

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MENTOURI CONSTANTINE

**INSTITUT DE LA NUTRITION DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES
AGRO- ALIMENTAIRES**

N° d'ordre :
N° de série :

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

En MICROBIOLOGIE et ENZYMOLOGIE

Option : **GENIE ALIMENTAIRE**

Présentée par

BEKHOUCHE FARIDA

TITRE

**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**

Soutenue le /2006

Devant le jury composé de:

Président :	Prof. AIT- AMMAR	H.	Faculté des sciences - USTHB -Univ- Alger
Rapporteur :	Prof. BOULAHROUF	A.	Faculté des sciences- I.S.N.- Univ. Mentouri- Constantine
Examineurs :	Prof. LEVEAU	J-Y.	E.N.S.I.A.- Massy- Paris- France
	Prof. ZADI- KARAM	H	Faculté des sciences- I.S.N.- Univ- ORAN
	Dr. AMOURACHE	L	I.N.A.T.A.A. -Univ. Mentouri- Constantine
	Dr. BENGUEDOUAR	N.	Faculté des sciences -I.S.N.-Univ. Mentouri- Constantine

REMERCIEMENTS

Les premiers dosages de l'enzyme polygalacturonase (Chapitre 3) ont été réalisés au sein de l'équipe de recherche de physicochimie et enzymologie des polysaccharides (Unité de recherche sur les polysaccharides leurs organisations et interactions), associé à l'I.N.R.A. de Nantes (France) et dirigé par le professeur J.F. THIBAULT. Je le remercie de m'avoir accueilli. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Madame E. BONNIN chercheur au niveau de ce laboratoire qui m'a initié aux techniques de dosages enzymatiques et pour tous ses conseils.

Je remercie sincèrement Monsieur le professeur J.Y. LEVEAU et Mademoiselle le professeur M. BOUIX, responsables du laboratoire de Microbiologie Industrielle de l'école nationale supérieure des industries alimentaires (E.N.S.I.A. de Massy -France), pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé lors de mes stages pour la réalisation du chapitre 4.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur le professeur A. BOULLAHROUF, dont les encouragements et les conseils bienveillants m'ont permis de réaliser ce travail.

Je tiens aussi à remercier tous les autres membres du Jury,

Monsieur le professeur H. AIT-AMMAR qui a bien voulu présider mon jury de soutenance

Monsieur J.Y. LEVEAU, pour l'intérêt qu'il manifeste à ce travail et pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury

Madame le Professeur H. ZADI-KARAM et les Docteurs, Mademoiselle L. AMOURACHE et Monsieur N. BENGUEDOUAR pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame C. MEKHANCHA et à tous les collègues de l'I.N.A.T.A.A., qui de près ou de loin, par leur aide et leur amitié, m'ont soutenu.

*Je dédie ce travail à mon très cher papa qui vient de nous quitter subitement
A ma mère et à tous les autres membres de ma famille*

SOMMAIRE

PAGES

LISTE DES TABLEAUX	i
LISTE DES FIGURES	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	iii
INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Les substances pectiques	6
1-1. Structure	6
1-1-1. La zone lisse	6
1-1-2. La zone hérissée	6
1-2. Localisation	8
1-3. Propriétés physico-chimiques	11
2. Les enzymes de dégradation des substances pectiques	14
2-1. Introduction	14
2-2. La dégradation des homogalacturonanes (zone lisse)	14
2-2-1. Les polygalacturonases (PG)	15
2-2-2. Les lyases	16
2-2-3. Les estérases	18
2-3. La dégradation des zones hérissées	19
2-3-1. La dégradation des rhamnogalacturonanes (RG)	19
2-3-2. La dégradation des chaînes latérales	19
3. Les bactéries lactiques	21
3-1. Introduction	21
3-2. Habitat	21
3-3. Classification	22
3-3-1. Les coques lactiques	23
3-3-2. Le genre <i>Lactobacillus</i>	25
3-4. Propriétés métaboliques	27
3-4-1. Le métabolisme des sucres	27
3-4-2. Le métabolisme du citrate	27
4. La microflore des olives	33
4-1. Les Olives	33
4-2. La flore des olives	33
4-2-1. Les bactéries	34
4-2-2. Les Levures	35
4-2-3. Les moisissures	36
ETUDE EXPERIMENTALE	
Chapitre 1: Bactéries lactiques isolées à partir de lait cru	
1. Introduction	37
2. Matériel et méthodes	37
2-1. Origine des échantillons de laits	37
2-2. Dénombrement	38
2-3. Identification	38
2-3-1. Caractères morphologiques	39

2-3-2. Caractères biochimiques et physiologiques	39
3. Résultats	42
3-1. Dénombrement	42
3-2. Isolement	42
3-3. Identification	44
4. Discussion	50
5. Conclusion	52
Chapitre 2 : Etude de la microflore pectinolytique isolée à partir des olives noires et vertes	
1. Introduction	53
2. Matériel et méthodes	53
2-1. Présentation et préparation des échantillons	53
2-2. Dénombrement de la flore totale pectinolytique	54
2-3. Isolement	54
2-4. Identification des bactéries	54
2-4-1. Etude des caractères morphologiques	54
2-4-2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques	54
2-5. Identification des levures	56
2-5-1. Les caractères culturaux	56
2-5-2. Les caractères morphologiques	56
2-6. Identification des moisissures	56
2-6-1. Les caractères culturaux	56
2-6-2. Les caractères morphologiques	58
3. Résultats	58
3-1. Dénombrement	58
3-2. Isolement	58
3-3. Identification des bactéries	60
3-3-1. Caractères morphologiques et culturaux	60
3-3-2. Caractères biochimiques et physiologiques	60
3-4. Identification des levures	65
3-5. Identification des moisissures	65
4. Discussion	66
5. Conclusion	67
Chapitre 3 : Mise en évidence de l'activité pectinolytique et évaluation de la polygalacturonase	
1. Introduction	68
2. Matériel et méthodes	69
2-1. Présentation des souches utilisées	69
2-2. Mise en évidence de la dégradation de la pectine	69
2-2-1. Test d'acidification	69
2-2-2. Test de clarification	69
2-3. Croissance cellulaire et production de polygalacturonase	70
2-3-1. Evaluation de la biomasse cellulaire	70
2-3-2. Mesure de l'activité polygalacturonase	71
3. Résultats	73
3-1. L'acidification du milieu	73
3-2. L'hydrolyse enzymatique	73
3-2-1. L'hydrolyse enzymatique selon la technique de TANSEY (1971)	73
3-2-2. L'hydrolyse enzymatique selon la technique de MCKAY (1988)	78

3-3. Production de polygalacturonase et de biomasse	78
4. Discussion	80
5. Conclusion	82
Chapitre 4. Optimisation de l' Activite polygalacturonase produite par des microorganismes isolés du lait cru et des olives noires et vertes	
1. Introduction	83
2. Matériel et méthode	84
2-1. Souches étudiées	84
2-2. Cinétique de production de polygalacturonase et de biomasse	84
2-3. Effet de la concentration en APG et du pH sur la production polygalacturonase et de biomasse	84
2-4. Culture des deux souches en bioréacteur	85
2-5. Etude microscopique à fluorescence des souches ONRh9 et LLn1	85
3. Résultats	87
3-1. Cinétiques de productions de polygalacturonase et de biomasse des souches sélectionnées	87
3-2. Influence des paramètres de cultures	90
3-3. Cinétiques de productions de cellules et d'enzymes PG en bioréacteur	92
3-4. Etude microscopique à fluorescence de la souche ONRh9	93
3-5. Etude microscopique à fluorescence de la souche LLn1	94
4. Discussion	95
5. Conclusion	96
CONCLUSION GENERALE	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101
ANNEXES	
I. Figures 3 et 4	1'
II. Milieux de cultures utilisées pour l'étude des bactéries lactiques isolées du lait cru	2'
III. Milieux de cultures utilisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes pectinolytiques à partir des olives noires et vertes	5'
IV. Les solutions utilisées pour la réaction colorimétrique permettant le dosage de l'activité PG	8'
V. Figures 20, 21 et 22	9'
RESUMES	

LISTE DES TABLEAUX

PAGES

Tableau 1.	Composition des parois de fruits, de légumes et de céréales	8
Tableau 2.	Teneur en pectine de différents fruits et légumes	9
Tableau 3.	Les enzymes qui interviennent dans la dégradation des régions HG, RG et des chaînes Latérales des pectines	13
Tableau 4.	Les différents genres de bactéries lactiques	23
Tableau 5.	Classification des lactobacilles selon ORLA- JENSEN (1919)	26
Tableau 6.	Nouvelle classification des Lactobacilles selon Atlan <i>et al.</i> (2000)	27
Tableau 7.	Composition chimique de l'olive	32
Tableau 8.	Présentation des stations d'élevages et Origine des échantillons de lait cru	38
Tableau 9.	Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/mL de lait) dans le lait de chaque station d'élevage et dans les différents milieux utilisés	42
Tableau 10.	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches des genres <i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Enterococcus</i>	43
Tableau 11.	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches du genre <i>Leuconostoc</i>	45
Tableau 12.	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches du genre <i>Pediococcus</i>	46
Tableau 13.	Caractéristiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i>	48
Tableau 14.	Bilan des souches de bactéries lactiques isolées et identifiées	49
Tableau 15.	Bilan des espèces de bactéries lactiques identifiées	51
Tableau 16.	Morphologie des souches bactériennes isolées des échantillons d'olives noires	59
Tableau 17.	Morphologie des souches bactériennes isolées des échantillons d'olives vertes	61
Tableau 18.	Souches, en forme de bacilles, isolées des échantillons d'olives noires et vertes	62
Tableau 19.	Coques lactiques isolées des échantillons d'olives noires et vertes	63
Tableau 20.	Souches de levures isolées des échantillons d'olives noires (S9 et S10) et vertes (S'2 et S'4)	64
Tableau 21.	Acidification du milieu MP5 par les souches isolées	72
Tableau 22.	Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène	77
Tableau 23.	Production de biomasse et de PG des souches isolées	79

LISTE DES FIGURES

PAGES

Figure 1.	Structure type du squelette des substances pectiques	5
Figure 2.	Structures de la chaîne principale (composée d'acide galacturonique, d'acide galacturonique méthylé et de rhamnose) et de la chaîne latérale (constituée de divers oses)	5
Figure 3.	Principales unités glucidiques constituant les substances pectiques	1'
Figure 4.	Structure type des polymères d'arabinose	1'
Figure 5.	Configuration schématique de l'architecture de la paroi primaire des dicotylédones	7
Figure 6.	Acide galacturonique (<i>a</i>), acide galacturonique méthylé (<i>b</i>) et polymère d'acide polygalacturonique (<i>c</i>) et plus ou moins acide selon son degré de méthylation (COOH-CH ₃) (<i>d</i>)	10
Figure 7.	Liaison de deux chaînes d'acide galacturonique non méthylé en présence de calcium (<i>a</i>) et (<i>b</i>)	12
Figure 8.	Les différentes voies de dégradation enzymatique des pectines	14
Figure 9.	Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique	16
Figure 10.	Action des pectines-lyases	17
Figure 11.	Action des pectates-lyases	17
Figure 12.	Action des pectines-méthylestérases	18
Figure 13.	Action des pectines-acétylestérases	18
Figure 14.	La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire	30
Figure 15.	Le métabolisme de citrate chez les bactéries lactiques	31
Figure 16.	Coupe schématique du fruit de l'olive	32
Figure 17.	Evaluation en pourcentage du nombre de microorganisme dénombré dans les échantillons d'olives noires (ONF ; ONCS) et vertes (OVF ; OVCS)	57
Figure 18.	Evolution de la hauteur de clarification du milieu MP5 par les souches isolées du lait cru	74
Figure 19.	Evolution de la hauteur de clarification du milieu MP5 par les souches isolées des olives noires et des olives vertes	75
Figure 20.	Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène des bactéries lactiques isolées des échantillons de lait cru	9'
Figure 21.	Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène des souches isolées des échantillons d'olives noires	10'

Figure 22.	Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène des souches isolées des échantillons d'olives vertes	11'
Figure 23.	Cinétiques de production de polygalacturonase et de biomasse des souches isolées du lait	86
Figure 24.	Cinétiques de production de polygalacturonase et de biomasse des souches isolées des olives noires et vertes	88
Figure 25.	Influence de la concentration en APG et du pH sur la production de la biomasse et de la PG des souches ONRh9 (<i>a et b</i>) et LLn1 (<i>c et d</i>)	89
Figure 26.	Production de biomasse et de PG, par les souches ONRh9 et LLn1, cultivées en fermenteur à pH contrôlé (<i>a et c</i>) et non contrôlé (<i>b et d</i>)	91
Figure 27.	Observation microscopique à fluorescence (x100) de la souche ONRh9 (<i>Rhodotorula</i>) cultivé en fermenteur, dans le milieu MAPG5 à pH 6 et 10 g.L ⁻¹ d'APG (<i>a et b</i>) et dans le milieu saboureaud à pH 6 et 20 g.L ⁻¹ de glucose (<i>c et d</i>)	93
Figure 28.	Observation microscopique à fluorescence (x100) de la souche LLn1 cultivée en fermenteur dans le milieu MAPG5 à pH 5,5 et 5 g.L ⁻¹ d'APG (<i>a et b</i>) et dans le milieu Mayeux à pH 6,5 et 20 g.L ⁻¹ de glucose (<i>c et d</i>)	94

LISTE DES ABREVIATIONS

AG :	Acide galacturonique
APG :	Acide polygalacturonique
DAc :	Degré d'acétylation
DE :	Degré d'estérification
DM :	Degré de méthylation
DP :	Degré de polymérisation
DO :	Densité optique
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EMP :	Embden- Meyerhof-Parnas
ES :	Enzyme-substrat
G-C :	Guanine- Cytosine
HG :	Homogalacturonanes
HM :	Pectine hautement méthylée (high methyl)
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
LM :	Pectine faiblement méthylée (low methyl)
Me :	Groupe méthoxyl
ONCS :	Olives noires conservées dans du sel
ONF :	Olives noires fraîches
OVCS :	Olives vertes conservées dans du sel
OVF :	Olives vertes fraîches
PAE :	Pectines-acétylestérases
PAL :	Pectates-lyases
PEP :	Phospho-énolpyruvate
<i>Pc.</i>	<i>Pediococcus</i>
PG :	Polygalacturonases
PL :	Pectines-lyases
PME :	Pectines-méthylestérases
PTS :	Phosphotransférase
RG :	Rhamnogalacturonanes
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
XG :	Xylogalacturonanes

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie des jus offre, aux dépolymérase des substances pectiques, un large champ d'utilisation dans la transformation des produits végétaux. Ces enzymes trouvent ainsi, plusieurs applications dans les productions diverses, telles que les boissons à base de fruits ou de légumes et autres. Parmi ces enzymes, les polygalacturonases (PG) ont un effet considérable sur la modification des propriétés physico-chimiques des pectines et des pectates (RZEDOWSKI, 1972; DURAND et MONSAN 1982).

Durant les différentes étapes de transformation du végétal, les enzymes PG contribuent à l'amélioration en rendement et en qualité des jus et des nectars obtenus. Les étapes successives de l'obtention du produit fini sont : le broyage, le pressurage, la centrifugation ou la filtration, puis éventuellement, selon le produit désiré, une clarification, une concentration et une pasteurisation. Le broyage entraîne la solubilisation partielle des pectines. La pulpe obtenue, est un milieu hétérogène dans lequel la phase liquide est très visqueuse. La phase solide forme une masse semi-gélifiée dont la capacité de rétention d'eau élevée, limite l'écoulement du jus au moment du pressurage. Avant l'étape du pressurage, l'addition d'enzymes (enzymage) polygalacturonase associée à d'autres enzymes pectinolytiques (pectinmethylestérase et pectinlyases) à la pulpe augmente ainsi les rendements lors de la fabrication des jus. De plus, la dégradation partielle des tissus du fruit par ces enzymes, favorise l'extraction des pigments et des arômes et contribue à améliorer les qualités organoleptiques du produit (VORAGEN *et al.*, 1995). L'enzymage entraîne également une baisse de viscosité qui améliore la filtrabilité des jus. Il permet de réduire le temps de filtration lors de la clarification des moûts, ainsi que le temps et l'énergie nécessaires à l'évaporation des jus limpides pour la fabrication des concentrés (YAMASAKI *et al.*, 1964 ; WINTAKER, 1990b; SHOMER, 1991). Les nectars produits en industrie sont des boissons pulpeuses dans lesquelles le jus visqueux maintient une quantité importante de matières en suspension. Ce trouble est essentiellement constitué de cellules isolées ou d'agrégat de cellules. Selon le fruit traité et en particulier pour les agrumes, le nectar produit un trouble quelquefois très instable. Cette instabilité pourrait être évitée par l'utilisation des enzymes polygalacturonases. Elles hydrolysent les pectines solubilisées en oligomères de taille trop petite afin d'éviter la formation du gel insoluble et qui précipite les particules du trouble (DUCROO, 1982; LAO *et al.*, 1997). A l'échelle expérimentale, ces procédés ont été appliqués à de nombreux fruits et légumes (concombre, carotte, pomme de terre, ail, abricot, pêche, prune). Les moûts ainsi produits, ont une teneur en matière sèche et en cendres plus élevées, une couleur plus intense et un pH plus faible qu'un témoin non additionné d'enzyme.

Du fait de ses nombreux avantages, le champs d'application de ce procédé s'élargit, actuellement à d'autres productions que celles des jus de fruits et de légumes : comme pour l'extraction des huiles essentielles et des pigments caroténoïdes à partir des écorces d'agrumes (BONNIN *et al.*, 1997a).

L'isolement des souches susceptibles d'utiliser la pectine comme seule source de carbone et d'énergie, est justifié en raison de l'intérêt économique du substrat et de son produit d'hydrolyse. Les pectinases industrielles sont fabriquées par plusieurs compagnies en Europe, au USA et au Japon et les plus commercialisées proviennent toutes des espèces d'*Aspergillus*, surtout d'*Aspergillus niger*. Les préparations des pectinases à partir de cette moisissure contiennent les polygalacturonases, les pectinestérases et les pectines lyases. Mais, d'autres activités enzymatiques parfois indésirables, sont liées à elles (PILNIK et ROMBOUTS, 1981). C'est la raison pour laquelle ces enzymes ont été étudiés chez d'autres microorganismes. Les PG sont les premières enzymes pectolytiques produites par les microorganismes phytopathogènes pour coloniser la plante et sont très répandues chez l'ensemble des microorganismes (COLLMER et KEEN, 1986 ; RODRIGUEZ-PALENZUELA *et al.*, 1991). Différentes espèces de levures productrices de polygalacturonase telles que : *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* et *Geotrichum* sont citées par plusieurs auteurs (BLANCO *et al.*, 1994; ESTEVEZARZOSO *et al.*, 1998; GUESSOUS *et al.*, 2000). Des fractions protéiques correspondant à des activités PG de type endo ont aussi été purifiées à partir de préparations d'*Aspergillus niger* (SINGH et RAO, 2002 ; GUPTA *et al.*, 1993 ; THIBAUT et MERCIER, 1978) et des exopolygalacturonases sont produites par *Alternaria mali* (AKI-3) (NOZAKI *et al.*, 1997). L'activité polygalacturonase a aussi été étudiée chez les bactéries telles que les *Bacillus* (SOARES *et al.*, 1999). Les olives constituent un milieu favorable pour le développement des microorganismes pectinolytiques. Les microorganismes isolés à partir des olives noires et vertes commercialisées sous forme saumurées appartiennent généralement aux genres *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Cryptococcus*. Selon plusieurs auteurs les espèces de ces genres sont pectinolytiques (CATULO *et al.*, 2002 ; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2004; CAMPANIELLO *et al.*, 2005). Mais, peu de travaux sont publiés sur l'existence des enzymes pectinolytiques produites par des bactéries lactiques. JUVEN *et al.* (1985) ont mis en évidence la production d'enzymes pectinolytiques par la souche *Leuconostoc mesenteroides*. SAKELLARIS *et al.* (1988 et 1989) ont étudié la synthèse extracellulaire et effectué la purification et la caractérisation de l'enzyme polygalacturonase par *Lactobacillus plantarum*.

Les travaux de KARAM (1995) ont montré la présence d'activités pectinolytiques chez les bactéries lactiques.

Parmi les 80 espèces étudiées par ces deux auteurs, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis*, ont présenté une activité polygalacturonase et peuvent se développer sur un milieu ne contenant que de l'acide polygalacturonique comme source de carbone et d'énergie. KARAM (1995) a par ailleurs obtenu la clarification d'un milieu synthétique contenant 1% de pectine en utilisant un surnageant de culture de *Lactobacillus casei* concentré 20 fois. Des préparations de pectinases de bactéries lactiques pourraient aussi être utilisées pour la clarification des jus des végétaux. Selon cet auteur, cette propriété technologique semble intéressante et devrait être prise en compte dans la sélection des souches lactiques utilisées pour les ensilages ou les industries cidricoles. En 2002 Avallon *et al.* ont déterminé l'activité endopolygalacturonase chez *Lactobacillus brevis* L166 destinée à la fermentation du café arabica. Et, ZADI-KARAM (1998) a montré la présence de polygalacturonase chez 14 souches de *Lactococcus lactis* isolées à partir d'échantillons de lait de chamelle.

Les bactéries lactiques présentent aussi d'autres intérêts dans l'industrie qui leurs sont acquis depuis fort longtemps. Elles assurent des caractéristiques particulières d'arômes et de texture et une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits (acides lactiques et acétiques) qui abaissent le pH dans le milieu. La synthèse de bactériocines permet aussi le renforcement de la conservation des produits alimentaires contenant les bactéries lactiques. Tous les produits alimentaires de transformation sont concernés. Dans les produits carnés, la viande conduit à des saucisses fermentés ou à des produits saumuré secs. Le lait est transformé en fromage, yaourt, crème, beurre et autres produits laitiers. Les produits végétaux (fruits, légumes et céréales) subissent aussi dans de nombreux pays, une fermentation lactique qui est impliquée dans la fabrication des boissons, des pains, du chou et la transformation du soja (DESMAZEAUD, 1996). Les espèces du genre *Lactococcus*, appelé communément souches acidifiantes, sont utilisées principalement dans la fabrication des fromages à pâte fraîche (Féta, Camembert et Roquefort). Ceux du genre *Leuconostoc* sont utilisées dans la fabrication des fromages à pâtes persillées : Roquefort (NOVEL, 1993) et pour la production des arômes (LEVATA-JOVANOVIC et SANDINE, 1997). Les *Pediococcus* sont utilisées principalement dans les aliments fermentés, carnés et végétaux (SKYTÄA *et al.*, 1993).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont utilisées comme levains dans des grandes variétés de fermentations de produits laitiers et autres. Elles interviennent dans la fermentation du café et du cacao (AVALLONE *et al.*, 2002), des ensilages, des olives, de la choucroute et comme levains lactiques dans la charcuterie (Guiraud, 1998).

Elles participent à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit (*Lb. plantarum* et *Lb. acidophilus*), à la maturation du saucisson sec et dans la fermentation lactique de nombreux végétaux (LARPENT, 1991, ZINK *et al.*, 2000).

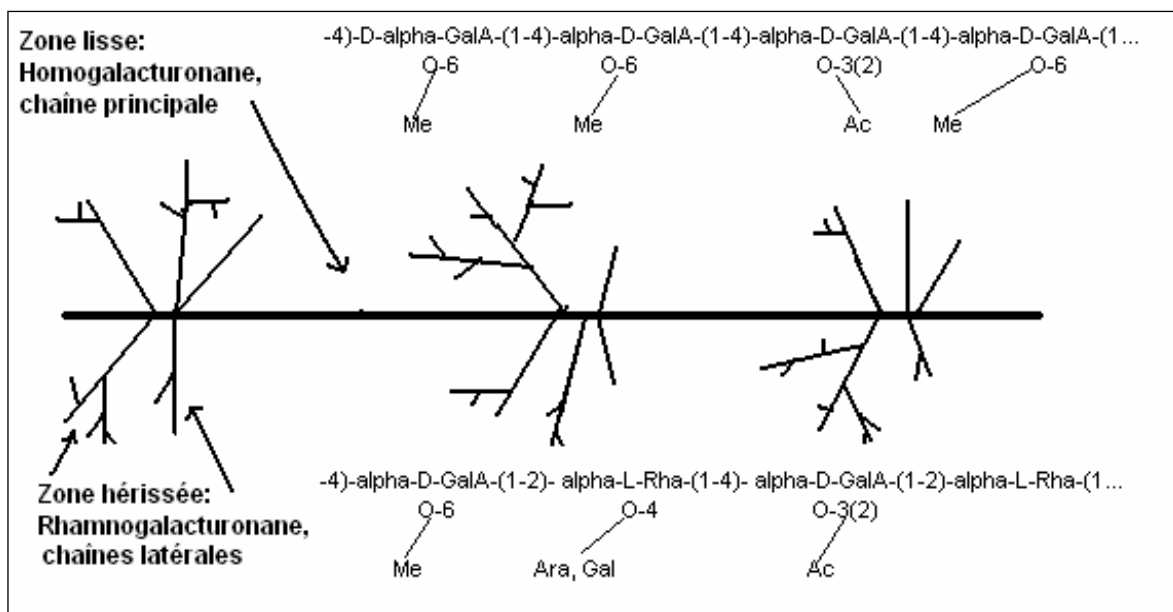
Pour toutes ces raisons, nous nous sommes intéressés aux microorganismes producteurs de pectinase et notre choix est porté sur leur isolement à partir du lait cru de vache et des olives noires et vertes. Pour cela, les objectifs fixés sont :

- L'isolement des bactéries lactiques, à partir des laits crus provenant des vaches importées et élevées dans des conditions d'alimentation et d'environnement locales.
- Les souches obtenues vont être étudiées pour leur activité pectinolytique et constituent aussi une contribution de notre part dans l'acquisition d'un soucier qui fera par la suite l'objet d'études diverses au sein du laboratoire de microbiologie de l'institut I.N.A.T.A.A.
- L'isolement des microorganismes producteurs d'enzymes pectinolytiques à partir d'échantillons d'olives noires et vertes traitées et non traitées.
- La mise en évidence de l'activité pectinolytique des souches obtenues, par le test de l'acidification du milieu de culture et la révélation de l'hydrolyse enzymatique selon les techniques de MCKAY (1988) et de TANSEY (1971).
- La caractérisation des souches fortement sécrétrices de l'enzyme polygalacturonase.
- L'étude des effets du pH et de la concentration en acide polygalacturonique (APG) ainsi que l'influence du pH initial contrôlé et non contrôlé sur les productions de la biomasse et de la PG, en fermenteur chez deux souches représentatives.

La partie expérimentale est précédée d'un aperçu des travaux antérieurs relatifs à :

- La présentation du substrat pectine et des enzymes pectinolytiques,
- La caractérisation des bactéries lactiques du lait,
- La caractérisation de la flore lactique des olives en générale et productrice de polygalacturonase en particulier.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



Ara : Arabinose, Gal : galactose, Rha : rhamnose, Me : méthanol, Ac : acide acétique

Figure 1. Structure type du squelette des substances pectiques (BONNIN *et al.*, 1997a)

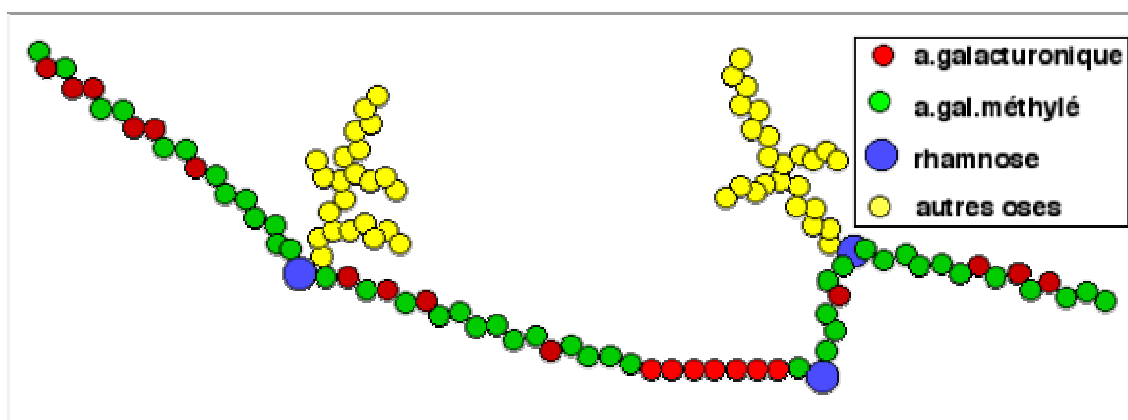


Figure 2. Structures de la chaîne principale (composée d'acide galacturonique, d'acide galacturonique méthylé et de rhamnose) et de la chaîne latérale (constituée de divers oses) (http://www.Unilim.fr/thèses/2003/sciences/2003_limo002/thèse_notes).

1. LES SUBSTANCES PECTIQUES

1-1. STRUCTURE

Les pectines sont constituées d'une zone lisse formée d'homogalacturonanes (HG) et d'une zone hérissée composées de rhamnogalacturonanes (RG) et de chaînes latérales (Fig. 1 et 2). Ce sont des complexes de polysaccharides à forte teneur en acide galacturonique (AG) et une faible quantité de rhamnose et d'oses neutres (fig. 3 : annexe I) (VORAGEN *et al.*, 1995 ; BONNIN *et al.*, 1997a).

1-1-1. La zone lisse

Elle est formée d'homogalacturonanes qui sont des polymères composés principalement d'acide D- galacturonique liés en α (1-4) sur des longueurs d'au moins cent résidus et d'une faible quantité de rhamnose.

1-1-2. La zone hérissée

La zone hérissée est représentée par des hétéropolymères divisés en deux groupes.

- **Les rhamnogalacturonanes** constituent le groupe 1. C'est une chaîne composée d'une alternance d'acides D-galacturonique liés en α -1-2 et de rhamnose liés en α -1-4 sur une longueur d'au moins vingt résidus.
- **Les chaînes latérales** représentent le groupe 2. Elles diffèrent du précédent par la diversité et le nombre de sucres (60) qu'elles contiennent. Elles sont composées d'oses neutres, les plus abondants sont l'arabinose, le galactose, le xylose en quantité faible et parfois du glucose, du mannose, de l'acide gluconique et d'autres oses rares (méthylfucose et méthylxylose). L'arabinose et le galactose forment des polymères, d'arabinanes, de galactanes et d'arabinogalactanes, liés au squelette principal au niveau des résidus de rhamnose. Les arabinanes sont des polysaccharides ramifiés avec un squelette composé d'unités L - arabinofuranosyl liées en α (1-5) transportant une chaîne latérale et d'une courte unité de L - arabinofuranosyl liée en α (1-3) en O-3 et/ou O-2)(Fig. 4a : annexe I). Les arabinogalactanes ont un squelette de galactose portant des ramifications d'arabinoses. Ils sont représentés par deux types. Le type 1 possède un squelette linéaire de D- galactose en α (1-4) et porte généralement au niveau de l'O-3 de courtes chaînes d'arabinose en α (1-5) (Fig. 4b : annexe I). Le type 2 est composé de polymères hautement ramifiés. Le squelette est composé d'unités D-galactose liées en β 1-3

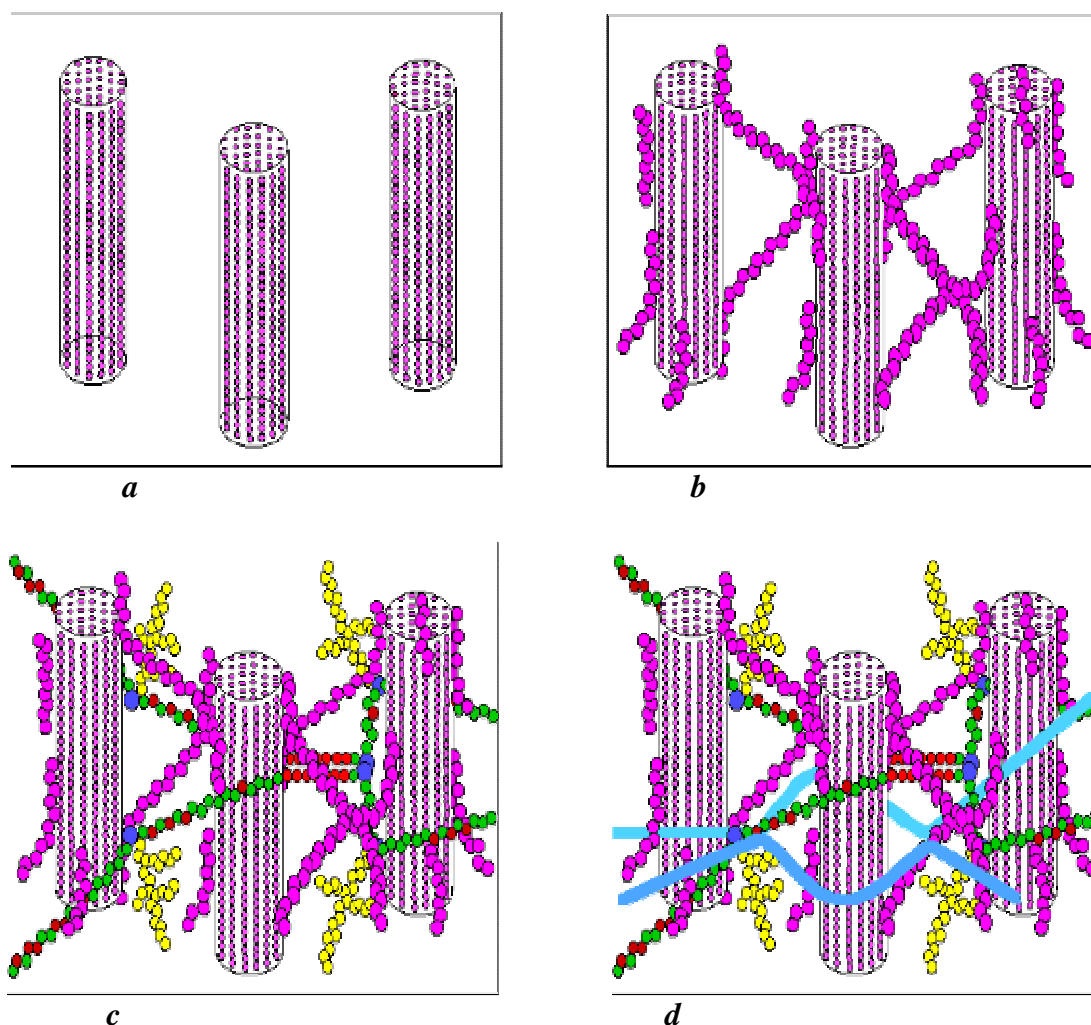


Figure 5. Configuration schématique de l'architecture de la paroi primaire des dicotylédones : Les molécules de cellulose (chaînes de β -glucose) sont associées sous forme de microfibrilles (a). Certaines hémicelluloses comme les xyloglucanes permettent le positionnement des fibrilles cellulosiques entre elles. Cellulose et xyloglucanes sont réunis par des liaisons H (b). Un réseau supplémentaire composé de pectines augmente la complexité de la matrice (c). A la fin de la croissance le réseau polysaccharidique peut être solidifié par un réseau secondaire de protéines composé " Hydroxyproline Rich Glyco Proteins " (HRGP) (d). (<http://www.snvi.jussieu.fr/bmedia/paroi/pectines>).

La ramification est constituée d'une chaîne latérale mixte de D-galactose liée en β 1-3 et des substituants d'arabinoses terminal tous deux situés sur l'O-6 (Fig. 4c : annexe I) (SPELLMAN *et al.*, 1983b ; AMAN et WESTERLUND, 1996 ; ALAIS et LINDEN, 1997).

1-2. LOCALISATION

Les substances pectiques sont localisées essentiellement dans la structure de la lamelle moyenne des régions intracellulaires des plantes supérieures (VORAGEN *et al.*, 1995). Dans le modèle étudié par CARPITA et GIBEAUT (1993), la cellulose constitue l'armature par l'intermédiaire d'une trame lâche. Tandis que, la pectine et les autres constituants forment un ciment permettant la cohésion de l'ensemble (fig. 5).

Dans la paroi primaire, les pectines sont minoritaires par rapport à la cellulose mais elles sont responsables de la perméabilité de la paroi par le contrôle de la taille de ces pores. Dans la paroi des produits végétaux tels que les fruits et les légumes, la quantité des substances pectiques est plus importante dans les tissus des parenchymes et plus faible dans les tissus ligneux. Par contre dans la paroi des céréales, la concentration en pectine est très faible dans les deux tissus (Tab.1). Certains sous-produits de l'industrie alimentaire, comme les écorces d'agrumes, le marc de pomme et la pulpe de betterave, peuvent être considérés comme d'excellentes sources de pectine et de fibres alimentaires (Tab. 2) (BONNIN *et al.*, 1997a, THIBAUT et RALET, 2001).

Tableau 1. Composition des parois de fruits, de légumes et de céréales (BONNIN *et al.*, 1997a)

Composition (%) du poids sec	Fruits et Légumes		Céréales	
	Parenchymes	Tissus Lignifiés	Parenchymes	Tissus Lignifiés
Substances Pectiques	35 – 45	5	0 - 0.5	0 - 0.5
Cellulose	35	40	3 - 5	30 - 35
Autres Polysaccharides	10	25 – 30	80 – 85	80 – 85
Glycoprotéines	10 – 20	5	10	5 – 10
Lignines + Acide phénolique	5	20 – 25	5	15

Tableau 2 : Teneur en pectine de différents fruits et légumes

Fruits	Teneur en pectine (% du poids frais)	Références
Ecorce d'orange	3,6 – 5,5	RENARD et THIBAUT, 1993
Ecorce de citron	2,5 – 4	KARR, 1976
Ecorce de fruit de la Passion	2,1 – 3,0	HODGSON et KERR, 1991
Marc de pomme	1,5 – 2,5	HODGSON et KERR, 1991
Tamarin	1,71	HODGSON ET KERR, 1991
Banane	0,7 – 1,2	KARR, 1976
Pulpe de betterave	1	KARR, 1976
Papaye	0,66 – 1,0	HODGSON et KERR, 1991
Goyave	0,77– 0,95	HODGSON et KERR, 1991
Mûre	0,72	HODGSON et KERR, 1991
Framboise	0,6 – 0,7	HODGSON et KERR, 1991
Pomme	0,5 – 1,6	KARR, 1976
Fruit de la passion	0,5	HODGSON et KERR, 1991
Lychee	0,42	KARR, 1976
Pêches	0,1 – 0,9	KARR, 1976
Tomate	0,2 – 0,6	KARR, 1976
Carotte	0,2 – 0,5	RENARD et THIBAUT, 1993
Mangue	0,26 – 0,42	HODGSON et KERR, 1991
Ananas	0,04 – 0,13	HODGSON et KERR, 1991

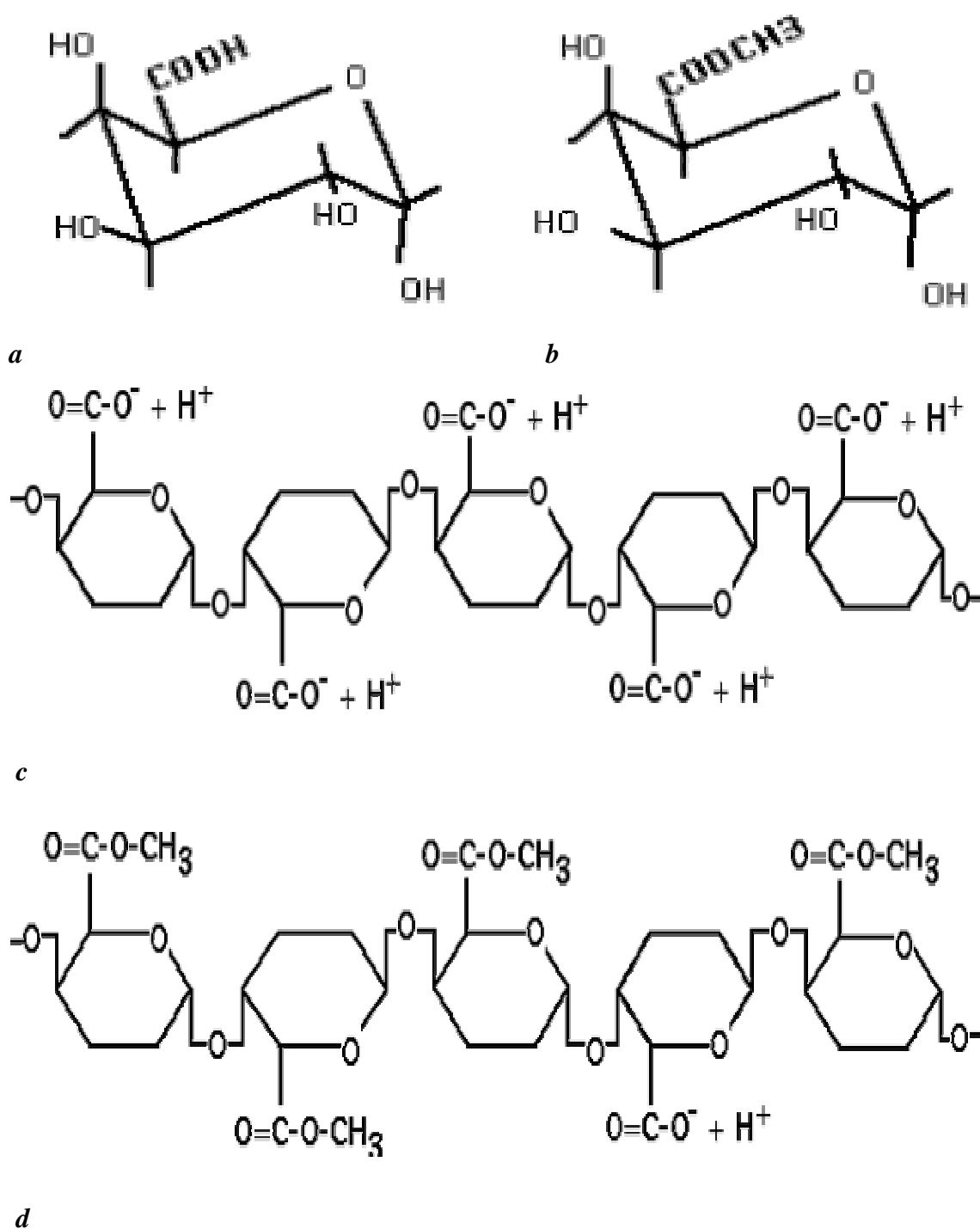


Figure 6. Acide galacturonique (a), acide galacturonique méthylé (b) polymère d'acide polygalacturonique acide (c) et plus ou moins acide selon son degré de méthylation (COO-CH₃) (d) ([http://www.snvi.jussieu.r/b media/paroi/pectines](http://www.snvi.jussieu.r/b%20media/paroi/pectines)).

1-3. PROPRIETES PHYSICO- CHIMIQUES

Les propriétés physico-chimiques des pectines dépendent du degré de méthylation (DM) que l'on exprime en pour cent du nombre de $-\text{COOCH}_3$ (Fig. 6). Leurs teneurs en méthoxyl (Me) et en acide acétique sont généralement exprimées en degrés de méthylation et d'acétylation (DAc), qui sont les rapports molaires entre ces substituants et l'acide galacturonique.

Les pectines natives sont les plus souvent hautement méthylées (HM) (DM > 50). Leurs degrés d'acétylations (DAc) sont par contre généralement faibles avec quelques exceptions comme les pectines de poire ou de betterave. Les DM et les DAc sont des caractéristiques structurales fondamentales des pectines car elles sont reliées à leur aptitude à la gélification et à leur réactivité envers les ions. Pour des pectines HM, le degré d'estérification (DE) conditionne la rapidité de la prise du gel ; plus il est élevé plus la formation du gel est rapide. Alors que les pectines faiblement méthylées (LM) (DM < 50) sont capables de fixer fortement les ions divalents tels que le calcium.

Les HG forment des gels rigides et insolubles en présence du calcium, ce qui laisse à penser qu'ils jouent un rôle important dans la structure des parois cellulaires. Le gel serait formé par l'association de chaînes pectiques, au niveau des zones homogalacturoniques non estérifiées, par l'intermédiaire d'ion calcium (Fig.7a). Cette hypothèse est soutenue par l'observation de la désagrégation des tissus lors du traitement des parois par des agents chélatants du calcium. La prise du gel dépend fortement de la quantité du calcium fixée. Cette réactivité aux ions est également influencée par la distribution des groupements carboxyles libres et par une distribution en bloc qui permet la fixation et conditionne ainsi la texture finale du produit. Dans ce cas, le calcium va favoriser la liaison de deux fragments de chaînes composés d'acide galacturonique non méthylé pour donner une structure dite de boîte à oeufs ou <<eggs box>> (Fig.7b) (BONNIN *et al.*, 1997a ; THIBAUT et RALET, 2001).

Les pectines ont un rôle important dans les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire des végétaux, notamment dans la rétention de l'eau (CUN et LESGARDS, 1993) leurs dégradations sont donc un point clé lors des procédés de pressurage. Certaines pectines peuvent passer en solution et constituer alors une gêne dans les étapes de filtration et de concentration, leur dégradation dans ce cas est nécessaire.

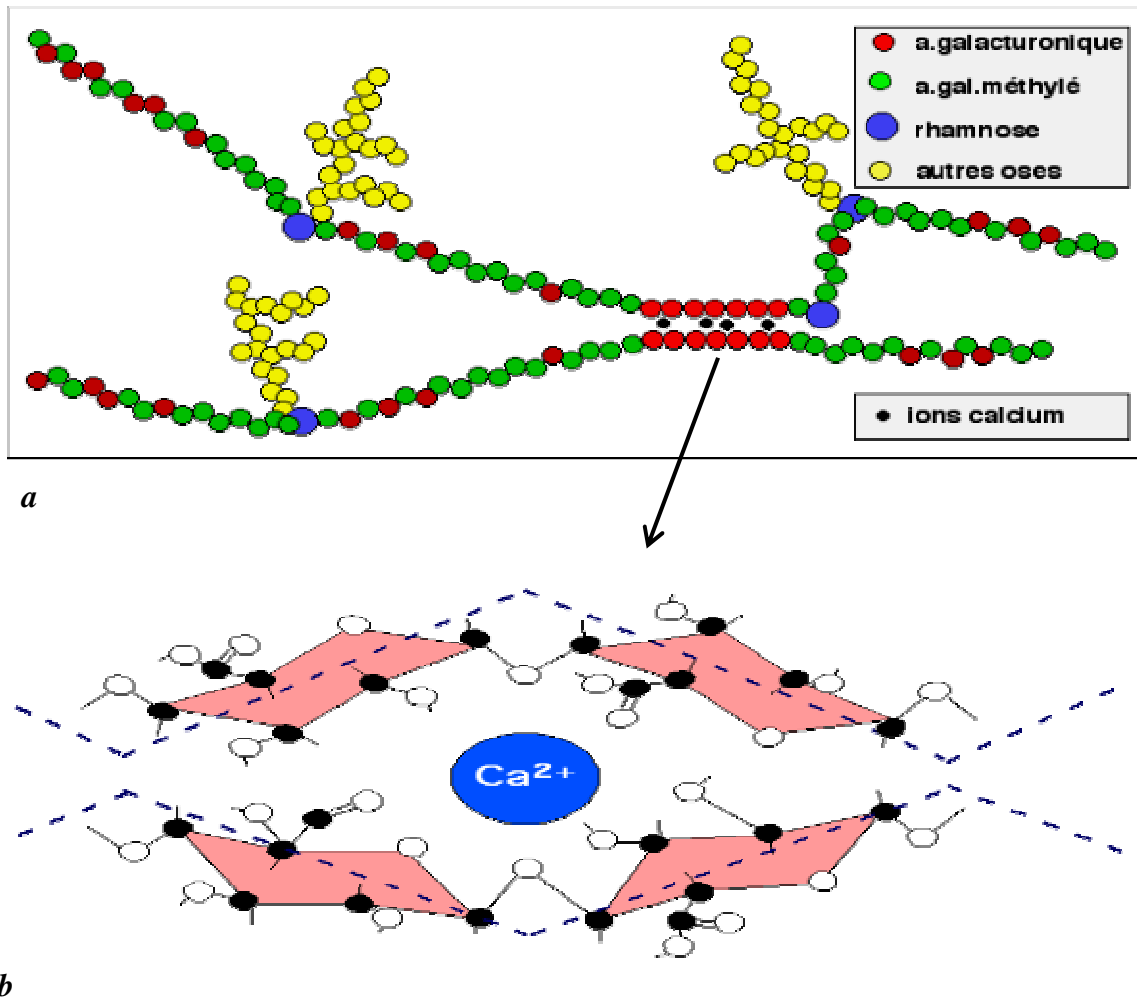


Figure 7. Liaison de deux chaînes d'acide galacturonique non méthylé en présence de calcium (a) et (b) : Le calcium bivalent peut se lier à 9 oxygènes électronégatifs et assurer ainsi la liaison entre 2 chaînes de pectines ([http:// www.Unilim.fr/ thèses/2003/ sciences/2003 thèse_notes](http://www.Unilim.fr/thèses/2003/sciences/2003_thèse_notes)).

Tableau 3. Les enzymes qui interviennent dans la dégradation des régions HG, RG et des chaînes Latérales des pectines
(BENEN *et al.*, 1996b).

	Réaction catalysée	Substrat préférentiel	Mode	Enzymes	EC.	Produits
HG	Hydrolyse *	Pectate	endo	Endopolygalacturonase	3.2.1.15	AG1, AG2 , AG3
		Pectate, ext.non réductrice	Exo	Exopolygalacturonase	3.2.1.67	AG1
		Pectate, ext.non réductrice	Exo	Exopolygalacturonase	3.2.1.82	AG2
	β-élimination	Pectine	endo	Endopolyméthylgalacturonase		
		Pectine	exo	Exopolyméthylgalacturonase		
		Pectate	endo	Endopectate lyase	4.2.2.2	oligomères insaturés
RG	Hydrolyse *	Pectate.ext.non réductrice	exo	Exopectate lyase	4.2.2.9	AG2 insaturé
		Pectine	endo	Endopectine lyase	4.2.2.10	oligomères insaturés
		Pectine.ext.non réductrice	exo	Exopectine lyase		
	β-élimination	RG non substitué	endo	Rhamnogalacturonane-hydrolase		2 à 3 motifs (AG-Rha)
		RG.ext.non réductrice	exo	Rhamnogalacturonane-rhamnohydrolase		
		RG.ext.non réductrice RG.ext.non substitué	endo	Rhamnogalacturonane-lyase		
Chaînes Latérales	Hydrolyse *	Arabinane	endo	Endo-arabinase	3.2.1.99	
		Arabinane arabinogalactane	exo	Arabinofuranosidase	3.2.1.55	
		Arabinogalactane	endo	Endo-galactanase	3.2.1.89	
		Arabinogalactane	exo	β-galactosidase	3.2.1.23	

* : Liaisons glycosidiques ; **HG** : Homogalacturonane ; **RG** : Rhamnogalacturonane

2. LES ENZYMES DE DEGRADATION DES SUBSTANCES PECTIQUES

2-1. INTRODUCTION

Les enzymes qui dégradent les substances pectiques se composent en deux catégories. Les dépolymérases et les estérases agissent au niveau des zones lisses des pectines. Les rhamnogalacturonases, les arabinanases, les galactanases et parfois les férulatestérases interviennent au niveau des zones hérissées (LE GOFF, 2001). Comme toutes les autres enzymes les pectinases sont aussi caractérisées par un numéro de code EC (Enzyme Commission) qui tient compte de la spécificité de la réaction catalysée, du substrat, du mode de coupure et de la nature de la liaison rompue (Tab. 3).

2-2. LA DEGRADATION DES HOMOGALACTURONANES (ZONE LISSE)

Les dépolymérases agissent soit par hydrolyse (Hydrolases) ou par β -élimination (Lyases) sur les liaisons glycosidiques. Elles ont pour substrat préférentiel, les pectines ou les pectates et coupent les liaisons à l'intérieur du polymère (mode endo) ou à partir d'une extrémité de substrat (mode exo). Les enzymes impliquées sont les polygalacturonases (EndoPG, ExoPG) et les lyases (EndoPL et EndoPAL, ExoPAL). Les estérases ou enzymes saponifiantes catalysent la déestérification des groupements méthoxyle des pectines pour former de l'acide pectique et du méthanol. Leur complexe enzymatique est composé de pectinéméthylestérase (PME) ou pectinestérases (PE) et de pectines-acétylestérases.

Leurs modes d'actions sont représentés dans la figure 8.

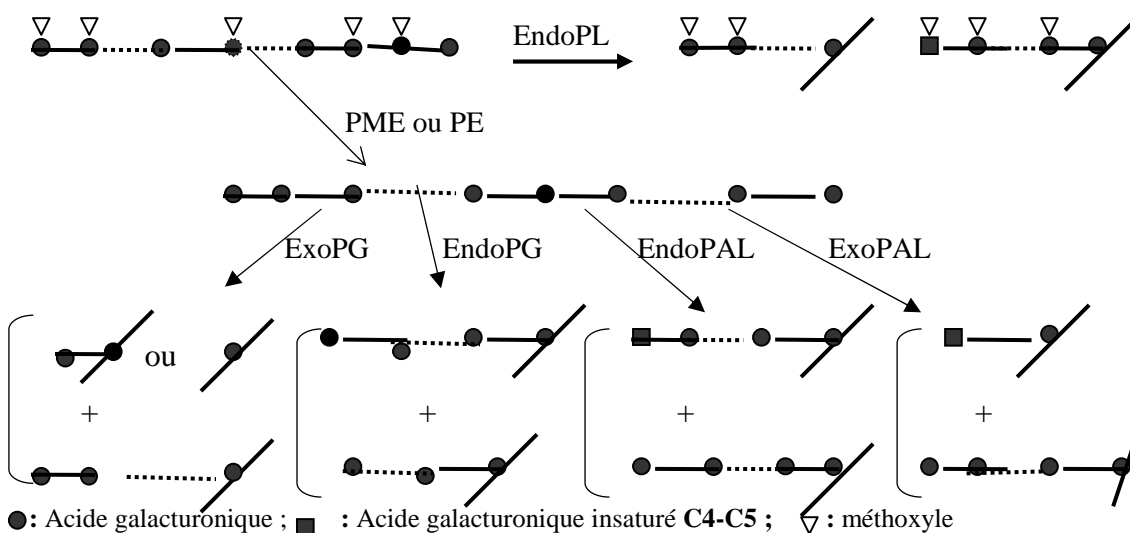


Figure 8. Les différentes voies de dégradation enzymatique des pectines (BARON et THIBAULT, 1985).

2-2-1. Les polygalacturonases (PG)

Les PG coupent la liaison glycosidique α 1-4 reliant deux résidus d'acide galacturonique de la chaîne polygalacturonique. Elles ont pour substrat préférentiel les polygalacturonates. Mais, en fonction de leur sensibilité à la présence de groupement méthoxyl (Me), ces enzymes peuvent réagir différemment. Généralement l'augmentation du DM ralentie l'activité enzymatique et le pourcentage final de liaisons hydrolysées (BENEN *et al.*, 1999). Cependant, certaines enzymes PG sont très actives sur un substrat pas ou peu méthoxylés. Alors que, d'autre ont une activité optimale sur pectine fortement méthoxylé (PARENICOVA *et al.*, 2000a). La présence de groupement acétyles influence également la dégradation des pectines par les PG. Le pourcentage d'hydrolyse d'homogalacturonane est élevé lorsque le degré d'acétylation est faible (RENARD et JAVIS, 1999). Selon leurs modes d'actions, on distingue les endopolygalacturonases et les exopolygalacturonases :

- **Les endopolygalacturonases** (endo PG) (PG, Poly- α -1,4-D-galacturonide glycano-hydrolase, E.C. 3.2.1.15) : Elles attaquent au hasard les liaisons α 1-4 des résidus d'acide galacturonique (AG) pour libérer des monomères (AG1), des dimères (AG2) et des trimères (AG3) d'acide galacturonique en fonction du substrat concerné, pectine ou acide pectique, (REXOVÁ-BENKOVÁ et MARKOVIC, 1976). Cependant, certaines enzymes ne produisent pas de monomères (PATINO *et al.*, 1997a et b) et d'autre ont parmi leurs produits de dégradation des oligomères de degré de polymérisation (DP) supérieurs (ZHANG *et al.*, 1999). Leur mécanisme d'attaque peut avoir lieu de différentes façons :

- Dans l'attaque sur de simples chaînes, une première liaison est hydrolysée au hasard au sein du polymère, puis l'enzyme, en glissant le long de la chaîne, l'hydrolyse totalement. Les oligomères de très faible degré de polymérisation (DP) issues des dégradations successives apparaissent dès le début de la réaction (SAKAI *et al.*, 1993). Ce type d'attaque a été observé chez la PG-I d'*Aspergillus aculeatus* (PASCULLI *et al.*, 1991).

- Dans l'attaque sur plusieurs chaînes, l'enzyme s'associe au hasard avec le substrat pour former un complexe enzyme-substrat (ES). Après la catalyse de la liaison glycosidique, l'enzyme se sépare du polymère et le complexe ES se forme ailleurs indépendamment du premier. Ce mécanisme libère des oligomères de degré de polymérisation (DP) élevé qui seront par la suite dégradés en oligomères de DP de plus en plus faible (GREENWOOD *et MILNE*, 1968 ; BENEN *et al.*, 1996a).

- Dans l'attaque multiple, les deux précédents mécanismes se combinent pour dégrader les chaînes du polymère les unes après les autres. Le complexe enzyme substrat (ES) se forme au hasard, l'enzyme coupe la liaison et le complexe (ES) se reforme ailleurs sur la même chaîne.

Ce mécanisme permet la libération rapide d'oligomères de petits DP; leurs modes d'actions se caractérisent par une chute rapide de la viscosité du substrat en solution.

• **Les exopolygalacturonases** (exo PG) hydrolysent les liaisons α 1-4 entre deux résidus d'acide D-galacturonique : Elles agissent généralement à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne dont les AG ne sont pas estérifiés. Leur action le long de la chaîne peut être bloquée par la présence d'un ester méthylique, de résidus de rhamnose ou de chaînes latérales d'oses neutres. Les exo PG sont de deux types selon le produit de la réaction. Le type I (PG, poly, α -1,4-D-galacturonide galacturonohydrolases, E.C. 3.2.1.67) libère l'AG1 et le type II (PG, poly, α -1,4-D-galacturonide digalacturonohydrolases, E.C.3.2.1.82) libère l'AG2. L'action de ces deux types d'enzymes peut-être gênée par la présence de résidus de rhamnose ou de chaînes latérales d'oses neutres et également la présence de méthoxyl (Me). En effet, lorsque le second résidu à partir de l'extrémité non réductrice est méthoxylé, l'exo-polygalacturonase de type I est incapable de libérer l'AG non réducteur (BARON et THIBAUT, 1985 ; KESTER *et al.*, 1996 ; KÖRNER *et al.*, 1999) (Fig. 9).

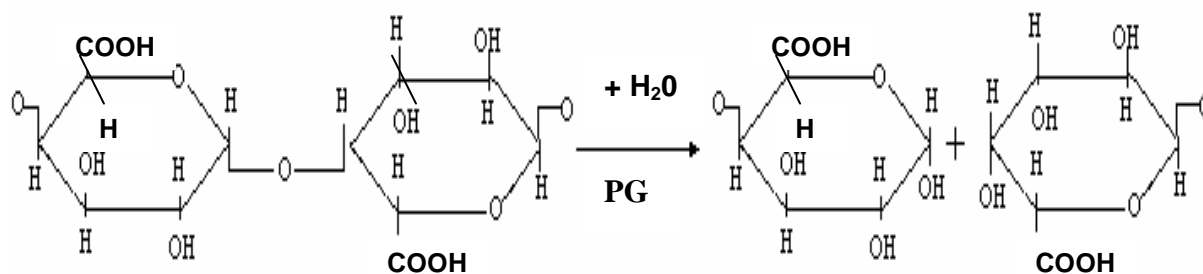


Figure 9. Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique

2-2-2. Les lyases

Les lyases catalysent la dépolymérisation d'un substrat par β -élimination de la liaison glycosidique α 1-4 entre deux résidus d'acide D-galacturonique. L'absence de molécule d'eau dans le mécanisme réactionnel conduit à la formation d'une double liaison entre le C4 et le C5 à l'extrémité non réductrice libérée d'une unité d'acide galacturonique. Comme pour les polygalacturonases, il existe aussi deux types de lyases :

- **Les pectines-lyases (PL)** : Elles ont pour substrat préférentiel la pectine et agissent selon deux modes : - Les endopectines-lyases (endo PL, E.C. 4.2.2.10) agissent par β -élimination et ont une préférence pour les pectines HM. Leur affinité pour les pectines diminue avec le DM du substrat et sont inactives sur l'acide polygalacturonique (APG). Elles coupent la liaison soit entre deux AG méthoxylés, ou entre un résidu AG libre et un résidu AG méthoxylé. Le plus petit substrat est un AG4 totalement méthoxylé (Fig. 10) (LEMBERG *et al.*, 2000a). - Les exopectines-lyases agissent sur les pectines fortement estérifiées, ont récemment été isolées d'*Aspergillus niger* (SUTHERLAND, 1995).

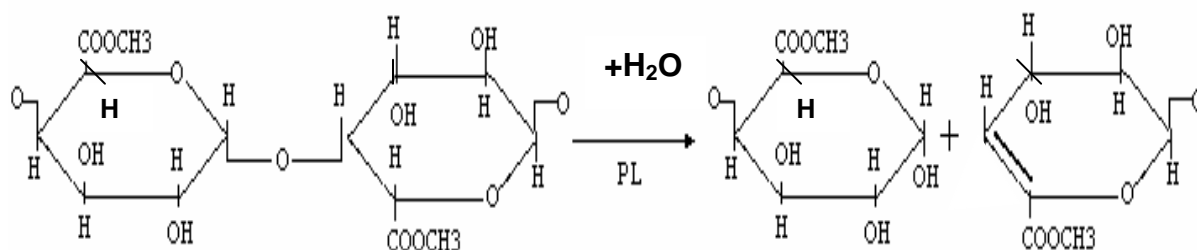


Figure 10. Action des pectines-lyases

- **Les pectates-lyases (PAL)** : Elles agissent préférentiellement sur une chaîne d'acide galacturonique mais aussi sur les pectines faiblement méthylées selon un mécanisme endo ou exo :- Les endopectate-lyases (endo PAL, E.C. 4.2.2.2) attaquent au hasard à l'intérieur de la chaîne polygalacturonique. Le substrat préférentiel est une pectine faiblement méthoxylée (LM) avec un degré de polymérisation (DP) plus élevé. Le plus petit substrat obtenu est un trimère (AG3). - Les exopectate-lyases (exo PAL, E.C. 4.2.2.9) ont une action récurrente à partir de l'extrémité réductrice de l'acide galacturonique en libérant des dimères insaturés (AG2) (REXOVÁ-BENKOVÁ et MARKOVIC, 1976; BARON et THIBAUT, 1985). La présence de calcium serait nécessaire à l'action des endo et des exopectate-lyases (Fig. 11) (JURNAK *et al.*, 1996).

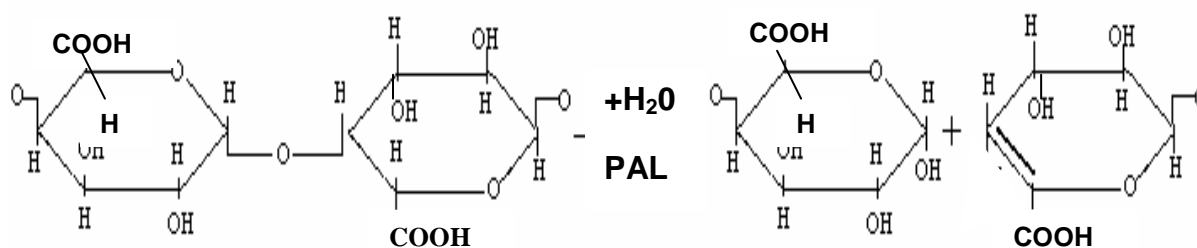


Figure 11. Action des pectates-lyases

2-2-3. Les estérases

- **Les pectines-méthylestérases** ou pectinestérases (PME ou PE, E.C. 3.1.1.11). Elles catalysent l'élimination des groupements méthoxyles fixés sur la pectine pour former de l'acide pectique et du méthanol par hydrolyse des liaisons esters méthyliques sur le C-6 de l'acide galacturonique (Fig. 12). Ce mode d'action conduit à une distribution en bloc des groupements carboxyliques libérés et à une grande sensibilité des acides pectiques produits au Ca²⁺ (KHAN *et al.*, 1990)

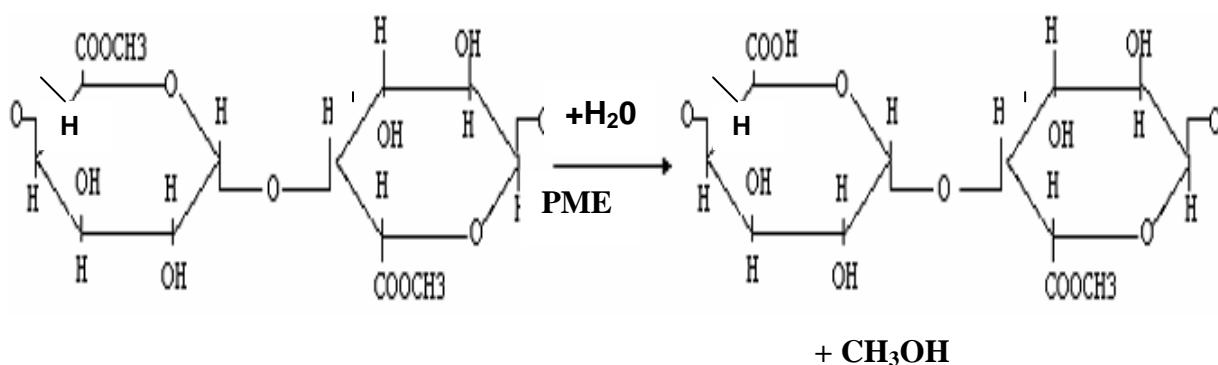


Figure 12. Action des pectines-méthylestérases

- **Les pectines-acétylestérases** (PAE, E.C. 3.1.1.6) : Elles éliminent les acides estérifiés en C-2 ou C-3 des résidus AG (Fig. 13).

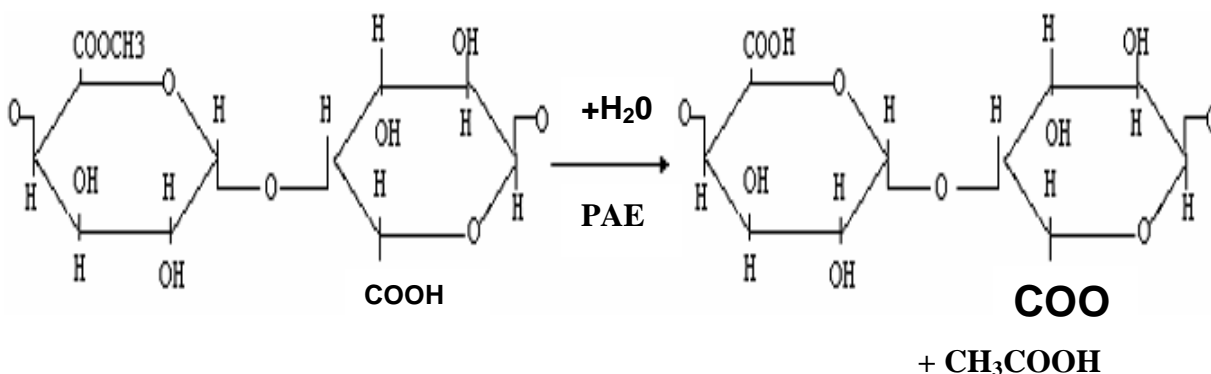


Figure 13. Action des pectines-acétylestérases

2-3. LA DEGRADATION DES ZONES HERISSEES

2-3-1. La dégradation des rhamnogalacturonanes (RG)

La dégradation des rhamnogalacturonanes implique des enzymes actives sur le squelette principal et sur les chaînes latérales. Ces enzymes ont été mises en évidence dans les années 90. Par conséquent, elles ne possèdent pas de numéro E.C. La dégradation du squelette rhamnogalacturonique nécessite l'intervention des hydrolases et des estérases.

- **Les Rhamnogalacturonanes-hydrolases** (RG-hydrolase) : Ce sont des endo enzymes qui interviennent au hasard sur le squelette rhamnogalacturonique et hydrolysent la liaison entre l'AG et le rhamnose au sein des RG. Les produits de dégradation sont des oligomères ayant une structure de base, un tétramère comportant une alternance stricte de 2 ou 3 motifs de rhamnose et d'acide galacturonique (AG). L'extrémité non réductrice de ces oligomères est toujours un résidu rhamnose, alors que l'extrémité réductrice est un acide galacturonique (SCHOLS *et al.*, 1990a).
- **Les Rhamnogalacturonanes-rhamnohydrolases** sont des exo enzymes qui agissent au niveau des extrémités non réductrices du substrat RG et libèrent le rhamnose. Elles peuvent être gênées par la présence de résidu galactose en C-4 du rhamnose (MUTTER *et al.*, 1998 a et b).
- **Les Rhamnogalacturonanes-galacturonohydrolases** sont aussi des exo enzymes qui agissent par hydrolyse sur les extrémités non réductrices des RG pour libérer les AG. Cependant, elles sont inactives sur les HG et ont besoin de reconnaître un rhamnose à droite de la liaison coupée (MUTTER *et al.*, 1996).
- **Les Rhamnogalacturonanes-lyases** sont des endo enzymes qui β -éliminent la liaison entre le rhamnose et l'AG au sein des RG. La coupure libère un résidu de rhamnose à l'extrémité réductrice et un AG insaturé à l'extrémité non réductrice (MUTTER *et al.*, 1998b).
- **Les Rhamnogalacturonanes-acétylestérases** libèrent les groupements acétyles estérifiés sur les rhamnogalacturonanes des pectines (SEARLE VAN LEEUWEN *et al.*, 1992).

2-3-2. La dégradation des chaînes latérales

De nombreuses enzymes interviennent dans la dégradation des arabinanes, des galactanes et des enzymes capables de libérer les acides féruliques.

- **Les endo- α -L-arabinanases** (Endo-A, E.C. 3.2.1.99) : Elles coupent au hasard, l'intérieur des chaînes latérales d'arabinanes, les liaisons α (1-5) entre deux résidus L-arabinose pour libérer du monomère, du dimère ou du trimère d'arabinose. La présence de ramifications limite leur efficacité.

- **Les exo- α -arabinanases** : Elles libèrent le résidu L-arabinose terminal non réducteur des arabinanes. L'enzyme hydrolyse non seulement les liaisons α (1-3) des résidus arabinose branchés latéralement, mais également les liaisons α (1-5) entre les résidus arabinose de la chaîne principale. Elles sont actives sur les arabinanes et les arabinogalactanes (KAJI et SHIMOKAWA, 1984 ; BRILLOUET *et al.*, 1985 ; ROMBOUITS *et al.*, 1988).
- **Les α -L-arabinofuranosidases** (E.C. 3.2.1.55) : Elles hydrolysent aussi les liaisons α (1-3) ou α (1-5) entre deux résidus arabinose pour libérer l'arabinose terminal non réducteur. Selon leur spécificité, elles peuvent également agir sur des arabinoxylyanes (ROMBOUITS *et al.*, 1988).
- **Les galactanases** : Elles comprennent des endo enzymes, des exo enzymes et des osidases. Cet ensemble hydrolyse les liaisons impliquant les résidus galactose au sein des galactanes linéaires ou d'arabinogalactanes de type I et II.
 - Les endo β -D-galactanases (E.C. 3.2.1.89) hydrolysent généralement les liaisons β (1-4) entre deux résidus de galactose et libèrent du monomère ou des oligomères de DP inférieur ou égal à 4 (NAKANO *et al.*, 1990 ; BRILLOUET *et al.*, 1991).
 - Les exo β -D-galactanases sont spécifiques des liaisons β (1-4) ou β (1-3) et sont d'origine bactérienne (PELLERIN et BRILLOUET, 1994).
- **Les β -D-galactosidases** (E.C. 3.2.1.23) hydrolysent les liaisons β (1-4) et libèrent les résidus galactose terminaux non réducteurs au sein des galactanes et des arabinogalactanes de type I de faible poids moléculaire (SEKIMATA *et al.*, 1989).
- **Les osidases** hydrolysent les substrats de faibles masses molaires.
- **La férulylestérase I et la cinnamate estérase**, toutes les deux coupent la liaison entre l'acide férulique lié en C-2, d'un résidu arabinose en O-6 d'un résidu galactose, situé dans les chaînes latérales de pectines de betterave. Elles ne peuvent agir que sur des oligomères (RALET *et al.*, 1994b ; KROON *et al.*, 1996).

3. LES BACTERIES LACTIQUES

3-1. INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets, Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative et généralement nitrate réductase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (Certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté).

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème. Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (LARPENT, 1989 ; NOVEL, 1993).

3-2. HABITAT

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (de ROISSART, 1986).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (SANDINE, 1988).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (JONES, 1978).

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification (SUHIGARA, 1985) et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (DEVOYOD et POUILLAIN, 1988).

BOUBEKRI et YOSHIYUKI (1996) ont isolé deux souches de *Leuconostoc* sp. à partir de fromage traditionnel El-Klila fabriqué à Batna (Algérie). Tandis que, RYHÄNEN *et al.*, (1996) ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus*, *Ln. Citreum* et *Ln. Mesenteroides subsp. Mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté. Seule l'espèce *Leuconostoc oenos* est isolée du vin (FLEMING *et al.*, 1985 ; SUGIHARA, 1985 ; DEVOYOD et POUILLAIN, 1988 ; HOUNHOÏGAN *et al.*, 1993).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja) (CHAPMAN et SHARPE, 1981; DELLAGLIO *et al.*, 1981A ; UCHIDA, 1982; BACUS et BROWN, 1985B ; VILLAR *et al.*, 1985).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (DEMAZEAUD, 1996).

3-3. CLASSIFICATION

La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variants au sein d'une même espèce. Ces tests sont :

- Le type de gram, la morphologie et la disposition cellulaire.
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques, le caractère fermentaire.
- La croissance des cellules sur des milieux hostiles
- Et la synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, et la résistance aux bactériophages.

Puis, des études basées sur les critères moléculaires ont permis de classer les espèces selon les critères suivants :

- La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG) permet d'observer le type d'espèce selon la nature de la liaison peptidique.
- Et la composition de l'ADN mesurée par hybridation permet de différencier les genres et les espèces entre eux. Le pourcentage en bases Guanine+Cytosine (G-C %) permet le rapprochement des genres *Streptococcus* (34-46%), *Leuconostoc* (36-43 %) et *Pediococcus* (34-42 %) (SCHLEIFER *et al.*, 1985; SCHLEIFER, 1986 ; FARROW *et al.*, 1989). Le pourcentage de G-C des espèces du genre *Lactobacillus* est très hétérogène et varie d'une espèce à une autre de 32 à 53 % (Tab. 4) (SCARDOVI, 1986).

Cependant, les espèces des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ou *streptococcus*, dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50 %, peuvent être regroupées dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus*, et séparées de la branche des *Actinomycétales* au G-C % supérieur à 50 %, comprenant *Propionobacterium* et *Bifidobacterium* (STACKEBRANDT *et al.*, 1983 ; KANDLER et WEISS, 1986b ; STACKEBRANDT et TEUBER, 1988).

Tableau 4. Les différents genres de bactéries lactiques

Genres	Cellules		Fermentation	ADN G-C (%)	Références
	Forme	Arrangements			
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaînes	Homolactiques	34 - 46	SCHLEIFER, 1986
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaînes	Hétérolactiques	36 - 43	FARROW <i>et al.</i> , 1989
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrade	Homolactiques	34 - 42	SCHLEIFER, 1986
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaînes	Homolactiques et Hétérolactiques	32 - 53	KANDLER et WEISS, 1986a et b

3-3-1. Les coques lactiques

Elles appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétérolactique).

Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexe. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

• **Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*** : Ils étaient anciennement groupés en un seul genre *Streptococcus*. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C. Parmi le genre *Streptococcus*, le groupe viridans comprend les agents d'acidification fréquents dans certains fromages et yaourts comme le cas de l'espèce *Sc. thermophilus*. (SKINNEL et QUESNEL, 1978).

Les *Enterococcus* représentent le groupe des entérocoques, ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) et considéré comme contaminants.

Les *Lactococcus* regroupent l'espèce *Sc. Lactis*, ses trois sous espèces *Sc. Lactis.*, *Sc. diacetylactis* et *Sc. cremoris*, *Sc. raffinolactis* et de nouvelles espèces mal classées : *Sc. plantarum* et *Sc. garviae* (GARVIE et FARROW, 1982 ; COLLINS *et al.*, 1983). Et Selon GUIRAUD (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc. Lactis subsp. cremoris*, *Lc. Lactis subsp. Lactis* et *Lc. diacetylactis*. La sous espèce *Streptococcus Lactis subsp. diacetylactis* est remplacée par la sous espèce *Lactococcus Lactis subsp. Lactis*.

• **Le genre *Leuconostoc***

Il représente les coques hétérofermentaires. La classification des espèces basée sur le G-C% a permis de distinguer trois espèces : *Ln. mesenteroides* (et ses trois sous espèces : *subsp. Mesenteroides.*, *subsp. dextranicum* et *subsp. Cremoris*), *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides* et *Ln. enos* (YANG et WOESE, 1989; LEVEAU et BOUIX, 1993).

• **Le genre *Pediococcus*** : Il rassemble des coques homofermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L.-lactique).

Mais, fréquemment la forme lévogyre L prédomine : les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (GUIRAUD, 1998).

3-3-2. Le genre *Lactobacillus*

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries.

Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (AXELSSON, 1993).

ORLA- JENSEN (1919) a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Bêtabacterium*, *Streptobacterium* (Tab. 5).

- **Les Lactobacilles homofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégradent les hexoses en acide lactique.

- **Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (voie hétérofermentaire de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

- **Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs** regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (KANDLER et WEISS, 1986b ; STILES et HOLZAPFEL, 1997).

L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes) (SCHLEIFER et LUDWIG, 1995).

Tableau 5. Classification des lactobacilles selon ORLA- JENSEN (1919)

Groupe 1 : <i>Thermobacterium</i> (Homofermentaires stricts)	Groupe 2 : <i>Streptobacterium</i> (Homofermentaires facultatifs)	Groupe 3 : <i>Bêtabacterium</i> (Hétérofermentaires stricts)
Groupe <i>delbruekii</i>	Groupe <i>plantarum</i>	Groupe <i>fermentum</i>
	<i>Lb. Plantarum</i>	<i>Lb. san francisco</i>
G-C: 49-51 %	<i>Lb. pentoseus</i>	<i>Lb. Brevis</i>
<i>Lb. delbrekii</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. ssp. delbrekii</i>		<i>Lb. Kefir</i>
<i>Lb. ssp. lactis</i>	Groupe <i>casei</i>	<i>Lb. Fructivorans</i>
<i>Lb. ssp. bulgaricus</i>	<i>Lb. casei ssp. casei</i>	
<i>Lb. ssp. Leichmani</i>	<i>Lb. casei ssp. alactosus</i>	
	<i>Lb. casei ssp. Pseudopiantarum</i>	
G-C: 33-41 %	<i>Lb. casei ssp. rhamnosus</i>	
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. Johnsoni</i>	
<i>Lb. helveticus</i>		
<i>Lb. amylovorus</i>		
<i>Lb. crispatus</i>		
<i>Lb. gallinarum</i>		
<i>Lb. jensenii</i>		
<i>Lb. kefiranofaciens</i>		
<i>Lb. Kefirgranum</i>		

Selon ATLAN (2000), ce critère physiologique a conduit à la classification des Lactobacilles en trois groupes qui diffèrent largement de celle déterminé précédemment par ORLA-JENSEN (1919).

- Le groupe *delbrueckii* comprend les espèces : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helvetis*, *Lb. crispatus*, d'autres lactobacilles homofermentaire et les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lb. acetotolerans* et *Lb. hamsteri*).
- Le groupe *casei-Pediococcus* est le groupe le plus large car il regroupe de très nombreux *lactobacillus* homofermentaires stricts (*Lb. avarius*, *Lb. salivarius*), hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*) et des hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. reuteri*, *Lb. sanfrancisco*, *Lb. parakefir*). Ce groupe contient aussi la plupart des souches de *Pediococcus* (*Pc. damnosus*, *Pc. parvulus*, *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus*).
- Le groupe *Leuconostoc* comprend les Lactobacilles heterofermentaires stricts et les espèces du genre *Leuconostoc* (*Ln. amelibiosum*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*) ainsi que le genre *Weissella* dans lequel sont regroupés plusieurs Lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. confusus*, *Lb. viridescence*, *Lb. halotolerans*) et *Ln. paramesenteroides*.

La taxonomie moléculaire a différencié *Leuconostoc oenos* en un nouveau genre bactérien : *Oenococcus oeni* (Tab.6).

3-4. PROPRIETES METABOLIQUES

3-4-1. Le métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques homofermentaires transforment tout le glucose en excès en acide lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffèrent selon les espèces. Elles utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse, convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du NAD^+ à partir du NADH formé auparavant. Dans cette dernière étape les bactéries font intervenir une lactate-déhydrogénase.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires utilisent les voies du tagatose-6-phosphate, de la glycolyse et des pentoses phosphates. Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation de quantité équimolaire de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique. Une production de formate et d'acétate peut avoir lieu, notamment en aérobiose (Fig. 14) (DESMAZEAUD, 1996).

Tableau 6. Nouvelle classification des Lactobacilles selon ATLAN *et al.* (2000)

Groupe I. <i>Delbrueckii</i>	Groupe II. <i>casei-Pediococcus</i>	Groupe III. <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	Homofermentaires stricts	Hétérofermentaires stricts
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. avarius</i>	Genre <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Ln. amelibiosum</i>
<i>Lb. crispatus</i>	Hétérofermentaires facultatifs	<i>Ln. carnosum</i>
Autres Homofermentaires	<i>Lb. casei</i>	<i>Ln. gelidum</i>
Hétérofermentaires Facultatifs	<i>Lb. plantarum</i>	Genre <i>Weissella</i>
<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Ln. paramesen</i>
<i>Lb. hamster</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. confusus</i>
	Hétérofermentaires stricts	<i>Lb. halotolerans</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. viridescens</i>
	<i>Lb. fermentum</i>	
	<i>Lb. buchneri</i>	
	<i>Lb. reuteri</i>	
	<i>Lb. sanfrancisco</i>	
	<i>Lb. parakefir</i>	
	Genres <i>Pediococcus</i>	
	<i>Pc. damnosus</i>	
	<i>Pc. parvulus</i>	
	<i>Pc. acidilactici</i>	
	<i>Pc. pantosaceus</i>	

- **Chez les lactocoques**, les sucres sont transportés par un système actif mettant en jeu une phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle les sucres aux dépend du phospho-énolpyruvate (PEP). Le PEP dans ce cas intervient surtout dans le métabolisme des sucres transportés. Le lactose (dans le cas du lait), apparaît dans la cellule sous forme de glucosyl- β -(1-4)-galactoside-6-P (ou lactose-P) et prêt à être hydrolysé par une β -D-phosphogalactosidase (LEE *et al.*, 1973 ; MOLSKNESS *et al.*, 1973 ; THOMPSON, 1979).
- **Chez les lactobacilles et les *leuconostocs***, le transport du lactose se fait librement par l'intermédiaire d'une perméase, puisque la présence systématique d'une β -galactosidase a été démontrée dans 28 souches (SOMKUTI et STEINBERG, 1979a). Le glucose et le galactose, issus de la dégradation du lactose sont transformés respectivement en glucose-6-P selon la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et en galactose-6-P selon la voie du D-tagatose-6-P.
- **Chez les streptocoques thermophiles**, le même système enzymatique de transport, que celui des lactobacilles et des *leuconostocs*, est utilisé mais seul le glucose est rapidement dégradé par la voie de la glycolyse et le galactose en excès est rejeté dans le milieu où il peut exercer une inhibition sur l'utilisation du lactose résiduel (TINSON *et al.*, 1982A ; HUTKINS et MORRIS, 1987).

3-4-2. Le métabolisme du citrate

L'acide citrique est utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*), *Enterococcus* (*Ec. faecium*), *Pediococcus*, *Leuconostoc* (*Ln. lactis*, *Ln. cremoris*) et *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*). Cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (LEVEAU et BOUIX, 1993).

Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate-perméase, où il est scindé en acétate (en majeure partie excrétés) et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate-lyase. L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO₂ par une oxaloacétate décarboxylase. Des transformations successives du pyruvate aboutissent à la formation de composés aromatisants et le produit fini est le 2,3-butylen-glycol (2,3-butanediol) (Fig. 15) (COGAN, 1981 et 1982).

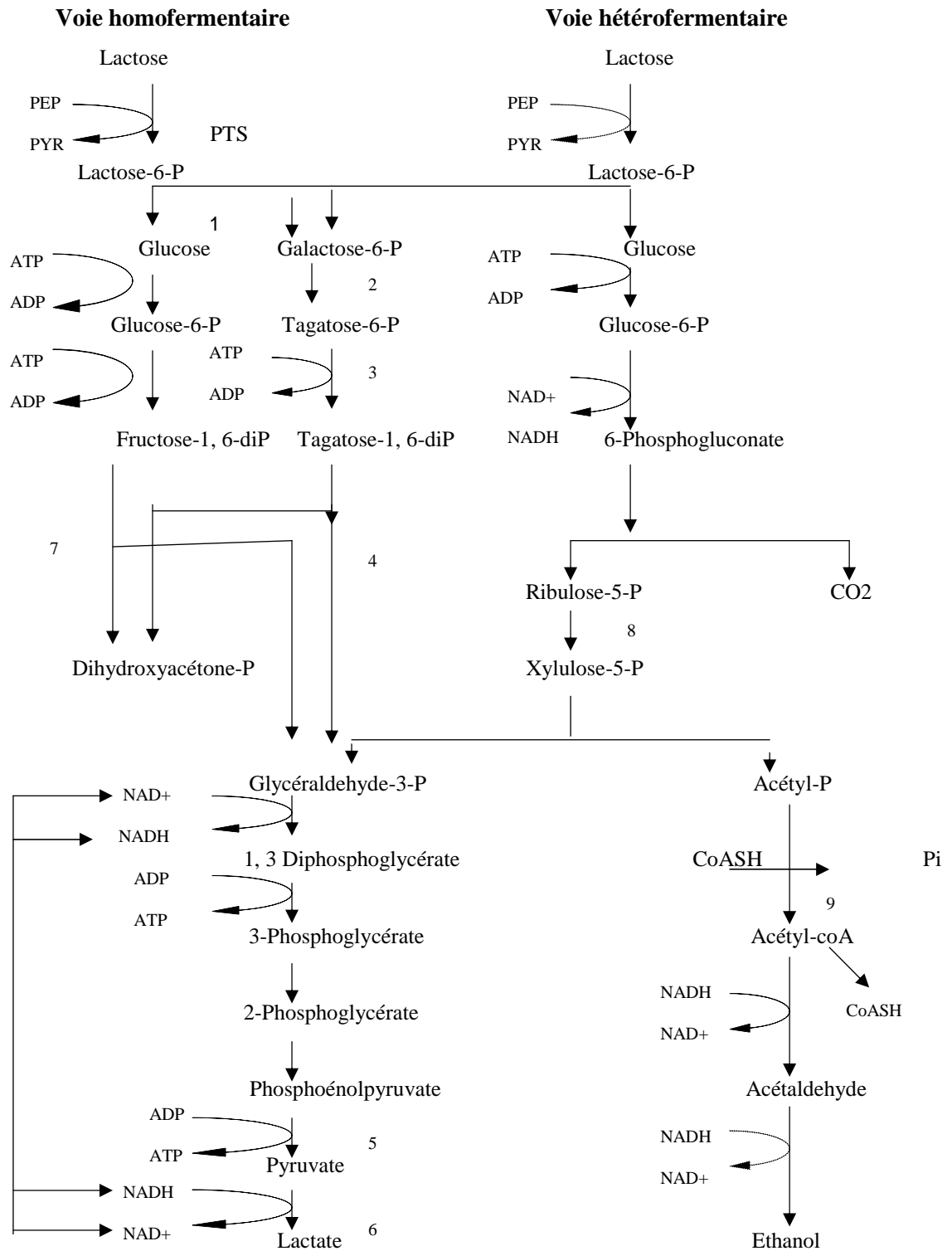
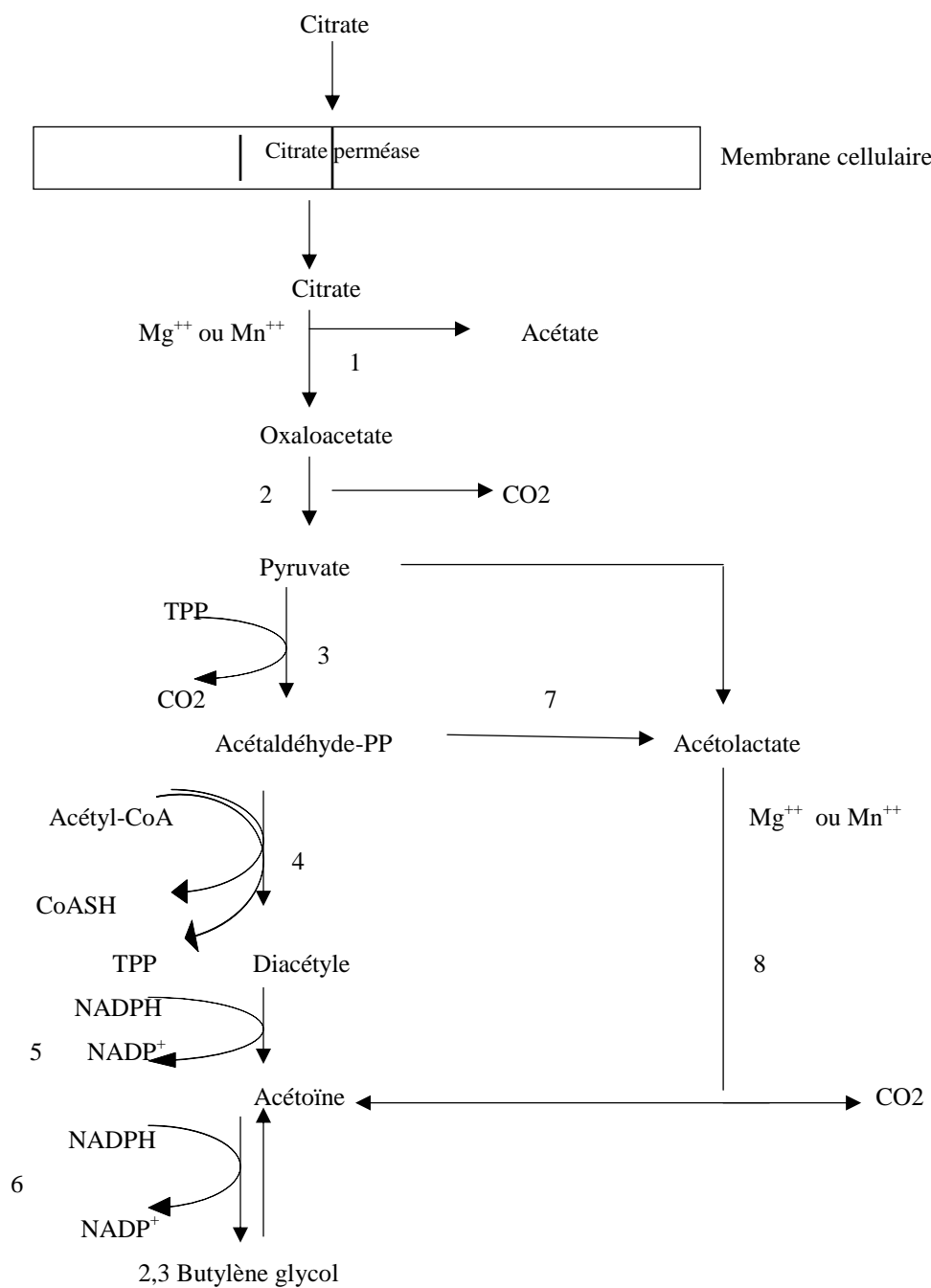


Figure 14. La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie Homofermentaire et voie Hétérofermentaire (LEVEAU et BOUIX, 1993).



TPP : thiamine pyrophosphate ; **1** : citrate lyase (citritase) ; **2** : oxaloacétate décarboxylase ; **3** : pyruvate décarboxylase ; **4** : diacétyle synthétase ; **5** : diacétyle réductase ; **6** : acétoïne réductase ; **7** : acétolactate synthétase ; **8** : acétolactate décarboxylase

Figure 15. Le métabolisme de citrate chez les bactéries lactiques (COGAN, 1981).

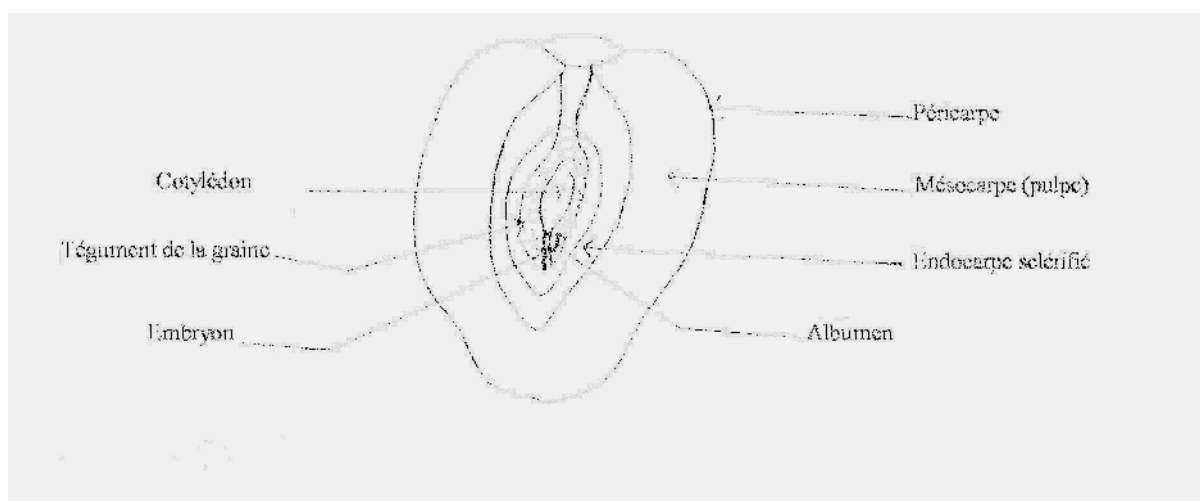


Figure 16. Coupe schématique du fruit de l'olive (BIANCHI, 1999)

Tableau 7. Composition chimique de d'olive (BIANCHI, 1999)

Eau	48%
Polysaccharides ^a	27%
Huiles	21%
Mono- et disaccharides	3%
Cires, triterpènes, phénols	1%
Autres composés ^b	Traces

a: hémicellulose, cellulose, pectines ; *b*: alcanes, alkyl-esters, methyl-phenyl-esters, sterylesters, aldéhydes, alcools, stérols, triterpénoïdes polycycliques et acides gras à très longue chaîne carbonée

4. LA MICROFLORE DES OLIVES

4-1. LES OLIVES

Le fruit de l'olivier est une drupe de forme ovoïde ou ellipsoïde. Il est constitué :

- d'épicarpe : la pellicule qui recouvre le fruit.
- de mésocarpe : la partie charnue appelée pulpe, riche en lipides dont la taille reste variable selon les variétés.
- d'endocarpe : le noyau fusiforme, constitué d'une amande ayant une texture rigide, protégeant une seule graine à albumen huileux cellulaire (Fig. 16).

La forme de l'olive est variable et caractéristique de la variété. Au cours de la maturation du fruit, le mésocarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte) à la couleur violette ou rouge (olive tournante) et en fin de maturité à la coloration noirâtre (olive noire) (BIANCHI, 1999).

La composition chimique de l'olive est constituée principalement d'eau, de polysaccharides, d'huile et d'autres composés sous forme de traces (Tab. 7). Malgré leur faible représentation, ces composés ont une très grande importance, car ils vont d'une part, conférer à l'huile une grande partie de ses qualités gustatives et nutritionnelles, et d'autre part, la stabiliser.

4-2. LA FLORE DES OLIVES

Les olives de par leur richesse en substances pectiques et autres constituants, représentent un milieu favorable pour la prolifération d'une flore très diverse. Selon BORCAKLI *et al.* (1993a) et KOTZEKIDOU (1997), cette flore est constituée essentiellement de bactéries Gram négatif, de *Lactobacillus* et de levures :

- Les microorganismes isolés à partir des olives vertes commercialisées sous forme saumurées appartiennent pour la plupart d'entre eux aux bactéries lactiques et aux levures. Les bactéries lactiques sont plus abondantes que les levures. Les aérobies mésophiles générateurs de spores tels les *Bacillus*, qui peuvent être considérés comme des contaminants du produit lors de sa manipulation, ont aussi été isolés à partir de quelques échantillons mais leurs effectifs n'étaient pas très importants (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2004).
- Une flore microbienne complexe favorisant la fermentation des olives noires du Portugal, constituée principalement de bactéries lactiques et de levures, a été mise en évidence *par* CATULO *et al.* (2002). L'étude taxonomique des mêmes auteurs a prouvé que plusieurs espèces de levures sont présentes durant le temps de fermentation avec des possibilités métaboliques particulières.

Alors que les bactéries lactiques constituées principalement de *Lactobacillus* se sont développées pendant le premier et/ou les dernières phases de fermentation.

Les études réalisées sur des échantillons d'olives noires fermentées selon les techniques artisanales et industrielles, ont également confirmé la prédominance des espèces de *Lactobacillus* par ces mêmes auteurs. Dans le cas des olives vertes conservées en saumure, il peut y avoir une fermentation indésirable avec la production de gaz, due à des *Enterobacter*, *Bacillus* et *Clostridium* (*Cl. butyricum* qui peut entraîner une fermentation butyrique).

Dans le cas des olives stockées et exposées à l'air, le développement sur la surface du fruit d'un film de levures (*Candida*) et de moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) est très fréquent ce qui entraîne la dégradation de l'acide lactique et permet ensuite l'implantation de contaminants (*Pseudomonas* et *Bacillus*) qui modifient l'aspect et la qualité organoleptique du produit (GUIRAUD, 1998).

Des germes pectinolytiques constitués le plus souvent de *Bacillus*, *Aeromonas* et de moisissures provoquent l'apparition de viscosité dans le fruit.

4-2-1. Les bactéries

- L'isolement de nouvelles souches de **bactéries lactiques** à partir des olives crues et fermentées ainsi que leurs dérivés (huiles d'olives et margines) a suscité l'intérêt de plusieurs auteurs des pays méditerranéens (VAN DEN BERG *et al.*, 1993 ; CHAMKHA, 2001).

Plusieurs souches de bactéries lactiques ont été isolées des olives vertes traitées à la saumure pendant quatre à neuf mois et sont identifiées comme étant : *Lactobacillus brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei subsp casei* ; *Leuconostoc mesenteroides*, *Lc. dextranicum* et *Pediococcus cerevisiae* (ASEHRAOU *et al.*, 1993). Parfois la présence d'espèces du genre *Enterococcus* a été constatée (GUIRAUD, 1998). D'autres souches de bactéries lactiques sont également isolées à partir des olives de table en Italie par LAVERMICOCCA et GOBBETTI (1998) et à partir d'olives fermentées au Portugal (CIAFARDINI *et al.*, 1994). Les travaux récents de CAMPANIELLO *et al.*, (2005) sur l'identification d'espèces de bactéries lactiques dans les olives naturelles ou traitées, selon la tradition espagnole qui traite les olives avec une solution aqueuse de NaOH (1,3 à 2,6 %) durant 12 à 15 h, ont prouvé que *lactobacillus plantarum* était l'espèce prédominante, bien que *Lactobacillus pentoseus* et *Leuconostoc mesenteroides* soient aussi présents.

- **Les *Bacillus*** sont des contaminants des olives traitées en saumure. Parmi l'espèce de ce genre, la plus fréquemment rencontrée est *Bacillus subtilis*, considérée pectinolytiques et causait le ramollissement du fruit (CAMPANIELLO *et al.*, 2005 ; LANCIOTTI *et al.*, 1999).
- **Les *Enterobacter*** sont présents dans le sol et les plantes. Ce sont des contaminants alimentaires très fréquents et capables de dégradation importante. Les espèces (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus*) de ce genre ont été isolées à partir des olives vertes traitées et non traitées avec de la soude. Elles apparaissent dès leur première phase de fermentation et persistent dans les échantillons durant 80 jours de conservation (THIERRY, 1997 ; CAMPANIELLO *et al.*, 2005).
- **Les *Pseudomonas*** : Les espèces de ce genre sont dotées d'une grande activité métabolique (protéolyse, lipolyse et dégradation des substances carbonées) (THIERRY, 1997). Ce groupe est très répandu dans la nature. Ce sont des agents phythopatoène (*Xanthomonas*, *Photobacterium*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas*). Les *Pseudomonas* sont aussi des contaminants des olives ; pendant le stockage des olives traitées en saumure, le développement des *Pseudomonas* protéolytiques cause la détérioration du produit. Elle est caractérisée par une diminution de l'acidité des saumures et le gonflement du fruit (CAMPANIELLO *et al.*, 2005).

4-2-2. Les Levures

Les levures sont classées en deux groupes selon la proportion de lipides qu'elles contiennent (groupe 1 : 20 % ; groupe 2 : 20 à 80 % de lipide). Les espèces du deuxième groupe sont appelées des levures oléagineuses et incluent principalement les espèces des genres : *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon* et *Cryptococcus*. Elles sont rencontrées dans l'air, les eaux, les sols et les végétaux où les sucres simples sont peu représentés (KREGER, 1987). Parmi ces genres, les espèces isolées à partir d'olives traitées avec de la soude sont : *Candida pelliculosaa*, *Candida ciferrii*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus laurentii* et *Rhodotorula mucilaginosa* et sont toutes dotées d'activité polygalacturonase (CAMPANIELLO *et al.*, 2005). Les espèces isolées des olives fermentées et stockées en vrac sont : *Candida etchellsii*, *Candida versatilis*, *Rhodotorula glutinis var. glutinis*, *R. minuta var. minuta*, et *R. rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia anomala*. Elles possèdent des activités estérase et polygalacturonase et sont la cause du ramollissement du fruit (VAUGHIN *et al.*, 1969 ; ASEHRAOU *et al.*, 2000).

4-2-3. Les moisissures

Les moisissures saprophytes (Mucorales, Pénicillium, etc.) se développent sur les fruits crus ou cuits, les fruits séchés placés à l'humidité, les déchets de betteraves et de bagasse de canne à sucre. Elles sont utilisées depuis fort longtemps par l'homme pour la préparation d'aliments et interviennent comme agents de fermentation dans la fabrication du fromage.

Elles synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes comme les enzymes, des acides organiques, des antibiotiques et des alcaloïdes (MOREAU, 1989; ROQUEBERT, 1997).

- Le genre *Aspergillus* est très répandu dans l'environnement et généralement trouvé comme contaminant banal dans les cultures surtout des céréales et dérivés telle que l'espèce *Aspergillus niger* (DERACHE et DERACHE, 1986 ; DAVISE LARONE, 1987). Tandis que l'espèce *Aspergillus versicolor* a été isolée à partir des olives et des huiles végétales (KAVITHA *et al.*, 1997).
- Le genre *Rhizopus* contient plusieurs espèces. Les plus communes sont : *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus* et *Rhizopus stolonifer* isolées du sol, des graines des céréales et des matières végétales en décomposition. L'espèce *Rhizopus stoloniferus* a été isolée à partir d'huile d'olives. Les espèces de *Rhizopus* sont des moisissures qui, en se développant sur les légumes et les fruits (Bananes, Fraises) les rendent mous (BRETON, 1985).

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1. BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU

1. INTRODUCTION

Le lait cru de par sa richesse en substances nutritives (protéines, graisses, glucides, vitamines...etc.), constitue un milieu favorable pour le développement des germes. Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, le lait cru contient peu de germes (10^3 germes par mL). Il s'agit de germes saprophytes et parmi eux, on trouve les Streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et les Lactobacilles. Durant la traite et le stockage, le lait peut se contaminer par une flore variée constituée essentiellement de bactéries lactiques appartenant aux genres suivants : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostocs* et *Lactobacillus*.

La mise en évidence des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus, a fait l'objet de travaux de recherche réalisés surtout dans la région de l'ouest Algérien : SAÏDI (1998) et KACEM (2005) ont isolé différents genres de bactéries lactiques à partir du lait cru de vache. Tandis que, ZADI- KARAM (1998) s'est intéressée à la mise en évidence de souches lactiques à partir du lait de chamelle. Dans la région de l'est et plus précisément à Constantine, peu de travaux ont été publiés dans ce sens.

A travers cette étude, nous avons voulu constituer un lot de souches de bactéries indigènes ayant une application dans l'industrie alimentaire et par la suite dans un autre chapitre, mettre en évidence leurs activités pectinolytiques. Pour cela, des bactéries lactiques sont isolées des laits crus provenant des vaches importées et élevées dans des stations d'élevages situées dans la wilaya de Constantine (Algérie). Ces stations sont localisées sur six emplacements géographiquement opposés : Sidi Mabrouk, Ain- El -bey, les quatre chemins et El-Kroubs. Dans cette étude six genres de bactéries lactiques appartenant aux *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* vont être isolés.

2. MATERIEL ET METHODES

2-1. ORIGINE ET PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE LAITS

Les échantillons de lait proviennent de six stations d'élevages, de vaches laitières de races croisées. Ce sont de petites exploitations excepté la station 6. L'alimentation des vaches laitières est saisonnière : elle s'effectue en hiver dans les étables (fourrages et complément nutritif à base de protéines). Durant les saisons chaudes, les vaches sont dans les pâturages. Seules les vaches appartenant à la station 3 séjournent toute l'année à l'étable (Tab. 8).

Dix huit échantillons de lait cru de 250 mL chacun, sont prélevés tous les 7 jours. Dans les cinq premières stations, le lait est prélevé au moment de la traite manuelle à partir des bidons de 10 litres. Dans la station 6, le lait est soutiré après la traite mécanique à partir des cuves de stockage. Les échantillons de lait sont conservés à + 4 °C durant les cinq heures qui précèdent les analyses au laboratoire et sont notés comme suit : E1, E2, E3 (station 1), E4, E5, E6 (station 2), E7, E8, E9 (station 3), E10, E11, E12 (station 4), E13, E14, E15, (station 5), E16, E17, E18 (station 6).

Tableau 8. Présentation des stations d'élevages et Origine des échantillons de lait cru

Stations d'élevages	Superficie des Stations	Nombres de vaches laitières
Station 1	2 à 4 hectares	10
Station 2	2 à 4 hectares	14
Station 3	2 à 4 hectares	12
Station 4	2 à 4 hectares	22
Station 5	2 à 4 hectares	22
Station 6	600 hectares	40

2-2. DENOMBREMENT

Les genres étudiés sont mis en évidence sur les milieux suivants :

- le milieu M17 est employé pour la recherche des *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. L'ensemencement est réalisé en surface. Le milieu M.R.S est utilisé pour déterminer les *Pediococcus* et *Lactobacilles*. Pour le premier genre l'ensemencement est effectué en surface et pour le deuxième genre en profondeur. Le milieu de Mayeux sert pour l'isolement des *Leuconostocs*. L'ensemencement de l'inoculum se fait en surface.

La composition de ces milieux figure dans l'annexe II. Trois boîtes de Pétri par dilution (de 10^{-3} à 10^{-6}) et par échantillons sont ensemencées et incubées à 30 °C durant 48 h. Le nombre de colonie par souches est évalué en UFC (unité formant colonie) par millilitre d'échantillon de lait analysé. Toutes les souches isolées sont conservées et entretenues dans leurs milieux.

2-3. IDENTIFICATION

L'identification des souches isolées est réalisée selon les techniques décrites par GUIRAUD et GALZY (1980), GARVIE (1986a et b), PETRANSXIENE et LAPIED, 1981 ; GUIRAUD 1998 ; BOUREL *et al.*, 2001. La composition des milieux de cultures utilisés figure dans l'annexe II.

2 -3-1. Caractères morphologiques

Afin de déterminer leurs caractères culturels (couleur, disposition forme et aspect), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire. Après la coloration de Gram, les cellules sont examinées au microscope optique (x100).

2-3-2. Caractères biochimiques et physiologiques

- **L'activité catalytique** permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

- **L'activité citratase** : Le milieu utilisé est la gélose semi solide au lait citraté contenue dans des tubes à essais. L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale et les souches sont incubées à 30 °C. Cette activité enzymatique est recherchée chez les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*.

- **Le développement des souches aux températures optimales** est réalisé:

- à 10 et 45 °C, les souches sont cultivées sur le milieu de Naylor et Sharpe pour les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* et sur le milieu M.R.S pour le genre *Lactobacillus* ;
- à 37 et 45 °C, les cultures sont réalisées sur le milieu Naylor et Sharpe pour le genre *Pediococcus* et seulement à 37 °C sur le milieu de Mayeux pour les *Leuconostoc*.

- **La croissance des souches dans des conditions hostiles** est étudiée sur le milieu de Naylor et Sharpe :

- à pH 9,6 pour les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, le pH 9,6 est obtenue par l'addition d'une solution de NaOH (1N).
- à pH 5 pour le genre *Pediococcus*, le pH initial égal à 7 du milieu de culture est abaissé jusqu'à 5 avec une solution d'acide lactique (1N).

- Avec 6,5 % de NaCl réalisés sur les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*.
- Avec 10 % et 15 % de NaCl sur les *Pediococcus*. Le milieu de culture est préparé selon la concentration en NaCl utilisé.
- à 55 °C durant 15 min pour *Leuconostoc* et à 60 °C durant 30 min pour *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*.

- en présence de tellurite de potassium : Les souches sont cultivées dans la "gélose au tellurite" contenant 50 mL d'une solution stérile de tellurite de potassium à 0,8 % par litre de milieu.

L'inoculum est ensemencé sur la surface des boîtes de Pétri et concerne les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. Les souches résistantes donnent des colonies noires et celles qui poussent mal donnent des colonies grises après une incubation à 30 °C durant 48 h.

- La croissance sur le lait "bleu de Sherman" : Le milieu utilisé est le lait écrémé contenu dans des tubes à essais de 9 mL. Après sa stérilisation par tyndallisation, 1 mL d'une solution de bleu de méthylène à 1 % sont ajoutés dans chaque tube. Le milieu est ensemencé avec les souches à tester et incubé à 30 °C durant 48 h. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer.

- **La croissance sur le lait tournesolé** : ce milieu est composé de 1 L de lait écrémé et de 10 mL de teinture de tournesol à 4 %. Le milieu est réparti en tube à essai. Après sa stérilisation (à 110 °C pendant 15 min), il est inoculé avec les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* et *Leuconostoc* et incubé à 30 °C durant 72 h. La présence du tournesol considéré comme un indicateur de pH du milieu, permet d'observer plusieurs types de réactions: attaque de lactose avec acidification (coagulation de la caséine et virage au rouge), attaque de la caséine avec alcalinisation (virage au bleu), peptonisation de la caséine après ou en dehors de toute coagulation (éclaircissement du milieu ou dégradation du coagulat) et réduction du colorant (décoloration).

- **La production de dextrans** : chez les souches du genre *Leuconostoc*, la synthèse de dextrans est mise en évidence dans leur milieu d'isolement (milieu de Mayeux). Elle se traduit par la formation de colonies larges et gluantes sur les boîtes de Pétri.

- **La production d'acétoïne** est détectée par la réaction de Voges Proskauer sur le bouillon lactosé et citraté. Elle concerne les souches appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. La mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) est obtenue après une culture de 72 h à 30 °C. 1 mL de culture est additionné de 0,5 mL de réactif à l' α naphthol et 1 mL de NaOH à 16 %.

Après agitation durant 10 min une coloration rose indique la présence de l'acétoïne. Cette substance se transforme en diacétyl sous l'action de la soude et se combine avec l' α naphthol en complexe rouge.

- **L'hydrolyse de l'amidon** par les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, est recherchée sur la gélose nutritive ordinaire additionnée de 0,3 % d'amidon soluble et caractérisée au lugol après trois jours d'incubation à 30 °C.

- **L'hydrolyse de la gélatine** est mise en évidence sur la GNO additionnée de 4 % de gélatine, par les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. Après incubation, la surface des boîtes ensemencées est vaporisée par le réactif de Frazer.

Un précipité opaque se produit sauf dans les endroits où la gélatine a subi l'hydrolyse.

- **L'hydrolyse de l'esculine** est réalisée pour les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Elle est mise en évidence sur le milieu gélosé à la bile esculine après incubation des cultures à 30 °C pendant 72 h. L'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une coloration noire au milieu de culture.

- **La réduction du chlorure de 2-3-5 triphenyltetrazolium (TTC)** est testée sur les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. Les souches sont ensemencées en boîte de Pétri sur la gélose au Tergitol additionnée de 0,05 % de TTC. Après incubation à 30 °C durant 72 h, une coloration rouge des colonies obtenues traduit la réduction du TTC en formazan.

- **La fermentation des sucres** est réalisée dans les milieux de cultures spécifiques aux genres. Après 72 h de culture à 30 °C, la croissance des souches et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre. Pour chaque milieu utilisé, un témoin sans sucre ensemencé par les souches est utilisé. Pour les souches des genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*, les sucres testés sont: le lactose, le maltose et le mannitol.

Pour les souches du genre *Pediococcus*, les sucres utilisés sont les : saccharose, maltose et les dextrine. Pour les souches du genre *Leuconostoc*, les sucres sont: le saccharose et le fructose. La dégradation des sucres par les souches du genre *Lactobacillus* est mise en évidence avec le lactose, le melibiose, le saccharose et le raffinose.

- **Le caractère homo ou hétérofermentaire** est mis en évidence sur le bouillon de Mac Cleskey. Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisés à 120 °C durant 15 min. Après inoculation, 4 mL de gélose blanche sont ajoutés dans chaque tube.

Les homofermentaires (*Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*) se développent dans le milieu en utilisant le sucre mais ne produisent pas de gaz. Au contraire les hétérofermentaires (*Leuconostoc* et le groupe betabacterium du genre *Lactobacillus*) produisent du CO₂ qui se manifeste par la montée du bouchon de la gélose.

3. RESULTATS

3-1. DENOMBREMENT

Les résultats du dénombrement par station sont rassemblés dans le Tableau 9. Le nombre moyen de colonies obtenu, pour l'ensemble des échantillons appartenant à 6 stations, est plus important sur les milieux M17 et M.R.S que sur le milieu de Mayeux. Le milieu de Mayeux est un milieu sélectif pour les *Leuconostocs* ; il est tout à fait normal que nous obtenions un nombre de colonies plus faible.

Les nombres moyens de colonies, les plus importants, sont obtenus pour la station 3 et ceci pour les milieux M17 ($4 \cdot 10^7$ UFC/mL) et MRS ($7 \cdot 10^7$ UFC/mL). Tandis que la station 5 a donné le nombre moyen de *Leuconostoc* le plus élevé ($1,5 \cdot 10^7$ UFC/mL). Les plus faibles nombres moyens de colonies, sont obtenus pour la station 2 sur les milieux M17 ($0,073 \cdot 10^7$ UFC/mL) et de Mayeux ($0,005 \cdot 10^7$ UFC/mL) et pour la station 6 sur le milieu MRS ($0,35 \cdot 10^7$ UFC/mL). L'amplitude des variations du nombre moyen de colonies obtenu entre les stations est relativement peu importante et ceci quel que soit le milieu utilisé.

3-2. ISOLEMENT

Les 1645 colonies isolées sont de taille variable, de forme circulaire avec un pourtour régulier ou irrégulier ou érodé et de couleur blanche, jaune ou blanc-crème. Parmi ce nombre, 1000 souches ont pu être purifiées. A partir de ce lot, 66 souches sont prélevées au hasard pour être identifiées à raison de : 19 souches des genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, 16 souches du genre *Leuconostocs*, 14 souches du genre *Pediococcus* et 17 souches du genre *Lactobacillus*.

Tableau 9. Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/mL de lait) dans le lait de chaque station d'élevage et dans les différents milieux utilisés

Milieux de culture	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5	Station 6
M17	$2,050 \cdot 10^7$	$0,073 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$0,4 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	$0,206 \cdot 10^7$
Mayeux	$0,252 \cdot 10^7$	$0,005 \cdot 10^7$	$0,4 \cdot 10^7$	$0,030 \cdot 10^7$	$1,50 \cdot 10^7$	$0,3 \cdot 10^7$
M.R.S	$2,367 \cdot 10^7$	$0,501 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$	$2,40 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$0,35 \cdot 10^7$

Tableau 10. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*

Caractéristiques des souches	Station 1			Station 2			Station 3			Station 4			Station 5			Station 6			
	E1	E2	E3	E1	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3		
	LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11	LS12	LS13	LS14	LS15	LS16	LS17	LS18	LS19
Croissance à 10 °C	+	+	-	V	V	V	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Croissance à 45 °C	-	+	+	+	+	V	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Croissance à pH 9,6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 6,5 % NaCl	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Résistance 30 min 60 °C	V	+	V	V	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Croissance sur lait "bleu de Sherman"	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
Résistance au tellurite K	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Réduction du T.T.C.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lait tournesolé	RC	CA	CA	CA	R	A	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acétoïne	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
CO2 sur citrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gélatinase	+	+	+	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolyse de l'amidon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(+) : Positif ; (-) : Négatif ; (V) : Variable ; (R) : Réduction du colorant ; (C) : Coagulation de la caséine ; (A) : Acidification (production d'acide lactique) ; (ND) : Non déterminé .

3-3. IDENTIFICATION

L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules (Coques et Bâtonnets). Les coques (diplocoques et en chaînette) constituent 80,3 % de l'effectif total et sont représentées par les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Les formes bâtonnets observés sont représentées par le genre *Lactobacillus* avec 19,7 % de l'effectif total. Les 66 souches sont Gram positif, immobiles, catalase négative, peroxydase négative et nitrate-reductase négatif. A l'exception des souches : LS2, LS4, LS6, LLb5 et LLn3 qui sont catalase positive, LLS2, LLb2, LLb5 et LLn4 peroxydase positive et LS4, LS5, LS6, LLb3, LP2, LLn3 et LLn4 parfois mobiles.

Parmi les souches sélectionnées, huit appartiennent au genre *Enterococcus* et présentent un développement positif : à 10 °C (Sauf LS17, LS18 et LS19) et 45 °C (Sauf LS6), à pH 9,6 (Sauf LS17, LS18, LS19), en présence de 6,5 % de NaCl (Sauf LS12) et une thermorésistance égale à 60 °C durant 30 min (pour l'ensemble des souches). Les souches LS8, LS9, LS12, LS18 et LS19 sont citrate négatif ; ce qui les rapproche à l'espèce *Enterococcus faecium*. Alors que LS6 et LS17 présentent les mêmes caractéristiques que l'espèce *Enterococcus faecalis* par la production de citrate et un développement positif en présence de Tellurite de potassium. La souche LS1 qui est mannitol négatif et citrate négatif peut être identifiée à l'espèce *Enterococcus durans* (Tab. 10). Les trois souches de *Lactococcus* LS7, LS13 et LS15 ne résistent pas à 45 °C. La souche LS7 présente un développement positif à 6,5 % de NaCl et produit de l'acétoïne, ce qui permet de la rapprocher de l'espèce *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Les souches LS13 et LS15, qui diffèrent de l'espèce précédente par la non croissance à pH 9,6 se rapprochent de l'espèce *Lactococcus subsp. lactis* (Tab. 10).

Pour les *Streptococcus*, les résultats des tests réalisés sont très variables. Sur la base de la thermorésistance et la production des cellules à 45 °C les souches LS2, LS3, LS4, LS5, LS10, LS11, LS14 et LS16 peuvent être classées parmi l'espèce *Streptococcus thermophilus* (Tab. 10).

- Toutes les souches de *Leuconostoc* présentent un développement positif à 37 °C et la plupart résistent au traitement thermique de 55 °C pendant 15 min. Les souches LLn1, LLn8, LLn10, LLn11, LLn12, LLn13, LLn14, LLn15 et LLn16 produisent des dextranses ; elles sont classées parmi l'espèce *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*. Alors que Les souches LLn2, LLn3, LLn4, LLn5 LLn6, LLn7 et LLn9 sont dextranses négatif et l'ensemble de leurs caractéristiques les rapprochent de *Leuconostoc lactis* (Tab. 11).

Tableau 11. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches du genre *Leuconostoc*

Caractéristiques des souches	Station 1		Station 2		Station 3			Station 4			Station 5			Station 6		
	E1	E2	E1	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	
	LLn1	LLn2	LLn3	LLn4	LLn5	LLn6	LLn7	LLn8	LLn9	LLn10	LLn11	LLn12	LLn13	LLn14	LLn15	LLn16
Croissance à 37 ° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Résistance 15 min 55 ° C	+	+	+	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de dextrane	+	-	-	V	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lait tournesolé	-	AC	AC	AC	AC	AC	AC	-	AC	-	-	-	-	-	-	-

(**V**) : Variable ; (**ND**) : Non Déterminé ; (+) : Positif ; (-) : Négatif ; (**A**) : Acidification ; (**C**) : Coagulation .

Tableau 12. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches du genre *Pediococcus*

Caractéristiques des souches	Station 1		Station 3			Station 4			Station 5			Station 6		
	E1	E2	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	LP6	LP7	LP8	LP9	LP10	LP11	LP12	LP13	LP14
Croissance à 37 ° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 45 ° C	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Croissance à pH 5	ND	ND	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Croissance à 10 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Croissance à 15 % NaCl	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	+	-	-	-	V	-	-	+	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Dextrine	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

(V) : Variable , (ND) : Nom Déterminé , (+) : Positif , (-) : Négatif .

● Parmi le genre *Pediococcus*, la souche LP1 fermente le maltose, présente une croissance positive en présence de sel (15 %), se développe à 37 °C mais pas à 45 °C. Ainsi, elle peut être identifiée à l'espèce *Pediococcus parvulus*. La souche LP2 se développe bien à 37 °C et à 45 °C, fermente le maltose et les dextrines. Elle se rapproche de l'espèce *Pediococcus dextrinicus* par l'ensemble des tests réalisés. Les souches LP3, LP4, LP6, LP7, LP9, LP10 et LP11 sont non acidophiles et ne tolèrent pas des concentrations en NaCl égales à 15 %. Elles sont classées parmi l'espèce *Pediococcus urinae equi*. Les souches LP5, LP12, LP13 et LP14, sont acidophiles (croissance positive à pH 5), présentent un développement positif à 37 °C et à 45 °C, ne fermentent pas le maltose et sont donc classées parmi l'espèce *Pediococcus acidilactici*. Alors que la souche LP8, fermente le maltose et ne se développe pas à 45 °C. Elle peut être rapprochée de l'espèce *Pediococcus pentosaceus* (Tab. 12).

● Parmi les *Lactobacillus*, Les souches LLb1, LLb2, LLb3, LLb4, LLb5, LLb8, LLb9, LLb10, LLb11, LLb12, LLb13, LLb14 et LLb17 sont classés dans le groupe *Bêtabacterium* par la production de CO₂ sur milieu glucosé. Les souches LLb1, LLb2, LLb3, LLb4, LLb5, LLb8, LLb9, LLb10 et LLb14 se développent à 45 °C et fermentent l'ensemble des sucres testés, se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus cellobiosus*. Tandis que les souches LLb11, LLb12, LLb13 et LLb17 se développent à 10 °C mais pas à 45 °C, fermentent la plupart des sucres testés et sont classés parmi les espèces *Lactobacillus brevis* ou *Lb bruchneri*.

Parmi le groupe *Streptobacterium* qui diffère du précédent par la non production de gaz, la souche LLb6 qui fermente tous les sucres testés est rapprochée de l'espèce *Lactobacillus plantarum*.

Les souches LLb7, LLb15 et LLb16 qui ne produisent pas de CO₂ à partir du glucose et ne se développent pas à 10 °C, appartiennent au groupe *Thermobacterium*. La souche LLb7 ne fermente ni le lactose ni le raffinose, peut être rapprochée de l'espèce *Lactobacillus delbrueckii/delbrueckii*. Tandis que LLb15 et LLb16 fermentent seulement le lactose et le saccharose, sont rapprochées à l'espèce *Lactobacillus acidophilus* (Tab. 13).

Tableau 13. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches du genre *Lactobacillus*

Caractéristiques des souches	Station 1			Station 2		Station 3			Station 4			Station 5			Station 6		
	E1	E2	E3	E1	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
	LLb1	LLb2	LLb3	LLb4	LLb5	LLb6	LLb7	LLb8	LLb9	LLb10	LLb11	LLb12	LLb13	LLb14	LLb15	LLb16	LLb17
CO2 sur glucose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Croissance à 10 ° C	V	V	V	+	+	+	-	+	V	-	+	+	V	+	-	-	+
Croissance à 45 ° C	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
Esculine	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélibiose	+	-	V	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	+	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Saccharose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(V) : Variable , (ND) : Nom Déterminé , (+) : Positif , (-) : Négatif .

Tableau 14. Bilan des souches de bactéries lactiques isolées et identifiées

Souches	Espèces identifiées	Souches	Espèces identifiées
Station 1		Station 4	
LS1	<i>Ec. durans</i> (E1)	LS11	<i>Sc. thermophilus</i> (E1)
LS2	<i>Sc. thermophilus</i> (E3)	LS12	<i>Ec. faecium</i> (E2)
LS3	<i>Sc. thermophilus</i> (E2)	LS13	<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> (E3)
LS4	<i>Sc. thermophilus</i> (E2)	LLn8	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E1)
LS5	<i>Sc. thermophilus</i> (E3)	LLn9	<i>Ln. Lactis</i> (E2)
LLn1	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E1)	LLn10	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E3)
LLn2	<i>Ln. lactis</i> (E2)	LP6	<i>Pc. urinae equi</i> (E1)
LLn3	<i>Ln. lactis</i> (E3)	LP7	<i>Pc. urinae equi</i> (E2)
LP1	<i>Pc. parvulus</i> (E1)	LP8	<i>Pc. pentosaceus</i> (E3)
LP2	<i>Pc. dextranicus</i> (E2)	LLb9	<i>Lb. cellobiosus</i> (E1)
LLb1	<i>Lb. cellobiosus</i> (E1)	LLb10	<i>Lb. cellobiosus</i> (E2)
LLb2	<i>Lb. cellobiosus</i> (E2)	LLb11	<i>Lb brevis</i> ou <i>Lb. bruchneri</i> (E3)
LLb3	<i>Lb. cellobiosus</i> (E3)		
Station 2		Station 5	
LS6	<i>Ec. faecalis</i> (E1)	LS14	<i>Sc. thermophilus</i> (E1)
LS7	<i>Lc. lactis subsp. Cremoris</i> (E3)	LS15	<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> (E2)
LLn4	<i>Ln. lactis</i> (E1)	LS16	<i>Sc. Thermophilus</i> (E3)
LLb4	<i>Lb. cellobiosus</i> (E1)	L Ln11	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E1)
LLb5	<i>Lb. cellobiosus</i> (E2)	L Ln12	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E1)
		L Ln13	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E1)
Station 3		LP9	<i>Pc. urinae equi</i> (E1)
LS8	<i>Ec. faecium</i> (E1)	LP10	<i>Pc. urinae equi</i> (E2)
LS9	<i>Ec. faecium</i> (E2)	LP11	<i>Pc. urinae equi</i> (E3)
LS10	<i>Sc. thermophilus</i> (E3)	LLb12	<i>Lb. brevis</i> ou <i>Lb. bruchneri</i> (E1)
LLn5	<i>Ln. lactis</i> (E1)	LLb13	<i>Lb. brevis</i> ou <i>Lb. bruchneri</i> (E2)
LLn6	<i>Ln. lactis</i> (E2)	LLb14	<i>Lb. cellobiosus</i> (E3)
LLn7	<i>Ln. lactis</i> (E3)		
LP3	<i>Pc. urinae equi i</i> (E1)	Station 6	
LP4	<i>Pc. urinae equi i</i> (E2)	LS17	<i>Ec. faecalis</i> (E1)
LP5	<i>Pc. acidilactici</i> (E3)	LS18	<i>Ec. faecium</i> (E2)
LLb6	<i>Lb. plantarum</i> (E1)	LS19	<i>Ec. faecium</i> (E3)
LLb7	<i>Lb. delbrueckii/delbrueckii</i> (E2)	LLn14	<i>Ln. mesenteroides subsp dextranicum.</i> (E1)
L Lb8	<i>Lb. cellobiosus</i> (E3)	LLn15	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E2)
		LLn16	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i> (E3)
		LP12	<i>Pc. acidilactici</i> (E1)
		LP13	<i>Pc. acidilactici</i> (E2)
		LP14	<i>Pc. acidilactici</i> (E3)
		LLb15	<i>Lb. acidophilus</i> (E2)
		LLb16	<i>Lb. acidophilus</i> (E3)
		LLb17	<i>Lb brevis</i> ou <i>Lb. bruchneri</i> (E3)

Les abréviations entre parenthèse représentent les échantillons de lait

4. DISCUSSION

Les 66 souches sélectionnées sont Gram positif, immobiles, catalase négative, peroxydase négative et nitrate-reductase négatif. Ces résultats confirment les données de GUNTER *et al.* (1998). Les souches catalase positive (LS2, LS4, LS6, LLb5 et LLn3), peroxydase positive (LLS2, LLb2, LLb5 et LLn4) et parfois mobiles (LS4, LS5, LS6, LLb3, LP2, LLn3 et LLn4) sont observées parmi nos résultats de ROISSARD (1986) a trouvé le même type de résultat chez quelques espèces de *Lactobacillus* pour la mobilité et chez les espèces de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* sur la production de la catalase.

Les caractères cultureux, biochimiques et physiologiques ont permis de mettre en évidence 18 espèces différentes. Leurs nombres par station varie de 5 (Station 2) à 9 (Station 4). Les plus fréquemment rencontrés sont surtout les coques avec 13 espèces, alors que les lactobacilles ne constituent que 5 espèces (Tab.14).

Parmi les coques, deux espèces de *Lactococcus* ont été isolées avec une fréquence très faible : l'espèce *Lc. lactis subsp. cremoris* est représentée par une seule souche (LS7) et *Lc. lactis subsp. lactis* par deux souches (LS13 et LS15). Les mêmes espèces ont été identifiées par SAÏDI (1998) et KACEM (2003) à partir de laits crus de vaches produites dans la région de l'ouest algérien et par ZADI- KARAM (1998) dans le lait de chamelle.

Dans le genre *Enterococcus*, Les résultats obtenus par BOUBEKRI et YOSHIYUKI (1996) sur des échantillons de fromage produit traditionnellement en Algérie à partir de lait cru de vache ont montré une forte prédominance de l'espèce *Ec. faecalis*. Alors que parmi le genre *Enterococcus* isolé à partir de nos échantillons, l'espèce *Ec. faecium* est la plus fréquemment rencontrés. Tandis que, *Ec. faecalis* est représentée par deux souches (LS6 de la station 2 et LS17 de la station 6). Nos résultats laissent supposer que les conditions de traite et de stockage des laits sont défavorables à ce type de bactérie qui est d'origine fécale.

Parmi le genre *Lactococcus*, deux espèces seulement ont été identifiées : L'espèce *Lc. lactis* et *Lc. lactis subsp cremoris*. Parmi le genre *Streptococcus*, seul l'espèce *Sc. thermophilus* a été isolée des échantillons appartenant à l'ensemble des stations excepté la station 6.

Pour le genre *Leuconostoc*, deux espèces, *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, et *Ln. lactis* sont fréquemment rencontrés dans la plupart des échantillons des différentes stations étudiées.

Tableau 15. Bilan des espèces de bactéries lactiques identifiées

Station 1	Station 4
<i>Ec. durans</i> (1)	<i>Ec. Faecium</i> (1)
<i>Sc. thermophilus</i> (3)	<i>Lc. lactis subsp lactis</i> (1)
<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> (1)	<i>Sc. thermophilus</i> (1)
<i>Ln. lactis</i> (2)	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> (2)
<i>Pc. parvulus</i> (1)	<i>Ln. lactis</i> (1)
<i>Pc. dextrinicus</i> (1)	<i>Pc. acidilactici</i> (2)
<i>Lb. cellobiosus</i> (3)	<i>Lb. cellobiosus</i> (1)
	<i>Lb. brevis</i> ou <i>buchneri</i> (1)
Station 2	Station 5
<i>Ec. faecalis</i> (1)	<i>Lc. lactis subsp lactis</i> (1)
<i>Lc. lactis subsp cremoris</i> (1)	<i>Sc. thermophilus</i> (1)
<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> (1)	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> (3)
<i>Lb. cellobiosus</i> (2)	<i>Pc. urinae equi</i> (3)
	<i>Lb. cellobiosus</i> (1)
	<i>Lb. brevis</i> ou <i>buchneri</i> (1)
Station 3	Station 6
<i>Ec. faecium</i> (2)	<i>Ec. faecium</i> (2)
<i>Sc. thermophilus</i> (1)	<i>Ec. faecalis</i> (1)
<i>Ln. lactis</i> (3)	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> (3)
<i>Pc. acidilactici</i> (3)	<i>Pc. acidilactici</i> (3)
<i>Lb. cellobiosus</i> (1)	<i>Lb. brevis</i> ou <i>buchneri</i> (1)
<i>Lb. plantarum</i> (1)	<i>Lb. acidophilus</i> (2)

Les chiffres entre parenthèse représentent le nombre d'espèces identifiées

Les tests effectués pour la détermination du genre *Pediococcus*, ont abouti à l'identification de quatre espèces différentes : *Pc. pentosaceus*, *Pc. parvulus*, *Pc. urinae equi* et *Pc. acidilactici*. Généralement l'habitat naturel de ces espèces sont les matières végétales, mais peuvent aussi être trouvées dans le lait (GARVIE, 1986b).

Dans le genre *Lactobacillus*, l'espèce *Lb. cellobiosus* est largement dominante par rapport aux autres espèces isolées. 9 souches ont été isolées des échantillons de lait de 4 stations. Ce résultat concorde avec celui de LARPENT (1991).

L'espèce *Lb. plantarum* identifiée est représentée seulement par la souche LLb6. Alors que les souches du genre *Lactobacillus* isolés par KARAM (1995) appartiennent essentiellement à l'espèce *Lb. plantarum* (Tab. 15).

5. CONCLUSION

L'identification des différentes souches a montrée une répartition très variée des espèces dans les dix huit échantillons de lait appartenant aux 6 stations d'élevages. Certaines espèces sont fréquemment rencontrés telles que : *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, *Ln. lactis* et *Lb. cellobiosus*. Par contre d'autres espèces ont été isolées à partir d'un ou de deux échantillons de lait d'une seule station, c'est le cas des espèces suivantes : *Ec. durans*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbruecki/delbruecki*, *Lc. lactis subsp cremoris*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. parvulus*, *Pc. dextranicus* et *Sc. thermophilus*.

La plupart de ces espèces sont considérées comme flore de contamination et parmi la flore originelle, seulement deux espèces appartenants au genre *Lactococcus* ont été obtenues avec une fréquence très faible.

CHAPITRE 2. ETUDE DE LA MICROFLORE PECTINOLYTIQUE ISOLEE A PARTIR DES OLIVES NOIRES ET VERTES

1. INTRODUCTION

Les olives de par leur richesse en substances pectiques et autres constituants, représentent un milieu favorable pour la prolifération d'une flore pectinolytique. Cette flore peut être représentée par :

- Une flore saprophyte très variée en fonction de sa relation avec l'environnement (milieux salés, acides ou milieux naturels).
- Une flore de contamination selon que le produit se présente à l'état frais ou conservé par des différentes techniques.

Dans les deux cas, NYCHAS *et al.* (2002) ont rapporté que les différents types de flores prolifèrent de la manière suivante : les levures et moisissures se développent sur les surfaces de la peau et dans les ouvertures stomatiques des olives. Tandis que les bactéries préfèrent les espaces intercellulaires des cellules secondaires des stomates. Cette flore, très diversifiée, est composée de plusieurs espèces des genres de bactéries (bactéries lactiques, *bacillus*), de levures (*Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*) et de moisissures (*Aspergillus versicolor* et *Rhizopus stoloniferus*). Elle est considérée pectinolytique et pourrait causer le ramollissement du fruit (KAVITHA *et al.*, 1997 ; LANCIOTTI *et al.*, 1999 ; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2004 ; CAMPANIELLO *et al.*, 2005).

Le travail de ce chapitre a pour but l'isolement et la purification des souches pectinolytiques à partir d'olives noires et vertes fraîches ou conservées dans l'eau salée. Pour cela, un milieu synthétique contenant comme seul substrat énergétique la pectine, a été utilisé.

2. MATERIEL ET METHODES

2-1. PRESENTATION ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La flore totale pectinolytique est recherchée dans les échantillons d'olives noires (ONCS) et vertes (OVCS) conservés durant une année dans l'eau salée et dans les échantillons d'olives noires (ONF) et vertes (OVF) achetés à l'état frais du marché.

Pour chaque catégorie d'olive trois échantillons ont été utilisés. 5 g de chaque échantillon d'olive sont broyés puis dilués de la façon suivante :

- les échantillons ONCS et OVCS sont additionnés avec 45 mL d'eau salée ayant déjà servi pour leur conservation (solution à 0,9 % de NaCl),
 - les échantillons ONF et OVF sont additionnés à 45 mL d'eau physiologique stérile.
- A partir de la solution mère, des séries de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-5}) sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile.

2-2. DENOMBREMENT DE LA FLORE TOTALE PECTINOLYTIQUE

Le milieu de culture utilisé est le milieu MP5 (Mineral Pectin 5 Medium) proposé par ATLAS (1995), son pH est égal à 5 et il contient comme seul substrat carboné 5 g.L^{-1} de pectine de citron (DM 22 %) (Sanofi bio-industries. France). La composition de ce milieu figure dans l'annexe III.

Pour chaque dilution, 3 boîtes de Pétri sontensemencées en surface. Les cultures sont incubées à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 24 h pour les bactéries et 72 h pour les levures et moisissures. Les colonies et les mycéliums obtenus sont dénombrés et observés à la loupe binoculaire.

2-3. ISOLEMENT

A partir du milieu de dénombrement, les colonies et les mycéliums sont prélevés et repiqués successivement autant de fois jusqu'à obtention d'une souche pure. Après chaque incubation, des examens macroscopiques et microscopiques sont réalisés afin de vérifier la pureté des souches.

2-4. IDENTIFICATION DES BACTERIES

La démarche et les techniques utilisées pour identifier les souches bactériennes sont basées sur les références suivantes : PILET *et al.*, 1998 ; GUIRAUD, 1998 et SINGLETON, 1999. La composition de tous les milieux ayant servi pour l'identification des souches figure dans l'annexe III.

2-4-1. Etude des caractères morphologiques

Cette étude est basée sur des observations microscopiques (x100) permettant de différencier le type de Gram, les coques, les bacilles ainsi que la disposition des cellules.

2-4-2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

- **L'activité catalytique** : Chez les bacilles, elle permet de distinguer les bactéries sporulées, aérobies et catalase positive appartenants au genre *Bacillus* et les bacilles asporulées catalase négative du genre *Lactobacillus*.

Chez les coques, elle permet de différencier les coques lactiques et les coques non lactiques. Les coques lactiques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) sont catalase négative alors que les coques non lactiques (*Staphylococcus* et *Micrococcus*) sont catalase positive.

- **L'aptitude à la sporulation** est réalisée sur les bacilles. Ce test est basé sur la thermorésistance et permet de différencier le genre *Bacillus* caractérisé par son aptitude à la sporulation. Les souches sont cultivées sur le bouillon nutritif ordinaire contenant 0,004 % de sulfate de manganèse (agent favorable à la sporulation) en tube à essai. Après 3 à 10 jours d'incubation à 30 °C (selon les résultats obtenus), les cultures sont chauffées à 80 °C durant 10 min, repiquées sur un milieu neuf et incubées à nouveau à la même température pendant 3 jours ou plus (selon les résultats obtenus).

La coloration de Bartholomew et Mittwer est réalisée sur les souches ayant résistées au chauffage à 80 °C. Le colorant met en évidence la présence et la position de la spore (centrale ou terminale) dans la cellule. C'est un des critères pour différencier les espèces de *bacillus*.

Le frottis, fixé à la flamme, est coloré pendant 10 minutes à l'aide d'une solution aqueuse saturée de vert malachite, lavé à l'eau froide, recoloré avec de la safranine (à 0,25 % dans H₂O) durant 15 secondes, lavé à l'eau, séché et observé au microscope. Les spores apparaissent colorées en vert et le corps bactérien en rouge.

- **Le caractère homo ou hétérofermentaire** : Les coques et les bacilles Gram positif sont ensemencés sur le bouillon de Mac Cleskey. Après inoculation, 4 mL de gélose blanche sont ajoutés dans chaque tube. Les homofermentaires (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Lactococcus*) se développent dans le milieu en utilisant le sucre mais ne produisent pas de gaz. Au contraire, les hétérofermentaires (*Leuconostoc* et le groupe betabacterium du genre *Lactobacillus*) produisent du CO₂ qui se manifeste par la montée du bouchon de la gélose.

● **La présence des *Pseudomonas*** : Les bacilles Gram négatif et oxydase positive sont cultivés sur le milieu King A utilisé en tubes inclinés.

Ce milieu permet de différencier les *Pseudomonas* parmi les souches de bacilles à Gram négatif et favorise sélectivement la synthèse de la pyocyanine (production de pus) par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique. Elle se manifeste en colorant le milieu de culture en bleu ou en vert si les deux pigments de *Ps. aeruginosa* sont synthétisés à la fois).

L'ensemencement est réalisé en stries sur la surface du milieu gélosé incliné et les souches sont incubées à 30 °C pendant 1 à 4 jours. Après incubation, 0,5 mL de chloroforme sont répartis sur la surface du milieu gélosé. La pyocyanine est très soluble dans ce dernier en le colorant en bleu. Ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique sont versées et il en résulte un changement de la couleur du bleu au rouge.

● **La présence des *Acétobacter*** : Les bacilles Gram négatif et oxydase négative sont cultivés dans le bouillon glucosé pour la sélection des bactéries acétiques (test de présomption).

Les souches obtenues sont repiquées sur le milieu gélosé DSM (dextrose sorbitol mannitol), utilisé sur boîtes de Pétri, pour la différenciation des genres *Acétobacter* et *Gluconobacter*. Les *Acétobacter* qui utilisent le lactate du milieu (lactate positif) font virer le milieu au pourpre, contrairement aux *Gluconobacter* qui ne change pas la couleur (jaune) du milieu (lactate négatif). Les souches sont ensemencées en surface et incubées à 30 °C pendant 48 h.

2-5. IDENTIFICATION DES LEVURES

2-5-1. Les caractères cultureux

Les caractères cultureux sont étudiés sur le milieu à l'extrait de levure glucosé. Il est utilisé à l'état liquide ou gélosé (avec 2 % d'agar-agar). Le bouillon à l'extrait de levure glucosé permet d'observer la sédimentation des cellules, la présence d'une pellicule en surface et la formation de gaz. Le milieu à l'extrait de levure glucosé gélosé permet de définir la taille des colonies, leur forme (contour net ou irrégulier, convexe ou concave), leur aspect (mat ou brillant) et leur pigmentation. Les cultures sont incubées pendant trois jours à 28 °C, examinées à la loupe binoculaire puis laissées quatre semaines à la température du laboratoire et réexaminées.

2-5-2. Les caractères morphologiques

La morphologie cellulaire et le mode de reproduction végétative des levures isolées sont observés à l'état frais ou après coloration au microscope.

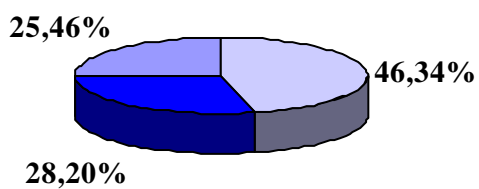
La Coloration de Schaeffer-Fulton met en évidence le type de reproduction chez les levures. Une parcelle de colonie est émulsionnée dans une goutte d'eau distillée, puis fixée à la chaleur. Le frottis est recouvert d'un colorant, le vert malachite à 5 % dans l'eau, durant 1 min puis séché par la flamme. L'excès de colorant est lavé à l'eau et la préparation est colorée à nouveau pendant 30 s à l'aide d'une solution aqueuse de safranine à 0,025 %. Après lavage et séchage, la préparation est examinée au microscope. Les ascospores sont colorés en bleu vert et les cellules végétatives en rouge.

2-6. IDENTIFICATION DES MOISSURES

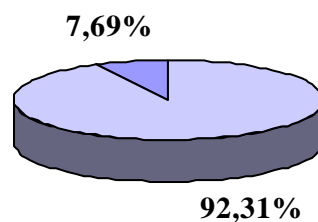
2-6-1. Les caractères culturaux

L'observation, à la loupe binoculaire, des mycéliums isolés permet de différencier les souches obtenues selon : la vitesse de croissance, la variation de la couleur au cours du temps, l'aspect de l'envers des colonies et le changement du milieu de culture et de la texture de sa surface avec présence ou non de duveté et d'odeur.

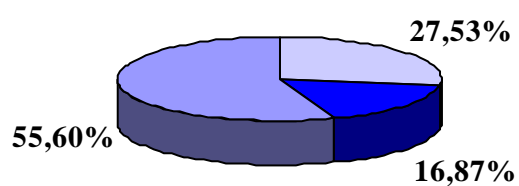
Flore de l'échantillon ONCS



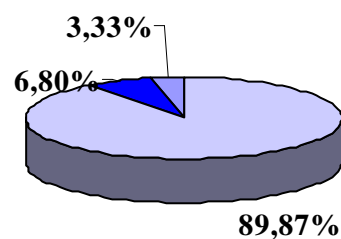
Flore de l'échantillon ONF



Flore de l'échantillon OVCS



Flore de l'échantillon OVF






Bactéries :  Levures :  Moisissures : 

Figure 17. Evaluation en pourcentage du nombre de microorganisme dénombré dans les échantillons d'olives noires (ONF ; ONCS) et vertes (OVF ; OVCS).

2-6-2. Les caractères morphologiques

Contrairement aux bactéries, l'étude des moisissures ne nécessite pas la réalisation de frottis colorés directement observables dans l'huile à immersion. Le matériel fongique est observé dans tous les cas sur milieu liquide. Le mycélium à examiner est placé sur une lame dans une goutte de liquide de montage le lactophénol, dilacéré à l'aide de deux aiguilles pour éviter la réalisation d'un frottis trop dense et inobservable, recouvert d'une lamelle et observé au microscope (x40 et x100)

L'utilisation du lactophénol d'Amann comme liquide de montage donne de très bons résultats. Il ne provoque ni contraction, ni gonflement des cellules (contrairement à l'eau), peu volatil (contrairement à l'alcool) et favorise une bonne conservation des préparations.

La Coloration à la lactofuchisine, à 0,1 % dans l'acide lactique pure, permet de mettre en relief certains détails de la structure du mycélium et le type de sexualité (forme et ornementation des spores, cloisonnement des hyphes, etc.) (BOTTON *et al.*, 1985).

3. RESULTATS

3-1. DENOMBREMENT

Dans l'échantillon ONCS, l'effectif global des souches de levures (28,20%) et de moisissures (25,46 %) est plus élevé que celui des bactéries (46,15 %). Alors que dans l'échantillon ONF, les bactéries sont largement représentées (92,31%) et seules les moisissures sont observées (7,69 %) dans la catégorie des champignons (Fig. 17).

Dans l'échantillon OVCS, la flore dominante est représentée par les moisissures (55,6%) alors que dans l'échantillon OVF, elle est constituée essentiellement de bactéries (89,87%) (Fig. 17).

3-2. ISOLEMENT

Les souches retenues sont sélectionnées selon la fréquence de leur présence dans le milieu d'isolement.

Dans les échantillons d'olives noires, Les bactéries sont représentées par les souches S1, S3, S5, S6, S7, S8, S11 (isolées de l'échantillon ONF), S12, S13 (de l'échantillon ONCS), les levures par les souches S9 et S10 (de l'échantillon ONCS) et la moisissure par S14 (de l'échantillon ONF).

Dans les échantillons d'olives vertes, les souches bactériennes sont représentées par : S'3, S'9, S'10, S'11, S'12 (isolées de l'échantillon OVF), S'1, S'5, S'6, S'7 (de l'échantillon OVCS), les souches de levures S'2 (de l'échantillon OVCS) et S'4 (de l'échantillon OVF) et la moisissure S'8 (de l'échantillon OVCS).

Tableau 16. Morphologie des souches bactériennes isolées des échantillons d'olives noire

Souches	Echs.	Les colonies				Les cellules	
		Couleur	Forme	Pourtour	Surface	Forme	Disposition
S1	ONF	Blanc-crème	Circulaire et bombé	Régulier et halo clair	Lisse et brillante	Coques	Isolées et en chaînettes
S3	ONF	Blanc-crème	Circulaire et plate	Irrégulier et halo clair	Lisse	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S5	ONF	Blanc-crème	Circulaire et plate	Régulier	Lisse	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S6	ONF	Blanche	Circulaire et plate	Irrégulier et halo clair	Lisse	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S7	ONF	Blanche	Circulaire et plate	Irrégulier	Lisse et brillante	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S8	ONF	Blanche	Circulaire et bombée	Irrégulier	Lisse et brillante	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S11	ONF	Blanc-crème	Circulaire et plate	Régulier	Lisse	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S12	ONCS	Blanc-crème	Circulaire et Plate	Irrégulier	Lisse	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas
S13	ONCS	Blanc-crème	Circulaire et plate	Irrégulier	Lisse	Bacilles	Isolées, en paires, en chaînettes et en amas

Echs. : les échantillons d'olives noires

3-3. IDENTIFICATION DES BACTERIES

3-3-1. Caractères morphologiques et culturels

Dans les échantillons d'olives noires, les colonies des souches S1, S7, S8 sont de couleur blanche avec une surface lisse et brillante (S1, S7, S8), de forme circulaire, plate (S7) et bombée (S1, S8). Alors que les colonies des souches S3, S5, S6, S11, S12, S13 présentent une couleur blanc-crème, une forme circulaire et plate. L'observation microscopique, montre deux formes de cellules : des coques isolées et en chaînettes (S1) et des bacilles Isolés, en paires, en chaînettes et en amas(S3, S5, S6, S7, S8, S11, S12, S13) (Tab.16). Dans les échantillons d'olives vertes plusieurs variétés de colonies sont isolées : des colonies de couleurs jaune (S'1), orange (S'12) et blancs crèmes (S'11) à blanches (S'3, S'5, S'6, S'7, S'9, S'10) et avec des formes lenticulaires (S'9), circulaire et bombée (S'1, S'5) ou circulaire et plate (S'3, S'6, S'7, S'10, S'11, S'12). Les souches observées au microscope révèlent des formes de coques (S'1, S'9 et S'10), de coccobacilles (S'3) et de bacilles (S'5, S'6, S'7, S'11, S'12). Les cellules de S'1 et de S'10 sont disposées en diplocoques ou en tétrades. Les cellules de S'9 sont des coques isolées ou disposées en chaînettes. Les cellules des bacilles sont soit isolées ou disposées en paires et en chaînettes (Tabl.17).

3-3-2. Caractères biochimiques et physiologiques

Dans les échantillons d'olives noires, les souches S3, S5, S6, S7, S8, S11, S12, S13 sont des bacilles aérobies, Gram positif, catalase positive, thermorésistantes et possèdent des endospores ovales. Ces derniers apparaissent comme un corps brillant au centre de la cellule chez l'ensemble des souches et sur la partie terminale avec un bord sombre coloré en vert chez S5. Les cellules sporulées sont nombreuses par rapport aux cellules végétatives qui sont colorées en rouge. Les souches S5, S6, S7, S8, S11 et S12 appartiennent au groupe 1 (spore ovale non déformante à paroi mince) et les souches S3 et S13 au groupe 2 (spore ovale déformante à paroi épaisse). Ces résultats permettent de classer toutes ces souches dans le genre *Bacillus*. Dans les échantillons d'olives vertes, les souches S'3 et S'5 sont des bacilles Gram négatif, mobiles et asporulées. La souche S'3 est oxydase positive et présente une croissance positive sur le milieu de King A, elle appartient au genre *Pseudomonas*. Tandis que S'5 est oxydase négative et dégrade l'acide lactique contenu dans le milieu DMS, elle appartient au genre *Acetobacter*.

Les souches S'11 et S'12 sont des bacilles Gram positif, catalase positive, thermorésistantes et possèdent une endospore située au centre de la cellule. S'11 appartient au groupe 1 et S'12 au groupe 2 du genre *Bacillus*. Les souches S'6 et S'7 sont des bacilles Gram positif et catalase négative. La production de gaz observée dans le milieu Mac Cleskey indique qu'elles sont hétérofermentaires. Elles sont classées dans le genre *Lactobacillus*. (Tab. 18).

Tableau 17. Morphologie des souches bactériennes isolées des échantillons d'olives vertes

Souches	Echs.	Les colonies				Les cellules	
		Couleur	Forme	Pourtour	Surface	Forme	Disposition
S'1	OVCS	Jaune	Circulaire et bombé	Régulier	Lisse, brillante	Coques	Diplocoques et tétrades
S'3	ONF	Blanche	Circulaire et plate	Régulier	Lisse et brillante	Coccobacilles	Isolées, en paires et parfois en amas
S'5	OVCS	Blanche	Circulaire et bombée	Régulière	Lisse, brillante	Bacilles	Isolées et en paires
S'6	OVCS	Blanche	Circulaires et plates	Irrégulier	Lisse et transparente	Bacilles	Isolées, en paires et en chaînettes
S'7	OVC	Blanche	Circulaires et plates	Irrégulier	Lisse et transparente	Bacilles	Isolées, en paires et en chaînettes
S'9	OVF	Blanche	Lenticulaire	Régulier	Lisse, brillante	Coques	Isolés et en chaînettes
S'10	OVF	Blanche	Circulaire et plate	Régulier	Plissée, brillante	Coques	Diplocoques et tétrades
S'11	OVF	Blanc crème	Circulaire et plate	Irrégulier	Rugueuse, mate	Bacilles	Isolés, en paires et en chaînettes
S'12	OVF	Orange	Circulaire et plate	Régulier	Lisse, brillante	Bacilles	Isolés, en paires et en chaînettes

Tableau 18. Souches, en forme de bacilles, isolées des échantillons d'olives noires et vertes

Souches	1	Echs.	2	3	4	5	6	Identifiées à
S3	ONB3	ONF	+	+	+2C			<i>Bacillus</i> sp.
S5	ONB5	ONF	+	+	+1T			<i>Bacillus</i> sp.
S6	ONB6	ONF	+	+	+1C			<i>Bacillus</i> sp.
S7	ONB7	ONF	+	+	+1C			<i>Bacillus</i> sp.
S8	ONB8	ONF	+	+	+1C			<i>Bacillus</i> sp.
S11	ONB11	ONF	+	+	+1C			<i>Bacillus</i> sp.
S12	ONB12	ONCS	+	+	+1C			<i>Bacillus</i> sp.
S13	ONB13	ONCS	+	+	+2C			<i>Bacillus</i> sp.
S'3	OVPs3	OVF	-	(+1)		King A+		<i>Pseudomonas</i> sp.
S'5	OVAc5	OVCS	-	(-1)		Lact+		<i>Acetobacter</i> sp.
S'6	OVLb6	OVCS	+	-			Hétéro-F	<i>Lactobacillus</i> sp.
S'7	OVLb7	OVCS	+	-			Hétéro-F	<i>Lactobacillus</i> sp.
S'11	OVB11	OVF	+	+	+2C			<i>Bacillus</i> sp.
S'12	OVB12	OVF	+	+	+1C			<i>Bacillus</i> sp.

1: Nouvelle appellation des souches ; **Echs :** Echantillons d'olives ; **2:** Gram; **3:** Catalase (+ou -), oxydase positive (+1) ou oxydase négative (-1) ; **4:** Thermorésistance et sporulation (C : spore centrale ; T : spore terminale, +1 : spore ovale non déformante à paroi mince, +2 : spore ovale déformante à paroi épaisse ; **5 :** Croissance sur DMS avec utilisation du lactate (Lact+) ; Croissance sur King A avec pigmentation (King A+) ; **6 :** Type fermentaire: Hétéro-F (hétérofermentaire)

Dans les échantillons d'olives noires, une seule souche (S1) en forme de coque est obtenue. Elle est Gram positif, immobile, catalase indéterminée et produit du gaz dans le milieu de Mac Cleskey (hétérofermentaire) et correspond au genre *Leuconostoc*.

Dans les échantillons d'olives vertes, les souches S'1 et S'10 sont des coques. Elles produisent de l'acide lactique, dans le milieu de Mac Cleskey, elles sont homofermentaires et peuvent être rapprochées du genre *Pediococcus*. La souche S'9 est aussi en forme de coque, elle produit de l'acide lactique et du gaz dans le même milieu et elle est considérée hétérofermentaire et se rapproche du genre *Leuconostoc* (Tab. 19).

Tableau 19. Coques lactiques isolées des échantillons d'olives noires et vertes

Souches	1	Echs.	Gram	Catalase	Type fermentaire	Identifiées à
S1	ONLn1	ONF	+	Ind	Hétéro-F	<i>Leuconostoc</i> sp.
S'1	OVP1	OVCS	+	-	Homo-F	<i>Pediococcus</i> sp.
S'9	OVLn9	OVF	+	Ind	Hétéro-F	<i>Leuconostoc</i> sp.
S'10	OVP10	OVF	+	-	Homo-F	<i>Pediococcus</i> sp.

1 : Nouvelle appellation des souches; **Echs** : les échantillons d'olives ; **Ind** : indéterminé ; **Hétéro-F** : hétérofermentaire; **Homo-F** : Homofermentaire.

Tableau 20. Souches de levures isolées des échantillons d'olives noires (S9 et S10) et vertes (S'2 et S'4).

	Souches		Ech.	Les colonies		Les cellules		Identifiées à	
	1			2	3	4	5	6	
99	S9	ONRh9	ONCS	Orange	Circulaire et plate	régulier	Ovales	B1	<i>Rhodotorula</i> sp.
	S10	ONCr10	ONCS	Blanche	Circulaire et plate	régulier	Ovales et rondes	B1	<i>Cryptococcus</i> sp.
	S'2	OVE n2	OVCS	Blanche	Circulaire et bombée	régulier	Ovales	B2	<i>Endomyces</i> sp.
	S'4	OVCa4	OVF	Crème	Circulaire et plate	régulier	Fusifformes	B2	<i>Candida</i> sp.

1 : Nouvelle appellation des souches ; **2** : Couleur; **3** : Forme ; **4** : Pourtour ; **5** : Forme ; **6** : bourgeonnement: (multilatéral =**B1**, multipolaire =**B2**)

3-4. IDENTIFICATION DES LEVURES

Dans les échantillons d'olives noires, deux souches de levure S9 et S10 sont isolées. Leurs colonies sont de couleur orange (S9) et blanche (S10), circulaire, plate, brillante (S9) et mat (S10). L'observation au microscope de leurs cellules, colorées au bleu de méthylène, montre des formes ovoïdes (S9) et ovales (S10) (Tab. 20). A l'état frais les deux souches présentent des pseudomycéliums avec des bourgeonnements multilatéraux et sans aucune forme sporale.

Les caractères culturels des souches de levures S9 et S10 montrent une sédimentation des cellules cultivées dans le milieu yeast-glucose (YG) en tube et une croissance positive sur la gélose à l'extrait de levure glucosé (YGA).

Ces résultats sont conformes à ceux donnés par Davise Larone (1987) pour les genres *Rhodotorula* (S9) et *Cryptococcus* (S10).

Dans les échantillons d'olives vertes, les colonies des souches S'2 et S'4 isolées, sont de couleurs blanches, rondes et bombées (S'2), crèmes, rondes et plates (S'4) et avec un pourtour régulier pour les deux. Leurs cellules, observées au microscope, sont ovoïdes (S'2) ou fusiformes (S'4). Les deux souches présentent aussi une reproduction par bourgeonnement multipolaire.

La coloration de Schaeffer-Fulton a donné les résultats suivants :

- les cellules de S'2 présentent des ascospores colorées en vert, disposés au centre de la cellule, leur nombre varie de 2 à 4 spores par cellule. Les cellules végétatives sont colorées en rouge.

La souche S'2 répond aux caractéristiques des Ascomycètes, de la famille des Endomycetoïdeae, et du genre des *Endomyces*.

- Les cellules de S'4 sont aussi colorées en rouge et les spores ne sont pas observées. La souche S'4 présente les caractéristiques des *Deutéromycètes*, de la famille des *Cryptococcoideae* du genre *Candida* (Tab. 20) (GUIRAUD et GALZY, 1980 et GUIRAUD, 1998).

3-5. Identification des moisissures

Dans l'échantillon des olives noires, une seule espèce représentée par la souche S14 a été isolée. L'observation macroscopique de la souche montre la présence d'un thalle à croissance lente, un aspect laineux et une couleur blanche obtenue après 2 jours de culture. Au bout de 5 jours la couleur du mycélium devient brun foncé avec un revers blanc à jaune. La présence de globules visqueuse sur la surface du mycélium a été observée à la loupe binoculaire.

L'observation microscopique a montré des hyphes septés avec des conidiophores longs, non ramifiés, renflés sous forme de vésicules globuleuses. Les phyalides couvrent entièrement la vésicule et les spores sont rondes et lisses. Selon BRETON (1985) et DAVISE LARONE (1987), ces caractéristiques nous permettent de classer la souche S14 parmi l'espèce *Aspergillus niger*. La souche S14 sera nommée souche ONAs14.

Dans les échantillons d'olives vertes, les colonies de la souche S'8 ont une couleur blanche avec une forme mycélienne, veloutée et brillante. Les mycéliums possèdent des sporocystes noires, brillants et localisés sur la périphérie. La présence des gouttelettes de transpiration sur la surface est aussi observée.

Après coloration à la lactofushine et examen au microscope, les mycéliums présentent des thalles très longs, non ramifiés, non cloisonnés avec des stolons bien différenciés qui se terminent par un système de rhizoïdes. Les sporocystophores isolés se dressent à partir des points d'insertion des rhizoïdes. Les apophytes ont une forme d'un entonnoir, limité entre le sporocystophores et le sporocyste. La columelle est de couleur brune et globuleuse. Les sporanges sont globuleux, noires et remplies de spores. Ces dernières ont une forme ellipsoïdale, lisse et de couleur grise à noire. La souche S'8 répond aux caractéristiques des Zygomycètes, de l'ordre des Mucorales : c'est un *Rhizopus*. La souche S'8 sera nommée souche OVRi8.

4. DISCUSSION

Le milieu de culture MP5, considéré sélectif de par sa composition (contient 0,5 % de pectine comme seul substrat carboné), nous a permis d'obtenir 24 souches supposées être pectinolytiques. Elles sont constituées de bactéries (18 souches), de levures (4 souches) et de moisissures (2 souches).

Les *bacillus* sont des contaminants des olives. Ils ont été isolés de la plupart des échantillons analysés (11 souches). Ce résultat rejoint celui de CAMPANIELLO *et al.* (2005). Parmi ce genre, l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les olives est *Bacillus subtilis*, considérée pectinolytiques causant le ramollissement du fruit (ASEHRAOU *et al.*, 1993 ; LANCIOTTI *et al.*, 1999).

Une seule souche de *Pseudomonas* a été identifiée à partir de l'échantillon OVF. Selon certains auteurs les *Pseudomonas* sont aussi des contaminants des olives (GUIRAUD, 1998) ; CAMPANIELLO *et al.*, 2005) et les espèces de ce genre sont dotées d'une grande activité métabolique (Protéolyse, lipolyse et la dégradation des substances carbonées) (THIERRY, 1997).

Parmi les bactéries lactiques, seulement trois genres représentées par: *Leuconostoc* (2 souches), *Pediococcus* (2 souches) et *Lactobacillus* (2 souches) sont identifiés.

Le nombre de souche du genre *Lactobacillus* obtenu ne correspond pas avec les résultats de certains auteurs qui ont démontrés une grande prédominance, dans les olives, du genre *Lactobacillus* avec la présence de *Pediococcus* et de *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides*) (BORCAKLI *et al.*, 1993a ; KOTZEKIDOU 1997 ; CATULO *et al.*, 2002).

Le genre *Lactococcus* n'a pas été identifié alors que les travaux de KACEM (2005) démontrent la présence de 17 souches isolées des olives fermentées.

Parmi les levures identifiées, la présence de souches des genres *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *Candida* dans les échantillons d'olives, est en accord avec les travaux de plusieurs auteurs qui ont isolé les espèces de ces genres à partir d'olives (VAUGHIN *et al.*, 1969 ; ASEHRAOU *et al.*, 2000 ; CAMPANIELLO *et al.*, 2005).

Les souches *Aspergillus niger* et *Rhizopus* sp., isolées respectivement des échantillons ONF et OVCS, ont aussi été obtenu à partir de plusieurs huiles végétales en particulier l'huile d'olive (BRETON 1985 ; KAVITHA *et al.*, 1997).

5. CONCLUSION

Vingt quatre souches sont isolées à partir d'échantillons d'olives noires et vertes. Le milieu de culture MP5 (à 0,5 % de pectine) utilisé pour leur l'isolement a permis d'obtenir une flore très variée et capable de dégrader le substrat pectine. Le plus nombre de souche obtenu appartient au genre *Bacillus*. Mais d'autre genre sont identifiés avec un nombre de souche plus faible. Les bactéries lactiques sont représentées par les genres *Leuconostoc* (2 souches), *Pediococcus* (2 souches) et *Lactobacillus* (2 souches).

Parmi les levures, les genres identifiés sont : *Rhodotorula* (1 souche), *Cryptococcus* (1 souche), *Candida* (1 souche) et *Endomyces* (1 souche). Et parmi les moisissures, le genre *Rhizopus* (1 souche) et l'espèce *Aspergillus niger* (1 souche) sont identifiés. La plupart des auteurs ont confirmés l'existence de tous ces genres dans les olives.

CHAPITRE 3. MISE EN EVIDENCE DE L' ACTIVITE PECTINOLYTIQUE ET EVALUATION DE LA POLYGALACTURONASE

1. INTRODUCTION

Les polygalacturonases, par leur action dépolymérisante, ont un effet considérable sur la modification des propriétés physico-chimiques des pectines et des pectates. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons alpha-1,4 glycosidique dans le polymère pectique (pectine ou acide polygalacturonique) générant des oligomères d'acide galacturonique dosés par l'augmentation du pouvoir réducteur.

L'activité polygalacturonase chez les microorganismes peut être détectée soit en milieu liquide soit en milieu solide :

- Dans le milieu liquide, la dégradation de la pectine aboutit à l'acide galacturonique qui acidifie le milieu et l'acidification peut être mise en évidence par le contrôle du pH. Cette technique a été utilisée par LUH et PHAFF (1951) et par BELL et ETCHELL (1956) pour tester l'activité pectinolytique chez plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

- Dans le milieu solide ou semi solide, l'hydrolyse enzymatique des substances pectiques est caractérisée par la clarification du milieu. Deux techniques ont été utilisées : celle de TANSEY (1971) a permis de mettre en évidence des cellulases chez les champignons et celle de MCKAY (1988) des pectinases chez l'espèce *Saccharomyces fragilis*. D'autres auteurs ont utilisé la technique de MCKAY (1988) pour rechercher les activités pectinases chez les bactéries lactiques (ZADI-KARAM, 1998) et chez *Saccharomyces cerevisiae* (GAINVORS et BELARBI, 1995 ; BLANCO *et al.*, 1994 ; GOGNIES *et al.*, 2001).

Dans la première partie de ce chapitre, des essais de mise en évidence de l'activité pectinolytique sont réalisés sur 42 souches isolées à partir des échantillons de lait et d'olives noires et vertes. Pour ce faire, les techniques citées précédemment sont utilisées.

La deuxième partie est consacrée à l'évaluation de l'activité polygalacturonase des 42 souches, selon les techniques combinées de NELSON (1944) et de SOMOGY (1952) et dont le principe est basé sur l'hydrolyse enzymatique des liaisons glycolytiques qui libère des groupements réducteurs des oses (acide galacturonique). En milieu alcalin, le groupement pseudo-aldéhyde des extrémités réductrices réduit les ions cuivriques (Cu^{++}), présents dans la solution, en ion cuivreux (Cu^{+}).

Ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont la densité optique, mesurée à 600 nm, varie linéairement avec la concentration en oses réducteurs.

2. MATERIEL ET METHODES

2-1. PRESENTATION DES SOUCHES UTILISEES

Pour cette étude, nous avons utilisés :

- Dix huit souches de bactéries lactiques sélectionnées parmi le lot des 66 souches isolées à partir du lait cru de vache (chapitre 1) et appartenant aux genres : *Leuconostoc* (LLn1, LLn2), *Lactococcus* (LLc7, LLc13 anciennement appelées LS7 et LS13), *Lactobacillus* (LLb1, LLb6, LLb7, LLb11, LLb15), *Streptococcus* (LSc2 anciennement appelées LS2), *Enterococcus* (LEc1, LEc6, LEc8 anciennement appelées LS1, LS6, LS8) et *Pediococcus* (LP1, LP2, LP3, LP5, LP8).
- Vingt quatre souches isolées à partir des échantillons d'olives noires et vertes (chapitre 2) et appartenants aux genres : *Bacillus* (ONB3, ONB5, ONB6, ONB7, ONB8, ONB11, ONB12, ONB13, OVB11, OVB12), *Pseudomonas* (OVPS3), *Acetobacter* (OVAc5), *Lactobacillus* (OVLb6, OVLb7), *Leuconostoc* (ONLn1, OVLn9), *Pediococcus* (OVP1, OVP10), *Rhodotorula* (ONRh9), *Cryptococcus* (ONCr10), *Aspergillus* (ONAs14), *Endomyces* (OVEn2), *Candida* (OVCa4) et *Rhizopus* (OVRi8).

2-2. MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DE LA PECTINE

Pour mettre en évidence la dégradation du substrat par les enzymes sécrétées, différents tests sont réalisés : l'acidification sur milieu liquide, la clarification sur milieu semi solide en tube et sur milieu solide en boîte de pétri.

2-2-1. Test d'acidification

Les souches sont cultivées sur le milieu MP5 (annexe III) liquide, à pH 5, contenant 0,5 % de pectine de citron (DM 22%) et additionnées d'une solution aqueuse de vert de bromocrésol (1 %). Le pH du virage de la coloration de cet indicateur est situé entre 3,8 et 5,4.

Le milieu est réparti en tube puis stérilisé à 120 °C durant 20 min. Un mL de l'inoculum estensemencé et incubé à 30 °C. La première lecture est observée à partir du deuxième jour d'incubation. L'acidification du milieu se traduit par le virage de la couleur initiale de l'indicateur de pH du vert au jaune.

2-2-2. Test de clarification

Pour mettre en évidence l'hydrolyse enzymatique du substrat, deux techniques sont utilisées :

- **La technique de TANSEY (1971)** permet de visualiser l'hydrolyse de la pectine par la mesure de la zone de clarification du milieu. Elle est réalisée dans le milieu MP5 semi solide contenant 0,5 % de gélose (annexe III).

Le milieu est réparti en tubes à raison de 9 mL puisensemencés sur une surface non inclinée, avec une suspension de cellules. Ces tubes sont incubés à 30 °C en présence d'un témoin nonensemencé. La première lecture est observée après 24 h d'incubation. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une zone d'hydrolyse dans le milieu qui est évaluée par la mesure en mm de la hauteur de clarification.

- **La technique décrite par MCKAY (1988)** permet d'observer l'activité polygalacturonase des souches cultivées sur le milieu MP5 solide, en boîte de Pétri. Cette activité est révélée au bleu de méthylène (ZADI-KARAM, 1998). La présence de polygalacturonase sécrétée par les souches testées, dépolymérise le substrat en favorisant ainsi la pénétration du colorant dans le milieu. Le colorant se fixe sélectivement sur les groupements carboxyles formés par des unités galacturonique issus de l'hydrolyse du substrat pectique. Dans le cas contraire, le colorant reste sur la surface du milieu et disparaît après lavage à l'eau. L'ensemencement est réalisé sur la surface. Après incubation des souches à 30 °C, un premier lavage à l'eau distillée est réalisé pour éliminer les colonies développées. Le milieu gélosé est inondé de la solution de bleu de méthylène à 0,02 % pendant quelques minutes puis lavé abondamment avec de l'eau distillée.

La mise en évidence de cette activité est caractérisée par deux cas possibles:

- la présence d'un halo clair autour des colonies, signifie une hydrolyse complète du substrat, donc le colorant ne se fixe pas sur le réseau pectique.
- la présence d'un halo coloré autour des colonies indique l'hydrolyse partielle de la pectine qui aboutit à l'acide polygalacturonique et les autres éléments constituant le réseau pectique
- L'inexistence d'halo entourant les colonies et l'élimination du colorant après lavage révèlent un résultat négatif : donc il n'y a pas d'enzymes pectinolytiques produites.

2-3. CROISSANCE CELLULAIRE ET PRODUCTION DE POLYGALACTURONASE

Des ballons de 250 mL contenant chacun 150 mL de milieu MP5 liquide (annexe III) ont été inoculés par les souches. Le pH initial du milieu est égal à 5.

Les cultures sont incubées à 30 °C sous agitation rotative (105 Tours.min⁻¹) durant 24 h pour les bactéries et 72 h pour les levures et moisissures.

2-3-1. Evaluation de la biomasse cellulaire

Après incubation des cultures, la biomasse cellulaire est évaluée par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Uvikon 860).

2-3-2. Mesure de l'activité polygalacturonase

Le dosage de cette activité est réalisé sur des surnageants des cultures appartenant aux 42 souches. Les surnageants sont récupérés par centrifugation (12 000 g durant 15 min et à 4 °C). 10 mL de chaque surnageants sont mis dans des boudins pour être dialysé durant 2 jours à 4 °C contre 5 L d'eau déionisée. Ce traitement a pour but de concentrer la fraction enzymatique contenue dans le surnageant.

- **La solution de substrat** utilisée pour la réaction enzymatique, est une solution de polymère d'acide polygalacturonique (DE 0%) (Fluka France) à 0,5 % dans du tampon acétate de sodium (50 mM ; pH=5) (AVALLONE *et al.*, 2002).

- **Le milieu réactionnel** est préparé dans des tubes à hémolyses, où 450 µL de la solution de substrat et 50 µL du surnageant des cultures sont ajoutés dans cet ordre. Le mélange est incubé à 40 °C dans un bain-marie pendant 10 min, puis 125 µL sont prélevés et versé dans une plaque Elisa (Σ960) de 2,2 mL contenant déjà 125 µL de la solution C (annexe IV). Parallèlement, le témoin est préparé dans un des puits de la plaque contenant 125 µL de la solution C, où sont ajoutés dans l'ordre : 12,5 µL de surnageants des cultures (Dans les mêmes conditions que dans l'essai) et 112,5 µL de la solution de substrat. Le mélange n'est pas incubé à 40 °C.

- **La gamme étalon** : elle est préparée à partir de la solution mère de l'ose constitutif du substrat (D-(+)- acide monogalacturonique monohydraté) (Fluka) à 1 mg.mL⁻¹. Cette dernière est diluée au ¼ afin d'obtenir une concentration en ose égale à 250 µg. mL. Elle est réalisée dans des concentrations situées entre 0 et 250 µg.mL⁻¹ dans un volume total de 125µL.

Concentration en oses ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0	50	100	150	200	250
Solution en ose (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
H ₂ O (mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Volume total (mL)	1	1	1	1	1	1

• **La réaction colorimétrique :** les tubes à hémolyses de la réaction enzymatique, du témoin et de la gamme étalon, sont mises dans un bain-marie bouillant durant 15 min (pour stopper la réaction), refroidies puis 125 μl de la solution D (annexe IV) sont ajoutés et agités durant 10 min avant l'addition de 1 mL de H₂O. 250 μL de chacun des milieux sont transvasés dans les puits d'une plaque Elisa. La densité optique à 600 nm, est lue sur un lecteur de plaques.

Tableau 21, Acidification du milieu MP5 par les souches isolées

Souches	Acidification			Souches	Acidification		
	2 Jrs	3 Jrs	4 Jrs		2 Jrs	3 Jrs	4 Jrs
Souches isolées des échantillons de lait cru							
LLb1	-	-	+	LP1	-	+	+
LLb6	-	+	+	LP2	-	+	+
LLb7	-	+	+	LP3	-	-	-
LLb11	-	-	-	LP5	+	+	+
LLb15	-	+	+	LP8	-	-	+
LLn1	+	+	+	LSc2	+	+	+
LLn2	-	-	+	Lec1	-	-	-
LLc7	+	+	+	Lec6	-	-	-
LLc13	-	-	+	Lec8	-	-	-
Souches isolées des échantillons d'olives noires				Souches isolées des échantillons d'olives vertes			
ONB3	-	-	+	OVB11	+	+	+
ONB5	-	+	+	OVB12	-	-	+
ONB6	-	-	+	OVLb6	+	+	+
ONB7	-	-	+	OVLb7	+	+	+
ONB8	-	-	+	OVLn9	-	-	+
ONB11	-	-	+	OVP1	-	-	+
ONB12	-	+	+	OVP10	-	-	+
ONB13	+	+	+	OVPs3	-	-	+
ONLn1	-	-	+	OVAc5	-	-	+
ONRh9	-	-	+	OVCa4	-	-	+
ONCr10	-	-	+	OVEN2	-	-	-
ONAs14	-	-	+	OVRi8	-	-	+

● **Calculs et expression des résultats :**

- La gamme étalon est exprimée en concentration d'oses en μmole afin d'obtenir une valeur de pente en μmole . Le temps d'incubation est évalué en minute.

- L'activité enzymatique est exprimée en Unité Internationale par mL de milieu réactionnel. Une unité d'activité polygalacturonase représente la quantité d'enzyme qui libère une μmole d'acide galacturonique par minute dans les mêmes conditions de pH et de température. Le calcul de l'activité polygalacturonase est effectué selon la formule suivante : $U. I = \frac{DO_n - DO_0}{(\text{pente}) \times 10 \times 1/10}$.

DO_n : La valeur observée dans le milieu réactionnel ; DO_0 : elle correspond à la valeur du blanc ; U.I: exprimé en $\mu\text{mol.mL}^{-1}$; Pente : c'est la valeur de x obtenue par l'évaluation de la concentration en monomère (de la gamme étalon) selon l'équation : $y = a x + b$; 10 : le taux de dilution de l'enzyme dans le milieu réactionnel ; 10 : le temps en minute de la réaction enzymatique.

3. RESULTATS

3-1. ACIDIFICATION DU MILIEU

Le bilan du résultat obtenu pour les bactéries lactiques isolées du lait cru est le suivant :

- Les souches LLn1, LLc7, LP5 et LSc2 acidifient le milieu dès le deuxième jour de culture.
- Les souches LLb6, LLb7, LP1 et LP2 acidifient le milieu après trois jours d'incubation.
- Les souches LLb1, LLn2, LLc13 et LP8 acidifient le milieu après 4 jours.
- Les souches LLb11, LP3 ainsi que les trois souches du genre *Enterococcus* ne donnent aucune réponse.

Parmi les souches isolées des échantillons d'olives noires et vertes, seules ONB13, OVB11, OVLb6 et OVLb7 acidifient le milieu après deux jours de cultures. Les souches ONB5 et ONB12 acidifient le milieu après trois jours d'incubation. Quant aux autres souches, elles modifient la couleur du milieu après quatre jours de cultures à l'exception de OVEN2. (Tab. 21).

3-2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

3-2-1. L'hydrolyse enzymatique selon la technique de TANSEY (1971)

Chez les souches des échantillons de lait cru, les hauteurs de clarifications mesurées varient de 1 à 5,5 mm. Les valeurs maximales des zones d'hydrolyses déterminées chez les Lactobacilles sont : de 2 mm pour LLb15, 1 mm pour LLb6 et 1,5 mm pour LLb7. Les temps d'incubations respectifs utilisés sont de 2, 4 et 5 jours.

Chez les souches du genre *Leuconostoc* : Les valeurs d'hydrolyses maximales sont observées après 15 jours de culture : la souche LLn1 présente une hydrolyse de 5,5 mm de hauteur et LLn2 une hydrolyse de 5 mm.

Chez les *Lactococcus*, les valeurs maximales des hauteurs d'hydrolyses enzymatiques des souches LLC7 et LLC13 sont obtenues après 10 jours de cultures et sont respectivement égales à 4 mm et 3,5 mm. Parmi le genre *Pediococcus*, LP5 présente après 20 jours de culture une hauteur d'hydrolyse la plus élevée et égale à 4,5 mm. Et pour les autres souches les valeurs sont comprises entre 3 mm (LP1 et LP3) et 3,5 mm (LP2, LP8) et elles sont observées dans le même temps que celui de la souche LPP5. La hauteur d'hydrolyse maximale observée, après 15 jours d'incubation dans le milieu utilisé par la souche LSc2 du genre *Streptococcus* est égale à 4,5 mm. Seules les souches LEC1, LEC8, LLb1 et LLb11 n'hydrolysent pratiquement pas le substrat et leurs valeurs d'hydrolyses maximales sont de 1mm (Fig. 18).

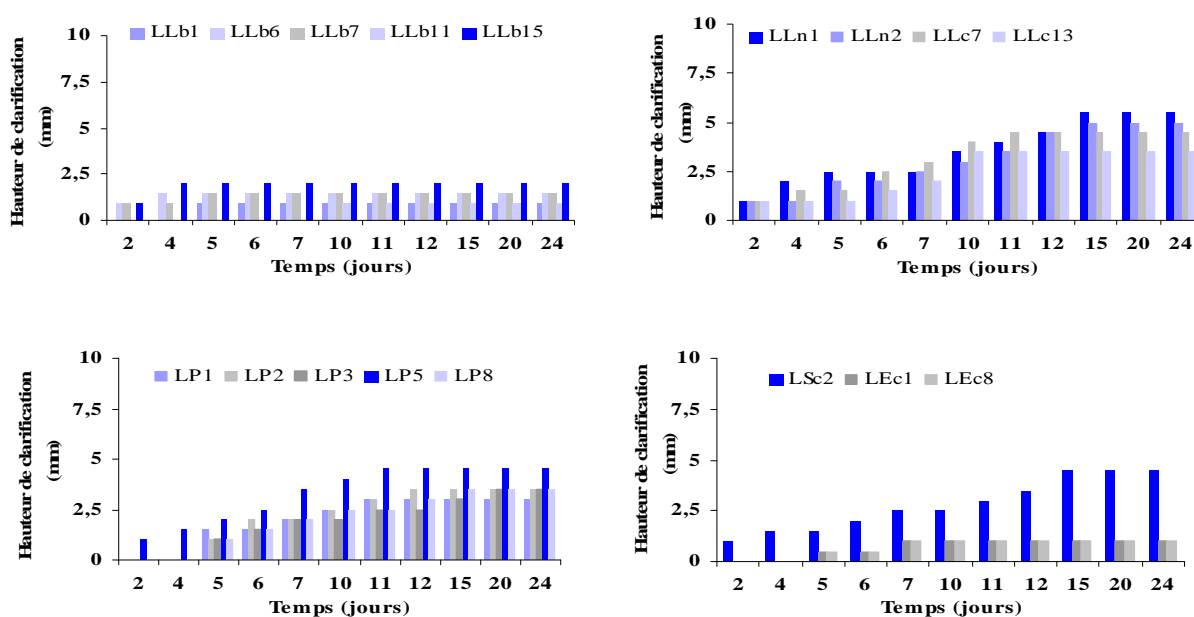


Figure 18. Evolution de la hauteur de clarification du milieu MP5 par les souches isolées du lait cru.

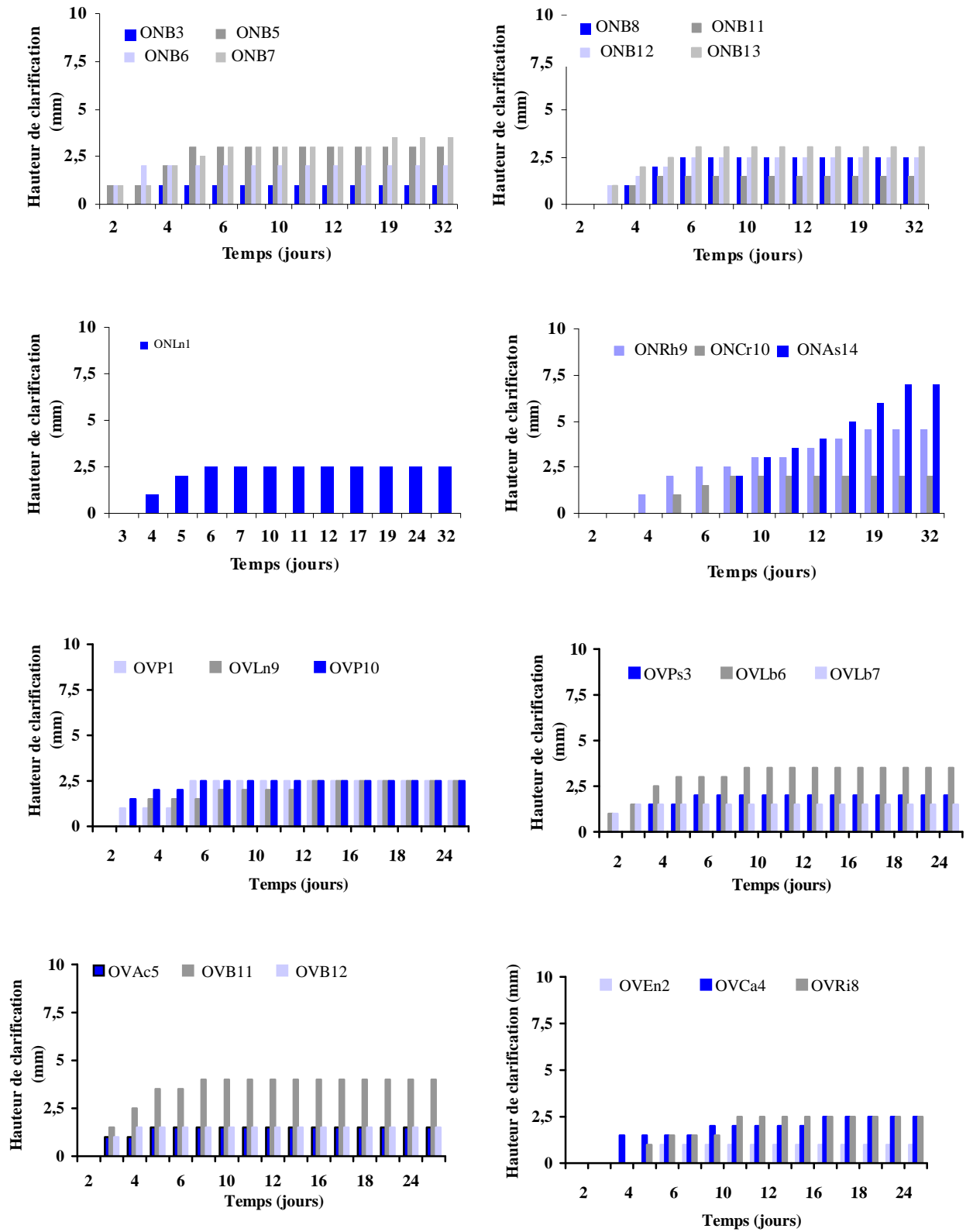


Figure 19. Evolution de la hauteur de clarification du milieu MP5 par les souches isolées des olives noires et des olives vertes.

Les hauteurs des zones de clarifications optimales déterminées par les souches des échantillons d'olives noires sont comprises entre 2 et 7 mm. Chez les souches du genre *Bacillus*, les zones de clarification maximale observées dans leurs milieux de cultures respectifs sont obtenues comme suit :

- Après 3 jours d'incubation, la souche ONB6 hydrolyse le milieu et la hauteur de dégradation est égale à 2 mm.
- Après 5 jours de cultures, les milieux utilisés par les souches ONB5 et ONB11 présentent des hauteurs d'hydrolyses respectivement égales à 3 mm et 1,5 mm.
- Après 6 jours les milieux de cultures utilisées par les souches ONB8 et ONB12 présentent chacun une hydrolyse de 2,5 mm. Tandis que, dans les milieux appartenants aux souches ONB7 et ONB13, la zone de clarification observée dans chacun d'eux est égale à 3 mm.
- Et seule, le milieu utilisé par la souche ONB3 présente une très faible hydrolyse égale à 1 mm et obtenue après le quatrième jours d'incubation.

La souche ONLn1 du genre *Leuconostoc* clarifie le milieu après 6 jours avec une zone d'hydrolyse de 2,5 mm.

Chez les levures et les moisissures, les hauteurs d'hydrolyses maximales sont égales:

- A 2 mm et obtenues après 7 jours de cultures pour la souche ONCr10.
- A 4,5 mm et observées après 17 jours pour la souche ONRh9.
- A 7 mm et déterminées après 24 jours pour ONAs14 (Fig. 19).

Chez les souches isolées des olives vertes, la zone de clarification maximale varie de 1 à 4 mm. Elle est obtenue dans les milieux de cultures :

- Après 3 jours par la souche OVLb7 (1,5 mm).
- Après 4 jours de cultures, par la souche OVB12 (1,5 mm),
- Après 5 jours de cultures, les milieux appartenants aux souches OVLb6 et OVAc5 présentent des hauteurs d'hydrolyse respectivement égale à 3 et 1,5 mm
- Après 6 jours de cultures, les milieux utilisés par les souches OVPs3, OVP1, OVP10 et OVEn2 présentent des hauteurs d'hydrolyses respectivement égales à 2 ; 2,5 et 1 mm.
- Après 9 jours d'incubation, les hauteurs de dégradation observées dans les milieux de cultures utilisés par des souches OVLn9 et OVB11 sont équivalentes à 2 et 4 mm.
- Les zones de dégradations enzymatiques mesurées dans les milieux de culture utilisés par les souches OVCa2 et OVRI8 sont chacune égale à 2 mm et sont respectivement obtenues après 10 et 11 jours de cultures, (Fig. 19).

Tableau 22. Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène

Souches	Halo clair	Halo coloré	Absence de halo	Souches	Halo clair	Halo coloré	Absence de halo
a. Souches isolées du lait cru							
LLb1			+	LP1		+	
LLb6			+	LP2			+
LLb7		+		LP3			+
LLb11		+		LP5	+		
LLb15	+			LP8			+
LLn1	+			LSc2	+		
LLn2	+			LEc1			+
LLc7	+			LEc6			+
LLc13	+			LEc8			+
b. Souches isolées des olives noires				c. Souches isolées des olives vertes			
ONB3			+	OVB11	+		
ONB5	+			OVB12	+		
ONB6	+			OVLb6	+		
ONB7	+			OVLb7	+		
ONB8	+			OVLn9	+		
ONB11	+			OVP1	+		
ONB12	+			OVP10	+		
ONB13	+			OVPs3			+
ONLn1	+			OVAc5		+	
ONRh9	+			OVCa4		+	
ONCr10	+			OVEEn2			+
ONAs14	+			OVRi8	+		

3-2-2. L'hydrolyse enzymatique selon la technique de MCKAY (1988)

Le tableau 22 résume les trois types de résultats observés dans les figures 20, 21 et 22 (annexes 5). Les résultats obtenus sont caractérisés par la présence de halo clair, de halo coloré et par l'absence de halo.

- **Parmi les souches isolées du lait cru :**

- Celles qui présentent des halos clairs sont : LLb15, LLn1, LLn2, LLc7, LLc13, LP5 et LSc2.
- Celles qui donnent des halos colorés sont : LLb7, LLb11 et LP1.
- Et celles qui ne donnent pas d'halos sont : LLb1, LLb6, LP2, LP3, LP8 et les trois souches du genre *Enterococcus* (Fig. 20 annexe V)

- **Parmi les souches isolées des olives noires**, la présence d'halos coloré est observée autour des colonies appartenant à l'ensemble des souches. Et seules les colonies de la souche ONB3 ne présentent pas d'halos (Fig. 21 annexe V).

- **Parmi les souches isolées des olives vertes**, les colonies des souches OVB11, OVLb6, OVLb7, OVLn9, OVP1, OVP10 et OVRi8 présentent des halos clairs. Tandis que les colonies appartenants aux souches OVAc5 et OVCa4 donnent des halos colorés et les colonies des souches OVPs3 et OVEN2 ne présentent pas d'halos (Fig. 22 annexes V).

3-3. PRODUCTION DE POLYGALACTURONASE ET DE BIOMASSE

La plupart des souches, isolées du lait cru, produisent une très faible quantité d'enzyme PG égale à $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$. Seules les souches, LP5, LLc7, LSc2 et LLn1, ont une PG plus active avec des valeurs respectives égales à 0,10 ; 0,11 ; 0,13 et $0,16 \text{ U.mL}^{-1}$. La croissance cellulaire est peu variable (DO de 0,10 à 1,62) pour l'ensemble des souches excepté pour LEC8 (DO : 0,05) (Tableau 23 ; a).

Parmi les souches isolées à partir des échantillons d'olives noires et vertes, ONAs14 ($0,48 \text{ U.mL}^{-1}$) et ONRh9 ($0,44 \text{ U.mL}^{-1}$) possèdent les activités PG les plus élevées et les souches OVCa4 et OVEN2 les activités enzymatiques les plus faibles ($0,01 \text{ U.mL}^{-1}$).

Chez les souches des genres *Bacillus* ($0,10$ à $0,17 \text{ U.mL}^{-1}$) et *Lactobacillus* ($0,14$ à $0,15 \text{ U.mL}^{-1}$), la production d'enzyme varie peu, par contre chez les souches des genres *Leuconostoc* ($0,03$ à $0,11 \text{ U.mL}^{-1}$) et *Pediococcus* ($0,05$ à $0,11 \text{ U.mL}^{-1}$) des différences sont observées. Toutes les bactéries lactiques, appartenants aux échantillons d'olives noires et vertes, produisent une biomasse avec des DO similaires ($1,01$ à $1,07$).

Par contre des différences de DO sont constatées chez : les *bacillus* (DO : 1,37 à 1,59), les levures (DO : 0,65 à 1,41) et les moisissures (DO : 1,02 à 1,43) (Tableau 23 ; *b* et *c*).

Tableau 23. Production de biomasse et de PG des souches isolées

Souches	Biomasses (DO 600 nm)	Activités PG (U.mL ⁻¹)	Souches	Biomasses (DO 600 nm)	Activités PG (U.mL ⁻¹)
<i>a.</i> Souches isolées des échantillons de lait cru de vache					
LLb1	0,14	0,06	LP1	0,49	0,01
LLb6	0,14	0,08	LP2	0,12	0,01
LLb7	0,13	0,02	LP3	0,16	0,01
LLb11	0,10	0,01	LP5	1,16	0,10
LLb15	0,13	0,01	LP8	0,17	0,06
LLn1	0,11	0,16	LSc2	1,62	0,13
LLn2	0,10	0,01	LEc1	1,45	0,02
LLc7	0,13	0,11	LEc6	1,23	0,01
LLc13	0,12	0,01	LEc8	1,14	0,01
<i>b.</i> Souches isolées des échantillons d'olives noires			<i>c.</i> Souches isolées des échantillons d'olives vertes		
ONB3	1,45	0,14	OVB11	1,55	0,16
ONB5	1,45	0,18	OVB12	1,57	0,10
ONB6	1,47	0,13	OVLb6	1,03	0,15
ONB7	1,37	0,12	OVLb7	1,03	0,14
ONB8	1,49	0,11	OVLn9	1,05	0,11
ONB11	1,37	0,17	OVP1	1,02	0,05
ONB12	1,47	0,11	OVP10	1,07	0,11
ONB13	1,59	0,12	OVPs3	1,08	0,12
ONLn1	1,01	0,03	OVAc5	1,21	0,13
ONRh9	1,41	0,44	OVCa4	0,65	0,01
ONCr10	1,27	0,11	OVEEn2	0,75	0,01
ONAs14	1,43	0,48	OVRi8	1,02	0,12

4. DISCUSSION

Le test d'acidification met en évidence la présence d'acide polygalacturonique ou acide galacturonique issue de l'hydrolyse partielle ou complète du substrat pectine. Parmi les bactéries lactiques du lait, les souches : LSc2, LLc7, LLn1, LLn2, LLc13, LP5, LLb7 et LLb5 arrivent à se développer sur le milieu MP5 et elles l'acidifient de façon variable.

L'ensemble des souches bactériennes appartenant aux échantillons d'olives noires et vertes, présente une acidification tardive. Les levures et les moisissures acidifient aussi le milieu tardivement, ce résultat peut s'expliquer par le fait que la production de leur enzyme est liée au développement cellulaire qui n'est pas aussi rapide que celui des bactéries. Nous pouvons supposer que les souches, isolées des échantillons de lait et des olives noires et vertes, qui acidifient le milieu de façon rapide ou non, produisent l'enzyme polygalacturonase. Tandis que les souches non acidifiantes peuvent avoir ou non d'autres activités pectinolytiques indétectables dans ce milieu.

L'hydrolyse enzymatique sur milieu solide, obtenue selon la technique de TANSEY (1971), révèle deux types d'hydrolyses :

- Une hydrolyse franche qui apparaît très nette et se manifeste plus rapidement chez les souches suivantes : LSc2, LLc7, LP5, LLn1, LLn2, ONB11, ONRh9, OVLb6 et ONAs14.
- Une hydrolyse graduelle qui s'effectue progressivement en direction centrifuge est observée chez l'ensemble des souches de *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Enterococcus* appartenant aux échantillons de lait et chez certaines souches appartenant aux échantillons d'olives noires et vertes: ONB11, ONB6, ONLn1, ONCr10, OVLb7, OVAc5, OVEN2 et les souches du genre *Pediococcus*.

Cette différence pourrait résulter d'une diffusion plus ou moins rapide du complexe enzymatique dans le milieu de culture.

La détection de l'activité pectinolytique selon la méthode de MCKAY (1988) a permis d'observer des halos clairs sur les milieux utilisés par 7 souches de bactéries lactiques du lait cru et par toutes les souches isolées des échantillons d'olives noires (à l'exception de la souche ONB3). Tandis que chez les souches appartenant aux échantillons d'olives vertes, les trois catégories de résultats sont observées.

Les souches qui présentent un halo clair possèdent l'enzyme polygalacturonase qui a permis l'hydrolyse totale de la pectine pour aboutir au monomère (l'acide galacturonique).

Par contre les milieux de cultures utilisés par les 4 souches isolées du lait et par les 2 souches appartenants aux échantillons d'olives vertes présentent un halo bleu, donc ces souches ont hydrolysées partiellement le substrat.

Les souches qui ne présentent aucun halo, elles ne possèdent pas d'activités pectinolytiques. C'est le cas de 7 souches de bactéries lactiques du lait, d'une souche des olives noires et de 2 souches des olives vertes.

L'évaluation de l'activité polygalacturonase, selon la technique de NELSON (1944) et de SOMOGY (1952), a permis de confirmer les résultats des tests de mise en évidence de cette activité chez les souches étudiées.

Parmi les genres de bactéries lactiques isolées du lait cru, toutes les souches des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* ont une faible activité enzymatique. Ce n'est pas le cas des souches appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. En effet, certaines souches du même genre ont une PG plus active sur le milieu MP5 alors que d'autres souches possèdent une faible activité PG.

Les bactéries lactiques, isolées à partir d'olives noires et vertes, ont une activité PG plus élevée que celle de l'ensemble des souches de mêmes genres isolées du lait cru. La nature végétale (pectine, hémicellulose...) des olives noires et vertes laisse prévoir ces résultats.

L'activité PG chez les deux souches de *Lactobacillus* isolées à partir d'échantillons d'olives vertes corrobore celle obtenue par plusieurs auteurs. SAKELLARIS *et al.*, (1988 et 1989), KARAM et BELARBI (1995) et AVALLONE *et al.* (2002) ont étudiés la synthèse extracellulaire et la caractérisation de l'enzyme PG chez respectivement *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* L166.

Seul JUVEN *et al.* (1985) ont démontré la production de PG chez *Leuconostoc mesenteroides*. Nos résultats confirment ceux obtenus par ces auteurs pour les souches LLn1 et OVLn9.

L'ensemble des souches du genre *Bacillus* possède une PG active comme l'ont soulignés CHESSON et CODNER (1978), mais nos résultats sont plus faibles (0,11 - 0,18 U.mL⁻¹) que ceux déterminés par Soares *et al.* (1999) (2,7 - 4,0 U.mL⁻¹).

L'activité enzymatique de la souche OVCa4 est faible, résultat obtenu précédemment par AVALLONE *et al.* (2002) pour quatre espèces de *Candida*. Alors que la PG de l'espèce *Candida boidinii* est mise en évidence par NAKAGAWA *et al.* (2000).

La souche ONAs14 (*Aspergillus niger*) possède la PG la plus active par comparaison aux autres souches. Cette espèce était déjà connue pour son aptitude à produire des enzymes pectinolytiques (THIBAUT et MERCIER, 1979 ; JERNEJC, 2000) et principalement des endo PG (REXOVA-BENKOVA, 1973 ; SINGH et RAO, 2002). Les espèces d'*Aspergillus* sont utilisées actuellement dans les industries agroalimentaires mais malheureusement n'ont pas le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) (PILNIK et ROMBOUTS, 1981).

Notre étude a montrée que la souche ONRh9 possède une PG plus active. VAUGHN *et al.* (1969) ont isolé trois espèces (*Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, *Rhodotorula minuta* var. *minuta* et *Rhodotorula Rubra*) à partir d'olives vertes conservées dans l'eau salée. Ces espèces sont toutes productrices d'enzyme PG extracellulaire et sont la cause du ramollissement des olives durant leurs conservations. Mais, des résultats contraires à ceux obtenus par VAUGHN *et al.* (1969) sont observés par BUZZINI et MARTINI (2002), pour qui seule l'espèce *Rhodotorula bacarum* a une activité pectinolytique.

5. CONCLUSION

Les quarante deux souches utilisées dans cette étude sont réparties en 12 genres. Les résultats de mise en évidence de leur activité pectinolytique obtenus dans le milieu liquide MP5 (à 5 % de pectine) avec les différents tests ne sont pas contradictoires. Leurs cultures dans le milieu liquide MP5 (à 5 % de pectine) montrent qu'elles possèdent toutes au moins une certaine activité PG.

Les bactéries lactiques isolées du lait cru, ont montré une faible activité polygalacturonase à l'exception de certaines souches des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Par contre, l'ensemble des souches isolées à partir d'olives noires et vertes, a une activité PG plus élevée.

CHAPITRE 4. OPTIMISATION DE L' ACTIVITE POLYGALACTURONASE PRODUITE PAR DES MICROORGANISMES ISOLES DU LAIT CRU ET DES OLIVES NOIRES ET VERTES

1. INTRODUCTION

Les polygalacturonases (PG) les plus commercialisées proviennent généralement des espèces d'*Aspergillus* (PASHOVA *et al.*, 1999 ; DINU, 2001 ; SINGH et RAO, 2002) mais ces espèces produisent d'autres activités enzymatiques parfois indésirables liées aux polygalacturonases (PILNIK et ROMBOUTS, 1981). Les PG d'*Aspergillus* conviennent surtout pour la clarification des jus de fruits et de certaines légumes, car le pH optimum de leur activité est situé dans la gamme de pH de ces milieux (entre 3,0 et 5,5) (THIBAUT et MERCIER, 1979 ; USEDA *et al.*, 1982). Tandis que, des produits tels que les purées végétales possèdent des pH proches de la neutralité (CHESSON et CODNER, 1978; ROMBOUTS et PILNIK, 1986). Ce sont les raisons pour lesquelles la PG est étudiée chez d'autres microorganismes (*Geotrichum lactis* et *Geotricum candidum*, *Saccharomyces cereviciae*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus Candida* et *Bacillus*) (BLANCO *et al.*, 1999 ; SOARES *et al.*, 1999, GUESSOUS *et al.*, 2000 ; NAKAGAWA *et al.*, 2000).

Les microorganismes producteurs de PG isolés des olives (CAMPANIELLO *et al.*, 2005) ou de leurs huiles (KACEM *et al.*, 2003) peuvent contribuer à la maturation du fruit et à une meilleure extraction de son huile (SERVILI *et al.*, 1992 ; ASEHRAOU *et al.*, 1993). Ceux isolés des laits crus (bactéries lactiques) peuvent aussi trouver un intérêt dans l'industrie des produits laitiers à base de fruits (boissons lactées) ou dans la clarification des jus de certains végétaux. Cette propriété technologique devrait être prise en compte aussi dans la sélection des souches lactiques utilisées pour les ensilages ou les industries cidricoles (KARAM, 1995).

La production de la PG par ces microorganismes dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques tels que : la proportion substrat /enzyme, la température d'incubation ainsi que le contrôle du pH du milieu. Tous ces paramètres ont une grande influence sur le taux de production et sur l'activité de l'enzyme.

Afin de déterminer les souches performantes notre intérêt était porté sur huit souches ayant des aptitudes de production d'enzyme PG les plus élevées. Pour ce faire, les objectifs retenus sont :

- l'évaluation des cinétiques de production de biomasse et d'enzyme polygalacturonase chez les huit souches sélectionnées - l'étude des effets du pH et de la concentration en acide polygalacturonique (APG)
- l'optimisation de la production d'enzyme en bioréacteur à pH initial contrôlé et à pH non contrôlé chez deux souches représentatives.
- L'observation microscopique à fluorescence de la viabilité des cellules des deux souches cultivées en bioréacteur.

2. MATERIEL ET METHODES

2-1. SOUCHES ETUDIEES

Huit souches présentant des activités PG optimales sont retenues pour l'étude cinétique. Elles appartiennent aux genres *Leuconostoc* (LLn1), *Lactococcus* (LLc7), *Streptococcus* (LSc2), *Bacillus* (ONB5 et OVB11), *Lactobacilus* (OVLb6), *Rhodotorula* (ONRh9) et *Aspergillus* (ONAs14).

2-2. CINETIQUE DE PRODUCTION DE POLYGALACTURONASE ET DE BIOMASSE

Les cultures sont réalisées dans des ballons de 250 mL et les prélèvements sont effectués après 0, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48 et 72 heures d'incubations. La production de la biomasse et de la polygalacturonase est déterminée selon le protocole expérimental décrit dans le paragraphe 2-3 du chapitre 3 (page 70).

2-3. EFFET DE LA CONCENTRATION EN APG ET DU PH SUR LA PRODUCTION DE POLYGALACTURONASE ET DE BIOMASSE

Les souches ONRh9 (*Rhodotorula*) et LLn1 (*Leuconostoc*) à activité polygalacturonase élevée dans le milieu MP5, sont cultivées sur le milieu MAPG5 dans lequel la pectine est remplacée par l'acide polygalacturonique (DE 0 %) (Fluka France).

● **Influence de la concentration du substrat APG :** Les cultures sont réalisées dans des ballons de 250 mL contenant chacun 150 mL de milieu MAPG5 à pH 5 avec comme seul substrat carboné l'APG utilisé à des différentes concentrations : 0 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7, 5 et 10 g.L-1 (GUESSOUS *et al.*, 2000).

- **Influence du pH :** Dans le même milieu, les deux souches sont cultivées à des pH compris entre 3 et 9 (BLANCO *et al.*, 1999 ; SOARES *et al.*, 1999 ; GUESSOUS *et al.*, 2000) et à des concentrations optimales en APG égales à 10 g.L⁻¹ pour la souche ONRh9 et 5 g.L⁻¹ pour la souche LLn1.

2-4. CULTURE DES DEUX SOUCHES EN BIOREACTEUR

Les souches ONRh9 (*Rhodotorula*) et LLn1 (*Leuconostoc*) sont cultivées dans le milieu MAPG5 à pH initial contrôlé et non contrôlé.

Quatre cuves d'une capacité de deux litres contenant chacune 850 mL de milieu de culture MAPG5 sont utilisées pour l'étude de la croissance cellulaire et de la production de PG des deux souches. Les milieux de cultures destinés pour la souche ONRh9 contiennent 10 g.L⁻¹ d'APG et ajustés à pH 6. Ceux réservés pour la souche LLn1 sont ajustés à pH 5,5 et renferment 5 g.L⁻¹ d'APG. Le milieu de culture de chaque cuve est inoculé avec 150 mL de préculture de la souche correspondante.

Les cinétiques de production de la biomasse et de l'enzyme PG des deux souches sont suivies à pH initial contrôlé et non contrôlé. A pH contrôlé, la régulation du pH est réalisée grâce à un correcteur programmable utilisant une solution de NaOH (2N).

Les cultures sont incubées à 30 °C sous agitation rotative (105 Tours.min⁻¹).

2-5. ETUDE MICROSCOPIQUE A FLUORESCENCE DES SOUCHES ONRH9 ET LLN1

Cette technique permet d'apprécier la viabilité des cellules de nos deux souches produites en bioréacteur dans le milieu MAPG5. La souche ONRh9 (*Rhodotorula*) est cultivée dans le milieu MAPG5 à pH 6 et 10 g.L⁻¹ d'APG et la souche LLn1 dans le milieu MAPG5 à pH 5,5 et 5 g.L⁻¹ d'APG. Parallèlement et pour comparer les résultats obtenus dans ce milieu, des cultures sont réalisées dans des milieux considérés favorables pour leurs développements. Pour la souche ONRh9 le milieu de saboureaud est utilisé à pH 6 et contient 20 g.L⁻¹ de glucose. Pour la souche LLn1 le milieu Mayeux est utilisé à pH 6,5 et renferme 20 g.L⁻¹ de glucose.

A la fin de la phase de croissance exponentielle, un mL de milieu de culture est prélevé à partir de chaque cuve, centrifugé durant une minute à 10 000 t/mn ; le culot obtenu est mélangé avec 900 µl de tampon B4 et de 10 µL de marqueur V2 (acétate de carboxyfluorecène) (Hemunex : biomicrobiology company). Le mélange est incubé à 40 °C durant 10 min.

Les cellules ainsi traitées sont examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leitz Wetzlam Dialux 20) équipé d'une lampe UV .L'observation se fait avec des objectifs 40 et 100. Les prises d'images sont réalisées à l'aide d'une caméra (M70 camera control Tool Dialux 20) reliée à un ordinateur qui nous permet d'avoir des photos grâce à son logiciel (IAI progressive scan version 1.02) de configuration suivante : IC-STD-RGB : 0...512 x 480 x 24. Le réglage des couleurs est réalisé selon l'observation.

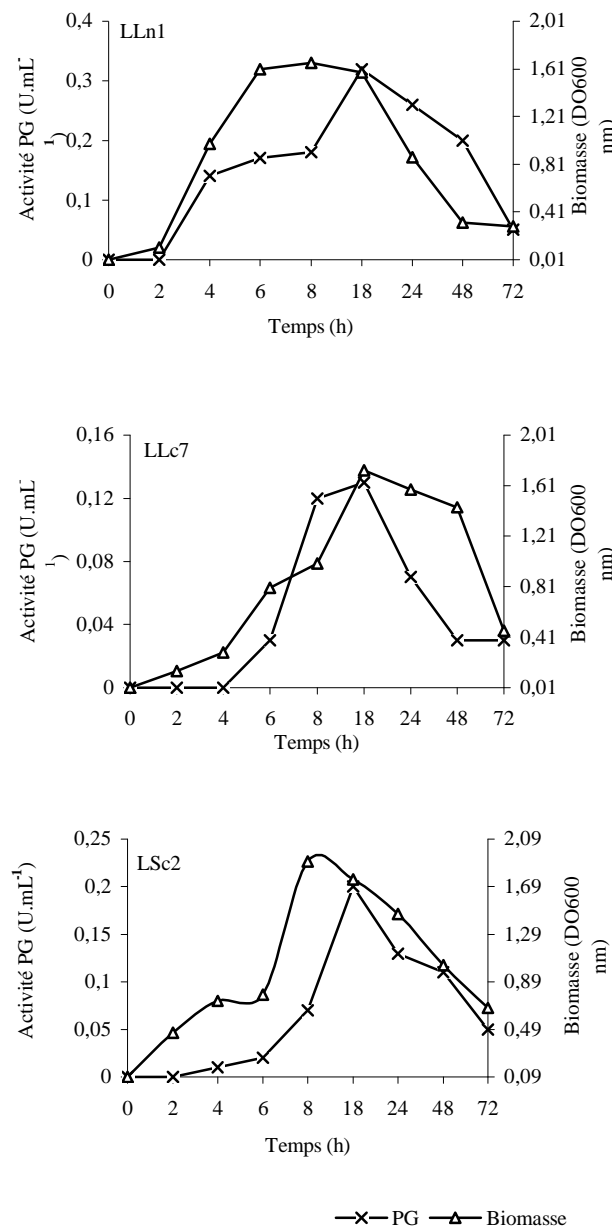


Figure 23. Cinétiques de production de polygalacturonase et de biomasse des souches isolées du lait cru.

3. RESULTATS

3-1. CINETIQUE DE PRODUCTION DE POLYGALACTURONASE ET DE BIOMASSE DES SOUCHES SELECTIONNEES

Les souches LLn1, ONB5, OVB11 et LSc2 sont les premières à produire l'enzyme après 2 h de culture. Tandis que, le début de synthèse de la PG par la souche LLc7 est obtenu après 4 h de culture, celui des souches OVLb6 et ONAs14 est observé après 6h de culture. Et seule la souche ONRh9 commence à produire l'enzyme après 8 h de culture.

L'activité enzymatique maximale observée chez les souches bactériennes, est comprise entre 12 h pour la souche LLc7 et 20 h pour la souche OVB11. Tandis que, les deux souches de levure et de moisissure possèdent des phases de production d'enzyme optimales situées entre 30 h pour la souche ONRh9 et 40 h pour la souche ONAs14. Les valeurs obtenues sont comprises entre 0,13 U. mL⁻¹ pour LLc7 et 0,76 U. mL⁻¹ pour ONAs14.

Les biomasses produites en même temps que l'enzyme, augmentent dès les premières heures pour toutes les souches à l'exception de ONB5 qui débute par une croissance plus lente. Chez les bactéries, les pics de production maximale de biomasse sont atteints après 18 h et leurs valeurs correspondent à des DO situées entre 1,66 (LLn1) et 2,35 (OVB11). Tandis que, chez la levure et la moisissure des pics de croissance cellulaire sont observés après 48 h pour la souche ONRh9 et 72 h (fin de culture) pour la souche ONAs14. Leurs valeurs de DO mesurées sont égales à 4,25 pour la souche ONRh9 et 2,48 pour ONAs14.

Parmi les bactéries, la souche LLn1 synthétise des quantités d'enzyme égale à 0,32 U. mL⁻¹ avec seulement une production de biomasse de 1,58 de DO. Tandis que La souche OVLb6 se multiplie plus rapidement dans le milieu en affichant une densité optique équivalente à 2,01 pour une production d'enzyme PG égale à 0,19 U.mL⁻¹.

Chez les champignons, la souche ONRh9 produit une quantité d'enzyme maximale égale à 0,63U.mL⁻¹ pour une biomasse de 3,75 de DO. Alors que, la souche ONAs14 condense plus d'enzyme (0,76 U.mL⁻¹) avec une quantité de biomasse de valeur de DO plus faible (2,06). Après 48 h de culture, cette même souche diminue sa production d'enzyme, mais continue à se développer dans le milieu de culture pour atteindre un maximum de cellules équivalent à 2,48 de densité optique (Fig. 23 et 24).

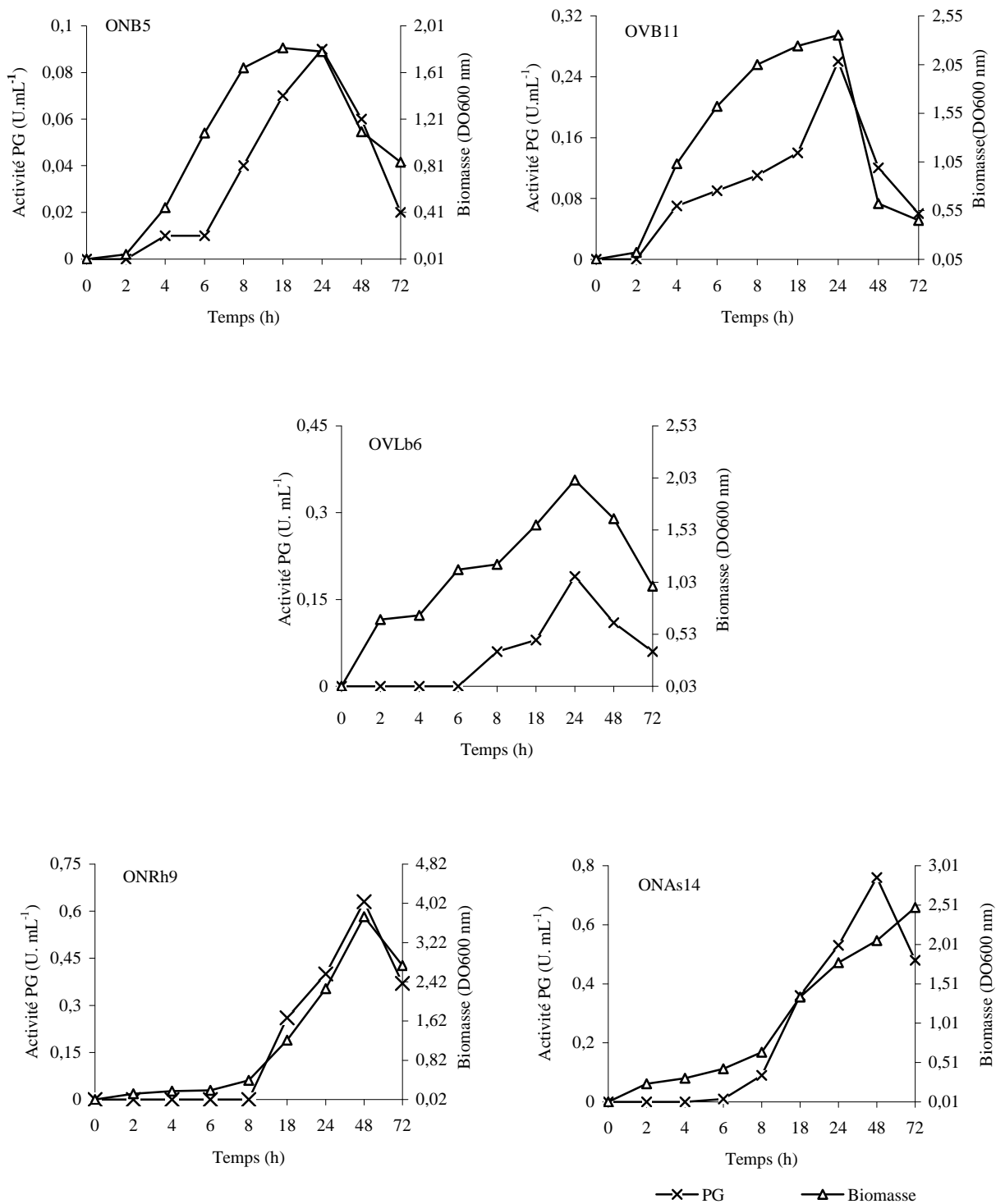
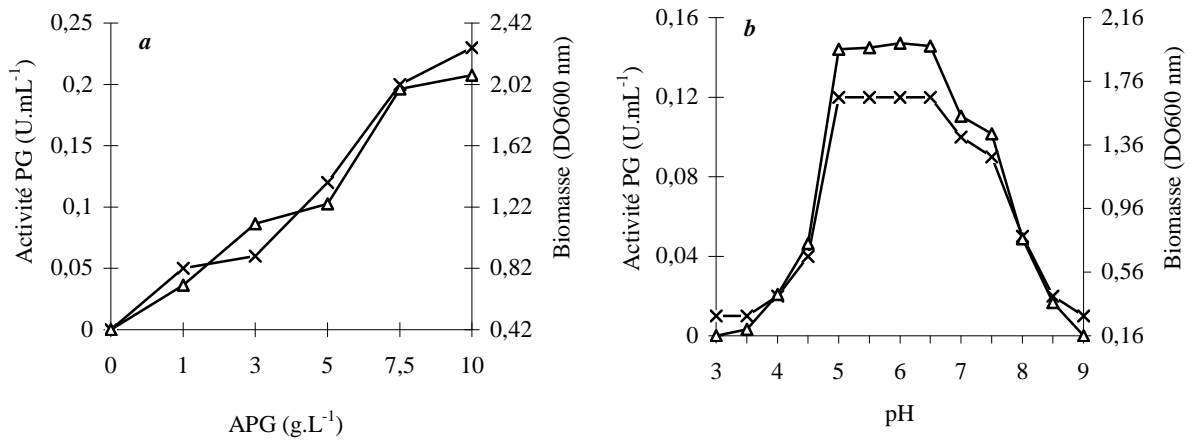


Figure 24. Cinétiques de production de polygalacturonase et de biomasse des souches isolées des olives noires et vertes.

Souche ONRh9



Souche LLn1

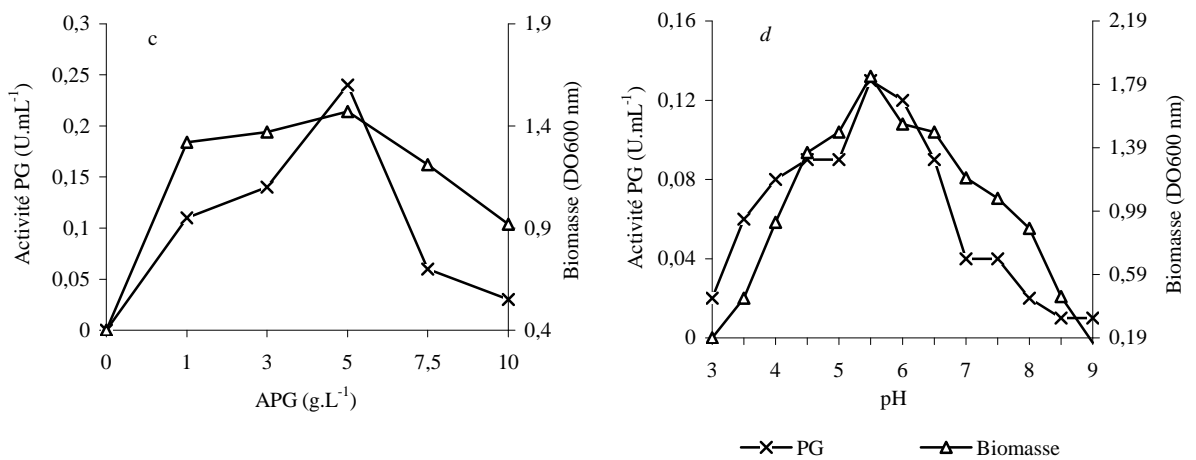


Figure 25. Influence de la concentration en APG et du pH sur la production de la biomasse et de la PG des souches ONRh9 (*a et b*) et LLn1 (*c et d*)

3-2. INFLUENCE DES PARAMETRES DE CULTURES

● Effet de la concentration en APG

Avec la souche ONRh9, les productions d'enzyme et de biomasse augmentent parallèlement avec la concentration en APG. Elles sont optimales pour des concentrations en APG situées entre 5 g.L⁻¹ et 10 g.L⁻¹. Avec la première concentration en substrat l'enzyme produite est égale à 0,12 U.mL⁻¹ et la biomasse est équivalente à 1,24 de DO. Les valeurs les plus élevées sont obtenues avec 10 g.L⁻¹ d'acide polygalacturonique et elles sont respectivement égales à 0,23 U.mL⁻¹ pour l'enzyme et 2,08 de DO pour la production de cellules (Fig. 25, a).

Avec la souche LLn1, La synthèse enzymatique est produite pour des concentrations en APG comprises entre 1 et 5 g.L⁻¹ d'acide polygalacturonique. La valeur maximale est observée avec 5 g.L⁻¹ et elle est égale à 0,24 U.mL⁻¹.

La production de cellules est aussi élevée pour les mêmes concentrations en APG utilisées, mais cette production n'est pas très différente pour les trois concentrations. En effet les quantités de cellules obtenues pour les concentrations en APG de 1 g.L⁻¹ et de 3 g.L⁻¹ sont presque équivalentes. Et leurs densités optiques sont respectivement égales à 1,32 et 1,37. Tandis que Le maximum de cellule est obtenu pour une concentration en APG égale à 5 g.L⁻¹. La valeur obtenue est égale à 1,47 de DO (Fig. 25, c).

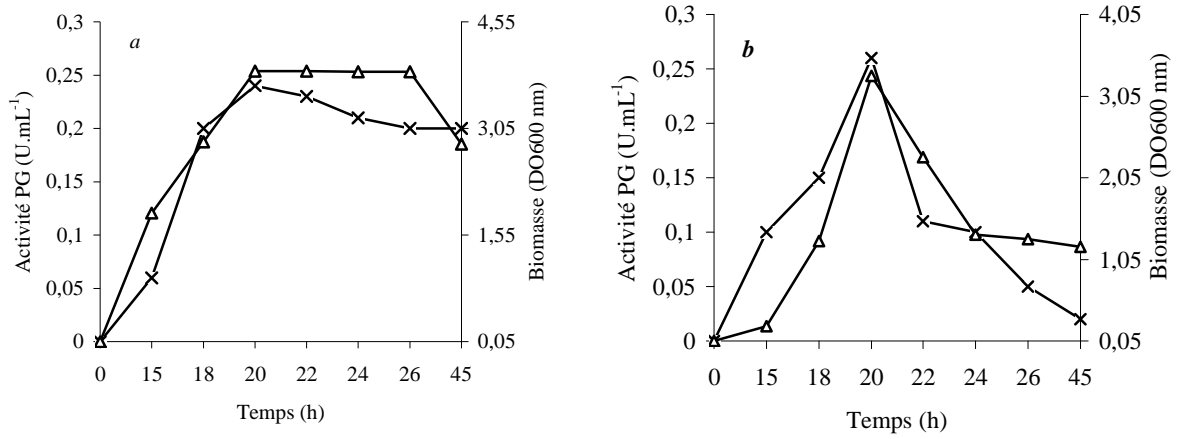
● Effet du pH :

La souche ONRh9 produit un maximum d'enzyme dans une gamme de pH comprise entre 5 et 6,5. La valeur maximale égale à 0,12 U.mL⁻¹, est observée pour des pH égaux à 5 ; 5,5 ; 6 et 6,5. Pour le pH égal à 7, la quantité d'enzyme produite est légèrement plus faible et elle est égale à 0,10 U.mL⁻¹.

La production de biomasse par cette même souche est aussi optimale pour la même gamme de pH. Les densités optiques obtenues pour les cellules sont comprises entre 1,96 pour le pH 5 et 1,98 pour le pH 6,5. (Fig. 25 ; b).

Chez la souche LLn1, l'activité enzymatique est limitée dans la zone de pH comprise entre 5,5 et 6. Les valeurs observées sont respectivement égales à 0,13 U.mL⁻¹ et 0,12 U.mL⁻¹. Par contre la production de biomasse est obtenue dans une large gamme de pH située entre 4,5 à 6,5 et les valeurs de DO sont comprises entre 1,36 et 1,49 (Fig. 25 ; d).

Souche ONRh9



Souche LLn1

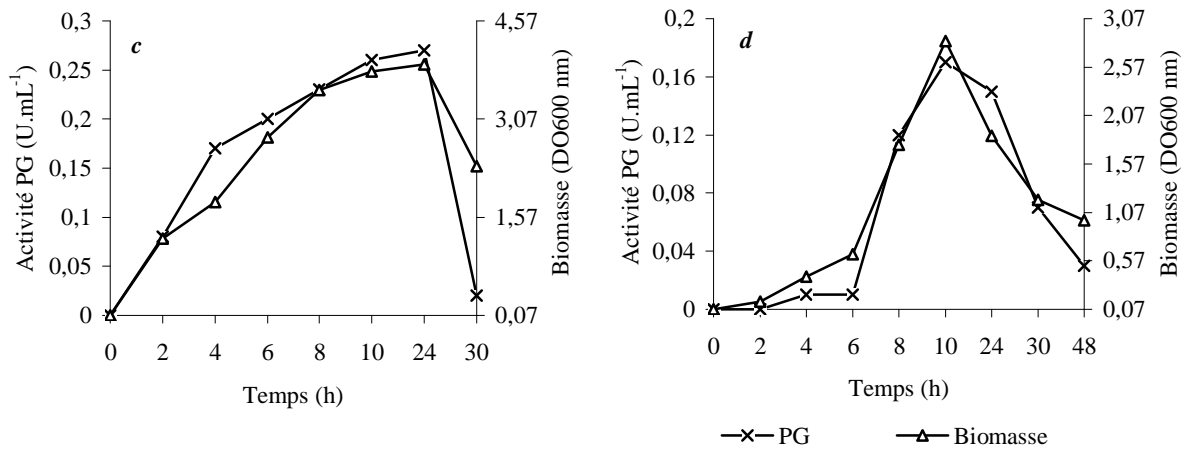


Figure 26. Production de biomasse et de PG, par les souches ONRh9 et LLn1, cultivées en bioréacteur à pH contrôlé (*a* et *c*) et non contrôlé (*b* et *d*).

3-3. CINÉTIQUES DE PRODUCTIONS DE CELLULES ET D'ENZYMES PG EN BIOREACTEUR

Les cinétiques de production de biomasse et d'enzymes PG, obtenues par les souches ONRh9 et LLn1, donnent les résultats suivants :

● A pH initial contrôlé

La biomasse produite par la souche ONRh9 commence après 15 h de culture et présente une valeur de DO égale à 1,86. Tandis que la synthèse de l'enzyme PG débute après 18 h de culture et affiche une valeur de 0,20 U.mL⁻¹.

Les synthèses de biomasse et d'enzyme augmentent parallèlement en fonction du temps pour atteindre leurs maximums après 20 h de culture. Les valeurs obtenues sont 3,86 de DO pour les cellules et 0,24 U.mL⁻¹ pour l'enzyme PG. Ce niveau de production est maintenu jusqu'à la fin de la culture (fig. 26 ; a).

- Les cellules produites par la souche LLn1 débutent après 2 h de culture et l'optimum est obtenu au bout de 24 h. Les valeurs de densité optique observées sont respectivement égales à 1,24 et 3,90.

La souche synthétise un maximum d'enzyme entre 4 h et 24 h de culture. Les valeurs obtenues sont égales à 0,17 U.mL⁻¹ pour les 4 premières heures et 0,27 U.mL⁻¹ après 24 h de culture (fig. 26 ; c).

● A pH initial non contrôlé

- Avec la souche ONRh9, la multiplication cellulaire augmente proportionnellement en fonction du temps atteint son maximum après 22 h de culture. La valeur de densité optique observée est égale à 2,30. Tandis que la production d'enzyme est plus active entre 15 h et 24 h. Les valeurs d'activité enzymatiques obtenues pour ces deux temps sont égales à 0,10 U.mL⁻¹. Et la valeur maximale obtenue après 20 h de culture est égale à 0,26 U.mL⁻¹ (fig. 26 ; b).

- Avec La souche LLn1, la production de biomasse augmente en fonction du temps, comme c'est le cas pour la souche précédente, et atteint une DO maximale de 2,84 après 10 h de culture. L'activité PG est particulièrement plus intense entre 8 h (0,12 U.mL⁻¹) et 24 h (0,15 U.mL⁻¹) de culture. Les valeurs déterminées durant ces deux temps sont respectivement égales à 0,12 U.mL⁻¹ et 0,15 U.mL⁻¹. La production maximale d'enzyme est obtenue après 10 h de culture et elle est égale 0,17 U.mL⁻¹ (fig. 26; d).

3-4. ETUDE MICROSCOPIQUE A FLUORESCENCE DE LA SOUCHE ONRH9

Les cellules de la souche ONRh9 observées au microscope à fluorescence (x100) et cultivées dans le milieu MAPG5 et dans le milieu Saboureaud apparaissent sous forme ovale, leur taille est grande et la plupart présentent des bourgeons polaires. La concentration cellulaire obtenue dans le milieu MAPG5 (*a* et *b*) n'est pas différente de celle obtenue dans le milieu Saboureaud (*c* et *d*) (Fig. 27).

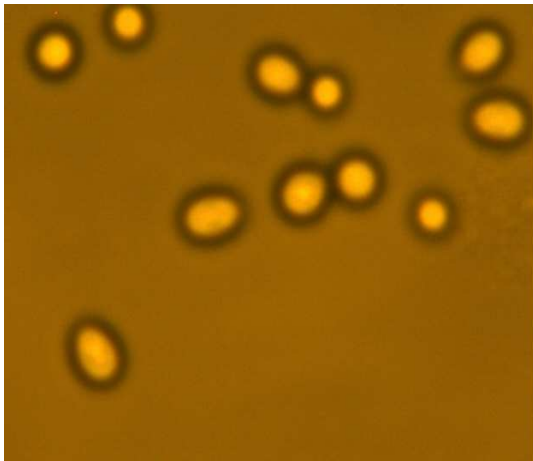
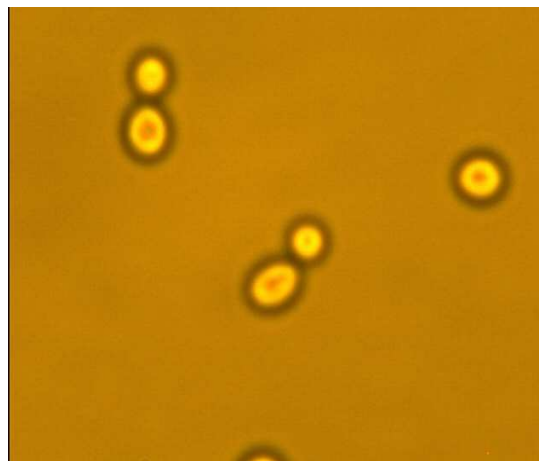
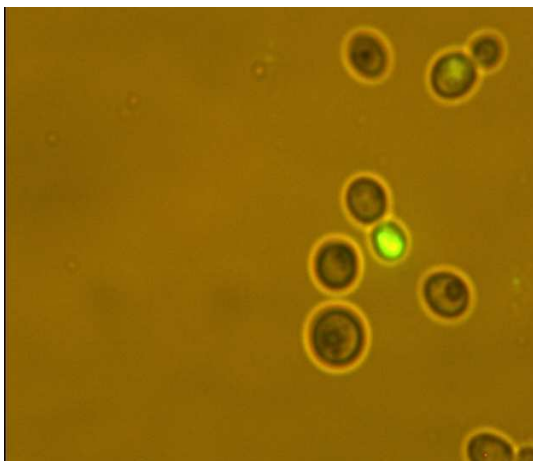
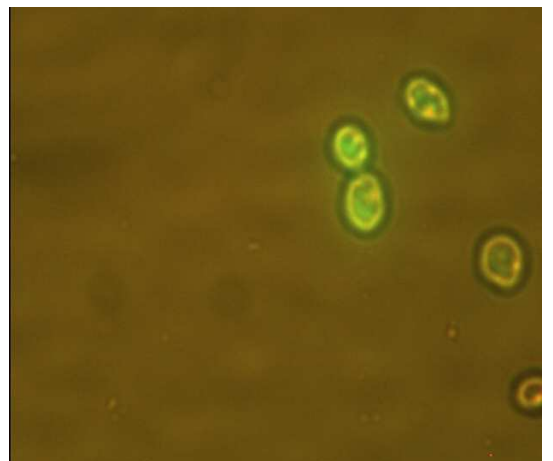
*a**b**c**d*

Figure 27: Observation microscopique à fluorescence (x100) de la souche ONRh9 (Rhodotorula) cultivé en bioréacteur, dans le milieu MAPG5 à pH 6 et 10 g.L^{-1} d'APG (*a* et *b*) et dans le milieu saboureaud à pH 6 et 20 g.L^{-1} de glucose (*c* et *d*).

3-5. ETUDE MICROSCOPIQUE A FLUORESCENCE DE LA SOUCHE LLN1

Les cellules de la souche LLn1 observées au microscope à fluorescence (x100) et cultivées dans le milieu MAPG5 (*a* et *b*), sont de tailles plus petites, moins fluorescentes et sont pour la plupart isolées ou groupées en paires. Celles cultivées dans le milieu de Mayeux, apparaissent disposées en petites chaînes de trois cellules pour la plupart et très fluorescentes (*c* et *d*) (Fig. 28).

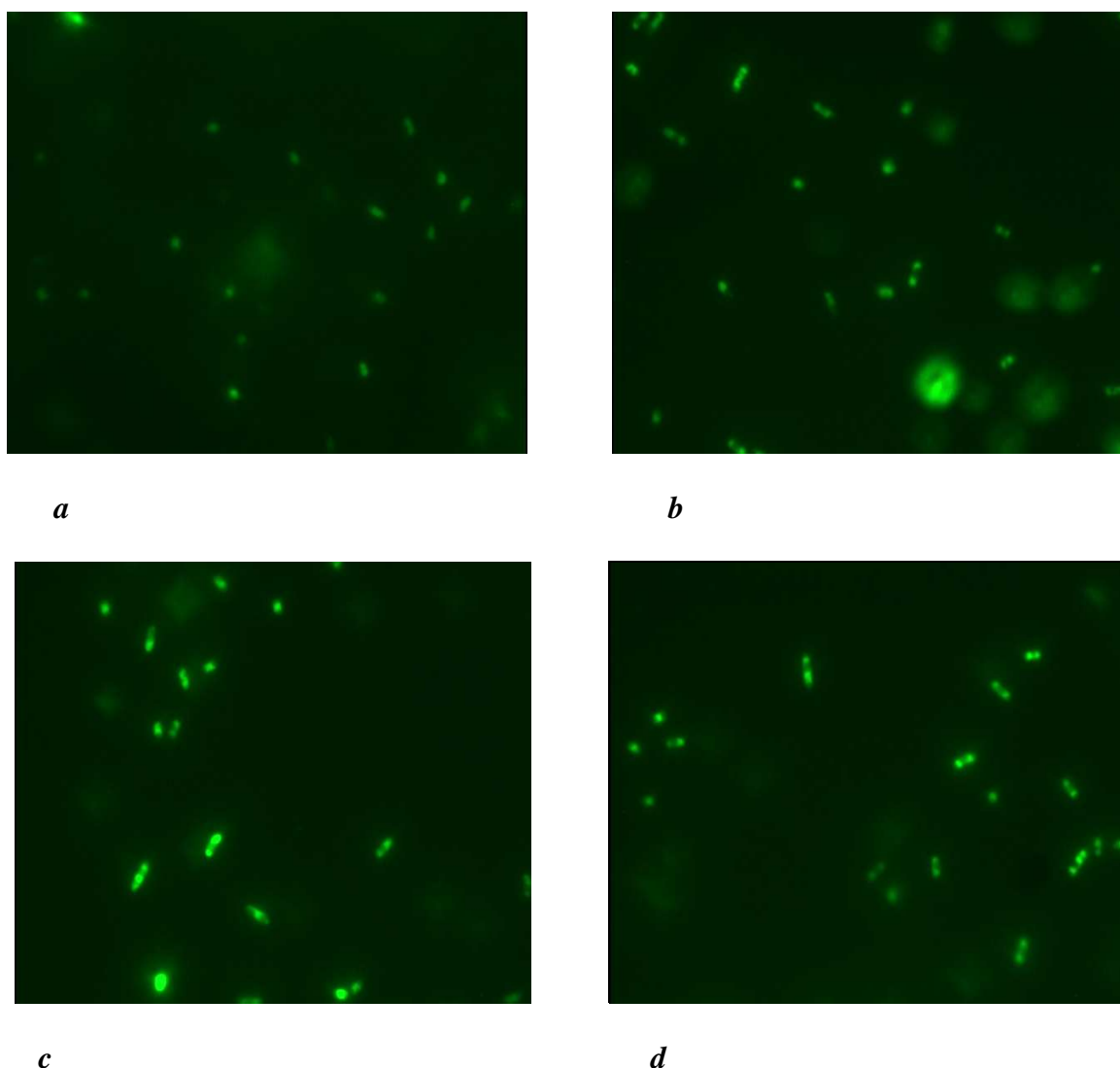


Figure 28. Observation microscopique à fluorescence (x100) de la souche LLn1 cultivée en bioréacteur dans le milieu MAPG5 à pH 5,5 et 5 g.L⁻¹ d'APG (*a* et *b*) et dans le milieu Mayeux à pH 6,5 et 20 g.L⁻¹ de glucose (*c* et *d*).

4. DISCUSSION

L'établissement des cinétiques nous a permis de quantifier la production d'enzyme des huit souches sélectionnées et de différencier des catégories en fonction de leur comportement dans le milieu MP5.

Chez les bactéries, les souches OVLb6, LLc7 et LSc2 se développent très rapidement mais leur synthèse enzymatique est très faible. La souche ONB5 se multiplie lentement et produit moins d'enzyme. Tandis que LLn1 produit moins de cellules, mais son activité enzymatique est plus importante. Chez les champignons, la souche ONRh9 nécessite un temps de culture plus important avant d'arriver à synthétiser l'enzyme. Son développement cellulaire est plus lent par comparaison à la souche ONAs14. En effet, ONAs14 produit plus de cellules de façon continue du début jusqu'à arrêt de la culture et parallèlement accumule dans le milieu une quantité d'enzyme plus importante.

Parmi les huit souches, ONAs14, ONRh9 et LLn1 se caractérisent par une quantité d'enzyme plus élevée que les autres souches. Les souches ONRh9 et LLn1 ont été sélectionnées pour être étudié sur le milieu MAPG5 contenant comme seule source d'énergie l'acide polygalacturonique. Tandis que la souche ONAs14 est écartée car son activité polygalacturonase est déjà connue (PASHOVA *et al.* 1999 ; DINU, 2002). L'influence de la concentration du substrat a permis d'obtenir :

- Avec la souche ONRh9, les productions de biomasse et de PG sont proportionnelles à l'augmentation de la concentration en APG. L'activité PG est maximale à 10 g.L⁻¹. Comparativement, l'activité optimale de la PG déterminée par *Neurospora crassa* (10 g.L⁻¹) est à la même concentration en APG (POLIZELI *et al.*, 1991). Pour *Geotrichum candidum* et *Aspergillus niger*, des concentrations en APG de 7,5 et 15 g.L⁻¹ ont été respectivement observées (GUESSOUS *et al.*, 2000 ; MALDONADO et STRASSER DE SAAD, 1998).
- Avec la souche LLn1 la production de cellules est favorable dans une large gamme de concentration en APG utilisée; alors que l'enzyme est beaucoup plus active avec 5g.L⁻¹ en APG.

Les variations du pH de production de biomasse et de PG chez les souches ONRh9 et LLn1, sont parallèles. Les deux souches ne tolèrent pas des valeurs de pH extrêmes et l'activité optimale de leur PG est située dans des zones de pH proches de la neutralité.

Le pH optimum, égal à 6, pour l'activité enzymatique de la souche ONRh9 est le même que celui obtenu par VAUGHN *et al.*, (1969) pour les espèces : *Rhodotorula glutinis var. glutinis*, *R. minuta var. minuta* et *R. rubra*.

Le pH optimum de l'activité de la PG chez la souche LLn1, compris entre 5,5 et 6, est plus élevé que celui obtenu chez *Lactobacillus brevis* (pH 4,2) (AVALLONE *et al.*, 2002) et *Lactobacillus plantarum* (pH 4,5) (SAKELLARIS *et al.*, 1988).

Les cultures en bioréacteur à pH contrôlé et à pH non contrôlé, montrent que l'augmentation de l'activité enzymatique est liée à la production de biomasse et à l'optimisation des paramètres de culture étudiés.

- Avec ONRh9, le contrôle du pH maintient les niveaux d'enzyme et de biomasse à des valeurs proches de leur valeur optimale. Avec la souche LLn1, le contrôle du pH augmente les productions d'enzyme et de biomasse pendant 20 h de culture.
- Avec le pH non contrôlé, les productions maximales d'enzyme et de cellules des deux souches sont très limitées dans le temps.

Les observations microscopiques par fluorescence ont permis de montrer le comportement des deux souches dans le milieu MAPG5 qui ne contient comme seul substrat l'acide polygalacturonique. La souche ONRh9 semble s'adapter facilement car la plupart des cellules observées sont vivantes. Elles ont la même morphologie dans les deux milieux de cultures et sont aussi nombreuses dans le milieu Saboureaud que dans le milieu MAPG5. Chez la souche LLn1, les cellules cultivées dans le milieu MAPG5 sont plus petites, isolées pour la plupart et moins fluorescentes. Tandis que dans le milieu de Mayeux, elles sont plus nombreuses et plus fluorescentes.

5. CONCLUSION

Cette étude nous a permis de confirmer les résultats des tests précédents sur la bonne aptitude de deux souches, ONRh9 et LLn1, à produire l'enzyme polygalacturonase sur le milieu MP5. Deux paramètres qui caractérisent cette enzyme sont étudiés sur le milieu MAPG5. Ils démontrent que les deux souches ont une activité PG pour des pH presque équivalents et moins acides. Par contre les concentrations en APG utilisées sont très différentes, puisque la souche ONRh9 utilise 10 g.L⁻¹ d'acide polygalacturonique pour une production maximale d'enzyme alors que la souche LLn1 n'a besoin que de la moitié de cette quantité.

L'optimisation de la production de l'enzyme, en bioréacteur avec les paramètres sélectionnés, indique que le contrôle du pH permet aux deux souches de produire une quantité d'enzyme PG plus importante. La microscopie par fluorescence nous a permis d'observer des cellules vivantes pour les deux souches. Leur comportement dans le milieu MAPG5 ne diffère pas beaucoup de celui dans leur milieu d'origine. À l'exception des cellules de la souche LLn1, qui sont de taille plus petite dans le milieu MAPG5.

CONCLUSION GENERALE

Dans cette étude, deux principaux objectifs sont réalisés :

- Le premier consiste en l'obtention d'un lot de souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache. Les souches obtenues représentent une contribution de notre part dans l'acquisition d'un soucier qui fera par la suite l'objet d'études diverses au sein du laboratoire de microbiologie de l'I.N.A.T.A.A.
- Le second a pour intérêt la mise en évidence de divers micro-organismes producteurs d'enzyme pectinolytiques et la caractérisation de la polygalacturonase en particulier. Pour cela, la production de ces enzymes par les souches de bactéries lactiques isolées du lait est notre première préoccupation puis notre attention s'est portée sur l'isolement de la flore totale pectinolytique à partir de différents types d'échantillons d'olives noires et vertes.

Dans le premier chapitre de l'étude expérimentale, 66 souches sont identifiées à partir de 18 échantillons de lait de vache appartenant à six stations d'élevage situées à Constantine. L'identification des souches, basée sur les caractères morphologiques et sur les différents métabolismes biochimiques nous a permis de les rapprocher aux espèces appartenant à six genres. Les espèces obtenues sont :

- *Streptococcus thermophilus*- *Leuconostoc lactis* et *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*
- *Lactococcus. lactis subsp. lactis* et *Lc. lactis subsp. cremoris*- *Enterococcus faecium*, *Ec. faecalis* et *Ec. durans* - *Pediococcus pentosaceus*, *Pc. parvulus*, *Pc. urinae equi* et *Pc. acidilactici* - *Lactobacillus cellobiosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii/delbrueckii*, *Lb brevis* et *Lb acidophilus*.

Le nombre d'espèce le plus élevé est obtenu chez les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.

Dans le genre *Lactobacillus*, l'espèce *Lb. cellobiosus* est largement dominante par rapport aux autres espèces isolées. Par contre, l'espèce *Lactobacillus plantarum* est citée comme étant la plus fréquemment rencontrée dans le lait (SAKELLARIS, 1988 et 1989; KARAM, 1995; ZADI-KARAM, 1998).

Le genre *Pediococcus* est représenté par des espèces isolées des laits provenant de la plupart des stations, alors que leur habitat naturel est surtout les produits végétaux (GARVIE, 1986b).

Dans le deuxième chapitre, notre intérêt est porté sur l'isolement de la flore pectinolytique à partir des échantillons d'olives noires et vertes. L'utilisation du milieu de culture MP5 contenant comme seule source de carbone la pectine (à 0,5 %), semble un bon moyen pour obtenir une population très variée et capable de dégrader le substrat pectine.

Douze genres appartenant aux bactéries et aux levures sont isolés à partir des échantillons d'olives vertes et ce résultat est en conformité avec celui de différents auteurs (VAUGHIN *et al.*, 1969 ; ASEHRAOU *et al.*, 2000). Par contre dans les échantillons d'olives noires, la flore isolée est constituée en grande partie de souches appartenant au genre *Bacillus*. Les espèces de ce genre sont considérées des contaminants des olives et pectinolytiques (CAMPANIELLO *et al.* (2005).

Les 24 souches isolées sont réparties comme suit :

- La flore bactérienne, est composée de souches appartenant aux genres *Bacillus* (10 souches), *Pseudomonas* (1 souche), *Acetobacter* (1 souche), *Leuconostoc* (2 souches), *Pediococcus* (2 souches) et *Lactobacillus* (2 souches).
- Parmi les levures, les genres identifiés sont : *Rhodotorula* (1 souche), *Cryptococcus* (1 souche), *Candida* (1 souche), *Endomyces* (1 souche) et les moisissures sont représentées par le genre *Rhizopus* (1 souche) et l'espèce *Aspergillus niger* (1 souche).

Ce résultat confirme bien le caractère pectinolytique des souches de ces genres.

Les quarante deux souches isolées et identifiées à partir des échantillons de lait et des olives noires sont utilisées pour l'étude de la mise en évidence de l'activité pectinolytique. Dans le premier volet du troisième chapitre, différents tests basés sur la dégradation du substrat pectine dans le milieu MP5 sont réalisés. Ils ont permis de distinguer huit souches appartenant aux genres *Bacillus* (ONB13), *Lactobacillus* (LLb6), *Leuconostoc* (LLn1 et OVLn9), *Streptococcus* (LSc2), *Pediococcus* (LP5), *Rhodotorula* (ONRh9) et *Aspergillus* (ONAs14). Elles ont montrées des potentiels les plus élevés de dégradation de la pectine. Le deuxième volet est consacré à l'évaluation de l'activité polygalacturonase par le dosage du sucre réducteur selon les techniques Nelson (1944) et de Somogy (1952). Les résultats ont permis de différencier les souches productrices de polygalacturonase. Parmi les genres de bactéries lactiques isolées du lait cru, les souches appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Streptococcus* et la souche LP5 du genre *Pediococcus* produisent l'enzyme PG. Tandis que les souches du genre *Lactobacillus* et *Enterococcus* n'ont pas cette activité. Parmi les souches isolées des olives noires et vertes, l'ensemble des souches du genre *Bacillus* possède une PG active. Tandis que, l'activité enzymatique de la souche ONAs14 (*Aspergillus niger*) est la plus active. Alors que celle des souches ONLn1, OVP1, OVCa4 et OVEN2 est faible.

Dans le quatrième chapitre, l'établissement des cinétiques a permis de quantifier la production d'enzyme des huit souches sélectionnées et de différencier des catégories en fonction de leur comportement dans le milieu MP5. Chez les bactéries, les souches OVLb6, LLc7 et LSc2 se développent très rapidement mais leur synthèse enzymatique est très faible. La souche ONB5 se multiplie lentement et produit moins d'enzyme. Tandis que LLn1 produit moins de cellules, mais son activité enzymatique est plus importante. Chez les champignons, la souche ONRh9 nécessite un temps de culture plus important avant la synthèse de l'enzyme. Son développement cellulaire est plus lent par comparaison à ONAs14.

Parmi les huit souches, ONAs14, ONRh9 et LLn1 se caractérisent par une quantité d'enzyme plus élevée que les autres souches. Les souches ONRh9 et LLn1 ont été sélectionnées pour être étudié sur le milieu MAPG5 contenant comme seule source d'énergie l'acide polygalacturonique. Tandis que la souche ONAs14 est écartée car son activité polygalacturonase est déjà connue.

Les influences de la concentration du substrat ont permis d'obtenir, avec la souche ONRh9, les productions de biomasse et de PG sont proportionnelles à l'augmentation de la concentration en APG. L'activité PG est maximale à 10 g.L⁻¹. Avec la souche LLn1 la production de cellules est favorable dans une large gamme de concentration en APG; alors que l'enzyme est beaucoup plus active avec 5g.L⁻¹.

Les résultats de l'influence du pH sur la production de biomasse et de PG chez ONRh9 et LLn1 ont montré que les deux souches ne tolèrent pas des valeurs de pH extrêmes et l'activité optimale de leur PG est située dans des zones de pH proches de la neutralité. Le pH optimum obtenu par la souche ONRh9 est égal à 6 et celui déterminé par la souche LLn1 égal à 5,5.

Les cultures en fermenteur à pH contrôlé et à pH non contrôlé montrent :

- Avec ONRh9, le contrôle du pH maintient les niveaux d'enzyme et de biomasse à des valeurs proches de leur valeur optimale. Avec la souche LLn1, le contrôle du pH augmente les productions d'enzyme et de biomasse pendant 20 h de culture.
- Avec le pH non contrôlé, les productions maximales d'enzyme et de cellules des deux souches sont très limitées dans le temps.

Les cellules des deux souches observées au microscope à fluorescence présentent

- Chez la souche ONRh9, la même morphologie cellulaire est constatée dans les deux milieux de cultures utilisés. Elles sont aussi nombreuses dans le milieu Saboureaud que dans le milieu MAPG5.

- Chez la souche LLn1, les cellules cultivées dans le milieu MAPG5 apparaissent plus petites, isolées pour la plupart et moins fluorescentes. Alors que, l'observation microscopique de la même souche mais cultivée dans le milieu de Mayeux, révèle des cellules plus abondantes et plus fluorescentes.

Notre étude a montré que la souche ONRh9 isolée de l'échantillon ONCS et appartenant au genre *Rhodotorula* possède une PG très active. Ce résultat confirme celui de VAUGHN *et al.* (1969) qui eux aussi avaient isolés à partir d'olives vertes conservées dans l'eau salée, trois espèces productrices de PG (*Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, *Rhodotorula minuta* var. *minuta* et *Rhodotorula rubra*).

Le résultat le plus marquant de notre travail est la production d'enzyme PG en quantité importante chez la souche LLn1. Cette souche est isolée des échantillons de lait et elle est identifiée à *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*. En effet peu de travaux ont montré l'existence de l'activité PG chez les espèces du genre *Leuconostoc* et seul JUVEN *et al.* (1985) a démontré la production de PG chez les espèces de *Leuconostoc mesenteroides*.

A la suite de ce travail, nous envisageons les perspectives suivantes :

- L'identification de l'ensemble des souches productrices d'enzyme PG par des techniques de biologie moléculaire (G-C%, ADN 16S ou par hybridation) ainsi que la purification de l'enzyme PG produite par les souches LLn1 et ONRh9.

- La mise en évidence et la caractérisation des autres enzymes permettant la dégradation totale de la pectine.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ALAIS, C.H. et LINDEN, G. (1997).** Les glycanes. Dans : Abrégé de biochimie alimentaire. 4^{ème} édition, Masson, Paris, pp: 39-53.
2. **AMAN, P. and WESTERLUND, E. (1996).** Cell wall polysaccharides: structural, chemical and analytical aspects. *Carbohydrate in food*, pp: 191-226.
3. **ANDERSON, A.J. (1978).** Extracellular enzymes produced by *Colletrichum lindemuthanium* and *Helminthosporium maydis* during growth on isolated bean and corn cell walls. *Phytopathology Journal*, **68**, pp: 1585-1589.
4. **ASEHRAOU, A., FAID, M. and AKHARTOUF, R. (1993).** Pure culture fermentation of green olives by *Lactobacillus* strains. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, **11**, pp: 221-228.
5. **ASEHRAOU, A., PERES, C., BRITO, D., FAID, M. and SERHROUCHNI, M. (2000).** Characterization of yeast strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y Aceites*, **51**, pp: 225-229.
6. **ATLAN, D., AUBEL, D. et GILBERT, C. (2000).** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases. *Science des aliments*, **20**, (01), pp: 5-17.
7. **ATLAS, R.M. (1995).** Handbook of microbiological media for the examination of food. (University of Louis Ville), 297 p. CRC press USA.
8. **AVALLONE, S., BRILLOUET, J.M., GUYOT, B., OLGUIN, E. and GUIRAUD, J.P. (2002).** Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, pp: 191-198.
9. **AXELSSON, L. (1993).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.
10. **BACUS, J.N. and BROWN, W.L. (1985b).** The pediococci: meat products. In: Bacterial Starter Cultures for foods. Gilliland S. E., **7**, pp: 86-96. CRC Press Inc. Boca Baton. Florida.
11. **BARON, et THIBAUT, J.F. (1985).** Les enzymes pectinolytiques. Dans: Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel. Mouranche A., Costes C., pp: 143-164, Gauthier-Villars.
12. **BELL, T.A. and ETCHELL, J.L. (1956).** Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **4**, pp: 196-201.
13. **BENEN, J.A.E., KESTER, H., PARENICOVA, L. and VISSER, J. (1996a).** Kinetics and mode of action of *Aspergillus niger* polygalacturonase. In: Pectins and pectinases, Visser J., Voragen A.G.J., **14**, pp: 221-230, Elsevier Sciences B.V., Amsterdam, Netherlands.
14. **BENEN, J.A.E., PARENICOVA, L., KUSTERS-VAN SOMEREN, M., KESTER, H. and VISSER, J. (1996b).** Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. In: Pectins and Pectinases. Visser J., Voragen A.G.J., Rockville M.I. *The American Society of Plant Physiologists*, pp: 98-107.

15. **BENEN, J.A.E., KESTER, H. and VISSER, J. (1999).** Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal of Biochemistry*, **259**, 577-585.
16. **BIANCHI, G. (1999).** Extraction systems and olive oil. Dans: Oléagineux, Corps gras, Lipides, **6** (1), pp: 49-55.
17. **BLANCO, P., SIEIRO, C., DIAZ, A. and VILLA, T.G. (1994).** Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, **40**, pp: 974-977.
18. **BLANCO, P., SIEIRO, C. and VILLA, T.G. (1999).** Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **175**, pp: 1-9.
19. **BONNIN, E., RENARD, C.M.J.C., THIBAUT, J.F. et DUCRO, P. (1997a)** Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisation alimentaires. Dans: Enzymes en Agro-alimentaire. Larreta-Garde V., Eds. Techniques et Documentations Lavoisier, **6**, pp: 168-200.
20. **BORCAKLI, M., ORZAY, G. and ALPERDEN, I. (1993a).** Fermentation of Turkish olives with traditional and aerated systems. In: Food flavours, ingredients, and composition. pp: 263-277. Elsevier Science Publisher.
21. **BOTTON, B., BRETON, A., FEVRE, M., GUY, PH., LARPENT, J.P. et VEAU, P. (1985).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Eds. Masson, Paris. 364 p.
22. **BOUBEKRI, K. and YOSHIYUKI, O. (1996).** Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **170**, pp: 501-505.
23. **BOUREL, G., HENINI, S., KRANTAR, K., ORABY, M., DIVIES, C. et GARMYN, D. (2001).** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. INRA EDP Sciences, pp : 75-82.
24. **BRETON, A. (1985).** Identification des moisissures. Dans : Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Botton *et al.*, Ed. Masson Paris, pp : 34-209.
25. **BRILLOUET, J.M., MOULIN, J.C. and AGOSIN, E. (1985).** Production. Purification and proprieties of an L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens*. *Carbohydrate Research*, **144**, pp 113-126.
26. **BRILLOUET, J.M., WILLIAMS, P. and MOUTOUNET, M. (1991).** Purification and some properties of novel endo β (1-6) D galactanase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, pp 1665-1571.
27. **BUZZINI, P., and MARTINI, A. (2002).** Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, **93**, pp: 1020-1025.

28. **CAMPANIELLO, D., BEVILACQUA, A., D'AMATO, D., CORBO, M.R., ALTIERI, C. and SINIGAGLIA, M. (2005).** Microbial Characterization of Table Olives: Processed According to Spanish and Natural Styles. *Food Technology and Biotechnology*, **43**, (3), pp: 289–294
29. **CARPITA, N.C. and GIBEAUT, D.M. (1993).** Structural models of primary cell walls in flowering plant: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, **3**, pp: 1-3.
30. **CATULO, L., LEITÃO, F., SILVA, S., OLIVEIRA, M.M., PERES, C., GOMES, M.L. and FERNANDES, I. (2002).** Table Olive Fermentation of *Galega* Portuguese Variety. Microbiological, Physico-Chemical and Sensorial Aspects. *ISHS Acta Horticulturae*, 586 IV International Symposium on Olive Growing (October 2002).
31. **CHAMKHA, M. (2001).** Etude du métabolisme de composés aromatiques par des bactéries anaérobies isolées de margines d'olives et de tourteaux de karaté. Université de Provence Aix-Marseille, 85 p.
32. **CHAPMAN, H.R. and SHARPE, M.E. (1981).** Microbiology of cheese. In: Dairy Microbiology, Robinson R.K., Eds., Vol. 2, The microbiology of milk products, Applied Sciences Publishers LTD, London, pp: 157-243.
33. **CHESSON, A. and CODNER, R.C. (1978).** The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, **44**, pp: 347-364.
34. **CIAFARDINI, G., MARSILIO, V., LANZA, B. and POZZI, N. (1994).** Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olives fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, **60**, pp: 4142-4147.
35. **COGAN, T.M. (1981).** Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Journal of Dairy Research*, **48**, pp: 489-495.
36. **COGAN, T.M. (1982).** Acetoin production and citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Food Science and Technology*, **6**, pp: 69-78.
37. **COLLINS, M.D., FARROW J.A.E., PHILLIPS, B.A. and KANDLER, O. (1983).** *Streptococcus garviae* sp. Nov. and *Streptococcus plantarum* sp. Nov. *Journal of General Microbiology*, **129**, pp: 3427-3431.
38. **COLLMER, A. and KEEN, N.T. (1986).** The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, **24**, pp: 383-409.
39. **CUN, C.H. et LESGARDS, G. (1993).** Aliments: Etude de certaines propriétés physico-chimiques des pectines. *Cahiers de nutrition et de diététique*, **28** (5), pp : 292-297.
40. **DAVIS LARONE, H. (1987).** Medically important fungi. A guide to identification. 2nd edition Elsevier, London, 230 p.

41. **DELLAGLIO, F., SARRA, P.G. and VESCOVO, M. (1981A).** DNA-DNA homology of *Pediococcus* strains isolated from some Italian cheeses. *Zentralbi. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.*, 1 Abt. Orig. C2, pp: 278-281.
42. **DE MAN, J.C., ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**, pp: 130-135.
43. **DERACHE, PH. et DERACHE, R. (1986).** Toxicité des champignons. Dans : Technologie et sécurité des aliments. pp : 199-228. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris.
44. **de ROISSART H.B. (1986).** Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., **3**, Eds. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.
45. **de ROISSART, H.B. et LUQUET, F.M. (1994).** Bactéries lactiques, I, II. Lorica Chemin saint Georges, F-38410 France.
46. **DESMAZEAUD, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, **5**, pp: 331-343.
47. **DEVOYOD, J.J. et POUILLAIN F. (1988).** Les Leuconostocs propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Revue Le lait*, **68** (3), pp: 249-280.
48. **DINU, D. (2001).** Enzymatic Hydrolysis of Pectic acid and Pectins by Polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Roumania Biotechnology Letters*, **6** (5), pp: 397-402.
49. **DUCROO, P. (1982).** Efficacité des préparations pectinolytiques en fonction du type de jus de fruits à traiter. Dans : Utilisation des enzymes en technologie alimentaires. Tech. et Doc. Lavoisier.
50. **DURAND, G. et MONSAN, P. (1982).** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Eds. Gauthier-Villars.
51. **ENGLISH, P.D., MAGLOTHIN, A., KEEGSTRA, K. and ALBERSHEIM, P. (1972).** A cell-wall degrading endo-polygalacturonase secreted by *Colletrichum lindemuthanium* grown in culture. *Plant Physiology*, **47**, pp: 1-6.
52. **ESTEVE-ZARZOSO, B., MANANARES, P. and QUEROL, A. (1998).** The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Journal of Microbiology*, **1**, pp: 143-148. Springer-Verlag Ibérica.
53. **FARROW, J.A.E., FACKLAM, R.C. and COLLINS, M.D. (1989).** Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. Nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**, pp: 279-283.
54. **FEDERICI, F. (1985).** Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Antonie van Leeuwenhoek. *Journal of Microbiology*, **51**, pp: 139-150.
55. **FLEMING, H.P., MC FEETERS, R.F. and DAESCHEL, M.A. (1985).** The lactobacilli, pediococci and leuconostocs; vegetable products. In: Bacterial Starter Cultures for foods. Gilliland S. E., pp: 98-118, CRC Press Inc, Boca Raton. Florida.

-
56. **GAINVORS, A. and BELARBI, A. (1995).** Detection method for polygalacturonase-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast*, Eds. John Wiley and SONS LTD, England, **11**, pp: 1493-1499.
57. **GARVIE, E.I. and FARROW, J.A.E. (1982).** *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen) comb. nov. and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. (Matuszewski *et al.*) nom. rev., com. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, **32**, pp: 453-455.
58. **GARVIE, E.I. (1986a).** Genus *Leuconostoc* van tiegen 1978, 198^{al} emended mut. Char Hucker and Pederson 1930, 66^{al}. In: Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 1071-1075.
59. **Garvie, E.I. (1986b).** Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68^{AL}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, **2**, pp 1075-1079.
60. **GUESSOUS, Z., OUHSSINE, M., MOKHTARI, A., FAID, M. et EL YACHIOUI, M. (2000).** Isolement et caractérisation de *Geotricum candidum* pour la production d'une polygalacturonase extracellulaire. *Science des Aliments*. **20** (3), pp: 309-320.
61. **GUIRAUD, J.P. et GALZY, P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Eds. Usine nouvelle Paris, 239 p.
62. **GUIRAUD, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
63. **GUNTER, K., PACK, A., BONAPARTE, C. and REUTE., G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of food microbiology*, **41**, pp: 103-125.
64. **GUPTA, M.N., GUOQIANG, D. and MATTIASSON, B. (1993).** Purification of endopolygalacturonase by affinity precipitation using alginat. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **18**, pp: 321-327.
65. **GOGNIES, S., BELARBI, A. and AIT BARKA, E. (2001).** *Saccharomyces cerevisiae*, a potential pathogen towards grapevine, *Vitis vinifera*. *FEMS Microbiology Ecology*, **37**, pp: 143-150.
66. **GREENWOOD, C.T. and MILNE, E.A. (1968).** Starch Degrading and Synthesizing Enzymes: A Discussion of Their Properties and Action Pattern. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **23**, pp 231-366.
67. **HODGSON, A.S. and KERR, L.H. (1991)** Tropical fruit products. In: The Chemistry and Technology of Pectin. Walter R. H., Eds. Academic Press, New York, 67 p.
68. **HOUNHOÏGAN, D.J., NOUT, M.J.R., NAGO, C.M., HOUBEN, J.H. and ROMBOUTS, F.M., (1993).** Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of maw fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology*. **18** (4), pp: 279-287.
69. **HUTKINS, R.W. and MORRIS, H.A. (1987).** Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Food and Protection*, **50**, pp: 876-884.

71. **JERNEJC, K. (2000).** Lipid composition of a citric acid producing and a pectolytic enzyme excreting *Aspergillus niger* strains. *Acta Chemistry of Slovenia*, **47**, pp 69-80.
72. **JONES, D. (1978).** Composition and differentiation of genus *Streptococcus*. In: *Streptococci*. Skinner, F. A., Quesnel, L. B., Eds. Academic Press, London, pp: 1-49.
73. **JURNAK, F., KITA, N., GARRETT, M., HEFFRON, S.E., SCAVETA, R., BOYD, C. and KEEN, N., (1996).** Functional implications of the three-dimensional structures of pectate lyase. Dans: *Pectins and Pectinases*. Visser J., Voragen A. G. J., Eds. Progress in Biotechnology **14**, pp 295-308. Elsevier Science.
74. **JUVEN, B.J., LINDNER, P. and WEISSLOWICZ, H. (1985).** Pectin degradation in plant material by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Applied Bacteriology*, **58**, pp: 533-538.
75. **KACEM, M., ZADI-KARAM, H. and KARAM, N. E. (2003).** *Lactic acid Bacteria* of western Algeria. 1: Characteristics of strains isolated from raw milk and olive oil. Sciences et Technologies C. (Université Mentouri. Constantine. Algeria), **20**, pp: 45-50.
76. **KACEM, M. (2005).** Bactéries lactiques d'Algérie: Isolement, identification et caractéristiques technologiques. Bactériocines produites par *Lc. Lactis* et *Lb. plantarum*. Thèse de doctorat d'état en Biologie Moléculaire et Génétique. Université d'Oran. 276 p.
77. **KAJI, A. and SHIMOKAWA, K. (1984).** New exo-type arabinanase from *Erwinia carotovora* IAM 1024. *Agricultural and Biological Chemistry*, **48**, pp 67-72.
78. **KANDLER, O. and WEISS, N. (1986A).** Regular nonsporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 1208-1209.
79. **KANDLER, O. and WEISS, N. (1986b).** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 1209-1234.
80. **KARAM, N. E. (1995).** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique: Etude Biochimique et Moléculaire. Thèse de Doctorat d'état, Université d'Oran. Algérie.
81. **KARAM, N.E. and BELARBI, A. (1995).** Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactis acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**, pp: 559-563.
82. **KARR, A.L. (1976).** Cell wall biogenesis. In: *Plant Biochemistry*. Bonner, J., Varner, J.E., Eds. Academic Press, New York. 405 p.
83. **KAVITHA, N.S., HILDA, A., GOPINATH, S. and LATHA K. (1997).** Hydrolysis of Oils and Marine Environmental Ethics. Bioethics in India: Proceedings of the International Bioethics Workshop in Madras: Biomanagement of Biogeoresources, University of Madras, Eds. Jayapaul Azariah, Hilda Azariah, Darryl, R.J., Macer, pp:16-19.

85. **KESTER, H.C.M., KUSTERS-VAN SOMEREN, M. and VISSER, J. (1996).** Primary structure and characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *European Journal of Biochemistry*, **240**, pp: 738-746.
86. **KHAN, N.Q., ALBRECHT, H., RUTKOWSKI, E., LOFFLER, F., GOTTSCHALK, M. and JANY, K. D. (1990).** Nucleotide and derived amino acid sequence of a pectinesterase cDNA isolated from *Aspergillus niger* strain RH5344. *Nucleic Acids Research*, **18**, 4262 p.
87. **KÖRNER, R., LIMBERG, G., CHRISTENSEN, T.M.I.E., MIKKELSEN, J.D. and ROEPSTORFF, P. (1999).** Sequencing of partially methyl-esterified oligogalacturonates by tandem mass spectrometry and its use to determine pectinase specificities. *Analytical Chemistry*, **71**, pp: 1421-1427.
88. **KOTZEKIDOU, P. (1997).** Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Journal of Food Microbiology*, **14**, pp: 609-616.
89. **KREGER, VAN RIJ, N.J.W. (1987).** Classification of yeasts. In: The yeasts, Rose and Harrison 2nd edition, London, pp: 5-55.
90. **KROON, P.A., FAULDS, C.B. and WILLIAMSON, G. (1996).** Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **23**, pp: 255-262.
91. **LANCIOTTI, R., CORBO, M.R., SINIGAGLIA, M. and GUERZONI, M.E. (1999).** Microbial characterization of table olives from the Apulian market, *Advances in Food Science*, **21**, pp: 159-165.
92. **LAO C., LOPEZ-TAMAMES, E., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., BUXADERAS, S. and DEL CARMEN DE LA TORRE-BORONAT, M.C. (1997).** Pectic enzyme treatment effect on quality of white grape musts and wines. *Journal of food Science*, **62** (6), pp 1142-1149.
93. **LARPENT, J.P. (1989).** Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans : Microbiologie alimentaire, Tome 2, Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., Eds. Techniques et documentation Lavoisier, pp: 3-15.
94. **LARPENT, J.P. (1991).** Les ferments bactériens. Dans : Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (Produits laitiers et carnés). Actualités Scientifiques et Techniques en Industrie Agro-alimentaire, Eds. C.D.I.U.P.A., Paris, **46**, pp: 3-117.
95. **LAVERMICOCCA, P. and GOBBETTI, M. (1998).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and table olive brines. *Italian Journal of Food Science*, **10**, pp: 27-39.
96. **LEE, D.R., MOLSKNESS, T.A., SANDINE, W.E. and ELLIKER, P.R. (1973).** Carbohydrate metabolism in lactic streptococci: fate of galactose supplied in free or disaccharide form. *Journal of Applied Microbiology*, **26**, pp: 951-958.

-
97. **LE GOFF, A. (2001).** Influence de la structure fine des pectinases sur le mode d'action d'endopolygalacturonase sauvage et mutant du champignon *Fusarium moniliform*. Thèse de doctorat d'état. Université de Nantes France.
 98. **LEMBERG, G., KÖRNER, R., CHRISTENSEN, T.M.I.E., ROEPSTORFF, P. and MIKKELSEN, J. D. (2000a).** Analysis of pectin structure. I. Analysis of different de-esterification mechanisms by enzymatic fingerprinting using endo-pectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate Research*, **327**, pp: 293-307.
 99. **LEVATA-JOVANOVIC, M. and SANDINE, W.E. (1997).** Method to use *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris* 91404 to improve milk fermentation. *Journal Dairy Science*, **1** (80), pp: 11-18.
 100. **LEVEAU, J.Y. et BOUIX, M. (1993).** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds.Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.
 101. **LOPEZ-LOPEZ, A., GARCIA-GARCIA, P., DURAN-QUINTANA, M.C. and GARRIDO-FERNANDEZ, A. (2004).** Physicochemical and Microbiological Profile of Packed Table Olives. *Journal of Food Protection*, **67** (10), pp: 2320-2325.
 102. **LUH, B.S. and PHAFF, H.J. (1951).** Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Archives Biochemistry and Biophysics*, **33**, pp: 213-227.
 103. **MALDONADO, M.C., and STRASSER DE SAAD, A.M. (1998).** Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **20**, pp: 34-38.
 104. **MCKAY, A.M. (1988).** A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiology Letters*, **56**, pp: 355-358.
 105. **MOLSKNESS, T.A., LEE, D.R., SANDINE, W.E. and ELLIKE, P.R. (1973).** β -D-phosphogalactoside galactohydrolase of lactic streptococci. *Journal of Applied Microbiology*, **25**, pp: 373-380.
 106. **MOREAU, C. (1989).** Les moisissures. Dans : Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Bourgeois, C.M., Mesclé, J.F. et Zulla, J., (1), pp : 174-185.
 107. **MUTTER, M., COLQUHOUM, I.J., SCHOLS, H.A., BELDMAN, G. and VORAGEN, A.G.J. (1996).** Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan α -L rhamnopyranosyl-(1,4)- β -D-galactopyranosyluronide lyase. *The American Society of Plant Physiologists*, **110**, pp 73-77.
 108. **MUTTER, M., BELDMAN, G., PITSON, S.M., SCHOLS, H.A. and VORAGEN, A.G.J. (1998a)** Rhamnogalacturonan α -D-galactopyranosyluronohydrolase. An enzyme that specifically removes the terminal nonreducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiology*, **117**, pp 153-163.

109. MUTTER, M., RENARD, C.M.G.C., BELDMAN, G., SCHOLS, H.A. and VORAGEN, A.G.J. (1998B). Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonans oligomers. Characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturono- hydrolase. *Carbohydrate Research*, **311**, pp 155-164.
110. NAKAGAWA, T., MIYAJI, T., YURIMOTO, H., SAKAI, Y., KATO, N. and TOMIZUKA, N. (2000). A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Applied Environmental Microbiology*, **66** (10), pp: 4253-4257.
111. NAKANO, H., TAKENISHI, S., KITAHATA, H. and WATANABE, Y. (1990). Purification and characterization of an exo- β -1-4-galactanase from a strain of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, **193**, pp 61-67.
112. NELSON, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, **153**, pp: 375-380.
113. NOVEL, G. (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.
114. NOZAKI, K., MIYAIRI, K., HOZUMI, S., FUKUI, Y. and OKUNO, T. (1997). Novel Exopolygalacturonase produced by *Alternaria mali*. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61** (1), pp: 75-80.
115. NYCHAS, G.J.E., PANAGOU, E.Z., PARKER, M.L., WALDRON, K.W., and TASSOU, C.C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine, *Letters in Applied Microbiology*, **34**, pp: 173-177.
116. ORLA-JENSEN, S. (1919). The lactic acid bacteria. Copenhagen. I Komision Hos Ejnar Munksgaard.
117. PASCULLI, R., GEREADS, C., VORAGEN, A.G.J. and PILNIK, W. (1991). Characterization of polygalacturonases from yeasts and fungi, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **24**, pp: 63-70.
118. PARENICOVA, L., BENEN, J.A.E., KESTER, H.C.M. and VISSER, J. (2000a). pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biochemistry Journal*. **345**, 637-644.
119. PASHOVA, S., SLOKOSKA, L., KRUMOVA, E. and ANGELOVA, M. (1999). Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, pp: 535-540.
120. PATINO, B., POSADA, M.L., GONZALEZ-JAEN, M.T. and VAZQUEZ, C. (1997a). The course of pectin degradation by polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici*. *Microbiosis Journal*, **91**, pp: 47-54.

121. **PATINO, B., POSADA, M L., GONZALEZ-JAEN, M.T., MARTINEZ DEL POZO, A. and VAZQUEZ, C. (1997b).** Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radici* lycopersici. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, pp: 1084-1090.
122. **PELLERIN, P. and BRILLOUET, J.M. (1994).** Purification and properties of an exo-(1,3)- β -galactanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, **264**, pp 281-291.
123. **PETRANSXIENE, P. et LAPIED, L. (1981).** Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers : Analyse et tests. 2^{ème} édition, Tech. et Doc., Lavoisier, Paris, pp: 44-81.
124. **PILET, M.F., MAGRAS, C. et FEDERIGHI, M. (1998).** Bactéries lactiques. Dans : Manuel de bactériologie alimentaires. Sutra *et al.*, Eds. Polytechnica. Paris, pp: 235-260.
125. **PILNIK, W., ROMBOUITS, F.M. and VORAGEN, A.G.J. (1973).** On the classification of pectin depolymerase: activity of pectin depolymerases on glycol esters of pectate as a new classification criterion. *Chemie Microbiologie, Technologie der Lebensmittel*, **2**, pp: 122-128.
126. **PILNIK, W. and ROMBOUITS, F.M. (1981).** Pectic enzymes. In: Enzymes in Food Processing, Birch, G. G., Blakebrough, N., Parker, K. J., Eds. Applied Sciences Publishers LTD, London, pp: 105-128.
127. **PILNIK, W. and VORAGEN, A.G.J. (1993).** Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. In: Enzymes in Food Processing, Nagodawithana, T., Reed, G., Eds. Academic press, London, pp: 363-399.
128. **POLIZELI, M.L.T.M., JORGE, J.A. and TERENCEZI, H.F. (1991).** Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of General Microbiology*, **137**, pp: 1815-1823.
129. **RALET, M.C., FAULDS, C.B., WILLIAMSON, G. and THIBAUT, J.F. (1994b).** Feruloyted oligosaccharides from cell-wall polysaccharides. Part III. Degradation of feruloyted oligosaccharides from wheat bran and sugar-beet pulp by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, **263**, pp 257-269.
130. **RALET, M.C. BONNIN, E. and THIBAUT, J.F. (2001).** Pectins in Biopolymère. Eds. Steibûchel, A., Willey, V.C.H., Verdog, Weiheim, H., **8**, pp: 1-28.
131. **RENARD, C.M.G.C. and THIBAUT, J.F. (1993).** Structure and properties of apple and sugar beet pectins extracted by chelating agent. *Carbohydrate Research*, **244**, pp: 99-114.
132. **RENARD, C.M.G.C. and JAVIS, M.C. (1999).** Acetylation and methylation of homogalacturonans. I: optimisation of the reaction and characterization of the products. *Carbohydrate Polymers*, **39**, pp: 201-207.
133. **REXOVÀ-BENKOVÀ, L. (1973).** The size of the substrate-binding site of an *Aspergillus niger* extracellular endopolygalacturonase. *European Journal of Biochemistry*, **39**, pp: 109-115.

134. **REXOVÀ-BENKOVÀ, L. and MARKOVIC, O. (1976).** Pectic enzymes. *Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **33**, pp: 323-385.
135. **RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., BURR, T.J. and COLLMER, A. (1991).** Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Journal of Bacteriology*, **173**, pp: 6547-6552.
136. **ROMBOUTS, F.M. and PILNIK, W. (1979).** Enzymes in the fruits juice industry. In: Microbiology and food industry. A.p.r.i.a. Department of food Science Agricultural University the Netherlands, **3**, pp: 153-160.
137. **ROMBOUTS, F.M. and PILNIK, W. (1986).** Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance, *Symbiosis*, **2**, pp: 79-90.
138. **ROMBOUTS, F.M., VORAGEN, A.G.J., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.J.F., GEREADS, C.C.J. M., SCHOLS, H.A. and PILNIK, W. (1988).** The arabinanase of *Aspergillus niger*. Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidases and an endo-1,5- α -L-arabinanes. *Carbohydrate Polymère*, **9**, 25-47.
139. **ROQUEBERT, M.R. (1997).** Les moisissures. Dans : Nature, biologie et contamination. Site Internet : <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm>.
140. **RYHÄNEN, E.L., SÄRKKÄ-TIRKKONEN, M. and MANTERE-ALHONEN, S. (1996).** Isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented wheat drink. *Microbiologie Aliment Nutrition*, **14** (4), pp 369-372.
141. **RZEDOWSKI, W. (1972).** Utilisation des enzymes dans l'industrie des fruits et légumes. *Annual Review of Agriculture and Technology*, **21**, pp 535-543.
142. **SAÏDI, N. (1998).** Bactéries lactiques des laits d'Algérie: isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique. Thèse de Magister. Université d'Oran.
143. **SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. and VANDAMME, E.J. (1993).** Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and application. *Advances Applied Microbiology*, **39**, pp: 213-294.
144. **SAKELLARIS, G., NIKOLAROPOULOS, S. and EVANGELOPOULOS, A.E. (1988).** Polygalacturonase biosynthesis by *Lactobacillus plantarum*: effect of cultural conditions on enzyme production. *Journal of Applied Bacteriology*, **65**, pp: 397-404.
145. **SAKELLARIS, G., NIKOLAKOPOULOS, S. and EVANGELOPOULOS, A.E. (1989).** Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from *Lactobacillus plantarum* strain BA 11. *Journal of Applied Bacteriology*, **67**, pp: 77-85.
146. **SANDINE, W.E. (1988).** New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, pp: 519-522.
147. **SCARDOVI, V. (1986).** Genus bifidobacterium. Orla-Jensen 1924, 472^{AL}. In : Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Williams et Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 1418-1434.

148. SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M.D. and FISCHER, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **6**, pp: 183-195.
149. SCHLEIFER, K.H. (1986). Gram-positive cocci. Dans: bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams et Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 999-1002.
150. SCHLEIFER, K. and LUDWIG, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, **18**, pp: 461-467.
151. SCHOLS, H.A., GERAEDS, C.C.J.M., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.F.S., KORMELINK, F.J.M. and VORAGEN, A.G.J. (1990A). Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydrate Research*, **206**, pp: 105-115.
152. SEARLE VAN LEEUWEN, M.J.F., VAN DEN BROEK, L.A.M., SCHOLS, H.A., BELDMAN, G. and VORAGEN, A.G.J. (1992). Rhamnogalacturonan acetylerase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**, pp 347-349.
153. SEKIMATA, M., OGURA, K., TSUMURAYA, Y., HASHIMOTO, Y. and YANAMOTO, S.A. (1989). β galactosidase from radish (*Raphinus sativus* L.) seeds. *Plant Physiology*, **90**, pp 567-574.
154. SERVILI, M., BEGLIOMINI, A.L., MONTEDORO, G., PETRUCCIOLI, M. and FEDERICI, F. (1992). Utilisation of yeast pectinase in olive oil extraction and red wine process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **58**, pp: 253-260.
155. SHOMER, I. (1991). Protein coagulation cloud in citrus fruits extract. I. Formation of coagulates and their bound pectin and neutral sugars. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **39**, pp: 22-63.
156. SINGH, S.A. and RAO, A.G.A. (2002). A simple fraction protocol for, and a comprehensive study of the molecular proprieties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **35**, pp: 115-123.
157. SINGLETON, P. (1999). Bacteriologie, 4^{ème} Eds. Dunod, Paris, pp: 380- 415.
158. SKINNEL, F.A. and QUESNEL, L.B. (1978). *Streptococci*. Symposium N° 7, The Society for Applied Bacteriology, Academic Press. London.
159. SKYTÄÄ, E., HAIKARA, A. and MATTILA-SANHOLMT, T. (1993). Production and characterization of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*. *Applied Bacteriology Journal*, **74**, pp: 134-142.
160. SOARES, M.M.C.N., DA SILVA, R. and GOMES, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **30** (4), pp: 1-8.

161. **SOMKUTI, G.A., and STEINBERG, D.H. (1979a)**. Adaptability of *Streptococcus thermophilus* to lactose, glucose and galactose. *Journal of Food and Protection*, **11**, pp: 885-887.
162. **SOMOGYI, M. (1952)**. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **159**, pp: 19-23.
163. **SPELLMAN, M.W., MC NEIL, M., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. and DELL, A. (1983b)**. Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonane II. *Carbohydrate Research*, **122**, pp 131-153.
164. **STACKEBRANDT, E., FOWLER, V.J. and WOESE, C.R. (1983)**. A phylogenetic analysis of *Lactobacilli*. *Pediococcus pentosaeus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Systematic and Applied Microbiology*, **4**, pp: 326-337.
165. **STACKEBRANDT, E. and TEUBER, M. (1988)**. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, pp: 317-324.
166. **STILES, M. and HOLZAPFEL, W. (1997)**. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.
167. **SUHIGARA, T.F. (1985)**. The Lactobacilli and Streptococci: bakery products. In: Bacterial Starter Cultures for Foods. Gilliland S.E. Eds. CRC Press Boca Raton. Florida, **9**, pp: 120-125.
168. **SUTHERLAND, J.W. (1995)**. Polysaccharides lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, **16**, pp: 223-347.
169. **TANSEY, M.R. (1971)**. Agar diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Archives of Microbiology*, **77**, pp: 1-11.
170. **TERZAGHI, B.E. and SANDINE, W.E. (1974)**. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, **29**, pp: 807-813.
171. **THIBAUT, J.F. and MERCIER, C. (1978)**. *Aspergillus niger* Endopolygalacturonase. I. Studies on purification by agarose gel chromatography. *Journal Solid-Phase Biochemistry*, **2**, (4), pp: 295-304.
172. **THIBAUT, J.F. and RALET, M. C. (2001)**. Pectins: Their origin, structure and functions. Dans: Advanced Dietary Fibres. Mc Cleary, B.V. and Prosky L., (Chapter 32), Eds. Oxford Blackwell Science, pp: 369-378.
173. **THIERRY, E. (1997)**. Les infections microbiennes. Eds. Nathan, Paris, (1), 128 p.
174. **THIEULIN, G. et VUILLAUME, R. (1973)**. Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait, de produits laitiers et des œufs. 3^{ème} édition, Institut Universitaire de Technologie (France), pp: 25-66.
175. **THOMPSON, J. (1979)**. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *Journal of Bacteriology*, **140**, pp : 774-785.

176. **TINSON, W., HILLIER, A.J. and JAGO, G.R. (1982a).** Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 1. Utilization of lactose, glucose and galactose. *Australian Journal of Dairy Technology*, **37**, pp: 8-13.
177. **UCHIDA, K. (1982).** Multiplicity in soy pediococci carbohydrate fermentation and its application for analysis of their flora. *Journal of General and Applied Microbiology*, **28**, pp: 215-223.
178. **USEDA, S., YUSAKU, F. and LIM, J.Y. (1982).** Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. *Journal of Applied Biochemistry*, **4**, pp: 524-532.
179. **VAN DEN BERG, J.C., SMITS A., POT, B., LEDEBOER, A.M., KERESTERS, K., VERBAKEL, J.M.A. and VERRIPS, C.T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food, fermentation processes and culture collection. *Food Biotechnology*, **7**, pp: 183-205.
180. **VAUGHN, I. L. H., JAKUBCZYL, T., MC MILLAN, J. D., HIGGINS T. E., DAVE B. A., and CRAMPTON V. M. (1969).** Some pink yeast associated with softening of olives. *Journal of Applied Microbiology*, **18**: pp: 771-775.
181. **VILLAR, M., DE RUIZ HOLGADO, A., SANCHEZ, J.J., TRUCCO, R.E. and OLIVER, G. (1985).** Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, pp: 664-666.
182. **VORAGEN, A.G.J., PILNIK, W., THIBAUT, J.F., AXELOS, M. and RENARD, C. (1995).** Pectins. In: *Food Polysaccharides and their Applications*. Eds. A.M. Stephen Marcel Dekker Inc, pp: 287-339.
183. **WEINSTEIN, L. and ALBERSHEIM, P. (1979).** Purification and partial characterization of a wall degrading endo-arabinanase and arabinosidase from *Bacillus subtilis*. *Plant Physiology*, **63**, pp: 425-432.
184. **WHITAKER, J.R. (1990b).** New and future uses of enzymes in food processing. *Food Biotechnology*, **4**, pp: 669-697.
185. **YAMASAKI, M., YASUI T. and AMARINA, K. (1964).** Pectic enzymes in the clarification of apple juice. I. Study on the clarification reaction in a simplified mode. *Agricultural and Biological Chemistry*, **28**, pp: 779-787.
186. **YANG, D. and WOESE, C.R. (1989).** Phylogenetic structure of the *Leuconostocs*: an interesting case of rapidly evolving organism. *Systematic and Applied Microbiology*, **12**. pp 145-149.
187. **ZADI-KARAM, H. (1998).** Bactéries lactiques de lait de *Camelus dromadarius* : Etude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques. Elaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de diplôme de Doctorat d'Etat Université de Constantine. 189 p.

188. **ZHANG, J., BRUTON, B.D. and BILES, C.L. (1999).** *Fusarium solani* endopolygalacturonase from decayed muskmelon fruit: Purification and characterization. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **54**, pp 171-186.
189. **ZINK, R., WALKER, C., SCHMIDT, G., ELLI, M., PRIDMORE, D. and RENIERO, R. (2000).** Impact of multiple stress factors on the survival of dairy lactobacilli. *Science des aliments*, **20** (1), pp: 119-126.

ANNEXES

ANNEXE I.

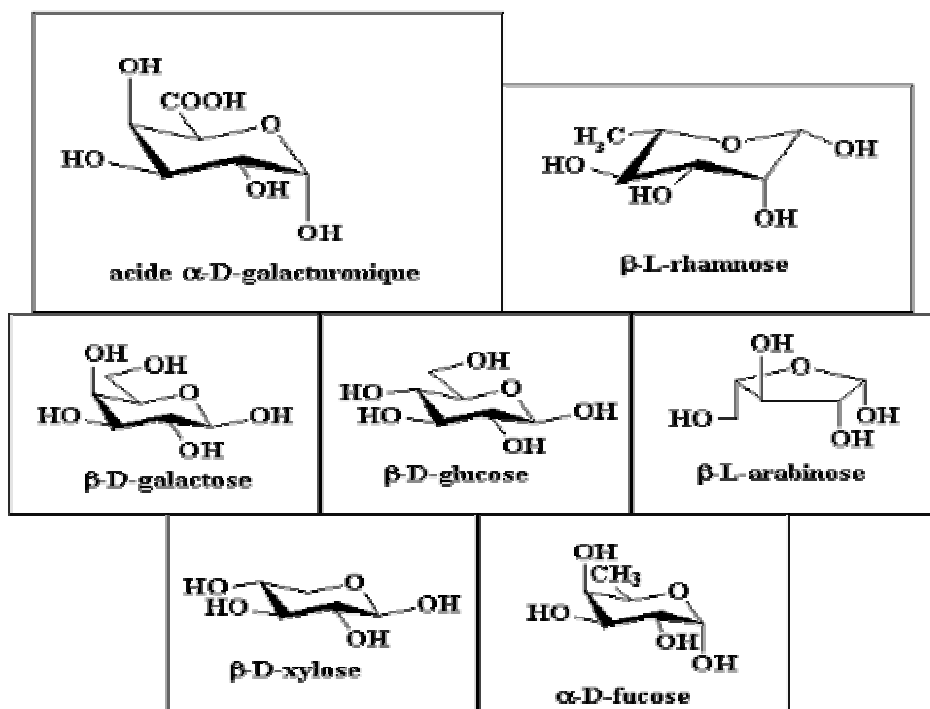


Figure 3. Principales unités glucidiques constituant les substances pectiques ([http:// www. Unilim.fr/thèses/2003/sciences/2003_limo002/thèse_notes](http://www.Unilim.fr/thèses/2003/sciences/2003_limo002/thèse_notes)).

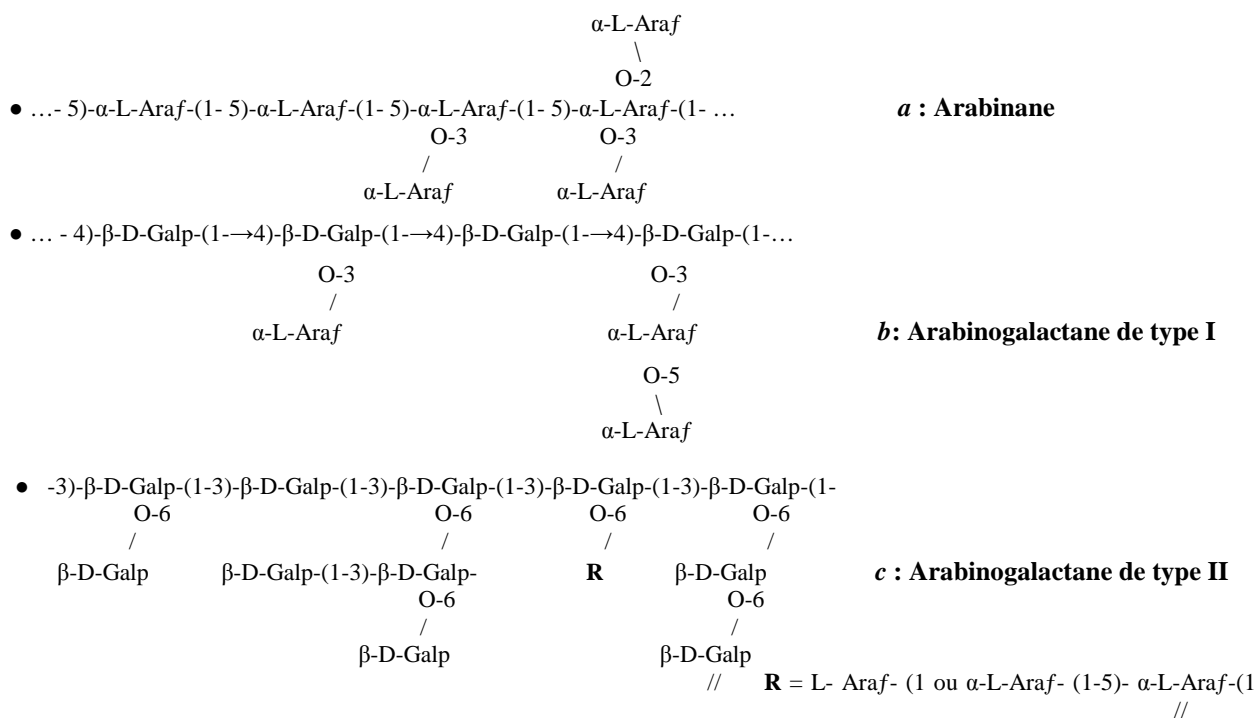


Figure 4. Structure type des polymères d'arabinose (BONNIN *et al.* 1997a).

ANNEXES II. Milieux de cultures utilisées pour l'étude des bactéries lactiques isolées du lait cru

1. Les milieux de cultures destinés pour le dénombrement des bactéries lactiques

- Milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE, 1974) :

Peptone papainique de soja	5 g	β -Glycérophosphate de sodium	19 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g	Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25 g
Peptone trypsique de caséine	2,5 g	Acide ascorbique	0,50 g
Extrait de viande	5 g	Agar-agar	15 g
Extrait de levure	2,5 g	Eau distillée	qsq 950 mL

pH 7,2

Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min. La solution de lactose est préparée dans l'eau distillée à raison de 5 g dans 50 mL Elle est stérilisée à 110 °C durant 15 min et ajoutée au milieu.

- Milieu MRS (MAN *et al.*, 1960):

Peptone	10 g	Acétate de sodium	5 g
Extrait de viande	10 g	Citrate d'ammonium	2 g
Extrait de levure	5 g	Sulfate de magnésium	2 g
Tween 80	1 mL	Sulfate de manganèse	0,005 g
Phosphate dipotassique	2 g	Agar-agar	5 g
		Eau distillée	qsq 800 mL

pH 6,5

Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 mn à l'autoclave. 20 g de glucose sont dissous dans 200 ml d'eau distillée, stérilisés à 110 °C durant 15 min et ajouté au milieu.

- Milieu de Mayeux (GUIRAUD 1998) :

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

pH 6,5

Après la stérilisation du milieu à 115 °C durant 15 min ; 10 mL d'une solution dans l'eau d'azide de sodium stérile à 7,5 mg/mL sont rajoutés.

2. Les milieux de cultures utilisés pour l'identification des bactéries lactiques (GUIRAUD 1998)

- Naylor et Sharpe:

Peptone	10 g	Chlorure de sodium	5 g
Extrait de viandes	10 g	Glucose	5 g
Extrait de levure	3 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
pH 7			

Le milieu est réparti en tubes à essais et stérilisé à 120 °C durant 15 min. 15 g d'Agar-agar sont ajoutées. Lorsque le milieu est utilisé à l'état solide.

- Gélose au tellurite de potassium :

Extrait de viande	10 g	Glucose	5 g
Extrait de levure	3 g	Gélose	20 g
Peptone	10 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
Chlorure de sodium	5 g		
pH 7			

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 15 min puis 50 mL d'une solution stérile de tellurite de potassium à 0,8 %.

- Gélose nutritive ordinaire :

Peptone	10 g	Agar-agar	15 g
Extrait de viande	5 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
Chlorure de sodium	5 g		
pH 7,2			

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min

- Gélose bile-esculine :

Extrait de viande	3 g	Bile de bœuf	40 g
Peptone de viande	50 g	Gélose	14,5 g
Esculine	1 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
Citrate ferrique	0,5 g	pH 6,6	

Après stérilisation à 120 °C durant 15 min, 5 % de sérum stérile sont ajoutés au milieu.

- Milieu lait tournesolé :

Teinture de tournesol à 4 %	10 mL
Lait écrémé	qsq 1000 mL

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 110 °C durant 5 min et utilisé 2 jours après sa préparation. Au moment de son emploi le milieu est chauffé à 100 °C pendant 20 min.

- Milieu TTC-Tergitol :

Extrait de viande	5 g	Bleu de bromothymol	0,05 g
Extrait de levure	6 g	Gélose	14 g
Peptone	10 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
Lactose	20 g		
	pH 7,2		

Le milieu est autoclavé à 115 °C durant 20 min. 50 mL de la solution de chlorure de 2-3-5 triphenyltetrazolium (TTC) à 0,05 % et 50 mL de la solution de Tergitol (polyoxyéthylène alcool) à 0,2 % stérilisé par filtration sont ajoutés au milieu.

- Milieu de fermentation des sucres par les souches du genre *Leuconostoc* :

Peptone	15 g	Pourpre de bromocrésol	0,02 g
Extrait de levure	6 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
Chlorure de sodium	5 g		

Le milieu est réparti en tube à essai, stérilisé à 115 °C durant 15 min et avant emploi 1 mL de la solution de sucre stérile utilisée à la concentration final 0,5 %, est ajoutée par tube.

- Milieu Cystine-Trypticase de fermentation des sucres par les souches des genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* :

Cystine	0,5 g	Rouge de phénol	0,017 g
Trypticase	20 g	Gélose	2,5 g
Chlorure de sodium	5 g	Eau distillée	qsq 1000 mL
Sulfite de sodium	0,5 g		
	pH 7,3		

Le milieu est réparti en tube à essai, stérilisé à 115 °C durant 15 min, additionnée de 1 mL de la solution de sucre à tester utilisée à la concentration final 0,5 % puis solidifié en culot.

- Milieu de fermentation des sucres par les souches du genre *Lactobacillus* :

Peptone	15 g	Rouge de chlorophenol	0,0005 g
Extrait de levure	5 g	Gélose	1 g
Tween 80	1 mL	Eau distillée	qsq 1000 mL

pH 6,4

Le milieu est réparti en tubes à essais, autoclavé à 115 °C pendant 10 min et avant emploi, 1 mL de la solution de sucre utilisée à la concentration finale 0,5 % est ajoutée.

- Bouillon de Mac Cleskey :

Tryptone	16 g	Phosphate dipotassique	1,5 g
Extrait de levure	8 g	Glucose	80 g

pH 7

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C durant 15 min. Après inoculation, 4 mL de gélose blanche sont ajoutés dans chaque tube. La gélose blanche est préparée avec 15 g de gélose complété avec 1000 mL d'eau distillée, le pH est ajusté à 7 puis le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 mn.

ANNEXE III. Milieux de cultures utilisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes pectinolytiques à partir des olives noires et vertes

1. Composition du milieu de culture MP5 (ATLAS, 1995) :

● Milieu de base :		● Solution minérale :	
Na ₂ HPO ₄	6 g	FeSO ₄	0,1 %
KH ₂ PO ₄	4 g	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,1 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 %
Extrait de levure	1 g	H ₃ BO ₃	0,001 %
Eau distillée qsq	100 mL	MnSO ₄ H ₂ O	0,001 %
		ZnSO ₄ H ₂ O	0,007 %
● Solution de pectine (DM 72 %) :		CUSO ₄ 5H ₂ O	0,005 %
Pectine de citron	5 g	MoO ₃	0,001 %
Eau distillée qsq	100 mL	Eau distillée qsq	250 mL
Gélose blanche :			
Gélose	15 g		
Eau distillée qsq	500 mL		

La pectine de citron est diluée dans 100 ml d'eau distillée pendant 12 h à 4 °C puis elle est ajoutée au milieu de base en tenant compte de la concentration des produits et de la quantité finale d'eau distillée qui constituent ce milieu. La Solution minérale est composée de 1 mL de chaque élément et le tout est complété par 250 mL d'eau distillée. Lorsque le milieu est utilisé sous forme liquide, il est complété tout simplement avec de l'eau distillée.

Le milieu utilisé à l'état solide est complété avec la solution de gélose blanche à 1,5 %. Lorsque le milieu est semi solide, la solution de gélose blanche ajoutée est égale à 0,5 %.

Le mélange des solutions est réalisé à la température de 45 °C. Le milieu synthétique final est stérilisé à 121 °C durant 15 min puis ajusté à pH 5.

2. Composition des milieux de cultures utilisés pour l'identification des souches

(GUIRAUD, 1998)

- Bouillon nutritif utilisé pour le test de la thermorésistance des *Bacillus* :

Peptone	10 g	Sulfate de manganèse	0,04 g
Extrait de viande	5 g	Eau distillée	qsq 1000 mL

pH 7,2

Le milieu est réparti dans des tubes à essais et stérilisé à 120 °C durant 20 min.

- Milieu de Hugh et Leifson utilisé pour l'épreuve d'oxydation-fermentation chez *Staphylococcus* et *Micrococcus* :

Peptone tryptique	2 g	Bleu de bromothymol	0,03 g
Chlorure de sodium	5 g	Gélose	2,5 g
Phosphate dipotassique	0,3 g	Eau distillée	qsq 1000 mL

pH 7,1

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C durant 15 min. Avant son emploi, 1 mL d'une solution stérile à 10 % de glucose est ajouté dans chaque tube.

- Milieu mannitol mobilité met en évidence la dégradation du mannitol chez les sous groupes des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* :

Peptone	20 g	Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1 g	Gélose	4 g
Mannitol	2 g		

pH 8,1

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C durant 15 min.

- Bouillon de culture utilisé pour mettre en évidence les bactéries acétiques :

Extrait de levure	10 g	Carbonate de calcium	20 g
Glucose	100 g	Eau distillée	qsq 1000 mL

Le milieu est réparti dans des tubes à essais et stérilisé à 120 °C pendant 15 min.

- Milieu King A pour caractériser les *Pseudomonas* :

Peptone	20 g	Chlorure de magnésium	1,4 g
Glycérol	10 mL	Gélose	15 g
Sulfate de potassium	10 g	Eau distillée	qsq 1000 mL

pH 7,2

Le pH du milieu est ajusté avec de la potasse à 10 %. Il est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C pendant 20 min et solidifiés en position inclinée.

- Gélose dextrose sorbitol mannitol (DSM) utilisé pour différencier les *Acetobacter* et les *Gluconobacter* :

Peptone	10 g	Glucose	1 g
Extrait de levure	3 g	Sorbitol	1 g
Lactate de calcium	1 g	Mannitol	1 g
Phosphate monopotassique	1 g	Désoxycholate de sodium	0,1 g
Sulfate de magnésium	0,02 g	Pourpre de bromocrésol	0,03 g
Cycloheximide	0,004 g	Gélose	15 g
		Eau distillée	qsq 1000 mL

Le milieu est autoclavé durant 15 mn à 120 °C puis acidifier à pH 4,3 par 1,5 ml d'acide chlorhydrique (10 %).

- Bouillon à l'extrait de levure et de glucose (YG = YEG) utilisé pour la croissance des levures :

Extrait de levure	5 g
Glucose	5 g
Eau distillée	qsq 1000 mL

Le milieu est réparti dans des tubes à essai et stérilisé à 120°C pendant 15 minutes.

3. Les colorants utilisés pour observer les moisissures au microscope (BOTTON *et al.*, 1985)

- Solution au lactophénol utilisé pour observer la morphologie :

Phénol pur cristallisé	100 g	Glycérol	100 mL
Acide lactique	100 mL	Eau distillée	qsq 100 mL

Le phénol est dissout dans l'eau à froid avant d'ajouter l'acide lactique et le glycérol.

ANNEXE IV. Les solutions utilisées pour la réaction colorimétrique permettant le dosage de l'activité PG

- La solution A :

Na ₂ SO ₄ anhydre	200 g	NaHCO ₃ anhydre	20 g
Na ₂ CO ₃ anhydre	25 g	Eau déionisée qsp	1000 mL
Tartrate double Na-K	25 g		

Les produits sont versés en pluie sur 800 mL d'eau déionisée chaude et ajusté à un litre. La solution est filtrée puis conservé entre 30 et 35 °C pour éviter sa recristallisation.

- La solution B :

CuSO ₄ 5 H ₂ O	30 g
H ₂ SO ₄ concentré	4 gouttes
Eau déionisée qsp	200 mL

La solution C : Cette solution est préparée avec 25 mL de la solution A et 1 mL de la solution B. La quantité préparée dépend du nombre d'échantillon à traiter et elle doit être utilisée juste au moment du dosage.

- La solution D :

(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O (dissous dans 800 mL H ₂ O)	50 g
H ₂ SO ₄ (concentré et versé rapidement)	42 mL
Na ₂ H As O ₄ , 7 H ₂ O (dissous dans un peu d'eau)	6 g
Eau déionisée qsp	1000 mL

Les éléments suivants doivent être ajoutés dans l'ordre Le tout est complété par un litre d'eau distillée.

La solution D est transvasée dans une bouteille opaque puis chauffer durant 3 h à 55 °C (ou 24 h à 37 °C).

ANNEXE V.

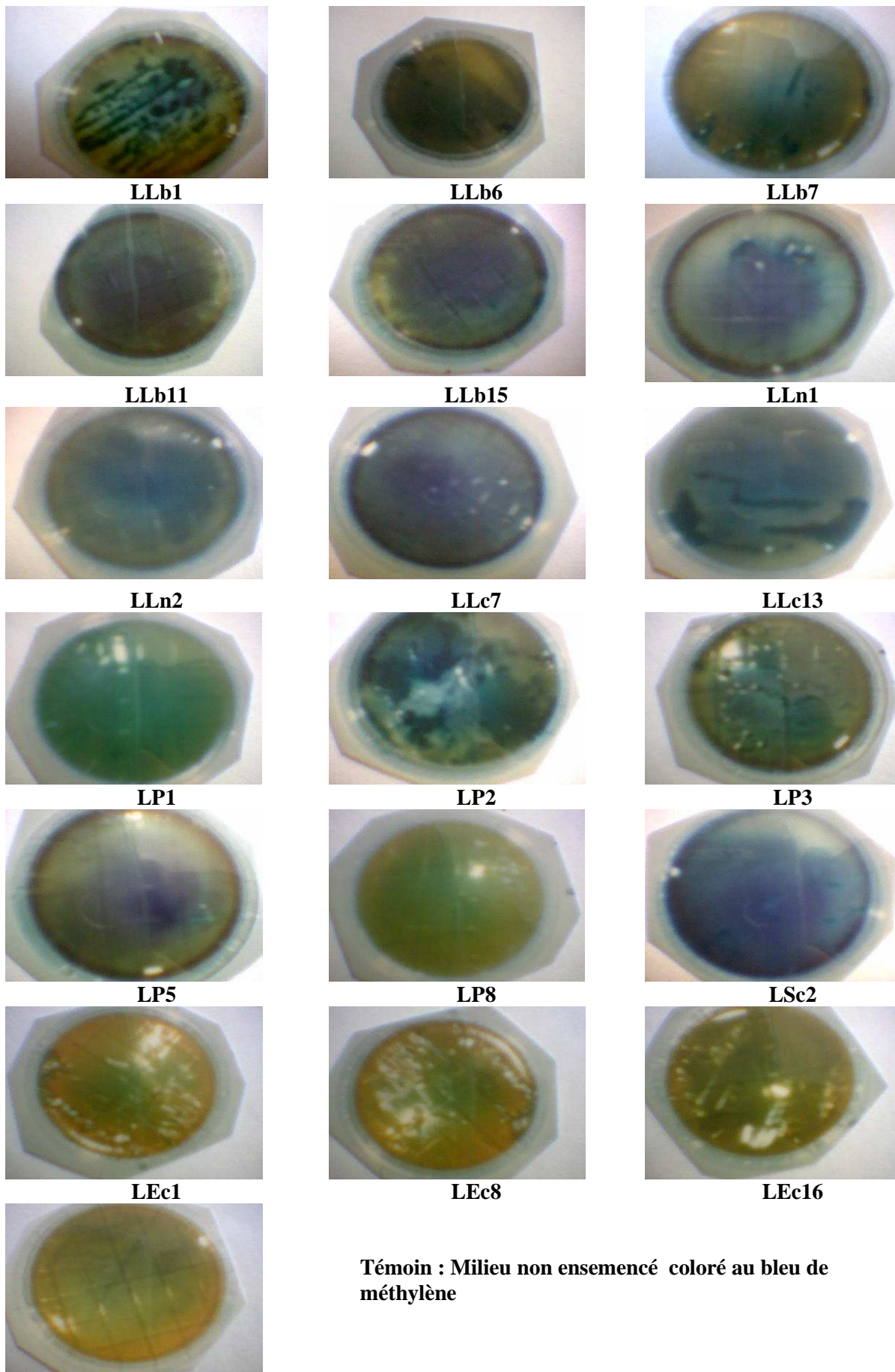
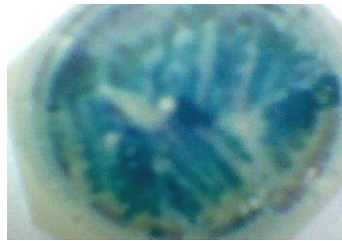


Figure 20. Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène des bactéries lactiques isolées des échantillons de lait cru.

ANNEXE V.



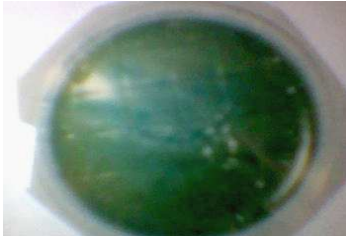
ONB3



ONB5



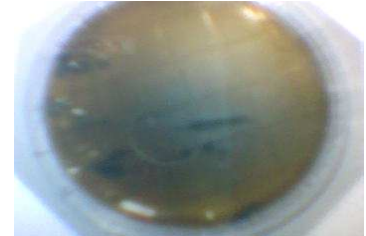
ONB6



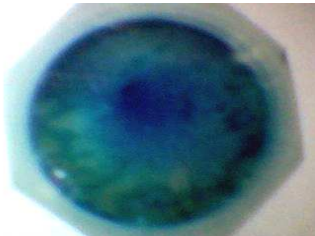
ONB7



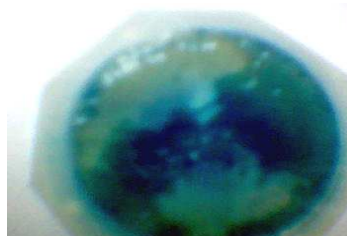
ONB8



ONB11



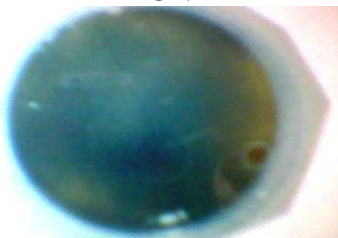
ONB12



ONB13



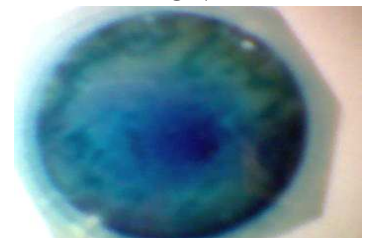
ONLn1



ONRh9



ONCr10



ONAs14



Témoin : Milieu nonensemencé et coloré
au bleu de méthylène

Figure 21. Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène des souches isolées des échantillons d'olives noires.

ANNEXE V.

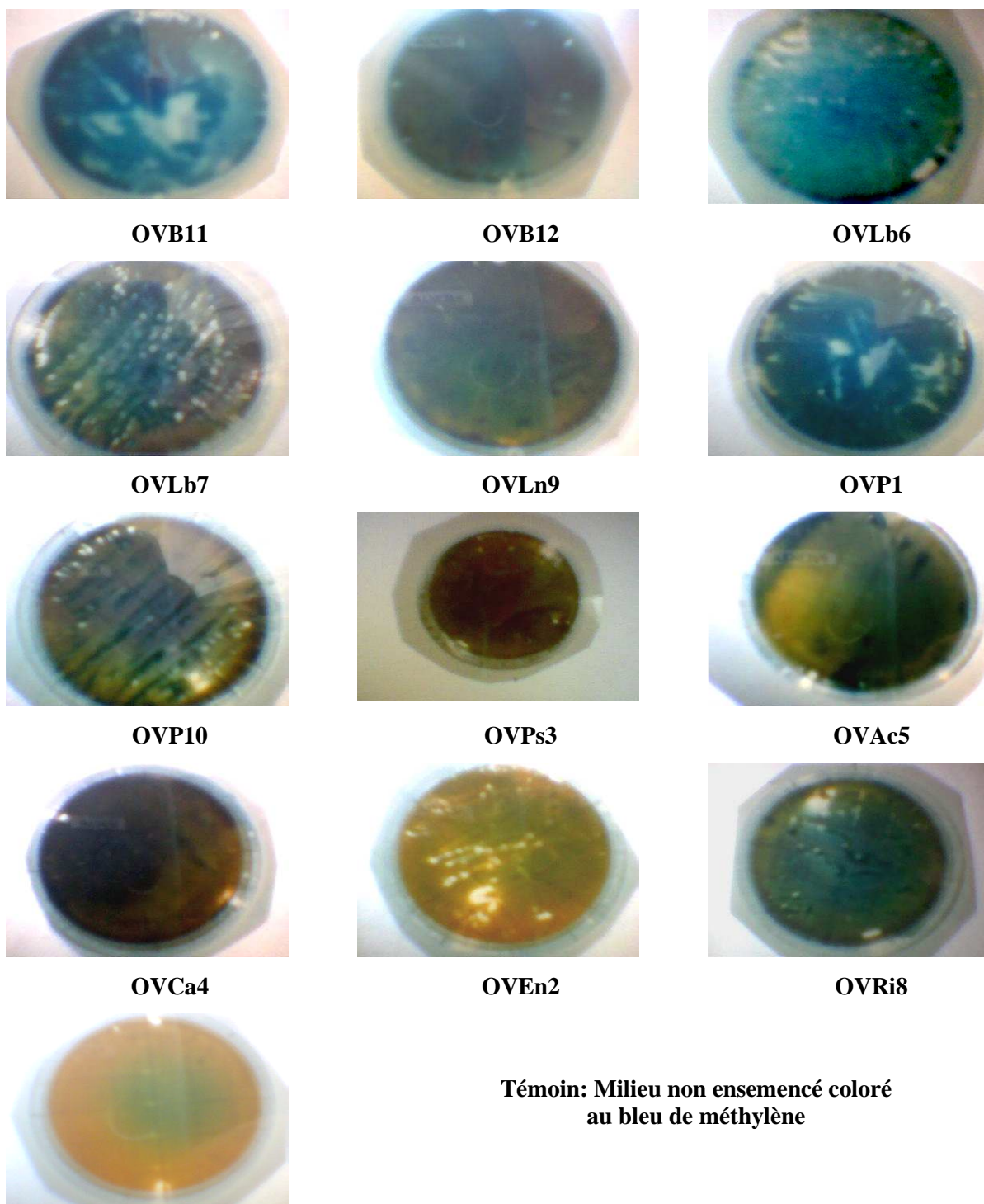


Figure 22. Activité pectinolytique révélée au bleu de méthylène des souches isolées des échantillons d'olives vertes.

RESUME

Soixante six souches sont isolées à partir de 18 échantillons de lait de vache appartenant à six stations d'élevage de la région de Constantine. Leur identification nous a permis d'obtenir les espèces suivantes : *Sc. thermophilus*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, *Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Ec. faecium*, *Ec. faecalis*, *Ec. durans*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. parvulus*, *Pc. urinae equi*, *Pc. acidilactici*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii/ delbrueckii*, *Lb. brevis* et *Lb. acidophilus*. Vingt quatre souches sont isolées des échantillons d'olives noires et vertes. Le milieu de culture MP5 (à 0,5 % de pectine) utilisé a permis d'obtenir une flore très variée et capable de dégrader le substrat pectine. Les souches obtenues appartiennent aux genres : *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Endomyces*, *Rhizopus* et *Aspergillus niger*.

Les différents tests de mise en évidence de l'activité pectinolytique réalisés sur les quarante deux souches ont permis de distinguer huit souches appartenant aux genres *Bacillus* (ONB13), *Lactobacillus* (LLb6), *Leuconostoc* (LLn1 et OVLn9), *Streptococcus* (LSc2), *Pediococcus* (LP5), *Rhodotorula* (ONRh9) et *Aspergillus* (ONAs14). Elles ont montré des potentiels les plus élevés de dégradation de la pectine et leur polygalacturonase est la plus active.

Les cinétiques de productions de PG et de biomasse réalisées sur le milieu MP5 par les huit souches ont permis d'obtenir deux souches, ONRh9 (*Rhodotorula*) et LLn1 (*Leuconostoc*) avec des activités polygalacturonases les plus élevées. Deux paramètres qui caractérisent la production de polygalacturonase sont étudiés sur le milieu MAPG5 contenant comme seul substrat carboné de l'acide polygalacturonique. Ils montrent que les deux souches ont une activité PG pour des pH équivalents et moins acides. Par contre les concentrations en APG utilisées sont très différentes. L'optimisation de la production de l'enzyme, en fermenteur avec les paramètres établis, indique que le contrôle du pH permet aux deux souches de produire une quantité d'enzyme PG plus importante.

L'observation microscopique à fluorescence des cellules de la souche ONRh9 présente la même morphologie dans les deux milieux de cultures utilisés. Elles sont aussi nombreuses dans le milieu Saboureaud que dans le milieu MAPG5. Les cellules de la souche LLn1 cultivées dans le milieu MAPG5 apparaissent isolées pour la plupart et moins fluorescentes. Alors que, l'observation microscopique de la même souche cultivée dans le milieu de Mayeux, révèle des cellules plus abondantes et plus fluorescentes.

Mots-clés : Lait cru – Olives noires et vertes – Bactéries lactiques – Microorganismes pectinolytiques – Isolement – Identification - Pectine – Acide polygalacturonique -Polygalacturonase.

SUMMARY

Sixty six strains are isolated starting from 18 samples from cow's raw milk in six breeding stations at Constantine. Their identification enabled us to obtain the following species: *Sc. thermophilus*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, *Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Ec. faecium*, *Ec. faecalis*, *Ec. durans*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. parvulus*, *Pc. urinae equi*, *Pc. acidilactici*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii / delbrueckii*, *Lb. brevis* and *Lb. acidophilus*. Twenty four strains are isolated from the black and green olive samples. The culture medium MP5 (to 0,5 % of pectin) used made it possible to obtain a species very varied and able to degrade the substrate pectin. The strains obtained belong to the kinds: *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Endomyces*, *Rhizopus* and *Aspergillus Niger*.

The various tests of the pectinolytic activity realized on the forty two strains made it possible to distinguished eight strains belonging to the kinds *Bacillus* (ONB13), *Lactobacillus* (LLb6), *Leuconostoc* (LLn1 and OVLn9), *Streptococcus* (LSc2), *Pediococcus* (LP5), *Rhodotorula* (ONRh9) and *Aspergillus* (ONAs14). They showed the highest potentials of degradation of pectin and polygalacturonase is most active for them.

The kinetics of productions of PG and biomass carried in the MP5 medium by the eight strains made it possible to obtain two strains, ONRh9 (*Rhodotorula*) and LLn1 (*Leuconostoc*) with polygalacturonases activities the high ones. Two parameters which characterize the production of polygalacturonase are studied in the MAPG5 medium. They show that the two strains have an activity PG for equivalent pH and fewer acids. On the other hand the concentrations in APG used are very different. The optimization of the production of the enzyme in the fermentor with the established parameters, indicates that the control of the pH makes it possible the two strains to produce a quantity of more important enzyme PG.

The cells of the two strains observed under the microscope with fluorescence present at the ONRh9 strain, same morphology and are numerous in the two culture media used Saboureaud and MAPG5. While at the LLn1 strain, the cells cultivated in medium MAPG5 smaller, are isolated for the majority and less fluorescent and in the medium of Mayeux, they are more numerous and more fluorescent.

Key words: Raw milk- Black and green olives – Lactic acid bacteria - Microorganism's pectinolytic - Isolation - Identification - Pectin -Polygalacturonase.

ملخص

سنة و سنتين سلا له تم عزلها إنطلاقا من 18 عينة حليب أبقار تنتمي إلى ستة محطات لتربيتهم تعريفهم سمح لنا
بالحصول على الأجناس التالية: *Sc. thermophilus*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, *lc*.

Lc. lactis subsp. cremoris, *Ec. faecium*, *Ec. faecalis*, *Ec. durans*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. parvulus*,
L.c. lactis subsp. lactis, *Pc. urinae equi* *Pc. acidilactici*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. plantarum*, *Lb.*
delbruecki/delbruecki, *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus*

أربعة و عشرون سلا لة تم عزلها إنطلاقا من عينات زيتون أخضر و زيتون أسود وسط التربة (MP5) (0.5%
بكتين) المستعمل مكننا من الحصول على أجناس متنوعة جدا و قادرة على تحليل مادة البكتين. السلالات المتحصل عليها
تنتمي إلى الأنواع *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*,
Candida, *Endomyces*, *Rhizopus*, *Aspergillus niger*.

الاختيارات المطبقة لإظهار نشاط إنزيمات البكتين و المنجزة على 42 سلا لة سمح بتمييز 8 سلالات تنتمي للنوع *Bacillus*
(ONB13), *Lactobacillus* (LLb6), *Leuconostoc* (LLn1 et OVLn9), *Streptococcus* (LSc2),
Aspergillus (ONAs14) و *Pediococcus*(LP5) (LP5), *Rhodotorula* (ONRh9)
أعلى الإمكانيات لتحليل البكتين بصفة عامة و بصفة خاصة إضهار نشاط إنزيم البوليكالاكتورونز. المنحنيات البيانية لإنتاج
إنزيم PG و الخلايا المنجزة في الوسط MP5 من طرف 8 سلالات سمح لنا بالحصول على سلالتين ONRh9
(*Rhodotorula*) و (LLn1 (*Leuconostoc*)) لهم أكثر نشاط إنزيم PG. من هنا تم وضع هذين السلا لتين في وسط إختبار
آخرهم MAPG5 من أجل دراسة تركيز مادة APG و لا pH. نتائج هذا الإختبار أثبت أن السلا لتين تنتجان إنزيم في وسط له
نفس الـ pH و أقل حموضة مع التركيز مختلف. تقدير إنتاج الأنزيم من طرف السلا لتين داخل جهاز التخمر في وسط له نفس
الـ pH و التركيز الذي أعطى أكثر نشاط للإنزيم أشار إلى أن استخدام طريقة الـ pH المراقب يسمح لهذين السلا لتين بالإنتاج
كمية معتبرة من إنزيم PG.

رؤية خلايا السللت لتين تحت مجهر خاص (microscope à fluorescence) يبين اننا أن السلالة ONRh9 لها نفس التكوين
المورفولوجي في الوسطين المتستعملين (Saboureaud et MAPG5) أما الخلايا الخاصة با لسلالة LLn1 التي أنتجت في
الوسط MAPG5 فكان حجمها أصغر و أقل لمعانا. و التي أنتجت في الوسط Mayeux فكان عددها أكبر و أكثر لمعانا.

الكلمات الدالة: حليب غير طازج- زيتون أسود و أخضر- بكتيريا لبنية - سلالات محللة لمادة البكتين - العزل - تمييز - مادة
البكتية - حمض البوليقاركتيروليك - أنزيم البوليقركتيروناز -