

Caractérisation phénotypique et génotypique de deux *Lactobacillus* isolés d'un fromage traditionnel frais type J'ben

A. DAHOU^{1*}, A. HOMRANI¹, F. BENSALAH², A. BEKADA³ et N. MEGHOUFEL¹

¹ Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale,
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie

² Laboratoire de Génétique Microbienne, Université de Senia (Oran), Algérie

³ Centre Universitaire Ahmed Benyahia El Wancharissi de Tissemsilt, Algérie

* Correspondance, courriel : amine2369@gmail.com

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer la diversité des lactobacilles d'un fromage du terroir type J'ben fabriqué à partir de lait de chèvre de race Arabia produit d'une exploitation des régions steppiques algériennes de NAAMA. Deux lactobacilles ont été isolés des échantillons de fromage récupérés de l'exploitation et analysés à l'aide de méthodes phénotypiques et génotypiques. Sur toutes les espèces isolées ; 04 isolats ont été retenues après caractérisation phénotypique par les techniques classiques de microbiologie basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les isolats purifiés ont été conservés dans un mélange MRS et glycérol en vue d'une caractérisation moléculaire basée sur l'amplification puis séquençage de l'ADN bactérien. L'isolement de l'ADN bactérien à partir de la culture purifiée de lactobacille a été établi par une amplification de l'ADN ribosomal 16 S par des amorces universelles spécifiques des procaryotes avec une souche de référence *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 utilisé comme témoin positif. Le séquençage de l'ADN 16S de tous les isolats a été réalisé et deux espèces différentes ont été identifiées avec une prédominance de *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus brevis*. L'évaluation des propriétés technologiques des isolats récupérés telle que la production d'exo polysaccharides (EPS) et l'activité protéolytique s'est avérée concluante.

Mots-clés : *fromage du terroir type J'ben, lait de chèvre de race Arabia, caractérisation phénotypique et génotypique, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus brevis.*

Abstract

Phenotypic and genotypic characterization of two *Lactobacilli* isolated from a traditional cheese type J'ben

The purpose of this study is to evaluate the diversity of lactobacilli of a terroir cheese, type J'ben made from the milk of goats of Arabia breed. The milk is produced on a holding of the Algerian steppe regions of NAAMA. Two lactobacilli of cheese samples, recovered from the exploitation, were isolated and analyzed using phenotypic and genotypic methods. On all isolated species, 04 isolates were selected after phenotypic characterization by classical microbiological techniques based on the search of a certain number of morphological, physiological and biochemical characters. The purified isolates were stored in MRS and glycerol

mixture to a molecular characterization based on the amplification then sequencing of bacterial DNA. The isolation of bacterial DNA from purified culture of *Lactobacillus* was established by an amplification of the 16 S ribosomal DNA by specific universal primers prokaryotes with the *Lactobacillus delbrueckii* reference strain ATCC 11842 used as a positive witness. Sequencing of the 16S DNA of all isolates have been realized and two different species have been identified with a predominance of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus brevis*. The evaluation of technological properties of the recovered isolates such as the production of exo polysaccharides (EPS) and proteolytic activity was inconclusive.

Keywords : *local cheese types J'ben, breed goat milk Arabia, phenotypic and genotypic characterization, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus brevis.*

1. Introduction

La flore microbienne des fromages est très diversifiée ; selon son intérêt et ses conséquences en fromagerie, on peut la scinder en 3 groupes :

- La flore utile ou technologique : lactocoques, lactobacilles, leuconostocs, flore de surface (levures, microcoques, etc.) ;
- La flore indésirable : coliformes, pseudomonas, etc. ;
- La flore potentiellement pathogène : E.coli, staphylocoques à coagulase positive, salmonella, *Listeria monocytogenes*, etc.

Cette flore microbienne, dite naturelle ou indigène, joue un rôle important dans la qualité des fromages au lait cru, en particulier sur le plan gustatif. Elle permet de préserver la typicité et une certaine diversité sensorielle des fromages [1]. En Algérie, le lait cru est transformé par des méthodes traditionnelles en fromage frais type « j'ben » et autres produits laitiers fermentés .Ces produits retiennent leurs qualités désirables même après une longue conservation à température ambiante à cause des aptitudes technologiques développés par la microflore naturelle apportée par le lait [2]. Les fromages traditionnels hébergent un microbiote diversifié, composé de populations microbiennes endogènes, qui joue un rôle majeur dans le développement des qualités nutritionnelles et organoleptiques très sollicitées [3]. Cette diversité de la microflore lactique sera spécifiée, dans cette étude, par la caractérisation phénotypique et génotypique de deux *Lactobacilles* isolés de ce fromage du terroir type J'ben.

2. Matériel et méthodes

2-1. Prélèvement des échantillons de J'ben

Des échantillons de fromage ont été prélevés aseptiquement dans des récipients stériles de l'exploitation de Fortassa de la wilaya de Naama et conservés à basses températures jusqu'à la mise en route des analyses expérimentales au laboratoire.

2-2. Analyses microbiologiques

Des prélèvements de masse suffisante de J'ben sont effectués de façon aseptique, 2.5 g de l'échantillon est placé dans un tube stérile contenant 2.1 mL d'eau physiologique stérile et incubé à 45°C jusqu'à fusion. La séparation des deux phases est ensuite réalisée par centrifugation pendant 10 minutes à 3500 rpm. A l'aide

d'une pipette stérile 1 mL de la phase aqueuse constituant la dilution mère est prélevé et introduit dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique stérile, ainsi s'obtient la dilution 10⁻². Les dilutions 10⁻³ jusqu'à 10⁻⁶ sont obtenues de la même manière [4].

2-3. Dénombrement des bactéries lactiques

Les milieux utilisés pour la culture des lactobacilles sont respectivement les suivants :

- le milieu MRS : Peptone 1 % : 10 g, Extrait de viande : 10 g, Extrait de levure : 5 g, Glucose : 20 g, Tween 80 : 1 mL, K₂H₂PO₄ : 2g, MgSO₄, 3H₂O : 5 g, Citrate d'ammonium : 2 g, MgSO₄, 4H₂O : 0,05 g, Agar : 15 g et 1000 mL d'eau distillée, pH = 6,2, stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn. Ce milieu très riche, permet un développement rapide de toutes les espèces de lactobacilles ;
- le milieu Chalmers : Lactose : 10 g, Peptone de viande : 3 g, Extrait de viande : 3 g, Extrait de levure : 3 g, Agar : 1 g, Carbonate de calcium précipité : 15 g, Solution aqueuse de Rouge neutre : 5 mL et 100 mL d'eau distillée, de pH = 6.8, stérilisé à l'autoclave à 100°C pendant 20 mn. Ce milieu permet une meilleure reconnaissance de ces bactéries qui s'entourent d'une auréole transparente caractéristique de leur présence ;
- le milieu hypersaccharosé : Extrait de viande : 10 g, Extrait de levure : 3 g, Bactocastone : 3,5 g, Saccharose : 15 g, Phosphate dipotassique : 2 g, NaCl : 1 g, MgSO₄, 7H₂O : 0,2 g, Agar : 15 g et 1000 mL d'eau distillée, pH = 6.8, stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn.

L'ensemencement des boîtes de Pétri des lactobacilles se fait dans la masse et sont incubées dans une jarre d'anaérobiose à 30°C et à 45°C pendant 48 heures à 72 heures. Le dénombrement des groupes bactériens recherchés est effectué à l'aide d'un compteur de colonies microbiennes (New Brunswick scientific CO Model C-100 6327). Les résultats sont exprimés en nombres de cellules par mL [5].

2-4. Isolement et purification

Après dénombrement, les colonies apparemment caractéristiques des groupes bactériens à étudier sont prélevées des boîtes de Pétri pour étude de la morphologie. Les bactéries, bâtonnets, gram-positives, catalase négative; ne produisant pas de dégagement d'oxygène lorsqu'elles sont dissociées sur une goutte d'eau oxygénée, sont retenues comme étant des bactéries lactiques. Après culture de souches isolées de lactobacilles sur les bouillons de leurs milieux précités, des ensemencements en stries sur leurs milieux gélosés sont réalisés et mis en incubation à 30°C et à 45°C pendant 48 heures à 72 heures. Parmi les colonies bien isolées et purifiées qui apparaissent sur boîtes de Pétri, une colonie bien caractéristique est prélevée de chaque boîte et conservée à 4°C sur tubes à appendorf avec du MRS-15 % glycérol en vue de son identification [6].

2-5. Caractérisation phénotypique des lactobacilles

L'identification des souches de lactobacilles est faite selon les critères biochimiques préconisés [7, 8] et selon la "classification de Bergey's *manual of determinative bacteriology*" et [9], par le système API bioMérieux en utilisant la galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant, le profil biochimique obtenu pour chaque espèce de lactobacille a été lu grâce à un logiciel d'identification APILAB (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

2-6. Caractérisation génotypique des lactobacilles

L'identification des lactobacilles par les méthodes phénotypiques ne permet pas d'identifier de façon fiable les isolats purifiés [10]. Nous avons développé, au niveau du laboratoire ; un outil basé sur la biologie

moléculaire par une amplification de l'ADN ribosomal 16 S par des amorces universelles spécifiques des procaryotes, une analyse critique de la séquence obtenue et une comparaison avec le témoin positif de *Lactobacillus delbrueckii* ATTC 11842.

2-7. Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats de lactobacilles

Le pouvoir protéolytique a été faite selon la méthode utilisée par [11]. La production des exo polysaccharides (EPS) a été réalisée par la technique utilisée par [12] pour chaque souche de lactobacille.

3. Résultats

3-1. Analyses microbiologiques

Les résultats des analyses microbiologiques sont représentés comme suit :

3-1-1. Dénombrement des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été dénombrées dans tous les échantillons de fromage étudié à base de lait de chèvre. Leur nombre varie de $5 \cdot 10^6$ ufc / g à 10^8 ufc / g. Cette différence de nombre de bactéries lactiques dans les échantillons analysés est le résultat de la variabilité de l'écosystème microbien laitier au sein de la même race animale avec une prédominance à 60 % en lactobacilles. Le nombre se détermine avec la qualité de l'échantillonnage en relation avec la race animale d'une même exploitation d'élevage et de transformation comme décrite par [13].

3-1-2. Isolement et purification

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement aux bactéries lactiques qui présentent un intérêt appliqué. 04 isolats d'espèces apparentées aux *Lactobacillus* ont été retenus pour une caractérisation phénotypique. Les tests physiologiques et biochimiques ont montré que tous les isolats se sont avérés à gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

3-1-3. Caractérisation phénotypique des lactobacilles

Sur les 04 isolats ; deux souches ont été identifiées par les galeries API CHL soit. Sur gélose, les cellules bactériennes sont apparues de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre. Sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques. L'observation microscopique a révélé une forme de cellules qui est la forme bâtonnet. Ces cellules bactériennes ont une micromorphologie de bâtonnets soit longs ou petits enroulés, filamenteux isolés ou en chaînettes. La macromorphologie des lactobacilles est soit en petites colonies blanches à centre marron et bombé ou bien à centre rond lenticulaire.

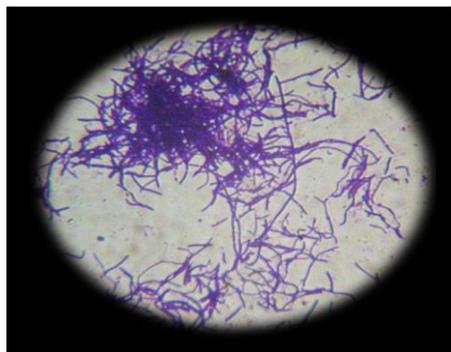


Photo 1 : Genre présumé à *Lactobacillus delbrueckii*

Photo 2 : Genre présumé à *Lactobacillus brevis*

Bâtonnets filamenteux

Bâtonnets en chaînettes



Photos 3 et 4 : Caractérisation phénotypique par API 50 CHL des 02 lactobacilles

3-1-4. Caractérisation génotypique des lactobacilles

L'étude génotypique réalisée par une caractérisation moléculaire basée sur l'amplification puis séquençage de l'ADN bactérien a donné les résultats escomptés. La visualisation des profils obtenus après électrophorèse sous lumière ultraviolette a donné un dendogramme comparatif avec des degrés de similitude à un témoin caractéristique de *Lactobacillus delbrueckii*. En effet à 480 pb de masse moléculaire, la bande d'ADN caractéristique pour les 02 souches purifiées de lactobacilles a été amplifiée et visualisée positivement après électrophorèse sur gel d'agarose 2 % en figures N°01 et 02

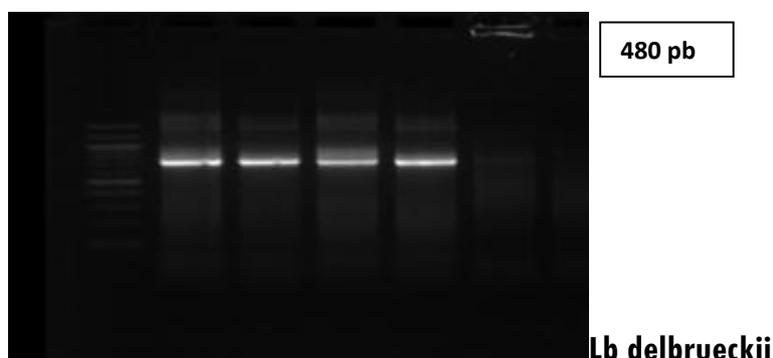


Photo 5 : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR des isolats identifiés par API 50 CHL comme *Lactobacillus delbrueckii*

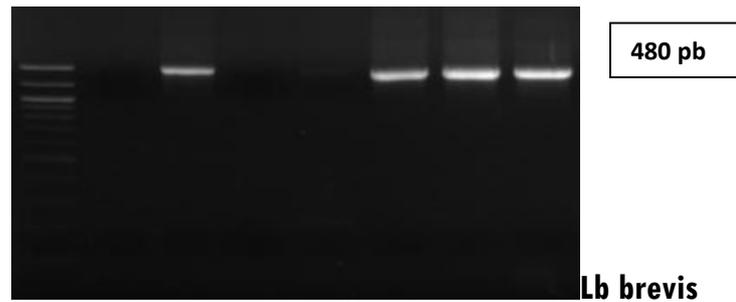


Photo 6 : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR des isolats identifiés par API 50 CHL comme *Lactobacillus brevis*

3-2. Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats de lactobacilles

3-2-1. Pouvoir protéolytique

Selon [14], la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre comprise entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches se sont révélées protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 6,5 et 12 mm. L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle dans la fabrication fromagère ainsi que dans le développement des propriétés organoleptiques et rhéologiques.

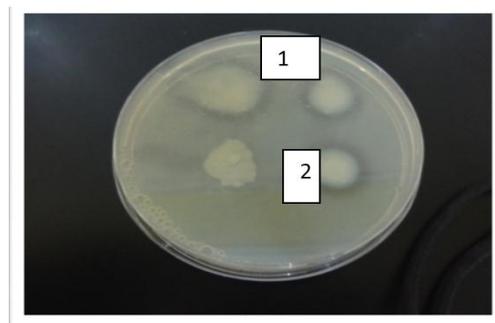


Photo 7 : *Activité protéolytique des lactobacilles isolés*

Légende de la photo 4 : (1) Lactobacillus delbrueckii ; (2) Lactobacillus brevis

3-2-2. Production d'Exopolysaccharides EPS

La production des exopolysaccharides EPS a été remarqué sur les souches de bactéries Lactiques isolées et purifiées de lactobacilles voir **Photo 5**

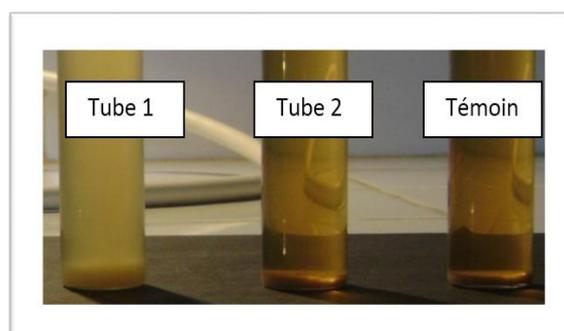


Photo 8 : *Production des exo polysaccharides EPS par les 02 lactobacilles*

Sur milieu MRS, la quantité la plus élevée d'EPS produite est obtenue avec la souche du genre *Lactobacillus delbrueckii* en tube N°1 et avec la souche du genre *Lactobacillus brevis* en tube N°2 par rapport au témoin **Photo 5**. Ces observations rejoignent celles de [15, 16].

4. Discussion

La connaissance de la diversité de la flore lactique du fromage « j'ben » fut d'abord acquise par des méthodes d'isolement, d'identification et de purification de 02 lactobacilles basée sur des cultures avec des milieux spécifiques, enrichie en deuxième lieu par des analyses phénotypiques à base des galeries API CHL, le profil biochimique ainsi obtenu a été lu grâce à un logiciel d'identification APILAB (bioMérieux, Marcy l'étoile, France) et a confirmé la typicité de deux espèces de lactobacilles ; *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus brevis*. L'analyse taxonomique de plus en plus fines grâce aux méthodes moléculaires appuyés par les techniques PCR de séquençage de l'ADN a permis d'affilié et de confirmé l'analyse phénotypique comme décrite par [17] ; en effet l'étude génotypique réalisée par la PCR a donné des profils à 480 pb (paire de base) des bandes d'ADN caractéristiques pour les 02 espèces visualisée positivement après électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. Les potentialités fonctionnels des 02 lactobacilles de par leurs aptitudes technologiques ont donné que les 02 espèces présentent une activité protéolytique similaire avec une production d'EPS ; très élevée pour *Lactobacillus delbrueckii* en adéquation avec les résultats de [18, 19]. En comparant ces résultats avec ceux de la bibliographie [20, 21], au cœur des fromages frais type « j'ben » fabriqués au lait cru, les bactéries lactiques acidophiles et hétérofermentaires, les lactobacilles dominent largement au cours de la transformation traditionnelle avec une activité protéolytique favorisant la production de facteurs de croissance les acides aminés nécessaires au développement de la microflore lactique secondaire fortement dépendante. En tenant compte des résultats de [22, 23], nos 02 espèces peuvent être incluses dans le groupe des probiotiques.

5. Conclusion

Notre étude réalisée a confirmé que la microflore naturelle joue un rôle important dans la qualité des fromages du terroir type « j'ben » fabriqués au lait cru, en particulier sur le plan organoleptique. Cette microflore représentée essentiellement par les lactobacilles permet de préserver la typicité par leurs aptitudes technologiques confirmés soit par leur activité enzymatique surtout protéolytique qui donne au J'ben une valeur nutritionnelle appréciable par les acides aminés indispensables libérés par cette flore acidophile. La comparaison des résultats avec ceux cités dans la bibliographie dont ceux de [24] ont donné des résultats similaires sur la présence des lactobacilles dans la pâte de nos fromages du terroir. D'autre part dans les pays industrialisés, les pratiques de nettoyage et de désinfection des trayons à la traite ont amélioré la qualité hygiénique du lait cru et de façon concomitante diminué sa charge microbienne et ainsi influé sur l'écosystème microbien laitier naturel des fromages. Des espèces tel que les Lactobacilles devenues rares dans ces pays sont fréquentes dans nos fromages traditionnels ce qui contribue à l'enrichissement du créneau et à la connaissance de leur écologie. De plus grâce aux développements technologiques de la dernière décennie, nous commençons à obtenir une image fiable de la diversité microbienne de nos fromages traditionnels qu'il va falloir exploité pour une appellation d'origine contrôlée.

Références

- [1] - F. M. LUQUET et G. CORRIEU, Bactéries lactiques et probiotiques. Tec. Doc, Lavoisier Paris, (2005) 3 - 37.
- [2] - S. HADEF, Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Thèse de magister université Kasdi Merbah de Ouargla. Option microbiologie appliquée, (2012) 87 p.
- [3] - M. OUADGHIRI, M. VANCANNYET, M. VANDAMME, P. NASER, S. GERVERS, K. LEFEBVRE and J. SWINGS, Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'leben'. J. Appl. Microbiol, 106 (2009) 486 - 495.
- [4] - T. IDOUI et N. E. KARAM, Lactic acid bacteria from Jijel's butter : isolation, identification and major technological traits. Gr. Y. Aceites, 59 (4) (2008) 361 - 367.
- [5] - BERGEY'S MANUAL, Manual of determinative bacteriology, William and Wilkin, Baltimore, (1986 - 1989).
- [6] - A. BADIS, L. OUABDIA-SELLAMI, D. GUETARNI, M. KIHAL, R. OUZROUT, Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». Sciences et Technologie, N°23, (2005)30 - 37.
- [7] - J. J. GILL, P. M SABOUR, J. GONG, H. YU, K. E. LESLIE, M. W GRIFFITH, characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactation dairy and beef cattle by 16S rRNA genre sequence analysis .Int ; dairy journal, (2006) 220 - 228.
- [8] - E. BEUVIER, S. BUCHIN, Raw milk cheeses : chemistry, physics and microbiology Timothy Academic Press., Vol. 1, (2004) 319 - 345.
- [9] - A. MALLET, M. GUEGUEN, F. KAUFFMANN, C. CHESNEAU, A. SESBOUE, N. DESMASURES, Quantitative and qualitative microbille analyses of raw milk reveals substantial diversity influenced by management practises. Int. Dairy Journal, (2012) 13 - 21.
- [10] - D. REATS, M. OFFEK, D. MINOZ, M. HALPERN, Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics, Food. Microb., 28 - 3, (2011) 465 - 471.
- [11] - C. DELBES, C. MONNET, F. IRLINGER, Des communautés microbiennes au service de la qualité des fromages, innovations agronomiques, 44 (2015) 69 - 86.
- [12] - F. MOZZI, M. I. TORINO et G. F. VALDEZ, Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. Methods in biotechnology, Vol. 14 : Food Microbiol. Protocols Humana press, Totowa, (2001) 183 - 190.
- [13] - L. QUIGLEY, O. O'SULLIVAN, T. P. BERESFORD, R. P ROSS, G. F. FITZGERALD, P. D. COTTER, Molecular approaches to analysis the microbial composition of raw milk and raw milk cheese , International journal of food and microbiology, 150 (2 - 3) (2011) 81 - 94.
- [14] - J. C VEUILLEMARD, Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec et Doc. Lavoisier. Paris, 3 (1986) 1 - 65.
- [15] - M. FRICKER, B. SKANSENG, K. RUDI, B. STASSI, M. EHLING-SCHULZ, Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independant from geographical origin .International journal of food microbiology, 145 (2011) S24 - S30.
- [16] - C. MONNET, S. LANDAUD, P. BONNARME, D. SWENNEN, Growth and adaptation of microorganisms on the cheese. FEMS Microbial. LEH, 362 (2015) 1 - 9, doi : 10.1093 / Fems / Fnu 025
- [17] - M. FRETIN, A. FERLAY, M. C. MONTEL, C. DELBES, La diversité bactérienne de fromages de type cantal mise en évidence par une approche méta génomique 20^{ème} C.B.L, Lille, France, (2015).
- [18] - E. A. MELNNIR, K. M. KALANETRON, D. A. MILLS, E. A. MAJA, Analysis of raw goat milk microbiota : impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity, Food Microbiology, 46 (0) (2015) 121 - 131.
- [19] - K. G. GBASSI, T. VANDAMME, S. F. YOLOU et E. MARCHIONI, In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. Int. Dairy J., 21 (2011) 97 - 102.
- [20] - T. Y. LIN et M. F. C. CHIEN, Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. Food Chem., 100 (2007) 1419 - 1423.

- [21] - P. MARTEAU et P. SEKSIK, Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées post antibiotiques. *Re. Fran. Lab*, (2004) 73 - 76.
- [22] - A. MAYA-MAKINEN et M. BIGRET, Industrial use and production of lactic acid bacteria. *In : Lactic acid bacteria : microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York, (2004) 73 - 102.
- [23] - A. Y. TAMIME, Microbiology of starter cultures. *In : Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc.* New York, (2002) 261 - 366.
- [24] - N. BENKERROUM et A. Y. TAMIME, Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol*, 21 (2004) 399 - 314.