

**PHENOTYPIC, MOLECULAR AND TECHNOLOGICAL CHARACTERIZATION
OF AUTOCHTHONOUS LACTOBACILLI STRAINS ISOLATED FROM COW'S
MILK AND GOAT OF ALGERIAN POPULATIONS**

F. Sadi^{1*}, A. Dilmi Bouras¹, F. N. Ghomari², F. Hallouz³ and A. Noui¹

¹Laboratoire Bio-rRessources Naturelles Locales, faculté des sciences, Université Hassiba Ben Bouali- Chlef, Bp 151, Chlef 02000, Algérie

²Laboratoire de Production Agricole et Valorisation Durable des Ressources Naturelles, Université Djilali Bounaama-Khemis-Milana, Algérie

³Laboratoire Génie de l'eau et de l'environnement, ENSH, Soumaa, Blida

Received: 18 July 2016 / Accepted: 23 December 2016 / Published online: 01 January 2017

ABSTRACT

The raw milk is an important reservoir of microbial diversity can have important biotechnological applications, in particular to improve the unique characteristics of dairy products. For this effect, eight strains of autochthonus Lactobacilli have been isolated from goat and cow raw milk of the local Algerian populations (Setifian and Kabyle). The strains were then identified by phenotypic and molecular approaches by amplification and sequencing of 16S rDNA as *Lb.casei* (C4, C5, V2 and V5), *Lb. paracasei* (C6) and *Lb.plantarum* (C7, C8, C10). Virtually all the strains studied, from a technological point of view, produced lactic acid concentrations at or above 0.89g.100 mL⁻¹. Most strains exhibit a high capacity and are actively producing proteolytic proteases in the stationary phase between 24 and 30 hours. The strains studied can be used in the starter cultures or co-cultures for making cheese.

Keywords: *Lactobacillus*, identification, acidification, proteolysis.

Author Correspondence, e-mail: sadifadhila16@gmail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i1.21>



1. INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de bactéries utilisées comme cultures starter pour les produits laitiers, la viande et les fermentations végétales [1]. Elles contribuent également à diverses applications industrielles dans les aliments et les boissons fermentées, en vrac et la production de produits chimiques finis ainsi que dans la fabrication de produits pharmaceutiques [2].

Les technologies laitières représentent toutefois le principal secteur d'application des bactéries lactiques. Dans la fabrication fromagère, elles jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits. Leur action est liée principalement à deux aspects de leur métabolisme : la production d'acide lactique et l'activité protéolytique [3]. La Protéolyse est importante pour affecter le goût de base de fromage, mais son rôle peut être plus lié à la fourniture de substrats pour les enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés, qui sont souvent le taux limitant pour la formation de saveur [4]. L'utilisation industrielle de starters composés de bactéries autochtones semble être une voie plus prometteuse, peu étudiée [5]. Le lait cru et le lait fermenté traditionnel sont riches en souches de bactéries lactiques avec de nouvelles propriétés [6]. Le criblage et la caractérisation de cette microflore est très intéressant pour isoler de nouvelles souches avec des fonctions technologiques potentiellement applicables dans l'industrie alimentaire [7].

A travers cette étude, nous allons mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques autochtones, caractérisées par des méthodes phénotypique et moléculaire, ayant une application dans l'industrie alimentaire et, déterminer leurs propriétés technologiques afin d'examiner leur application potentielle comme composants de cultures starter dans la production de fromage.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Isolement et purification des bactéries

Huit souches de lactobacilles ont été isolées à partir de lait de chèvre de la variété Kabyle et

de lait de vache de la variété Setifienne de la région de Khemis Milian wilaya de Ain defla, Algérie. L'isolement a été réalisé sur gélose MRS (Institut Pasteur, Algérie). La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à 30°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches. Les isolats purifiés ont été différenciés par l'examen macroscopique, microscopique (coloration de Gram), la recherche de la catalase, l'oxydase et la nitrate réductase.

La conservation des souches a été réalisée dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure et 0.05 % de glucose) et 30% de glycérol et stockés à une température de -20 °C [8].

L'identification biochimique et physiologique des souches isolées a été réalisée par l'application des méthodes classiques décrites par plusieurs auteurs ([9], [10], [11]) :

La croissance à différentes températures 10°C, 37°C et 45°C; La capacité de survie en présence de 2%, 4% et 6,5 de NaCl, La production de l'arginine dihydrolase (ADH) sur bouillon Moeller [12], et l'hydrolyse de l'esculine sur milieu gélosé à 0,5% d'esculine [13], Le caractère homo ou hétérofermentaire a été mis en évidence sur le bouillon de Mac Cleskey. La production de gaz se manifeste par la montée du bouchon de la gélose blanche additionnée après inoculation, L'utilisation de citrate a été étudiée sur gélose semi solide au lait citraté et la production d'acétoïne a été déterminée en utilisant le test Voges-Proskauer sur lait écrémé à 9%. Le profil fermentaire des sucres a été étudié sur bouillon MRS (sans glucose et sans extrait de viande) additionné de 40 mg/l de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) [14] pour les sucres suivants :glucose, lactose, galactose, xylose, amidon, fructose, saccharose, cellobiose, adonitol, arabinose, raffinose, sorbitol, salicine, et mannitol [8].

2.2. Caractérisation moléculaire des bactéries lactiques isolées (Amplification et séquençage de 16S rDNA)

L'ADN a été extrait des isolats selon Fischer et al., (1997) [15] et a été utilisé comme matrice pour l'amplification partielle des ARNr 16S. Les fragments d'ADN ont été séparés sur gel d'agarose selon Sambrook et al., (1989) [16]. Les marqueurs de tailles utilisés sont les

EZ-LOAD 100 pb (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les amorces universelles sont SSU for (3'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-5') et SSU rev (5'-GACGGGCGGTGTACAA-3').

Les amplifications d'ADN ont été réalisées dans un thermocycleur My Cycler'' PCR (Bio-Rad). Le mélange réactionnel contient : 2 µL de tampon de PCR concentré 10X (Fermentas), 1,2 µL de MgCl₂ à 25 mM, 0,4 µL du mélange de dNTP à 10 mM, (Fermentas), 1 µL de chaque amorce à 10 µM, 0,5 U de Taq polymérase (Fermentas) et environ 100-200 ng d'ADN génomique dans un volume final de 20 µL.

Les amplifications par PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes : une première étape de dénaturation à 94 °C pendant 4 min. Ensuite, le mélange a été soumis à 35 cycles de trois étapes de 30 s chacune (une étape de dénaturation à 94°C, une phase d'hybridation des amorces à la température spécifique 58°C et d'une phase d'élongation à 72°C). Une élongation finale à 72 °C pendant 10 min a été réalisée. Les amplicons ont été analysés sur un gel à 1% (m/v) d'agarose en TAE 0,5X (Tris acétate 20 mM, EDTA 0,5 mM). Les fragments ont été ensuite visualisés sous UV à 254 nm après incubation des gels dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 µg/mL pendant 15 min. Les gels ont été analysés grâce à l'utilisation d'un appareil GelDoc (BioRad) et du logiciel d'analyses d'images Quantity One.

Le séquençage d'ADN a été effectué par la société Beckman Coulter Genomics (<https://myproject.beckmangenomics.com/myp/home?siteid=col&mapid=home>). Une recherche d'homologie a été effectuée en utilisant le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les alignements multiples ont été réalisés à l'aide du programme ClustalW de Bioedit et DNAbaser.

2.3. Caractérisation technologique

La lipolyse est mise en évidence sur gélose aux triglycérides tandis que la lécithinase a été détectée par la formation des opacifications sur gélose enrichie de jaune d'œuf [10].

L'activité acidifiante des souches a été déterminée par mesure de pH des cultures inoculées à raison de 1% (v/v) dans du lait écrémé reconstitué à 10% après 6 h et 24 h, et simultanément, par dosage de l'acidité titrable en présence de phénolphtaléine [9].

Détermination de l'activité protéolytique

Initialement, l'activité protéolytique a été testée par la méthode des puits sur gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10 %. Les zones claires autour des colonies est un indicateur positif de la protéolyse [17].

L'activité protéolytique des surnageants, obtenus après 8 000 x g à 4°C pendant 20 min des cultures bactériennes, ensemencées à raison de 2% (v/v) dans le bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 0, 6, 24, 30 et 48 heures, a été déterminée par la méthode de Chopra et Mathur., (1983) [18]. Un mL du substrat (1% de caséine dans le tampon phosphate 0,05 M, pH 7) est incubé à 37 °C pendant 15 minutes, puis 1 mL de surnageant est ajouté. Après mélange, la réaction est terminée par addition de 2 mL de TCA 0,4 M, puis filtré et le mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 20 mn. Pour le blanc, avant l'addition d'enzyme, le substrat est précipité avec du TCA, puis traité comme décrit ci-dessus. À 1 mL du filtrat obtenu après précipitation au TCA, 5 mL de carbonate de sodium 0,4 M et 1 mL de réactif de folin sont ajoutés et le tout est incubé à 37°C pendant 20 mn. La lecture de l'absorbance A est faite à 750_{nm}. Les activités protéolytiques sont exprimées en unités/ml.

2.4. Traitement des données et Analyse statistique

Le logiciel SPSS (version 20, SPSS IBM) est utilisé pour l'analyse statistique entre les paramètres technologiques (pouvoir acidifiant et activité protéolytique). Les résultats sont considérés comme non-significatif lorsque $P > 0,05$ en appliquant le test t (2-tailed). Le test Pearson de corrélation est réalisé pour examiner les diverses corrélations.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification des bactéries lactiques

L'identification phénotypique des huit souches de bactéries lactiques a conduit à attribuer ces isolats aux espèces suivantes, *Lb. casei* (4), *Lb. paracasei* (1) et *Lb. plantarum* (3). Cette identification a été confirmée par le séquençage de 16 S rDNA amplifié par PCR (figure 1).

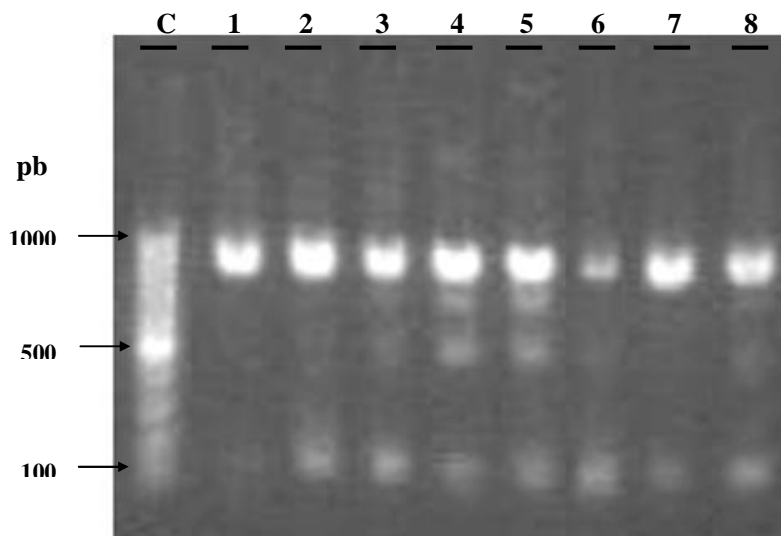


Fig.1. L'électrophorèse des produits de PCR obtenus. **C** : marqueur de taille ; **1** : *Lb. casei* (C4) ; **2** : *Lb. casei* (C5) ; **3** : *Lb. paracasei* (C6) ; **4** : *Lb. plantarum* (C7) ; **5** : *Lb. plantarum* (C8) ; **6** : *Lb. plantarum* (C10) ; **7** : *Lb. casei* (V2) ; **8** : *Lb. casei* (V5)

Les caractéristiques phénotypiques des souches testées dans cette étude sont présentées dans le tableau 1. Les souches de *Lb. plantarum* étaient capables de croître à 45°C et ne produisent pas de NH₃ à partir de l'arginine et hydrolysent l'esculine [19] sauf la souche 8 qui a montré une incapacité d'hydrolyser l'esculine. Cette dernière tolère une concentration de 6,5% (p/v) de NaCl. Une faible tolérance au sel a été également trouvée pour les souches identifiées comme *Lb. casei*. Seules les souches *Lb. casei* 4 et *Lb. plantarum* 8 sont pourvues d'un caractère hétérofermentaire

Toutes les souches fermentent la majorité des sucres (fructose, lactose, saccharose, sorbitol, galactose, salicine, raffinose et glucose). *Lb. paracasei* C6 est incapable d'utiliser l'arabinose et le raffinose [20]. Par ailleurs, *Lb. paracasei* a également présenté une notable diversité phénotypique [21]. Les souches de *Lb. plantarum* fermentent le mannitol et le raffinose [22]. Tandis que l'utilisation des autres sucres est variable et semble être dépendante des souches. Les quatre souches de *Lb. casei* des populations différentes (caprine et bovine) sont différenciées par la capacité d'utilisation de xylose.

Table 1. Caractéristiques phénotypiques des souches isolées

Espèces	<i>Lb. casei</i> C4	<i>Lb. casei</i> C5	<i>Lb. paracasei</i> C6	<i>Lb. plantarum</i> C7	<i>Lb. plantarum</i> C8	<i>Lb. plantarum</i> C10	<i>Lb. casei</i> V2	<i>Lb. casei</i> V5
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire	hété	homo	homo	homo	hété	homo	homo	homo
Esculine	-	+	-	+	-	+	-	+
Dextrane	+	+	+	-	+	+	+	+
Citratase	+	+	-	+	-	-	-	-
Hydrolyse de l'Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à (°C)								
10	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+
45	-	+	-	+	+	+	+	+
Croissance à (% p/v, NaCl)								
2	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	-	-
6,5	-	-	+	-	+	-	-	-
Profil fermentaire								
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	-	-	-	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	-	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	+	-	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : réaction Positive ; (-) : réaction Négative ; (Hom) : homofermentaire ; (Hété) : hétérofermentaire

3.2. Caractérisation technologique

Tous les isolats ont été testés pour des caractéristiques technologiques importantes pour l'utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie laitière. Les essais inclus : la capacité à métaboliser le citrate, l'activité lipolytique, acidifiante et protéolytique.

La possibilité de synthèse de diacétylène à partir du citrate est caractéristique de certaines souches de bactéries lactiques entrant dans la composition des cultures de démarrage. Le diacétylène est l'un des composés les plus importants qui affectent l'arôme des produits laitiers, en leur donnant la saveur analogue à celle du beurre [23]. Les résultats révèlent que toutes les souches étudiées sont productrices d'acétoïnes (VP⁺).

L'activité lipasique n'a été détectée que chez les souches de *Lb.plantarum* et une seule souche de *Lb.casei* (V2). Les bactéries lactiques sont peu lipolytiques, bien que quelques espèces possèdent des lipases et /ou des estérases qui sont capables d'hydrolyser des matières grasses du lait [24].

Le facteur déterminant dans le développement des textures et des caractéristiques organoleptiques des fromages est le potentiel enzymatique des souches utilisées comme des cultures starter dans la fabrication du fromage. Les cultures lactiques jouent un rôle crucial au début de la fermentation, en développant l'acidité et favorisant la coagulation. En outre, elles sont impliquées dans la maturation et le développement de l'arôme des fromages [25].

Dans tous les produits laitiers, la production rapide d'acide lactique par les bactéries lactiques au début de la fermentation est une étape cruciale pour obtenir des produits avec de bonnes propriétés sensorielles et hygiéniques. La production rapide d'acide lactique par les souches de bactéries lactiques dépend de leur système protéolytique, la capacité de métaboliser le lactose et la résistance des bactéries au stress acide [26]. Par conséquent, les activités acidifiantes et protéolytiques des isolats sont très importantes pour leur sélection dans les cultures starter.

En fait, une souche lactique pour être considérée comme un bon candidat pour l'inclusion comme un démarreur, il devrait produire suffisamment d'acide pour réduire le pH du lait à des valeurs inférieures à 5,3 après 6 h d'incubation dans le lait à 30°C [27].

La capacité acidifiante de huit souches de bactéries lactiques testées a été déterminée au bout

de 6, 12 et 24 h d'incubation à 30°C. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Dans notre étude, tous les lactobacilles testés ont montré une capacité de réduire le pH à des valeurs inférieures à 6 (entre 5.43 et 4.55) après 6 heures d'incubation et peuvent coaguler le lait écrémé après 24 h d'incubation. Bien qu'il y ait des variations dans la production d'acidité entre les souches de ces espèces, ces différences sont devenues plus marquées au cours de temps, avec des valeurs allant de 0.89 à 1.11 g 100 mL⁻¹ d'acide lactique pendant 24 h d'incubation, en fonction de la souche (p < 0.05). ([28], [29], [30]) ont montré qu'il y a une variation dans les valeurs de pH entre les souches à l'intérieur de la même espèce et ont classé les souches de bactéries lactiques étudiées comme étant rapide ou lente par rapport à leur pouvoir acidifiant. Les souches utilisées dans cette étude peuvent être adaptées pour leur sélection dans les cultures starter du fromage.

Table 2. Activité acidifiante de 8 lactobacilles après 6 et 24 heures d'incubation

Souches	Temps d'incubation (h)			
	6h		24h	
	pH	acidité titrable (g 100mL ⁻¹)	pH	acidité titrable (g 100mL ⁻¹)
<i>Lb.casei</i> C4	4,97±0.017	0.6±0.10	4,20±0.000	1.1±0.10
<i>Lb.casei</i> C5	4,97±0.00	0.6±0.10	4,52±0.068	0.95±0.50
<i>Lb.paracasei</i> C6	4,55±0.050	0.59±0.10	4,36±0.005	0.90±0.10
<i>Lb.plantarum</i> C7	5,43±0.025	0.50±0.10	4,24±0.052	1.11±0.17
<i>Lb.plantarum</i> C8	4,75±0.043	0.60±0.10	4,52±0.028	0.99±0.11
<i>Lb.plantarum</i> C10	4,85±0.043	0.46±0.10	4,50±0.005	0.89±0.05
<i>Lb.casei</i> V2	5,40±0.005	0.57±0.05	4,49±0.005	1.04±0.55
<i>Lb.casei</i> V5	4,99±0.005	0.6±0.10	4,45±0.113	1.03±0.57

Valeurs exprimées en (moyenne ± écart type).

La technique de gélose au lait écrémé a été utilisée pour examiner qualitativement l'activité protéolytique des isolats. La protéolyse a été observée par la production des halos clairs, après 24 h d'incubation, autour des colonies isolées. La taille de la zone claire dans la gélose au lait écrémé indique l'étendue des protéinases produites de lactobacilles [17]. Tous Les isolats sont révélés protéolytiques.

Les bactéries lactiques sont des organismes exigeants. Pour une croissance optimale, elles dépendent de la présence de petits peptides et acides aminés libres dans le milieu de culture. Etant donné que la concentration d'acides aminés et de peptides libres présents dans le lait ne suffit pas pour la croissance des bactéries lactiques, ces bactéries doivent être capables de dégrader les protéines du lait ; cela constitue la base de leur utilité dans l'industrie laitière. La dégradation de la caséine et de l'utilisation ultérieure des produits de dégradation protéolytique nécessite un système complexe constitué de protéinases, des peptidases et des acides aminés et des transporteurs de peptides [31]. Les résultats obtenus pour l'activité protéasique de huit souches testées sont présentés dans la figure 2.

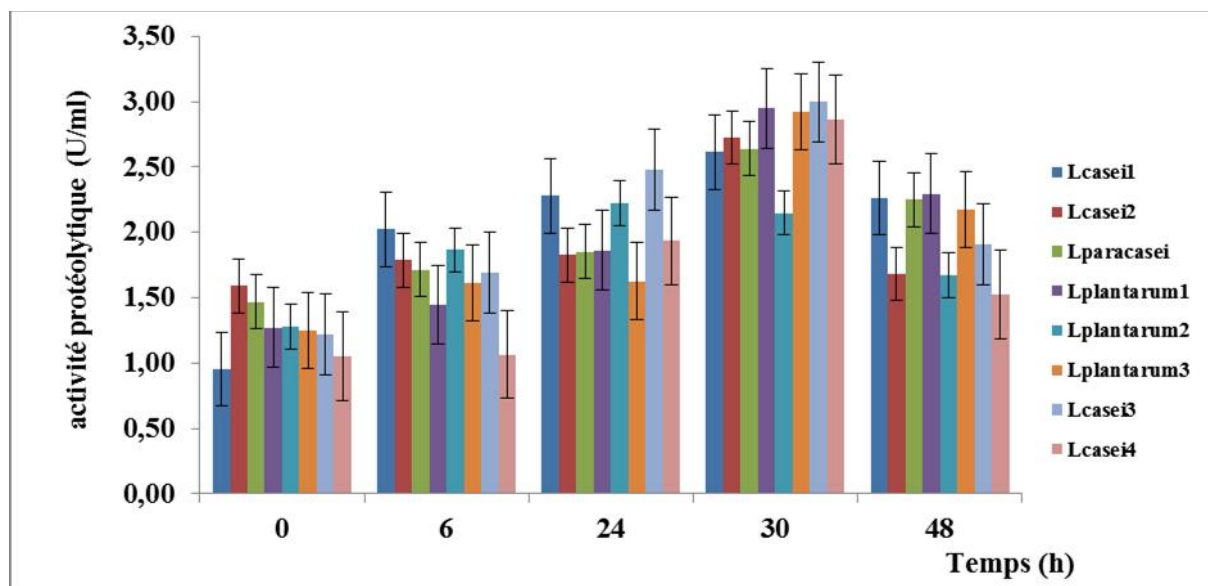


Fig.2. Evolution de l'activité protéolytique (unités/mL) des souchesensemencées dans le bouillon MRS à 37°C.

Les résultats indiquent que la plupart des souches produisent activement les protéases exocellulaire dans la phase stationnaire précoce de la croissance cellulaire. Les activités les plus élevées ont été trouvées entre 24 et 30 heures, à titre d'exemple, *Lactobacillus casei* V2 a atteint un taux de 2.48 et 3.00 U/mL après 24 et 30 heures d'incubation respectivement. Mêmes résultats ont été trouvés par Kholif et al., (2011) [32]. Il a été également mentionné que, l'activité de la protéase maximale (0,14 U/ml) est apparue au début de la phase stationnaire ([33], [34]). L'analyse de corrélation des données présentées dans la figure 2

suggèrent qu'il y avait une faible relation non significative entre les activités protéolytique et acidifiante ($p=0.3$). Certaines études sur les Lactobacilles confirment ces résultats ([35], [36], [30]). La variabilité des performances technologiques des souches provenant de sources naturelles n'est pas surprenante ([37], [38]).

4. CONCLUSION

Les souches étudiées avec leurs aptitudes technologiques distinctes peuvent être un outil bien adapté à la production de nouveaux produits laitiers avec des propriétés physicochimiques et sensorielles différentes par leur contribution à l'acidification du lait et à la formation d'arômes et de saveurs en raison de leurs activités enzymatiques.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Je tiens à remercier Madame le Professeur Annie Dary Mourot pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire au niveau de l'unité de recherche Animal et Fonctionnalités des produits animaux, Equipe Protéolyse- Biofonctionnalité des Protéines et des Peptides, Faculté des Sciences et Techniques UHP-Nancy. Mes vifs remerciements s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire Dr Jean-Michel Girardet, Dr Clarisse Perrin et plus précisément Dr. Emeline ROUX pour m'avoir transmis ses connaissances en biologie moléculaire et aussi pour sa patience et sa disponibilité.

6. REFERENCES

- [1] Yamamoto Y, Togawa Y, Shimoska M, and Okazaki M. Purification and characterization of novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Applied and Environmental Microbiology.*, 2003, 69(10):5746–5753.
- [2] Zhu Y, Zhaping Y, and Li Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83 : 597–610.
- [3] Desmazeaud M. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières. INRA, 1998,1-3.

-
- [4] Yvon M. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2006, 61, 80–96.
- [5] Fall P A. Etude des interactions entre la bactérie bioprotectrice *Lactococcus piscium* et *Brochothrix thermophilacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale. Thèse de doctorat Microbiologie Alimentaire. Ecole doctorale VENAM : Université de Nantes, 2011.
- [6] Wouters J T M, Ayad E H E, Hugenholtz J, and Smit G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 2002, 12 : 91–109.
- [7] El-Ghaish S, Dalgalarondo M, Choiset Y, Sitohy M, Ivanova I, Haertlé T, Chobert J M. Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chemistry*. 120, 2010, 758–764, doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.007
- [8] Samelis J, Maurogenakis F, and Metaxopoulos J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry Salami. *Int. J. food Microbiol.*, 1994, 23 : 179-196
- [9] Larpent J.P. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 1997, 10-72.
- [10] Guiraud J.P. Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris, 2003, 90-292.
- [11] Bourel G, Henini S, Krantar K, Oraby M, Divies C, and Garmyn D. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. INRA EDP Sciences, 2001, pp. 75-82.
- [12] Moeller V. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 1955, 36 : 158-172.
- [13] Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle. Produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Edit. Tec & Doc Lavoisier. Paris, 2007.
- [14] Mannu L, Paba A, Pes M, and Scintu M F. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *J. appl. Microbiol.*, 2000, 89 : 191-197.
- [15] Fischer G, Decaris B, Leblond P. Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambifaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 4553–4558
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

-
- [17] Pailin T, Kang D H, Schmidt K, and Fung D Y C. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology.*, 2001,33 : 45–49
- [18] Chopra A K, Mathur D K. Factors affecting protease production by *Bacillus stearothermophilus* RM-67. *J. Food Protect.*, 1983, 116 : 1020-1025.
- [19] Collins M D, Phillips BA, and Zanoni P. Desoxy ribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp nov, *subsp paracasei* and *subsp tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp nov, comb nov. *J Syst Bacterio.*, 1989, 39 : 105-108
- [20] Ballows A, H. Truper, M. Dvorkin, Harder W, and Schleifer K. In : *the procaryotes*. New York : Springer-Verlag, 1991, vol. II, pp.1468- 1485-1564.
- [21] Feutry F, Oneca M, Berthier F, Torre P. Biodiversity and Growth Dynamics of Lactic Acid Bacteria in Artisanal PDO Ossau-Iraty Cheeses Made from Raw Ewe's Milk with Different Starters. *Food Microbiology.* 29, 2012, 33-42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.011>
- [22] Schillinger U, Lucke F K. Identification of Lactobacilli from meat and meat products. *J. food Microbiol.*, 1987, 4 : 199-208.
- [23] Madera C, Garcia P, Janzen T, Rodriguez A, and Suarez J E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int. J. of Food Microbiology.*, 2003,86:213-222.
- [24] Morais J. Estudio de adecuacion de cepas lacticas autoctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboracion de queso. Thèse doctorale. UAB, 2004
- [25] Delgado F J, González-Crespo J, Cava R, García-Parra J, Ramírez R. Characterization by SPME-GCMS of the Volatile Profile of a Spanish Soft Cheese P.D.O. Tortadel Casar during Ripening. *Food Chemistry.* 118,2010, 182-189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.081>
- [26] Galia W, Perrin C, Genay M, Dary A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophiles* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal.* 19, 2009, 89–95, doi: 10.1016/j.idairyj.2008.08.004
- [27] Beresford TP, Fitzsimons N A, Brennan N L, Cogan T M. Recent Advances in Cheese

- Microbiology. International Dairy Journal. 11, 2001, 259-274.[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- [28] Ayad E H E, Nashat S, El-Sadek N, Metwaly H, and El Soda M. Selection of Wild Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Egyptian Dairy Products According to Production and Technological Criteria. Food Microbiology., 2004, 21 :715-725
- [29] Dagdemir E, Ozdemir S. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese. Int. J. Dairy Technol., 2008, 61 (2), p.133-140.
- [30] González L, Fernández Cuadrillero A, Castro J M, Bernardo A, Tornadijo M E. Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from San Simón da Costa Cheese (PDO) in Order to Develop an Autochthonous Starter Culture. Advances in Microbiology. 5, 2015, 748-759, <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.511079>
- [31] Tsakalidou E, Anastasiou R, Vandenberghe I, VanBeeumen J, and Kalantzopoulos G. Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* ACA-DC 178: Characterization and specificity for b-casein. Applied and Environmental Microbiology., 1999, 65(5) :2035–2040
- [32] Kholif AM, Mahran G A, El-Nawawy M A, Ismail A A, Salem M M E, and Zaky W M. Evaluation of Proteolytic Activity of Some Dairy Lactobacilli. World. J of Dairy and Food Sciences., 2011, 6(1) : 21-26.
- [33] Kawai Y, Tadokoro K, Konomi R, Itoh K, Saito T, Kitazawa H, and Itoh T. A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stages of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci., 1999, 82 : 481-485.
- [34] Wang S L, C W Wang, T Y Huang. Microbial reclamation of squid pen for the production of a novel extracellular serine protease by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* TKU012. Bioresour. Technol. 2007, doi : 10.1016.et al., 2007
- [35] Fontina M G, Nicastro G, Garminati D, Neviani E, and Manachini P L. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. Journal of Applied Microbiology., 1998, 84: 72-80.
- [36] Hassaine O, Zadi-Karam H, and Karam NE. Phenotypic identification and Technological properties of lactic acid bacteria isolated from three breeds dromedary raw

milks in south Algeria. EMIR. J. Food Agric., 2008, 20(1) : 46-59

[37] Gatti M, Contarini G, and Neviani E. Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics. Applied and Environmental Microbiology., 1999, 65 : 1450–1454.

[38] Giraffa G, Andrighetto C, Antonello C, Gatti M, Lazzi C, and Marcazzan G. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* strains of dairy origin. Int.J. of Food Microbiology., 2004, 91 : 129–139.

How to cite this article:

F. Sadi, A. Dilmi Bouras, F.N. Ghomari, F. Hallouz and A. Noui. Phenotypic, molecular and technological characterization of autochthonous lactobacilli strains isolated from cow's milk and goat of Algerian populations. J. Fundam. Appl. Sci., 2017, 9(1), 339-353.