

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

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES
AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires

Option : biotechnologie et génie des industries alimentaires

Thème

Isolement de souches bactériennes potentiellement productrices de lipases alcalines, à partir du beurre cru et du beurre fermenté « *Dhan* »

Présenté par : M^{lle} BELHOULA Nora

Mémoire soutenue publiquement le : 09/03/2017

Devant le jury composé de :

Présidente :	Pr. KHARROUB Karima	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.1
Rapporteur :	Pr. BEKHOUCHE Farida	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.1
Examinatrices :	Dr. AMOURACHE Leila	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.1
	Dr. BECILA - HIOUAL Samira	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.1

Année universitaire 2016-2017



Remerciements

Je tiens à remercier Allah, le Tout Puissant et le Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ma formation de magister.

Je tiens avant tout à remercier le Professeur BEKHOUCHE Farida qui m'a honorée en acceptant de diriger ce travail et pour son encadrement méthodique. Je lui adresse également ma gratitude pour son aide précieuse, ses conseils fructueux, son soutien continu et ses encouragements permanents. Merci de m'avoir guidée avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit.

J'exprime mes remerciements aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations :

Mes sincères remerciements au Professeur KHARROUB K., qui a bien voulu accepter de présider ce jury.

Je tiens à exprimer ma très grande considération au Docteur AMOURACHE L. et au Docteur BECILA-HIOUAL S., qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce mémoire de magister et de me faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui nous ont fourni en smen et en beurre et ne nous ont pas privé d'informations.

Je remercie très vivement tous les membres de l'unité SARL HODNA Lait (M'sila) et particulièrement monsieur LATRECHE Bilal qui nous a permis d'effectuer les analyses physicochimiques au niveau de l'entreprise.

Mon remerciement particulier au docteur GAGAOUA M., pour son aide scientifique.

J'exprime mes vifs remerciements également à tous les membres du laboratoire BIOQUAL Ainsi toute l'équipe VAliTraF pour leur présence et leur aide et spécialement mademoiselle GHANNAI Oulaya. Je suis particulièrement sensible à la confiance qu'ils m'ont témoignée.

Mes remerciements vont à tout le personnel des laboratoires pédagogiques de l'INATAA.

Sans oublier de remercier tous les enseignants de l'INATAA qui ont contribué à notre formation durant notre parcours universitaire.

Enfin, Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.





Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail, Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de docteur TRAD KHOUDJA D.

Aux membres de ma famille qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenue durant ces longues années d'études, pour tous les sacrifices qui ont faits et l'amour qu'ils m'ont apporté.

A tous mes amis, vous êtes si nombreux que je ne peux citer tout le monde. Vous ne m'avez jamais laissé tomber, votre soutien je ne l'oublierai jamais : Ghislain, Amira, Asma, Siham, Meriem, Imen (bolba), Imen, Amal, Wissem, Rania et Zina.

A mon fiancé Sabir qui m'a toujours soutenu et m'a prêté main-forte dans les moments difficiles.

A ma promotion de magister 2014 : Biya, Houria, Ibtissem, Wissem et Ghania (vivent les filles ☺)

Nora BELHOULA

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des annexes

INTRODUCTION 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... 3-30

Chapitre 01 : beurre cru et *smen*

1. Beurre 3

1.1. Définition..... 3

1.2. Composition nutritionnelle..... 3

1.3. Propriétés..... 5

1.3.1. Microstructure..... 5

1.3.2. Consistance 7

2. Beurre cru 7

2.1. Procédé de préparation du beurre cru 7

3. *Smen* ou *Dhan*..... 10

3.1. Définition..... 10

3.2. Composition et valeur nutritionnelle..... 10

3.3. Procédés de préparation..... 11

3.3.1. Salage sans cuisson 12

3.3.2. Salage et cuisson 12

3.4. Consommation du *smen* dans le monde 13

Chapitre 02 : flore microbienne du beurre cru et du *smen*

1. Flore microbienne du beurre cru 15

1.1. Flore originelle 15

1.2. Flore contaminante 15

1.2.1. Flore bactérienne pathogène 16

1.2.2. Flore microbienne d'altération..... 16

2. Flore microbienne du *smen* 19

2.1. Flore originelle 19

2.2. Flore contaminante 19

2.2.1. Flore microbienne pathogène.....	19
2.2.2. Flore microbienne d'altération.....	20

Chapitre 03 : lipases microbiennes

1. Définition.....	21
2. Microorganismes producteurs de lipases.....	22
3. Caractéristiques structurales des lipases	24
4. Types de réactions catalysées par les lipases.....	25
5. Mécanisme d'action.....	26
6. Mécanisme catalytique	27
7. Détermination de l'activité lipolytique microbienne.....	28
8. Application des lipases microbiennes	29
8.1. Industries Alimentaires.....	29

MATERIEL ET METHODES31-47

1. Lieu de travail.....	31
2. Démarche expérimentale globale	31
3. Matériel biologique : beurre cru et <i>smen</i>	33
3.1. Origine.....	33
3.2. Prélèvement et présentation des échantillons.....	33
3.3. Méthode de recueil des données sur les échantillons.....	35
4. Analyses physicochimiques.....	36
4.1. Mesure du pH	36
4.2. Mesure du taux de la matière grasse, de l'humidité, de l'extrait sec total et dégraissé	36
5. Recherche de bactéries productrices de lipases.....	37
5.1. Préparation des échantillons.....	37
5.2. Milieux utilisés et mise en culture.....	37
5.3. Dénombrement des souches	38
5.4. Isolement des souches lipolytiques	39
5.5. Conservation des isolats lipolytiques	39
5.6. Screening des isolats potentiellement lipolytiques.....	40
5.7. Caractérisation des isolats lipolytiques	40
5.7.1. Étude morphologique et culturale.....	40
5.7.2. Test de mannitol-mobilité.....	41

5.7.3. Test de la catalase	41
5.7.4. Test de sporulation	41
6. Production de lipases	41
6.1. Milieux de culture	43
6.2. Culture en milieu liquide des isolats producteurs de lipases.....	43
6.2.1. Préparation d'inoculum.....	43
6.2.2. Mise en culture	44
6.3. Préparation de l'enzyme lipase à partir de bouillon de la culture	44
6.4. Dosage de l'activité lipasique par titration.....	44
6.5. Détermination de l'activité spécifique de l'extrait brute.....	45
7. Étude statistique.....	46
RESULTATS ET DISCUSSION.....	48-73
1. Résultats	48
1.1. Collecte des données sur les échantillons.....	48
1.1.1. Identification d'interviewers	48
1.1.2. Matière première : lait.....	48
1.1.3. Préparation du beurre cru et du <i>smen</i>	48
1.2. Analyses physicochimiques	51
1.3. Recherche de bactéries productrices de lipases	51
1.3.1. Dénombrement de la flore totale et la flore lipolytique	51
1.3.2. Isolement de souches lipolytiques	53
1.3.3. Screening des isolats potentiellement lipolytiques	53
1.3.4. Caractéristiques des isolats lipolytiques	56
1.3.4.1. Examen macroscopique et microscopique	56
1.3.4.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats lipolytiques	60
1.4. Dosage d'activité lipasique	60
1.5. Détermination de l'activité spécifique de l'extrait brute.....	65
2. Discussion.....	67
Conclusion et perspectives	74
Références bibliographiques.....	76
Annexes	
Résumés	

Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique des étapes de la production du beurre (Fox <i>et al.</i> , 2015).....	5
Figure 2 : microstructure du beurre à température ambiante (Walstra <i>et al.</i> , 2005)	6
Figure 3 : étapes de fabrication du beurre cru algérien (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Lahsaoui, 2009 ; Bendimerad, 2013).....	9
Figure 4 : types de barattes traditionnelles	9
Figure 5 : beurre cru et babeurre (Makhloufi, 2013).....	10
Figure 6 : différentes étapes de préparation du <i>smen</i>	14
Figure 7 : image simplifiée du repliement 3D des lipases (Jaeger <i>et al.</i> , 1999).....	25
Figure 8 : réactions catalysées par les lipases (Casas-Godoy <i>et al.</i> , 2012)	26
Figure 9 : mécanisme d'action catalytique (transesterification) des lipases (Jegannathan <i>et al.</i> , 2008).....	27
Figure 10 : protocole expérimental global de notre étude	32
Figure 11 : localisation des régions de prélèvement (Djazaïrouna l'Atlas pratique de l'Algérie, 2004)	34
Figure 12 : différents échantillons collectés (<i>smen</i> et beurre cru).....	35
Figure 13 : Schéma globale du protocole de culture et de dosage enzymatique de chaque souche	42
Figure 14 : courbe d'étalonnage des protéines du dosage des protéines par la méthode Bradford pour la détermination l'activité spécifique.....	46
Figure 15 : diagramme du procédé de préparation de nos échantillons du beurre cru et du <i>smen</i>	50
Figure 16 : développement des souches lipolytiques sur des boîtes de Pétries contenant les milieux GN _{TH} (A) et le GN _{JO} (B) de l'échantillon de beurre cru.....	52
Figure 17 : hauteurs de lyse selon la méthode de Tansey (1971).....	54
Figure 18 : répartition des isolats selon la hauteur de lyse sur le milieu GN _{TH} solide.....	54
Figure 19 : répartition des souches isolées selon la forme des cellules (%).....	56
Figure 20 : aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats après 7 jours de culture	59
Figure 21 : dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des 49 souches sur la base de leur activité lipolytique (Lip) indépendamment des 3 milieux de cultures utilisés (BN _T , BN _H et BN _{HT}).....	62

Figure 22 : bi-plot de l'analyse en composante principale discriminant les 4 groupes issus des 49 souches étudiées après une analyse CAH.....	63
Figure 23 : hiérarchisation des 4 groupes (rouge pour <i>Lip</i> +++ , rose pour <i>Lip</i> ++ , vert pour <i>Lip</i> + et bleu pour <i>Lip</i> +/-) obtenus sur la base de leur activité lipolytique en fonction du milieu de culture	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : teneur en éléments nutritifs de 100 g du beurre (Chandan et Kilara, 2010)	4
Tableau 2 : éléments structuraux du beurre (Walstra <i>et al.</i> , 2005)	6
Tableau 3 : caractéristiques physicochimiques du <i>smen</i> (Tantaoui-Elaraki & El Marrakchi, 1987 ; Bendimerad, 2013)	11
Tableau 4 : <i>smen</i> consommés dans différentes régions du monde.....	13
Tableau 5 : altérations les plus rencontrés dans le beurre (Budhkar <i>et al.</i> , 2014).....	17
Tableau 6 : exemples de micro-organismes producteurs de la lipase cités par Treichel <i>et al.</i> (2010) et Messias <i>et al.</i> (2011)	22
Tableau 7 : présentation des échantillons du beurre cru et du <i>smen</i>	33
Tableau 8 : milieux utilisés pour l'isolement des souches lipolytiques	38
Tableau 9 : abréviations utilisées	39
Tableau 10 : solutions utilisées pour la réaction colorimétrique permettant le dosage de l'activité lipasique.....	45
Tableau 11 : résultats des analyses physicochimiques du beurre cru et du <i>smen</i>	51
Tableau 12 : effectif de la flore lipolytique par rapport à la flore totale dans les échantillons exprimé en Log (UFC/g).....	52
Tableau 13 : répartition de l'effectif des isolats lipolytiques obtenus selon leurs milieux d'isolement et leurs origines.....	53
Tableau 14 : mesure de la hauteur de lyse (mm) sur milieu GN _{TH} à 37°C après différents temps d'incubation des 49 isolats sélectionnés	55
Tableau 15 : examen macroscopique et microscopique des isolats de forme coque	57
Tableau 16 : examen macroscopique et microscopique des isolats de forme Bâtonnet	57
Tableau 17 : examen macroscopique et microscopique des isolats de forme filamenteuse ...	58
Tableau 18 : caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats lipolytiques.....	60
Tableau 19 : activités des lipases extracellulaires en U/mL des isolats sur les trois milieux liquides incubés à 37°C	61
Tableau 20 : comparaison des activités lipolytiques des 4 groupes obtenus par CAH et par milieu de culture aussi en utilisant une analyse de variance au seuil de signification de 5% ..	65
Tableau 21 : activités spécifique des lipases extracellulaires des isolats cultivés sur les trois milieux liquides incubés à 37°C exprimées en U/mg de protéines	66

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ANOVA	Analyse de la variance
BN	Bouillon Nutritif
BSA	Sérum Albumine Bovine
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
DO	Densité Optique
D	Dimension
EB	Echantillon du Beurre cru
ES	Echantillon du <i>Smen</i>
ESD	Extrait Sec Dégraissé
EST	Extrait Sec Total
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
h	heure
H	Addition de l'Huile d'olive au milieu de culture
H₂O₂	Peroxyde d'Hydrogène
j	jour
JO	Addition de Jaune d'Œuf au milieu de culture
JORA	Journal Officiel de la République Algérienne
KDa	Kilo Dalton
MG	Matière Grasse
min	minutes
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pH	potentiel d'hydrogène
rpm	round par minute
SARL	Société À Responsabilité Limitée
SG	Souche isolée sur milieu Gélose nutritive additionné de l'huile et de Tween 80
SS	Souche isolée sur milieu Sabouraud dextrose additionné de l'huile d'olive
T	Addition de Tween 80 au milieu de culture
TH	Addition de l'Huile d'olive plus le Tween 80 au milieu de culture
U	Unité enzymatique
UFC	Unité Formatrice de Colonies
UV	Ultraviolet

Liste des annexes

Annexe 1 : questionnaire

Annexe 2 : milieux de culture et solutions

Annexe 3 : matériels et appareillages

Annexe 4 : aspect macroscopique et microscopique des isolats après 7 jours de culture

Annexe 5 : protocoles

Annexe 6 : fiche technique de Food Scan

Annexe 7 : résultats en chiffres de l'évaluation des hauteurs de lyse des isolats faiblement lipolytiques, de mesure de pH à la fin des cultures et de dosage des protéines

Annexe 8 : valorisation scientifique

Introduction

Le beurre a été utilisé non seulement comme aliment, mais aussi à usage cosmétique, médical et pour les cérémonies religieuses (Buldo et Wiking, 2016). En Algérie, le beurre cru (*Zebda*) et le *smen* (*Dhan*) ont été la fierté de la tradition culinaire depuis des siècles (Idoui *et al.*, 2010). Leur préparation est faite selon un savoir faire spécifique à la région et transmis d'une génération à une autre, ces deux produits possèdent une qualité microbiologique composée d'une flore indigène locale qui reflète les conditions climatiques de la région (Bensalah *et al.*, 2011). Pendant leur conservation, la qualité organoleptique et nutritionnelle se modifient. Ces modifications sont caractérisées par un développement d'odeur et de goût provoquées principalement par des microorganismes dotés d'activités lipolytiques (Idoui *et al.*, 2013 ; Bereda *et al.*, 2014).

Un grand nombre de microorganismes produisent des lipases extracellulaires et en particulier les bactéries. Les lipases appartiennent à la superfamille des hydrolases à repliement α/β et sont présentes dans l'ensemble du monde vivant. L'intérêt porté sur la recherche des lipases microbiennes est justifié par leurs importances dans différents applications industrielles (Christokopoulos *et al.*, 1992 ; Rapp et Backhaus, 1992). Les enzymes lipolytiques constituent un groupe d'enzymes qui catalysent la dégradation des lipides et de façon plus générale l'hydrolyse des esters d'acides gras. De par leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques, elles représentent aujourd'hui l'un des enjeux majeurs des biotechnologies. En effet, de nombreux produits font appel à ces enzymes dans leur processus de fabrication. Elles interviennent pour la production d'aliments, de médicaments ou encore de papier. Elles ont également pris une place importante dans des applications domestiques. Elles sont souvent plus Economiques et génèrent moins de déchets que les transformations chimiques (Kerviel, 2014).

Parallèlement à la diversification de leurs applications, les lipases microbiennes ont été particulièrement étudiées en raison de la facilité d'obtention comparée à ceux provenant de sources animales ou végétales, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques (Messias *et al.*, 2011), de l'efficacité, de la pureté et d'une large gamme de spécificité du substrat (Treichel *et al.*, 2010). De plus, l'intérêt accru des enzymes lipolytiques oriente la recherche vers la découverte de souches lipolytiques et d'enzymes plus performantes et plus spécifiques que celles actuellement connues (Kerviel, 2014).

Nous avons choisi le *smen* et le beurre cru comme source pour isoler les souches lipolytiques, le choix de ces produits est basé sur leurs richesses en matière grasse et leurs

Introduction

particularités, cette étude s'inscrit dans une continuité de travaux déjà réalisés antérieurement en Algérie et qui ont ciblé la production des lipases par les bactéries lactiques isolées du beurre cru (Guessas *et al.*, 2012 ; Idoui *et al.*, 2013 ; Guetouache *et al.*, 2014 ; Latreche, 2016).

L'objectif de notre travail est la recherche et l'isolement de souches bactériennes autochtones productrices de lipases à partir de deux échantillons : le beurre cru et le beurre fermenté *Dhan (smen)*, et l'évaluation du potentiel de leurs activités lipolytiques.

Notre manuscrit est structuré en trois parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour d'un premier chapitre sur le beurre cru et le *smen* ainsi leurs procédés de fabrication. Le deuxième chapitre donne une caractérisation de la flore du beurre cru et du *smen* et le troisième chapitre est consacré pour les lipases microbiennes.

Dans la seconde partie du manuscrit, nous décrivons le matériel et les méthodes utilisées tout au long de notre travail. Elle comporte la caractérisation physicochimique du beurre cru et du *smen*, l'isolement et la caractérisation des souches bactériennes lipolytiques ainsi que l'étude et la comparaison de production de lipases par les souches bactériennes lipolytiques isolées. La dernière partie du manuscrit est consacrée aux résultats et discussion. Une conclusion complétée par des perspectives achèvera ce manuscrit.

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : beurre cru et *smen*

1. Beurre

1.1. Définition

La production du beurre est une ancienne méthode de préservation de la matière grasse du lait, qui est une partie essentielle de sa valeur nutritionnelle. Le beurre peut être fabriqué à partir du lait de différentes espèces animales, par exemple : les brebis, les chèvres, les chamelles, les bufflonnes et les vaches, mais la principale source pour la production du beurre, aujourd'hui, est le lait de vache.

Selon la commission du *Codex Alimentarius* de 2011 conformément au programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, le beurre est un produit gras dérivé exclusivement du lait, sous forme d'une émulsion du type eau dans l'huile. Une portion de 100 g du beurre doit contenir au minimum 80 g de la matière grasse, au maximum 16 g d'eau et 2 g de la matière sèche dégraissée du lait (lactose, protéines, minéraux) (Mortensen, 2011 ; Deosarkar *et al.*, 2016). Le beurre peut également contenir des solides du lait, des cultures bactériennes, du sel et un colorant alimentaire (Paul, 2010). Il n'existe aucune spécification concernant la teneur en sel et le pH du beurre dans la norme *Codex* de 2011, mais ces spécifications peuvent être trouvées dans la législation nationale (Mortensen, 2011 ; Deosarkar *et al.*, 2016).

Les principales propriétés du beurre sont : la couleur qui varie de jaune clair au jaune foncé, cette couleur est influencée par la quantité de β -carotène présente dans les fourrages des animaux par conséquent dans le lait ; la saveur caractéristique du beurre qui varie en fonction de l'alimentation de l'animal et la consistance optimale du beurre qui est lisse, légèrement ferme et plastique (Buldo et Wiking, 2016).

1.2. Composition nutritionnelle

Le beurre est considéré comme un aliment riche en nutriments essentiels comme les lipides, les minéraux, les vitamines et les acides aminés, qui sont importants pour le bon fonctionnement du corps (tableau 1). Le beurre a une teneur en acide gras saturés d'environ 51,4 % tels que l'acide palmitique et stéarique, cette teneur est le double de celle de la crème et d'autres produits laitiers (Hae-Soo *et al.*, 2013). Cependant, 15 % d'acide gras sont à chaîne courte et moyenne, particulièrement digestes et 3 à 5 % des acides gras essentiels polyinsaturés (acide linoléique et linoléique). Le beurre est la seule matière grasse qui apporte de la vitamine A en quantité notable (une ration journalière de 24 g couvre environ

30 % des besoins en vitamine A) (Romain *et al.*, 2008). On trouve en outre des phosphatides (de 0,2 à 1 %) et du carotène (de 3 à 9 ppm) (FAO, 1995).

Tableau 1 : teneur en éléments nutritifs de 100 g du beurre (Chandan et Kilara, 2010)

Nutriments	Unités	Beurre Salé	Beurre non salé
Poids	G	100	100
Humidité	%	15,87	17,94
Énergie	kcal	717	717
Énergie	kJ	2999	2999
Protéine	g	0,85	0,85
Matière grasse	g	81,11	81,11
Les acides gras saturés	g	51,368	51,368
Les acides gras mono-insaturés	g	21,021	21,021
Les acides gras polyinsaturés	g	3,043	3,043
Cholestérol	mg	215	215
Glucides	g	0,06	0,06
Fibre alimentaire	g	0	0
Calcium	mg	24	24
Fer	mg	0,02	0,02
Magnésium	mg	2	2
Phosphore	mg	24	24
Potassium	mg	24	24
Sodium	mg	576	11
Zinc	mg	0,02	0,09
Cuivre	mg	0	0,016
Manganèse	mg	0	0,004
Sélénium	µg	1,0	1,0
Vitamine C	mg	0	0
Thiamine	mg	0,005	0,005
Riboflavine	mg	0,034	0,034
Niacine	mg	0,042	0,042
Acide pantothénique	mg	0,110	0,110
Vitamine B 6	mg	0,003	0,003
Acide folique	µg	3	3
Vitamine B 12	µg	0,17	0,17
Vitamine A	µg	684	684
Vitamine D	µg	60	60
Vitamine E	µg	2,32	2,32
Vitamine K	µg	7,0	7,0
Tryptophane	g	0,012	0,012
Thréonine	g	0,038	0,038
Isoleucine	g	0,051	0,051
Leucine	g	0,083	0,083
Lysine	g	0,067	0,067
Méthionine	g	0,021	0,021
Cystéine	g	0,008	0,008
Phénylalanine	g	0,041	0,041
Tyrosine	g	0,041	0,041
Valine	g	0,057	0,057
Arginine	g	0,031	0,031
Histidine	g	0,023	0,023
Alanine	g	0,029	0,029
Acide aspartique	g	0,064	0,064
Acide glutamique	g	0,178	0,178
Glycine	g	0,018	0,018
Proline	g	0,082	0,082
Serine	g	0,046	0,046

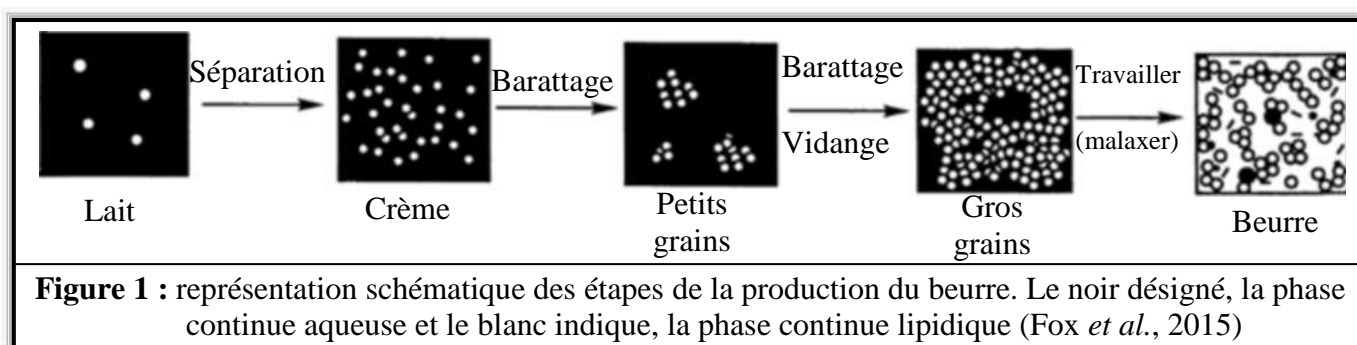
L'eau et la matière sèche forment le non gras, l'eau provient de la crème et une partie est ajoutée lors du lavage du beurre. La matière sèche est composée de lactose (de 0,1 à 0,3 %), d'acide lactique (0,15 % dans le beurre de crème acide), de matières azotées (de 0,2 à 0,8 %) dont la caséine (de 0,2 à 0,6 %), la lactalbumine (de 0,1 à 0,05 %), les protéines membranaires, les peptides et les acides aminés (traces). On trouve aussi des sels, autres que le NaCl (d'apport : 0,1 %) et des métaux lourds. La teneur en air du beurre varie de 0,5 à 10 mL pour 100 g selon le procédé de fabrication (FAO, 1995).

Le faible point de fusion du beurre le rend digeste avec un temps de séjour dans l'estomac plus faible que celui des autres matières grasses animales et une vitesse d'absorption plus grande (Romain *et al.*, 2008).

1.3. Propriétés

1.3.1. Microstructure

La fabrication du beurre nécessite une inversion de phases (figure 1), c'est-à-dire, transformation d'émulsion de globules gras dispersés dans une phase aqueuse (lait écrémé) en une émulsion de gouttelettes d'eau dans une phase continue lipidique (Romain *et al.*, 2008).



Au plan physicochimique, le beurre est constitué, principalement, de la matière grasse du lait qui existe dans le beurre sous deux formes différentes : globulaire et libre. Une partie de la matière grasse sous ces deux formes est à l'état cristallisé et un peu à l'état liquide. La dureté et la consistance du beurre dépendent donc de la proportion et de la composition de ces deux formes de matière grasse (Fox *et al.*, 2015).

Les caractéristiques physicochimiques de la matière grasse du lait varient avec la race, la période de lactation et de l'alimentation, il en résulte des fluctuations au cours de l'année. Ainsi, en été la proportion des acides gras insaturés, plus mous et plus grande qu'en hiver. Les agglutinines peuvent s'associer à la couche périphérique des globules gras individuels et favoriser leur juxtaposition sous forme de grappes de plusieurs centaines d'unités, facilitant

d'autant l'ascension de la matière grasse. De plus, certains globules ont une membrane plus ou moins enveloppante et forment ainsi différents types d'agglomérations de globules gras cela donne au globule gras un rôle prépondérant dans la fabrication du beurre (Lapointe-Vignola, 2002).

La figure 2 et le tableau 2 donnent la microstructure du beurre.

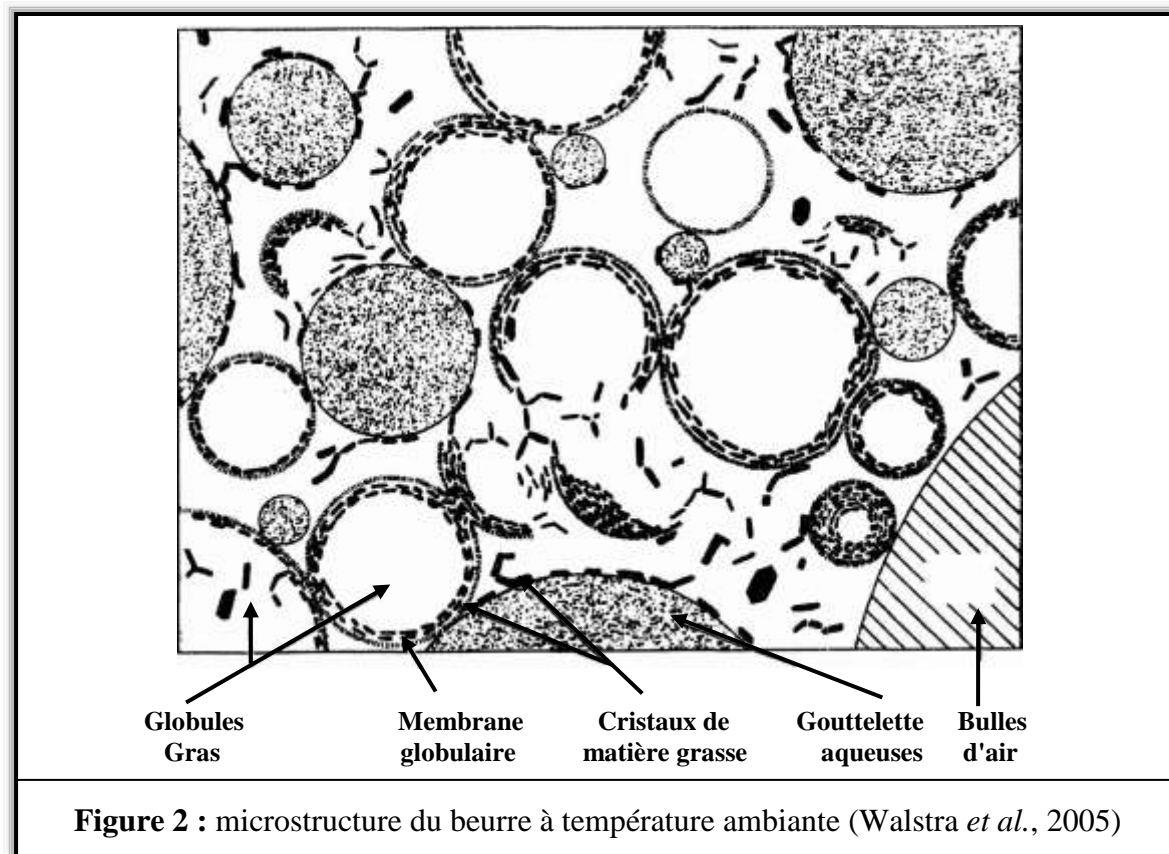


Tableau 2 : éléments structuraux du beurre (Walstra *et al.*, 2005)

Éléments	Concentration approximative (mL ⁻¹)	Pourcentage dans le beurre (% v/v)	Dimension (µm)
Globules gras ^a	10 ¹⁰	10–50 ^c	2–8
Cristaux de matière grasse ^b	10 ¹³	10–40 ^d	0,01–2
Gouttelettes d'eau	10 ¹⁰	16	1–25 ^c
Bulles d'air	10 ⁶	~2	> 20

a : avec (pour la plus grande partie) une membrane complète ; **b :** à des températures supérieures principalement à l'intérieur des globules de matière grasse ; **c :** à basse température formant des réseaux solides ; **d :** dépend étroitement du travail ; **e :** dépend étroitement de la température

1.3.2. Consistance

Le beurre est une matière plastique : il peut être déformé de façon permanente sans perdre sa cohérence et ses propriétés solides. Dans le beurre plusieurs facteurs sont importants, il doit être ferme, un dégagement de l'huile est tout à fait indésirable. Le beurre doit être facilement tartinable et fondu facilement dans la bouche sans sensation de gras ce qui implique que la graisse doit fondre complètement à 35°C. Parmi les variables qui influent sur la fermeté de beurre sont :

- L'augmentation de la température diminue la fermeté par son influence sur la teneur en matière grasse solide ;
- La composition de la matière grasse a un effet considérable sur la fermeté, elle varie selon l'origine et l'alimentation de l'animale ;
- Le malaxage provoque une diminution de la fermeté ;
- Le procédé de fabrication et les conditions de stockage (Walstra *et al.*, 2005).

2. Beurre cru

Le beurre cru est préparé à partir de lait qui n'a pas subi un traitement thermique (Idoui et Karam, 2008). Dans le passé, la fabrication du beurre était basée sur la séparation de la crème de lait par sédimentation sous la gravité, suivie d'un barattage manuel dans des barattes en bois ou dans des peaux de chèvre en Afrique (Buldo & Wiking, 2016 ; Deosarkar *et al.*, 2016). Cependant, la qualité du beurre a longtemps été médiocre par manque d'hygiène et de maîtrise technologique. Il a fallu attendre le milieu du XX^e siècle pour assister à la prise en compte de l'importance de l'hygiène (Boutonnier, 2007).

En Algérie, le beurre cru est nommé "*Zabda*" (Idoui et Karam, 2008), et il est nommé "*Zebda beldia*", "*Zebda baladi*" et "*Zebda beldi*" dans les pays Arabes (Benkerroum, 2013). Aussi, il est nommé "*Kibe*" en Éthiopie (Bereda *et al.*, 2014) et connu sous le nom "*Zibdeh baladieh*" dans d'autres pays du Moyen-Orient (Idoui *et al.*, 2010).

2.1. Procédé de préparation du beurre cru

En Algérie, les fermiers préparent du beurre en utilisant une méthode traditionnelle, les étapes de préparation sont représentées dans la figure 3.

Le lait cru est laissé coaguler spontanément à la température ambiante qui peut prendre jusqu'à 24-72 heures en fonction de la température pendant les saisons d'été et d'hiver. À la gélification, le produit est appelé « *Reyeb* » (Idoui *et al.*, 2010).

Le lait fermenté (*Reyeb*) subit un barattage et un écrémage dans une jarre en terre cuite (Sakili et Issoual, 2003) ou dans la *Chekoua* qui est une peau de chèvre ou de brebis (figure 4) où la peau de l'animal non fondue est tannée puis confectionnée sous forme de sac imperméable par nouaison des différentes ouvertures, l'ouverture de cou de l'animal constituera le col ou la bouche de la *Chekoua* (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Aissaoui *et al.*, 2006).

La baratte est remplie à moitié du *Rayeb*. Ensuite, elle est bien secouée vigoureusement durant une demi-heure. La formation des globules gras (beurre) est jugée par le changement du " son " qui se produit à l'intérieur. Pour aider l'agglomération des particules du beurre, L'eau est habituellement ajoutée (environ 10 %) à la fin de la période de barattage, chaude (40-50°C) ou froide en fonction de la température du lait (Benkerroum et Tamime, 2004).

À la fin du barattage, deux phases apparaissent. L'une est solide ce sont les grains du beurre, l'autre est liquide c'est le babeurre (figure 5) (Boutonnier, 2007). Ensuite, le beurre frais est retiré manuellement. Les globules gras apparaissant en surface sont séparés par une cuillère perforée (Benkerroum et Tamime, 2004) ou se réunissent avec les mains ou bien filtrer à l'aide d'un tissu en coton (Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987). Puis un ou deux lavages sont effectués à l'eau froide pour éliminer un excès de la matière non grasse et raffermir les grains du beurre. La phase aqueuse est éliminée à nouveau partiellement par égouttage gravitaire. Enfin, les grains du beurre sont regroupés en une masse qui est malaxée pour permettre d'homogénéiser la totalité du beurre et d'améliorer la dispersion de l'eau qui, par voie de conséquence, garantit une durée de conservation acceptable (Boutonnier, 2007).

Le beurre cru est un aliment fragile et altérable par la chaleur, ou par d'autres facteurs capables de nuire à sa qualité physicochimique, microbiologie et organoleptique. Donc, il est primordial d'assurer sa conservation à basse température ou le consommer dès sa production. Afin de mieux conserver ce produit, il est nécessaire de le transformer en produit dérivé. Ce dernier est connu chez les nomades sous le nom du « *Dhan* » et conservé traditionnellement dans un récipient à température ambiante (Makhloufi, 2013).

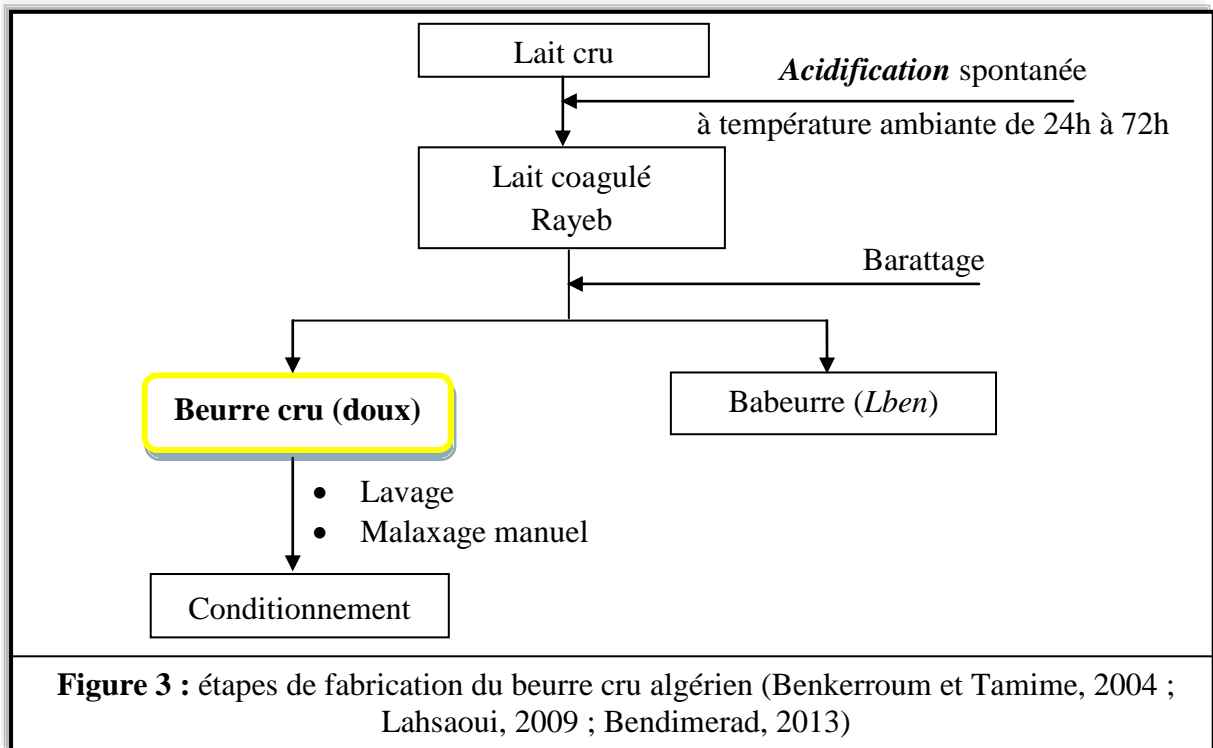
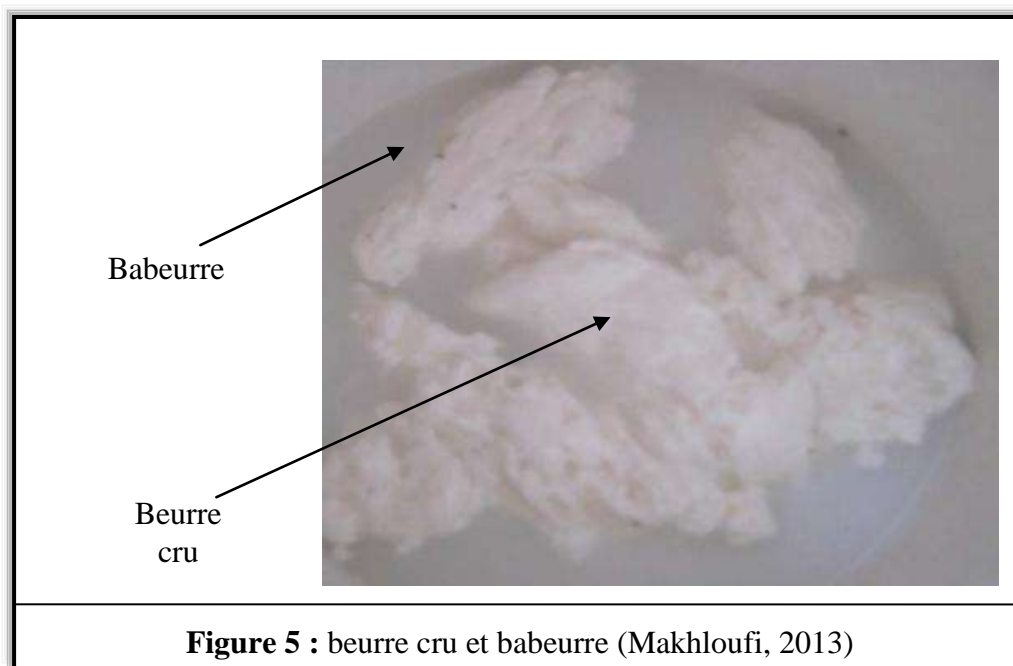


Figure 4 : types de barattes traditionnelles

A. La *Chakoua* fabriquée avec la peau de chèvre (Makhloufi, 2013) ; **B.** La *Chekoua* fabriquée avec la peau de mouton (Maghnia, 2011) ; **C.** Jarre en terre cuite obturée par un morceau de peau de l'animal (O'mahony et Bekele, 1985)



3. *Smen* ou *Dhan*

3.1. Définition

Le terme « *smen* » désigne généralement des produits préparés de façon artisanale à partir du beurre cru par lavage et salage, puis conditionnement dans des pots en terre et conservation à l'abri de l'air et de la lumière pour une durée variable d'au moins six mois. Cette technologie générale est susceptible de quelques modifications, selon les provinces :

- Le beurre cru peut être fabriqué à partir d'un mélange de laits (vache et chèvre) ;
- Avant le salage, le beurre peut exceptionnellement subir une cuisson de 1 h à 1 h 30 pour favoriser une certaine évaporation de l'eau ;
- Le *smen* après salage, mais avant son conditionnement, peut être aromatisé de thym sous forme de fragments de la plante ou d'extrait (El Marrakchi *et al.*, 1986).

2.2. Composition et valeur nutritionnelle

La composition du *smen* englobe généralement trois paramètres (tableau 3) : la teneur en eau, la teneur en extrait sec dégraissé et la teneur en matière grasse (Chakir, 1985). Le *smen* a des valeurs relativement faibles d'humidité et de pH, mais des quantités élevées d'acides gras libres et de NaCl (Sakili et Issoual, 2003). Donc sa composition est très différente de celle du beurre cela est dû à l'exsudation de l'eau observée au cours de l'entreposage de produit et/ou la dégradation microbienne des constituants (Chakir, 1985).

Selon El Marrakchi (1986), au cours de la conservation du *smen* une augmentation progressive des acides gras libre est produite, les courtes chaînes (C₄-C₁₀) sont les premiers à être libérées suivi d'acides gras insaturés, principalement, l'acide oléique (C₁₈ : 1). Alors que les acides gras saturés (C₁₂-C₂₀) sont les dernières à être libérés dans le produit. Triqui et Guth (2001) dans leurs études, ont conclu que les acides butanoïques et hexanoïques sont les clés odorantes de la saveur traditionnelle du *smen*.

Ce produit très apprécié par le consommateur pour ses qualités gustatives et diététiques, est utilisé comme additif des produits alimentaires pour remonter le goût et l'arôme de certaines recettes traditionnelles (Couscous, tajine, poulet, etc.). Sa propriété d'aliment de forte énergie est exploitée en médecine traditionnelle pour atténuer les douleurs de la sensation du froid qui accompagne la toux, le rhumatisme et le traumatisme osseux (voie orale et massage) (Sakili et Issoual, 2003).

Tableau 3 : caractéristiques physicochimiques du *smen* (Tantaoui-Elaraki & El Marrakchi, 1987 ; Bendimerad, 2013)

Paramètres	Unités	Valeurs moyennes	Marge de variation
Matière grasse totale	g/100 g	81,0	76-87
Humidité	%	14,0	10-20
Matière sèche dégraissée	%	5	2,5-7
NaCl	%	1,5	0,9-3,4
Lactose	g/100 g	1,2	0,6-2
Protéines	g/100 g	3,2	2,2-4
Lipides insaponifiables	g/100 g	0,3	0,2-0,5
Indice d'acide	mg KOH/g lipide	52,0	12-108
Indice de peroxyde	meq/kg lipide	3,7	0,4-24

3.3. Procédés de préparation

Le *smen* est un produit laitier fermenté, fabriqué à partir du lait cru entier par des méthodes empiriques basées sur des expériences de l'ancien temps. Le beurre cru obtenu par barattage du lait fermenté (§ 2. Beurre cru) est lavé et malaxé, le but du lavage est d'enlever le *Lben* restant dans le beurre afin d'éliminer la phase aqueuse et la plupart des nutriments qui pourraient contribuer à la croissance microbienne donc permettre au *smen* d'être stocké pendant une longue période (Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987 ; Sakili et Issoual, 2003).

Après cette étape, le *smen* peut être préparé, selon deux méthodes :

3.3.1. Salage sans cuisson

Un lavage du beurre à l'eau chaude est utilisé en premier, suivi par l'eau légèrement salée. Le sel sec est utilisé pour le salage avec une quantité globale d'environ 100-120 g par kg du beurre cru. Cette opération est difficile, car elle nécessite d'homogénéiser le sel et le beurre. Le sel est généralement ajouté progressivement, tandis que le beurre est travaillé de façon continue. Ensuite, le beurre salé est introduit dans des jarres en terre cuite dont sont remplies soigneusement pour éviter d'incorporer l'air dans le beurre qui peut provoquer une oxydation indésirable. Les pots en terre cuite sont fermés hermétiquement et entreposés dans un endroit frais et obscur à température ambiante. Après quatre à six mois le beurre salé a généralement mûri en *smen*, cependant le stockage peut nécessiter d'être plus long (Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987).

Cette préparation fait ressortir les caractéristiques suivantes : absence de tout traitement thermique, le salage constituant le seul élément de conservation et les conditions de stockage sont également originales : anaérobiose et température ambiante (El Marrakchi *et al.*, 1986).

3.3.2. Salage et cuisson

Le beurre cru est placé dans une cuve en acier inoxydable ou en aluminium, ou dans une casserole en fer ou en cuivre. Le beurre est alors chauffé sous agitation continue jusqu'à liquéfaction (50-60°C) ensuite le sel est ajouté à un taux d'environ 2-4 % de poids du beurre. Puis le beurre liquéfié est chauffé à 90-96°C, au cours du chauffage, une écume est produite qui est connue sous le nom d'écume d'ébullition. À ce stade, le niveau de chauffage doit être réduit. Après la disparition de l'écume, au bout d'un certain temps une autre ébullition commence, des particules flottantes apparaissent qui sont essentiellement constituées des protéines et des phospholipides sont enlevées ou non selon la préférence des fabricants. En général, à 103-107°C, la plupart des particules précipitent au fond de la cuve. Une agitation continue pendant l'ébullition est très importante pour éviter tout défaut de surcuisson ainsi que le temps auquel le chauffage et l'agitation doivent être arrêtés.

Généralement, le beurre chauffé salé est filtré à travers un tissu pour éliminer toute matière étrangère mélangée avec le beurre, si il est de bonne qualité cette étape est négligée. Pour le conditionnement, de nombreux récipients peuvent être utilisés par exemple : les

bocaux en verre de couleur foncée pour éviter l'oxydation induite par la lumière et les jarres en terre cuite. Alors qu'une température ambiante trop chaude et la lumière directe doivent être évitées pendant le stockage (Abou-Donia et El-Agamy, 2003).

Les étapes de préparation des différents types de *smen* sont résumées dans la figure (6).

3.4. Consommation du *smen* dans le monde

Le tableau (4) montre quelques préparations traditionnelles du *smen* et sa consommation dans différentes régions du monde.

Tableau 4 : *smen* consommés dans différentes régions du monde

Nom du Produit	Pays d'origine	Lait utilisé	Nature du produit	Usages	Références
<i>Dihin bagar</i>	Tchad	Vache	beurre liquide (avec cuisson) et conservé	alimentaires, thérapeutiques, cosmétiques et artisanales	(Duteurtre & Koussou, 2007)
<i>Ghee</i>	Inde	Bufflonne ou vache			
<i>Samna</i> ou <i>samnah</i>	Moyen-Orient	Vache			
<i>Santeiga de garrafa</i> (beurre en bouteille)	Brésil				
<i>Neter qibe</i>	Éthiopie				
<i>Tesmir</i>	Érythrée				
<i>Shar tas</i> (beurre de jaune)	Mongolie		préparations culinaires principalement ajouté au thé	(Accolas <i>et al.</i> , 1978)	
<i>Shmen</i>	Algérie	Chameau	Beurre salé chauffé et conservé	alimentaires, thérapeutiques, cosmétiques	(Benkerroum, 2013)
<i>Semna/Sman</i>	Égypte et Tunisie	Chèvre et vache			
<i>Smen</i>	Pays du Maghreb	Tous les types de lait			

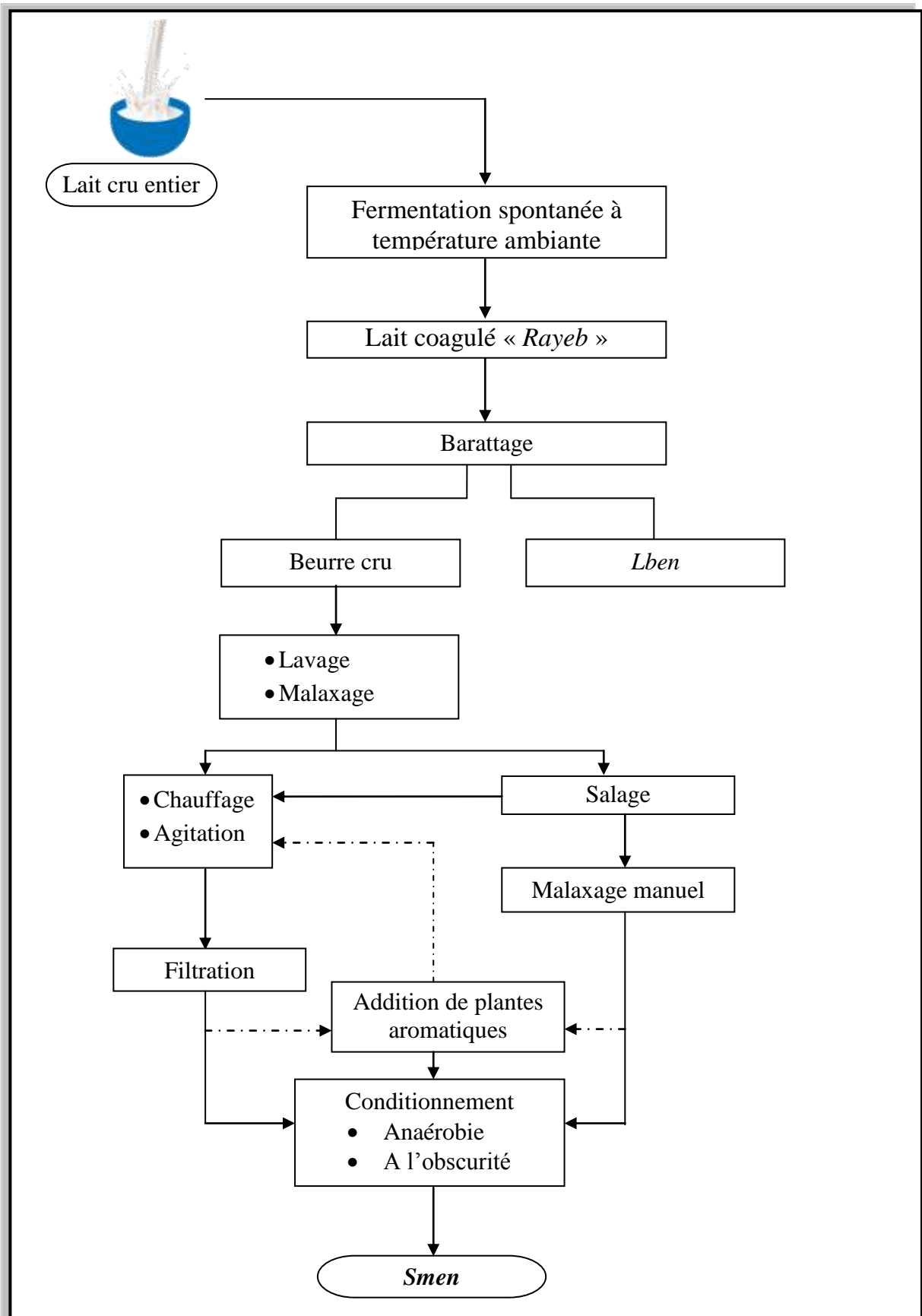


Figure 6 : différentes étapes de préparation du *smen*

Chapitre 02 : flore microbienne du beurre cru et du *smen*

1. Flore microbienne du beurre cru

La charge microbienne du beurre dépend de micro-organismes présents dans les matières premières, les conditions d'hygiène, d'environnement et de stockage (Santos *et al.*, 2016).

Donc, selon son origine la flore microbienne se divise en : flore originelle (indigène) et flore de contamination.

1.1. Flore originelle

Le beurre peut contenir tous les germes rencontrés dans le lait. Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/mL). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Ainsi, le beurre peut contenir des bactéries lactiques d'acidité et d'arôme comme : *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*, parfois *Leuconostoc* qui participent à l'élaboration des qualités organoleptiques du beurre (Guiraud, 2003).

1.2. Flore contaminante

En plus des matières grasses, le beurre contient un faible pourcentage de protéines de lait, du sucre et de l'eau qui font des substrats appropriés pour les micro-organismes (Idoui *et al.*, 2010). Les caractéristiques microbiologiques du beurre dépendent d'un grand nombre de facteurs qui sont liés à la qualité du lait utilisé pour sa fabrication et les conditions de production (Idoui *et al.*, 2013). En ce qui concerne le lait, il se contamine par des apports microbiens d'origines divers :

- Fèces et téguments de l'animal : coliformes, entérocoques, *Clostridium*, éventuellement entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc. ;
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques, etc. ;
- Litières et aliments : flore banale variée, en particulier lactobacilles, *Clostridium* butyriques (ensilages) ;
- Air et eau : flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées, etc. ;

- Équipements de traite et de stockage du lait : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*, etc.;
- Manipulateurs : staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi les germes provenant d'expectorations, de contaminations fécales, etc. ;
- Vecteurs divers (insectes en particulier) : flore de contamination fécale (Guiraud, 2003).

En conséquence, le beurre peut être contaminé par les coliformes, les levures, les moisissures, les bactéries lactiques et psychotropes (Erkmen et Bozoglu, 2016). Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autres dangereux du point de vue sanitaire et d'autres capables d'entraîner la détérioration (Guiraud, 2003).

1.2.1. Flore bactérienne pathogène

Leur origine est variée : infection mammaire, matériel de traite, ensilage, trayeur et d'autres facteurs liés à la saison. Elle présente un danger pour le consommateur (Vignola, 2002). C'est le cas de *Mycobacterium bovis*, *Bacillus cereus* et des espèces des genres : *Brucella*, *Salmonella* et *Listeria* en particulier *Listeria monocytogenes* qui est un agent de toxi-infection (Richard, 1983).

D'après Verraes *et al.* (2015), *Salmonella* n'a pas été détectée dans tous les échantillons testés du beurre. Mais *Listeria monocytogenes*, verocytotoxine produite par *Escherichia coli* (VTEC) et *Staphylococcus aureus* ont été identifiées dans le beurre cru. Cependant, le beurre n'est pas un milieu très favorable, ce qui limite les risques (Guiraud, 2003).

1.2.2. Flore microbienne d'altération

Le beurre frais est le plus susceptible à la contamination microbienne (Wilbey, 2005). Son altération produit un changement de flaveur et la formation d'une odeur désagréable, ce qui provoque des changements à la fois de texture et d'apparence (Erkmen et Bozoglu, 2016). Le fait que les microorganismes ne peuvent pas se développer dans la phase grasse de l'émulsion produite du beurre, met en évidence l'importance de la phase aqueuse de ce produit, donc la répartition des gouttelettes d'eau en émulsion eau / huile (beurre) est d'une importance primordiale. Tous les trois grands groupes d'organismes d'origines bactériennes (*Pseudomonas* spp.), levuriennes (*Candida* spp.) et mycéliennes (*Geotrichum*), ont été impliqués dans l'altération du beurre en surface provoquant les défauts de flaveur tels que la putréfaction, le rancissement et / ou le goût de poisson, ainsi que le changement de la couleur

de surface. Les défauts de flaveur du beurre non salé ont été attribués à la croissance des coliformes, *Enterococcus* et *Pseudomonas* dans la phase aqueuse du beurre (Wilbey, 2005).

Le tableau (5) donne quelques dégradations du beurre et ses principales origines.

Tableau 5 : altérations les plus rencontrés dans le beurre (Budhkar *et al.*, 2014)

Détérioration	Facteurs causaux
Détérioration bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> • L'équipement et l'eau contaminés
Putridité ou « souillure de surface » et rancissement hydrolytique	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas</i> spp. comme <i>Pseudomonas fragi</i>, <i>Shewanella putrefaciens</i> (<i>Alteromonas putrefaciens</i>) et <i>Pseudomonas fluorescens</i> qui se développent sur la surface du beurre et produisent les protéases et les lipases.
La croissance des moisissures produit un arôme de moisi	<ul style="list-style-type: none"> • Croissance de <i>Rhizopus</i>, <i>Geotrichum</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Cladosporium</i> peut provoquer le rancissement hydrolytique ; • Humidité supérieure à 70 % ; • Mauvais hygiène personnelle.
Saveur maltée, l'odeur désagréable, et la décoloration noire	<ul style="list-style-type: none"> • La croissance de <i>Lactococcus lactis var. maltigenes</i>, <i>Pseudomonas mephitica</i>, et <i>Alteromonas nigrifaciens</i>.
Changement de couleur	La croissance en surface de divers champignons produisent des spores colorées.
Production d'acide	La croissance de levures telles que <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida mycoderma</i> , <i>Torulopsis holmii</i> .

Bactéries lactiques : les bactéries lactiques peuvent entraîner une acidité trop forte dans le beurre qui peut être antérieure à sa fabrication (Guiraud, 2003). La réduction de pH par les bactéries lactiques va inhiber de nombreux contaminants, y compris *Pseudomonas* spp., mais permet aux levures de croître si l'eau libre est disponible et un organisme anciennement connu sous le *Lactococcus lactis var. maltigenes* peut être responsable d'un défaut de saveur « malté » liée à la formation de 3-méthylbutanal (Wilbey, 2005).

Coliformes : leur détection témoigne une contamination fécale possible. Du point de vue technologique, elles assurent la fermentation du lactose et produisent des acides et des gaz (hydrogène et gaz carbonique). De plus, elles élaborent diverses substances conférant aux produits des goûts et des odeurs très désagréables. Certaines espèces peuvent être responsables des infections gastro-intestinales (FAO, 1995).

Flore microbienne psychrotrophe : elle est constituée de microorganismes qui ont la capacité de se développer à une température égale ou inférieure à 7°C, c'est le cas des

bactéries du genre *Pseudomonas*. Ces derniers sont responsables de colorations ou de décolorations anormales et de mauvais goûts dans le beurre (amer, rance ou putride) à la suite de la production des lipases et des protéases thermorésistantes (FAO, 1995 ; Guiraud, 2003).

Levures : les levures sont également bien connues, elles provoquent une altération des produits laitiers. Des genres lipolytiques telles *Rhodotorula* peuvent se développer à la surface du beurre à des températures faibles et tolérer des concentrations élevées de sel. Autres levures associées à l'altération comprennent *Candida lipolytica*, *Torulopsis* et *Cryptococcus*. Sagdic *et al.* (2010) ont isolé et identifié quarante-neuf espèces de levures à partir des échantillons du beurre. La plupart des isolats appartenant au genre *Candida* (*C. kefyr*, *C. zeylanoides* et *C. lambica*) et un nombre modéré d'isolats appartenant à des genres *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces*. Dans une autre étude, six genres différents de la levure ont été identifiés à partir d'échantillons du beurre : *Candida*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* et *Geotrichum* (Daijeet, 2012). Les levures et les moisissures peuvent provoquer des altérations de goût (moisi, âcre, malté, caramélisé, etc.) et entraîner dans le beurre l'apparition de pigmentations anormales et de gonflements (Guiraud, 2003).

Moisissures : les moisissures restent les plus importants organismes d'altération du beurre et leurs développements peuvent provoquer une décoloration et une décomposition de la surface. Les genres majoritaires étant *Thamnidium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Alternaria* et *Rhizopus* (Ahmed *et al.*, 2016). Rajaraman *et al.* (1994) ont isolé à partir du beurre quarante espèces de moisissures, la plupart des isolats sont identifiés comme *Penicillium purpurogenum* et les restes appartenant à : *P. citrinum*, *P. adametzi*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Fusarium* spp. et *Mucor* spp.

Flore protéolytique : les bactéries protéolytiques peuvent dégrader la caséine du beurre et entraîner un goût de fromage (Guiraud, 2003), elles engendrent aussi un goût amer et une odeur aigre. Elles sont représentées surtout par la flore psychrotrophe (FAO, 1995).

Flore lipolytique : les bactéries lipolytiques tels que *Bacillus* et celles appartiennent aux familles Micrococcaceae et Pseudomonadaceae (telles que *Pseudomonas* et *Flavobacterium*) détruisent et oxydent les matières grasses, entraînant le rancissement du beurre (Guiraud, 2003 ; Erkmen et Bozoglu, 2016). Ce dernier peut résulter de la lipolyse des graisses par les lipases microbiennes résiduelles provenant du lait cru ou de la crème. Il peut également se produire dans le beurre en raison de la croissance des bactéries et des levures

lipolytiques (telles que *Rhodotorula*, *Candida lipolytica*) qui peuvent encore se développer sur la surface du beurre même à faible température (Erkmen & Bozoglu, 2016).

2. Flore microbienne du *smen*

La microflore du *smen* peut être affectée par la composition chimique du lait (Kacem & Karam, 2006), les matières premières utilisées (à savoir le beurre cru et le sel) (Benkerroum & Tamime, 2004), la différence des méthodes de traitement traditionnel : traite, caillage lactique, extraction du beurre, etc. (El Marrakchi *et al.*, 1988b ; Kacem & Karam, 2006), les matériaux d'emballage et les conditions de stockage. Par conséquent, la connaissance de la microflore bactérienne impliquée dans la fermentation du beurre est d'une importance primordiale dans la prévision et la détermination de la qualité finale du *smen* (Kacem & Karam, 2006). Le nombre des micro-organismes était généralement faible (comptage des colonies était entre 0-800 UFC / g) (Triqui & Guth, 2001).

2.1. Flore originelle

Des études diverses sur le *smen* font ressortir que seuls les lactobacilles parmi les bactéries lactiques sont présents alors que les streptocoques lactiques, aussi bien les homofermentaires que les hétérofermentaires sont absents dans les échantillons (Chakir, 1985).

D'autres études montrent la disparition de la flore lactique de *smen* à partir de quarantième jour de conservation (Ismaili Alaoui, 1986). Parmi les lactobacilles isolés au cours des premiers mois de conservation de *smen* ; *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei* qui prédominent (Tantaoui-Elaraki & El Marrakchi, 1987). Les auteurs expliquent ce résultat par l'effet de salage, l'épuisement des substances nutritives et l'action inhibitrice des acides gras libres (Ismaili-Alaoui, 1986).

2.2. Flore contaminante

Divers contaminants sont inévitablement introduits pendant les étapes de lavage, de malaxage et de conditionnement. Le niveau d'hygiène adopté par les ouvriers laitiers, la qualité de l'eau de lavage utilisée et l'état sanitaire des ustensiles sont les causes possibles de contamination du *smen* (Benkerroum et Tamime, 2004).

2.2.1. Flore microbienne pathogène

Selon El Marrakchi *et al.* (1988b), le *smen* est exempt aussi bien de germes de contamination fécale que de microorganismes pathogènes tels que les staphylocoques

présupposés entérotoxigènes et les salmonelles. Cette absence s'explique par les conditions dysgénésiques du milieu : salage et forte lipolyse, cela montre que le *smen* malgré les nombreuses manipulations que nécessite sa préparation, offrent une garantie sanitaire pour le consommateur.

2.2.2. Flore microbienne d'altération

Bactéries : au cours de l'élaboration du produit, les coliformes ne sont plus isolés dès le 40^e jour alors que le nombre des entérocoques diminue. Ces observations confirment les résultats obtenus sur le produit fini, les micro-organismes qui forment la flore normale du *smen* (flore aérobie mésophile totale et flore halophile modérée) appartiennent presque tous, au genre *Bacillus* et aux espèces *B. alvei*, *B. brevis* et *B. firmus*. La prédominance des *Bacillus* s'explique par leur résistance aux effets inhibiteurs du sel et des acides gras libres (El Marrakchi *et al.*, 1988b).

Levures et moisissures : ces microorganismes sont faibles, voire nuls (Chakir, 1985). Banquor a enregistré une disparition des levures dans les échantillons après 80 à 160 jours de conservation, les principales levures rencontrées dans le *smen* appartiennent aux espèces suivantes : *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichiakudria vzevii*, *Saccharomyces sake*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulopsis sphaerica*, *debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *K. marxianicus*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavisporalus itaniae* (Ismaili-Alaoui, 1986).

Flore lipolytique : en particulier la lipolyse, est le résultat d'activités enzymatiques d'origines microbiennes. La lipase naturelle n'a aucun effet en raison de sa sensibilité au salage (El Marrakchi *et al.*, 1988b). Au cours de l'entreposage, le nombre des bactéries lipolytiques de *smen* diminue. Au moment d'incorporation du sel (le premier jour), les bactéries à Gram négatifs dominent et de l'identifiées comme membres des genres ou familles : *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Enterobacteriaceae*. Présence également des bactéries à Gram positifs appartiennent aux genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*. Après le nombre des bactéries à Gram négatifs diminue de façon significative sauf pour les *Aeromonas*, tandis qu'à l'inverse, le nombre des bactéries Gram positifs augmente avec une prédominance marquée du genre *Bacillus* (El Marrakchi *et al.*, 1988a).

Chapitre 03 : lipases microbiennes

Pendant la lipolyse, les graisses et les huiles sont hydrolysées en glycérol et en acides gras. Les enzymes impliquées dans ce processus sont généralement appelés lipases. D'autres enzymes spécifiques de lipides comprennent les estérases et les phospholipases (Adejuwon, 2013). L'hydrolyse des lipides peut être d'origine microbienne, dès 1901, les lipases ont été mises en évidence chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (dénommées respectivement, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*). La présence de lipases chez de nombreux microorganismes leurs permettent d'utiliser des «sources non-conventionnelles » de carbone comme les triglycérides ou d'autres lipides contenant des liaisons ester. Ces lipides, ne pouvant pas traverser les membranes cellulaires de façon passive, doivent être dégradés dans le milieu extracellulaire en glycérides partiels et en acides gras libres avant que ces derniers soient absorbés par les cellules (Fichers *et al.*, 2008).

1. Définition

Les lipases appelées les triacylglycérol acylhydrolases, font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques (E.C.3.1.1.3) avec des différentes origines (bactérienne, fongique, pancréatique, hépatique, gastrique) et des propriétés diverses. Elles peuvent catalyser l'hydrolyse d'un grand nombre d'esters carboxyliques, mais montrent une forte spécificité envers les substrats glycériques (Linden, 1998). Ces derniers sont à chaînes longues ou à chaînes acyles comportant plus de 10 atomes de carbone. Les enzymes ayant la capacité d'hydrolyser seulement les glycérides à chaîne inférieure à 10 atomes de carbone sont désignées généralement comme des estérases. Il convient de souligner que la majeure partie des lipases peuvent hydrolyser les substrats des estérases, alors que l'inverse n'est pas vrai (Messias *et al.*, 2011). Les lipases sont également capables de catalyser la réaction réversible de synthèse (Linden, 1998).

L'hydrolyse des liaisons esters formées par les acides gras et le glycérol est catalysée par les lipases, à l'interface eau - lipide. Le phénomène est connu sous le nom d'activation interfaciale (Linden, 1998 ; Rajanikanth et Damodharam, 2016), elle est l'une des caractéristiques des lipases vraies qui sont des enzymes de la famille (I) adopte au classement décrit auparavant par Jaeger *et al.* en 1994 (Akoh *et al.*, 2004). Jusqu'à récemment, deux critères ont été utilisés pour définir une lipase «vraie» :

- L'activation de ces enzymes nécessite la présence d'une interface entre les différentes phases ;
- La structure tertiaire de la lipase doit contenir un "couvercle" recouvrant le site actif de l'enzyme. Lors du contact avec l'interface, le couvercle est déplacé pour donner aux substrats un accès au site actif (Hugo et Charles, 2010).

2. Microorganismes producteurs de lipases

Les lipases sont des enzymes ubiquitaires leurs principales sources sont les microorganismes, mais elles sont également produites par la plupart des eucaryotes (Messias *et al.*, 2011).

Les lipases microbiennes sont aussi produites par les bactéries à Gram + (genres *Bacillus* et *Staphylococcus*) que par les Gram – (*Pseudomonas*). Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* (Fickers *et al.*, 2008). Le tableau (6) illustre les divers micro-organismes décrits comme producteurs de lipases.

Tableau 6 : exemples de micro-organismes producteurs de la lipase cités par Treichel *et al.* (2010) et Messias *et al.* (2011)

Microorganismes	Références
Archées	
<i>Natronococcus</i> sp.	Boutaiba <i>et al.</i> (2006)
Bactéries (Gram positif)	
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Kambourova <i>et al.</i> (2003)
<i>B. megaterium</i>	Lima <i>et al.</i> (2004)
<i>Burkholderia glumae</i>	Khattabi <i>et al.</i> (2003)
<i>B. cepacia</i>	Fernandes <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus coagulans</i>	Alkan <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus</i> sp.	Ertugrul <i>et al.</i> (2007), Shariff <i>et al.</i> (2007) Nawani et Kaur (2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	Takaç et Marul (2008)
<i>Burkholderia multivorans</i>	Gupta <i>et al.</i> (2007)
<i>Ralstonia</i> sp.	Yoo <i>et al.</i> (2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Shah et Wilson (1965)
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	Volpato <i>et al.</i> (2008)
<i>S. epidermidis</i>	Simons <i>et al.</i> (1998)
<i>S. xylosum</i>	Mosbah <i>et al.</i> (2007)
Bactéries (Gram négatif)	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Li <i>et al.</i> (2005)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Jaeger et Reetz (1998)
<i>Photobacterium lipolyticum</i>	Yang, Sohn et Kim (2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jaeger <i>et al.</i> (1997)

Microorganismes	Références
Bactéries (Gram négatif)	
<i>P. mendocina</i>	Jaeger et Reetz (1998)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Kiran <i>et al.</i> (2008)
<i>P. fluorescens</i> HU380	Kojima et Shimizu (2003)
<i>Serratia marcescens</i>	Jaeger <i>et al.</i> (1997)
<i>Serratia rubidaea</i>	Immanuel <i>et al.</i> (2008)
actinomycètes	
<i>Streptomyces cinnamomeus</i> Tü 89	Sommer, Bormann et Götz (1997)
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Côté et Shareck (2008)
Levures	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Liu <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida rugosa</i>	Dalmau <i>et al.</i> (2000)
<i>C. cylindracea</i>	Brozzoli <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida utilis</i>	Grbavcic <i>et al.</i> (2007)
<i>Candida</i> sp.	He et Tan (2006)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Potumarthi <i>et al.</i> (2008)
<i>Trichosporon asahii</i>	Kumar et Gupta (2008)
<i>Torulopsis ernobii</i>	Yoshida, Motal et Ichishima (1968)
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Costas, Deive et Longo (2004)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ciafardini <i>et al.</i> (2006)
<i>Williopsis californica</i>	Ciafardini <i>et al.</i> (2006)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Domínguez <i>et al.</i> (2003)
Moisissures	
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Lin, Wang et Sung (2006)
<i>Alternaria</i> sp.	Tom et Crisan (1975)
<i>Aspergillus carneus</i>	Saxena <i>et al.</i> (2003)
<i>A. terreus</i>	Gulati <i>et al.</i> (1999)
<i>A. niger</i>	Edwinoliver <i>et al.</i> (2010)
<i>A. oryzae</i>	Toida <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus</i> sp.	Cihangir et Sarikaya (2004)
<i>Beauveria bassiana</i>	Hegedus et Khachatourians (1988)
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Messias <i>et al.</i> (2009)
<i>B. ribis</i>	Messias <i>et al.</i> (2009)
<i>Botrytis cinerea</i>	Comménil <i>et al.</i> (1999)
<i>Cunninghamella verticillata</i>	Gopinath <i>et al.</i> (2002)
<i>Geotrichum candidum</i>	Burkert <i>et al.</i> (2005)
<i>Geotrichum</i> sp.	Burket <i>et al.</i> (2004)
<i>Fusarium globulosum</i>	Gulati <i>et al.</i> (2005)
<i>F. oxysporum</i>	Prazeres, Cruz et Pastore (2006)
<i>Mucor circinelloides</i>	Szczesna-antczak <i>et al.</i> (2006)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima <i>et al.</i> (2003)
<i>P. citrinum</i>	Miranda <i>et al.</i> (1999)
<i>P. restrictum</i>	Cammarota et Freire (2006)
<i>P. simplicissimum</i>	Gutarra <i>et al.</i> (2007)
<i>P. verrucosum</i>	Kempka <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Jaeger et Reetz (1998)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Li, Wang et Tan (2006)
<i>R. chinensis</i>	Sun et Xu (2009)

Suite de tableau

Microorganismes	Références
Moisissures	
<i>R. delemar</i>	Açikel, Erşan et Açikel (2010)
<i>R. homothallicus</i>	Diaz <i>et al.</i> (2006)
<i>R. oryzae</i>	Essamri ; Deyris et Comeau (1998)
<i>Rhizopus</i> sp.	Bapiraju <i>et al.</i> (2005)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fernandes <i>et al.</i> (2004)
<i>Trichoderma viride</i>	Kashmiri, Adnan et Butt (2006)

Suite de tableau

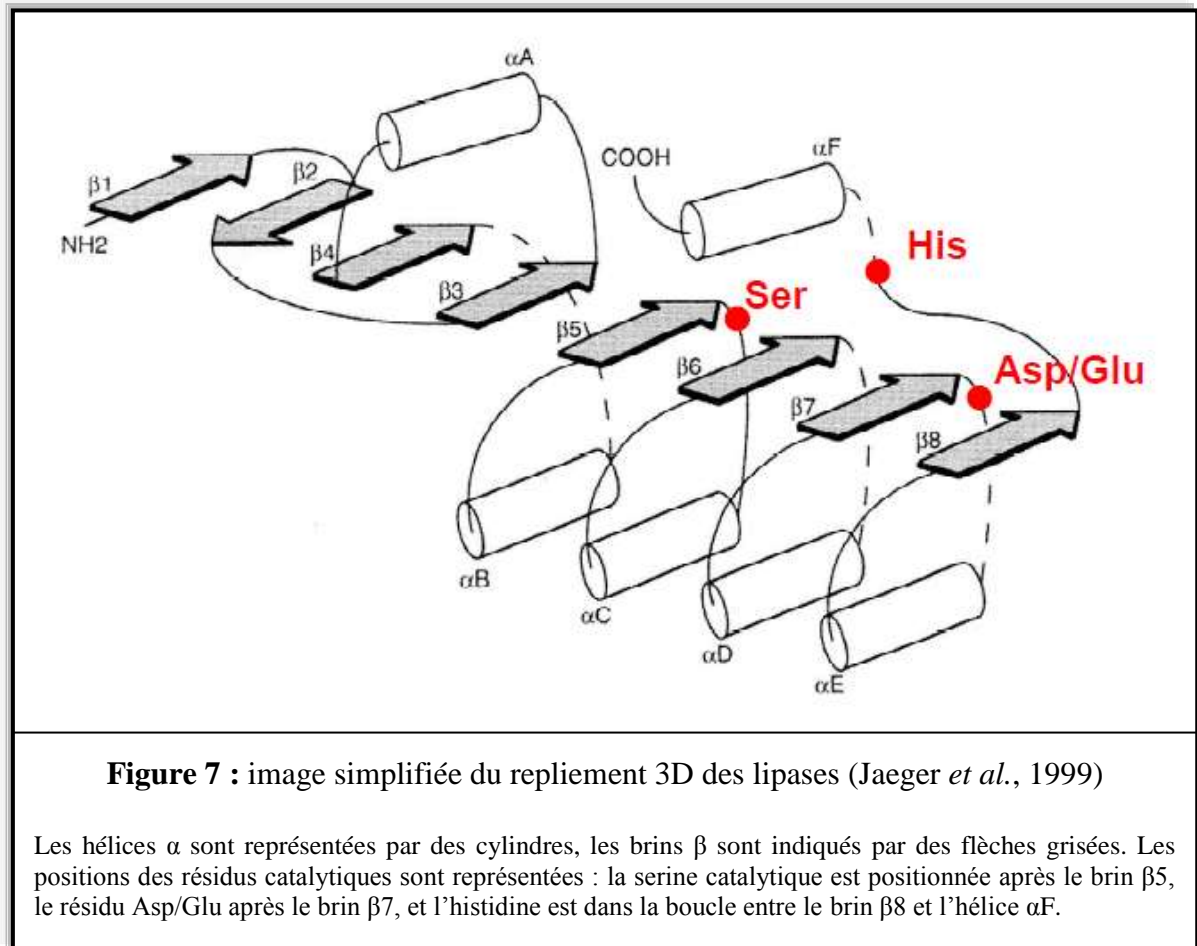
3. Caractéristiques structurales des lipases

C'est au début des années 1980 que les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées biochimiquement. Comme il a déjà été mentionné précédemment, les lipases sont des enzymes très variables par leurs origines et leurs spécificités de substrat. Les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 kDa tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60- 65 kDa. Les premières structures cristallographiques publiées ont été celle de la lipase du champignon filamentueux *Rhizomucor miehei*. Bien que les séquences peptidiques montrent très peu de similitudes entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle (Fickers *et al.*, 2008).

Sur un plan structural, les lipases appartiennent toutes à la super famille des (α/β) hydrolases et des résidus catalytiques. Le repliement α/β est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases, mais également des autres hydrolases des origines différentes comme l'acétylcholine estérase, la carboxypeptidase, la diène lactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Cette structure tri-dimensionnelle est constituée d'un feuillet β central formé par 7 brins β parallèles et un brin β (β_2) antiparallèle. Les brins β_3 à β_8 sont connectés à des hélices α disposées sur les côtés de la feuille centrale β (figure 6). Certaines variations de pli α / β ont été trouvées dans plusieurs lipases. Les variations du pli consistent à des différences dans la quantité des hélices α et des feuilles β , à la longueur des boucles et l'architecture des sites actifs. Les lipases sont également caractérisées par la présence de ponts disulfures qui peuvent être important pour l'activité catalytique ou la stabilité de l'enzyme (Jaeger *et al.*, 1999).

Le site catalytique de lipases est constitué d'une sérine (Ser), d'une histidine (His) et d'un acide carboxylique (L'acide aspartique : Asp, L'acide glutamique : Glu) dont l'ordre d'apparition dans la séquence primaire est Ser-Asp/Glu-His. De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans le penta-peptide Gly-X₁- Ser-X₂-Gly où X₁ et X₂ représentent un

acide aminé variable. Ce penta-peptide est, en général, la seule portion de séquence peptidique conservée chez les lipases. La sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5^e brin β et immédiatement suivi d'une hélice α (figure 7). L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxy-terminale du dernier brin du feuillet constituant le repliement α/β tandis que l'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7^e brin (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

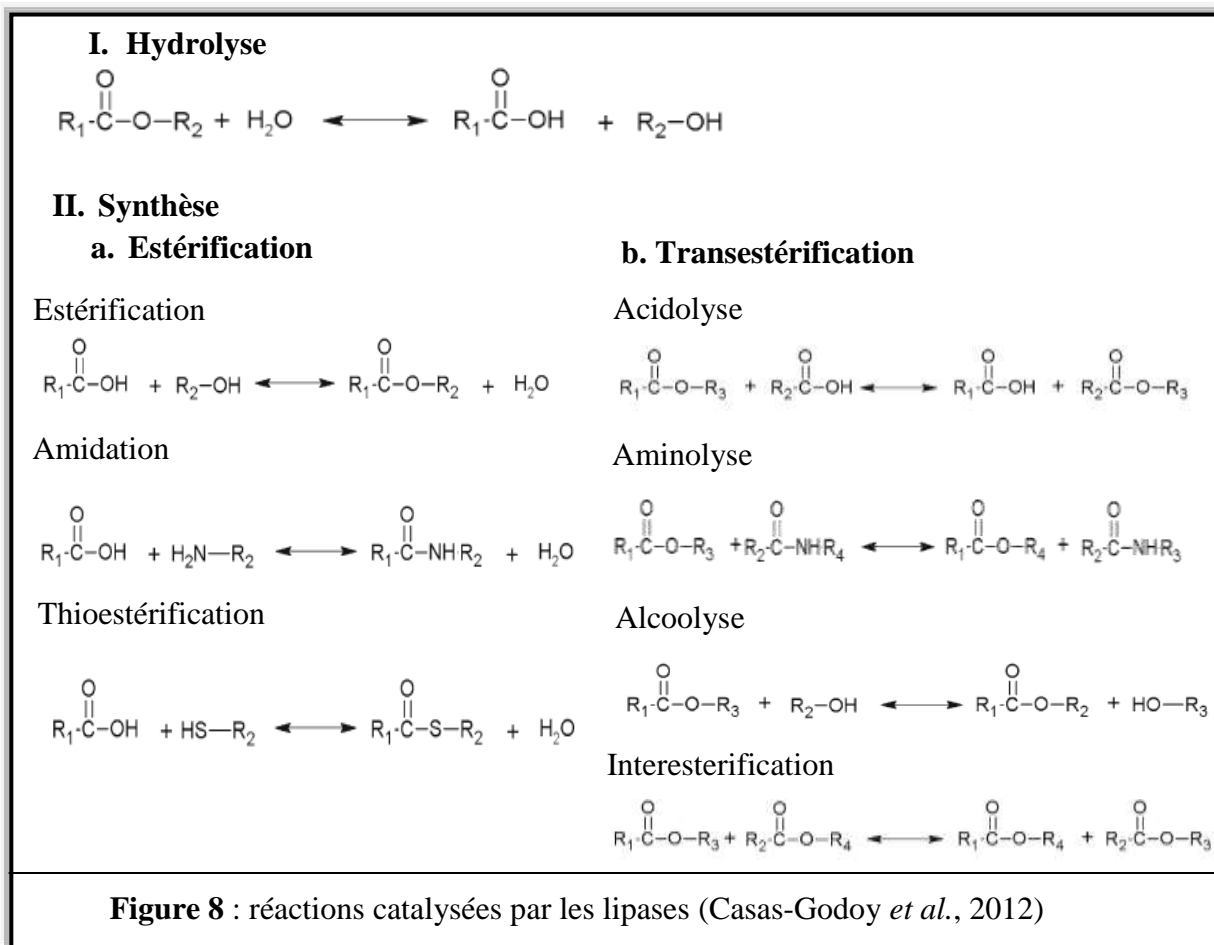


4. Types de réactions catalysées par les lipases

La fonction naturelle et principale des lipases est de catalyser l'hydrolyse des triglycérides à chaîne longue (Ravindra & Jegannathan, 2015). Cependant, dans certaines conditions, elles sont aussi capables de catalyser des réactions de synthèse. Les lipases sont considérées comme des biocatalyseurs parce qu'ils peuvent hydrolyser sélectivement et synthétiser une large gamme de composés (Rajanikanth et Damodharam, 2016).

Il existe une relation entre les structures des lipases et leurs capacités catalytiques, les particularités structurelles de cette enzyme provenant de sources différentes pourraient être la

raison pour montrer une activité différente vers les substrats (Ravindra et Jegannathan, 2015). La figure 8 résume les principales réactions catalysées par les lipases.



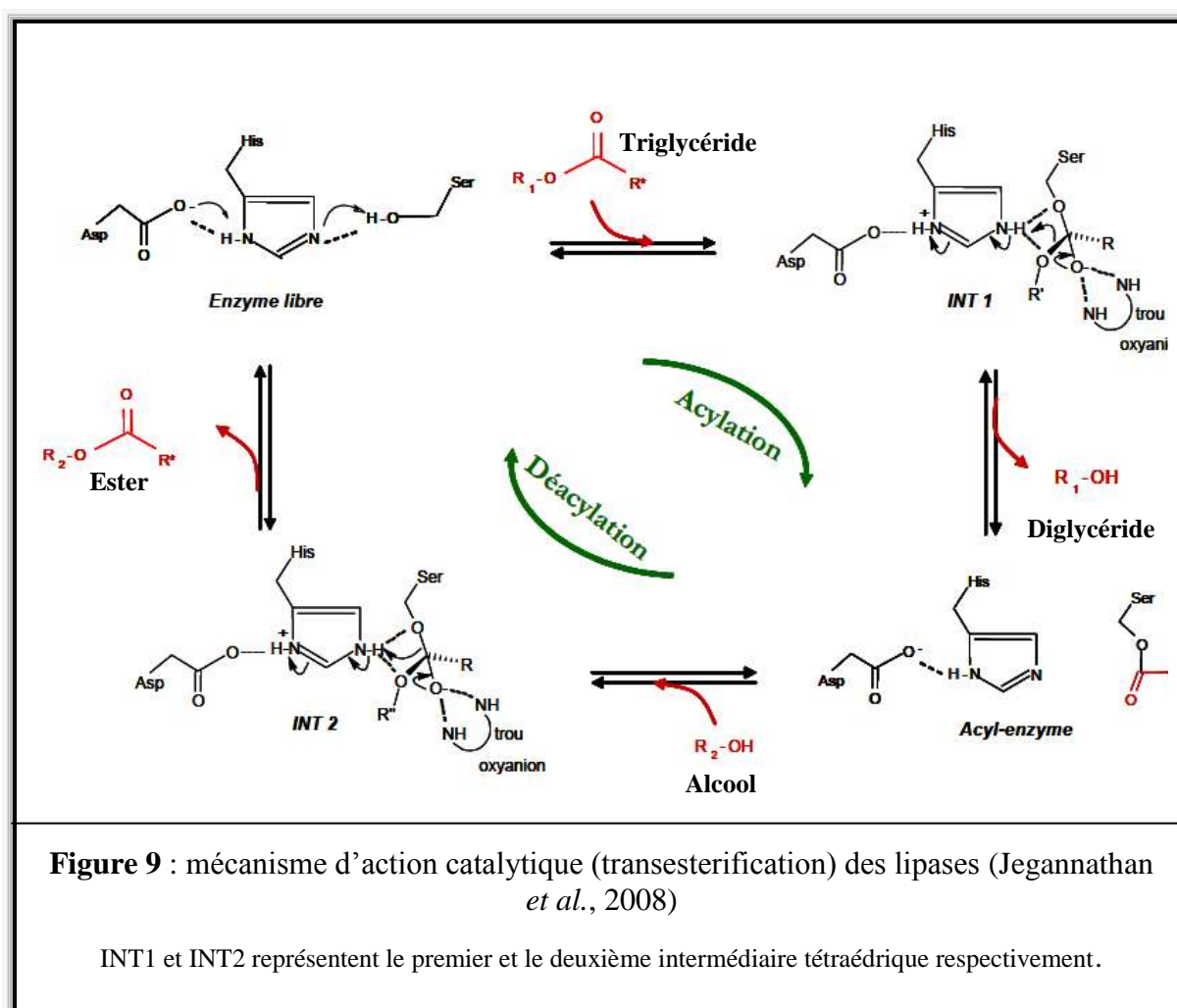
5. Mécanisme d'action

Le mécanisme enzymatique des lipases montre quelques similitudes avec celui des protéases à sérine active. Contrairement aux autres hydrolases, le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice α amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui agit comme un volet. Lorsque cette hélice α recouvre le site actif, l'enzyme est dans sa forme fermée ou inactive. Dans cette conformation, la face hydrophobe de cette hélice amphiphile est en interaction avec des résidus hydrophobes entourant le site actif tandis que sa face hydrophile interagit avec des molécules d'eau. Le substrat ne peut donc pas être en interaction avec la triade catalytique. Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme et suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y a un déplacement de l'hélice α constituant le volet. La face hydrophobe de l'hélice orientée auparavant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau / corps gras. Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible au substrat.

La résolution de structures cristallographiques des lipases de *Rhizomucor miehei*, de *Geotrichum candidum* a permis de mettre en évidence l'existence de cette hélice amphiphile recouvrant le site catalytique (Fickers *et al.*, 2008).

6. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique supposé pour les lipases est centré sur le site actif Serine. Tout d'abord, l'ester se lie à l'enzyme, ensuite le résidu catalytique sérine attaque le carbonyle, en formant le premier tétraédrique intermédiaire (figure 9). En outre, cette réaction libère l'alcool et laisse une acyl-enzyme intermédiaire. En addition, dans une deuxième réaction d'hydrolyse, l'eau attaque cette acyl-enzyme pour former un deuxième tétraédrique intermédiaire. La désagrégation de ce dernier libère l'acide, ce qui régénère une enzyme libre. Dans d'autres conditions, l'alcool peut attaquer le nucléophile de l'enzyme acyl ce qui donne un nouvel ester (réaction de transestérification). Cependant, dans la plupart des cas, il semble que la formation de l'enzyme acyl est plus rapide (Jaeger et Reetz, 1998 ; Fickers *et al.*, 2008).



7. Détermination de l'activité lipolytique microbienne

La littérature a enregistré plusieurs procédés pour l'étude de la production de lipase par les microorganismes. Soit par une étude directe du microorganisme (Nair et Kumar, 2007), soit par une méthode indirecte qui implique la mesure de l'activité lipolytique des préparations de lipase brutes ou purifiées (Singh *et al.*, 2010).

Parmi ces procédés, la détection préliminaire tels que le zymogramme, qui consiste à la détection qualitative de l'activité de lipase sécrétée dans un milieu de culture solide contenant l'agar et le substrat (tributyryne, la trioléine, l'huile d'olive et le Tween 80) dans lequel on peut observer la formation des halos clairs ou des zones opaques autour des colonies, qui correspondent aux zones d'hydrolyse du substrat. Outre, la rhodamine B est utilisée comme substrat, il est possible d'observer la formation d'un halo fluorescent sous lumière UV (Becker *et al.*, 2005). Alternativement, la détection de lipase peut également être observée par la préparation d'une gélose avec des lipides et des substances chromophores sensibles au pH, comme le rouge de phénol et le bleu de victoria (Rahman *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2006), où l'activité lipolytique des lipases libère des acides gras diminuant le pH, qui à son tour peut changer la couleur des colorants chromophores utilisés dans la gélose (Kim *et al.*, 2001). D'autre part, les méthodes colorimétriques sont développées sur la base de la mesure des complexes chromophores formés par la réaction des acides gras libérés par la lipolyse et d'un ion de métal divalent comme les ions cuivre (Rahman *et al.*, 2005).

L'activité lipasique a été déterminée par la quantification des acides gras libérés durant l'hydrolyse menée par l'enzyme. Ces produits peuvent être déterminés par des méthodes physico-chimiques évaluant la disparition du substrat ou la formation des produits de réaction.

Parmi les méthodes qui permettent d'évaluer la disparition du substrat ; la néphélométrie et la turbidimétrie, le tensiomètre interfacial, la microscopie à force atomique et la spectroscopie infrarouge.

Les principales méthodes qui évaluent l'apparition des produits de la réaction d'hydrolyse comprennent un dosage indirect de la libération de protons (les indicateurs de couleur et la titration), l'analyse des acides gras libérés à partir d'esters carboxyliques dérivés de glycérol (dosages colorimétriques, fluorimétriques, par chromatographie, enzymatiques, la microscopie électronique pour la détection *in situ*) et l'analyse des acides gras libérés à partir d'esters carboxyliques synthétiques (dosages radioactifs, colorimétriques, fluorométriques) et des méthodes immunologiques, etc. (Hasan *et al.*, 2009)

Parmi les nombreuses méthodes disponibles pour accompagner l'activité lipasique présente dans le milieu de fermentation, les plus utilisés sont la colorimétrie en utilisant des substrats synthétiques tels que les esters d'acides gras de p-nitrophényle (acétate, butyrate, caproate, le caprate, le palmitate et le stéarate) et la titration (pH STAT) en utilisant trioléine comme substrat standard. L'huile d'olive est un alternatif faible coût pour être utilisé en tant que substrat et qui contient une moyenne de 70 % de trioléine (Messias *et al.*, 2009).

8. Application des lipases microbiennes

Les lipases microbiennes sont des biocatalyseurs potentiels en raison de leur versatilité. Elles se distinguent parmi les hydrolases en raison de leurs multiples applications en industrie des détergents, des médicaments, de l'alimentation (pains, fromages, thés), des textiles, des pâtes et papiers, de cuir, des cosmétiques, de biodiesel, des biocapteurs et aussi dans le traitement des eaux usées (Sharma *et al.*, 2001).

8.1. Industries Alimentaires

Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries : saucissons, salamis (Hasen, 2006).

Les graisses et les huiles sont des constituants importants des aliments. La valeur nutritionnelle, sensorielle et les propriétés physiques d'un triglycéride sont fortement influencées par des facteurs tels que la position de l'acide gras dans le squelette du glycérol, la longueur de chaîne de l'acide gras et son degré d'insaturation. Les lipases sont capables de modifier les propriétés des lipides relativement peu coûteux et moins souhaitables à une valeur supérieure comme le beurre de cacao qui est le principal ingrédient pour de nombreuses formulations de chocolat noir dans le monde. Ce processus utilise la lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* pour la réaction de transestérification qui remplace ainsi l'acide palmitique dans de l'huile de palme avec de l'acide stéarique et aussi l'interestérification de la matière grasse du beurre catalysée par une lipase entraînant une diminution considérable des acides gras saturés.

Les lipases ont été utilisées avec succès en tant que catalyseur pour la synthèse d'esters. Les esters produits à partir d'acides gras à chaîne courte ont des applications comme agents aromatisants dans l'industrie alimentaire, cela développe leurs utilisations pour

améliorer la saveur dans l'affinage des fromages, des produits de boulangerie et des boissons (Ray, 2015).

Les lipases sont utilisées pour la production de viande plus maigre comme dans le poisson. La graisse est enlevée pendant le traitement de la viande de poisson en ajoutant les lipases et cette procédure est appelée biolipolyse. Les lipases jouent également un rôle important dans la fermentation au cours des étapes de fabrication des saucisses et pour déterminer les changements des acides gras à longue chaîne libérée au cours de la maturation. Les lipases microbiennes ont été utilisées pour la saveur du riz raffiné, la modification du lait de soja et l'amélioration de l'arôme et l'accélération de la fermentation du vin de pomme (Hasen, 2006).

Les lipases sont utilisées aussi pour la préparation d'un fromage modifié enzymatiquement qui possède un arôme de fromage concentré produit par le traitement du caillé avec des enzymes lipolytiques et il est utilisé comme additif alimentaire pour de nombreux produits comme : poudres de fromage dans les soupes, les salades et les sauces (Guinee et Kilcawley, 2004). Les fromages modifiés enzymatiquement ont une saveur plus intense que le fromage affiné naturellement (Fenster *et al.*, 2003). La matière grasse du lait liposée est préparée à partir de lait condensé ou de l'huile de beurre avec addition de lipase afin de produire des acides gras libres qui confèrent l'arôme de fromage au produit. Ce type de produit est utilisé pour l'enrobage du chocolat, les additifs de saveur artificielle, la margarine, etc. Ainsi, les lipases bactériennes utilisées pour ces produits peuvent être dérivées des genres microbiens d'*Achromobacter* et *Pseudomonas* (Sangeetha *et al.*, 2011).

D'autre part, l'utilisation d'enzymes telles que les lipases de *Bacillus subtilis* peut améliorer la qualité du pain et, en outre, elles sont dénaturées pendant le processus de cuisson, laissant la texture fine sur le pain et cette technologie peut remplacer complètement ou partiellement les émulsifiants pour une meilleure qualité et efficacité de la fabrication du pain (Moavyedallaie *et al.*, 2010).

Pour conclure les lipases ont été appliquées dans la production d'émulsifiant polyricinoléate polyglycérol dans le traitement des déchets gras des industries d'alimentation des bétails pour compléter l'alimentation des non-ruminants, la suppression des déficiences enzymatiques et l'amélioration de l'utilisation des éléments nutritifs des matières premières avec la digestibilité difficile pour les animaux (Messias, 2010).

Matériel & Méthodes

1. Lieu de travail

Notre étude expérimentale comporte deux parties : La partie microbiologie est réalisée au niveau du laboratoire de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL) ainsi que les laboratoires pédagogiques de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A., université des Frères Mentouri Constantine1), durant la période du 08 février au 25 août 2016. Alors que l'étude physicochimique est réalisée au niveau du laboratoire central de la qualité dans l'entreprise SARL HODNA-Lait, spécialisée dans la fabrication du lait et des produits laitiers et localisée dans la wilaya de M'Sila, durant la période du 21 au 25 février 2016.

2. Démarche expérimentale globale

Il s'agit de présenter la démarche qui répond à l'objectif principal de notre étude qui est l'isolement des souches bactériennes potentiellement lipolytiques à partir de deux produits du terroir le beurre cru et le *smen*, elle comprend, principalement, trois volets à savoir :

- Une collecte des données sur nos échantillons au moment du prélèvement, vise à délimiter et connaître l'origine de nos échantillons et ses étapes de préparation traditionnelle par le biais d'un questionnaire auprès des personnes donatrices, pour estimer ses effets sur la qualité microbiologique finale de nos produits récupérés.
- Une caractérisation physicochimique des échantillons, comporte une caractérisation physicochimique des échantillons collectés par la mesure de différents paramètres : le pH, le taux de matières grasses (MG), l'extrait sec dégraissé (ESD), l'extrait sec total (EST) et l'humidité.
- Une caractérisation des souches bactériennes fortement sécrétrices des enzymes lipases, regroupe le dénombrement de la flore lipolytique dans le beurre cru et le *smen*, l'isolement d'une collection de souches lipolytiques à partir de ces deux produits de terroir, la purification réalisée grâce à des repiquages successifs afin d'avoir des isolats purs, la sélection des souches bactériennes potentiellement productrices de lipases sur un milieu solide, le rapprochement du genre de ces dernières ainsi que l'étude et la comparaison de ses productions de lipases extracellulaires en présence de deux inducteurs (huiles d'olive et Tween 80).

Ci-dessous le protocole expérimental synthétisant les différentes analyses réalisées dans le cadre de notre mémoire :

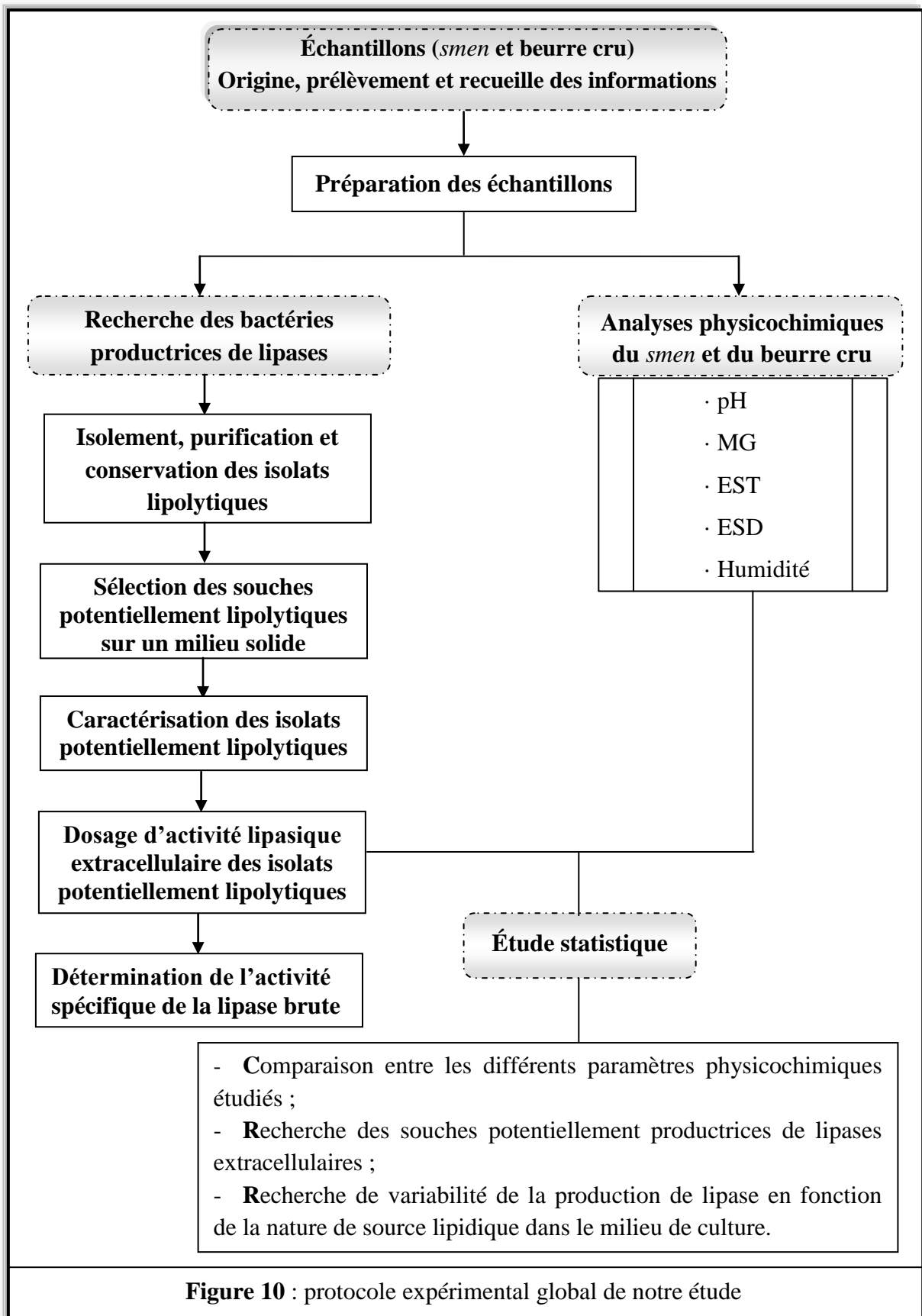


Figure 10 : protocole expérimental global de notre étude

3. Matériel biologique : beurre cru et *smen*

3.1. Origine

Les échantillons du *smen* et du beurre ont été collectés ou achetés de différentes régions du nord-est et du sud-est d'Algérie. L'étude a été portée sur six échantillons (*smen* : 5 ; beurre cru : 1), prélevés du 02 janvier au 08 février 2016 et classés selon la provenance (figure 11).

3.2. Prélèvement et présentation des échantillons

Les échantillons ont été recueillis dans leurs bocal d'origine auprès des ménages ou dans des flacons stériles à l'aide d'une cuillère stérile et étiquetés par un code correspondant (tableau 7). Puis le transport et la conservation au laboratoire sont effectués à température ambiante (Guiraud, 2003).

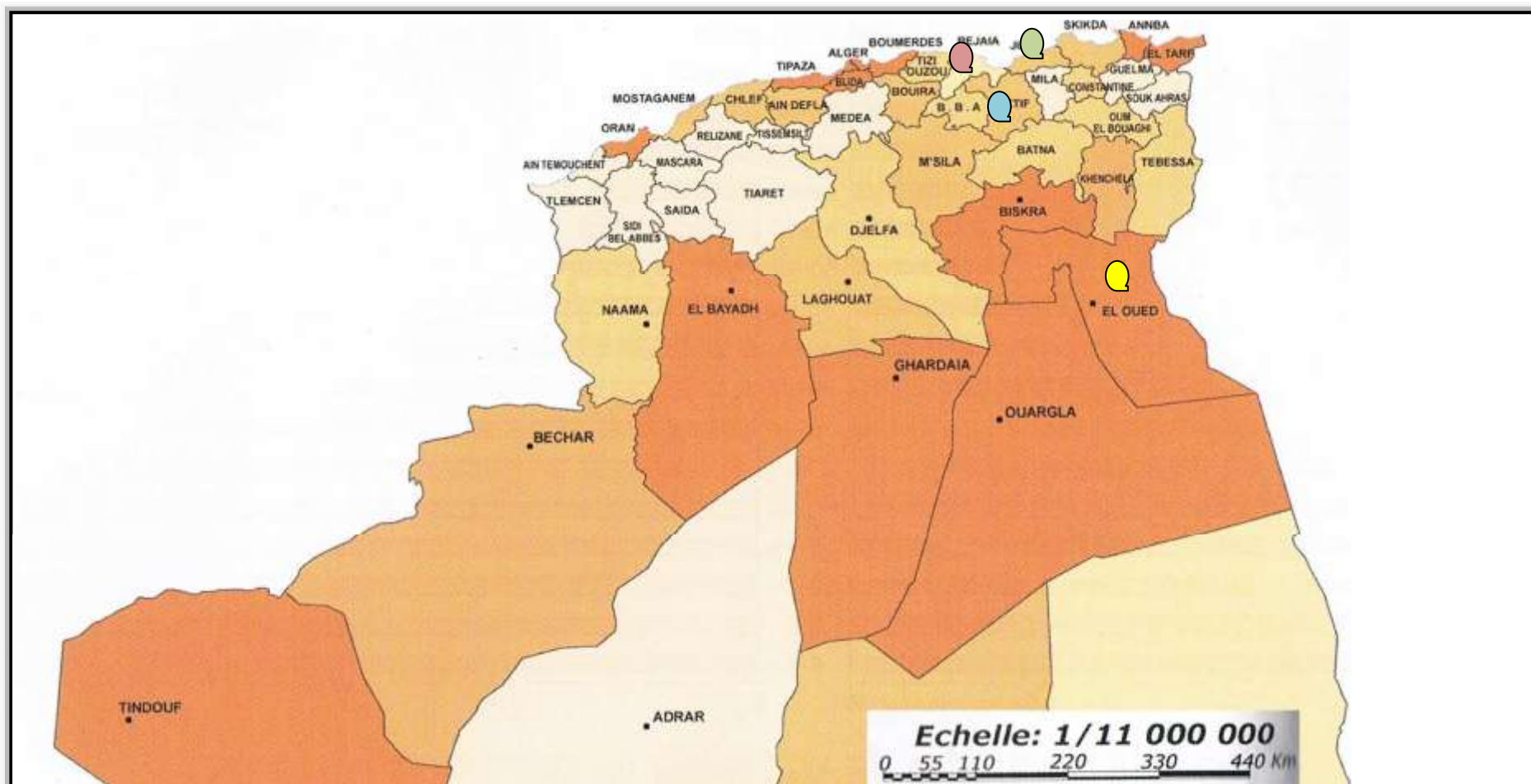
Les informations sur le procédé de préparation du *smen* et du beurre cru ainsi que leurs traçabilités ont été obtenues, à l'aide d'un questionnaire distribué auprès des personnes au moment de la collecte des échantillons. Le tableau suivant résume les principales caractéristiques des échantillons.

Tableau 7 : présentation des échantillons du beurre cru et du *smen*

Codes d'échantillons	Origines	Dates de prélèvement	Sources	Matière première	Description	Durée de conservation
ES 1 _A	Region : Guemar Wilaya : El-Oued	02/01/2016	Achetés au niveau de commerce	Lait de Vache	-Couleur : jaune ; -Odeur : de l'huile d'olive ; -Texture : liquide.	1 an et 6 mois
ES 3 _A *	Region : Zgoum Wilaya : El-Oued	03/01/2016		Lait de Chèvre	-Couleur : blanche ; -Odeur : spécifique ; -Texture : liquide.	3 ans et 7 mois
ES23 _A	Region : Amoucha Wilaya : Sétif	26/01/2016	Prélevés au niveau de ménage	Lait de Vache	-Couleur : jaune ; -Odeur : piquante ; -Texture : semi-solide.	23 ans
ES5 _A	Region : El Milia Wilaya : Jijel	02/02/2016			-Couleur : blanche ; -Odeur : piquante; -Texture : liquide.	5 ans et 1 mois
ES10 _A	Region : Adekar Wilaya : Bejaïa	28/01/2016		Lait de Chèvre	-Couleur : jaune ; -Odeur : piquante ; -Texture : semi- solide.	10 ans
EB	Region : Ras el Ma Wilaya : Sétif	08/02/2016		Lait de Vache	-Couleur : jaune ; -Odeur : de beurre ; -Texture : semi- solide.	1 jour

E : échantillon ; **S** : *smen* ; **1_A**, **3_A**, **23_A**, **5_A**, **10_A** : durée de conservation en an ; **B** : beurre cru.

* : le seul échantillon récupéré dans son bocal d'origine.



Zones d'échantillonnages :

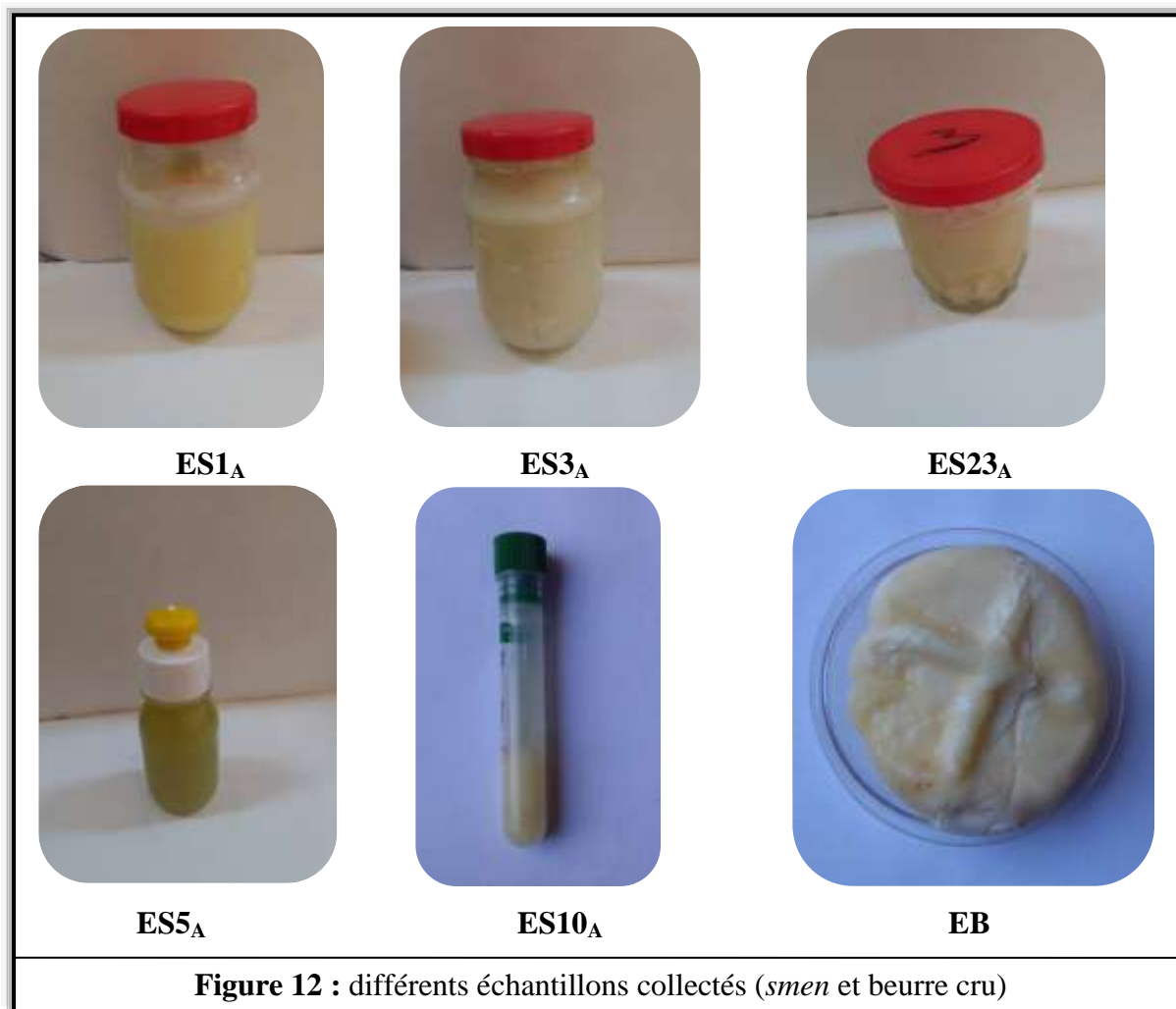
- Wilaya d'El-Oued : deux échantillons (du *smen*) ;

● Wilaya de Sétif : deux échantillons (un du *smen* ; un du beurre cru) ;
- Wilaya de Jijel : un échantillon (du *smen*) ;

● Wilaya de Bejaïa : un échantillon (du *smen*).

Figure 11 : localisation des régions de prélèvement (Djazaïrouna l'Atlas pratique de l'Algérie, 2004)

Les différentes photos des échantillons sont présentées au niveau de la figure suivante ;



3.3. Méthode de recueil des données sur les échantillons

Le but de cette étape est de connaître la traçabilité des échantillons qui font l'objet de notre travail ainsi que leurs modes de préparation avec un effectif total des personnes enquêtées de six.

Le questionnaire est conçu autour des éléments suivants (fiche de questionnaire en annexe 01) :

- Informations sur les personnes à enquêter : âge, sexe, origine et activité professionnelle ;
- Matière première : cette partie comprend la description de la matière première (beurre) et sa préparation ;
- Mode de préparation : notion sur les étapes de préparation de produit final (*smen*) ;

- Caractéristiques du *smen* obtenu : cette section vise à recueillir les informations sur l'aspect, la couleur, l'odeur du produit final (*smen*) consommé ;
- Mode de conservation et de consommation du *smen*.

La fiche du questionnaire a été élaborée de manière à faciliter la compréhension par les répondants et traduit en arabe pour faciliter la communication avec les enquêtés. Le questionnaire était rempli sur place au fur et à mesure que les informations nous étaient données.

4. Analyses physicochimiques

Les paramètres physicochimiques ont été recherchés autant qu'ils font partie des plus importantes caractéristiques du beurre cru et du *smen* et permettent d'avoir une représentation de la composition de nos échantillons dans un but de voir la relation entre les microorganismes isolés et les caractéristiques de leurs écosystèmes (teneurs en matière grasse, en humidité, etc.).

Nos analyses physicochimiques reposent sur l'étude des paramètres suivants : la mesure du pH qui donne la concentration des ions H^+ , la détermination du taux de la matière grasse, du taux d'humidité, de l'extrait sec total ou le taux de matière sèche et de l'extrait sec dégraissé.

4.1. Mesure du pH

Une quantité de 10 g de chaque échantillon (*smen*, beurre cru) a été homogénéisée vigoureusement. Le pH des échantillons a été déterminé directement en utilisant un pH-mètre de type Ohaus ST3100 (annexe 3) où l'électrode a été insérée directement dans chaque échantillon (Owusu-Kwarteng *et al.*, 2012). Trois mesures ont été réalisées.

4.2. Mesure du taux de la matière grasse, de l'humidité, de l'extrait sec total et dégraissé

Une boîte de Pétri a été remplie du beurre cru ou du *smen* puis elle a été introduite dans l'analyseur infrarouge Food Scan™-FOSS qui est un instrument rapide, précis, son utilisation est facile et sert à l'analyse du beurre. Il mesure avec précision tout un éventail de paramètres et seule une préparation minime des échantillons est nécessaire. Dans notre mesure, trois essais ont été réalisés.

L'analyseur Food Scan™-FOSS pour produits laitiers utilise la transmission proche infrarouge dans une région de 850 à 1 050 nm, l'analyse proche infrarouge est une technique

spectroscopique qui utilise le spectre électromagnétique. Le principe de fonctionnement de l'analyseur infrarouge est décrit en annexe 6.

5. Recherche de bactéries productrices de lipases

5.1. Préparation des échantillons

Deux grammes et demi (2,5) de chaque échantillon ont été placés dans un tube à essai avec 2,1 mL d'une solution saline stérile (Guiraud, 2003) à 0,85 % puis chauffés à 37°C jusqu'à liquéfaction (Ongol et Asano, 2009). Après homogénéisation vigoureuse, le mélange est laissé au repos au bain-Marie Memmert (annexe 3) à 37°C jusqu'à séparation des deux phases. Une série de dilutions jusqu'à 10^{-5} est préparée de façon classique en prélevant 1 mL de la phase aqueuse avec une pipette stérile dans 9 mL de la solution saline stérile (0,85 %) (Guiraud, 2003).

5.2. Milieux utilisés et mise en culture

Le screening ciblé est une stratégie très utilisée, elle permet un isolement sélectif, dans ce cadre, notre criblage a été orienté en employant 7 milieux d'isolements contenant une source de lipide (l'huile d'olive et/ou le Tween 80, le jaune d'œuf ; voir annexe 5) qui a été choisie dans notre étude pour mettre en évidence la présence des souches lipolytiques. Les milieux que nous avons utilisés (composition en annexe 2) sont non sélectifs pour les bactéries, les levures et les moisissures, mais ils permettent d'isoler les différentes catégories des souches productrices de lipases.

L'ensemencement se fait en surface de deux boîtes de Pétri par dilution et par milieu de culture, en étalant de 0,1 mL sur l'une des géloses citées au niveau du tableau 8 (Guiraud, 2003 ; Priji *et al.*, 2015). Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 7 jours à $37\pm 1^\circ\text{C}$ en aérobiose (milieux GN_{TH}, GN_{JO}) (Adejuwon, 2013) ; pendant 48 h à $37\pm 1^\circ\text{C}$ en anaérobiose par la méthode de la bougie pour (MRS_H, MRS_T et M17_H) (Ongol et Asano, 2009) et pendant 4 jours à $30\pm 1^\circ\text{C}$ en aérobiose pour les autres milieux (Adejuwon, 2013).

Les souches productrices de lipases sur GN_{TH} et MRS_T sont entourées d'un halo opaque dû à la précipitation des sels d'acide gras (Sierra, 1957 ; Guiraud 2003 ; Priji *et al.*, 2015). Pour les milieux MRS_H et M17_H les colonies sont entourées d'un halo clair, alors que pour les autres milieux après 4 jours d'incubation, les boîtes de Pétri sont inondées par une solution saturée stérile de sulfate de cuivre (II) et laissées pendant 15 minutes. L'apparition

d'un halo verdâtre autour de la colonie est considérée comme positif cela est dû à la précipitation des oléates de cuivre (sels d'acides gras) (Adejuwon, 2013).

Tableau 8 : milieux utilisés pour l'isolement des souches lipolytiques

Codes	Milieux de base	Sources de lipides *	Composants additionnels	pH	Références
GN _{TH}	Gélose nutritive	Tween 80 (1%) et l'huile d'olive (1%)	CaCl ₂ : 0,01% NaCl : 0,5% Peptone : 0,5% Extrait de levure : 0,3%	6,68	(Priji <i>et al.</i> , 2015)
PDA _H	glucosée à l'extrait de pomme de terre	l'huile d'olive (1 %) **	-	5	(Guiraud, 2003 ; Sorokin & Jones, 2009)
SD _H	Gélose Sabouraud Dextrose				
OGA _H	Gélose glucosée à l'oxytétracycline (milieu de base sans l'oxytétracycline)				
GN _{JO}	Gélose nutritive	jaune d'œuf (8 %)		6,68	(Guiraud 2003)
MRS _H	Gélose de Man Rogosa et Sharpe (sans tween 80)	1% de l'huile d'olive **	CaCO ₃ : 0,5 %	6,68	(Karam <i>et al.</i> , 2012)
M17 _H	Gélose de Terzaghi				
MRS _T	Gélose de Man Rogosa et Sharpe (sans tween 80)	1% de Tween 80	CaCl ₂ : 0,01% NaCl : 0,5%		

H : huile d'olive ; **T** : Tween 80 ; **JO** : jaune d'œuf ; - : aucun composant est additionné

* : la source lipidique stérile est additionnée aux milieux de culture stériles maintenus à 60°C

** : c'est une émulsion de l'huile d'olive dans une solution aqueuse de la gomme arabique (5% p/v), voir annexe 5

5.3. Dénombrement des souches

Les colonies développées sur les boîtes de Pétri sont comptées à l'aide d'un compteur de colonie de type Bioblock Scientific (annexe 3) et l'estimation de la population est calculée par la formule suivante (Guiraud, 2003) :

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Où :

ΣC : la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et contenant entre 10 et 300 colonies ;

n_1 : nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 : nombre des boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Parmi le nombre total des colonies, une autre estimation de la flore lipolytique doit être réalisée par le comptage des colonies lipolytiques obtenues et l'application de la même formule utilisée au dénombrement de la flore totale. Pour l'isolement, nous avons tenu compte que des souches lipolytiques.

5.4. Isolement des souches lipolytiques

Les isolats possédant un pouvoir lipolytique sont séparés, selon leur morphotype (couleur, aspect et texture), purifiés par un repiquage successif sur le même milieu d'isolement, Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possibles afin conserver la stabilité génétique des souches (Guiraud, 2003) et codifiés (tableau 9).

Tableau 9 : abréviations utilisées

milieu de culture	Nature du prélèvement		Codes *
Gélose Nutritive additionne de l'huile d'olive et de Tween 80	Beurre cru	B	BG
	<i>Smen</i>	S	SG
Gélose nutritive additionne du jaune d'œuf	Beurre cru	B	BGJ
	<i>Smen</i>	S	SGJ
Gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre	Beurre cru	B	BP
	<i>Smen</i>	S	SP
Gélose Sabouraud Dextrose	Beurre cru	B	BS
	<i>Smen</i>	S	SS
Gélose glucosée à l'oxytétracycline	Beurre cru	B	BO
	<i>Smen</i>	S	SO
Man-Rogosa-Sharp additionne de l'huile d'olive	Beurre cru	B	BM
	<i>Smen</i>	S	SM
Man-Rogosa-Sharp additionne de Tween 80	Beurre cru	B	BMT
	<i>Smen</i>	S	SMT
Gélose de Terzaghi	Beurre cru	B	BT
	<i>Smen</i>	S	ST

* Des numéros 1, 2, etc. sont ajoutés au codes pour désignés les souches isolées différentes

5.5. Conservation des isolats lipolytiques

Les isolats purs sont conservés par deux techniques :

À court terme : afin de maintenir les souches viables et disponibles le long de notre étude. Les isolats sont repiqués en boîtes de Pétri ou sur gélose inclinée en tubes, sur le même milieu d'isolement, après incubation à 37°C pendant 14 jours les boîtes ont été scellées avec

du parafilm et maintenues à 4 °C (Dworkin *et al.*, 2006 ; Sandoval, 2012). Un repiquage des souches est nécessaire chaque trois mois.

À long terme : afin de préserver une fraction riche en cellules viables pendant 1 à 2 ans, nous avons utilisé la technique de congélation à – 20°C. Pour cela, des cultures pures sont placées en tubes Eppendorfs contenant le bouillon nutritif (annexe 2) additionnés de 20% (v/v) de glycérol stérile comme cryoprotecteur et ensuite conservés directement à – 20 °C (Larpent, 1997 ; Dworkin *et al.*, 2006).

5.6. Screening des isolats potentiellement lipolytiques

Les souches isolées pures capables de produire la lipase sont cultivées sur le milieu gélosé pour le screening des meilleurs producteurs (Höfelmann *et al.*, 1985), selon la technique de Tansey (1971) qui permet de visualiser l'hydrolyse des lipides par la mesure de la zone d'opacification du milieu. Elle est réalisée dans le milieu GN_{TH} contenant deux sources lipidiques (1 % de l'huile d'olive et 1 % de Tween 80). Le milieu est réparti en tubes à essais à raison de 10 mL puisensemencé sur une surface non inclinée, avec une quantité de cellules. Ces tubes sont incubés à 37 °C en présence d'un témoin nonensemencé. La première lecture est observée après trois jours d'incubation, puis après 6, 9 et 12 jours. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une zone d'hydrolyse opaque évaluée par la mesure en mm par le biais d'un papier millimètre de l'hauteur d'opacification.

5.7. Caractérisation des isolats lipolytiques

Après dénombrement des souches lipolytiques et sélection des isolats potentiellement producteurs de lipases, des tests microscopiques, cultureux et biochimiques sont réalisés : la coloration de Gram, la recherche de la mobilité, la sporulation, la recherche de la catalase et la dégradation du mannitol (Holt *et al.*, 1994 ; Leyral *et al.*, 1998 ; Guiraud, 2003).

5.7.1. Étude morphologique et culturale

Une observation macroscopique et microscopique des isolats a été effectuée après chaque repiquage pour vérifier la pureté de chaque souche et la catégorie de chaque isolat.

L'examen macroscopique des colonies (forme, taille, couleur, etc.) est réalisé à l'aide d'une loupe binoculaire MOTIC S-10-P (annexe 3).

La forme, le groupement cellulaire et le Gram des isolats sont déterminés par deux techniques de coloration la première est simple et la deuxième différentielle (décrite par Gram

en 1884) à l'aide d'un microscope photonique Motic B1-220 ASC (annexe 3). Les protocoles des colorations effectués ont été décrits par Guiraud (2003), voir annexe 5.

5.7.2. Test de mannitol-mobilité

La mobilité cellulaire est déterminée sur le milieu mannitol-mobilité (annexe 2), un ensemencement par piqûre au fil droit du milieu semi-solide en culot est effectué. Après incubation de 24 h à 3 jours (pour les souches qui ont une croissance lente) et à 30 °C, la mobilité de germe se traduit par envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu, l'attaque du mannitol est exprimée par un virage de couleur rouge vers jaune (Guiraud, 2003).

5.7.3. Test de la catalase

Chez les isolats doués d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée (H₂O₂) en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une colonie de l'isolat à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

5.7.4. Test de sporulation

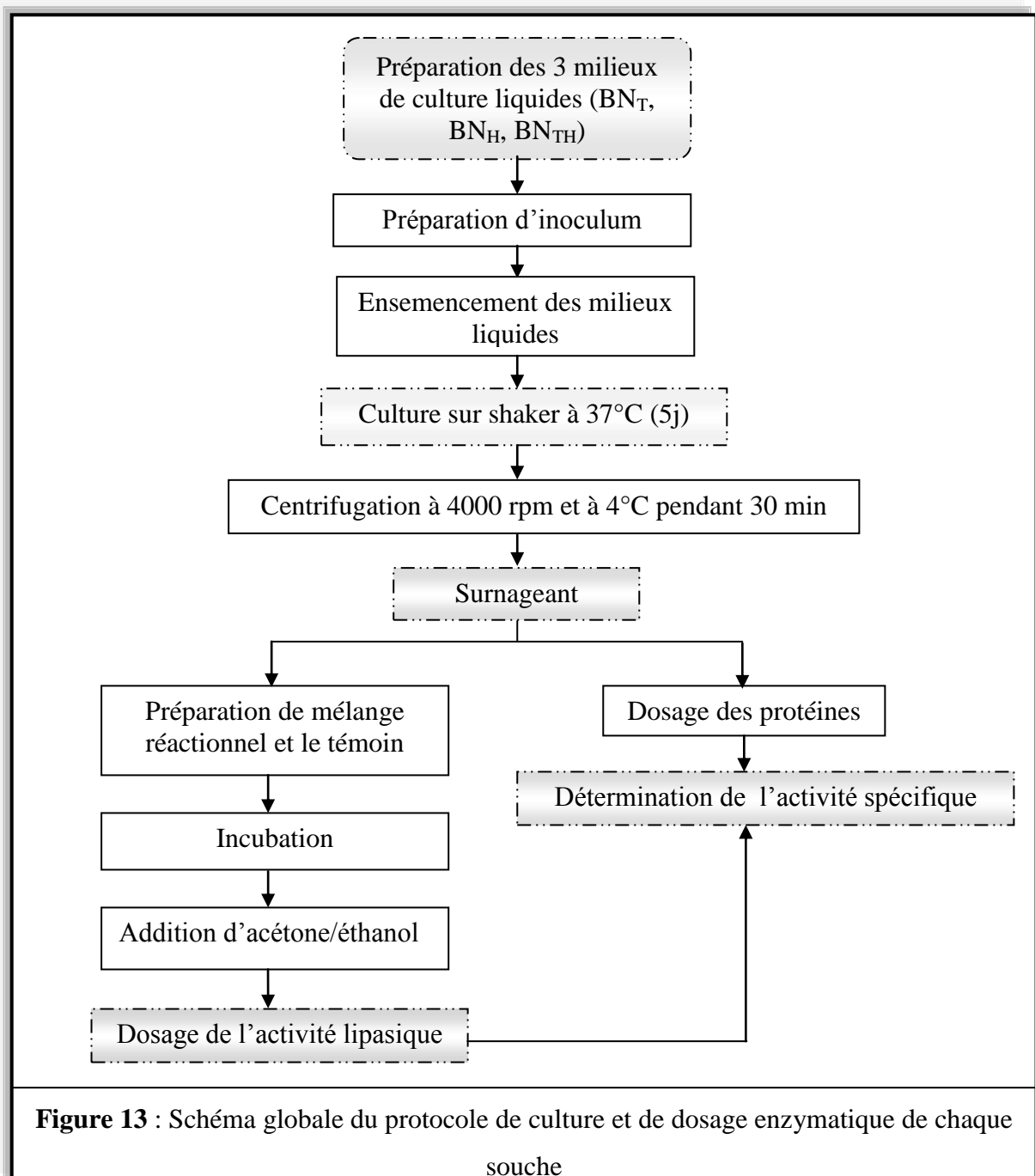
La sporulation peut être mise en évidence par le test de thermorésistance, une culture âgée (3 à 10 jours) sur le bouillon nutritif contenant 0,004 % de sulfate de manganèse en tube à essais, subit 10 minutes de chauffage au bain-Marie à une température de 80°C. Le sulfate de manganèse est un agent favorise la sporulation. Le tube est ensuite repiqué sur le bouillon nutritif et incubé à 30°C pendant 2-3 jours ou plus. S'il ya développement microbien, il y a présomption de la sporulation. Quelques rares espèces non sporulées étant capables de résister dans ces conditions, cette prévention est confirmée par la coloration décrite par Bartholomew et Mittwer, voir annexe 5 (Guiraud, 2003).

6. Production de lipases

Afin d'étudier la production de lipases extracellulaires par les isolats sélectionnés selon la méthode de Tansey (1971) et qui possède une forte activité sur gélose, des cultures en milieu liquide ont été effectuées. Nous avons utilisé une méthode de dosage de référence qui est la titration pour la mesure du taux de la réaction de lipase dans des préparations brutes en déterminant le taux de production d'acides gras (Smeltzer *et al.*, 1992).

En raison qu'elle est pratique et à faible coût, la titration a été utilisée pour caractériser l'activité et la spécificité de la lipase qui a été mesurée sur une émulsion agitée mécaniquement de triacylglycérides naturels par la neutralisation des acides gras libérés au cours du temps par l'addition de NaOH afin de maintenir le pH à une valeur finale constante. Alors que l'huile d'olive a été utilisée comme substrat pour détecter l'activité des vraies lipases (Ferrato *et al.*, 1997).

Les différentes étapes utilisées pour les cultures des souches, la production et le dosage des lipases par titration sont illustrées dans la figure 13.



6.1. Milieux de culture

Les souches bactériennes qui présentent un halo important sur le milieu gélosé sont cultivées sur trois milieux liquides, selon la méthode de Cadirci *et al.* (2016). Cependant, chaque milieu liquide est constitué du bouillon nutritif additionné de 0,01 % : CaCl₂, 0,5 % : NaCl, 0,5 % : peptone et 0,3 % : extrait de levure, mais la différence entre eux est la nature de la source lipidique, en ajoutant :

- Au premier milieu (BN_T) : 2 % de Tween 80. Ce milieu est utilisé pour mettre en évidence l'activité estérasique ;
- Au deuxième milieu (BN_H) : 2 % de l'huile d'olive émulsifié dans une solution aqueuse de la gomme arabique à 5 % (p/v). Ce milieu est utilisé pour définir l'activité de vraie lipase ;
- Au troisième milieu (BN_{TH}) : 2 % de l'huile d'olive émulsifié avec le Tween 80 (v/v). Ce milieu est utilisé pour définir l'effet de Tween 80 sur l'activité des vraies lipases.

Le pH des milieux liquide est de 6,68 alors que les émulsions stériles préparées (annexe 5) sont additionnées aux milieux stériles maintenus à 60°C.

6.2. Culture en milieu liquide des isolats producteurs de lipase

Les milieux préparés ont été répartis dans des flacons et des tubes à essais puisensemencés selon les étapes suivantes :

6.2.1. Préparation d'inoculum

Pour définir la même concentration des cellules ajoutées aux milieux de culture, une préparation d'inoculum a été réalisée. Pour toutes les souches sélectionnées, des suspensions denses ont été réalisées où une quantité de cellules de 48 h de culture à 37°C a été mise dans des tubes contenant 3 mL des milieux liquides préparés précédemment. Après avoir introduit les cellules, nous avons agité sur Vortex et cultivé à 37°C dans un bain-Marie agité Memmert (annexe 3) à 150 tours par minute (rpm), après 24 h de culture une standardisation des inocula est effectuée, nous avons dilué convenablement à l'aide d'une solution saline stérile une partie aliquote de ces suspensions afin d'obtenir une densité optique de 0,2 à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu, voir annexe 3 (Bastide *et al.*, 1986 ; Taskin *et al.*, 2016).

6.2.2. Mise en culture

Tous les inocula des bactéries productrices de lipases sert à ensemercer séparément 20 mL des mêmes milieux liquides contenus dans des flacons en raison de 10 %, ensuite les flacons sont incubés à $37\pm 1^\circ\text{C}$ dans un bain Marie agité à 150 rpm, pendant cinq jours (Shivareddy *et al.*, 2010 ; Sirisha *et al.*, 2010).

6.3. Préparation de l'enzyme lipase à partir de bouillon de la culture

Le bouillon de la culture microbienne de chaque isolat est centrifugé à 4000 rpm pendant 30 min à 4°C par une centrifugeuse de type NF400 / 400R (annexe 3). Le surnageant de chaque culture est collecté séparément dans des tubes à essais propres et utilisé immédiatement comme source de lipase brute pour les essais titrimétriques afin de doser l'activité de lipases (Sirisha *et al.*, 2010).

6.4. Dosage de l'activité lipasique par titration

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzymes active dans une préparation. L'activité de la lipase est mesurée par une méthode titrimétrique en utilisant l'huile d'olive en tant que substrat à pH 7. Cette analyse est simple, nécessite peu ou pas d'équipement sophistiqué et elle prend du temps ce qui peut la rendre non souhaitable pour le dosage d'activité lipolytique à grande échelle (Thomson *et al.*, 1999 citer par Lopes *et al.*, 2011).

Le dosage de l'activité lipasique a été fait selon la méthode d'Aly *et al.* (2012), où le **milieu réactionnel** est préparé dans des Erlenmeyers : 1 mL de surnageant de chaque culture est additionné à un mélange préparé par 10 mL de la solution A, 2 mL de la solution B et 5 mL de la solution C, les solutions sont mentionnées au niveau du tableau (10). Parallèlement, le témoin est préparé en remplaçant le surnageant par 1 mL de l'eau distillée.

Le milieu réactionnel et le témoin sont incubés sur Shaker à 150 rpm. Après 20 min, la réaction est stoppée et les acides gras sont extraits par l'ajout de 20 mL de la solution D puis tourbillonnant le contenu rapidement. 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine sont additionnées à chaque mélange réactionnel et au témoin ensuite, ils sont titrés par une solution de NaOH à 0,1 M (mol.L^{-1}) jusqu'au changement de couleur vers le rose à pH 10. Chaque dosage est effectué en triple.

Tableau 10 : solutions utilisées pour la réaction colorimétrique permettant le dosage de l'activité lipasique

Solution	Préparation
Solution A	10% (v / v) d'huile d'olive émulsionné dans la gomme arabique à 10 % (p / v)
Solution B	Solution de CaCl ₂ à 0,6 %.
Solution C	Tampon phosphate à 0,2 mol/L et à pH 7.
Solution D	un mélange de l'acétone et de l'éthanol (v/v)

* : une préparation plus détaillée des solutions est mentionnée au niveau de l'annexe 2 sauf pour l'émulsion de l'huile d'olive, la préparation est en annexe 5.

L'activité lipasique est calculée selon la formule :

$$v_0 = \text{Activité } (\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}) = \frac{(V_S - V_B) \cdot N \cdot 1000}{V_R \cdot T}$$

V_S : volume de NaOH consommé pour la titration de volume réactionnelle ;

V_B : volume de NaOH consommé pour la titration de témoin (blanc) ;

N : normalité de NaOH ;

1000 : facteur de conversion de mmol au μmol ;

V_R : volume réactionnel (18 mL).

T : temps de la réaction (20 min).

Une unité (U) de lipase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmol d'acides gras par minute dans les conditions de la réaction (Pinsirodom et Parkin, 2001).

6.5. Détermination de l'activité spécifique de l'extrait brute

À partir de l'activité lipasique, une activité spécifique est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines du surnageant de culture et exprimée en U/mg, selon la formule suivante (Pinsirodom et Park, 2001) :

$$\text{act. sp.} = \frac{v_0}{a}$$

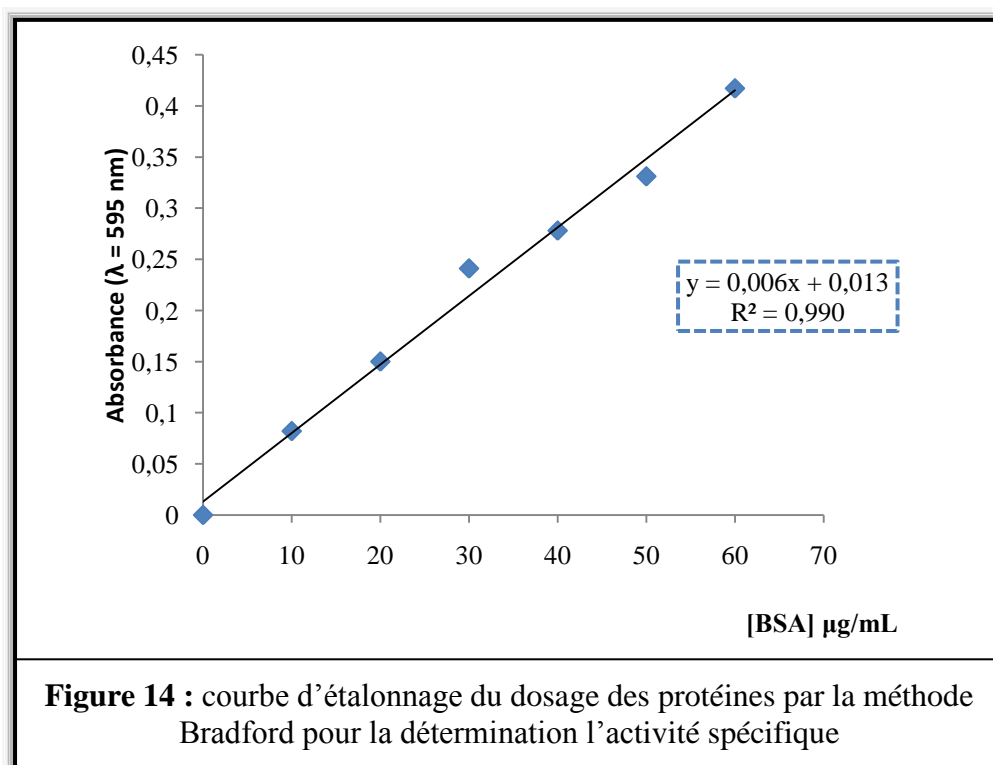
act.sp. : activité spécifique

v₀ : activité lipasique ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$)

a : quantité en mg de protéine dans un mL de surnageant.

Alors que le dosage des protéines totales dans les surnageants des cultures microbiennes est déterminé selon la méthode de Bradford (1976). C'est une méthode colorimétrique qui utilise le bleu de Coomassie G-250 qui se lie aux protéines, provoquant l'augmentation de l'absorbance de 365 à 595 nm. Une fois lié aux protéines, sa couleur vire du rouge vers le bleu et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. Le haut coefficient d'extinction permet d'avoir un dosage des protéines même à faibles concentrations (< 20 µg/mL).

La solution mère de BSA (Sérum Albumine de Bovin) utilisée pour la préparation de la gamme d'étalonnage a une concentration de 1 mg/mL. Les dilutions préparées ont des concentrations de 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 µg/mL de BSA, additionnées de l'eau distillée et du réactif de Bradford (annexe 2). L'absorbance de la gamme étalon à la longueur d'onde 595 nm permet de tracer la courbe d'étalonnage (figure 14). En fonction de la densité optique des protéines contenant dans le surnageant, leur concentration est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage.



7. Étude statistique

Afin d'analyser et exploiter nos données pour répondre aux objectifs fixés, des analyses statistiques ont été employées. Les traitements des données ont été effectués à l'aide du logiciel XLStat (Version 2009.1.01. Addinsoft ®) comme un outil rapide d'exploration de

données. La préparation des histogrammes et le calcul des moyennes, les écarts types et les teneurs de protéines ont été faits sous Microsoft Office Excel 2007.

Afin de visualiser la distribution des souches lipolytiques et les groupes qu'elles forment, une analyse par classification ascendante hiérarchique (CAH) en utilisant la méthode de ward et la distance euclidienne a été utilisée. La CAH est une méthode itérative fondée sur des regroupements progressifs dans la mesure où l'intérêt est d'obtenir des groupes les plus contrastés possibles.

L'analyse en composante principale (ACP) nous a permis de montrer les différences entre groupes de CAH ou d'obtenir une meilleure visualisation des relations entre les caractéristiques quantitatives de production de lipase par les souches et les propriétés des milieux de culture (Gagaoua, 2015).

À la fin, nous avons réalisé une analyse de variance sur les différents paramètres physicochimiques étudiés pour les comparer, ainsi que une analyse de variance sur les groupes de CAH afin de déceler les variations des activités lipolytiques entre les bactéries cultivées sur le même milieu et les variations dues à l'effet de la source lipidique contenant dans le milieu de culture. La séparation des moyennes a été effectuée suivant Tukey à $P < 0.05$. Les valeurs de $P < 0,05$; $P < 0,001$; et $P < 0,0001$ sont considérées comme significatives et les valeurs $P > 0,05$ comme non significatives.

Résultats & Discussion

1. Résultats

1.1. Collecte des données sur les échantillons

1.1.1. Identification d'interviewers

Dans le but de recueillir des informations sur tous les échantillons, nous avons interviewé six personnes (hommes : 3 ; femmes : 3). Les deux femmes sont âgées de 74, 70, 65 ans, respectivement. Ce sont des femmes aux foyers habitant les wilayas (Sétif, Jijel, Bejaia). Tandis que les hommes sont âgés de : 40, 45, 62 ans, respectivement. Parmi eux, deux pratiquent la commercialisation des produits laitiers, un commercialise les plantes médicinales et ces derniers habitent les wilayas (El-oued et Sétif). Toutes les personnes enquêtées vivent dans des régions rurales sauf un vit en ville.

1.1.2. Matière première : lait

Le lait cru, constitue la matière première de préparation du beurre cru et du *smen*. Les laits de vache (ES1_A, ES23_A, ES5_A, EB) et de chèvre (ES10_A, ES3_A) sont seulement utilisés. Nous avons constaté qu'aucune personne n'utilise d'autres laits, car seuls les laits de vache et de chèvre sont disponibles dans leurs régions.

1.1.3. Préparation du beurre cru et du *smen*

Le lait cru est fermenté à température ambiante (18°C-38°C ; 6-48 h, selon la saison). Parmi les femmes aux foyers enquêtées seule une ajoute une certaine quantité de lait caillé au lait cru de chèvre avant la fermentation du mélange, cette personne a préparé l'échantillon de *smen* ES10_A.

Une fois le lait est caillé (rayeb) ; il subit un barattage dans la " *chekwa* " ou dans des jarres en terre cuite ou dans un autre ustensile " *taxsaut ssendu* " ce dernier est une baratte de la région de Kabyle d'origine végétal " *Calebasse* ". La durée de barattage est de 30 min à 1 h pour les échantillons (EB, ES5_A, ES10_A) ou de 1h à 3h pour les échantillons (ES1_A, ES3_A, ES35_A).

L'eau tiède est ajoutée à la fin du barattage pour permettre la séparation de la matière grasse. Celle-ci est recueillie dans un récipient où elle est lavée plusieurs fois à l'eau froide pour éliminer *Lben*. Le beurre obtenu est conservé par cinq méthodes :

- Le beurre est conservé tel qu'il est dans un bocal en verre (EB : 4 à 5 jours) ;

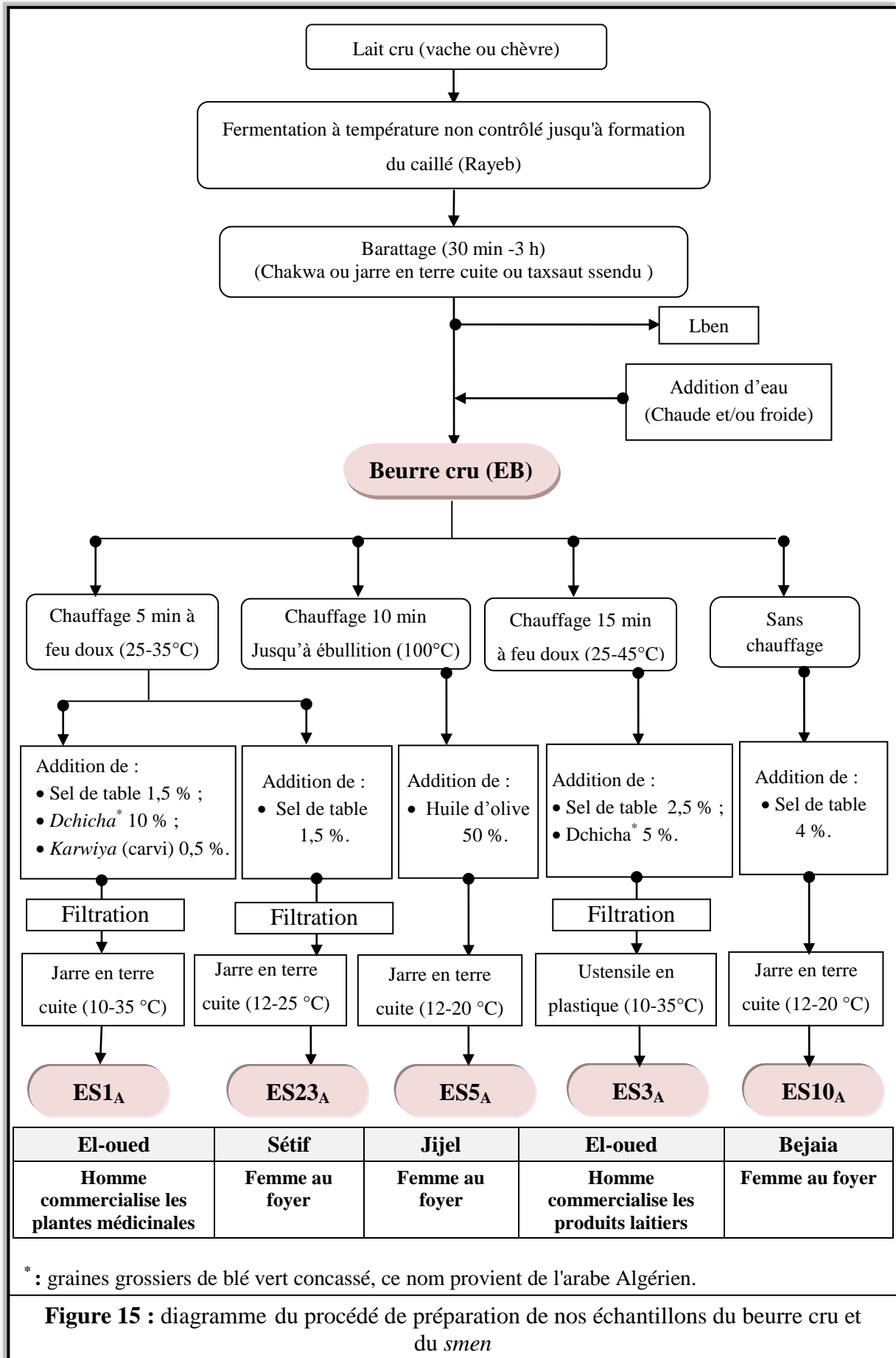
- Le beurre et le sel (4 %) sont mélangés uniformément puis ils sont mis dans une jarre en terre cuite (ES10_A) ;
- Le beurre est bouilli et après refroidissement, il est mis dans une jarre en terre cuite, recouvert par une couche de l'huile d'olive (v/v) et conservé (ES5_A) ;
- Le beurre est lavé à l'eau salée puis additionné de sel (1,5 %) et mélangé uniformément, après une conservation de trois mois, il subi un chauffage (25-35 °C). L'écume (*Raghousa*) formée est éliminée au cours du chauffage. Après refroidissement, le *smen* est filtré et mis dans des jarres en terre cuite (ES23_A).

Le beurre additionné de sel (ES1_A : 1,5 % ; ES3_A : 2,5 %) est chauffé (ES1_A : 25-35°C ; ES3_A : 25-45°C). À la fin du chauffage, ce produit est mélangé avec *dchicha* (ES1_A : 10 % ; ES3_A : 5 %) et le carvi (ES1_A, 0,5 %), selon les personnes enquêtées la *dchicha* permet d'absorber l'eau restante et le carvi permet d'améliorer le goût. Après refroidissement, le *smen* est filtré puis mis dans une jarre en terre cuite (ES1_A) ou dans un ustensile en plastique (ES3_A).

Tous les produits décrits sont conservés dans un endroit frais sous atmosphère confinée et pendant une durée indéterminée.

Selon les personnes enquêtées le *smen* est ajouté dans les plats traditionnels pour améliorer le goût et la qualité nutritionnelle, apporter des arômes, il peut être utilisé comme traitement aux allergies, l'asthme, la constipation et le mal de tête. Cependant, parmi les personnes enquêtées, trois commercialisent le *smen* préparé.

Selon les données rassemblées, nous avons pu mettre au point le diagramme de préparation de nos échantillons (figure 15).



1.2. Analyses physicochimiques

Les résultats des analyses physicochimiques des échantillons étudiés sont présentés sous forme de moyennes \pm écarts types. Ces derniers sont accompagnés avec une comparaison par le biais du test ANOVA-Tukey au seuil de 5 % ($p < 0,0001$) (tableau 11).

Selon ces résultats, il y a une différence significative entre les paramètres physicochimiques mesurés du beurre et des échantillons du *smen*. Par ailleurs, des différences non significatives ont été trouvées pour le taux de matière grasse et la teneur en eau des échantillons ES1_A et ES3_A, ainsi que pour l'extrait sec dégraissé et l'extrait sec total des échantillons ES3_A et ES23_A. Alors que des différences significatives sont notées pour le reste des paramètres des échantillons du *smen*. Cependant, tous les échantillons du *smen* présentent un pH, un taux de matière grasse, un extrait sec total et un taux d'humidité inférieur par rapport à ceux du beurre, d'autre part, nous avons observé que seul l'extrait sec dégraissé de beurre est inférieur à celui obtenu pour les échantillons du *smen*.

Tableau 11 : résultats des analyses physicochimiques du beurre cru et du *smen*

Paramètre	ES1 _A	ES3 _A	ES23 _A	EB	ES5 _A	ES10 _A
pH	4,61 \pm 0,1 ^c	4,75 \pm 0,1 ^b	4,40 \pm 0,2 ^d	5,12 \pm 0,1 ^a	ND	ND
MG (%)	73,40 \pm 0,01 ^c	73,52 \pm 0,01 ^c	73,69 \pm 0,06 ^b	83,65 \pm 0,03 ^a	ND	ND
ESD (%)	9,07 \pm 0,01 ^a	4,25 \pm 0,01 ^b	4,20 \pm 0,02 ^b	2,09 \pm 0,01 ^c	ND	ND
EST (%)	82,47 \pm 0,03 ^b	77,77 \pm 0,03 ^c	77,89 \pm 0,08 ^c	85,74 \pm 0,04 ^a	ND	ND
Humidité (%)	2,44% \pm 0,01 ^c	2,45 \pm 0,02 ^c	2,92 \pm 0,01 ^b	11,87 \pm 0,04 ^a	ND	ND

MG : taux de la matière grasse ; H : taux d'humidité ; ESD : extrait sec dégraissé ; EST : extrait sec totale

ND : absence d'analyse à la suite de la faible quantité récupérée

Même exposant = Différence non significative

1.3. Recherche de bactéries productrices de lipases

1.3.1. Dénombrement de la flore totale et la flore lipolytique

Les résultats du dénombrement des colonies par échantillon sont rassemblés dans le tableau 12, selon ces résultats l'amplitude des variations du nombre moyen de colonies obtenues entre les échantillons est relativement importante d'un milieu à l'autre (entre 0,70 et 6,30 Log UFC g⁻¹). La charge microbienne (la flore totale) la plus importante est obtenue sur le milieu GN_{TH} (6,30 Log UFC g⁻¹) dans ES23_A et sur le reste des milieux dans EB, Par contre, une absence de la flore lactique est notée sur les milieux MRS et M17 dans tous les

échantillons et aussi, une absence de la flore totale est notée sur les milieux SD_H (ES10_A et ES5_A), PDA_H (ES1_A, ES23_A, ES5_A), OGA_H (ES5_A) et GN_{JO} (ES23_A et ES10_A).

La flore lipolytique est dénombrée sur la base de l'apparition d'un halo opaque ou verdâtre ou claire autour des colonies (figure 16). Elle représente une proportion importante de la flore totale, le nombre le plus important des colonies est obtenu sur le milieu GN_{TH} (2,35 Log UFC g⁻¹) dans ES23_A. Alors que, sur certains milieux, l'absence de la flore lipolytique est notée malgré que la flore totale soit présente en citant les milieux OGA_H dans tous les échantillons, PDA_H dans tous les échantillons du *smen*, le milieu SD_H dans ES23_A et ES10_A, et le milieu GN_{JO} dans ES5_A. Nous pouvons conclure que le milieu GN_{TH} semble le plus convenable pour l'isolement des souches lipolytiques.

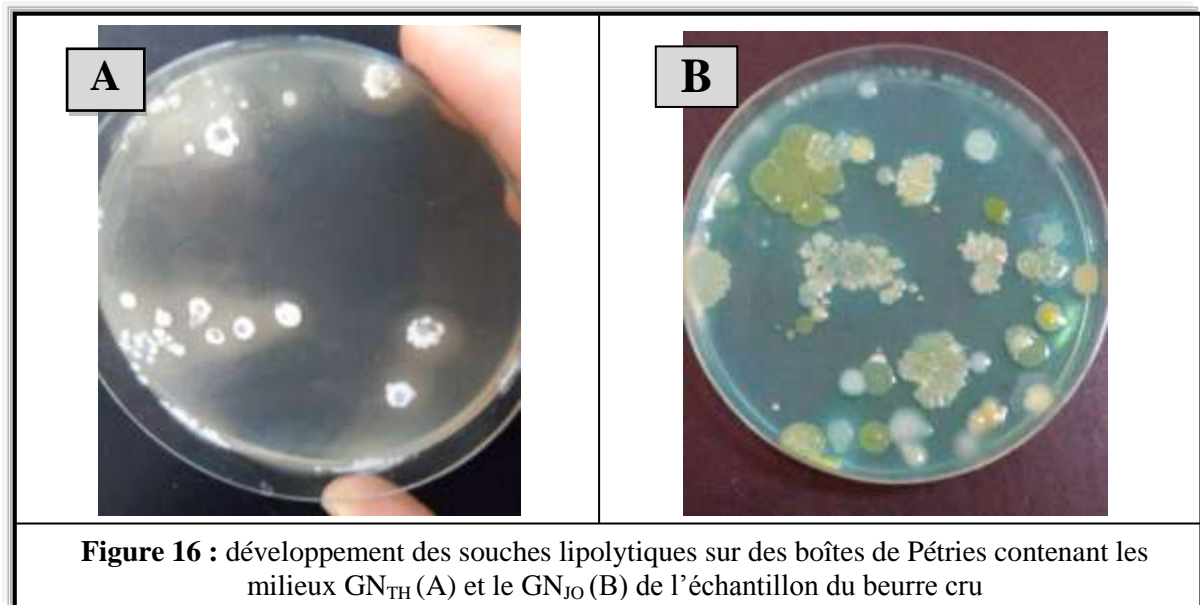


Tableau 12 : effectif de la flore lipolytique par rapport à la flore totale dans les échantillons exprimé en Log (UFC/g)

Milieux de culture	Nombre de colonies						Totale
	ES1 _A	ES3 _A	ES23 _A	ES5 _A	ES10 _A	EB	
GN _{TH}	1,77/2,85	1,61/3,73	2,35/6,30	1,56/3,46	1,74/3,00	2,20/4,99	11,23/21,33
SD _H	0,70/0,70	1,15/1,51	0,00/1,51	0,00	0,00/0,70	1,56/5,87	3,41/10,29
PDA _H	0,00/0,00	0,00/3,20	0,00/0,00	0,00	0,00/0,70	1,56/5,49	1,56/8,69
OGA _H	0,00/0,95	0,00/2,25	0,00/0,95	0,00	0,00/2,27	0,00/3,40	0,00/8,87
GN _{JO}	0,95/2,84	1,51/3,12	0,00	0,00/1,66	0,00	1,26/5,09	3,72/12,71
MRS _H	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MRS _T	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M17 _H	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
totale	3,42/7,74	4,27/13,81	2,35/8,76	1,56 /5,12	1,74/6,67	6,58/24,84	19,92/66,94

1.3.2. Isolement de souches lipolytiques

À partir des milieux sélectifs utilisés précédemment pour le dénombrement, 159 souches productrices de lipases sont isolées, ces dernières sont majoritairement des bactéries lipolytiques. Selon les résultats rassemblés dans le tableau 13, nous constatons que pour les quatre milieux utilisés, il y a une différence importante de nombre de bactéries isolées des différents échantillons étudiés. Le nombre de colonies isolées est de 16 pour ES1_A, 19 pour ES3_A, 49 pour ES23_A, 08 pour ES5_A et 55 pour EB. Il apparaît clairement qu'un nombre plus élevé de bactéries lipolytiques est obtenu à partir de l'échantillon du beurre cru suivi par celui de l'échantillon ES23_A.

Le plus grand nombre de bactéries lipolytiques est obtenu sur le milieu GN_{TH}. En effet, ce dernier s'est montré plus efficace en permettant une bonne récupération des souches lipolytiques soit 49 et 35 isolats pour l'ES23_A et l'EB respectivement. Ceci est vérifié pour le reste des milieux. Les deux milieux SD_H et GN_{JO} n'ont pas permis d'isoler des souches productrices de lipases à partir des trois échantillons (ES23_A, ES5_A, ES10_A), alors que le milieu PDA_H a permis l'isolement des souches lipolytiques à partir d'échantillon du beurre cru (uniquement huit souches).

Tableau 13 : répartition de l'effectif des isolats lipolytiques obtenus selon leurs milieux d'isolement et leurs origines

Echantillons Milieux	ES1 _A	ES3 _A	ES23 _A	ES5 _A	ES10 _A	EB	Totale
GN _{TH}	13	09	49	08	12	35	126
SD _H	01	03	00	00	00	08	012
PDA _H	00	00	00	00	00	08	008
GN _{JO}	02	07	00	00	00	04	013
Totale	16	19	49	08	12	55	159

1.3.3. Screening des isolats potentiellement lipolytiques

La méthode de Tansey (1971) nous a permis de confirmer l'activité lipolytique de 159 souches isolées. Ce même test a permis de classer les souches productrices de lipases selon leurs degrés de lipolyse sur le milieu solide (figure 17). Ce qui permettra la sélection de souches bactériennes qui seront utilisées pour la production de lipases en milieux liquides.

Le suivi de l'évolution de la hauteur de lyse par les souches lipolytiques pendant 12 jours et à 37°C à montrer qu'à partir de 3^{ème} jour 110 isolats présentent une hauteur inférieure

à 5 mm et 49 isolats présentent une hauteur entre 5 et 15 mm (figure 18), ces 49 souches qui représentent 31 % des souches lipolytiques sont utilisées dans notre étude.

Seules, les résultats des hauteurs de lyse des isolats potentiellement lipolytiques sur milieu solide et qui sont retenus pour la production de lipase sur milieu liquide sont présentés dans le tableau 14. Les résultats chiffrés de l'évaluation des hauteurs de lyse des isolats faiblement lipolytiques (hauteur inférieure de 5 mm) se trouvent en annexe 7.

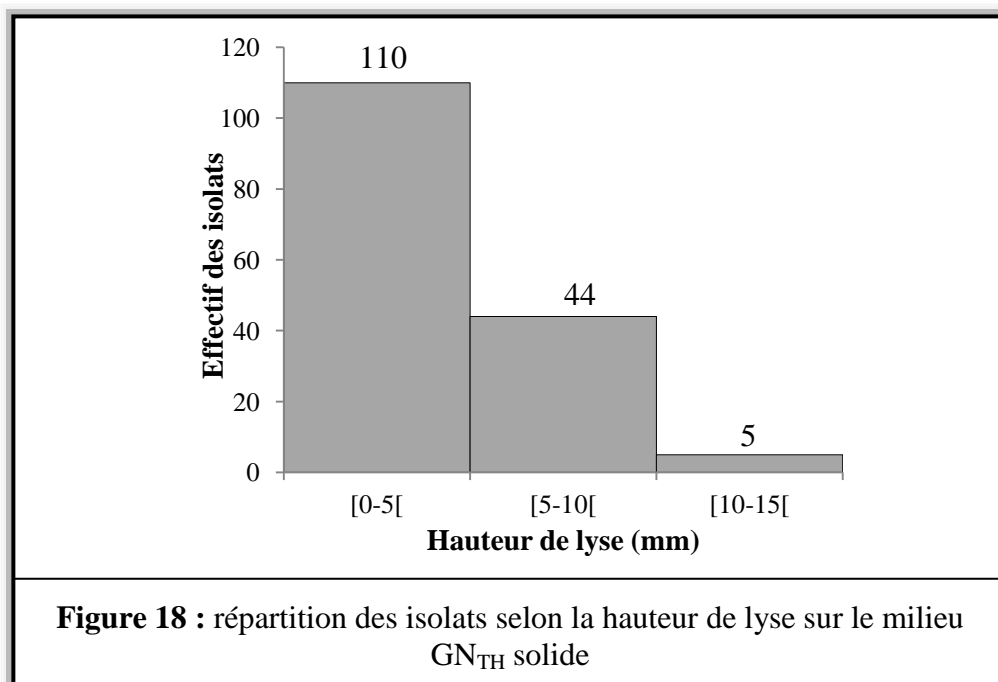
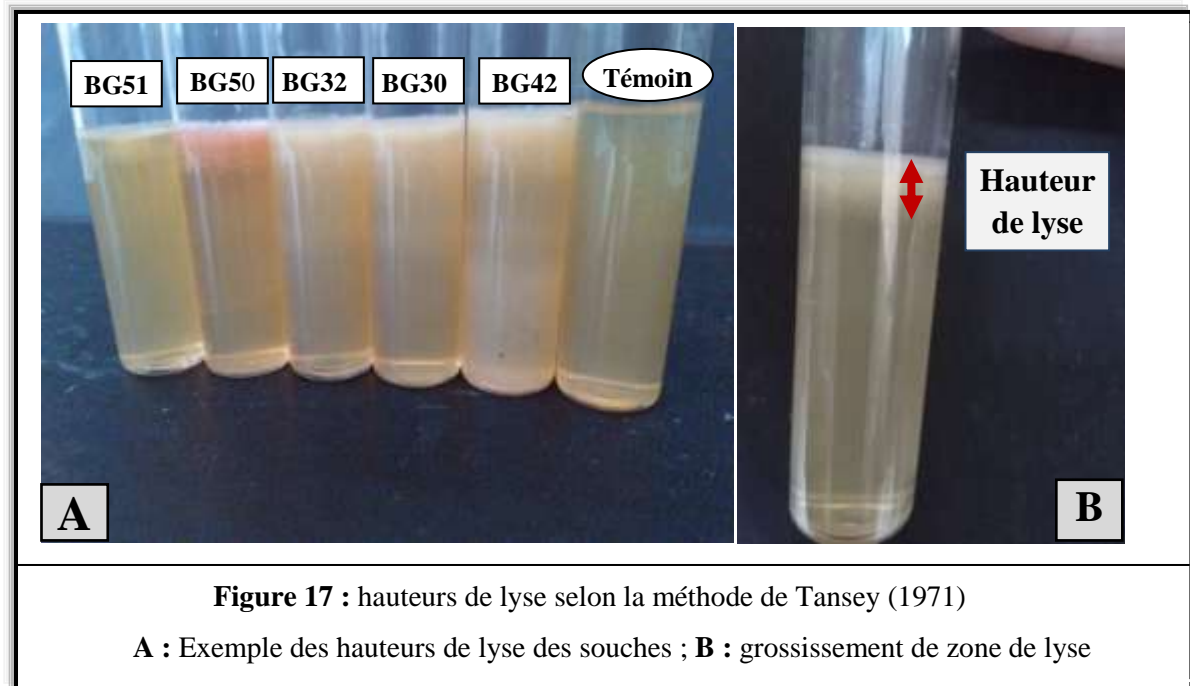


Tableau 14 : mesure de la hauteur de lyse (mm) sur milieu GN_{TH} à 37°C après différent temps d'incubation des 49 isolats sélectionnés

Codes ¹	Origines	Hauteur d'hydrolyse en mm				Echelle ² (3 ^{ème} jours)
		3 jours	6 jours	9 jours	12 jours	
SG1	ES1 _A	6.33±0.58	10.17±0.29	14.17±0.29	18,00±0,00	++
SG2		5.67±1.15	7,00±0,00	12.67±0.58	13,00±0,00	++
SG3		5.33±0.58	6.33±0.58	7,00±0,00	10,00±0,00	++
SG4		9,00±0,00	13,00±0,00	16,00±0,00	18,00±0,00	++
SG5	ES3 _A	11.50±0.87	16.17±0.29	19.67±0.58	22.33±1.15	+++
SG6		12.83±0.76	15.67±0.58	20,00±0,00	23,00±0,00	+++
SG7		5.67±0.58	8,00±0,00	11.17±0.29	13.33±2.08	++
SS46		5,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	++
SS47		6.67±0.58	11.67±0.58	11.67±0.58	11.67±0.58	++
SS48		5,00±0,00	9.67±0.58	10,00±0,00	10,00±0,00	++
SG8	ES23 _A	6,00±0,00	7.67±0.58	10.83±0.29	14,00±0,00	++
SG9		6,00±0,00	7.50±0.50	10.50±0.50	12.50±0.50	++
SG10		5.17±0.29	7.17±0.29	12.17±0.29	13.83±0.29	++
SG11		11.17±0.76	13.17±1.04	17.50±0.50	18.67±1.15	+++
SG12		5,00±0,00	7.83±0.29	10.33±0.58	10.67±1.15	++
SG13		5.67±0.29	8.33±0.29	11.67±0.58	13,00±1,00	++
SG14		7.50±0.50	10.33±1.15	13.83±0.29	14.83±0.29	++
SG15		7.17±0.58	9.67±0.76	14,00±0,00	14,00±0,00	++
SG16		5,00±0,00	10,00±0.50	12,00±0,00	14,00±0,00	++
SG17		5,00±0,00	9.83±0.29	10.67±0.58	12,00±0,00	++
SG18		5,00±0,00	11,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00	++
SG19		5,00±0,00	9.83±0.29	12,00±0,00	12,00±0,00	++
SG20		5,00±0,00	9.67±0.58	13,00±0,00	13,00±0,00	++
SG21		5,33±1,15	10,00±0,00	12.33±0.29	13,00±0,00	++
SG22		6.67±0.58	9.67±0.58	15,00±0,00	15,00±0,00	++
SG23		5.83±0.29	12,00±1,00	17.33±0.58	22,00±1.73	++
SG24		5.33±0.58	8.67±1.15	11.33±0.58	14.33±0.58	++
SG25	ES10 _A	5,00±0,00	9.33±0.58	8,00±0,00	8,00±0,00	++
SG26		5.67±0.58	6.67±0.58	6.67±0.58	6.67±0.58	++
BG27	EB	9,00±0,00	12.83±0.29	18.5±1.32	22.67±1.53	++
BG28		7,00±0,00	13.67±0.58	17.67±0.58	19.67±0.58	++
BG29		12.67±0.58	17,00±1.73	22.67±2.31	28.33±1.15	+++
BG30		7.83±0.29	13.67±0.58	19.33±1.15	23.67±0.58	++
BG31		9.83±0.29	11.67±0.58	16.67±0.58	25,00±0,00	++
BG32		9,00±0,00	11.67±0.58	19.67±0.58	20,00±0,00	++
BG33		10,00±0,00	12.50±1.50	22.17±0.29	30,00±0,00	+++
BG34		6,00±0,00	11.50±0.50	16,00±0,00	24,00±0,00	++
BG35		5,17±1,04	9.33±1.15	13,00±10,0	14,00±0,00	++
BG36		5,33±0,29	10.33±0.58	15,00±0,00	15,00±0,00	++
BG37		7,00±0,00	10,00±0,00	13.67±0.58	15.67±0.58	++
BG38		6,00±0,00	9.33±1.15	16.33±1.15	18.50±0.87	++
BG39		7,00±0,00	8.17±0.29	10,00±0,00	10,00±0,00	++
BG40		9,00±0,00	12.67±0.58	24.33±0.58	25,00±0,00	++
BG41		7,00±0,00	08.67±0.58	8.67±0.58	8.67±0.58	++
BG42		8.17±0.29	12.33±2.08	17.67±0.58	25.33±0.58	++

BG43		9,00±1,00	11.33±1.15	14.83±0.76	30,00±0,00	++
BG44		7.17±0.76	12.67±0.58	19.67±1.53	19.67±1.53	++
BG45		8,00±1.73	12.67±2.08	16,00±0,00	16,00±0,00	++
BS49		5.67±0.58	9.67±1.53	12.67±1.15	13.33±0.58	++

Suite de tableau

Symboles : ¹ S : *smen* ; B : beurre ; G : milieu gélose nutritive additionné de H et T (GN_{TH}) ; S : milieu Sabouraud dextrose additionné de H (SD_H) ; H : l’huile d’olive ; T : Tween 80

² ++ : hauteur entre 5 et 10 mm ; +++ : hauteur > 10 mm.

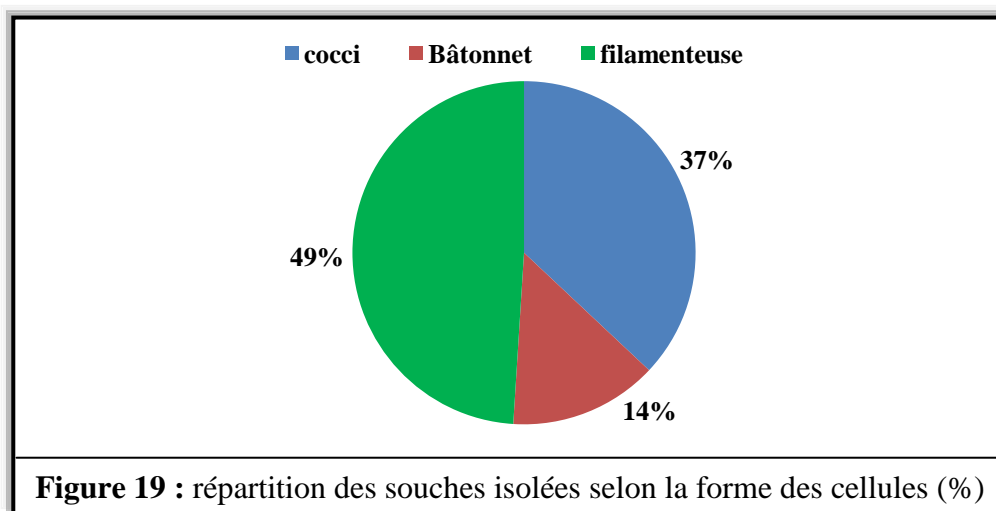
1.3.4. Caractéristiques des isolats lipolytiques

Après purification des isolats, les 49 souches bactériennes lipolytiques sélectionnés sont seules qui ont fait l’objet d’une détermination de l’aspect macroscopique et microscopique, recherche de la catalase, la mobilité, l’aptitude à la sporulation et la capacité de dégradation de mannitol.

1.3.4.1. Examen macroscopique et microscopique

L’aspect macroscopique a montré que les 49 colonies isolées sont de taille variable, de forme ronde ou irrégulière avec un pourtour régulier ou irrégulier et de couleur blanche, jaune, crème, beige et marron. Certaines de ces colonies sont dures et incrustées dans la gélose.

L’observation microscopique a révélé plusieurs formes de cellules : coque, bâtonnet et filamenteuse qui représentent des pourcentages de 37 %, 14 % et 49 %, respectivement (figure 19). La coloration de Gram permet à montrer que tous les isolats sont à Gram positifs sauf un qui est à Gram négatif (BG34).



Les tableaux (15, 16, 17) regroupent les résultats de l’examen macroscopique et microscopique des isolats.

Tableau 15 : examen macroscopique et microscopique des isolats de forme coque

Codes	Description macroscopique	Description microscopique (mode d'association)
SG (8-10)	Colonie irrégulière, cratère, pourtour lobé ; zone périphérique jaune vers orange et zone centrale crème ; Surface rugueuse.	Isolé, par 2, en chaine, en amas ou grappe de raisin
SG25	Colonie très petite ronde, bombée ; blanche ; surface lisse, aspect irisé.	Isolé, par 2, chaine ou amas
BG (27 ; 30)	Colonie ronde, bombé, translucide ; crème à jaune au centre ; surface lisse, aspect irisé.	
BG (28 ; 29)	Colonie irrégulière, bombé ; zone périphérique crème translucide et zone centrale jaune pâle ; surface lisse, aspect irisé.	Isolé ou par 2
BG34	Colonie circulaire, bombée ; blanche opaque ; surface lisse, aspect irisé.	
BG (35, 36)	Colonie ronde, épaisse, translucide ; jaune ; surface rugueuse, aspect irisé.	par 2, tétrade ou amas
BG (39-45)	Colonie ronde, bombé, translucide ; crème à jaune au centre ; surface lisse, aspect irisé.	Isolé, par 2, chaine ou amas

Tableau 16 : examen macroscopique et microscopique des isolats de forme Bâtonnet

Codes	Description macroscopique	Description microscopique	
		Morphologie cellulaire	Mode d'association
BG33	Colonie ronde, bombée, translucide ; zone au périphérique crème claire et zone centrale crème opaque ; surface lisse, aspect irisé.	Coccobacille	Isolé, par 2, chaine ou amas
SG21	Colonie irrégulière, plate, pourtour ondulé ; transparente ; crème brillante ; surface rugueuse.	Bâtonnet petit, irrégulier	En lettre alphabètes : V, L, N ; en palissades
BG (31 ; 32)	Colonie ronde, bombé ; zone périphérique crème et zone centrale jaune pâle opaque ; translucide ; surface lisse, aspect irisé.		
SG18	Colonie ronde, bossue ; zone périphérique jaune et zone centrale marron ; surface rugueuse, aspect irisé.		
SG19 SS48	Colonie ronde, épaisse, translucide ; jaune foncée ; surface rugueuse, aspect irisé.		

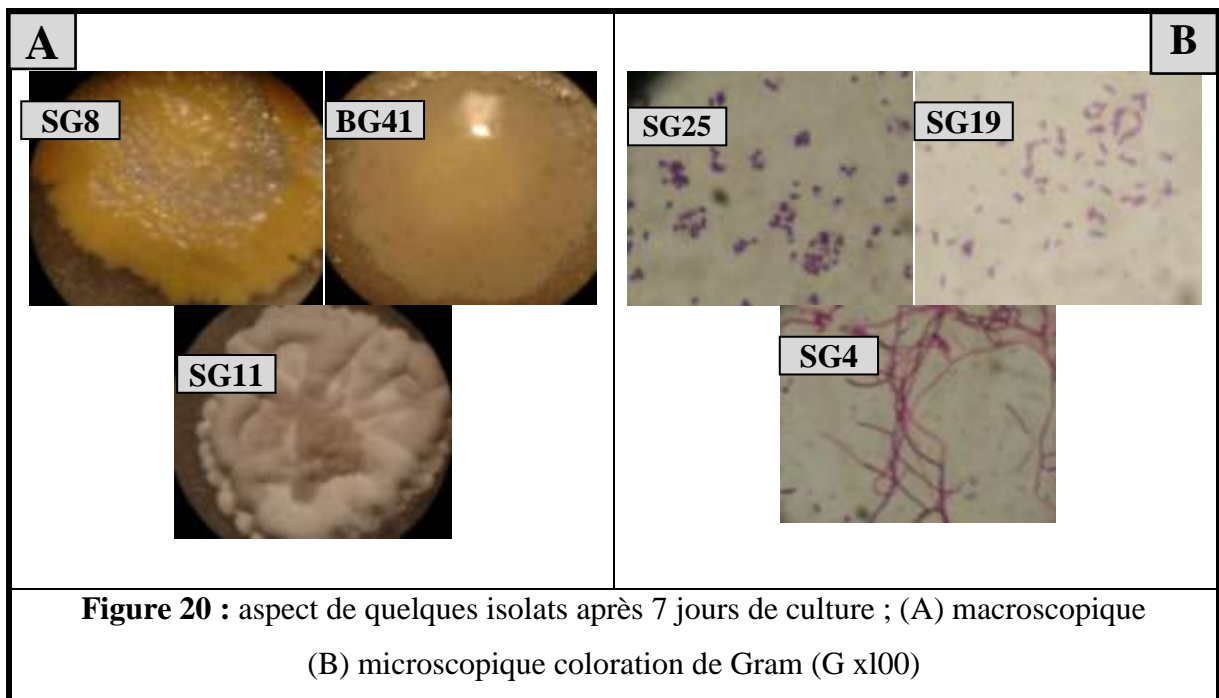
Tableau 17 : examen macroscopique et microscopique des isolats de forme filamenteuse

Codes	Description macroscopique				Description microscopique
	Forme	Aspect de surface	couleur		
			Mycélium aérien	Mycélium de substrat	
SG (1 ; 4)	irrégulière convexe, pourtour ondulé	Dentelée	Un centre beige et une périphérie blanche	Marron	Filaments ramifiés, septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
SG2	Ronde, bombée pourtour ondulé	Surface plissée et brillante	-	Crème	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
SG3	Ronde, bombée pourtour ondulé	Surface plissée et brillante	-	Crème	Filaments ramifiés, non septés
SG (5 ; 6)	Ronde, cratère, pourtour lobé	Bosselée	Blanc	Jaune	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
SG7	Irrégulière, Convexe, pourtour ondulé	Dentelée	Blanc	Jaune	Filaments ramifiés, non septés
SG11	irrégulière, élevée, pourtour lobé	Dentelée	Un centre beige et une périphérie blanche	Orange	Filaments ramifiés, septés
SG12	Irrégulière, pourtour ondulé	Surface rugueuse brillante	-	Jaune pâle à crème	Filaments ramifiés, non septés fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
SG13	Ronde, bossue, pourtour ondulé	Rugueuse	blanc	Marron	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments ovoïdes
SG (14;17)	Ronde, bossue, pourtour ondulé	Rugueuse	Un centre beige et une périphérie blanche	Jaune-crème	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments ovoïdes
SG15	Irrégulière, convexe, pourtour ondulé	Dentelé, brillante	-	Crème à jaune	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
SG16	Ronde, pourtour striation radicalaire	Rugueuse	Blanc	Marron claire	Filaments ramifiés, septés
SG20	Ronde, bossue, pourtour ondulé	Plissée, lisse brillante à la périphérie	blanc	Rouge brique	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
SG22	Irrégulière, plate, transparente, pourtour ondulé	Rugueuse brillante	-	Crème	Des bacilles longs forment des filaments avec la présence des spores
SG23	Ronde, épaisse, pourtour dentelé	Dentelé brillante	Blanc	Un centre marron et une périphérie jaune	Filaments fragmentent en éléments ovoïdes

SG24	irrégulière, plate, translucide, pourtour ondulé	Surface rugueuse	-	Blanc-crème	Filaments ramifiés, septés et fragmentent en éléments ovoïdes
SG26	Irrégulière, élevée, pourtour ondulé	dentelé	blanc	Crème	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
BG37	ronde, épaisse, pourtour ondulé	Dentelée	Blanc	Un centre marron et une périphérie crème	Filaments ramifiés, septés et fragmentent en éléments ovoïdes
BG38	ronde, épaisse, pourtour lobé	Dentelée	-	Blanche ave un halo crème à la périphérie	Filaments ramifiés et fragmentent en éléments ovoïdes
SS46	Irrégulière, bossue, pourtour ondulé	Rugueuse	-	Un centre jaune et une périphérie crème	Filaments ramifiés, septés
SS47	Irrégulière, convexe, pourtour ondulé	Dentelée	-	Beige	Filaments ramifiés, non septés et fragmentent en éléments bacillaires ou ovoïdes
BS49	ronde, épaisse, pourtour ondulé	Rugueuse	Blanc	Blanche avec un halo crème à la périphérie	Filament ramifiés, non septés

- : absence de mycélium aérien

Suite de tableau



La photographie de l'aspect macroscopique et microscopique des isolats se trouvent en annexe 4.

1.3.4.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats lipolytiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques ont permis de rapprocher les souches au groupe correspondant (tableau 18).

Parmi la collection de coques, une seule souche (BG₃₄) est à Gram négatif, catalase positive, asporulée et immobile.

Les autres formes coques sont à Gram positifs, catalase positive, asporulées et immobiles, parmi eux les souches codées (SG_(25, 8-10) ; BG_(27-30, 39-45)) dégradent le mannitol. Tandis que, les souches (BG_(35, 36)) ne dégradent pas le mannitol et ont une coloration jaune.

Les formes bâtonnet sont à Gram positifs et catalase positive, parmi eux les souches (BG_(31, 32)) sont sporulées et mobiles. Alors que les souches (SG_(18, 19, 21) ; BG₃₃ ; SS₄₈) sont asporulées et immobiles.

Les souches filamenteuses ramifiées (SG₁₋₇ ; SG₁₁₋₁₇ ; SS₍₄₆₋₄₇₎ ; SG_(20, 22, 23, 24, 26) ; BG₃₇₋₃₈ ; BS₄₈) sont asporulées, immobiles avec une catalase positive (tableau 18).

Tableau 18 : caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats lipolytiques

Codes	Catalase	Mannitol	Mobilité	Sporulation	Gram
Les formes coques					
BG ₃₄	+	-	-	-	-
SG (8, 9, 10) ; BG (30, 27, 28, 29, 39,40, 41, 42, 44, 43, 45)	+	+	-	-	+
SG ₂₅ ; BG (35, 36)	+	-	-	-	+
Les formes bâtonnées					
BG (31, 32)	+	+	+	+	+
SS (48), SG (19, 21)	+	-	-	-	+
SG ₁₈	+	-	-	-	+
BG ₃₃	+	+	-	-	+
Les formes filamenteuses					
SG (1-7 ; 11,13, 15,16, 17, 20, 22, 26)	+	+	-	-	+
SG (12, 14, 23, 24), BG (37, 38, 46, 47,49)	+	-	-	-	+

(+) : Positif ; (-) : Négatif

1.4. Dosage d'activité lipasique

Les 49 isolats potentiellement lipolytiques sélectionnées précédemment sur le milieu solide GN_{TH}, sont cultivés dans le bouillon nutritif contenant une ou deux source (s) lipidique (s) (huile d'olive et/ou Tween 80) comme une seule source de substrat. Les résultats de dosage de l'activité lipolytique extracellulaire ont permis d'observer une variabilité de

production de l'enzyme entre les différentes souches, selon le milieu de culture utilisé. Les isolats fortement producteurs sont SG18 (sur le milieu BN_T), SG14 (sur le milieu BN_H) et SG8 (sur le milieu BN_{HT}) dont l'activité lipolytique est respectivement égale 14,8±1,06 U/mL, 14,80±0,28 U/mL et 15,3±0,14 U/mL. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que les 49 bactéries présentent une activité positive en présence de l'huile d'olive dans le milieu, donc elles sont considérées comme souches productrices de lipases vraies ainsi qu'elles ont une activité estérasique sur le milieu contenant le Tween 80, l'ajout de Tween 80 en présence d'huile d'olive a permis d'activer la production de lipases vraies, selon les souches (tableau 19).

À la fin des cultures, nous avons remarqué une variation de pH initial de 6,68 à environ 9 (annexe 7), notée pour la totalité des 49 souches étudiées. Nous avons observé que les lipases produites par les souches gardent son activité à des valeurs de pH alcalin.

Tableau 19 : activités des lipases extracellulaires en U/mL des isolats sur les trois milieux liquides incubés à 37°C

Codes	Milieu BN _T	Milieu BN _H	Milieu BN _{HT}	Codes	Milieu BN _T	Milieu BN _H	Milieu BN _{HT}
SG1	6,00±0,20	5,90±0,90	7,95±0,15	SG23	8,85±0,05	5,80±0,40	7,85±0,95
SG2	11,30±1,00	5,80±1,00	6,10±0,30	SG24	3,80±0,80	0,35±0,15	3,90±0,80
SG3	08,10±0,30	0,65±0,05	2,20±0,10	SG25	0,80±0,70	10,30±0,30	6,00±0,95
SG4	07,90±0,40	5,50±1,00	5,00±0,20	SG26	4,50±0,75	10,75±1,55	5,05±0,75
SG5	6,80±0,00	12,50±0,30	7,90±0,40	BG27	10,55±0,25	5,25±0,25	5,80±0,50
SG6	10,90±0,30	6,10±0,10	4,30±0,50	BG28	9,625±0,77	3,90±0,10	14,35±0,95
SG7	6,80±2,50	1,30±0,20	3,15±0,15	BG29	13,35±0,05	7,90±0,20	8,8±0,50
SS46	1,90±1,10	7,80±0,25	7,05±0,25	BG30	9,65±0,75	6,50±2,00	5,05±0,25
SS47	6,80±1,00	6,55±2,75	3,30±1,50	BG31	10,85±0,05	3,10±0,10	4,05±0,25
SS48	7,10±0,85	1,30±0,00	0,50±0,30	BG32	9,90±1,00	10,80±2,50	13,10±0,70
SG8	12,55±0,25	13,3±0,15	15,3±0,10	BG33	8,45±0,05	4,00±0,50	6,80±1,00
SG9	5,00±0,00	9,30±0,50	3,30±0,60	BG34	6,75±0,95	4,03±0,03	5,90±1,40
SG10	8,50±0,70	0,25±0,05	4,20±0,35	BG35	6,70±0,10	3,50±0,00	10,30±4,50
SG11	8,80±0,00	2,90±0,20	7,80±0,00	BG36	6,55±0,25	5,00±1,00	7,65±0,25
SG12	7,05±6,25	4,80±0,50	7,30±1,05	BG37	9,95±1,15	4,75±0,25	7,80±0,00
SG13	6,38±2,53	6,80±0,00	3,85±0,65	BG38	120±0,20	6,00±0,00	8,50±0,20
SG14	6,85±0,05	14,80±0,20	8,00±0,10	BG39	1,05±0,25	4,00±0,00	0,90±0,10
SG15	7,25±0,05	3,23±1,28	7,70±2,10	BG40	10,75±0,05	4,50±0,00	5,25±0,05
SG 16	7,10±0,20	6,10±0,10	7,05±0,05	BG41	9,80±1,00	3,50±0,00	5,30±0,10
SG17	10,65±0,45	3,70±0,70	6,65±0,05	BG42	9,25±0,45	5,00±0,00	6,45±1,35
SG18	14,8±1,50	0,25±0,05	0,45±0,35	BG43	9,05±0,75	3,75±0,00	7,80±0,00
SG19	6,00±0,60	0,80±0,20	12,30±1,00	BG44	9,10±0,30	5,50±0,00	8,00±0,30
SG20	13,3±2,00	0,80±0,50	0,55±0,25	BG45	7,85±0,95	6,00±0,00	4,80±0,50
SG21	6,55±1,75	0,30±0,10	3,10±0,55	BS49	2,40±1,90	2,80±0,10	4,50±0,65
SG22	7,50±0,80	4,70±0,20	5,05±0,25				

Abréviation : T : Tween 80, H : huile d'olive, HT : huile avec Tween 80, BN : bouillon nutritif

Pour mieux comprendre la relation entre l'activité lipasique des 49 isolats, nous avons effectué une classification ascendante hiérarchique (CAH), cette analyse inclut toutes les activités dosées sur les trois milieux BN_T, BN_H, BN_{TH}. Ce classement donne lieu à quatre groupes de souches, chaque groupe contenant de 2 à 31 souches. La méthode de Ward utilise une analyse de la variance approchée afin de constituer des groupes présentant le maximum de similitude entre eux donc le dendrogramme pour chacun des quatre groupes est plat, ce qui indique une homogénéité au sein du groupe, alors que le troisième (Lip++) et le quatrième (Lip+/-) groupes sont plus homogènes que le deuxième (Lip+) et le premier (Lip+/-) groupes (le dendrogramme est plus plat pour le troisième et le quatrième groupes) (figure 21).

Nous constatons après comparaison des activités lipolytiques des 49 souches basée sur une mesure de dissimilarité que indépendamment de la composition des milieux de culture, huit souches (SG8, BG32, SG5, SG14, SG9, SG26, SG25, SS46) sont classées comme les plus fortes productrices de lipases. Parmi elles, SG8 et BG32 ont une activité lipasique extrême. Par ailleurs, les souches du premier groupe présentent une activité lipolytique faible quelle que soit la nature du substrat lipidique utilisée dans le milieu de culture.

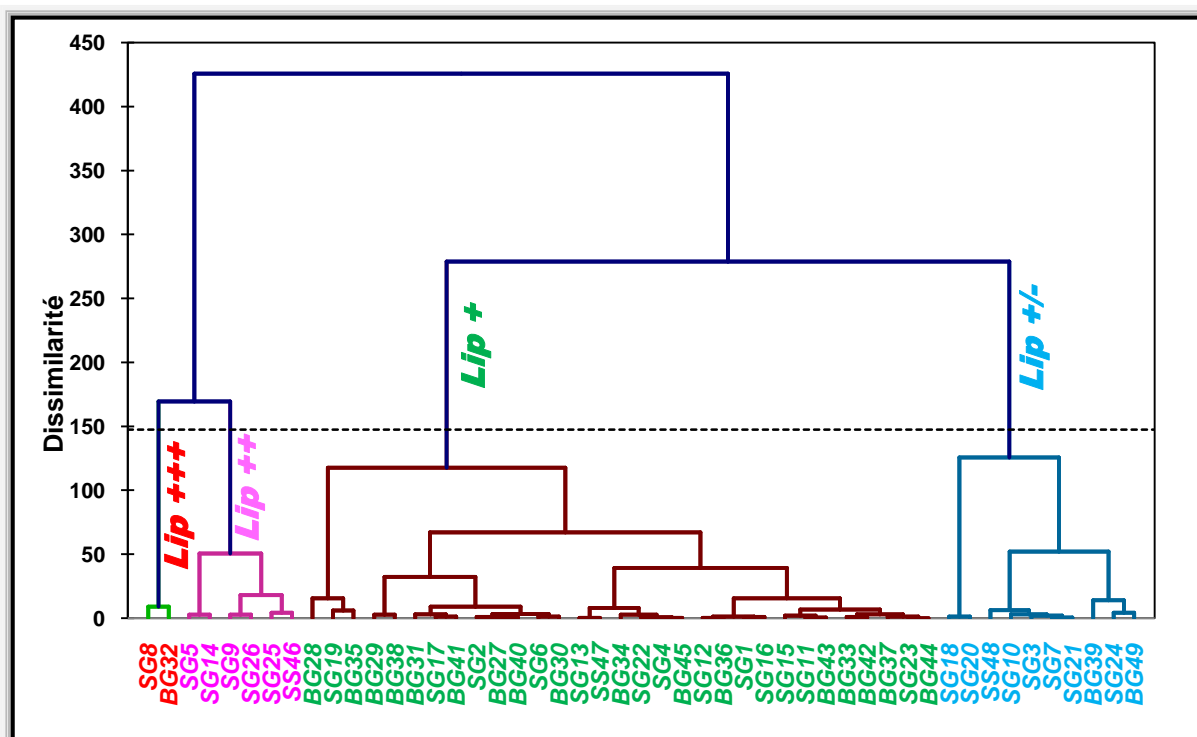
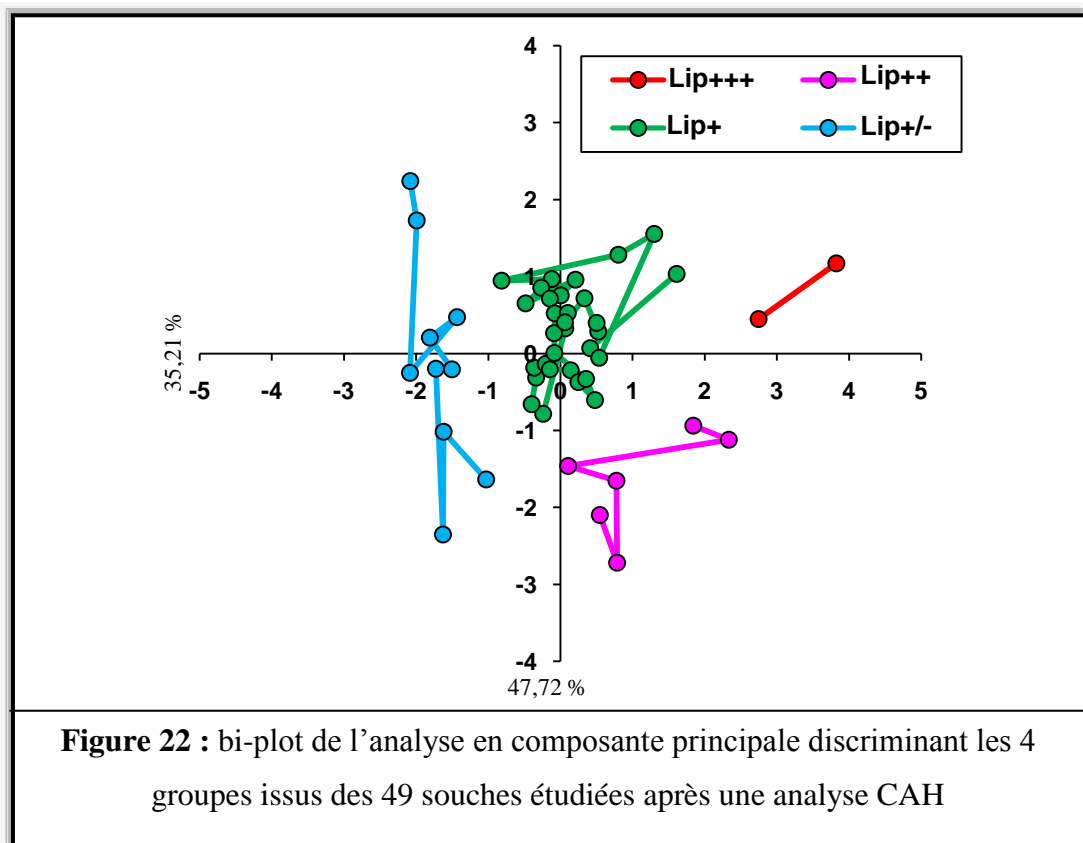


Figure 21 : dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des 49 souches bactériennes sur la base de leur activité lipolytique (Lip) indépendamment des 3 milieux de cultures utilisés (BN_T, BN_H et BN_{HT}). Quatre groupes ont été obtenus : *Lip+++* (rouge pour n = 2) ; *Lip++* (rose pour n = 6) ; *Lip+* (vert pour n = 31) et *Lip+/-* (bleu pour n = 10)

Pour visualiser la position des quatre classes (groupes) obtenues de CAH, une analyse en composante principale (ACP) en utilisant les coordonnées des 49 souches a été réalisée. Les deux premiers axes représentent 82,93 % de la variabilité totale, ils permettent cependant une bonne discrimination de la production de la lipase pour la majorité des souches. A partir du bi-plot de la distribution des souches (figure 22), la première composante expliquant 47,72 % de variabilité, elle sépare les souches des deux groupes 4 (rouge) et 3 (rose), apparaissant groupées dans le côté droit par rapport aux souches du groupe 1 (bleu) groupées dans le côté gauche et du groupe 2 (vert) réparties au centre de la carte. La deuxième composante expliquant 35,21 % de la variabilité, explique la position des souches du groupe 3 en décalage par rapport à l'ensemble des autres souches de groupe 2 et 1 (qui sont réparties sur l'axe 2).

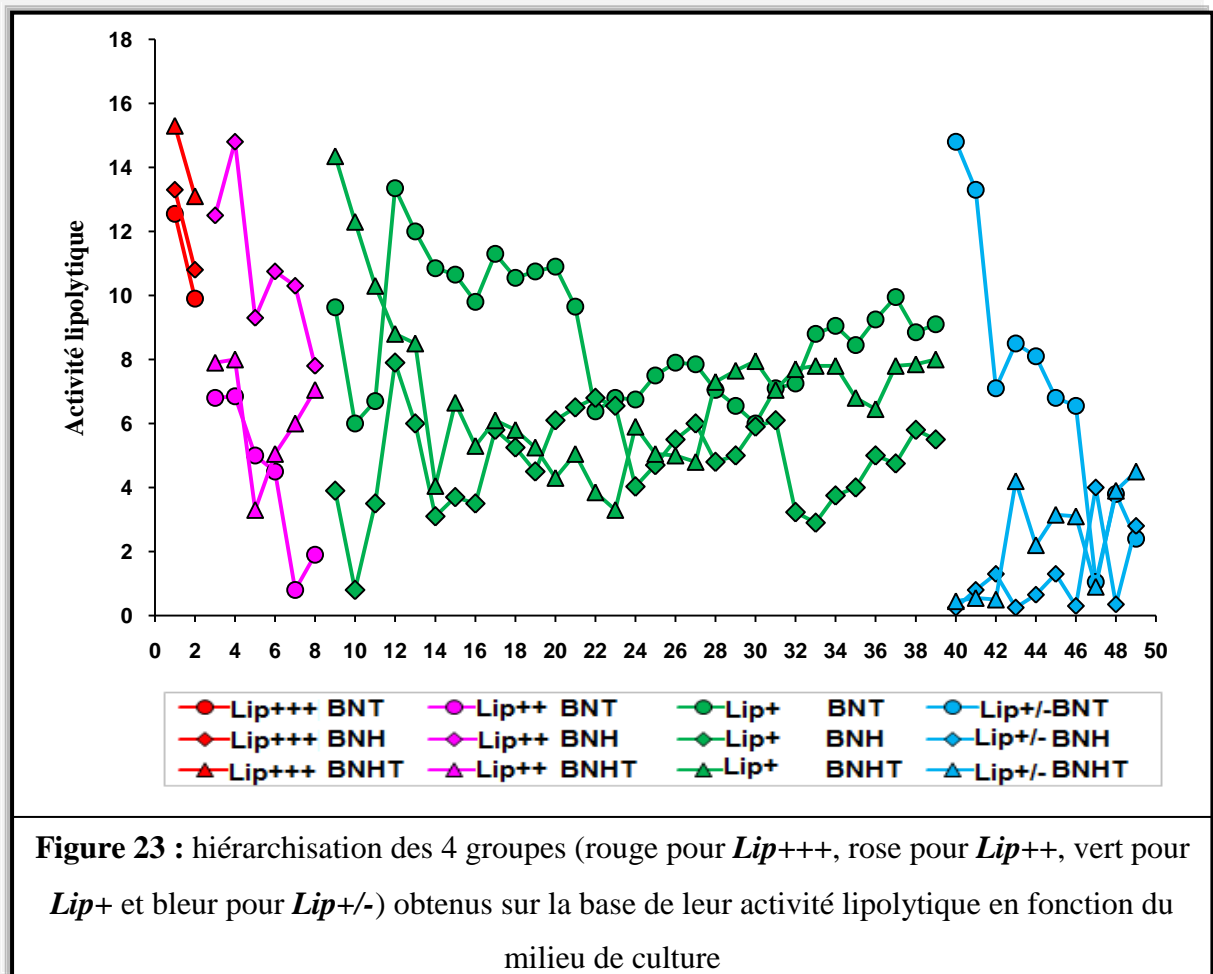
Nous avons remarqué que la distance entre les individus de même groupe obtenus est généralement plus faible que la distance entre les individus d'un groupe à l'autre, confirmant ainsi une séparation nette de la production de lipases par les quatre groupes de bactéries.

Donc, nous constatons la performance de l'analyse en composante principale a bien discriminé les quatre groupes de bactéries (Lip+++, Lip++, Lip+ et Lip+/-) en fonction de l'activité lipolytique.



Selon l'hierarchisation des 4 groupes de souches obtenues de CAH (figure 23), nous avons observé une variation de la production de lipases entre les différentes souches. Cette hierarchisation montre d'une manière générale, que chaque classe (groupe) est caractérisée par une variable : les souches du groupe 3 ont des valeurs plus faibles d'activité lipolytique sur le milieu BN_T alors que les souches des groupes 1 et 2 ont des valeurs plus faibles d'activité sur les deux milieux BN_H et BN_{TH}, donc la variable Tween 80 caractérise la production de lipases du groupe 3 et la variable l'huile d'olive caractérise la production des groupes (1 et 2).

Nous pouvons dire qu'il y a une diminution de production de lipases du quatrième groupe jusqu'au premier groupe et aussi au sein de même groupe d'un milieu à l'autre. Le taux de diminution de production de lipases par les souches appartenant au même groupe dépend de la nature de substrat lipidique dans le milieu de culture (variable caractéristique). Concernant les isolats qui présentent une activité lipasique extrême (groupe 4) la variabilité de production de lipases par les souches cultivées sur les trois milieux a été plus prononcée lors de la présence de l'huile et le Tween dans le milieu de culture.



Une comparaison entre les différents groupes obtenus par CAH et par milieu de culture en utilisant une analyse de variance au seuil de 5 % a été réalisée (tableau 20). Selon les résultats obtenus de l'analyse de la variance (ANOVA), la production de lipase par les souches cultivées sur les milieux contenant l'huile d'olive (BN_H ; BN_{TH}) a révélé une différence significative de production de lipases entre la plupart des groupes des souches, mais en présence de Tween 80 dans le milieu de culture nous avons noté une différence non significative entre la plupart des groupes de souches. Alors que, sur tous les milieux les souches du groupe 4 (Lip+++) possèdent l'activité la plus élevée donc ce groupe joue un rôle important dans la classification, suivi par les souches du groupe 3 cultivé sur un milieu contenant l'huile d'olive. En outre, au sein de chaque groupe la nature de la source lipidique dans le milieu de culture a un effet significatif sur l'activité lipolytique entre la plupart des groupes, avec une activation de la production de lipases des souches du groupe 4 en présence de Tween 80 avec l'huile d'olive dans le milieu de culture contrairement aux souches du groupe 3 (Lip++) qui sont actives en présence de l'huile d'olive et la production de lipases par les bactéries des groupes 2 (Lip+) et 1 (Lip+/-) sont actives en présence de Tween 80.

Tableau 20 : comparaison des activités lipolytiques des 4 groupes obtenus par CAH et par milieu de culture aussi en utilisant une analyse de variance au seuil de signification de 5%

Milieu	<i>Lip+++</i> (n = 2)	<i>Lip++</i> (n = 6)	<i>Lip+</i> (n = 31)	<i>Lip+/-</i> (n = 10)	Signification
BN _T	11,23a (B)	4,31b (C)	8,8a (A)	7,24a,b (A)	0,001
BN _H	12,05a (B)	10,91a (A)	4,87b (B)	1,2c (B)	< 0,0001
BN _{HT}	14,2a (A)	6,22b (B)	6,93b (A,B)	2,35c (B)	< 0,0001
Signification	0.001	< 0,0001	0.01	0.001	

Les lettres a, b, c pour des comparaisons multiples par lignes entre groupes de CAH

Les lettres A, B et C pour des comparaisons multiples par colonnes entre milieux de culture

1.5. Détermination de l'activité spécifique de l'extrait brute

Les niveaux des activités spécifiques détectées sur les substrats lipidiques, c'est-à-dire l'émulsion de l'huile d'olive, étaient variables (tableau 21). Les activités spécifiques des lipases déterminées par un dosage des protéines (annexe 7) contenues dans le surnageant des cultures bactériennes ont montré que les isolats SG14 et BG27 possèdent les activités spécifiques les plus élevées : 30,83±0,59 U/mg de protéines et 32,81±2,21 U/mg de protéines respectivement sur le milieu BN_H. Suivie de l'activité spécifique de SG2 (21,01±5,47 U/mg)

et SS46 ($20,89 \pm 0,95$ U/mg) et les lipases de SG12 ($19,91 \pm 4,05$ U/mg) sur le milieu BN_{TH} . Alors que pour les souches cultivées sur le milieu BN_T la souche SG5 possède l'activité spécifique la plus importante ($10,76 \pm 4,28$ U/mg).

Tableau 21 : activités spécifique des lipases extracellulaires des isolats cultivés sur les trois milieux liquides incubés à $37^\circ C$ exprimées en U/mg de protéines

Codes	Milieu BN_T	Milieu BN_H	Milieu BN_{HT}	Codes	Milieu BN_T	Milieu BN_H	Milieu BN_{HT}
SG1	$3,41 \pm 0,01$	$12,05 \pm 2,71$	$1,41 \pm 0,16$	SG23	$0,46 \pm 0,11$	$5,18 \pm 0,51$	$4,06 \pm 1,44$
SG2	$7,16 \pm 0,13$	$21,01 \pm 5,47$	$2,76 \pm 0,16$	SG24	$0,39 \pm 0,12$	$0,39 \pm 0,23$	$3,31 \pm 0,96$
SG3	$0,92 \pm 0,24$	$0,26 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,06$	SG25	$0,18 \pm 0,22$	$16,61 \pm 0,68$	$5,68 \pm 1,30$
SG4	$7,71 \pm 1,86$	$7,03 \pm 2,05$	$0,99 \pm 0,44$	SG26	$7,55 \pm 1,84$	$11,33 \pm 2,48$	$2,06 \pm 0,43$
SG5	$10,76 \pm 4,28$	$9,01 \pm 0,31$	$3,83 \pm 0,28$	BG27	$7,94 \pm 1,05$	$32,81 \pm 2,21$	$0,70 \pm 0,08$
SG6	$1,09 \pm 0,12$	$7,47 \pm 0,22$	$0,53 \pm 0,17$	BG28	$0,93 \pm 0,18$	$4,37 \pm 0,16$	$2,12 \pm 0,01$
SG7	$0,53 \pm 0,35$	$1,36 \pm 0,30$	$1,27 \pm 0,10$	BG29	$1,00 \pm 0,01$	$14,03 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,03$
SS46	$0,04 \pm 0,04$	$20,89 \pm 0,95$	$6,24 \pm 0,34$	BG30	$1,00 \pm 0,38$	$6,77 \pm 2,95$	$0,83 \pm 0,12$
SS47	$2,76 \pm 0,57$	$8,44 \pm 3,72$	$0,49 \pm 0,29$	BG31	$2,29 \pm 1,12$	$4,01 \pm 0,18$	$0,40 \pm 0,06$
SS48	$0,34 \pm 0,06$	$1,29 \pm 0,00$	$0,24 \pm 0,20$	BG32	$1,15 \pm 0,02$	$13,77 \pm 4,43$	$1,67 \pm 0,21$
SG8	$1,10 \pm 0,08$	$17,58 \pm 0,39$	$8,47 \pm 0,08$	BG33	$0,69 \pm 0,04$	$8,22 \pm 1,45$	$0,91 \pm 0,02$
SG9	$2,63 \pm 0,07$	$18,60 \pm 1,41$	$1,32 \pm 0,34$	BG34	$0,74 \pm 0,06$	$4,51 \pm 0,04$	$1,04 \pm 0,23$
SG10	$0,86 \pm 0,10$	$9,50 \pm 0,71$	$4,15 \pm 0,83$	BG35	$0,56 \pm 0,16$	$3,08 \pm 0,01$	$4,89 \pm 3,09$
SG11	$9,43 \pm 0,00$	$4,78 \pm 0,47$	$0,77 \pm 0,05$	BG36	$0,19 \pm 0,01$	$5,09 \pm 1,58$	$2,43 \pm 1,05$
SG12	$0,83 \pm 1,09$	$3,43 \pm 0,51$	$19,91 \pm 4,05$	BG37	$0,23 \pm 0,02$	$4,20 \pm 0,30$	$2,19 \pm 0,94$
SG13	$0,49 \pm 0,25$	$7,61 \pm 0,00$	$0,65 \pm 0,16$	BG38	$0,30 \pm 0,01$	$15,52 \pm 0,00$	$5,79 \pm 0,12$
SG14	$0,46 \pm 0,00$	$30,83 \pm 0,59$	$1,46 \pm 0,03$	BG39	$0,04 \pm 0,02$	$2,99 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,03$
SG15	$0,44 \pm 0,04$	$2,32 \pm 1,29$	$3,90 \pm 1,50$	BG40	$0,32 \pm 0,02$	$3,57 \pm 0,00$	$2,19 \pm 0,17$
SG16	$0,50 \pm 0,06$	$9,34 \pm 0,22$	$1,09 \pm 0,49$	BG41	$0,86 \pm 0,03$	$5,68 \pm 0,04$	$3,16 \pm 0,43$
SG17	$0,59 \pm 0,02$	$4,00 \pm 1,05$	$0,74 \pm 0,13$	BG42	$0,66 \pm 0,04$	$2,56 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,14$
SG18	$5,05 \pm 0,72$	$0,24 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,35$	BG43	$0,23 \pm 0,02$	$4,65 \pm 0,00$	$0,67 \pm 0,07$
SG19	$2,48 \pm 0,35$	$0,38 \pm 0,14$	$9,04 \pm 1,04$	BG44	$0,55 \pm 0,11$	$4,06 \pm 0,00$	$4,67 \pm 4,90$
SG20	$5,95 \pm 1,28$	$0,69 \pm 0,61$	$0,36 \pm 0,23$	BG45	$6,10 \pm 0,40$	$10,71 \pm 0,00$	$2,43 \pm 0,22$
SG21	$7,44 \pm 3,45$	$0,17 \pm 0,08$	$2,22 \pm 0,59$	BS49	$5,90 \pm 6,61$	$4,22 \pm 0,24$	$8,44 \pm 1,72$
SG22	$0,87 \pm 0,30$	$5,00 \pm 0,30$	$2,54 \pm 0,34$				

2. Discussion

Le beurre cru et le beurre fermenté *smen* sont des sources potentielles de flores diverses, parmi elles la flore lipolytique, de par leurs richesses en matières grasses. Les corps gras naturels ont un effet stimulant sur la production de lipase par les microorganismes (Obradors *et al.*, 1993) ; pour ses propriétés, la lipase microbienne est recherchée dans plusieurs applications en industries alimentaires.

- La caractérisation physicochimique du beurre cru et du *smen* nous a permis de constater qu'il existe une différence significative entre les paramètres recherchés de *smen* et celui du beurre cru. Les valeurs moyennes de **pH** des échantillons du *smen* (ES1_A, ES3_A, ES23_A) sont situées dans l'intervalle des valeurs de pH (4,55 à 5,87) obtenus par Belyagoubi et Abdelouahid (2013) et Guetouache *et al.* (2014). Seul l'échantillon ES23_A présente une valeur inférieure à celle des auteurs. Nos résultats peuvent s'expliquer par la durée et les températures de conservation des échantillons qui varient respectivement de 1 à 23 ans et de 10 à 35°C (résultats de nos investigations). Le couple temps/température de stockage est un paramètre important, car il permet de caractériser le pH : lorsque le temps de stockage augmente avec la température, ceci entraîne une diminution rapide de la valeur du pH (Park *et al.*, 2014). La valeur moyenne du **pH** du beurre cru observée dans la présente étude est similaire aux valeurs rapportées par Spreer (1998) et Idoui *et al.* (2010), mais elle est plus élevée que les valeurs rapportées par Samet-Bali *et al.* (2009) et Dervisoglu *et al.* (2013).

Nos résultats ont montré aussi que le **taux de matière grasse** du *smen* a diminué par rapport au beurre cru. Nous remarquons donc que la fraction grasse du *smen* a subi une hydrolyse, conséquence de l'action des lipases (El Marrakchi *et al.*, 1986). La même constatation est observée pour les **extraits sec totaux** et les **teneurs en eau** obtenus avec nos échantillons, en effet nos valeurs sont aussi inférieures de celles du beurre cru et celles obtenues par El Marrakchi *et al.* (1986). Alors que les extraits secs dégraissés sont supérieurs du beurre cru. Ces résultats expliquent que la préparation de *smen* provoque l'évaporation de l'eau à partir de la matière première (beurre cru) et aussi par la diminution de la teneur du lactose dans le non gras au cours du stockage (Benjelloun, 1984 ; Makhloufi, 2013). La même constatation est observée pour les **extraits secs totaux** et **dégraissés** obtenus avec tous les échantillons du *smen*. En effet, ces deux paramètres ont diminué significativement entre l'échantillon ES1_A et les deux échantillons du *smen* (ES3_A et ES23_A). Ces résultats s'expliquent par le mode de préparation et l'évaporation de l'eau (El Marrakchi *et al.* 1986 ; Makhloufi, 2013).

Dans le beurre cru, les paramètres mesurés répondent à l'exigence de la norme algérienne (JORA n°096 du 23-12-1998) ; ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux données par plusieurs auteurs (Chandan *et al.*, 2009 ; Bauer *et al.*, 2010 ; Dervisoglu *et al.*, 2013). Alors qu'ils sont différents de ceux obtenus par d'autres auteurs (El Marrakchi *et al.*, 1986 ; Samet-Bali *et al.*, 2009 ; Idoui *et al.*, 2010 ; Makhloufi, 2013). Cette différence peut être liée, à la qualité physicochimique et à l'activité microbienne des laits crus utilisés et aussi aux méthodes de la fabrication traditionnelle (El Marrakchi *et al.*, 1986).

Peut on conclure que nos échantillons diffèrent par leurs régions d'origine des prélèvements, le type de lait utilisé (vache ou chèvre), le processus de la préparation traditionnelle (*chakwa*, jarre en terre), le chauffage et l'addition de différents ingrédients (semoule de blé, sel, épices, etc.) ainsi que les ustensiles de conservation (jarre en terre ou en plastique). Les conditions environnementales (température, l'hygiène, temps de conservation) vont diminuer considérablement le taux de matière grasse et d'humidité. Tous ces paramètres peuvent influencer significativement la composition du beurre cru et du *smen* et donc sur leur qualité physicochimique (El Marrakchi *et al.*, 1986 ; Idoui *et al.*, 2010).

- Le dénombrement de la **flore totale** est très différent d'un échantillon à l'autre. Parmi les milieux utilisés, nous avons constaté que le milieu BN_{TH} nous a permis d'obtenir la flore totale la plus importante (entre : 2,85 et 6,30 log UFC g⁻¹). La flore totale du *smen* est faible comparativement avec les résultats mentionnés par plusieurs auteurs (Wondou, 2007 ; Belyagoubi & Abdelouahid 2013 ; Guetouache *et al.*, 2014) qui ont trouvé que le *smen* possède une charge microbienne importante, alors que le beurre cru présente une flore totale relativement élevée par rapport aux résultats mentionnés par Belyagoubi et Abdelouahid (2013), mais cette flore est faible de celle obtenue par Wondou (2007).

- Le dénombrement de la **flore lipolytique** sur la base de l'apparition de la précipitation des cristaux du sel de calcium ou de cuivre de l'acide gras sous l'influence d'une lipase dans visible sous forme d'un halo opaque ou verdâtre autour des colonies (Sierra, 1957 ; Adejuwon, 2013), nous remarquons que pour les cinq échantillons du *smen* le nombre des colonies obtenues est relativement faible (entre : 0,70 et 2,35 Log UFC g⁻¹). Ces résultats sont inférieurs au nombre (5-5,38) Log UFC/g trouvés dans le *Dhan* rapporté par El Marrakchi *et al.* (1988a). Alors que le résultat de la flore lipolytique du beurre cru montre une valeur importante (6,58 Log UFC g⁻¹) qui est supérieure aux valeurs (2,10-4) Log UFC g⁻¹ rapportés par plusieurs auteurs (Rady et Badr, 2003 ; Kacem et Karam, 2006 ; Idoui *et al.*, 2013) et très proche de la valeur (2,50-5,29) Log UFC g⁻¹ mentionnée par Asresie *et al.* (2013).

Nous avons remarqué une absence de la flore totale et lipolytique sur certains milieux, ainsi qu'une variation de nombre des colonies obtenues entre les différents échantillons sur les différents milieux que nous avons utilisés, cela peut être expliqué par la qualité microbienne des matières premières (lait, eau, sel, etc.) la variation des méthodes du savoir faire (cités précédemment) ; d'autres facteurs tels que le climat (chaud/froid) ont un fort effet sur le développement des bactéries (Abdelmoumene, 2015) ; cependant, une longue conservation de produit entraîne une diminution considérablement de la flore microbienne étudiée, probablement l'inhibition des microorganismes résulte de l'action conjuguée des acides gras libres et du chlorure de sodium (El Marrakchi *et al.*, 1986). Cet effet est limité, dans la majorité des cas, aux acides gras à courte et moyenne chaîne, de C₄ à C₁₂ (Freese *et al.*, 1973). La baisse des teneurs en lactose et en protéines, observées pendant l'élaboration du produit peut aussi, d'une façon secondaire, défavoriser le développement microbien, mais seulement en fin de maturation (El Marrakchi *et al.*, 1986).

- La purification des isolats lipolytiques a permis d'obtenir 159 isolats appartenant aux 6 échantillons étudiés (ES1_A: 16 ; ES3_A: 19 ; ES23_A: 49 ; ES5_A: 8 ; ES10_A: 12 ; EB : 55). La croissance des isolats sur milieu solide contenant l'huile d'olive et le Tween 80 (GN_{TH}), a permis de sélectionner 49 souches bactériennes les plus productrices de lipases.

- **La caractérisation** préliminaire des 49 souches, par l'observation microscopique et les caractères phénotypiques, a révélé qu'elles appartiennent à la catégorie des bactéries. Le nombre élevé de bactéries peut être attribué : à l'absence de pasteurisation du lait, l'effet des processus de séparation et de barattage sur la fragmentation des touffes bactériennes qui augmentent leurs nombres (Idoui *et al.*, 2010). Selon Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi (1987) la faible présence d'un certain nombre de micro-organismes (moisissures et levures) dans le *smen* est probablement lié à l'accumulation de l'acide gras libre et la disparition totale ou partielle des éléments nutritifs dans la phase aqueuse.

Les 49 souches lipolytiques obtenues dans le *smen* (totale 29 ; ES1_A : 4 ; ES3_A : 6 ; ES23_A : 17 ; ES10_A : 2) et le beurre cru (20) sont des bactéries à Gram positifs sauf pour BG34 qui est à Gram négatif, ces résultats sont en désaccord avec les résultats d'El Marrakchi *et al.* (1988a) qui a mentionné que qualitativement, dans le beurre avant le salage, la flore lipolytique est représentée essentiellement par les bactéries à Gram négatifs. Mais il confirme nos résultats concernant la dominance en *smen* des bactéries à Gram positifs.

La caractérisation préliminaire des 49 isolats est basée sur les caractères morphologiques et sur certains métabolismes biochimiques qui ont permis de mettre en place une collection représentée par six types de bactéries lipolytiques : **49 %** (beurre cru : 3 ; *smen* : 21) sont à Gram positifs, filamenteuses ramifiées, catalase positive, asporulées et immobiles ; **31 %** (beurre cru : 11 ; *smen* : 4) sont à Gram positifs, forme coque, catalase positive, asporulées, immobiles et dégradent le mannitol ; **10 %** (beurre cru : 1 ; *smen* : 4) sont à Gram positifs, forme bâtonnet, catalase positive, asporulées et immobiles ; **4 %** (beurre cru : 2 ; *smen* : 0) sont à Gram positifs, forme coque, catalase positive, asporulées, immobiles, ne dégrade pas le mannitol et ont une coloration jaune ; **4 %** (beurre cru : 2 ; *smen* : 0) sont à Gram positifs, forme bâtonnet, catalase positive, sporulées et mobiles et **2 %** (beurre cru : 1 ; *smen* : 0) sont à Gram négatifs, formes coques, catalase positive, asporulées et immobiles. Les souches de cette collection possèdent une activité lipolytique, Ces résultats obtenus sont confirmé par Borrelli et Trono (2015) ; Uddin *et al.* (2016) ; Treichel *et al.* (2010). Il faut noter que l'identification phénotypique est très limitée et sans doute, l'utilisation des techniques moléculaires apporte plus de description de la biodiversité microbienne dans ces écosystèmes.

Il n'y avait pas assez de recherche en ce qui concerne l'isolement de bactéries lipolytiques à partir du beurre cru et *smen*, ces résultats ne correspondent pas à ceux obtenues par El Marrakchi *et al.* (1988a), ce dernier a noté que la flore lipolytique est représentée principalement par *Bacillus* et *Staphylococcus* pour le *Dhan* et par *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrionaceae* et *Flavobacterium* pour le beurre cru au premier jour de sa préparation.

Dans le beurre cru, la forme coque des bactéries est la plus dominant par 64 % et dans le *smen* la forme filamenteuse est la plus dominant par 70 %. La prédominance de ces groupes de bactéries dans nos échantillons du *smen* et du beurre, peut dépendre de la flore présente dans les matières premières (lait, eau, sel), les conditions d'hygiène, de l'environnement et de stockage (Santos *et al.*, 2016). Aussi, elle s'explique par la résistance à certains facteurs d'inhibition (tolérer des concentrations en chlorure de sodium élevées et résister à des valeurs de pH faibles) et possède aussi une résistance à l'effet défavorable des acides gras libres (El Marrakchi *et al.*, 1988a).

- La production de lipases extracellulaires par les 49 isolats lipolytiques cultivés sur les trois milieux de culture liquides est positive, mais avec une variabilité de la synthèse

influencée par la présence des lipides. En général, l'activité des lipases extracellulaires augmente avec l'augmentation des concentrations de lipides, bien que des niveaux excessifs dans le milieu de croissance puissent être cytotoxiques (Thomson *et al.* 1999).

Cette variabilité de production de lipases selon les souches est étudiée par le biais d'une analyse statistique. La classification hiérarchique (CAH) de nos données sur les activités lipolytiques, a identifié quatre groupes contrastés de bactéries du *smen* et du beurre cru, où les groupes des souches se distinguent selon l'activité lipolytique. Les souches au sein de chaque groupe fonctionnent de manière semblable dans les trois milieux de culture mais les groupes 3 et 4 sont les plus homogènes. Tandis que l'ACP donne une bonne discrimination de ces quatre groupes. Donc, à partir des résultats de CAH et d'ACP, les souches ayant la plus forte activité lipolytique, sur les trois milieux de culture, sont celles des groupes trois et quatre composés par les isolats (SG8, BG32, SG5, SG14, SG9, SG26, SG25, SS46). Cela est confirmé par ruban (1978) et Adejuwon (2013) qui ont montré la variation significative de l'activité lipolytique entre les microorganismes même s'ils appartiennent à la même espèce. La potentialité de production sur les trois milieux est expliquée par Gupta *et al.* (2004) où les lipases peuvent être régio-spécifiques* ou non spécifiques vis-à-vis des triacylglycérols. Certaines lipases possèdent également une spécificité d'acides gras par rapport à la longueur de la chaîne carbonée. Alors que les lipases non spécifiques, agissent au hasard sur la molécule de triacylglycéride et conduisent à la décomposition complète du triacyl-glycéride en acide gras et en glycérol, comme il a été constaté pour les groupes quatre et trois de notre étude.

Cependant, les résultats de l'analyse de variance ainsi que hiérarchisation des souches des 4 groupes qui ont mis en évidence l'effet significatif de la source lipidique contenue dans le milieu de culture sur la production de lipases intra et intergroupes des souches, donc l'activité de chaque bactérie change selon la nature de substrat lipidique (naturelle ou synthétique) dans le milieu de culture. Les souches (SG8 et BG32) sont les plus actives en présence de l'huile d'olive avec le Tween 80 dans le milieu, les souches (SG5, SS9, SG14, SG25, SG26, BG46) sont inhibées par la présence de Tween 80 tandis que les souches qui restent (groupes 1 et 2) sont actives en présence de Tween 80. Les deux souches SG8, BG32 sont celles qui définissent une différence potentielle entre les isolats et qui possèdent l'activité lipolytique la plus importante sur les trois milieux. Donc, le taux d'hydrolyse des lipides

* régio-spécifiques : le fait que la lipase catalyse préférentiellement l'hydrolyse des acides gras en position 1 ou 3 des triacylglycerols.

dépendant, principalement, de la concentration en enzyme lipases produite qui varie d'une souche à l'autre, cela peut s'expliquer par l'accélération ou l'inhibition par la présence du Tween 80, de l'huile d'olive, de la gomme arabique, du calcium et du sel dans le milieu de culture même la plus longue période d'exposition de l'huile végétale pour les souches cultivées aux milieux contenant l'huile d'olive, la différence du pH optimum et la température optimale, tous ces facteurs peuvent influencer même des souches de même espèce (Adejuwon, 2013).

Les lipases produites par les bactéries cultivées sur des milieux contenant l'huile d'olive et/ou le Tween 80, conduisent à la formation des acides gras libres dans le milieu, favorisant la diminution du pH ; ce n'est pas le cas des isolats de notre étude où le **pH des milieux de culture** est alcalin entre 6,68 et 8,9, cela peut être s'expliquer par l'assimilation des acides gras libres présents dans le milieu de culture par les cellules bactériennes, suite à la dégradation enzymatique (Obradors *et al.*, 1993). Peut on conclure qu'il y a une diminution du pH pendant l'incubation mais, l'inhibition de la lipase par les acides gras libres est éliminée par la présence des ions de Ca^{2+} et les Tweens (Alford *et al.*, 1971). Ainsi que les lipases de notre étude sont restées actives sur cette gamme de pH cela peut être s'expliquer par le faite que les lipases bactériennes ont en général un pH optimum neutre ou légèrement alcalin de 8 à 8,5 (Lawrence, 1967). Cependant, il existe des lipases conservant une bonne activité à des pH plus extrêmes, d'autre part, certaines lipases sont stables et actives dans une large gamme de valeurs de pH (Watanabe *et al.*, 1977).

- Les résultats des **activités spécifiques** des préparations brutes de la lipase ont montré une variabilité entre les lipases des souches. Cette différence entre les activités mesurées est attribuable aux différents substrats forment les émulsions, qui sont également affectées par la nature des émulsifiants, les différences dans les quantités de substrats et des émulsifiants utilisés, et les relations substrat-émulsifiants (Kordel *et al.*, 1991). Les activités spécifiques dépendent de la concentration de protéines dans le milieu de culture donc elle donne la part de l'enzyme lipase parmi les protéines produites par la souche. L'activité spécifique remise en question, la pureté et l'identité de la lipase donc les étapes du procédé de purification donnent une augmentation de l'activité spécifique (Saxena *et al.*, 2003 ; Kurtovic *et al.*, 2009). Selon Laszlo *et al.* (2011) l'activité spécifique est basée sur la quantité d'enzyme catalytiquement active déterminée par titrage du site actif. Cette activité spécifique a été utilisée pour la normalisation de la quantité ajoutée d'enzyme dans des émulsions naturelles (Bourlieu *et al.*, 2012).

Cette étude nous a permis de retirer premièrement que nos échantillons montrent des différences d'origines, de processus de la préparation traditionnelle, de type de lait utilisé, de chauffage et d'addition de différents ingrédients ainsi que des ustensiles de conservation et des conditions environnementales ; deuxièmement une différence significative entre les paramètres physicochimiques mesurés du beurre cru et des échantillons du *smen*. Par ailleurs, des différences non significatives ont été trouvées pour le MG et la teneur en eau des échantillons ES1_A et ES3_A, ainsi que pour l'ESD et l'EST des échantillons ES3_A et ES23_A ; troisièmement quarante-neuf souches bactériennes sont isolées à partir de nos échantillons et les résultats de leurs cultures dans le milieu liquide montrent qu'elles possèdent toutes au moins une certaine activité lipolytique et les souches les plus potentielles sont (SG8, BG32, SG5, SG14, SG9, SG26, SG25, SS46).

Conclusion

Dans cette étude, deux principaux objectifs sont réalisés :

- Le premier consiste, principalement, à l'isolement, la purification et la caractérisation des bactéries lipolytiques du beurre cru et du *smen* algériens ;
- Le second a pour intérêt d'étudier les potentialités lipolytiques des bactéries isolées et l'effet de la nature de la source lipidique sur la production de l'enzyme lipase.

Nos échantillons (beurre cru : 1 ; *smen* : 5) diffèrent par leurs origines, leur processus de la préparation traditionnelle (temps de fermentation spontanée ; temps de barattage ; filtration ; ustensiles de barattage : *chakwa*, jarre en terre), le type de lait utilisé (vache ou chèvre), le chauffage et l'addition de différents ingrédients (semoule de blé, sel, épices, etc.) ainsi que les ustensiles de conservation (jarre en terre ou en plastique) et les conditions environnementales (température, temps de conservation).

Le screening a abouti à l'obtention de plusieurs isolats lipolytiques à partir de matières premières riches en matière grasse, à savoir : le beurre cru et le *smen*. Le test de l'activité lipolytique sur milieu solide a permis de présélectionner quarante neuf souches bactériennes, en se basant sur les résultats phénétiques, Ces dernières ont rattaché de six types de bactéries lipolytiques : **49 %** (beurre cru : 3 ; *smen* : 21) sont à Gram positifs, filamenteuses ramifiées, catalase positive, asporulées et immobiles ; **31 %** (beurre cru : 11 ; *smen* : 4) sont à Gram positifs, forme coque, catalase positive, asporulées, immobiles et dégradent le mannitol ; **10 %** (beurre cru : 1 ; *smen* : 4) sont à Gram positifs, forme bâtonnet, catalase positive, asporulées et immobiles ; **4 %** (beurre cru : 2 ; *smen* : 0) sont à Gram positifs, forme coque, catalase positive, asporulées, immobiles, ne dégrade pas le mannitol et ont une coloration jaune ; **4 %** (beurre cru : 2 ; *smen* : 0) sont à Gram positifs, forme bâtonnet, catalase positive, sporulées et mobiles et **2 %** (beurre cru : 1 ; *smen* : 0) sont à Gram négatifs, formes coques, catalase positive, asporulées et immobiles.

Néanmoins, le test de production de lipase sur milieu liquide contenant des inducteurs de la production lipolytique (Tween 80 ; huile d'olive avec ou sans Tween 80) a abouti à la sélection par le biais de la classification ascendante hiérarchique (CAH) et l'analyse en composante principale (ACP) de huit souches uniquement (SG8, BG32, SG5, SG14, SG9, SG26, SG25, SS46), comme étant souches potentielles productrices de lipases vraies sur les trois milieux de culture utilisés.

Le test ANOVA a montré que la quantité d'enzyme lipase produit par chaque souche est significativement affectée par la présence de l'huile d'olive et de Tween 80 dans le milieu, comme inducteurs ou inhibiteurs. Donc l'activité de chaque bactérie est change selon la nature de substrat lipidique dans le milieu de culture aussi après comparaison des moyennes par le test ANOVA a montré que les deux souches SG8 et BG32 possèdent l'activité lipolytique la plus forte sur les trois milieux et ses activités sont induite par la présence de l'huile d'olive et Tween 80 dans le milieu de culture.

Cette constatation révèle le degré d'adaptation de ces souches à des milieux variés, permettant de conclure qu'elles peuvent être utilisées dans des applications biotechnologiques diverses.

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

- Approfondir l'identification pour les huit isolats productrices de lipases (moléculaires et génotypiques : SDS PAGE, HPLC, DGG, etc.) afin de les affilier aux espèces correspondantes ainsi étudier leurs le pouvoir virulent ;
- Dosage de l'activité lipasique par les méthodes chromatographiques ;
- Optimiser les conditions de la mesure de l'activité lipase de ces bactéries isolées ;
- Purification et caractérisation (chimique et moléculaire) de l'enzyme lipase produite par les huit bactéries potentiellement lipolytiques ;
- Optimiser la production des lipases par l'étude des facteurs inductibles ;
- Il faudrait également s'intéresser à l'impact de lipases sur le processus de maturation du *smen* préparé.

Références bibliographiques

- Abdelmoumene W. (2015). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de produits laitiers traditionnels Algériens (*Zebda, Lben* et *Dhan*). Memoire master : Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Et science de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Algérie, P32-33.
- Abou-Donia S.A. & El-Agamy E.I. (2003). SAMNA A2 - Caballero, Benjamin. In : Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). *Academic Press, Oxford*, pp. 5088-90.
- Accolas J., Deffontaines J. & Aubin F. (1978). Le lait et les produits laitiers en République Populaire de Mongolie. *Le Lait* **58**, 278-86.
- Adejuwon A. (2013). Microbial Lipase. *Lap Lambert Academic Publishing GmbH KG*, 43p.
- Ahmed S.S.J., Abdalla M.O.M. & Rahamtalla S.A. (2016). Microbiological Quality of Cows' Milk Butter Processed in Khartoum State, Sudan. *British Microbiology Research Journal* **11**.
- Aissaoui O., Zitoun M. & Zidoune N. (2006). Le fromage traditionnel algérien «Bouhezza». *Séminaire d'animation régional. Technologie douce et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT-Tunis*, Tunisie.
- Akoh C.C., Lee G.C., Liaw Y.C., Huang T.H., and Shaw J.F. (2004). GDSSL family of serine esterases/lipases. *Progress in lipid research* **43**, 534-552.
- Alford J., Smith J. & Lilly H. (1971). Relationship of microbial activity to changes in lipids of foods. *Journal of Applied Bacteriology* **34**, 133-46.
- Aly M.M., Tork S., Al-Garni S.M. & Nawar L. (2012). Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil. *African Journal of Microbiology Research* **6**, 1125-37.
- Asresie A., Seifu E. & Kurtu M.Y. (2013). Churning efficiency and microbial quality of butter made from camel milk alone and blending it with goat milk. *Net Journal of Agricultural Science* **1**, 75-80.

- Bastide A., de Méo M., Andriantsoa M., Laget M. & Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology* **2**, 453-66.
- Bauer W.J., Badoud R. & Lölliger J. (2010). Science et technologie des aliments : principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. *Presses polytechniques et universitaires romandes*.
- Becker S., Theile S., Heppeler N., Michalczyk A., Wentzel A., Wilhelm S., Jaeger K.-E. & Kolmar H. (2005). A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Letters* **579**, 1177-82.
- Belyagoubi L. & Abdelouahid D.E. (2013). Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional Algerian dairy products. *Advances in Food Sciences*. **35** (1) : 84-85.
- Bendimerad N. (2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben». Université aboubekr belkaid, Tlemcen, Algérie.
- Benjelloun N. (1984). Contribution à l'étude des levures du " *Smen* " : Taxonomie et activité lipolytique. Thèse de doctorat, Université Mohammed V – Agdal. Faculté des Sciences, Rabat, Maroc.
- Benkerroum N. (2013). Traditional Fermented Foods of North African Countries: Technology and Food Safety Challenges With Regard to Microbiological Risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**, 54-89.
- Benkerroum N. & Tamime A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food microbiology* **21**, 399-413.
- Bensalah F., Labtar A., Delorme C. & Renault P. (2011). Occurrence, isolation and DNA identification of involved in Algerian traditional butter 'Smen'. *African journal of biotechnology* **10**, 17251-7.
- Bereda A., Eshetu M. & Yilma Z. (2014). Microbial properties of Ethiopian dairy products : A review. *African Journal of Microbiology Research* **8**, 2264-71.

- Borrelli, G. M. and D. Trono (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International journal of molecular sciences* **16** (9) : 20774-20840.
- Bourlieu C., Rousseau F., Briard-Bion V., Madec M.N. & Bouhallab S. (2012). Hydrolysis of native milk fat globules by microbial lipases : Mechanisms and modulation of interfacial quality. *Food research international* **49** (1) : 533-544.
- Boutonnier J.L. (2007). Matière grasse laitière : Crème et beurre standard. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire* **4**.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-54.
- Budhkar Y. Bankar S. & Singhal R. (2014). Microbiologie of cream and butter. In : *Encyclopedia of Food Microbiology*, Second Edition, pp. 728–737.
- Buldo P. & Wiking L. (2016). Butter : Properties and Analysis. In : *Encyclopedia of Food and Health*. *Academic Press*, Oxford, pp. 535-41.
- Cadirci B.H., Yasa I. & Kocyigit A. (2016). *Streptomyces* sp. TEM 33 possesses high lipolytic activity in solid-state fermentation in comparison with submerged fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **46**, 23-9.
- Casas-Godoy L., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G. & Marty A. (2012). Lipases : An Overview. In : *Lipases and Phospholipases : Methods and Protocols*, ed. by *Sandoval G. Humana Press, Totowa, NJ*, pp. 535-41.
- Chakir M. (1985). Contribution à l'étude de l'évolution de la flore lactique au cours de l'élaboration du *lben* et du *smen*. thèse de doctorat. institut agronomique et vétérinaire. Hasan II, Maroc.
- Chandan R.C. & Kilara A. (2010). Dairy ingredients for food processing. *John Wiley & Sons*.
- Chandan R.C., Kilara A. & Shah N.P. (2009). Dairy processing and quality assurance. *John Wiley & Sons*.
- Christokopoulos P., Tzia C., Kekos D. & Macris B.J. (1992). Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 194-197.

- Daijeet C. (2012). Isolation and identification of yeasts from butter samples. *Indian Journal of Field Veterinarians* **7**, 62-63.
- Deosarkar S.S., Khedkar C.D. & Kalyankar S.D. (2016). Butter : Manufacture. In : Encyclopedia of Food and Health. *Academic Press, Oxford*, pp. 529-34.
- Dervisoglu M., Gul O., Guvenc D., Yazici F., Atmaca E. & Aksoy A. (2013). Evaluation of Chemical and Microbiological Characteristics and Fatty Acid Profiles of Butter Samples Collected from the Black Sea Region of Turkey. *Asian Journal of Chemistry* **25**, 10185.
- Djazaïrouna l'Atlas pratique de l'Algérie (2004). 1^{er} Edition de l'Institut national de cartographie et de télédétection (I.N.C.T). 200p.
- Duteurtre G. & Koussou M.O. (2007). Economie pastorale et marchés laitiers au Sahel : l'âge d'or du commerce de beurre clarifié au Tchad de 1930 à 1970. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* **60**.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. & Stackebrandt E. (2006). The Prokaryotes : Vol. 3 : Archaea. Bacteria : Firmicutes, Actinomycetes. *Springer Science & Business Media*.
- El Marrakchi A., Berrada M., Chahboun M. & Benbouhou M. (1986). Etude chimique du smen marocain. *Le Lait* **66**, 117-33.
- El Marrakchi A., Tantaoui-Elaraki A., Hamama A. & Grini A. (1988a). La flore microbienne du smen marocain. II. Flores lipolytique et caséolytique. *Le Lait* **68**, 333-47.
- El Marrakchi A., Tantaoui-Elarraki A., El Mane A. & Tifrit L. (1988b). La flore microbienne du smen marocain I. Flore naturelle et flore d'intérêt hygiénique. *Le Lait* **68**, 205-17.
- Erkmen O. & Bozoglu T.F. (2016). Spoilage of Milk and Milk Products. In : Food Microbiology : Principles into Practice. *John Wiley & Sons, Ltd*, pp. 307-36.
- FAO (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture*.
- Fenster K.M., Rankin, S.A. & Steele J.L. (2003). Accumulation of short n-chain ethyl esters by esterases of lactic acid bacteria under conditions simulating ripening parmesan cheese. *Journal of Dairy Science* **86** (9), 2818-2825.

- Ferrato F., Carriere F., Sarda L. *et al.* (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol* **286**, 327–347
- Fickers P., Destain J. & Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement (BASE)* **12**, 119-30
- Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H. & O'Mahony J.A. (2015). Milk Lipids. In : Dairy Chemistry and Biochemistry. *Springer International Publishing, Cham*, pp. 69-144.
- Freese E., Sheu C.W. & Galliers E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* **241**, 321-5.
- Gagaoua M. (2015). Biomarqueurs des qualités sensorielles de la viande bovine : Compréhension des mécanismes et prédiction. Thèse de doctorat en Sciences Alimentaires. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires INATAA. Université frères Mentouri Constantine. 405p.
- Guessas B., Adjoudj F., Hadadji M. & Kihal M. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal* **17** (4) : 480-488.
- Guetouache M., Guessas B. & Toumatia O. (2014). Sanitary quality and ecology of the lactic bacteria isolated from traditional butter. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences* **2**.
- Guinee T.P. & Kilcawley K.N. (2004). Cheese as an Ingredient. In : Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, Fox, P.F., P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee (Eds.). *Elsevier Academic Press*, Amsterdam.
- Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris.
- Gupta R., Gupta N. & Rathi P. (2004). Bacterial lipases : an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology* **64**, 763-81.
- Hae-Soo K., Palanivel G. & Mohammad Al M. (2013). Butter, Ghee, and Cream Products. In : Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *John Wiley & Sons*, pp. 390-411.

- Hasan F., Shah A.A. & Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 235-251.
- Hasan F., Shah A.A. & Hameed A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases : A comprehensive review. *Biotechnology advances* **27**, 782-98.
- Höfelmann M., Hartmann J., Zink A. & Schreier P. (1985). Isolation, purification, and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *Journal of Food Science* **50**, 1721-5.
- Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. et Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth edition, *Williams & Wilkins*, Baltimore, USA.
- Hugo S.G. & Charles G.H. (2010). Lipases in Foods. Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food. *Taylor & Francis*, pp. 370-374.
- Idoui T., Benhamada N. & Leghouchi E. (2010). Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows' milk in East Algeria. *Grasas y Aceites* **61**, 232-6.
- Idoui T. & Karam N.E. (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter : isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites* **59**, 361-7.
- Idoui T., Rechak H. & Zabayou N. (2013). Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter made from goat milk. *Annals, Food Science and Technology* **4**, 108-14.
- Ismaili-Alaoui M.M. (1986). Contribution a la connaissance du role du thym dans la maturation du *Smen* : etude de 3 techniques de conservation. Memoire d'assistanat institut agronomique et veterinaire. Hasan II, Maroc.
- Jaeger K. E. & Reetz M. T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends biotechnol* **16**, 396-403.
- Jaeger K., Dijkstra B. & Reetz M. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology* **53**, 315-51.
- Jegannathan K.R., Abang S., Poncelet D., Chan E.S. & Ravindra P. (2008). Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase- A Critical Review. *Critical reviews in biotechnology* **28**, 253-64.

- Kacem M. & Karam N.E. (2006). Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria) : isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites* **57**, 198-204.
- Karam N.E., Dellali A. & Zadi-karam H. (2012). Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*.
- Kerviel V. (2014). Clonage et caractérisation de deux gènes codant des enzymes lipolytiques de la microalgue *Isochrysis galbana*. Thèse doctorat, Le Mans.
- Kim, E.K., Jang, W.H., Ko, J.H., Kang, J.S., Noh, M.J. and Yoo, O.J. (2001) Lipase and its modulator from *Pseudomonas* sp. strain KFCC 10818 : Prline-t-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator. *Journal of Bacteriology* **183** (20), 5937-5941.
- Kordel M., Hofmann B., Schomburg D. & Schmid R. (1991). Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808 : purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of bacteriology* **173** (15) : 4836-4841.
- Kurtovic I., Marshall S.N., Zhao X. & Simpson B.K. (2009). Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science* **17** (1) : 18-40.
- Lahsaoui S. (2009). Etude du procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel algérien (Kilila). Thèse de doctorat d'état : Département d'Agronomie, Université de Batna.
- Lapointe-Vignola C. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. *Presses inter Polytechnique*.
- Larpent, J.P. (1997). *Microbiologie* alimentaire, technique de laboratoire. *Technique et documentation*. pp. 1041.
- Laszlo, J. A., Jackson M. & Blanco R.M. (2011). Active-site titration analysis of surface influences on immobilized *Candida antarctica* lipase B activity. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* **69** (1-2) : 60-65.
- Latreche B. (2016). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du beurre cru, évaluation de leurs aptitudes technologiques et leur utilisation dans la fabrication de la crème sure. Mémoire magister. INATAA, université frères Mentouri, Constantine. Algérie.
- Lawrence R. (1967). Microbial lipases and related esterases. *Dairy Sci. Abstr.* **29**, 1-8.

- Leyral G., Joffin, J. N. & Boineau F. (1998). Microbiologie technique : 2, Documentation technique. 2^e éd., Bordeaux. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, 304 p.
- Linden G. (1998). Transformation des produits alimentaires par les enzymes. Ed. Techniques Ingénieur.
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately?. *Food Science and Technology (Campinas)*, **31**(3), 603-613.
- Maghnia D. (2011). Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens. Université Ahmed Ben Bella d'Oran1 Es Senia. Algérie.
- Makhloufi A. (2013). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse doctorat : Faculté des sciences, département de Biologie. Université aboubaker belkaid. algérie
- Messias J., Da-Costa B., de Lima V., Giese E., Dekker R. & Barbosa A.d.M. (2011). Microbial lipases : production, properties and biotechnological applications. *Semina : Ciências Exatas e Tecnológicas (Londrina)* **32**, 213-34.
- Messias J.M., Da-Costa B.Z., de Lima V.M.G., Dekker R.F.H., Rezende M.I., Krieger N. & Barbosa A.M. (2009). Screening Botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by Botryosphaeria ribis EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial technology* **45**, 426-31.
- Moayedallaie S., Mirzaei M. & Paterson, J. (2010). Bread improvers : Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chemistry* **122** (3), 495-499.
- Mortensen B.K. (2011). Butter and Other Milk Fat Products | Modified Butters A2 - Fuquay, John W. In : Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). *Academic Press, San Diego*. pp. 500-5.
- Obradors N., Montesinos J., Valero F., Lafuente F. & Sola C. (1993). Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology letters* **15**, 357-60.

- O'mahony F. & Bekele E. (1985). La fabrication du beurre en Ethiopie : techniques traditionnelles et perspectives d'améliorations. in Bulletin du CIPEA : No. 22. *Centre international pour l'élevage en Afrique*. Addis-Abeba, Ethiopie.
- Ongol M.P. & Asano K. (2009). Main microorganisms involved in the fermentation of Ugandan ghee. *International journal of food microbiology* **133**, 286-91.
- Owusu-Kwarteng J., Akabanda F., Nielsen D.S., Tano-Debrah K., Glover R.L.K. & Jespersen L. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiology* **32**, 72-8.
- Park J.M., Shin J.H., Bak D.-J., Kim N.-k., Lim K.S., Yang C.Y. & Kim J.M. (2014). Determination of shelf life for butter and cheese products in actual and accelerated conditions. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **34**, 245.
- Paul A. (2010). Beurre et fractions de matière grasse laitière, Dans : VINGOLE C.L. Science et Technologie du lait. *Presses polytechnique* **5**, 323-47.
- Pinsirodom P. & Parkin K.L. (2001). Lipase assays. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- Priji P., Unni K.N., Sajith S., Binod P. & Benjamin S. (2015). Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas sp.* strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. *Biotechnology and applied biochemistry* **62**, 71-8.
- Rady A. & Badr H. (2003). Keeping the quality of cows' butter by γ -irradiation. *Grasas y Aceites* **54**, 410-8.
- Rahman R.N.Z.A., Geok L.P., Basri, M. & Salleh, A.B. (2005). Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresource Technology* **96** (4), 429-436.
- Rajanikanth A. & Damodharam T. (2016). Bioconversion of Disposed Marine Waste into Lipase Enzyme by *Streptomyces fungicidicus* RPBS-A4. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **5**, 616-28.
- Rajaraman S., Narasimhan R. & Habibulla Khan M. (1994). Identification of yeasts and moulds in butter and Lipolytic study of selected moulds. *Indian Journal of Dairy Science* **47**, 341- 341.

- Rapp P. & Backhaus S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microbial Technol.* **14**, 938-943.
- Ravindra P. & Jegannathan K.R. (2015). Production of biodiesel using lipase encapsulated in κ -carrageenan. *Springer*.
- Ray S. (2015). Applications of extracellular microbial lipases-a review. *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry* **5**, 612.
- Richard, J. & C. Houssu (1983). Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués. *Le Lait* **63** (625-626) : 148-170.
- Romain J., Thomas C., Michel M., Pierre S. & Gérard B. (2008). Les produits laitiers (2^e ed.). *Lavoisier*.
- Ruban E.L. (1978). Lipolytic activity of microorganisms isolated from different sources. *Journal of microbiology* **14** (4), 499-503.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Bayram, O., Kesmen, Z., & Yilmaz, M. T. (2010). Characterization of Butter Spoiling Yeasts and Their Inhibition by Some Spices. *Journal of Food Science* **75**, 597–603.
- Sakili D. & Issoual D. (2003). Les bactéries lactiques dans l'élaboration du smen marocain lactic acid bacteria in processing maroccan sman. *Copyright Académie d'Agriculture de France*.
- Samet-Bali O., Ayadi M.A. & Attia H. (2009). Traditional Tunisian butter : Physicochemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 899-905.
- Sandoval G. (2012). Lipases and phospholipases : methods and protocols. *Humana Press*.
- Sangeetha R., Arulpandi I. & Geetha A. (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts : An Overview. *Research Journal of Microbiology* **6** (1), 1-24.
- Santos J.N., Molognoni L., Vieira T.A., Valesse A.C., Tuzimoto P., Cattani C.S.O. & Daguer H. (2016). Scope extension validation of a LC-MS method for the inspection of preservatives in butter. *Food Control* **67**, 209-15.
- Saxena R., Sheoran A., Giri B. & Davidson W.S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* **52** (1) : 1-18.

- Sefha F. (2011). Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée. Doctoral dissertation, Université Yahia Farès de Médéa.
- Sharma R, Chisti Y. et Banerjee U. C. (2001). Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances*. 19: 627-662.
- Shivareddy D., Ksheerasagar R. & Abhilash M. (2010). Isolation, optimization, production and molecular characterization of lipase from *Bacillus* and *Pseudomonas* species and protein profiling. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences* **1**, 27-38.
- Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* **23**, 15-22.
- Singh A., Goering R.V., Simjee, S., Foley S.L., Zervos M.J. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews* **19** (3), 512–530.
- Singh M., Singh R.S. & Benerjee U.C. (2010). Enantioselective trans esterification of racemic phenyl ethanol and its derivatives in organic solvent and ionic liquid using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Process biochemistry* **45**, 25-29.
- Sirisha E., Rajasekar N. & Narasu M.L. (2010). Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research* **4**, 249-52.
- Smeltzer M. S., Hart M. E. & Iandolo, J. J. (1992). Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl. Environ. Microbiol* **58**, 2815–2819.
- Sorokin D.Y. & Jones B.E. (2009). Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions. *Microbiology* **78**, 125-30.
- Spreer E. (1998). Milk and Dairy Product Technology. *Taylor & Francis*.
- Tansey M.R. (1971). Agar-diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Archives of Microbiology* **77**, 1-11.
- Tantaoui-Elaraki A. & El Marrakchi A. (1987). Study of Moroccan dairy products: *Iben* and *smen*. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology* **3**, 211-20.

- Taskin M., Ucar M.H., Unver Y., Kara A.A., Ozdemir M. & Ortucu S. (2016). Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **8**, 97-103.
- Thomson C.A., Delaquis P.J. & Mazza G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **39**, 165-87.
- Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M. & Oliveira J.V. (2010). A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology* **3**, 182-96.
- Triqui R. & Guth H. (2001). Potent odorants in "Smen", a traditional fermented butter product. *European Food Research and Technology* **212**, 292-5.
- Uddin M.N. *et al.* (2016). Characterizing Microbial Populations in Petroleum-Contaminated Soils of Swat District, Pakistan. *Polish Journal of Environmental Studies* **25** (4) : 1721-1727.
- Verraes C., Vlaemynek G., Van Weyenberg S., De Zutter L., Daube G., Sindic M., Uyttendaele M. & Herman L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal* **50**, 32-44.
- Vignola C. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. *Ed Lvoisier*, Paris.
- Walstra P., Walstra P., Wouters J.T. & Geurts T.J. (2005). Dairy science and technology. *CRC press*.
- Watanabe N., Ota Y., Minoda Y. & Yamada K. (1977). Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1353-1358.
- Wilbey R.A. (2005). Microbiology of Cream and Butter. In : Dairy Microbiology Handbook. *John Wiley & Sons, Inc.* pp. 123-74
- Wondu M. (2007). Composition, microbial quality and acceptability of butter produced from cow's milk in Awassa, Southern Ethiopia. M. Sc Thesis Hawassa University, Ethiopia.

ANNEXES

Questionnaire sur le procédé de préparation du beurre cru et du *smen*

N° du questionnaire :Date: / / 201 ..

Dans le cadre de mon mémoire de magister, Ce questionnaire est effectué pour connaître la traçabilité du Beurre cru et du *smen* utilisés pour notre travail.

Nous demandons de bien vouloir répondre à toutes les questions suivantes ; Vos réponses seront un élément essentiel à la réussite de cette étude.

I. IDENTITE DES INTERVIEWERS

Nom et prénom (facultatif) : Sexe : Féminin Masculin

Age :ans

Profession :

Lieu de résidence : Daïra : Wilaya :

Origine : Urbain Rural

II.LA MATIERE PREMIERE (BEURRE CRU)

II-1- L'origine de la matière première

Q1- quelle matière première utilisez-vous ?

Beurre fermier Beurre cru Beurre pasteurisé
Lait cru margarine Autres

Q2- Le beurre utilisé est-il préparé à la maison ? Oui Non

• Si oui :

Q2-1- Quel est le lait utilisé pour sa préparation ?

Cru Nature (pasteurisé, stérilisé)
Reconstitué Autres

Q2-2- Le lait utilisé a-t-il subi un traitement thermique ? Oui Non

Q2-3- quelle est l'origine de ce lait ?

Vache Brebis Chèvre
Camelin Mélange (Citer)

II-2- Préparation de la matière première

Q3- Le beurre est préparé à partir de : Lait coagulé De la crème

• Si oui, citez le temps et la température ?

.....

Q5- Quelles sont les conditions de la coagulation de lait ?

Temps :

Température :

Q6- Ajoutez-vous des additifs pour favoriser la coagulation ou la fermentation ?

Oui Non

• Si oui, citez-les ?

.....

Q7- quel est le type de baratte utilisez vous ?

.....

Q8 - Quel est le temps de barattage ?

.....

Q9 - Le beurre préparé, est-il utilisé immédiatement pour la préparation de smen ?

Oui Non

• Si non, pourquoi ?

.....

III. PREPARATION DE SMEN

Q10- Le beurre utilisé est-il fondu ? Oui Non

• Si oui, citez le couple :

Temps :

Température :

Q11- Ajoutez-vous d'autres ingrédients au beurre ? Oui Non

• Si oui, citez le type et la quantité ?

Ingrédients					
Quantité					
Quantité de beurre					

Q12- Selon vous, pourquoi vous les ajoutez ?

.....

Q13- Si le beurre est fondu, quel est le moment de l'ajout ?

Avant la fonte Après la fonte

Q14- Procédez-vous au malaxage de mélange (beurre ingrédients) ? Oui Non

• Pourquoi ?

Q15- Quelle est la méthode utilisée pour la récupération de men ?

Q16- Est ce qu'il y a des parties qui sont éliminées ? Oui Non

• Si oui :

- Quelle sont :

-Vous les utilisez pour autres choses:

IV. MODE DE CONSERVATION DU SMEN

Q17 - Le smen préparé est utilisé :

Directement après préparation

Après conservation Citez la durée :

Q18- Les ustensiles utilisés:

Jarre en terre

Plastique

Verre

Céramique

Autres

• Pourquoi ?

Q19-Quelles sont les conditions de conservation ?

Température :

Temps (Pour l'échantillon récupéré) :

Aération :

Q20- Donnez une description du produit prêt à l'utilisation ?

-goût :

-couleur :

-odeur :

Q21- Quelles sont les problèmes rencontrés lors de la préparation et/ou la conservation ?

.....

V. MODE DE CONSOMMATION DU SMEN

Q22 - Smen est consommé : Ajouté dans les plats traditionnels Autres

Annexe 02 Milieux de culture et solutions

1. Milieux gélosés

Les compositions sont données pour un litre d'eau distillée, le volume doit être amené à un litre d'eau à l'aide de la quantité nécessaire d'eau distillée. Le pH final, le temps et la température d'autoclavage sont mentionnés ainsi que les modalités particulières de préparation.

GNO (Gélose Nutritive Ordinaire)	
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 7,2	
Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes	
Guiraud, 2003	

Gélose PDA (Gélose Pomme de Terre Glucosée)	
Extrait de pomme de terre (à partir de 200g)	1l
Glucose	20 g
Gélose	15 g
pH 5,6	
Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes	
Guiraud, 2003	

Gélose SD (Sabouraud Dextrose)	
Peptone de viande	5g
Peptone de caséine	5g
Glucose	20 g
Gélose	20 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 6,3	
Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes	
Guiraud, 2003	

Gélose OGA (Gélose Oxytétracycline-Glucose)	
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	20,0 g
Gélose	16,0 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 7,0	
Stérilisation : 115°C pendant 20 minutes	
Guiraud, 2003	

Gélose Nutritive Ordinaire au jaune d'œuf	
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 7,2	
Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes	
Addition de 10 % de jaune d'œuf à 8 %	
Guiraud, 2003	

Gélose MRS (Gélose de Man Rogosa et Sharpe)	
Peptone	10,0 g
Peptone de viande	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	20,0 g
Tween 80	1,0 mL
Phosphate dipotassique	2,0 g
Acétate de sodium	5,0 g
Citrate triammonique	2,0 g
Sulfate de magnésium	200,0 mg
Sulfate de manganèse	50,0 mg
Gélose	15,0 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 6,5	
Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes	
Guiraud, 2003	

Gélose M17 (Gélose de Terzaghi)	
Peptone de soja	5,0 g
Peptone de viande	2,5 g
Peptone de caséine	5,0 g
Peptone de caséine	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Lactose	5,0 g
Acide ascorbique	0,5 g
Glycérophosphate de sodium	19,0 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Gélose	13,0 g
Eau distillée qsp 1000 mL	1000 mL
pH 7,2	
Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes	
Guiraud, 2003	

Gélose Mannitol mobilité	
Peptone	20 g
Nitrate de potassium	1 g
Mannitol	2 g
Rouge de phénol	40 m g
Gélose	4 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 8,1	
Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes	
Guiraud, 2003	

2. Milieux liquides

Bouillon Nutritif	
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 7,2	
Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes	
Guiraud, 2003	

Solution saline	
Chlorure de sodium	0,85 g
Eau distillée	100 mL

Milieu de la sporulation	
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
de sulfate de manganèse	0,004 %
Eau distillée qsp	1000 mL
pH 7,2	
Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes	
Guiraud, 2003	

3. Solutions

Solution de sulfate de cuivre (II) saturé	
Produits	Quantité
Pentahydrate de sulfate de cuivre formule $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	207,70 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Tampon phosphate à 0,2 mol/L et de pH 7.0		
Produits	Masse molaire (g/mol)	Quantité
Potassium phosphate monobasique KH_2PO_4	136,09	10,53 g
Potassium phosphate dibasique K_2HPO_4	223,23	27,37 g
Eau pure qsp		1000 mL

Solution de CaCl ₂ à 0,6 %	
Produits	Quantité
Chlorure de calcium CaCl ₂	6 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Solution de NaOH à 0,1 M	
Produits	Quantité
Hydroxyde de sodium NaOH	4 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Réactif de Bradford	
Produits	Quantité
Bleu de Coomassie G-250	100 mg
Éthanol à 95%	50 ml
Après une agitation magnétique pendant 2 heures ajouter	
Acide orthophosphorique à 85%	100 ml
Eau distillée qsp	ajusté à 1 litre

Gamme d'étalonnage à utiliser pour le dosage des protéines par la méthode Bradford							
Tubes	0	1	2	3	4	5	6
Gamme SAB en (µg/mL)	0	10	20	30	40	50	60
SAB (µL)	0	5	10	15	20	25	30
Eau	100	95	90	85	80	75	70
Réactif Bradford (µL)	300						
Homogénéiser et garder à l'obscurité pendant exactement 5 min							

4. Réactifs de la coloration de Gram (Guiraud, 2003)

- Solution de violet de Gentiane : 1 g de violet de gentiane, 10 mL d'alcool éthylique à 95 %, 2 g de phénol ajoutés à 100 mL d'eau distillée.
- Solution de Lugol : 1g d'iodure de potassium, 1 g d'iode ajoutés à 300 mL d'eau distillée.
- Alcool éthylique : à 95 %.
- Solution de Fuschine de ziehl : 1g de Fuschine, 10 mL d'alcool éthylique à 95 %, 5 g de phénol ajoutés à 100 mL d'eau distillée.














5. Autres réactifs et produits

- Eau oxygénée ;
- Glycérol (5 %) ;
- NaCl ;
- CaCl₂ ;
- Acétone ;
- Ethanol ;
- NaOH ;
- Phénolphtaléine ;
- la gomme arabique ;
- Glycérol à 20 % ;
- Huile d'olive ;



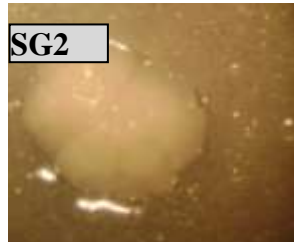
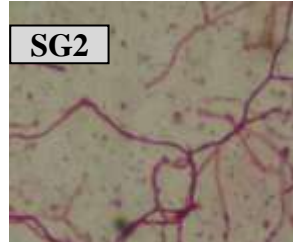
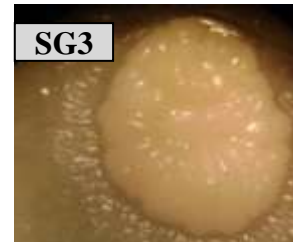
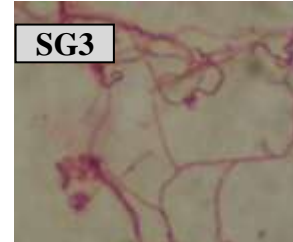

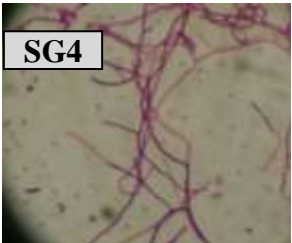


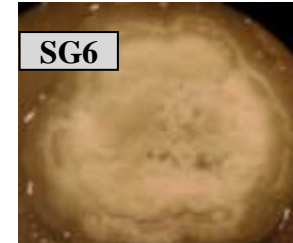


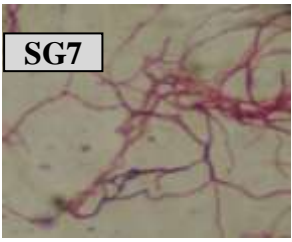
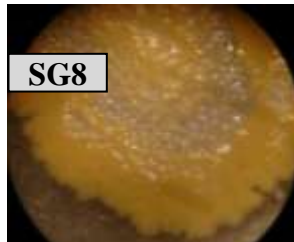
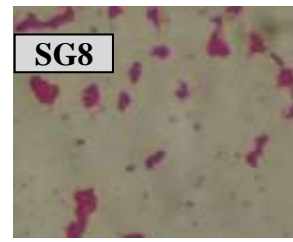

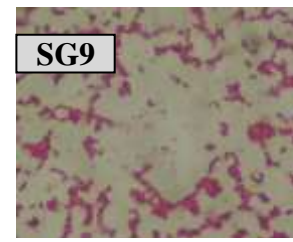
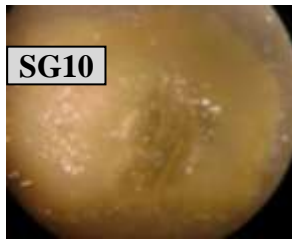
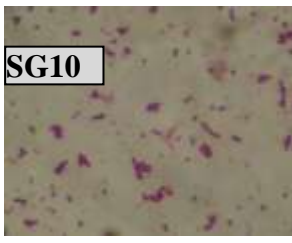
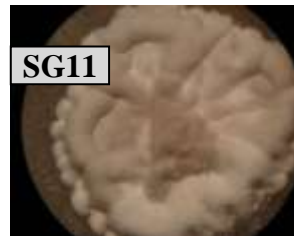
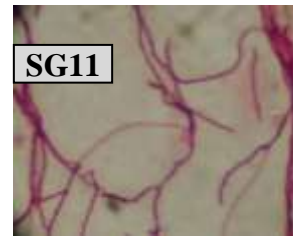

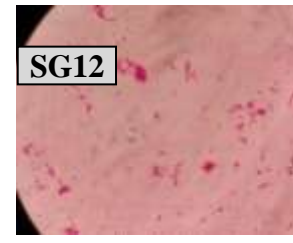
Annexe 03**Matériels et appareillages****La liste des appareils et matériels**

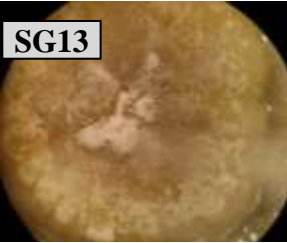
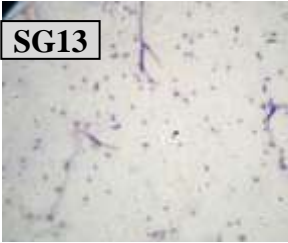


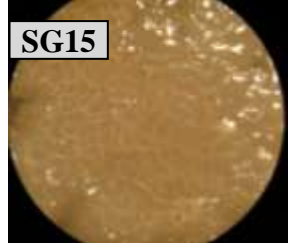


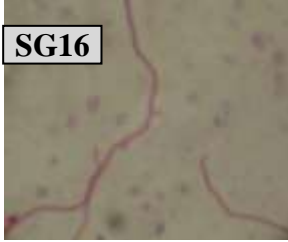


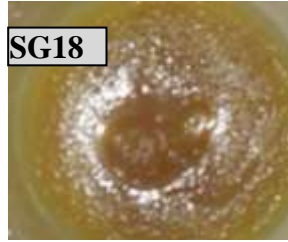
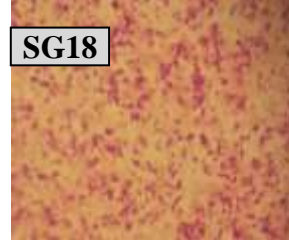
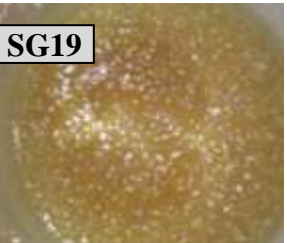
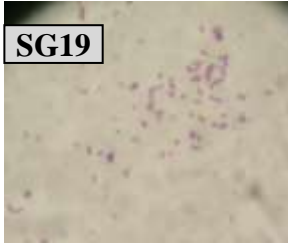
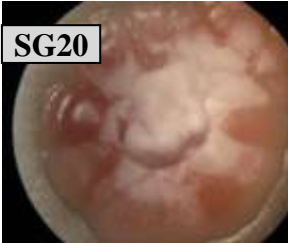
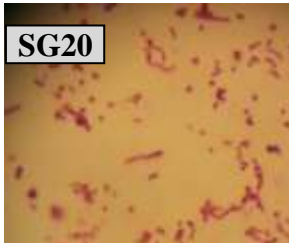
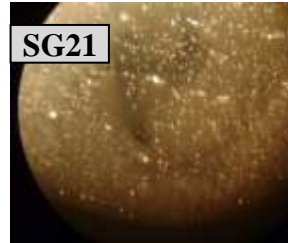
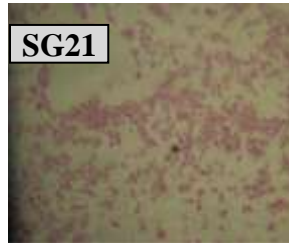
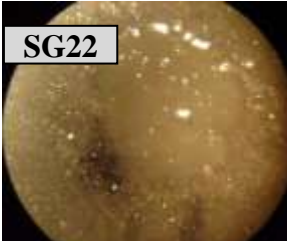

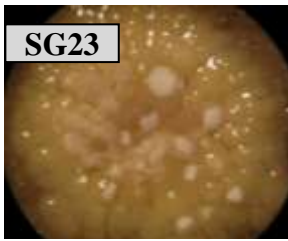
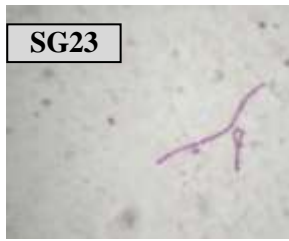
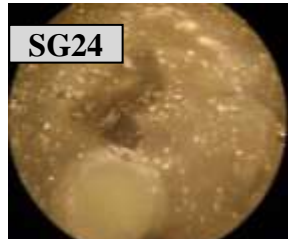

Equipement	Marque
Etuve	Memmert
Bain marie	Memmert
Bain marie agité	Memmert
Balance de précision	KERN
Microscope optique	Motic B1-220 ASC
Agitateur magnétique chauffant	IKA RH basic 2
Réfrigérateur à (- 4°C)	Condor
Congélateur à (-20°C)	FCKW-Frei
Agitateur-Vortex	VELP Scientific
pH mètre	Ohaus STARTER 3100
Compteur colonies	Bioblock Scientific
Centrifugeuse	NF400 / 400R
Autoclave	Autoclave - Aluminium (Cooker Type)
La loupe binoculaire	MOTIC S-10-P
Ultraturrax	IKA T18
Spectrophotomètre	SHIMADZU

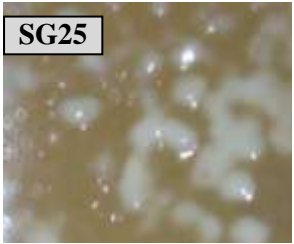
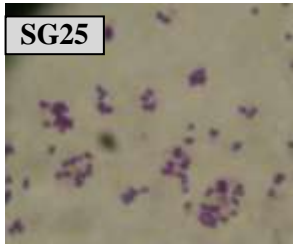
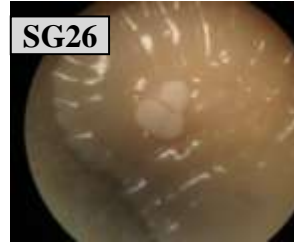


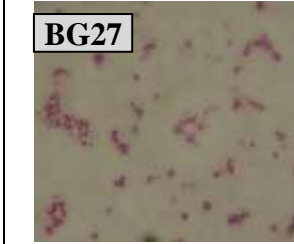
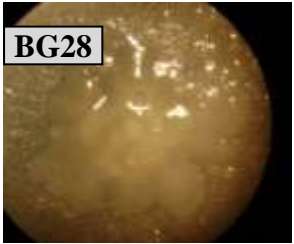
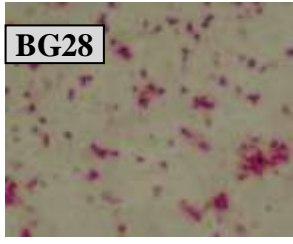

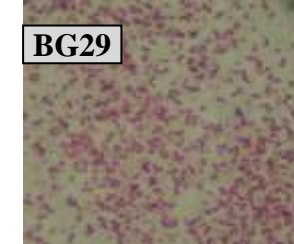
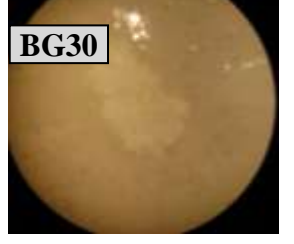
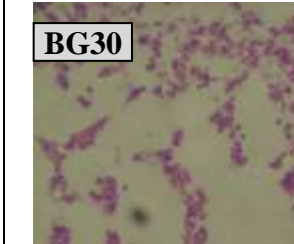
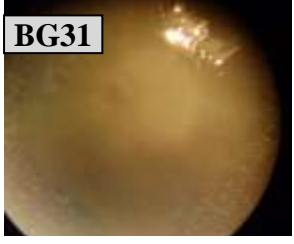

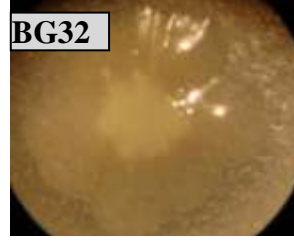
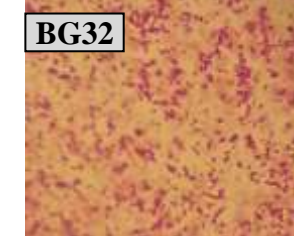
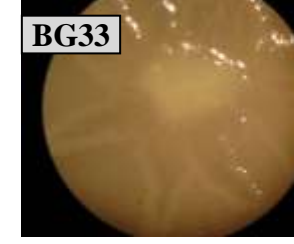
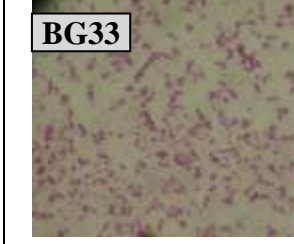

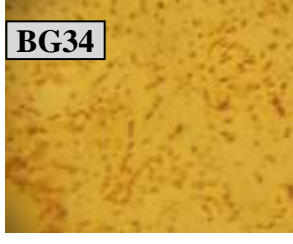

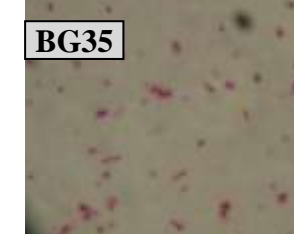

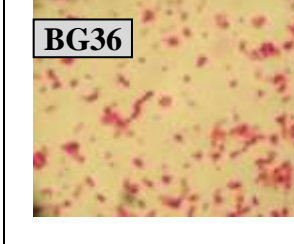
Images de quelques appareils et matériels**Etuve****Bain marie****Bain marie agité**

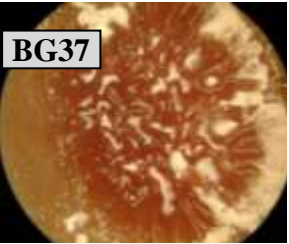
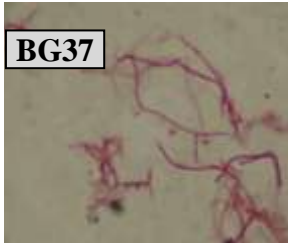

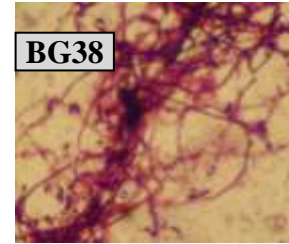
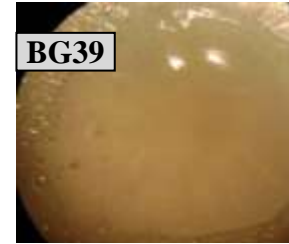
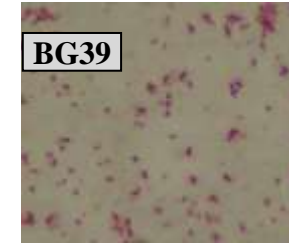
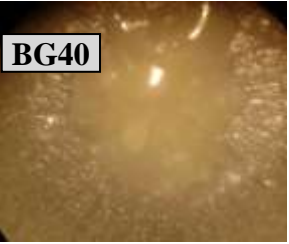
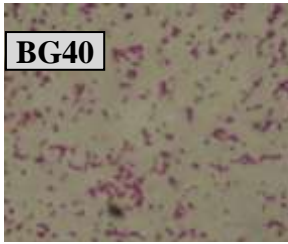

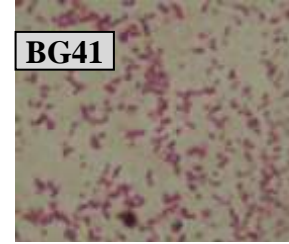
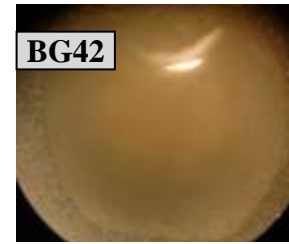
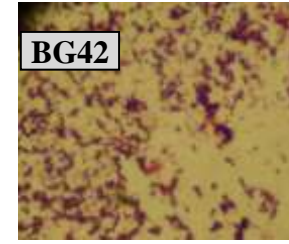

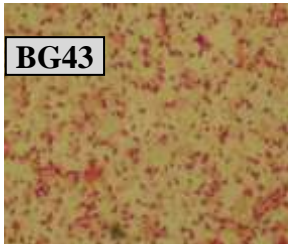
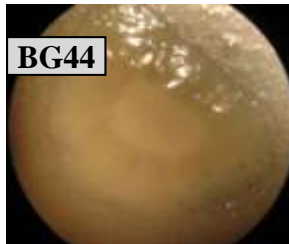
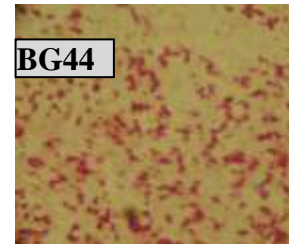





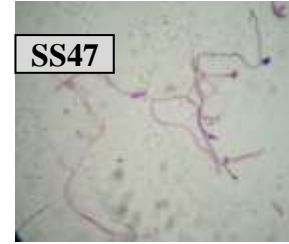

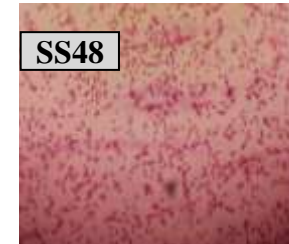
		
Balance de précision	Microscope optique	Agitateur magnétique chauffant
		
Réfrigérateur à (- 4°C)	Congélateur à (-20°C)	Agitateur-Vortex
		
pH mètre	Compteur colonies	Centrifugeuse
		
Autoclave	La loupe binoculaire	Ultraturrax
		
Spectrophotomètre		



Annexe 04Aspect macroscopique et microscopique des isolats après 7 jours de culture

Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)
 SG1	 SG1	 SG2	 SG2	 SG3	 SG3
 SG4	 SG4	 SG5	 SG5	 SG6	 SG6
 SG7	 SG7	 SG8	 SG8	 SG9	 SG9
 SG10	 SG10	 SG11	 SG11	 SG12	 SG12

Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)
 SG13	 SG13	 SG14	 SG14	 SG15	 SG15
 SG16	 SG16	 SG17	 SG17	 SG18	 SG18
 SG19	 SG19	 SG20	 SG20	 SG21	 SG21
 SG22	 SG22	 SG23	 SG23	 SG24	 SG24

Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)
 SG25	 SG25	 SG26	 SG26	 BG27	 BG27
 BG28	 BG28	 BG29	 BG29	 BG30	 BG30
 BG31	 BG31	 BG32	 BG32	 BG33	 BG33
 BG34	 BG34	 BG35	 BG35	 BG36	 BG36

Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)	Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)
 BG37	 BG37	 BG38	 BG38	 BG39	 BG39
 BG40	 BG40	 BG41	 BG41	 BG42	 BG42
 BG43	 BG43	 BG44	 BG44	 BG45	 BG45
 SS46	 SS46	 SS47	 SS47	 SS48	 SS48

Aspect macroscopie	Aspect microscopie (x100)
	

Annexe 05**Protocoles****Préparation d'émulsion d'huile d'olive dans la gomme arabique (Sefha, 2011)**

Dans un bécher d'un litre, on porte à l'ébullition 1L d'eau distillé. Sous agitation, 20g de la gomme arabique est versée en pluie. Quand la gomme arabique est dispersée, la solution est laissée sous agitation dans un cristalliseur remplie de glace jusqu'à ce que la solution soit clarifiée.

L'émulsion d'huile d'olive est préparée à l'aide d'un homogénéiseur (ultratorex) par l'ajout d'huile d'olive (tout dépend la concentration en substrat désirée) dans la solution de la gomme arabique, le mélange est agité 4 fois 1 minute en s'arrêtant 30 secondes entre deux agitations successives pour éviter l'échauffement de l'émulsion.

Préparation d'émulsion d'huile d'olive dans le Tween 80 (Sierra, 1957)

L'émulsion d'huile d'olive est préparée à l'aide d'un homogénéiseur (Ultraturax) par l'ajout d'huile d'olive (tout dépend la concentration en substrat désirée) dans le Tween 80.

Préparation d'émulsion de jaune d'œuf (JORA n°68 du 23 novembre 2014)

- Nettoyer les œufs frais avec une brosse à l'aide d'un détergent liquide ;
- Rincer à l'eau courante puis désinfecter les coquilles (plonger dans l'éthanol à 70 % fraction volumique pendant 30 seconde ;
- Laisser sécher à l'air, soit en les pulvérisant d'alcool suivi de flambage ;
- Mettre dans un flacon stérile de jaune d'œuf et ajouter quatre fois leur volume d'eau distillée stérile ;
- Mélanger vigoureusement ;
- Chauffer le mélange dans un bain à 47°C pendant 2 h et entreposé à 3°C pendant 18 à 24h, pour laisser former un précipita ;
- Récupérer le surnageant dans des flacons stériles.

Coloration simple (Guiraud, 2003)

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Recouvrir le frottis fixé par quelque gouttes de bleu de méthylène.
- Laisser agir 30 secondes à 2 minutes.

- Rincer à l'eau.
- Séchez à la flamme.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope.

Coloration différentielle de Gram (Guiraud, 2003)

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool absolu en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope.
- Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Bartholomew et Mittwer (Guiraud, 2003)

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et chauffer sur la flamme d'un bec benzène (20 passage).
- colorer pendant 10 minutes à l'aide d'une solution saturé de vert de malachite.
- laver rapidement durant 10 secondes à l'eau froide.
- Recolorer par la safranine à 0,25 % pendant 15 secondes.
- laver rapidement à l'eau.
- sécher à la flamme.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope.

Annexe 06**Fiches Technique de Food Scan****FOODSCAN – FOSS****Principe de la mesure**

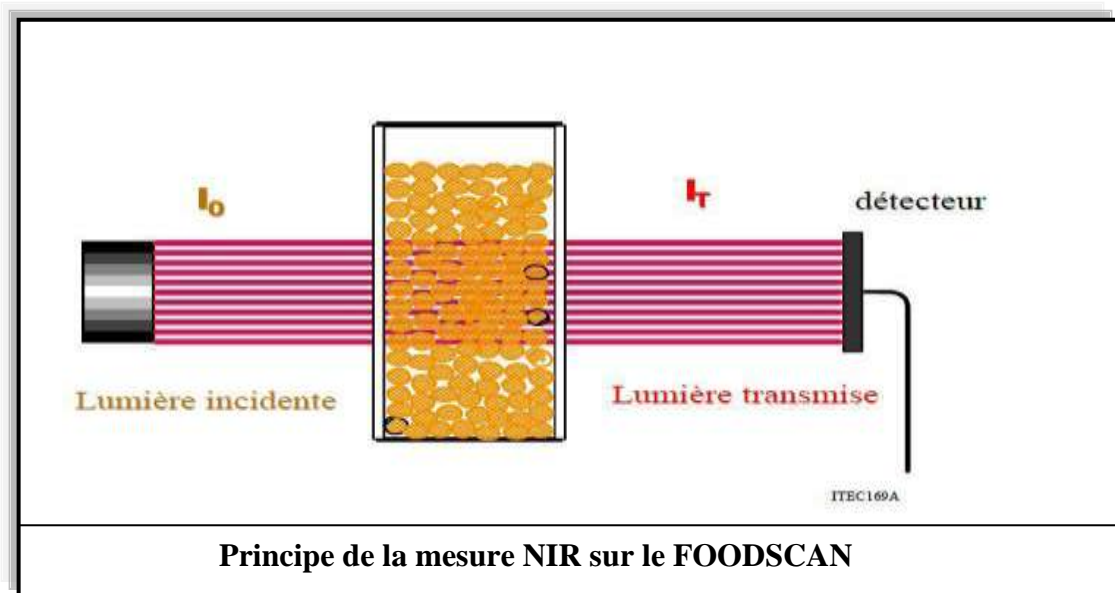
La spectroscopie Proche Infrarouge (NIR) est basée sur l'interaction entre la lumière et la matière organique. La **lumière** a long temps été définie soit comme un corpuscule (théorie défendue par Newton), soit comme une onde (théorie défendue par De Huygens). L'approche quantique de physique a démontré la dualité de la lumière, à savoir que la lumière se comporte soit comme une onde (onde électromagnétique), soit comme un **corpuscule** (photons) selon l'observation.

Le comportement ondulatoire de la lumière est caractérisé par 3 grandeurs :

- La longueur d'onde (distance parcouru entre 2 maximas, ou 2 minimas),
- L'amplitude (intensité de la lumière)
- La célérité (vitesse de la lumière dans le milieu).

La **matière** peut être modélisée comme un oscillateur anharmonique : en raison des forces de répulsions entre électrons voisins, et des forces d'attraction entre les électrons d'un atome et les protons des atomes voisins, les liaisons chimiques sont continuellement oscillent.

Ainsi, même à l'état fondamental (équilibre thermodynamique) **la molécule est en vibration**. Par conséquent, chaque type de liaison chimique est défini par une **fréquence de vibration**. Cette vibration naturelle a pour conséquence de modifier le moment dipolaire des liaisons (si existant).



Dans le cas du FOODSCAN où le mode d'analyse est la transmittance, l'expérimentation fait en sorte que seule l'énergie transmise soit mesurée. Si le mode d'analyse est la réflectance (InfraXact par exemple), alors l'énergie transmise sera cette fois nulle et seule l'énergie réfléchie est mesurée. Le mode d'analyse est à choisir selon l'application. FOODSCAN irradie donc l'échantillon d'une succession de lumière monochromatique (longueur d'onde entre 805 et 1050 nm, avec une résolution de 2 nm) et mesure ensuite la quantité d'énergie transmise. Le résultat de la mesure du FOODSCAN est alors une valeur d'absorbance tous les 2nm entre 850 et 1050 nm. FOSS préconise donc de mettre en place un plan de contrôle sur chacun de vos produits.

Annexe 07 Résultats en chiffres de l'évaluation des hauteurs de lyse des isolats faiblement lipolytiques, mesure de pH à la des cultures et de dosage des protéines

1. Résultats en chiffres des de l'évaluation des hauteurs de lyse des isolats faiblement lipolytiques (en mm)

Codes	Milieux	Origines	3 ^{ème} jours	6 ^{ème} jours	9 ^{ème} jours	12 ^{ème} jours
1	GN _{TH}	ES1A	0±0	1.67±0.29	2±0	2±0
2			2.67±0.29	5.83±0.29	6±0	6±0
3			0±0	0±0	8.83±0.29	13.17±0.29
4			0±0	1.83±0.29	5.17±0.29	8±0
5			0±0	0±0	0±0	1.17±0.29
6			4±0.5	8±0	8±0	8±0
7			2±0	4.17±0.29	6.33±0.58	6.33±0.58
8			0±0	0±0	1.00±0	1±0
9			1.33±0.58	3.67±0.29	7.17±0.29	8±0
10		ES3A	1.17±0.29	3±0	5.17±0.29	5±0
11			4.33±0.58	8.33±0.58	9.17±0.29	10±0
12			0±0	1.17±0.29	2.17±0.29	2.17±0.29
13			3.83±0.29	7±0	11±0	13±0
14			0±0	1±0	1±0	1±0
15			4.67±0.58	6.83±0.29	12.67±0.58	13±0.5
16		ES23 _A	2.17±0.29	4.5±0.5	7±0	8.33±0.58
17			3.17±0.29	7.03±0.06	11.17±0.29	13.17±0.29
18			3.33±0.58	6.5±0.5	17±0	18.83±0.29
19			0±0	1.67±1.15	7.33±0.58	13.33±0.58
20			0±0	1±0	1±0	1±0
21			3.5±0.5	7.83±0.76	10±0.5	15.17±0.76
22			0±0	0±0	0±0	1±0
23			4.5±0	7.83±0.29	9.67±0.58	12.83±0.76
24			5±1	6.17±1.04	12±1	13.17±1.26
25			1.17±0.29	4.67±0.58	9±1	10.33±0.58
26			4±0.5	7±1	8.17±0.29	8.67±0.29
27			2.67±0.29	3.17±0.29	5±0	5±0
28			0.83±0.29	0.83±0.29	2±0	2±0
29			4.33±0.58	7.5±0.87	7.5±0.87	8.17±0.29
30			4.17±0.29	10.67±0.58	14±0	14±0
31			4.5±0.5	6.5±0.5	7±0	7±0
32			5.67±0.58	6±0	6±0	6.33±0.58
33			2.83±0.29	3.67±0.58	5.83±1.44	10.33±0.58
34			0±0	1.5±0.5	5.17±0.76	9±1
35			2.67±0.58	5.67±0.58	8±0	12±0
36			2.17±0.29	5±0	7.17±0.29	9±0
37			3.83±0.29	4.67±0.58	7.33±0.29	12±0
38			1.83±0.29	6.17±0.29	8±0	8±0
39			3.83±0.29	6±1	7.67±0.29	10±0
40			2±0	3.17±0.29	8.33±0.58	11±0
41			2.17±0.29	4±0	6.17±0.29	8±0
42			3.67±0.58	5±0	9±0	10±0
43		4.67±0.58	5.67±0.58	9.67±0.58	11.67±1.15	

Codes	Milieux	Origines	3 ^{ème} jours	6 ^{ème} jours	9 ^{ème} jours	12 ^{ème} jours	
44	GN _{TH}	EB	4.5±0.5	5±0	5±0	5±0	
45			1.50±0.5	3±0	3±0	3±0	
46			2±0	6±0	11±0	10.33±0.58	
47			0±0	0±0	0±0	1.17±0.29	
48			4.33±0.58	6.33±0.58	13.67±1.53	18.33±1.15	
49			0±0	3.67±0.58	6.33±1.15	6.67±0.58	
50			0±0	0±0	0±0	1±0	
51			2.67±0.58	5.67±0.58	8.67±0.58	9±0	
52			3±0	7±0	10±0	14±0	
53			2±0	5.33±0.58	7.67±0.58	7.67±0.58	
54			3±0	4.83±0.76	9±0	10±0	
55			1.67±0.58	3.83±0.29	3.83±0.29	8±0	
56			0±0	0±0	0±0	5.33±1.53	
57			0±0	0±0	0±0	1.17±0.29	
58			0±0	1.67±0.58	6.33±2.08	11±1	
59			0±0	2.67±0.58	6.33±1.15	8.5±0.5	
60			0±0	0±0	4.67±0.58	7.67±0.58	
61			0±0	0±0	4.33±0.58	7.33±0.58	
62			0±0	0±0	0±0	0±0	
63			0±0	4.83±0.29	7.67±0.58	8.67±0.58	
64			ES5 _A	0.67±0.58	3.67±0.58	4±0	4±0
65		3.5±0.5		2.17±0.29	5.33±0.58	6±0	
66		1±0		4±0	6±0	6±0	
67		1.17±0.29		2.33±0.58	3±0	3±0	
68		2±0		4±0.5	5±1	6±0	
69		2.67±0.29		2±0	5±0	5±0	
70		4.33±0.58		4±0	5.33±1.15	5.33±1.15	
71		1.83±0.29		3±0	4±0	4±0	
72		ES10 _A		2.33±1.53	5.17±0.76	9.33±1.15	9.67±0.58
73				4.33±0.58	7.33±0.58	7±0	7±0
74			3±1	5±1	5.5±0.5	6±0	
75			1.33±0.58	4±0	6.33±0.58	6.33±0.58	
76			3.83±0.76	7±0	7±0	7±0	
77	2.67±0.58		4.67±0.58	4.67±0.58	4.67±0.58		
78	2±0		5±0	6±0	6±0		
79	1±0		1±0	2±0	2±0		
70	4±2		6±1.73	6.33±1.15	6.67±0.58		
81	1±0		1±0	1±0	1±0		
82	1±0	1±0	1±0	1±0			
83	SD _H	ES1 _A	1±0	1±0	1±0	1±0	
84		EB	2±0	2±0	2±0	2±0	
85			2±0	2±0	2±0	2±0	
86			2±0	2±0	2±0	2±0	
87			2.67±0.58	6.33±1.15	7±0	7±0	
88			1±0	6±0	6±0	6±0	
89			0±0	2.33±0.29	2.83±0.29	3±0	
90			3.17±0.29	7.67±0.58	8±1	9.17±0.29	
91			2.17±0.29	2.17±0.29	2.17±0.29	2.17±0.29	
92			1.67±0.58	1.83±0.76	2±0.5	2.33±0.29	
93			3.17±0.29	3.17±0.29	3.17±0.29	3.17±0.29	
94			2.33±0.58	3±0	3±0	3±0	
95			3±0	3±0	3±0	3±0	
96			2±0	3±0	3±0	3±0	
97			1.83±1.04	2.17±0.76	2.33±0.58	2.33±0.58	
98			2±0	4.67±0.58	4.67±0.58	4.67±0.58	
99			GN _{JO}	ES1 _A	2±0	4±0	4±0

Suite de tableau

Codes	Milieux	Origines	3 ^{ème} jours	6 ^{ème} jours	9 ^{ème} jours	12 ^{ème} jours
100	GN _{JO}	ES3 _A	2.17±0.29	4±0	4±0	4±0
101			0±0	0±0	0±0	0.33±0.58
102			0±0	0±0	0.33±0.58	0.67±0.58
103			0±0	0±0	1±0.87	1.67±0.58
104			1±0	1±0	1±0	1±0
105			1.67±0.58	4.67±0.58	5±0	5±0
106		0±0	0±0	0±0	1±0	
107		EB	1.67±1.15	2.33±0.58	2.33±0.58	2.33±0.58
108			0±0	1.67±0.29	2.67±1.15	3.33±0.58
109			1.67±0.58	2.67±0.58	5±1	5±1
110	1±0		3±0	3±0	3±0	

Suite de tableau

2. Résultats en chiffres des mesures de pH à la fin des cultures

Codes	PH ₁ de BN _T	PH ₂ de BN _H	PH ₃ de BN _{TH}	Codes	PH ₁ de BN _T	PH ₂ de BN _H	PH ₃ de BN _{TH}
SG1	8,33±0,00	8,90±0,01	8,23±0,03	SG23	8,57±0,01	8,50±0,00	8,63±0,00
SG2	8,35±0,08	8,84±0,00	8,34±0,01	SG24	8,76±0,00	8,68±0,01	8,02±0,08
SG3	8,45±0,01	8,82±0,03	8,83±0,02	SG25	8,17±0,04	8,92±0,00	7,34±0,01
SG4	8,03±0,00	8,83±0,00	8,71±0,01	SG26	8,79±0,01	8,85±0,05	8,53±0,01
SG5	8,34±0,01	8,77±0,00	8,38±0,01	BG27	8,24±0,00	8,55±0,02	8,17±0,01
SG6	8,03±0,00	8,74±0,01	8,65±0,04	BG28	8,46±0,03	8,68±0,00	8,57±0,00
SG7	8,22±0,08	8,82±0,00	8,23±0,03	BG29	8,30±0,00	8,57±0,00	8,64±0,00
SS46	8,73±0,00	8,46±0,56	8,06±0,00	BG30	8,42±0,00	8,76±0,01	8,59±0,03
SS47	8,75±0,06	8,42±0,00	8,28±0,01	BG31	8,47±0,39	8,84±0,01	8,66±0,01
SS48	8,38±0,00	8,76±0,00	8,10±0,00	BG32	8,23±0,00	8,70±0,00	8,34±0,00
SG8	7,92±0,00	8,80±0,00	8,57±0,01	BG33	8,37±0,01	8,75±0,01	8,40±0,07
SG9	8,82±0,00	8,75±0,04	8,60±0,03	BG34	8,33±0,01	8,49±0,00	8,46±0,04
SG10	8,02±0,01	8,63±0,00	8,64±0,01	BG35	8,15±0,03	8,74±0,00	8,49±0,01
SG11	8,16±0,00	8,81±0,00	8,10±0,04	BG36	8,15±0,01	8,73±0,01	8,63±0,00
SG12	8,09±0,00	8,92±0,06	7,53±0,27	BG37	8,34±0,00	8,57±0,00	8,48±0,00
SG13	8,11±0,05	8,92±0,00	8,31±0,03	BG38	8,57±0,00	8,81±0,00	8,49±0,00
SG14	8,31±0,00	8,71±0,00	8,68±0,00	BG39	8,33±0,03	8,84±0,00	8,34±0,04
SG15	8,20±0,28	8,63±0,01	8,09±0,01	BG40	8,44±0,04	8,63±0,13	7,94±0,01
SG16	8,47±0,00	8,79±0,29	8,44±0,03	BG41	8,41±0,01	8,78±0,10	8,57±0,01
SG17	8,36±0,00	8,65±0,01	8,54±0,00	BG42	8,49±0,05	8,62±0,01	8,31±0,00
SG18	8,86±0,01	8,73±0,00	8,43±0,00	BG43	8,24±0,00	8,72±0,00	8,47±0,00
SG19	8,20±0,01	8,70±0,00	8,61±0,00	BG44	8,42±0,00	8,64±0,00	8,27±0,03
SG20	8,06±0,01	8,64±0,01	8,33±0,01	BG45	8,47±0,01	8,84±0,01	8,56±0,00
SG21	8,21±0,00	8,82±0,00	8,18±0,00	BS49	8,83±0,01	8,86±0,03	8,26±0,00
SG22	8,18±0,01	8,62±0,00	8,24±0,00				

3. Résultats en chiffres des dosages des protéines ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Codes	Milieu BN _T	Milieu BN _H	Milieu BN _{TH}	Codes	Milieu BN _T	Milieu BN _H	Milieu BN _{TH}
SG1	1,76±0,08	0,49±0,00	5,70±0,80	SG23	20,03±4,76	1,12±0,00	2,00±0,38
SG2	1,58±0,23	0,28±0,00	2,21±0,02	SG24	9,63±0,05	0,91±0,00	1,18±0,00
SG3	9,10±1,93	2,52±0,00	2,43±0,00	SG25	4,42±0,00	0,62±0,00	1,06±0,00
SG4	1,05±0,18	0,79±0,03	5,57±2,22	SG26	0,60±0,00	0,95±0,01	2,45±0,00
SG5	0,69±0,27	1,39±0,00	2,06±0,00	BG27	1,34±0,22	0,16±0,00	8,23±0,05
SG6	10,03±1,46	0,82±0,00	8,40±1,41	BG28	10,43±0,80	0,89±0,00	6,77±0,61
SG7	13,63±2,40	0,96±0,00	2,49±0,03	BG29	13,40±0,00	0,56±0,02	7,40±0,38
SS46	11,47±0,57	0,76±0,00	1,81±0,00	BG30	10,20±2,83	0,96±0,00	6,13±0,47
SS47	1,90±0,05	0,50±0,00	2,49±0,00	BG31	5,37±2,59	0,77±0,00	10,10±0,71
SS48	9,87±0,00	0,03±0,01	1,02±0,08	BG32	8,57±1,08	0,78±0,00	7,93±1,60
SG8	0,93±0,00	0,61±0,00	10,10±0,71	BG33	12,27±0,75	0,49±0,00	7,43±1,37
SG9	11,03±3,82	1,40±0,00	0,37±0,00	BG34	9,23±2,59	0,89±0,00	5,60±0,66
SG10	12,87±0,66	0,89±0,00	5,91±0,00	BG35	12,47±3,87	1,14±0,00	2,12±0,04
SG11	15,00±0,00	0,48±0,00	5,47±0,00	BG36	34,43±0,05	0,99±0,03	3,50±1,65
SG12	16,60±1,51	1,39±0,00	1,97±0,00	BG37	42,97±3,06	1,13±0,00	3,93±1,70
SG13	14,20±1,23	0,65±0,00	7,20±3,21	BG38	40,43±2,59	0,39±0,00	1,47±0,08
SG14	18,17±0,33	0,92±0,00	9,10±1,65	BG39	26,60±1,32	1,34±0,00	9,53±1,51
SG15	2,93±0,00	1,05±0,00	1,41±0,00	BG40	34,00±2,45	1,26±0,00	2,40±0,16
SG16	2,42±0,00	2,09±0,00	1,36±0,00	BG41	11,50±2,12	0,62±0,00	1,69±0,27
SG17	2,24±0,00	1,15±0,00	1,53±0,00	BG42	14,03±1,84	1,95±0,01	7,77±0,99
SG18	0,90±0,08	1,73±0,00	1,40±0,02	BG43	39,90±1,08	0,81±0,00	11,70±1,27
SG19	8,97±1,84	0,94±0,00	2,02±0,41	BG44	16,77±2,69	1,35±0,00	3,94±4,23
SG20	1,76±0,08	0,49±0,00	5,70±0,80	BG45	1,28±0,14	0,56±0,00	1,97±0,11
SG21	1,58±0,23	0,28±0,00	2,21±0,02	BS49	2,47±0,00	0,37±0,00	1,13±0,00
SG22	9,10±1,93	2,52±0,00	2,43±0,00				

Annexe 08

Valorisation scientifique

Le présent travail fut présenté dans la manifestation scientifique suivante :



Isolation of bacteria strains, producing lipases from Algerian *smen* (*Dhan*) or fermented butter and evaluation their potential

Nora Belhoula^{1*}, Wissem Boutana¹, Farida Bekhouche¹

Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL)
INATAA route de Sétif ; 7ème Kilomètre Constantine 25000 - Algérie

* Email : belhoulanora@gmail.com

Background and aim: Lipolytic bacteria can degrade lipids by producing lipases. Lipases remain among the most important biocatalysts to carry out reactions in the mediums aqueous and no aqueous. That is mainly due to their capacity to use a broad range of substrates, that gives them wide applications in a number of industrial sectors. The aim of this work is to isolate of bacteria strains producing lipases from fermented butter and evaluate their potential.

Methods: Isolation of lipolytic bacterial strains was realized from five samples of butter fermented, traditional product. To obtain a diversity of lipolytic flora, we have used several culture media (Ordinary Nutrient Agar (GNO), Oxytetracycline Dextrose Agar (OGA), Sabouraud Dextrose (SD) Man Rogosa Sharp (MRS), Potato Dextrose Agar (PDA) and Gélose de Terzaghi (M17), all those media are sublimented with olive oil. The culture incubation was carried out at 30 ° C for 5 days. The strains obtained are classified for his activities on agar then on liquid media (nutrient broth) adding olive oil with/without Tween 80. Titration is the method used to estimate of the free fatty acids or lipase activity.

Results: 104 strains were selected for their lipolytic activity. 29 bacteria isolates producing lipase were prescreened for their ability to develop important height on agar medium. Then, six isolates (SG8, SS46, SG9, SG14, SG5, SG25 and SG26) were screened for their ability to produce high levels of lipase depending on the nature of the lipid substrate in the medium, the producer extreme lipase is SG8 (BN_T : 12,55±0,18 U / mL, BNH : 13,3±0,21 U/mL, BNTH : 15,3±0,14 U/mL). Preliminary identification showed that 29 strains are : cocci form (4 isolates : Gram+, catalase +, immobile, unsporulated), bacilli form (2 isolates : Gram +, catalase +, mobile , sporulated ; 3 isolates: Gram+, catalase-, immobile, unsporulated) and filamentous morphology cell (16 isolates : Gram+, catalase +, immobile, unsporulated ; 4 isolates: Gram+, catalase-, immobile, unsporulated).

Conclusion: the isolate SG8 is show a extreme production of lipase and the capacity of this bacteria to use a variety of the substrates.

Keywords: lipolytic bacterial strains, lipases, lipase activity, high levels.

Orale	<input type="checkbox"/>
Affiche	<input checked="" type="checkbox"/>

Isolement de souches bactéries potentiellement productrices de lipases alcalines, à partir du beurre cru et du beurre fermenté « Dhan »

Résumé

Un intérêt considérable est porté actuellement pour la lipase, principalement aux secteurs industriels, ainsi que pour la flore lipolytique des produits traditionnels locaux. Dans ce cadre, s'installe le but de notre travail visant l'isolement de souches lipolytiques à partir de beurre cru et *smen*, qui sont deux produits laitiers de terroir Algérien. Ainsi que le screening des meilleurs isolats bactériens producteurs de lipases. Pour atteindre nos objectifs, six échantillons d'origines variées ont été utilisés pour l'analyse physicochimique et l'isolement de souches bactériennes lipolytiques. Nous avons utilisé plusieurs milieux, tous sont supplémentés avec de jaune d'œuf ou de l'huile d'olive et/ou Tween 80. Les souches obtenues sont classées pour ses activités sur milieu gélosé puis cultivés sur des milieux liquides. La titration est la méthode utilisée pour estimer les acides gras libres ou l'activité lipasique. Les résultats de la caractérisation physicochimiques ont montré qu'il y a une différence significative entre les paramètres mesurés du beurre et des échantillons du *smen*. Le screening a abouti à l'obtention de plusieurs isolats lipolytiques à partir de matières premières riches en matière grasse, à savoir : le beurre cru et *smen*. Le test de l'activité lipolytique a permis de sélectionner quarante neuf souches bactériennes qui sont rapprochées en se basant sur les résultats phénétiques, de six types : **49%** (24) sont à Gram positifs, filamenteuses ramifiées, catalase positive, asporulées et immobiles ; **31%** (15) sont à Gram positifs, coque, catalase positive, asporulées, immobiles et dégradent le mannitol ; **10%** (5) sont à Gram positifs, bâtonnet, catalase positive, asporulées et immobiles ; **4%** (2) sont à Gram positifs, forme coque, catalase positive, asporulées, immobiles, ne dégrade pas le mannitol et ont une coloration jaune ; **4%** (2) sont à Gram positifs, bâtonnet, catalase positive, sporulées et mobiles et **2%** (1) sont à Gram négatifs, coques, catalase positive, asporulées et immobiles. Le test de production de lipase sur milieu liquide contenant des inducteurs de la production de l'enzyme (Tween 80 ; huile d'olive avec ou sans Tween 80) a abouti à la sélection de huit souches : (SG_(5, 8, 9, 14, 25, 26) ; BG₍₃₂₎ ; SS₍₄₆₎), potentiellement productrices de lipases vraies indépendamment de la nature de la source lipidique. Cette constatation révèle le degré d'adaptation de ces souches à des milieux variés, cela lui confèrent des applications biotechnologiques diverses.

Mots clés : beurre cru, *smen*, souches lipolytiques, activité lipolytique.

BELHOULA Nora

Option : biotechnology and food industry engineering

Isolation of bacteria strains potentially producing alkaline lipases, from raw butter and fermented butter "*Dhan*"

Abstract

Considerable interest is carried currently for lipase, mainly to industrial sectors, as well as for the lipolytic flora of the local traditional products. In this context, settles the goal of our work on isolation of lipolytic strains from raw butter and *smen*, which are two traditional Algerian dairy products. As well as the screening of the best bacterial isolates producing lipases. To achieve our goals, six samples of varied origin were used for the physicochemical analysis and the isolation of lipolytic bacterial strains. We used several media, all these are supplemented with Of egg yolk or olive oil and / or Tween 80. The strains obtained are classified for its activities on agar medium and then grown on Liquid media. Titration is the method used to estimate free fatty acids or lipase activity. Physicochemical characterization results showed that there was a significant difference between the measured parameters of butter and *smen* samples. Screening yielded to obtaining of several lipolytic isolates from raw materials rich in fat, namely : raw butter and *smen*. The test of the lipolytic activity has allowed selecting Forty-nine bacterial strains which are approximated on the basis of the phenetic results of six types : **49%** (24) are Gram-positive, Branched filamentous, catalase positive, asporulated and immobile ; **31%** (15) are Gram-positive, cocci, catalase positive, asporulated, immobile and degrade mannitol ; **10%** (5) are Gram-positive, rod, catalase positive, asporulated and immobile ; **4%** (2) are Gram-positive, cocci, Catalase positive, asporulated, immobile, does not degrade mannitol and have a yellow color ; **4%** (2) are Gram-positive, rod, catalase positive, sporulated and mobile and **2%** (1) are Gram-negative, cocci, catalase positive, asporulated and immobile. The test of production of lipase on liquid medium containing inducers of the production of the enzyme (Tween 80, olive oil with or without Tween 80) yielded to the selection of eight strains (SG_(5, 8, 9, 14, 25, 26) ; BG₍₃₂₎ ; SS₍₄₆₎), potentially producing true lipases independently of the nature of the lipid source. This finding reveals the degree of adaptation of these strains to various media, giving it various biotechnological applications.

Key words: raw butter, *smen*, lipolytic strains, lipolytic activity.

عزل البكتيريا المنتجة للليباز القلوية، من الزبدة الخام وزبدة المخمرة "دهان"

ملخص:

يتركز اهتمام كبير حاليا على إنزيم الليباز، وذلك أساسا في القطاعات الصناعية، وكذلك على البكتيريا الموجودة في المنتجات المحلية التقليدية الدهنية. في هذا السياق يندرج هدف عملنا المتمثل في عزل الكائنات المهجرية المفككة للدهون من الزبدة الخام والسمن، وكذا فحص أفضل بكتيريا منتجة للليباز. لتحقيق أهدافنا استخدمنا ست عينات من أصل مختلف من أجل التحليل الفيزيوكيميائي ولعزل السلالات البكتيرية المنتجة للليباز. استخدمنا عدة أوساط أضفنا إليها صفار البيض أو زيت الزيتون و / أو دون التوين 80. السلالات التي تم الحصول عليها صنفت لنشاطها على وسط جيلوزي تم على نموها في أوساط سائلة و المعايير هي الطريقة المستخدمة لتقدير الأحماض الدهنية أو نشاط الليباز. أظهرت نتائج التحليل الفيزيوكيميائي أن هناك اختلاف كبير في المعايير المقاسة للزبدة الخام و جميع عينات السمن. أسفر الفحص في الحصول على مجموعة من الكائنات المنتجة للليباز من المواد الخام الغنية بالدهون، وهي الزبدة الخام و السمن. باستخدام اختبار نشاط الليباز تم تمييز تسعة وأربعون بكتيريا، و تبين أن هاته السلالات المعزولة تنتمي إلى ستة أجناس : 49% (24) إيجابية الغرام، خيطية مجزأة، إيجابية الكاتالاز، غير منتجة للأبواغ و غير متحركة. 31% (15) إيجابية الغرام، كروية، إيجابية الكاتالاز، غير منتجة للأبواغ، غير متحركة، تتحلل مانيتول. 10% (5) إيجابية الغرام، عصوية، إيجابية الكاتالاز، غير منتجة للأبواغ و غير متحركة. 4% (2) إيجابية الغرام، كروية، إيجابية الكاتالاز، غير منتجة للأبواغ، غير متحركة، لا تتحلل المانيتول وذات لون أصفر. 4% (2) إيجابية الغرام، عصوية، إيجابية الكاتالاز، منتجة للأبواغ و متحركة و 2% (1) سلبية الغرام، كروية، إيجابية الكاتالاز، غير منتجة للأبواغ و غير متحركة. اختبار إنتاج إنزيم الليباز على وسط سائل يحتوي على محرضات لإنتاج إنزيم الليباز (توين 80 و زيت الزيتون مع أو بدون توي 80) أدت إلى اختيار ثمانية سلالات : $SS_{(46)}$; $BG_{(32)}$; $SG_{(5, 8, 9, 14, 25, 26)}$ مع إمكانية إنتاج الليباز الحقيقية بغض النظر عن طبيعة مصدر الدهون. يكشف هذا الاستنتاج درجة تكيف هذه السلالات في مختلف الأوساط مما يعطيها تطبيقات مختلفة في البيوتكنولوجيا.