Nualsri, I. (2017).** Lactic acid bacteria isolated from raw and fermented pork products: Identification and characterization of catalase-producing *Pediococcus pentosaceus*. *Food Sci Biotechnol* 26: 173–179.
- **Narayanan, N., P. Roychoudhury, and A. Srivastava. (2004).** L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* 7:167–179.
- **Nardi, M., Fiez-Vandal, C., Tailliez, P., Monnet, V. (2002).** The EstA esterase is responsible for the main capacity of *Lactococcus lactis* to synthesize short chain fatty acid esters in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 93: 994–1002.
- **Navarro, L., Zarazaga, M., Saenz, J., Ruiz-Larrea, F., et Torres, C. (2000).** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88: 4
- **Navarro-González, I., A. Sánchez-Ferrer, and F. García-Carmona. (2013).** Overexpression, purification, and biochemical characterization of the esterase Est0796 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Mol. Biotechnol.* 54:651–660.
- **Nielsen, J.C., & Richelieu, M. (1999).** Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 740–745.
- **Niemi, R.M., Ollinkangas, T., Paulin, L. et al. (2012).** *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2169–73.
- **Nikkilä, K.K., Hujanen, M., Leisola, M. & Palva, A.A. (2000).** Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3835–41.

- **Niven, G.W., Knight, D.J., Mulholland, F. (1998).** Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of *Lactococcus lactis* indicate biphasic nitrogen metabolism. *J. Dairy Res.* 65: 101–107.
- **Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T. (2006).** Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J of Appl Microbiol.* 101: 396–405.
- **Novel, (1993).** Les bactéries lactiques, JY Leveau et M. Bouix, Microbiologie industrielle, Les micro-organismes d'intérêt industriel, Paris: Tec et Doc Lavoisier. 170- 374.
- **Oberg, C.J., Broadbent, J.R., Strickland, M., McMahon, D.J. (2002).** Diversity in specificity of the extracellular proteinases in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34 (6): 455–460.
- **Oberman, H., Piatkiewia, A., & Libudzisz, L. (1982).** Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *Nahrung.* 26: 615-623.
- **Ohara, H. (2003).** Biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 474-477.
- **Okano, K., Yoshida, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2009).** Homo-D-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 75:5175–8.
- **Oleksy, M., Klewicka, E. (2016).** Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. biosynthesis and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 58(3):450-462.
- **Olguín, N., Bordons, A., Reguant, C. (2009).** Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 26: 197-203.
- **Oneca, M., Ortigosa, M., Irigoyen, A., Torre, P. (2007).** Proteolytic activity of some *Lactobacillus paracasei* strains in a model ovine-milk curd system: Determination of free amino acids by RP-HPLC. *Food Chem.* 100 (4): 1602–1610
- **Oscar, A., Anunziat, A., Liliana, B., Pierella, A., Costa, M.G., Beltramone, A.R. (2001).** Studies on the synthesis of diacetyl over oxidation zeolite catalysts. Centro de Investigacion y Tecnologia Quimica, Facultad Cordoba, Universidad Tecnologica Nacional, CC36, Suc 16 (5016), Cordoba, Argentina.
- **Oterholm, A., Ordal, Z. J., Witter, L. D. (1968).** Glycerol ester hydrolase activity of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.* 16:524-527.
- **Oterholm, A., Witter, L. D. Ordal, Z. J. (1967).** Glycerol ester hydrolase activity of some lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 50:954
- **Oterholm, A., Witter, L. D. Ordal, Z. J. (1972).** Purification and properties of an acetyl ester hydrolase (acetylesterase) from *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 55:8–13.
- **Ott, A. (1999).** Investigation of the aroma compounds in yogurt and their formation. Thèse de Doctorat. 2cole polytechnique fédérale de Lausanne. Université de Zurich.
- **Ott, E.M., Müller, T., Müller, M. (2001).** Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *J. Appl. Microbiol.* 91: 54–66

- **Oyewole, O.B. (1997).** Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control* 8: 289–297
- **Palles, T., Beresford, T., Condon, S. & Cogan, T. (1998).** Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 147-154.
- **Papagianni, M., Avramidis, N. (2011).** *Lactococcus lactis* as a cell factory: a twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. *Enzyme Microb. Technol.* 49: 197–202.
- **Pappin, DD., Hojrup, J.P., Bleasby, A.J. (1993).** Rapid identification of proteins by peptide-mass finger printing. *Curr Biol.* 3:327–32
- **Parente, E., Cogan, T. M. (2004).** Starter cultures: General aspects. Pages 123–147 in *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. 3ème ed.
- **Passos, F. V., Fleming, H. P., Ollis, D. F., Felder, R. M., & McFeeters, R. F. (1994).** Kinetics and modelling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl and Envir Microbiol.* 60: 2627-2636.
- **Pastink, M.I., Sieuwerts, S., de Bok, F.A.M. (2008).** Genomics and high throughput screening approaches for optimal flavour production in dairy fermentation. *Int. Dairy J.* 18: 781–9.
- **Pastink, M.I., Sieuwerts, S., de Bok, F.A.M. (2008).** Genomics and high throughput screening approaches for optimal flavour production in dairy fermentation. *Int. Dairy J.* 18: 781–9.
- **Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology, Notermans Special Issue 79*, 3–16.
- **Peérez, G., Cardell, E. and Za´rate, V. (2003).** Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Int J Food Sci Technol.* 38: 537–546
- **Pereira, C.I., Crespo, M.T.B., Romao, M.V.S. (2001).** Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int. J. Food Microbiol.* 68 (3): 211–216.
- **Pérez, T., Balcázar, J.L., Peix, A., Valverde, A., Velázquez, E., De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, I. (2011).** *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1894-1898.
- **Pescuma, M., Hebert, E.M., Rabesona, H., Drouet, M., Choiset, Y., Haertle, T., Mozzi, F., de Valdez, G. F., J.M. Chobert. (2011).** Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine beta-lactoglobulin. *Food Chem.* 127 (2): 487–492.
- **Petit, C., Vilchez, F., Marczak, R. (1989).** Influence of citrate on the diacetyl and acetoin production by fully grown cells of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Curr Microbiol.* 19:319–327
- **Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R. (2007).** The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 15(12):546–53.

- **Piraino, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Zotta, T. & Parente, E. (2006).** Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of SDS-PAGE patterns of whole cell proteins. *J. Microbiol. Meth.* 66: 336–46.
- **Poquet, I., Bolotin, A., 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. *Lait* 81 : 37–47.
- **Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.* Lavoisier. Paris, France. 1–152.
- **Pot, B., Felis, G.E., Bruyne, K.D., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., Vandamme, P. (2014).** The genus *Lactobacillus*, in: *Lactic Acid Bacteria.* Wiley-Blackwell. 249–353.
- **Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K. & Schleifer, K.H. (1993).** Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 139: 513–17.
- **Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Schleifer, K.-H. (1994).** Taxonomy of lactic acid bacteria. In De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria; Microbiology, genetics and applications.* London, UK: Chapman and Hall. 13–90.
- **Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. (1997).** Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2355-2360
- **Pringsulaka, O., Thonggam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul K., Rangsiruji A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: 547-551.
- **Psoni L, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E. (2003).** Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek chees from raw goat’s milk. *Food Microbiol.* 20: 575-82.
- **Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006).** Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int J Food Microbiol* 109:109–120
- **Puniya, A.K., (2015).** *Fermented Milk and Dairy Products.* CRC Press.
- **Ramakrishnan, V., Balakrishnan, B., Rai, A.K., Narayan, B., Halami, P.M. (2012).** Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *Int Aquat Res* 4 14.
- **Ramos, A., B. Poolman, H. Santos, J. S. Lolkema., W. N. Konings. (1994).** Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* 176: 4899–4905.

- **Ramos, A., Lolkema, J.S., Konings, W.N. & Santos, H. (1995).** Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1303-1310.
- **Ramos, A., Santos, H., (1996).** Citrate and sugar co-fermentation in *Leuconostoc oenos*, a <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2577-2585.
- **Rasouli Pirouzian, H., Hesari, J., Farajnia, S., Moghaddam, M., Ghiassifar, S., Manafi, M. (2010).** Inclusion of *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* to UF White Cheese World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering. 4:6.
- **Rea, M. C., and T. M. Cogan. (2003a).** Glucose prevents citrate metabolism by enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 88:201–206
- **Rea, M. C., and T. M. Cogan. (2003b).** Catabolite repression in *Enterococcus faecalis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:159–164.
- **Repizo, G.D., Mortera, P., Magni, C. (2011).** Disruption of the alsSD operon of *Enterococcus faecalis* impairs growth on pyruvate at low pH. *Microbiol.* 157: 2708–2719.
- **Requena, T., Pelaez, C. and Desmazeaud, M.J. (1991).** Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semihard goat's cheese. *J Dairy Res* 58, 137–145.
- **Reuter, G. (1970).** Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillen-Stämme. *Fleischwirtschaft.* 50 : 954 – 962.
- **Ricciardi, A., Parente, E., Piraino, P., Paraggio, M. & Romano, P. (2005).** Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *Int. J. Food Microbiol.* 98: 63–72.
- **Rodas AM, Chenoll E, Macián MC, Ferrer S, Pardo I, Aznar R (2006).** *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *I J System Evol Microbiol.* 56:513–517.
- **Rodas, A.M., Ferrer, S. & Pardo, I. (2003).** 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 412-22.
- **Romeo, Y., Bouvier, J., Gutierrez, C. (2001).** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (mini-revue). *Le Lait* 81 : 49–55.
- **Rondags E, Halliday and Marc I. (1998).** Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* bv. diacetylactis: study of  $\alpha$ -acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis. *Appl Biochem Biotechnol.* 69: 113-125.
- **Roos, S., L. Engstrand and H. Jonsson. (2005).** *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 77–82.

- **Rossant, A. (2011).** Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Limoges. France.
- **Rossetti, L. & Giraffa, G. (2005).** Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Meth.* 63: 135–44.
- **Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, N.-E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest algérien. *Euro J Sci Res.* 34(2): 218-227.
- **Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J.M. and Decaris, B. (1993).** Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Møcquot). *J. Appl. Bacteriol.* 74:549-556.
- **Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 12: 163 – 171.
- **Ruoff, K.L. (1988).** *Streptococcus anginosus* (“*Streptococcus milleri*”): Teunrecognized pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 102–108.
- **Russell, J. B., Diez-Gonzalez, F. (1998).** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microbial Physiol* 39: 205–234.
- **Sadi, F., Dilmi Bouras, A., Ghomari, F. N., Hallouz, F. (2016).** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, local proteolytic strains evaluated for their probiotic potential. *Der Pharmacia Lettre.* 8 (19):183-190.
- **Sakala, R. m., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C., Ogawa, M. (2002).** Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *J of Appl Microbiol.* 92: 173–179.
- **Salama, M.S., Musafija-Jeknic, T., Sandine, W.E., Giovannoni, S.J. (1995).** An Ecological Study of Lactic Acid Bacteria: Isolation of New Strains of *Lactococcus* Including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*1. *J of Dairy Sci.* 78: 1004–1017.
- **Salazar, N., Gueimonde, M., Reyes-Gavilán, C.G., de los, Ruas-Madiedo, P. (2016).** Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Crit Rev in Food Sci and Nut.* 56 :1440–1453.
- **Salazar, N., Prieto, A., Leal, J.A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J.C., de los, Reyes-Gavilán, Ruas-Madiedo P. (2009).** Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J Dairy Sci.* 9: 4158 – 4168.
- **Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc., U.S.A.*
- **Salou, P., P. Loubiere, and A. Pareilleux. (1994).** Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1459–1466
- **Salvetti E, Torriani S, Felis GE. (2012).** The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 4(4):217–26.

- **Sanalibaba, P, Çakmak, G.A (2016).** Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl Microbiol*: 2 :1-5.
- **Sanders, M.E. (1994).** Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: Goldberg, I. (ed.), *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods and Nutraceuticals*. London: Chapman & Hall. 294–322.
- **Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D. (2001).** Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance,” *Int Dairy J.* 11: 621–647.
- **Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., (2001).** Biochemical properties of Enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11: 621– 647.
- **Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2001)** Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Appl Env Microbiol.* 67:5482–5487
- **Sarantinopoulos, P., L. Makras, F. Vaningelgem, G. Kalantzopoulos, L. De Vuyst, E. Tsakalidou. (2003).** Growth and energy generation by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 during citrate metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 84:197–206
- **Sarkar, P.K., Hasenack, B. Nout, M.J.R. (2002).** Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soya bean (Indian *kinema*) and locust bean (African *soumbala*). *Int J Food Microbiol* 77: 175–186.
- **Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C.K., Marx, H. (2017).** The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in Biotechnology* 35: 756–769.
- **Savijoki, K., H. Ingmer and P. Varmanen. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 394–406.
- **Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., De Vuyst, L., Vandamme, P. & Huys, G. (2009).** Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1081–92.
- **Schlegel, L., F. Grimont, M.D. Collins et al. (2000).** *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1425–1434.
- **Schleifer, K., Ludwig, W. (1995).** Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood B, Holzappel W, editors. *The genera of lactic acid bacteria*. London: Blackie Academic & Professional. 7–18.
- **Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., 1995.** Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal, Int Dairy Lactic Acid Bacteria Conference* 5: 1081–1094.
- **Schleifer, K.H., J. Kraus, C. Dvorac, R. Kilpper-Bälz, M.D. Collins and W. Fisher. (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen nov. *System. Appl. Microbiol.* 6: 183–195.



- **Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (1983).** Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 143–87
- **Schmidt, J.L, Tourneur, C., et Lenoir, J. (1994).** Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologie laitière, « Bactéries lactiques », Vol 1, Ed Coord. Lorica : 231-240.
- **Schmitt, P., Couvreur, C., Cavin, J. F., Prévost, H., & Diviès, C.(1988).**Citrate utilisation by free and immobilised *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis in continuous culture. *ADPI. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 430-436.
- **Schmitt, P., Divies, C. (1991).** Co-metabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *J. Ferment. Bioeng.* 71:72.
- **Schütz, H., Radler, F. (1984a).** Propanediol-1,2-dehydratase and metabolism of glycerol of *Lactobacillus brevis*. *Arch Microbiol.* 139:366–370
- **Schütz, H., Radler, F. (1984b).** Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *L. brevis* and *L. buchneri*. *Syst Appl Microbiol.* 5:169–178
- **Schwab, C., Walter, J., Tannock, G.W., Vogel, R.F., Ganzle, M.G. (2007).** Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:433–43.
- **Sedláček, I., Holochová, P., Mašlanová, I. (2013).** *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two ureaseproducing enterococci from the environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 502–10.
- **Sender, P.D., Martin, M.G., Peiru, S., Magni, C. (2004).**Characterization of an oxaloacetate decarboxylase that belongs to the malic enzyme family. *FEBS Lett* 570: 217–222.
- **Sergent, N. (1998).** Parfums et Arômes : Industrie et Synthèse. Rapport de Projet Dunkerque.
- **Seseña, S., Sánchez, I., Palop, L. (2005).** Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 325-335.
- **Shaker R.R., Jumah R.Y., Tashtoush B., et Zraiy A.F.,(1999).** Manufacture of Jameed using a spray drying process, a preliminary study. *Int J of dairy technol.* 52(3): 77-80.
- **Sharpe, M. (1979).** Identification of the lactic acid bacteria. In *Identification Methods for Microbiologists*. pp. 233-259. F. Skinner. Lovelock D W. London: Academic Press
- **Siezen, R.J. (1999).** Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 139–155.
- **Siezen, R.J., Bayjanov, J., Renckens, B. (2010a).** Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. *J. Bacteriol.* 192: 2649–50.
- **Siezen, R.J., van Enkevort, F.H.J., Kleerebezem, M. & Teusink, B. (2004).** Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 105–15.

- **Siezen, R.J., Tzeneva, V.A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H.T.K., Rademaker, J.L.W. (2010b)** Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ Microbiol* 12: 758–773.
- **Simonds, J., Hansenn, P. A., Lakshmanan, S. (1971).** Deoxyribonucleic acid hybridization among strains of lactobacilli. 1. *Bact.*, 107: 382-4.
- **Singh, S. Ahmed, S. et Pandey, A. (2006).** Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* 41: 991-1000.
- **Singh, O.V, Nagaraj, N.S. (2006).** Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 4:355–62.
- **Sistek, V., Maheux, A.F., Boissinot, M. (2012).** *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1314–20.
- **Skeie, S., A. Kieronczyk, S. Eidet, M. Reitan, K. Olsen, and H. Østlie. (2008b).** Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagines and aspartate in a washed-curd cheese. *Int. Dairy J.* 18: 169–177
- **Skeie, S., Kieronczyk, A. Næss, R. M., Østlie, H. (2008a).** *Lactobacillus* adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *Int. Dairy J.* 18:158–168.
- **Skeie, S., Kieronczyk, A., Næss, R. M., & Østlie, H. (2007).** *Lactobacillus* adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese, *Int Dairy J*, in press
- **Skinner, G.E., H.M. Solomon and G.A. Fingerhut. (1999).** Prevention of *Clostridium botulinum* type A, proteolytic B and E toxin formation in refrigerated pea soup by *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014. *J. Food Sci.* 64 (4): 724–727.
- **Snoep, J.L., Teixeira de Mattos, M.J., Starrenburg, M.J., Hugenholtz, J. (1992).** Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* bv. *diacetylactis*. *J Bacteriology* 174:4838–4841
- **Snowdon J. A., Cliver D. O. (1996).** Microorganisms in honey. *Int j Microbiol.* 31: 1-26.
- **Sobczak, I., Lolkema, J.S. (2005).** The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 665–695
- **Sonar, N.R., Halami, P.M. (2014).** Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India. *J Food Sci Technol* 51: 4143–4148.
- **Soomro, A.H., Masud, T. et Anwaar, K. 2002.** Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health– A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1: 20-24.
- **Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11: 327–345.

- **Speckman, R.A. et Collins, E.B. (1968).** Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J Bacteriol*, 1, 174-180.
- **Speckman, R.A., Collins, E.B. (1982).** Specificity of the Westerland adaptation of the Voges–Proskauer test. *Appl Envir Microbiol* 44: 40–43.
- **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043–7.
- **Starrenburg M.J., Hugenholtz. J. (1991).** Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl and Envir Microbiol.* 57(12): 3535-3540.
- **Steele, J. (1995).** Contribution of lactic acid bacteria to cheese ripening. In: Malin, E.L., Tunick, M.H. (Eds.), *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. Plenum Press, New York. 209–220.
- **Steidler, L., Rottiers, P. & Coulie, B. (2009).** Actobiotics as a novel method for cytokine delivery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1182: 135–45.
- **Steinkraus, K.H. (1995).** *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- **St-Gelais, D., Lessard, J., Champagne, C.P., et Vuilleumard, J.-C. (2009).** Production of fresh Cheddar cheese curds with controlled postacidification and enhanced flavor. *J of Dairy Science.* 92(5): 1856-1863.
- **Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.
- **Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W.P. & Vogel, R.F. (1995).** Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201: 91–6.
- **Stolz, P., Böcker, G., Vogel, R.F. Hammes, W.P. (1993).** Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 237–42.
- **Strompfová, V. & Lauková, A. (2009).** Enterococci from piglets – probiotic properties and responsiveness to natural antibacterial substances. *Folia Microbiol.* 54: 538–44.
- **Suzuki, C., Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K. & Mizumachi, K. (2008)** Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus* strains on the murine macrophage cell line J774.1. *Int. J. Food Microbiol.* **123**: 159–65.
- **Suzuki, C., Kobayashi, M., Kimoto-Nira, H. (2013).** Novel exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and the diversity of *epsE* genes in the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:2013–18
- **Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M. & Yamashita, H. (2004).** *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 115–17
- **Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T. (2000)** A survey of the Enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto caprino). *J Appl Microbiol.* 89:267–274

- Švec, P., Devriese, L.A., Sedláček, I. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1567–74.
- Švec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L.A. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2183–7.
- Švec, P., Vandamme, P., Bryndová, H. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1499–505.
- Swaisgood, H. E. (2010). Características do leite. *Química de alimentos de fennema*, 689–758.
- Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, Renault P, Ehrlich SD, Gasson MJ. (1996). Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 62:2641.
- Swindell, S.R., Benson, K.H., Griffin, H.G., Renault, P., Ehrlich, S.D., Gasson, M.J. (1996). Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2641–2643.
- Takahashi, T., Nakakita, Y., Sugiyama, H., Shigyo, T., Shinotsuka, K. (1999). Classification and identification of strains of *Lactobacillus brevis* based on electrophoretic characterization of d-lactate dehydrogenase: Relationship between d-lactate dehydrogenase and beer-spoilage ability. *J of Biosci and Bioengineer.* 88: 500–506.
- Tallon, R.; Bressollier, P.; Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* 154: 705–712.
- Tamang, J.P. (2010). Diversity of fermented foods. *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press, Boca Raton. 41–84.
- Tamime, A.Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications-a review. *Eur J Clin Nutr.* 56(4):1–15.
- Tamime, A.Y. (2002). Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3<sup>ème</sup> Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- Tamime, A.Y. Deeth, H.C. (1980). Yogurt: Technology and biochemistry. *J. Food Protect.* 43: 939–977.
- Tanaka, K., Komiyama, A., Sonomoto K., Ishizaki, A., Hall, S.J., Stanbury, P.F. (2002). Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:160–7
- Tanigawa, K., Kawabata, H., Watanabe, K. (2010). Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 76: 4055-62
- Tavaría, F.K., Malcata, F.X. (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d’Origine Protégée region. *J Food Protec* 61: 601– 607.

- **Temmerman, R. (2003).** Culture-dependent and Culture-independent Microbial Analysis of Probiotics. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- **Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J. (2004).** Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci. Tech.* **15**: 348–359
- **Terzic, V.A, Mihajlovic, S., Uzelag, G., Golic, N., Fira, D., Kojic, M., Topisirovic, L.J. (2014).** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golija cow's milk cheeses. *Arch. Biol. Sci. Belgrade.* 66:10.2298.
- **Teuber, M. (2000).** Fermented Milk Products. In Lund, Baird-Parker and Gould. *The Microbiological Safety and Quality of Food, Vol. I.* Aspen Publishers, Gaithersburg. 535–589.
- **Teuber, M. (2015).** *Lactococcus*, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. *American Cancer Society.* 1–21.
- **Teuber, M., Geis, A. (2006).** The Genus *Lactococcus*, in: Dr, M.D.P., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes.* Springer US. 205–228.
- **Thage, B. V., Broe, M. L. Petersen, M. H. Petersen, M. A. Bennedsen, M. Ardö, Y. (2005).** Aroma development in semi-hard reducedfat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. *Int. Dairy J.* 15:795–805
- **Thierry, F., Schanck, N.A., Hugenholtz, J., Hols, P., de Vos, M.W., Delcour, J. (1998).** Redistribution métabolique chez une souche de *Lactobacillus plantarum* déficiente en lactate deshydrogénase. *Le Lait*, INRA Editions, 78 (1) :107-116.
- **Thompson, J. et Gentry-Weeks, C.R. (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : De Roissart H. et Luquet F.M., *Bactéries lactiques. Lorica, Uriage.* 1 : 239-290.
- **Tobiassen, R.O., L. Stepaniak, T. Sorhaug. (1997).** Screening for differences in the proteolytic systems of *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Res. Technol.* 204 (4): 273–278.
- **Todorov, S.D., Wachsmann, M.B., Knoetze, H., Meincken, M., Dicks, L.M.T. (2005).** An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25 : 508–513.
- **Toptaş, Y., Akça, G., Çabuk, A. (2014).** Lactic Acid Production by *Lactobacillus brevis* Isolated from Oral Microbiota. *IUFS Journal of Biology.* 73: 1–7.
- **Topisirovic, L., Veljovic, K., Terzic Vidojevic, A., Strahinic, I., et Kojic, M. (2007).** Comparative analysis of antimicrobial and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Genetika* 39 : 125–138.
- **Torino, M.I., Mozzi, F., Sesma, F., Font de Valdez, G. (2000).** Effect of stirring growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. *Milchwissenschaft* 55: 204-206.

- **Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., Kersters, K. (2001).** Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPDPCR and AFLP. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:554-560
- **Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. (1999).** Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4351–6
- **Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., and Kersters, K. (2001).** Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst Appl Microbiol* 24: 554–560.
- **Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B. & Novak, S. (2010).** Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T in batch process. *Food. Technol. Biotechnol.* 48: 352-361.
- **Tsakalidou, E., Dalezios, I., Kalantzopoulos, G. (1994).** Isolation and partial characterization of an intracellular esterase from *Enterococcus faecium* ACA-DC 237. *J of Biotechnol.* 37: 201– 208
- **Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (1992).** Purification and partial characterization of an esterase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strain ACA-DC 127. *Le Lait.* 72:533–543.
- **Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabarakis, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G. (1994).** The combined use of whole cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Syst Appl Microbiol.* 17: 444–458.
- **Tsau, J.L., Guffanti, A.A. & Montville, T.J. (1992).** Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 891-894.
- **Ugrinovits M., Arrigoni E., Dossenbach A., Haberli G., Hanich H., Rychener M., Thorman M. et Stalder U. (2004).** Céréales, produits de l'industrie meunière, prémélanges pour mélange de farine, farines instantanées. manuel suisse des denrées alimentaires. 1-15.
- **Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J.R., Holzapfel, W.H. (1992).** Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *Int J of Food Microbiol.* 16: 141–151.
- **Upadhyay, V.H., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Fox, P.F. (2004).** Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol. 1. Elsevier Academic Press, London, UK.
- **Upadhyay, V.K., M.J. Sousa, P. Ravn, H. Israelsen, A.L. Kelly and P.L.H. McSweeney. (2004).** Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait.* 84: 527–538.
- **van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L. (2007)** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 1–46.

- **Van Den Berg, J. C., Smits, A., Pot, B., Zedeboer, M., Keresters, K., Verbakel, J. M. A. et Verrips, C. T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections, *Food biotechnol.* 7: 189-205.
- **van Hijum, S.A., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G. (2006).** Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:157–76
- **van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J. (2002).** Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12: 111–21.
- **van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R.J., de Vos, W.M., Siezen, R.J., and Kleerebezem, M. (2005).** Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1223–1230.
- **Van Niel, C. B., Kluyver, A. J. Derx, H. G. (1929).** Uber das Butteraroma. *Bioehem. Z.*, 210 : 234-251.
- **Van Niel, E.W., Palmfeldt, J., Martin, R., Paese, M., Hahn-Hagerdal, B. (2004).** Reappraisal of the régulation of lactococcal L-lactate dehydrogenase. *Appl environ microbiol.* 70(3): 1843-1846.
- **Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407.
- **Vandenberg, D., Smits, A., Pot, B., Ledebøer, A., Kersters, K., Verbakel, J., Verrips, C. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic-acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnol.* 7: 189–205.
- **Vandenbroucke, K., de Haard, H., Beirnaert, E. (2010).** Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol.* 3: 49–56.
- **Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M. (2008).** Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 102–14.
- **Varsha, K.K., Nampoothiri, K.M. (2016).** *Lactococcus garvieae* subsp. *bovis* subsp. nov., lactic acid bacteria isolated from wild gaur (*Bos gaurus*) dung, and description of *Lactococcus garvieae* subsp. *garvieae* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 : 3805–3809.
- **Vasiljevic, T., and N. P. Shah. (2008).** Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.* 18:714–728.
- **Vedamuthu, E.R. (2006).** Starter Cultures for Yogurt and Fermented Milks, in: Chandan, R.C. (Ed.), *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Blackwell Publishing, 89–116.

- **Veljovic, K., Fira, D., Terzic-Vidojevic, A., Abriouel, H., Galvez, A., Topisirovic, L. (2009).** Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of Enterococci isolated from fermented products. *Eur Food Res Tech.* 230:63–70
- **Venderell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blöas, I., Girones, O., Múzquiz, J.L. (2006).** *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 177–198.
- **Ventura, M., Elli, M., Reniero, R. & Zink, R. (2001).** Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 113–21
- **Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Ganzle, M.G., Vogel, R.F. (2005).** Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451(T) during growth in Sourdough. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10): 6260–6266.
- **Vescovo, M., Dellaglio, F., Botazzi, V., Sarra, P. G. (1979).** Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. *Microbiologica*, 2: 317-30.
- **Viana de Souza, J., Silva Dias, F. (2017).** Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science, Food chemistry and biochemistry. Food bioprocessing.* 13: 1–9.
- **Villani, F., Coppola, S. (1994).** Selection of enterococcal strains for waterbuffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia.* 44: 97–105.
- **Vincent, S.J, Faber, E.J., Neeser, J.R., Stingle, F., Kamerling, J.P. (2001).** Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology* 11:131–139
- **Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Cornelissen, A., van Sinderen, D. (2015).** Structural investigation of cell wall polysaccharides of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 17. *Carbohydr Res.* 413: 93 – 99.
- **Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P., Panya, A. (2006).** Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*. *LWT - Food Science and Technology.* 39: 814-826.
- **Vogel, R.F., Böcker, G., Stolz, P. (1994).** Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 223–9.
- **Von Wright, A. et Axelsson, L. (2012).** Lactic acid bacteria: An introduction. In Lahtinne, S., Salminen, S., Von Wright, A. et Ouwehand, A., Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. *CRC Press*:1-17
- **Vuyst, L.D., Vin, F.D., Vaningelgem, F., Degeest, B. (2001).** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 11: 687 – 707.

- **Wakai, T., Yamamoto, N. (2012).** Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk, *Biotechnology—Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*, 1st ed., Sammour, R., Ed., Croatia.
- **Walling E.G., Indreau E. et Lonvaud-Funel A., 2001.** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. *INRA*. 289-300.
- **Walter, J. (2008).** Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4985–96
- **Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M. (2014).** Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int.J.Biologic. Macromolecules*. 67: 71-78.
- **Wang, X.M., Wang, Q.H., Wang. X.-Q, Ma, H.Z. (2011).** Effect of different fermentation parameters on lactic acid production from kitchen waste by *Lactobacillus* TY50. *Chem. Biochem. Eng.* 4: 433-438.
- **Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X. (2010).** Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82: 895-903.
- **Wardani, A. K., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H., et Shioya, S. (2006).** Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin by *Lactococcus lactis*. *Biochem. Eng. J.* 28: 220-230.
- **Wardani, S.K., Cahyanto, M.N., Rahayu, E., Utami, T. (2017).** The effect of inoculum size and incubation temperature on cell growth, acid production and curd formation during milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* Dad 13. *Int.Food.Res.J:* 24: 921–926.
- **Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A. (2007).** Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189: 3256–70.
- **Welker M, Moore ER. (2011).** Applications of whole-cell matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol.* 34:2-11.
- **Welman, A.D., Maddox, I.S. (2003).** Exopolysacchrides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 6: 269 – 274.
- **Werning, M.L., Nacher, M. Lopez, P., de Palencia, P.F., Aznar, R., Notararigo, S. (2012).** Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *London: INTECH*.
- **Williams, A.M., Fryer, J.L. Collins, M.D. (1990).** *Lactococcus piscium* sp. nov. A new *Lactococcus* species from salmonid fsh. *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 109–104.
- **Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–71.
- **Wolfrum, G., Vogel, R.F. (1999).** Growth and metabolism of *Lactobacillus pontis* TMW 1.109 isolated from cereal fermentations described by differential equations.

In: *Proceedings of the 17th ICC Conference "Cereals across the Continents"*, Valencia, Spain.

- **Xanthopoulos, V., Hatzikamari, M., Adamidis, T., Tzaneetakis, N., Tsakalidou, E., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2000).** Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Feta cheese throughout ripening. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 1056-1064.
- **Yadav, J., Srinivasan, A. (1985).** Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* on the flavour of ghee (clarified butterfat). *Journal of Dairy Research*. 52: 547–553.
- **Yan Yang, S., Zheng, Y., Huang, Z., Min Wang, X. Yang, H. (2016).** *Lactococcus nasutitermitis* sp. nov. isolated from a termite gut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66: 518-522.
- **Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Walker, B. (2018).** Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*. 8: 10.
- **Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., Terada, F. (2010).** Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 93: 3136–3145.
- **Yang, Z. (2000).** Antimicrobial compounds and extracellular Polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic dissertation. Department of food technology. Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, 61.
- **Yates, J.R, Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T. (1993).** Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem*. 214:397–408.
- **Yelnetty, A., Purnomo, H., Mirah, A. (2014).** Biochemical Characteristics of Lactic Acid Bacteria with Proteolytic Activity and Capability as Starter Culture Isolated From Spontaneous Fermented Local Goat Milk. *J of Natural Sci Res*. 4: 2225-0921.
- **Yoon M., Jun Y., Hwanga H. (2008).** Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT Food Sci. Technol.* 41: 925-933.
- **Yoshida, S., Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (2011).** Homo-D-lactic acid production from mixed sugars using xylose-assimilating operon-integrated *Lactobacillus plantarum* Appl Microbiol Biotechnol. 92: 67–76.
- **Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M. a. P. (2005).** Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from "Hussuwa", an African fermented sorghum product. *J. Appl. Microbiol.* 98 : 216–228.
- **Yvon, M., Rijnen, L. (2001).** Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11:185–201.
- **Zadi-Karam, H. (1998).** Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : Etude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, Elaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromage. Thèse d'Etat. Université de Constantine.



- **Zadi-Karam, H. et Karam, N-E. (2007).** Cinétique de croissance et d'acidification de souches de *Lactobacillus* isolées de lait de chamelle. (Growth and acidification kinetics of strains of *Lactobacillus* isolated from camel milk). 14ème Congrès 3R, 6 – 7
- **Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016).** Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:1121–35.
- **Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki, A., Sonomoto, K. (2005).** Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1181–1190.
- **Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki, A., Sonomoto, K. (2005).** Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1181–1190.
- **Zhang, H., Cai, Y. (2014).** Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. Springer Netherlands.
- **Zhu, Y., Zhang, Y., Li, Y. (2009).** Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 597–610.
- **Zidani, H (2015).** Les exopolysaccharides des bactéries lactiques : Optimisation et cinétique de production. Thèse de Doctorat. Université d'Oran. Algérie.
- **Zouaoui, N. (2011).** Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain de blé dur. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Université Mentouri de Constantine. 83.
- **Zourari, A., Accolas, J.P., Desmazeaud, M.J. (1992).** Metabolisme and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Lait.* 72 : 1–34.
- **Zuljan, F.A., Repizo, G.D., Alarcon, S.H., Magni, C., 2014.**  $\alpha$ -Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 188: 99–107.

## Milieux de culture

### Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe, 1960) :

Utilisé pour la culture des lactobacilles.

- Peptone 10 g
- Extrait de viande 10 g
- Extrait de levure 5 g
- Glucose 20 g
- Acétate de sodium 5 g
- Citrate d'ammonium 1 g
- Sulfate de magnésium 0,1 g
- Sulfate de manganèse 0,05 g
- Phosphate dipotassique 2 g
- Tween 80 1 ml
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml

Autoclaver à 120°C pendant 20mn.

### Milieu MRS hypersaccharosée :

- Peptone 10 g
- Extrait de viande 10 g
- Extrait de levure 5 g
- Saccharose 50 g
- Acétate de sodium 5 g
- Citrate d'ammonium 1 g
- Sulfate de magnésium 0,1 g
- Sulfate de manganèse 0,05 g
- Phosphate dipotassique 02 g
- Tween 80 01 ml
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### Milieu MRS-BCP :

Utilisé pour la culture des lactobacilles.

- Peptone 10 g
- Extrait de viande 10 g
- Extrait de levure 5 g
- Acétate de sodium 5 g
- Citrate d'ammonium 1 g
- Sulfate de magnésium 0,1 g
- Sulfate de manganèse 0,05 g
- Phosphate dipotassique 2 g
- Tween 80 1 ml

- Pourpre de bromocrésol 0,2 g
- Eau distillée 1000 ml

pH= 7

Autoclaver à 120°C pendant 20mn.

### **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962).**

- Tryptone 10 g
- Extrait de levure 10 g
- Saccharose 100 g
- Citrate de sodium 1 g
- Glucose 5 g
- Gélatine 2,5 g
- Azide de sodium 0.0075g
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml

pH= 7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

### **Milieu Falkow :**

Utilisé pour la recherche de l'arginine dihydrolase.

- Extrait de levure 3 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Glucose 1 g
- Arginine 5 g
- Pourpre de Bromocrésol 1.6% 1 ml
- Eau distillée qsp 1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### **Milieu Clark et Lubs :**

- Peptone tryptique de viande 6 g
- Glucose 5 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g
- Eau distillée qsp 1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### **Gélose semi-solide au lait citaté :**

- Lait écrémé stérile 10%
- Citrate de sodium 10%
- Gélose blanche :
- Agar 7 g
- Eau distillée qsp 1000 ml

Ajouter 0.25ml de Citrate de sodium 10% à 5ml de Lait stérile et 4 ml de gélose blanche 1.5%.

**Lait écrémé :**

- Lait écrémé 10 g
- Extrait de levure 0,5 g
- Eau distillée 100 ml

Autoclaver à 110°C pendant 10mn.

**Tampons et réactifs****Tampon Glycine NaOH :**

<b>Solution A</b> (0,2 M)	Glycine	15,01 g/l	50 ml
<b>Solution B</b> (0,2 M)	NaOH		22,4 ml

Pour obtenir un tampon à pH 9,6, il faut ajouter à 50 ml de solution A, 22,4 ml de solution B. Le mélange est complété jusqu'à 200 ml d'eau distillée ou de bouillon de culture.

**Tampon citrate : (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, H<sub>2</sub>O - 0,1 M/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O - 0,2 M)**

Solution A : 0,1 M d'acide citrique	19,21 g/l
Solution B: 0,2 M de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	71,7 g/l

**Réactif VP<sub>1</sub> :**

- α-naphtol 06 g
- Ethanol absolu 100 ml

**Réactif VP<sub>2</sub> :**

- NaOH 16 g
- Eau distillée 100 ml

**Réactif DNS :**

Utilisé pour le dosage du glucose.

Solution A : Dissoudre 0,25 g de DNS dans 50ml d'eau distillé.

Solution B : - Dissoudre à part 18,75 g de Tartrate Na-K dans 50ml de NaOH (2N).  
 - Mélanger la solution A+B, agiter et compléter à 250ml avec l'eau distillée.  
 - Conserver à 4°C à l'abri de l'air et de lumière.

**Coloration de Gram :****a) Violet de Gentiane :**

Solution A : 2 g de violet de Gentiane dans 20 ml d'alcool à 95 °.

Solution B : 0,8 g d'oxalate d'ammonium dans 80 ml d'eau distillée.

Mélanger les solutions A et B, laisser reposer 24 h avant l'emploi, Filtrer.

**b) Solution iodée de Gram :**

Dissoudre d'abord 2 g d'iodure de potassium dans environ 30 ml d'eau distillée, ajouter 1 g d'iode et mélanger jusqu'à dissolution. Compléter jusqu'à 300 ml avec l'eau distillée et mélanger rigoureusement. Conserver le mélange dans un flacon en verre brun.

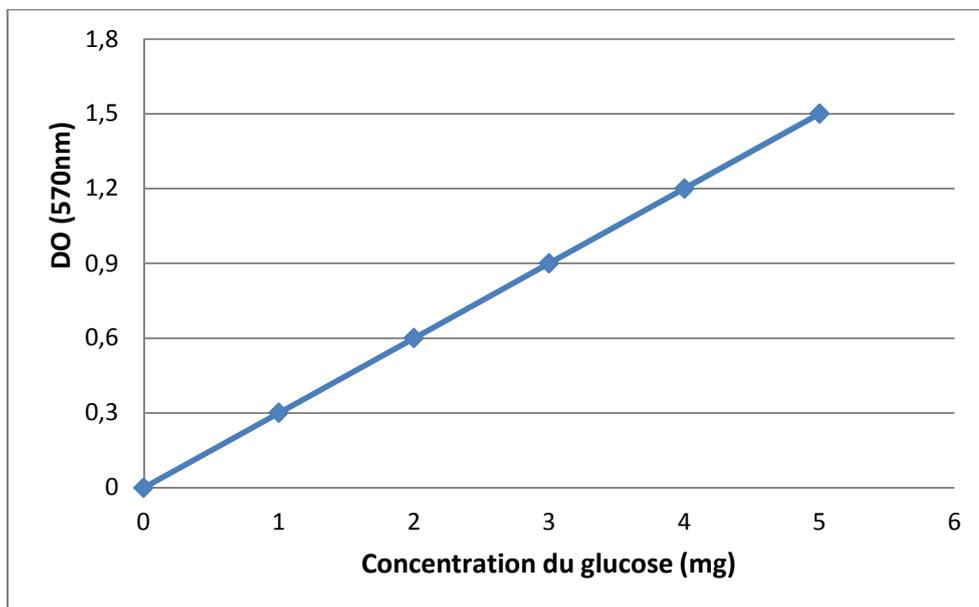
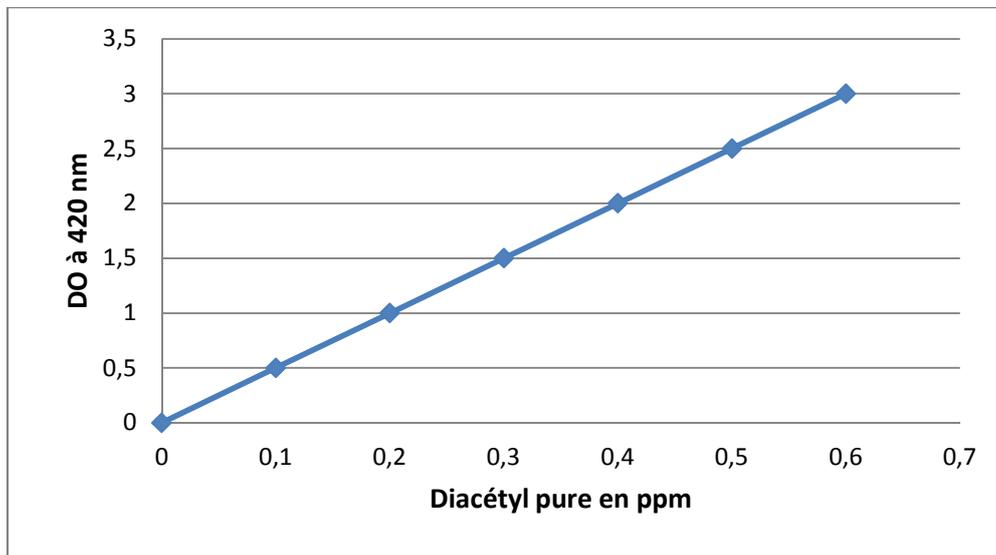
**c) Solution de safranine :**

Solution A : 2,5 g de safranine O dans qsp 100 ml d'alcool à 95 °.

Solution A bis : 10 ml de solution A dans 100 ml d'eau distillée.

**d) Décolorant :**

Mélanger à parties égale (v/v) alcool à 95 ° et acétone.

**Courbes étalon :****Courbe d'étalonnage du glucose.****Courbe d'étalonnage du diacétyle.**





## Quelques exemples d'identification par les cartes Vitek2GP (BioMérieux)

EHU Oran  
Rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux : 10968 Imprimé 20 juin 2016 10:34 CDT

Nom du patient : ID du patient :  
 Lieu : Médecin :  
 ID labo : HTK1 /16 Numéro d'isolat : 1

Numération :  
 Germe sélectionné : Enterococcus faecium

Source : Prélevé :

<b>Commentaires :</b>	

<b>Informations sur l'identification</b>	Heure de l'analyse : 5,75 heures	État : Final
Germe sélectionné	89% Probabilité	<b>Enterococcus faecium</b>
Commentaires sur l'Ident.	Profil biochimique :	002002065733771

Détails biochimiques																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

EHU Oran  
 N° Client bioMérieux : 10968 Rapport du laboratoire Imprimé 20 juin 2016 10:34 CDT

Nom du patient : ID du patient :  
 Lieu : Médecin :  
 ID labo : HTK12 /16 Numéro d'isolat : 1

Numération :  
 Germe sélectionné : Enterococcus gallinarum

Source : Prélevé :

<b>Commentaires :</b>	

<b>Informations sur l'identification</b>	Heure de l'analyse :	5,00 heures	État :	Final
Germe sélectionné	99% Probabilité	Enterococcus gallinarum		
Commentaires sur l'Ident.	Profil biochimique :	536003265733771		

Détails biochimiques																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	+	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	+	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	+	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

EHU Oran  
 N° Client bioMérieux : 10968 Rapport du laboratoire Imprimé 20 juin 2016 10:35 CDT

Nom du patient : ID du patient :  
 Lieu : Médecin :  
 ID labo : HTK 38 /16 Numéro d'isolat : 2

Numération :  
 Germe sélectionné : Enterococcus faecium

Source : Prélevé :

<b>Commentaires :</b>	

<b>Informations sur l'identification</b>	Heure de l'analyse :	6,00 heures	État :	Final
Germe sélectionné	95% Probabilité	Enterococcus faecium		
Commentaires sur l'Ident.	Profil biochimique :	132002265733771		

Détails biochimiques																	
2	AMY	(+)	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	(-)	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

## Full Length Research Paper

# Identification and major technological characteristics of *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains isolated from "hamoum", an Algerian fermented wheat

Khadidja KALBAZA, Halima ZADI-KARAM and Nour-Eddine KARAM\*

Laboratory of Biology of Microorganisms and Biotechnology, University of Oran1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria.

Received 14 August, 2017; Accepted 16 November, 2017

Twenty-eight strains of lactic bacteria were isolated from fermented wheat "hamoum" and phenotypically attributed to the following species: seven strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, six strains of *Lactobacillus brevis* and 15 strains of *Lactobacillus plantarum*. The acidifying behavior of the strains is considerably variably demanding on considered strain. The amounts of lactic acid produced reached 9.7 g for lactococci. Strains (27) showed proteolytic activity in the presence of 1% skimmed milk. The lipolysis activity of *L. lactis* strains was greater than that expressed by lactobacilli. The search for aromatic activity showed that four out of ten citratase producing strains can produce acetoin. The results indicate that *L. plantarum* is the most dominant strain in the "hamoum" with the most important technological characteristics.

**Key words:** "Hamoum", *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, identification, proteolysis, lipolysis, exopolysaccharides (EPS), aromatic activity.

## INTRODUCTION

Cereals are by far the most important food resource in the world for both human and animal. Wheat (*Triticum* species), by its important nutritional power, remains one of the main human food resource (Cassman, 1999).

In Algeria, wheat was historically conserved in underground silos called "Matmor" or "Matmora". Due to the accidental infiltration of precipitation water into the "matmor", the humidified or flooded wheat grains undergo a spontaneous fermentation at the periphery and depth of the silo, which depends also on the nature of the soil. Humidity, uncontrolled temperature and the absence of air in the matmor cause microbial fermentation

phenomena that can last several years ( $\leq$  nine years). Fermented wheat taste is then discovered and entered into the eating habits for the manufacture of fermented wheat, bread or couscous, "lemzeiet", "elmechroub" or "hamoum". This fermented wheat has a variety of flavors, textures and aromas that are highly coveted by consumers in specific regions (Bekhouche et al., 2013).

Balance of total microbial population present in wheat grains can be affected by many factors (Wang et al., 2015). Elements of this imbalance include climatic conditions, mainly temperature and humidity, and biotic conditions associated with insect and mold attack and

\*Corresponding author. E-mail: nek1948@yahoo.fr.

pesticide application. Among the microorganisms associated to wheat grains, lactic acid bacteria play a very important role in preserving the balance of the microbial flora and stabilizing the final fermentation products (Corsetti et al., 2017).

Lactic acid bacteria are a heterogeneous group of microorganisms producing lactic acid as the main product of metabolism. They colonize many food products such as dairy products, meat and vegetables. They are involved in a large number of spontaneous fermentations of food products and intervene in the dairy industry and fermentation of many other food products. They contribute to both texture and flavor of food and the production of aromatic compounds. They constitute a group of bacteria united by a multitude of morphological, metabolic and physiological characteristics. In general, they are described as Gram-positive bacteria, immobile, rods and cocci, non-sporulating, free of cytochromes and catalase, anaerobic micro-aerophiles, strictly fermentative, with complex nutritional requirements (amino acids, peptides, vitamins, salts, fatty acids, fermentable carbohydrates) and produce lactic acid as the main end product during carbohydrates fermentation (Axelsson, 2004).

Currently, lactic acid bacteria encompass 13 different bacterial genera: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* and *Vagococcus*. Classification can be done according to phylogenetic criteria by the use of molecular methods. However, the classical phenotypic/biochemical characterization remains practical in the preliminary identification of microorganisms. Some phenotypic characteristics are used to identify species within genus such as ability to ferment carbohydrates, different bile concentrations toleration, extracellular polysaccharides production, growth factors requirement, acetoin production, and some enzymes synthesis. The G+C composition of the DNA, the fatty acid composition, the electrophoretic mobility of lactate dehydrogenase are criteria that can also be studied for the identification of lactic species (Vandamme, 1996; Stiles and Holzappel, 1997; Ho et al., 2007).

*Lactobacillus* is one of the most important genus involved in food microbiology, due to its role in food production and preservation. Lactobacilli contribute to the flavor of fermented foods by diacetyl production. The genus *Lactobacillus* was proposed by Beijerinck in 1901. They are long and fine (sometimes curved) rods often grouped in chains, immobile, non-sporulated, with negative catalase, and developed at 30 to 40°C. Lactobacilli have very complex nutritional requirements lactic acid bacteria. It is therefore quite heterogeneous, contains species with a wide phenotypic/biochemical variety, and physiological properties. Heterogeneity is reflected by the type of molecular percentage G+C of the DNA in the species of this genus (Schleifer and Ludwig,

1995; Axelsson, 2004; Hammes and Hertel, 2006).

The lactococci have been used primarily as starter cultures for various dairy products (yogurt, Cheddar, and hard cheeses). For most parts, they have been limited to N and D Streptococci and *Leuconostoc cremoris* and *Leuconostoc dextranicum*. The lactococci are Gram-positive cocci, nonmotile, grow at 10 and 40°C, but not 45°C, grow in 4% NaCl (except for *L. cremoris*); some species grow in 0.1% methylene blue milk medium. The lactococci ferment glucose by the hexose diphosphate pathway with the formation of L(+) lactic acid. In general, *Lactococcus* species produce smooth colonies with an entire edge on agar media (Carr et al., 2002).

*Lactococcus lactis* is predominantly found on plant material and in the dairy environment. It is extensively used in dairy fermentations, which is mainly due to its role in the development of texture and flavor through, for example proteolysis and the production of volatile flavor compounds. It also contributes to food preservation through the production of organic acids and bacteriocins such as nisin. Four *L. lactis* subspecies have been defined: subsp. *lactis*, subsp. *cremoris*, subsp. *hordniae*, and subsp. *tractae* (Backus et al., 2017).

To our knowledge, very few studies have been carried out on the fermented wheat "hamoum", but without a special interest regarding the technological interest in lactobacilli and lactococci. The metabolic activities of bacterial species sought by food industry, like production of lactic acid, aroma or thickening saccharides. Then, the objectives of this study were to isolate these lactic acid bacteria from "hamoum" in order to identify and highlight their technological characteristics.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation and storage of lactic acid bacteria

To carry out this study, 28 strains of lactic acid bacteria were isolated from fermented wheat "hamoum": three samples of hamoum of three different matmors (underground silos) were taken in sterile bottles; an aliquot of 5 g was homogenized with Stomacher, then was added to 10 ml of sterile skimmed milk and placed to coagulate at 30°C for 24 h in order to promote the development of the endogenous lactic flora. After coagulation of milk, the first dilutions were prepared by mixing 1 ml of each milk sample with 9 ml of physiological water (0.90% w/v NaCl solution). Decimal dilutions were then made in the same solution. Purification of bacterial strains was performed by the method of the streaks on solid MRS medium (De Man et al., 1960). Incubation was carried out at 30°C for 48 h. Obtained colonies were examined macroscopically and bacteria were characterized microscopically after Gram staining. The search for catalase activity was performed for all strains. Gram positive and catalase negative bacteria were then stored at -20°C in MRS medium supplemented (v/v) with 40% glycerol.

### Strains identification

#### *Physiological and biochemical study of strains*

Bacterial growth was followed by spectrophotometric measures

( $A_{600nm}$ ) at different temperatures: 10, 15, 37, and 45°C, different pH: 4, 4.5 and 8 and different concentrations of NaCl: 2, 4 and 6.5% in liquid MRS medium. Each strain was seeded into two tubes containing the Falkow medium (Falkow et al., 1958): a control tube (without arginine) and a test tube (with arginine). The presence of arginine dihydrolase results in turning the pH indicator towards violet, whereas glucose fermentation in the control tube leads to the turning of the colored indicator towards the yellow.

Fermentation type was searched out for all the strains. The strains were seeded in tubes containing 10 ml of MRS medium and a Durham tube, and then incubated at 30°C for 48 h. The accumulation of gas in the Durham tube shows that the path of degradation of the sugar is heterofermentary, otherwise it is homofermentary.

#### Identification with API50 CHL galleries

Fermentation profiles of the strains were established using the API50 CHL biochemical galleries according to manufacturer instructions. The identification of strains was performed using Apiweb™ software of Biomerieux.

#### Study of technological characteristics of strains

**Measurement of acidity produced by bacteria:** The acidity produced by the bacteria in MRS medium was estimated by pH-meter using Dornic soda (N/9) (Karam and Karam, 1994) after an incubation period of 24 h at 30°C. Results were expressed in Dornic degrees according to the formula: Acidity (°D) =  $n \times 10$  ( $n$  = average volume of soda to titrate 10 ml of milk; 1 °D = 0.1 g/L of produced lactic acid) (Accolas et al., 1971).

**Bacterial proteolysis activity:** Cells capacity for proteolysis was sought in MRS medium Na/Na<sub>2</sub>-phosphate buffered to pH 7 supplemented with 2% of reconstituted sterile skimmed milk at 10%, according to the method described by Van Den Berg et al. (1993) and adapted by Roudj et al. (2009).

**Lipolytic activity:** Lipolytic activity was sought on solid MRS medium Na/Na<sub>2</sub>-phosphate buffered to pH 7 and supplemented with 1% of milk fat as sole lipid source.

**Aromatic activity:** (1) Search for acetoin (Hydroxy-3-butanone-2 or acetylmethylcarbinol): Bacteria were inoculated into Clark and Lubs medium. After incubation at 30°C for 48 h, the production of acetoin was demonstrated by means of Voges-Proskauer colored reaction (Eddy, 1961). (2) Search for citratase: The production of citratase was demonstrated by bulk culture in semi-solid agar with citrated milk; prepared by adding 0.5 ml of 10% sodium citrate solution to 10 ml of milk with 1% (0.1 ml) of the preculture and then adding 4 ml of molten agar at 48°C (Harrigan, 1998).

**Exopolysaccharides (EPS) production:** The production of EPS was sought on Mayeux medium (*Leuconostoc* specific medium) and on hypersaccharosed solid MRS medium containing 50 g of sucrose per liter (Messens et al., 2002).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Strains identification

After purification series on MRS medium (pH 5.4), bacterial colonies presented the following characteristics:

small, whitish, smooth, curved and with regular outline. Results of morphologic tests have also shown that all strains were Gram positive and catalase negative. Microscopic observation has revealed two cell forms: 7 strains have presented the shape of small cocci rallied in chains, recalling the form of *Lactococcus* strains, and 21 strains whose cells have presented the shape of isolated rods or short chains belong to *Lactobacillus* genus.

Among the lactobacilli, 14 isolates were homofermentatives and did not possess arginine dihydrolase. All these strains did not grow at 10°C but grew at 15 and 37°C. Out of them, only nine were able to grow at 45°C. These isolates belong to Group II of lactobacilli (Streptobacteria) according to Axelsson (2004) and Hammes and Hertel (2006) recommendations. The six other strains of bacilli belong to Group III of the lactobacilli (Betabacteria) because they are heterofermentatives with positive ADH, and grew at 15°C but not at 45°C. Eight strains of *Lactococcus* were homofermentary, possessed ADH and grew at 15, 37 and 45°C. Table 1 shows the physiological and biochemical characteristics of the strains.

Results of fermentation of the carbohydrates on the API 50CHL gallery allowed the identification of the strains. The results (Table 1) show that the 7 strains of *Lactococcus* belong to *L. lactis* subsp. *lactis*, the 6 heterofermentative strains of *Lactobacillus* are part of *Lactobacillus brevis*. The 15 homofermentative lactobacilli belong to *Lactobacillus plantarum*; which was confirmed by the ATCC 14917 *L. plantarum* carbohydrate fermentation profile obtained from Biomerieux database.

### Technological characteristics of strains

#### Acidity produced by bacteria

The results (Figure 1) lead us to note that the acidifying behavior of these bacteria is variable from one strain to another in the same species. In this study, comparison between means of acidity production in all readings has not revealed any significant difference in all strains, which reflects stability of this characteristic (Table 2).

The strains of *L. plantarum* has produced acidity varying from 10 to 90°D, which is greater than that produced by strains of *L. brevis*. These results are in agreement with those of Zhang and Vadlani (2014). *L. plantarum* is known to be homofermentative to hexoses, producing 2 moles of lactic acid per hexoses mole (Passos et al., 1994). However, the higher acidifying behavior was that of the strains of *L. lactis*. They produced lactic acid amounts of up to 9.7 g/L, which is in agreement with the work of Åkerberg et al. (1998). In general, lactobacilli ferment lactose by producing lesser amounts than *Lactococcus* and this was also suggested by Herreros et al. (2003). In fact, comparison between means of acidity production of the different strains has revealed a significant difference ( $P < 0.05$ ) (Table 3).

**Table 1.** Phenotypic characteristics of strains isolated from "hamoum".

Species	Code of the strain	Arginine dihydrolase	Gas production	Growth at different									
				Temperature (°C)				% NaCl			pH		
				10	15	37	45	2	4	6.5	4	4.5	8
<i>Lactobacillus brevis</i>	HMTK10	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	HMTK24	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	HMTK29	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	HMTK52	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	HMTK56	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	HMTK57	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HMTK2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HMTK6	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	HMTK8	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	HMTK9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	HMTK21	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	HMTK23	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	HMTK25	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	HMTK26	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	HMTK28	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	HMTK50	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	HMTK51	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	HMTK53	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	HMTK58	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	HMTK59	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	HMTK1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	HMTK3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	HMTK4	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	HMTK7	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	HMTK20	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	HMTK22	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	HMTK54	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	HMTK55	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+

+, Positive reaction; -, negative reaction.

According to these results, it may be suggested that strains with good acidifying activity can be proposed for application in the dairy industry, in which they lead to pH decrease, which plays an important and essential part in the coagulation of milk by destabilizing the casein micelles on one hand and giving the product its distinct and characteristic taste, thus contributing to flavor and aroma production. They may also act as inhibitors of undesirable micro-organisms.

### Proteolysis activity

All the tested strains except the HMTK24 strain showed a growth with proteolysis activity confirmed by the appearance of a clear halo around the colonies seeded in

a touch on the surface of the MRS medium supplemented with 1% of skimmed milk reconstituted at 10% (Figure 2).

According to Vuilleumard (1986), the strain is considered as a proteolytic one if it presents a lysis zone with a diameter of 5 to 15 mm. In comparison with this data, our strains are revealed to be proteolytic, with proteolysis zone diameters between 6 and 14 mm. *L. lactis* subsp. *lactis* strains are more proteolytic than *Lactobacillus* strains, of which 50% have a lysis zone greater than or equal to 10 mm. The statistical study showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the results obtained for the three species (Table 4). These results are consistent with those of Hassaine et al. (2007). *L. lactis* possesses a complex proteolysis system comprised of multiple intracellular peptidases and a single protease anchored

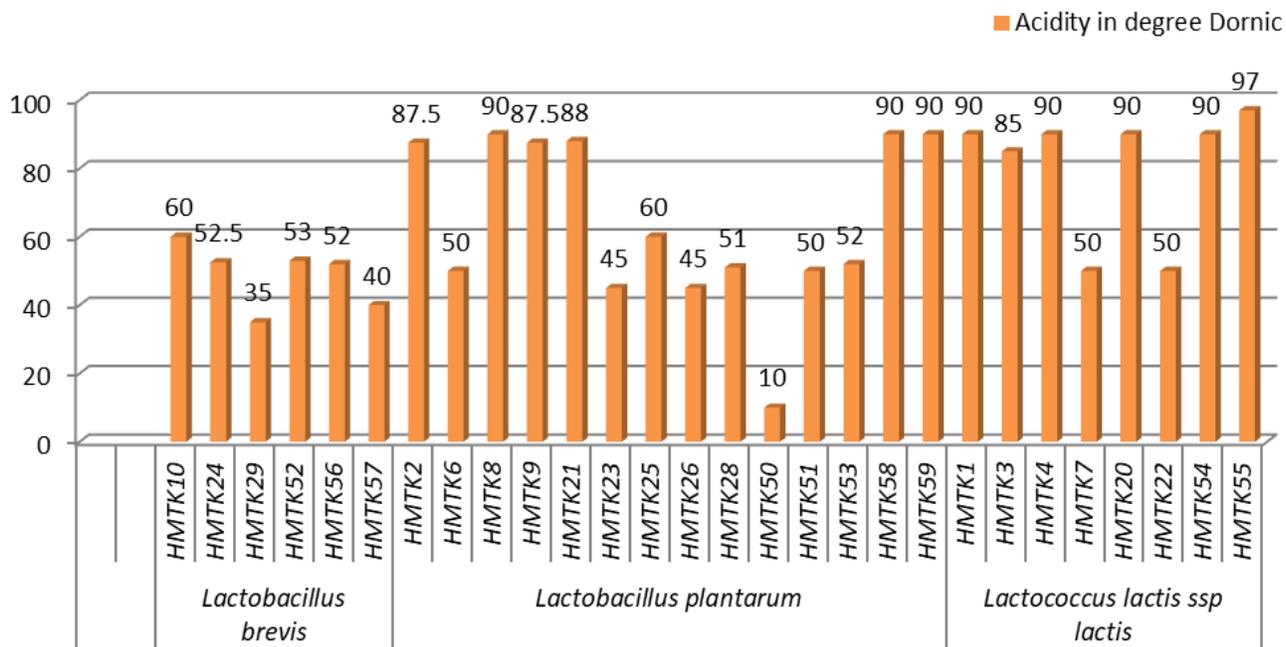


Figure 1. Acidity produced by the strains.

Table 2. Mean  $\pm$  standard deviation of acidity produced by strains during experiment assays.

Parameter	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
1 <sup>st</sup> assay	46.50 $\pm$ 8.41	64.00 $\pm$ 24.91	80.25 $\pm$ 18.95
2 <sup>nd</sup> assay	49.25 $\pm$ 8.75	64.04 $\pm$ 24.80	79.75 $\pm$ 18.85
3 <sup>rd</sup> assay	48.25 $\pm$ 10.01	64.68 $\pm$ 24.77	80.88 $\pm$ 18.87

to the cell surface, PrtP, whose gene is plasmidic, a serine protease that allows growth in milk by hydrolyzing caseins (Kunji et al., 1996). Some strains of *L. lactis* possess a surface protease specific to the maturation of the precursor of nisin. A functional protease of the HtrA family was demonstrated in *L. lactis* (Poquet et al., 2001).

The strains of *Lactobacillus* exhibit proteolytic activity with lysis zones with a diameter ranging from 6 to 12 mm, which is in line with the results of Roudj et al. (2009). *L. brevis* have shown a moderate level of proteolysis compared to *L. plantarum* with lysis diameters not exceeding 8 mm, these results being in agreement with the work of Belkheir et al. (2017). Strains exhibiting high proteolytic activity could be used with other ferments as complement or secondary culture. These strains can contribute to the development of the flavors during the maturation stage of cheese or in the manufacture of the fermented beverages.

*L. lactis* and *Lactobacillus* are largely deficient in the capacity of amino acid biosynthesis, which is compensated for by the ability to synthesize a large number of peptidases, amino acid permeases and

multiple oligopeptide transport systems (Opp) (Klaenhammer et al., 2005). A large number of *Lactococcus* and *Lactobacillus* peptidases have been purified and biochemically characterized; in most cases, the corresponding gene has been cloned and sequenced (Kirsi et al., 2006). The first step in the use of casein by lactic acid bacteria is performed by CEP. Five different types of these enzymes (PrtP endoprotease, 2 general PepN and PepC aminopeptidases, PepO1 endopeptidase and Opp oligopeptide transport system) were cloned and characterized, including PrtP from *L. lactis*, whose gene (*prtP*) can be found either on plasmidic or chromosomal DNA, while the CEPs of lactobacilli are coded by genes on chromosomal DNA (Holck and Naes, 1992; Guédon et al., 2001; Kelleher et al., 2017).

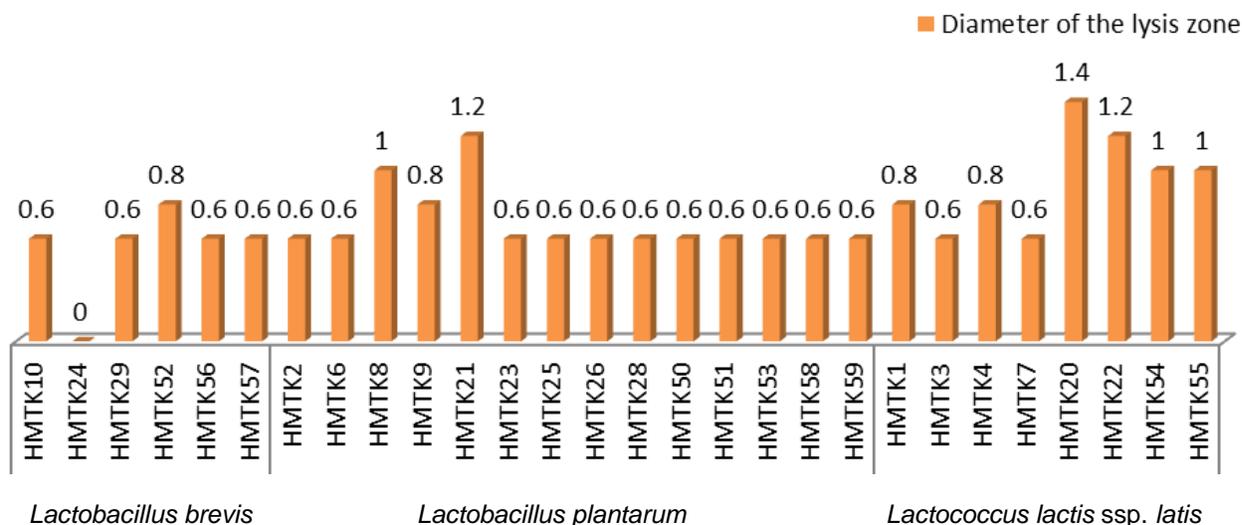
#### Lipolytic activity

The lipolytic activity of the strains of the same species is highly variable. An example of the result is as shown in

**Table 3.** Acidity production expressed by different strains.

Strain	Mean $\pm$ standard deviation
<i>Lactobacillus brevis</i>	48.75 $\pm$ 9.33 <sup>(a)</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	64.00 $\pm$ 24.91 <sup>(a)</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	80.25 $\pm$ 18.95 <sup>(a)</sup>

Values are mean  $\pm$  standard deviation. <sup>(a)</sup>No significant difference was obtained by Duncan's test between three assay.

**Figure 2.** Proteolytic activity of the bacterial strains.**Table 4.** Proteolysis expressed by different strains.

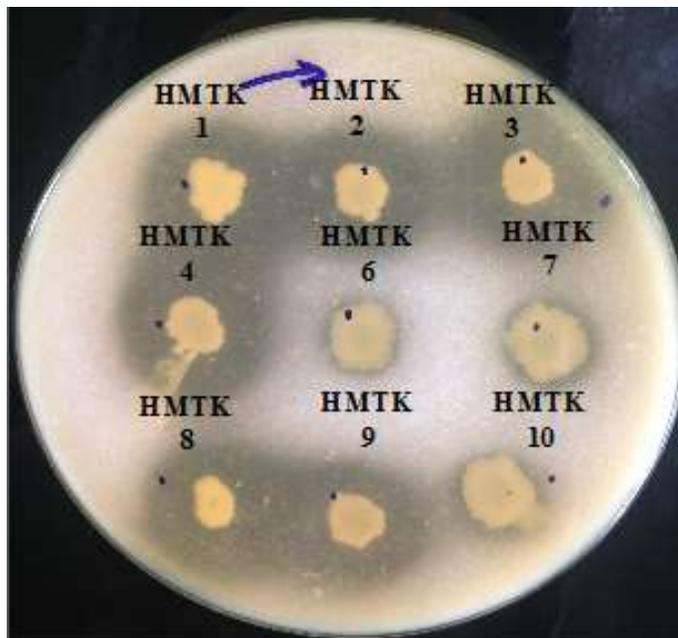
Strain	Mean $\pm$ standard deviation
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.533 $\pm$ 0.273 <sup>(a)</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.6857 $\pm$ 0.1875 <sup>(a)</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	0.9250 $\pm$ 0.2816 <sup>(a)</sup>

Values are mean  $\pm$  standard deviation. <sup>(a)</sup>No significant difference was obtained by Duncan's test between three assay.

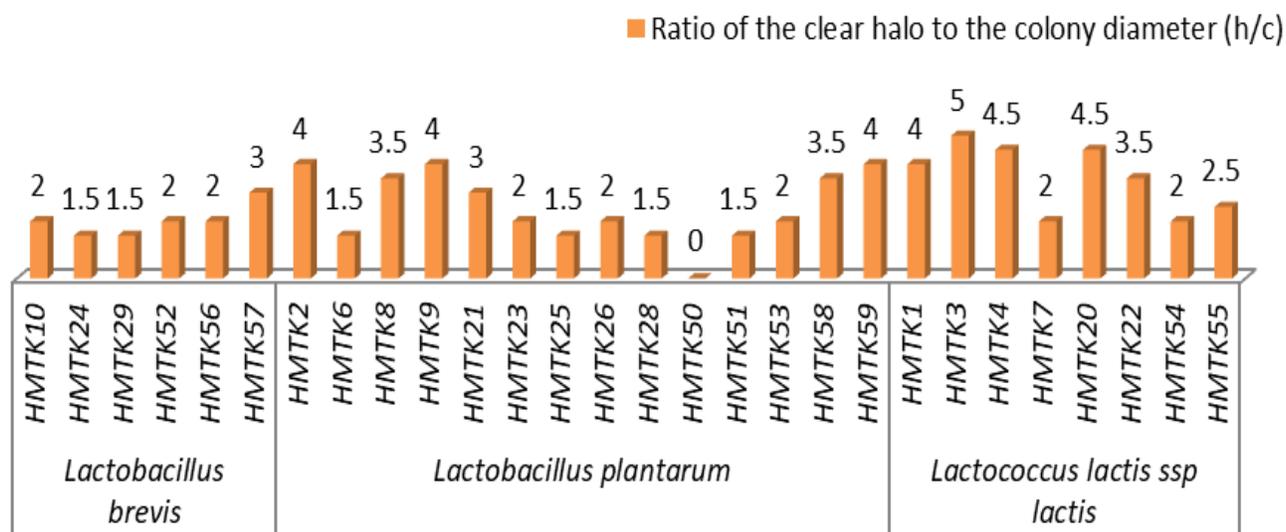
Figure 3. The ratio of the clear halo to the colony diameter (h/c) expressing the lipolytic activity was calculated for each strain (Figure 4). The statistical study of the means obtained for the lipolytic activity shows significant differences ( $p < 0.05$ ) by Duncan's post hoc test (Table 5). The strains of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* express a higher activity with ratios ranging from 2 to 5 by comparing it with that expressed by *L. plantarum*. The two species preferentially hydrolyze short chain fatty acids knowing that the milk fat is rich of these fatty acids. *L. lactis* exhibits a stronger esterase activity than that of *L. plantarum* according to Macedo et al. (2003) and Karam

et al. (2012), which confirms the results of the present study. Several studies have characterized the esterases of *L. plantarum* (Gobbetti et al., 1997; Brod et al., 2009; Esteban-Torres et al., 2013, 2014, 2015; Kim et al., 2017). The lipolytic activity of *L. brevis* remains the lowest with ratios (h/c) not exceeding 3.

The study of Herreros et al. (2004) suggests that *L. plantarum* strains hydrolyze C8 and C14 fatty acids while those of *L. brevis* have shown greater esterase activity on C4 and C8 fatty acids. The study of the genome of *L. plantarum* WCFS1 reveals the presence of a rich repertoire of esterases and lipases suggesting their important role in cellular metabolism, among them LpEst



**Figure 3.** Lipolytic activity on MRS medium deprived of tween 80 and supplemented with 1% milk fat.



**Figure 4.** Lipolytic activity expressed by the strains on the milk fat.

carboxylesterase (Alvarez et al., 2014).

Lipases find promising applications in various fields: hydrolysis and synthesis of long-chain acylglycerols, manufacture of detergents, manufacture of food ingredients, application in the paper industry and biocatalysis of stereoselective transformations. They are widely used in the treatment of products of organic chemistry, the manufacture of cosmetic and pharmaceutical products as well as increased stability or

enantioselectivity (Kapoor and Gupta, 2012).

#### **Production of exopolysaccharides**

The production of EPS by lactic bacteria is a favorable trait to many industrial food processes. The main advantage of the use of exopolysaccharide-producing lactic bacteria in lactic ferments during the production of

**Table 5.** Lipolysis expressed by different strains.

Strain	Mean $\pm$ standard deviation
<i>Lactobacillus brevis</i>	2.000 $\pm$ 0.548 <sup>(a)</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.429 $\pm$ 1.238 <sup>(a)</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	3.500 $\pm$ 1.195 <sup>(a)</sup>

Values are mean  $\pm$  standard deviation. <sup>(a)</sup>No significant difference was obtained by Duncan's test between three assay.

**Figure 5.** Production of exopolysaccharides on hypersaccharosed MRS medium.

fermented milks is the improvement of the texture and the reduction of the syneresis (expulsion of liquid from a gel). According to this test, negative results were obtained on the Mayeux medium for all the lactic strains, which were unable to develop by forming colonies with a more or less glutinous aspect, testifying to the production of a thickening agent, exopolysaccharides. Nevertheless, four strains, HMTK2, HMTK4, HMTK10 and HMTK24, produce EPS on hypersaccharosed MRS medium (Figure 5).

Several works focus on the EPS production by *Lactobacillus* (Ismail and Nampoothiri, 2010; Dilna et al., 2015; Fontana et al., 2015; Salazar et al., 2015; Oleksy and Klewicka, 2016). To date, about 30 species of *Lactobacillus* producing EPS have been identified, the most well-known being *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum* and *Lactobacillus johnsonii*. The genetic determinants of EPS are carried either by a plasmidic or a chromosomal DNA. The genes encoding for proteins responsible for EPS synthesis by mesophilic lactic bacteria are generally located on a plasmid. In *Lactococcus*, the production of EPS is less stable, the main reasons being the plasmidic

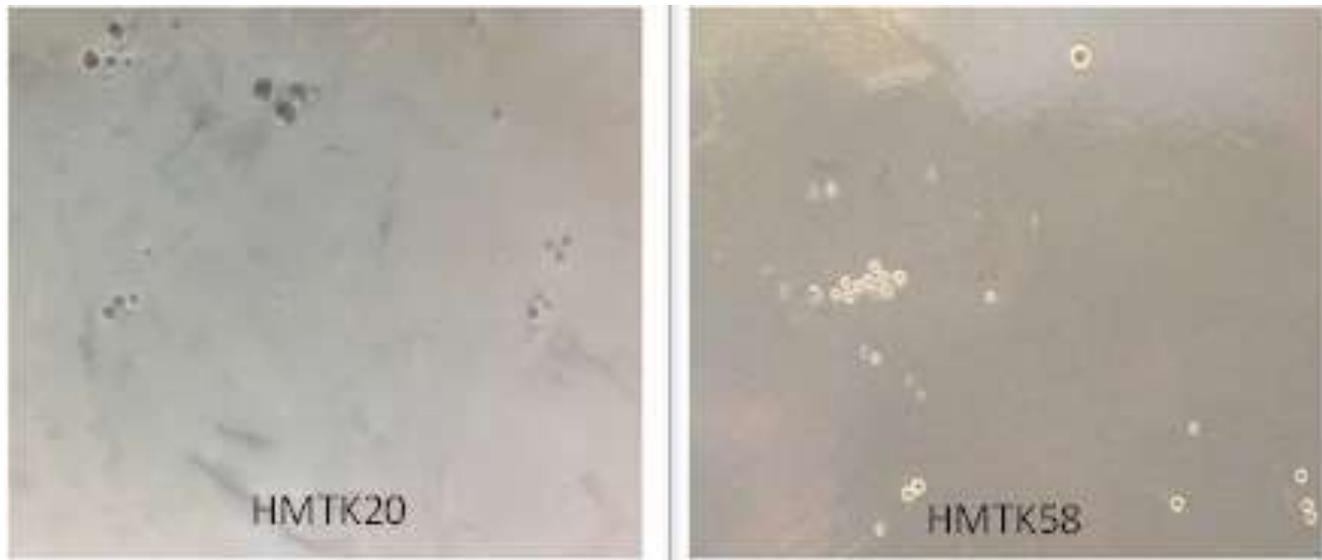
location of the production genes and the presence of a mobile insertion sequence (IS, e.g. ISS1, IS981) (Sanlibaba and Çakmak, 2016).

#### **Aromatic activity**

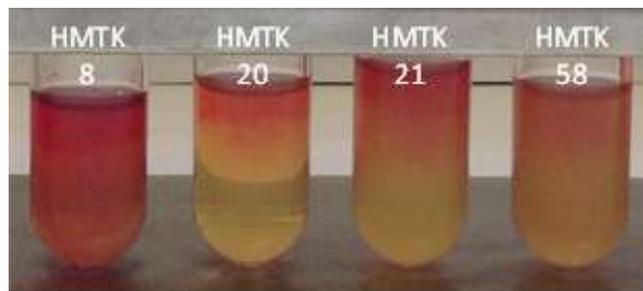
Co-metabolism of citrate, fermentable sugar is very important in lactic bacteria since it is closely related to the aromatic activity. The strains HMTK2, HMTK4, HMTK8, HMTK10, HMTK20, HMTK21, HMTK24, HMTK50, HMTK51 and HMTK58 were found to produce citratase (Figure 6).

Lactic bacteria using citrate play an important role in many dairy processes. They are responsible for the production of aromatic compounds (diacetyl and acetoin). Diacetyl is essential for establishing the flavor of dairy products such as butter and buttermilk and sometimes, young cheeses. Because of these properties, these lactic bacteria are often called aroma bacteria. During the citrate metabolism, CO<sub>2</sub> is also produced, which leads to eye formation in certain types of cheese.

The strains HMTK 8, HMTK20, HMTK21 and HMTK58 show a positive result for the production of acetoin (Figure7).



**Figure 6.** Citratase production in semi-solid agar with citrated milk.



**Figure 7.** Production of acetoin revealed by Voges-Proskauer colored reaction.

## Conclusion

This study shows the interesting technological properties presented by strains of *L. lactis* ssp *lactis*, *L. plantarum* and *L. brevis* isolated from hamoum. Some of them produce amounts of lactic acid of up to 9.7 g/L. They express proteolytic activity of milk proteins and lipolytic of milk fat. Ten strains possess citratase and four strains produce acetoin. These strains are good candidates for use in the food industry.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

## REFERENCES

Accolas PJ, Veaux M, Auclair J (1971). Etude des interactions entre

- diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait* 51:249-272.
- Åkerberg C, Hofvendahl K, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:682-690.
- Alvarez Y, Esteban-Torres M, Cortés-Cabrera Á, Gago F, Acebrón I, Benavente R, Mardo K, Rivas B, Muñoz R, Mancheño J.M (2014). Esterase LpEst1 from *Lactobacillus plantarum*: A Novel and Atypical Member of the  $\alpha\beta$  Hydrolase Superfamily of Enzymes. *PLOS ONE.* 9(3):e92257.
- Axelsson L (2004). Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria – Microbiology and functional aspects*. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A; Ouweland. Marcel Dekker, Inc. 1-66. ch1
- Backus L, Wels M, Boekhorst J, Dijkstra A.R, Beerthuyzen M, Kelly W.J, Siezen RJ, van Hijum SAFT, Bachmann H (2017). Draft Genome Sequences of 24 *Lactococcus lactis* Strains. *Genome Announc.* 5:13.
- Bekhouche F, Merabti R, Bailly J.D (2013). "Lemzeiet": Traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria); investigation of the process and estimation of the technological and nutritional quality. *Afr. J. Food. Sci. Technol.* 4(8):167-175.
- Belkheir K, Karam HZ, Karam NE (2017). New proteolytic pathway

- with Probable Hypoallergenic Properties of *Lactobacillus* Isolated from Dromedary Milk. Arab. J. Sci. Eng. 1-6.
- Brod FCA, Vernal J, Bertoldo JB, Terenzi H, Arisi ACM (2010). Cloning, Expression, Purification, and Characterization of a Novel Esterase from *Lactobacillus plantarum*. Mol. Biotechnol. 144:242-249.
- Carr FJ, Chill D, Maida N (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. Rev. Microbiol. 28:281-370.
- Cassman KG (1999). Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(11):5952-5959.
- Corsetti A, Settanni L, Chaves López C, Felis GE, Mastrangelo M, Suzzi G (2007). A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. Syst. Appl. Microbiol. 30:561-571.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23:130-135.
- Dilna SV, Surya H, Aswathy RG, Varsha KK, Sakthikumar DN, Pandey A, Nampoothiri KM (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. LWT. Food. Sci. Technol. 2:1179-1186.
- Eddy BP (1961). The Voges-Proskauer Reaction and Its Significance: A Review. J. Appl. Bacteriol. 24:27-41.
- Esteban-Torres M, Landete JM, Reverón I, Santamaría L, de las Rivas B, Muñoz R (2015). A *Lactobacillus plantarum* Esterase Active on a Broad Range of Phenolic Esters. Appl. Environ. Microbiol. 81:3235-3242.
- Esteban-Torres M, Mancheño JM, de las Rivas B, Muñoz R (2014). Characterization of a Cold-Active Esterase from *Lactobacillus plantarum* Suitable for Food Fermentations. J. Agric. Food Chem. 62:5126-5132.
- Esteban-Torres M, Reverón I, Mancheño JM, de las Rivas B, Muñoz R (2013). Characterization of a Feruloyl Esterase from *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 79:5130-5136.
- Falkow S (1958). Activity of Lysine Decarboxylase as an Aid in the Identification of *Salmonella* and *Shigella*. Am. J. Clinical Pathol. 29:598-600.
- Fontana C, Li S, Yang Z, Widmalm G (2015). Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. Carbohydr. Res. 402:87-94.
- Gobbetti M, Fox PF, Stepaniak L (1997). Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. J. Dairy Sci. 80:3099-3106.
- Guédon E, Martin C, Gobert FX, Dusko Ehrlich S, Renault PP, Delorme C (2001). Réseau de régulation de la transcription des gènes du système protéolytique de *Lactococcus lactis*. Le Lait. 81:65-74.
- Hammes WP, Hertel C (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, in: The Prokaryotes. Springer US. pp. 320-403.
- Hassaine O, Zadi-Karam H, Karam NE (2007). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). Afr. J. Biotechnol. 6:1720-1727.
- Herreros MA, Fresno JM, González Prieto MJ, Tornadijo ME (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). I. Dairy J. 13:469-479.
- Herreros MA, Fresno JM, Sandoval H, Castro JM, Tornadijo ME (2004). Esterolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat milk cheese). Milchwissenschaft 59:526-529.
- Holck A, Naes H (1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. J. Gen. Microbiol. 138:1353-1364.
- Ismail B, Nampoothiri KM (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. Arch. Microbiol. 192:1049-1057.
- Kapoor M, Gupta MN (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. Process Biochem. 47:555-569.
- Karam NE, Dellali A, Zadi-Karam H (2012). Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. Renc. Rech. Rumin. 19:415.
- Karam N-E, Karam H (1994). Isolement et caractérisation de bactéries lactiques de laits crus d'Algérie in Alimentation, Génétique et Santé de l'enfant, ed. M. Touhami et F. Des jeux, L'Harmattan, Paris.
- Kelleher P, Bottacini F, Mahony J, Kilcawley KN, Van Sinderen D (2017). Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights in to evolution and niche adaptation. BMC Genomics 18:267.
- Kim Y, Ryu BH, Kim J, Yoo W, An DR, Kim BY, Kwon S, Lee S, Wang Y, Kim KK, Kim TD (2017). Characterization of a novel SGNH-type esterase from *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Biol. Macromol. 96:560-568.
- Kirsi S, Hanne I, Pekka V (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:394-406.
- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiol. Rev. 29:393-409.
- Kunji ER, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings W.N (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 70:187-221.
- Ma CL, Zhang LW, Yi HX, Du M, Han X, Zhang LL, Feng Z, Zhang YC, Li Q (2011). Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks. J. Dairy Sci. 94:1691-1696.
- Macedo AC, Tavares TG, Malcata FX (2003). Esterase activities of intracellular extracts of wild strains of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. Food Chemistry. 81:379-381.
- Messens W, Neysens P, Vansielegem W, Vanderhoeven J, De Vuyst L (2002). Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. – biosynthesis and applications. Critical Rev. Food Sci. Nutri. 58(3):450-462.
- Passos FV, Fleming HP, Ollis DF, Felder RM, McFeeters RF (1994). Kinetics and Modeling of Lactic Acid Production by *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 60:2627-2636.
- Poquet I, Bolotin A, 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. Lait. 81:37-47.
- Roudj S, Belkheir K, Zadi-Karam H, Karam N.-E (2009). Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest algérien. Eur. J. Sci. Res. 34(2):218-227.
- Salazar N, Gueimonde M, Reyes-Gavilán C.G. de los, Ruas-Madiedo P (2016). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 56:1440-1453.
- Sanlibaba P, Çakmak GA (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. Appl. Microbiol. 2:1-5.
- Schleifer KH, Ludwig W (1996). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. Syst. Appl. Microbiol. 18:461-467.
- Stiles M.E, Holzapfel W.H (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36:1-29.
- Van Den Berg DJC, Smits A, Pot B, Ledebøer A.M, Kersters K, Verbake JMA, Verrips CT (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. Food Biotechnol. 7:189-205.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60:407-438.
- Vuilleumard JC (1986). Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3:1-65.
- Wang Ni. K, Cai Y, Pang H (2015). Natural Lactic Acid Bacteria Population and Silage Fermentation of Whole-crop Wheat. Asian-Australas J. Anim. Sci. 28:1123-1132.
- Zadi-Karam H, Hassaine O, Karam N.-E (2004). Acid Production and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* strains isolated from Timimoun's (southern Algeria) camel raw milk. Renc. Rech. Rumin. 11:108.
- Zhang Y, Vadlani PV (2015). Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. J. Biosci. Bioeng. 119:694-699.

## Résumé

Nous avons isolé 133 souches de bactéries lactiques à partir de produits artisanaux (*Klila*, *Hamoum*, *Afermes*, *Couscous aux herbes*, *Miel toute fleurs*) originaires de la région de Tiaret (Ouest algérien). La pré-identification phénotypique montre que 53 souches ont été pré-identifiées à *Lactobacillus brevis*, 35 à *Lactobacillus plantarum*, 37 souches à *Enterococcus faecium*, 7 à *Lactococcus lactis* et une souche à *Enterococcus gallinarum*. L'identification était confirmée par utilisation des galeries biochimiques API 50 CHL, des cartes d'identification Vitek et par MALDI-TOF-MS. L'ensemble des souches présentent un bon pouvoir acidifiant et quelques souches peuvent produire jusqu'à 97 °D abaissant le pH du milieu à pH 3,9. Les souches de *Lactococcus lactis* sont les plus acidifiantes. L'activité protéolytique s'exprime sur milieu MRS additionné de 2% de lait écrémé chez la majorité des bactéries avec des diamètres de zone de protéolyse arrivant à 14 mm pour certaines souches de *Lactobacillus brevis*. Le pouvoir lipolytique sur milieu MRS additionné de matière grasse du lait était décelé pour la majorité des bactéries, cette activité était remarquable chez *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. Les souches isolées de *Klila* et quatre souches isolés de *Hamoum* produisent des EPS sur milieu MRS hypersaccharosé. Certaines souches produisent la citratase et d'autres arrivent à la production de diacétyle. La production de diacétyle est optimisée pour les deux souches HMTK8 (*Lactobacillus brevis*) et HMTK21 (*Lactobacillus plantarum*) dans le milieu MRS et dans le lait écrémé. La meilleure production de diacétyle s'effectue à pH 4,3 et à 21°C, en présence de 15 g/l de glucose et 0,3 g/l de citrate. Les quantités de diacétyle produites dans le lait étaient supérieures à celles dans le milieu MRS et variables d'une souche à l'autre. La production est liée à la croissance bactérienne : elle est maximale (0,2 ppm) au bout de 12h d'incubation pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne.

### Mots clés :

Produits artisanaux; Bactéries lactiques; *Lactococcus*; *Lactobacillus*; *Enterococcus*; Identification; Caractéristiques technologiques; Diacétyle; Acétoïne; Optimisation.