

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE : VENAM

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Usage des bactéries lactiques issues de
produits laitiers fermentés ou de fromages
locaux obtenus en Égypte dans la protéolyse
des protéines du lait afin de diminuer leurs
propriétés allergéniques et dans l'obtention de
produits antimicrobiens

Thèse de Doctorat

Discipline : Biochimie, Biotechnologie Agroalimentaires

Spécialité : Microbiologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Shady Nabil Rashed EL-GHAISH

Le 8 Juillet 2011, devant le jury ci-dessous

Président : Mr. Joël FLEURENCE, Professeur Université de Nantes
Rapporteur : Mme. Annie DARY, Professeur Université Henri Poincaré, Nancy 1
Rapporteur : Mme. Nathalie DESMASURES, Professeur Université de Caen Basse-Normandie
Examineur : Mr. Jean-Luc GAILLARD, Professeur Université de Caen
Membre invité : Mr. Xavier DOUSSET, Professeur ONIRIS

Directeur de thèse : DR. Jean-Marc CHOBERT
Responsable équipe FIP, INRA-BIA, NANTES

Co-directeur de thèse : DR. Thomas HAERTLÉ
Directeur de recherche, INRA, NANTES

University of Nantes
Faculty of Science and Technology

ÉCOLE Doctoral: VENAM

Year 2011

N° assigned by the library

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

The use of lactic acid bacteria collected from Egyptian fermented dairy products in the proteolysis of milk proteins for reduced allergenicity and in the production of antimicrobial agents

PhD Thesis

Discipline: Biochemistry, Food and Dairy Biotechnology
Specialist : Microbiology

Presented by

Shady Nabil Rashed EL-GHAISH

On 8 July 2011

Approved by

President : Mr. Joël FLEURENCE, Professor University of Nantes
Reporteur : Mme. Annie DARY, Professor, University of Henri Poincaré, Nancy 1
Reporteur : Mme. Nathalie DESMASURES, Professor University of Caen Basse-Normandie
Examiner : Mr. Jean-Luc GAILLARD, Professor University of Caen
Invited Member : Mr. Xavier DOUSSET, Professor ONIRIS

Supervisor: DR. Jean-Marc CHOBERT
FIP Team Manager, INRA-BIA, Nantes
Co-supervisor: Dr. Thomas HAERTLÉ
Director of Research, INRA, Nantes

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée au sein de l'équipe "Fonctions et Interactions des Protéines (FIP)", de l'unité "Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA)" de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Nantes. Je tiens à remercier le Gouvernement Égyptien (Ministère de L'Enseignement Supérieur Égyptien) pour avoir financé ma thèse de doctorat dans un laboratoire français.

**Institut National de la Recherche Agronomique
INRA**



La République arabe d'Égypte
جمهورية مصر العربية



A monsieur le Professeur Joël FLEURENCE, Professeur à l'Université de Nantes, vous nous avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A madame le Professeur Annie DARY, Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy 1, nous vous remercions d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A madame le Professeur Nathalie DESMASURES, Professeur à l'université de Caen Basse-Normandie, vous nous faites l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteur. Nous tenons à vous exprimer notre respectueuse reconnaissance.

A monsieur le Professeur Xavier DOUSSET, Professeur à ONIRIS, Nantes, que je tiens également à remercier pour sa gentillesse, son aide, ses précieux conseils et pour avoir accepté de juger ce travail.

A monsieur le Professeur Jean-Luc GAILLARD, Professeur à l'université de Caen Basse-Normandie, je voudrais dire un grand merci pour ses encouragements, ses remarques fort judicieuses durant le déroulement de ma thèse et pour avoir accepté de juger ce travail.

Cette thèse a été rendue possible grâce au support de plus d'un. Pour manifester ma profonde gratitude, je voudrais remercier d'une façon particulière les personnes suivantes :

Je remercie infiniment **Monsieur Jean-Marc CHOBERT**, Directeur de Recherches à l'INRA de Nantes, mon directeur de thèse, qui a accepté de m'accueillir dans son équipe. Je tiens à le remercier particulièrement pour la confiance qu'il m'a accordée, pour ses encouragements, ses conseils, et les nombreuses discussions que nous avons

eues tout au long de ma thèse, ainsi que pour son aide précieuse dans les différents aspects rédactionnels afférant à notre collaboration scientifique.

Je souhaite également exprimer ma profonde reconnaissance à **Monsieur Thomas HAERTLÉ**, Directeur de Recherches à l'INRA de Nantes, mon co-directeur de thèse, pour sa constante disponibilité, ses encouragements, ses conseils, ainsi que pour les discussions qui ont eu lieu tout au long de la thèse, son aide précieuse dans la rédaction des articles scientifiques, fruits de nos échanges et du travail accompli au sein de l'équipe FIP.

Je remercie sincèrement **Michèle Dalgalarondo** pour sa gentillesse, sa disponibilité quotidienne à toute épreuve, sa patience et pour tout le temps qu'elle a consacré à m'écouter et à m'aider dans mes travaux.

Je voudrais également remercier **Yvan Choiset** pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, m'aider à résoudre les difficultés que j'ai rencontrées, pour ses conseils et son amitié.

J'adresse un grand merci à **Hanitra Rabesona** pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, pour sa gentillesse et son amitié.

J'exprime également ma gratitude aux autres membres de l'équipe **Isabelle SERVENTON, Jean-Charles Gaudin, Christine MARQUOIS, et Sylvaine BIZON** pour leur aide et pour les discussions amicales.

Mes très sincères remerciements vont également à **Monsieur Mahmoud Sitohy**, professeur à l'université de Zagazig, Egypte, pour m'avoir permis d'initier ce travail, pour m'avoir autant aidé dans sa réalisation et pour ses nombreux conseils en biochimie et **Madame Iskra IVANOVA**, professeur à l'université de Sofia, Bulgarie, pour ses nombreux conseils en Microbiologie.

Je remercie infiniment le directeur de l'unité Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA.) **Monsieur Jacques Guéguen** pour m'avoir accueilli durant ces 4 années.

Je tiens aussi à exprimer mes plus profonds sentiments d'amitiés à tous les stagiaires accueillis à FIP durant mon séjour : **Asghar, Aynur, Azza, Claudia, Ferid, Imen, Inga, Kamel, Karan, Kawthar, Kevin, Martina, Micaela, Mikhail, Milos, Muhtadi, Nedelina, Nigar, Nigora, Nikolay, Ralica, Ragu, Reza, Soumaya, Svetoslav, Tania, Tatiana, Wafaa, Yanath et Yulia** pour leur soutien et les moments passés en commun.

Que tous ceux dont les noms n'ont pas été mentionnés, veuillez bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Enfin, je tiens tout particulièrement à remercier **mes Parents, ma femme Shaimaa, mes filles Farah et Yasmin, et mes frères Sherif et Rashed** pour leurs encouragements, leur soutien et leur patience.



SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Page
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	11
1. REVUE DE LA LITTÉRATURE	14
1.1. Les Produits Laitiers Egyptiens	15
1.1.1. Laban Rayeb	16
1.1.2. Laban Zabady	16
1.1.3. Fromage Karish	16
1.1.4. Fromage Domiati	17
1.1.5. Fromage Ras	18
1.2. Les bactéries lactiques	19
1.2.1. Application des bactéries lactiques	20
1.3. L'activité protéolytique	21
1.3.1. Les protéases de la paroi	23
1.3.2. Peptides et acides aminés	24
1.3.3. Transport des acides aminés et des peptides	25
1.4. Allergie	26
1.4.1. Définition et mécanismes de l'allergie alimentaire	28
1.4.2. Principaux allergènes alimentaires	29
1.4.3. L'allergie aux protéines du lait	31
1.4.3.1. Les allergènes du lait de vache.....	31
1.4.3.2. Structure des allergènes	32
1.4.3.2.1. Les épitopes	32
1.4.3.2.1.1. Classification des épitopes	32
1.4.3.2.2. Les haptènes	33
1.4.3.3. Les protéines majeures du lait présentant des propriétés allergéniques	33
1.4.3.3.1. Les caséines	33
1.4.3.3.1.1. La caséine αs_1	33

1.4.3.3.1.2. La caséine α_s2	34
1.4.3.3.1.3. La caséine β	34
1.4.3.3.1.4. La caséine κ	34
1.4.3.4. Les protéines majeures du lactosérum	35
1.4.3.4.1. La β -lactoglobuline et ses caractéristiques allergéniques	35
1.4.3.4.2. L' α -lactalbumine et ses caractéristiques allergéniques	35
1.5. Bactériocines des bactéries lactiques	36
1.5.1. Classe I : Lantibiotiques	37
1.5.1.1. Caractéristiques	37
1.5.1.2. Sous-classes de lantibiotiques de type A	37
1.5.1.3. Sous-classes de lantibiotiques de type B	38
1.5.2. Classe II : Peptides non modifiés	38
1.5.2.1. Caractéristiques	38
1.5.2.2. Sous-classe IIa	38
1.5.2.2.1. Caractéristiques	38
1.5.2.2.2. Mode d'action	39
1.5.2.3. Sous-classe IIb	39
1.5.2.3.1. Caractéristiques	39
1.5.2.3.2. Mode d'action	39
1.5.2.4. Sous-classe IIc	40
1.5.2.4.1. Caractéristiques	40
1.5.2.4.2. Mode d'action	41
1.5.3. Classe III : Protéines	41
1.5.3.1. Caractéristiques	41
1.5.4. Classe IV : Bactériocines complexes	42
1.5.4.1. Caractéristiques	42
1.5.5. Les applications des bactériocines dans les produits alimentaires	42
1.5.5.1. Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées	42
1.5.5.2. Immobilisation des bactériocines sur les cellules productrices	42
1.5.5.3. Les applications des bactéries productrices de bactériocines	43
2. MATERIEL ET METHODES	44
2.1. Matériel	45
2.2. Échantillons de collection	45

2.3. Isolement des isolats de LAB	46
2.4. Identification des isolats de LAB	47
2.4.1. Coloration de Gram	47
2.4.2. Test de la catalase	47
2.4.3. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S	47
2.5. Méthodes de detection de l'activité protéolytique	48
2.5.1. Test sur le lait écrémé UHT	48
2.5.2. Activite protéolytique déterminée sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé	48
2.5.3. Facteurs influençant l'activité protéolytique ..	49
2.5.3.1. Effet du pH	49
2.5.3.2. Effet de la température	49
2.5.3.3. Effet des inhibiteurs	49
2.6. SDS-PAGE	50
2.7. RP-HPLC	50
2.8. Purification des caséines α_{S1} et β à partir de la caséine totale	50
2.9. Identification des peptides par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS)	51
2.10. Identification des types de protéases par PCR	52
2.11. ELISA compétitif	53
2.12. Étude de l'activité antimicrobienne	54
2.12.1. Les isolats de LAB	54
2.12.2. Isolats bactériens et conditions de culture	54
2.12.3. Méthode de diffusion en puits pour la détection de l'activité antimicrobienne	54
2.12.4. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne	55
2.12.4.1. Effet des enzymes	55
2.12.4.2. Effet du pH	55
2.12.4.3. Effet de la température	55
2.13. Production d'une bactériocine par <i>Enterococcus faecium</i> TX1330 et <i>Enterococcus faecium</i> E980	55
2.14. Effet de la température, du pH et du sel sur la production de bactériocine	56

2.15. Caractérisation des entérocoques par PCR	56
2.16. Détection des facteurs de virulence	57
2.17. Tests de sensibilité aux antibiotiques	59
3. RESULTATS ET DISCUSSION	61
.....	
Chapitre I : Isolement et identification des bactéries lactiques (LAB) qui présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers traditionnels Égyptiens	62
Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity	62
RÉSUMÉ	63
ABSTRACT	64
1. INTRODUCTION	64
2. MATERIAL AND METHODS	65
2.1. Samples collection	65
2.2. Isolation and identification of LAB cultures	65
2.3. Amplification and sequencing 16S rDNA	65
2.4. Determination of growth and acidity curves	65
2.5. Proteolytic activity	65
2.5.1. Proteolytic activity on skim milk agar	65
2.5.2. Proteolytic activity measured using UHT skim milk	65
2.5.3. Proteolytic activity measured on caseinate and whey milk fractions	65
2.6. Factors influencing proteolytic activity	66
2.6.1. Effect of pH	66
2.6.2. Effect of temperature	66
2.6.3. Effect of inhibitors	66
2.7. SDS-PAGE	66
2.8. RP-HPLC	66
3. RESULTS AND DISCUSSION	66
3.1. Identification of various LAB isolates	66
3.2. Proteolytic activity	66
3.2.1. Determination of proteolytic activity on skim milk agar	66
3.2.2. Determination of proteolytic activity on UHT skim milk	66

3.3. Characterisation of <i>E. faecium</i> DO623 and <i>E. faecalis</i> HH22	67
3.3.1. Growth and acidification kinetics	67
3.3.2. Determination of proteolytic activities	68
3.3.3. Effect of pH on proteolytic activities	68
3.3.4. Effect of temperature on proteolytic activities	69
3.3.5. Effect of inhibitors on proteolytic activities	69
4. CONCLUSION	70
ACKNOWLEDGEMENTS	70
REFERENCES	70
Characterization of a new isolate of <i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity	71
RÉSUMÉ	72
ABSTRACT	73
INTRODUCTION	73
MATERIAL AND METHODS	74
Samples collection	74
Isolation and identification of LAB cultures	74
Amplification and sequencing 16S rDNA	74
Determination of growth and acidity curves	75
Proteolytic activity	75
Proteolytic activity screening (skim milk agar)	75
Proteolytic activity on UHT skim milk	75
Proteolytic activity studied on whole casein and denaturated whey protein	75
Factors influencing proteolytic activity	75
Effect of pH	75
Effect of temperature	75
Effect of inhibitors	76
SDS-PAGE	76
RP-HPLC	76
RESULTS AND DISCUSSION	76
Identification of various LAB isolates	76
Proteolytic activity	77
Proteolytic activity screening (skim milk agar)	77

Proteolytic activity studied on UHT skim milk	77
Characterization of <i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956	77
Growth and acidification kinetics	77
Proteolytic activity on casein and denaturated whey proteins	78
Effect of pH on proteolytic activity	79
Effect of temperature on proteolytic activity	79
Effect of inhibitors on proteinase activity	80
CONCLUSION	80
ACKNOWLEDGEMENTS	80
REFERENCES	81
TRAVAUX COMPLEMENTAIRES	82
Isolement et identification des bactéries lactiques (LAB) qui présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers traditionnels Égyptiens	82
RÉSULTATS ET DISCUSSION	82
Isolement des isolats de LAB	82
Activité protéolytique	83
Activité protéolytique mesurée sur du lait écrémé UHT	83
Activité protéolytique déterminée sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé	84
Détection des facteurs de virulence	86
Facteurs influençant l'activité protéolytique	87
Cinétique d'activité protéolytique	87
Effet du pH	89
Effet de la température	89
Effet des inhibiteurs	90
Chapitre II : La protéolyse des caséines β et α_{s1} par <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> IFO3956, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2 et <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> JDM1 isolées de produits laitiers égyptiens diminue leur immuno-réactivité	92
Proteolysis by <i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of α_{s1} -casein	92
RÉSUMÉ	93

ABSTRACT	94
INTRODUCTION	94
MATERIAL AND METHODS	95
Materials	95
Purification of α_{S1} -casein from total casein	95
Strain and growth conditions	95
Influence of the media on the proteolytic activity	95
Extraction and characterization of cell wall-bound proteases	95
SDS-PAGE	96
Gelatin-SDS-PAGE Zymogram	96
Characterization of α_{S1} -casein hydrolysates	96
LC/MS/MS analysis	96
Competitive ELISA	96
RESULTS AND DISCUSSION	97
Effect of the culture medium on proteinase activity	97
Characterization of the cell-bound proteases	97
Characterization of α_{S1} -casein hydrolysates	98
Competitive ELISA	100
CONCLUSION	100
ACKNOWLEDGEMENTS	100
REFERENCES	100
TRAVAUX COMPLEMENTAIRES	102
La protéolyse des caséines β et α_{S1} par <i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2 et <i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1 isolées de produits laitiers égyptiens diminue leur immuno- réactivité	102
RÉSULTATS ET DISCUSSION	102
Profils RP-HPLC	103
Types de protéases produites par les lactobacilles	104
ELISA compétitif	105
Chapitre III : Isolement et identification de bactéries lactiques (LAB) qui montrent une activité antimicrobienne dans les produits laitiers traditionnels égyptiens	108

Characterization of two safe Enterococcus strains producing enterocins isolated from Egyptian dairy products	108
RÉSUMÉ	109
ABSTRACT	110
1. INTRODUCTION	110
2. MATERIAL AND METHODS	111
Materials	111
Strains	111
Samples collection	112
Isolation and identification of Lactic acid bacteria cultures	112
Antimicrobial activity assay	112
Factors affecting antimicrobial activity	112
Enzymes	112
pH	112
Heat treatment	112
16S rDNA amplification, identification and sequencing	112
Producing of bacteriocin-like substance	113
Factors affecting production of bacteriocin	113
Temperature	113
pH and salt	113
Enterocin typing by PCR gene amplification and identification	113
Detection of virulence factors by PCR amplification	113
Disk diffusion antibiotic sensitivity testing	114
3. RESULTS AND DISCUSSION	115
Isolation and identification of various LAB isolates	115
Antimicrobial activity	115
Effect of enzymes, pH and heat treatments	116
Strain identification	117
Producing of bacteriocin-like inhibitory substance	117
Factors influencing bacteriocin production	117
Enterocin typing	117
Virulence factors	118
Antibiotic resistance	119

4. CONCLUSIONS	120
ACKNOWLEDGEMENTS	120
REFERENCES	121
CONCLUSION GÉNÉRALE	123
Activité protéolytique	124
Activité antimicrobienne	125
ENGLISH CONCLUSION	126
Proteolytic activity	127
Antimicrobial activity	128
RÉFÉRENCES	129

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

I-Publications

El-Ghaish, S., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J.-M. (2010). Screening of strains of *Lactococci* isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chemistry*, 120, (3) 758-764.

El-Ghaish, S., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J.-M. (2010). Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *European Food Research and Technology*, 230, (4) 635-643.

El-Ghaish, S., Rabesona, H., Choiset, Y., Sitohy, M., Haertlé, T., & Chobert, J.-M. (2011). Proteolysis of α_{S1} -casein by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products is decreasing its immuno-reactivity. *Journal of Dairy Research*, 78, 203-210.

El-Ghaish, S., Hadji-Sfaxi, I., Ahmadova, A., Choiset, Y., Rabesona, H., Sitohy, Haertlé, T., & Chobert, J.-M. (2011). Characterization of two safe *Enterococcus* strains producing enterocins isolated from Egyptian dairy products. *Beneficial Microbes*, 2, (3), 15-27.

El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., Eddine El Mecherfi, K., Bazukyan, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y.G., Kuliev, A.A., Mozzi, F., Chobert, J.-M., Haertlé, T. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sciences and Technology*, doi: 10.1016/j.tifs.2011.05.003.

II-Communications

El-Ghaish, S., Dalgarrondo, M., Haertlé, T., Sitohy, M., & Chobert, J.-M. A survey of proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from Egyptian dairy products. 2nd International Symposium on Antimicrobial Peptides. June 17-19, 2009, Saint-Malo, France, Poster.

Ahmadova, A., **El-Ghaish, S.**, Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.-M., & Haertlé, T. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity of fermented dairy foods. International Conference of Food Innovation. October 25-29, 2010, Valencia, Spain, communication orale.

El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Rabesona, H., Choiset, Y., Sitohy, M., Kuliev, A., Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J.-M. Use of strains of lactic acid bacteria selected from Azerbaijani and Egyptian traditional dairy products for reduction of immuno-reactivity of the protein components of milk matrices. Food Matrices (Construction, destructuring, sensory and nutritional properties, December 1-3, 2010, Le Croisic, France, Poster.

Chobert, J.-M., Rabesona, H., Choiset, Y., Popov, Y., Tkhruni, F., Kuliyevev, A., Ahmadova, A., Ivanova, I., Iliev, I., **El-Ghaish, S.**, Sitohy, M., Mazo, V., Sheveleva, S., Karlikanova, N., Lanina, V., Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G., & Haertlé, T. Use of lactic acid bacteria for production of antimicrobial and hypoallergenic products. Proceeding of the VI Moscow International Congress, Part 2 Biotechnology: State of the art and prospects of development, March 21-25, 2011, Moscow, Russia, Communication orale.

Chobert, J.-M., Haertlé, T., **El-Ghaish, S.**, Pescuma, M., Rabesona, H., Choiset, Y., Sitohy, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G. Proteolytic activity of LAB in order to decrease immuno-reactivity. Symposium Prebiotics and Probiotics – Potential for Human Health. April 17-20, 2011, Sofia, Bulgaria. Communication orale.

Ahmadova, A., **El-Ghaish, S.**, Kuliyevev, A.A., Ivanova, I., Chobert, J.-M., and Haertlé, T., Antimicrobials produced by lactic acid bacteria. Symposium Prebiotics and Probiotics – Potential for Human Health. April 17-20, 2011, Sofia, Bulgaria. Communication orale.

Ahmadova, A., **El Ghaish, S.**, Bazukyan, I., Popov, Y., Kuliev, A.A., Sitohy, M., Chobert, J.-

M., Haertlé, T. Antimicrobial and hypoallergenic products of lactic acid bacteria. Congrès International de Nutrition, Oran, Algérie. 2-3 mai 2011.

Dib, W., **El-Ghaish, S.**, Gourine, H., Grar, H., El Mecherfi, K.E., Negaoui, H., Belalia, S., Choiset, Y., Rabesona, R., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Chekroun, A., Saïdi, D., Kheroua, O. Etude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques sur les protéines du lait de vache. Congrès International de Nutrition, Oran, Algérie. 2-3 mai 2011.

LISTE DES ABREVIATIONS

APLV	Allergie aux protéines du lait de vache
BIA	Biopolymères, Interactions, Assemblages
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FIPL	Fonctions et Interactions des Protéines Laitières
INC	Institut National de la Consommation
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
UFC	Unité formant colonie
PCR	réaction en chaîne par polymérase
U.A.	Unités arbitraires
UHT	Ultra-haute-température
ADN	Acide désoxyribonucléique
RP-HPLC	Reversed-phase-High performance liquid chromatography
FPLC	Fast protein liquid chromatography
ATCC	American type culture collection
ONIRIS	Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, Nantes-Atlantique
AA	Acide aminé
Da	Dalton
kDa	kilo Dalton
kb	kilo base
pb	paires de bases

Code Acides aminés

Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Kunji *et al.*, 1996)

Chapitre I

Article 1

Figure 1: SDS-PAGE (12%) of UHT skim milk treated with proteolytic LAB cocci isolates for 24 h at 37°C. C: control. Samples 1 and 2: Domiatti cheese from Alexandria. Samples 3: Domiatti cheese from Damietta. Samples 4, 5 and 6: Domiatti cheese from Tanta.

Figure 2: Growth curve in M17 broth (■) or in skim milk (▲) and pH curve (○) of *Enterococcus faecalis* HH22 and *Enterococcus faecium* DO623 during incubation at 37°C during 24h. Experiments were performed three times and the results are expressed as mean plus the standard error.

Figure 3: SDS-PAGE (a and c) of Na-caseinate incubated for different periods 3, 6, 9 and 24h at 37°C at pH 7.2 with *Enterococcus faecalis* HH22 (a and b) and *Enterococcus faecium* DO623 (c and d). RP-HPLC profiles (b and d) were obtained after 24 h hydrolysis. Sample (S, -) as compared to control (C, - - -).

Figure 4: SDS-PAGE profile of denaturated whey proteins incubated for 3, 6, 9 and 24h at 37°C at pH 7.2 with *Enterococcus faecalis* HH22 (S) as compared to control (C).

Figure 5: Hydrolysis of Na-caseinate by *Enterococcus faecalis* HH22 and *Enterococcus faecium* DO623 at different pH values after 24 h incubation at 37°C (upper part) and at different temperatures after 24 h incubation at pH 7.2 (lower part).

Figure 6: Effect of inhibitors (EDTA, PMSF, and Iodoacetic acid) on hydrolysis of Na-caseinate by *Enterococcus faecalis* HH22 and *Enterococcus faecium* DO623.

Article 2

Figure 1: SDS-PAGE of UHT skim milk treated with some proteolytic lactobacilli strains for 24 h at 37°C.

Figure 2: Growth curve (open square) and pH value (filled circle) of *Lactobacillus fermentum* IFO3956 grown in MRS broth (a) and skim milk (b) at 37°C during 24 h.

Figure 3: SDS-PAGE (a and c) and RP-HPLC (b and d) profiles of Na-caseinate and denaturated whey proteins incubated for different periods (3, 6, 9 and 24 h) with *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (S) as compared to control (C) at 37°C.

Figure 4: SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolyzed by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 at different pH values after 24 h incubation at 37°C.

Figure 5: SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolyzed by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 at different temperatures after 24 h incubation at pH 7.2.

Figure 6: SDS-PAGE of Na-caseinate treated with *Lactobacillus fermentum* IFO3956 in the presence of EDTA (lane 3), PMSF (lane 4) and iodoacetic acid (lane 5). Lane 1 Na-caseinate, lane 2 Na-caseinate treated by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 in absence of inhibitors.

Travaux complémentaires

Figure 2: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en présence de différents isolats et contrôle sur du lait UHT écrémé. C : Contrôle sans isolat ; 1, 3, 4, 6, 7, 9 : coques obtenus à partir de fromage Ras ayant subi une maturation et originaire de Tanta ; 2, 5 et 8 : lactobacilles

Figure 3: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en présence des différents isolats et contrôle sur du lait UHT écrémé. CN, CL : Contrôles ; 1, 3, 4, 6, 9 : Coques obtenus à partir de fromage Ras ayant subi une maturation et originaire de Tanta ; 2, et 5 : Lactobacilles

Figure 4: SDS-PAGE du caséinate de sodium après différents temps d'incubation (3, 6, 9 et 24 h) avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 à 37° C. S : caséinate de sodium incubé avec la souche ; C : caséinate de sodium incubé sans souche.

Figure 5: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en présence de différentes souches et contrôle sur du caséinate de sodium à différents pH.

Figure 6: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à différentes température en présence de différentes souches et contrôle sur du caséinate de sodium.

Figure 7: SDS-PAGE du caséinate de sodium (C) hydrolysé par le surnageant de culture de *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1, en présence ou non d'inhibiteurs

Chapitre II

Figure 1: SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolysate obtained by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 after 5 and 24 h incubation at 37 °C on different media [MCA

(lane 2); CYG (lane 3); RSM (lane 4); MRS (lane 5)] as compared to control (Na-caseinate without strain, lane 1).

Figure 2: SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolysate (3 and 24 h incubation at 37 °C) by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 supernatants obtained by treating bacterial cells with different detergents: 1% SDS (lane 2); 1% Triton X-100 (lane 3); and 1% Tween 80 (lane 4) as compared to non-hydrolyzed Na-caseinate (lane 1).

Figure 3: Gelatin SDS-PAGE zymogram patterns of *Lactobacillus fermentum* IFO3956 supernatants obtained after cultivation for 48 h at 37 °C on MCA and subsequent incubation for 24 h at 37 °C with different detergents [1% SDS (lane 2); 1% Triton X-100 (lane 3) and 1% Tween 80 (lane 4)]. Lane 1 is molecular weight markers.

Figure 4: α_{S1} -Casein sequence and peptides released by the proteolytic action of *Lactobacillus fermentum* IFO3956 after 24 h incubation at 37 °C, as indicated by arrows. The peptides marked by borders show the main 8 epitopes reported originally by Chatchatee et al. (2001) and the peptide marked by a shadow refers to a new epitope reported by Lin et al. (2009). The sequence uses the one-letter amino acid code and the phosphorylated serines are indicated by S.

Figure 5: Binding of α_{S1} -casein (●) and its *Lactobacillus fermentum* hydrolysate (■) to IgE in the sera pool of CMA patients. Averages are indicated by horizontal black bar.

Travaux complémentaires

Figure 8: SDS-PAGE des caséines α_{S1} et β après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (1), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (2) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (3) à 37 ° C. CA : caséine α_{S1} incubée sans souche ; CB : caséine β incubée sans souche.

Figure 9: Profils RP-HPLC des caséines α_{S1} et β après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 à 37 °C.

Figure 10: Détection par PCR de gènes codant pour des protéases connues dans les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (LF), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (LR) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (LP).

Figure 11: Immuno-réactivité des hydrolysats de caséine α_{S1} après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (B) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (C) à 37° C et d'un contrôle (A) obtenu par incubation de la caséine α_{S1} en absence de souche.

Figure 12: Immuno-réactivité des hydrolysats de caséine β après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (D), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (B) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (C) à 37° C et d'un contrôle (A) obtenu avec de la caséine β incubée sans souche.

Chapitre III

Figure 1: Evolution of bacteriocin production during the growth of (A) *Enterococcus faecium* E980 and (B) *Enterococcus faecium* TX1330 in M17 broth at 37 °C. Bacteriocin concentration (BC) is expressed as arbitrary units per millilitre (AU/ml). pH (■); OD 600 nm (●).

Figure 2: PCR detection of genes encoding known enterocins in *Enterococcus faecium* isolates.

Lane 1: molecular marker (100 bp); lane 2: Enterocin 31; lane 3: Enterocin S48; lane 4: Enterocin L50A; lane 5: Enterocin Q; lane 6: Enterocin P; lane 7: Enterocin Cyl; lane 8: Enterocin B and lane 9: Enterocin A.

Figure 3: Multiplex PCR detection of genes encoding major virulence factors in *Enterococcus faecium* TX1330 (B) and *Enterococcus faecium* E980 (C) as compared to the reference strain, *Enterococcus faecalis* MMH594 (A).

Lane 1: molecular marker (100 bp); lane 2: *asaI*; lane 3: *esp*; lane 4: *ace*; lane 5: *efaAfs*; lane 6: *cylA*; lane 7: *cylB* and lane 8: molecular marker (1 kb).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau (1): Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques

Tableau (2): Systèmes de transports d'acides aminés identifiés chez les bactéries lactiques (Kunji et al., 1996)

Tableau (3): Un glossaire des termes liés à l'allergie (Hayakawa *et al.*, 1999)

Tableau (4): Allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et chez l'adulte (données du CICBAA) (Moneret-Vautrin, 2008)

Tableau (5): Classification des bactériocines de bactéries lactiques

Tableau (6): Distribution des produits laitiers recueillis en Égypte

Tableau (7): Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les protéases connues

Tableau (8): Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les enterocines connues

Tableau (9): Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les facteurs de virulence connus

Chapitre I

Table 1: Identification of lactobacilli isolates in dairy products collected from Egyptian local regions

Travaux complémentaires

Tableau (10): Distribution des bactéries lactiques qui présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers traditionnels Égyptiens

Tableau (11): Distribution et identification des souches protéolytiques collectées à partir des produits laitiers Égyptiens

Chapitre II

Table 1: Characterization of the 24 peptides contained in hydrolysate of α_{S1} -casein by *Lactobacillus fermentum* IFO3956

Travaux complémentaires

Tableau (12): Inhibition de la fixation des IgE à la caséine α_{S1} (contrôle) et à ses hydrolysats obtenus par l'action protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 après 24 h d'incubation à 37 ° C

Tableau (13): Inhibition de la fixation des IgE à la caséine β (contrôle) et à ses hydrolysats obtenus par l'activité protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, *Lactobacillus plantarum* JDM1 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956 après 24 h d'incubation à 37 °C

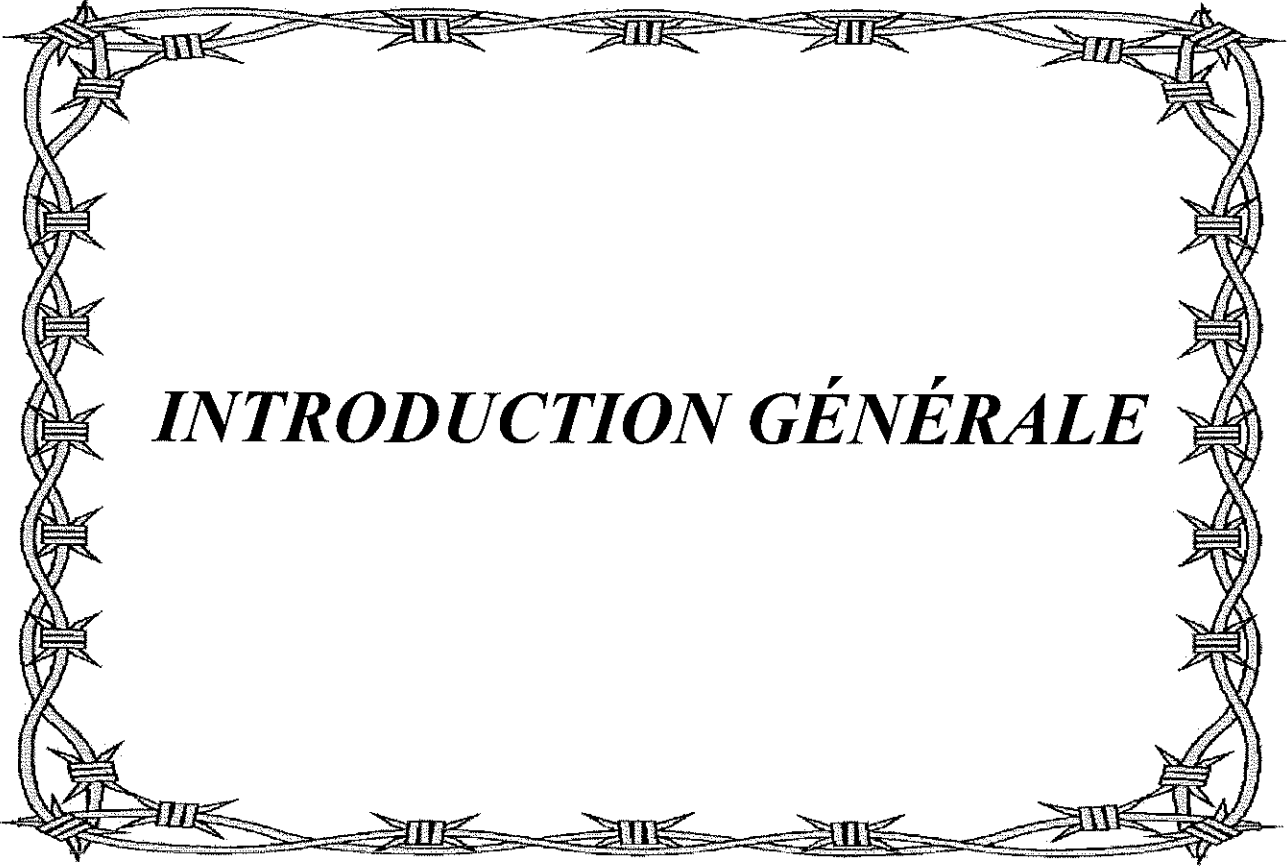
Chapitre III

Table 1: PCR primers and products used for the detection of genes encoding for the virulence factors and known enterocins

Table 2: Geographical distribution of lactic acid bacteria (LAB) isolates collected from Egyptian dairy products

Table 3: Effect of some physicochemical factors on the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolates against *Lactobacillus brevis* 145

Table 4: Antibiotic resistance of *Enterococcus faecium* E980 and *Enterococcus faecium* TX1330



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Généralement les produits laitiers traditionnels Égyptiens sont obtenus sans addition de levains industriels. Les principaux fromages traditionnels sont Ras, Domiatti et Kareish et les principaux produits laitiers fermentés sont Zabady et Laban rayeb. En Egypte, différents laits crus (vache, bufflesse, brebis, chèvre et chamelle) sont consommés. Récemment, l'organisation égyptienne de normalisation et de contrôle de qualité a recommandé que différents produits laitiers doivent être fabriqués à partir de lait pasteurisé. Cette recommandation visait à produire des produits laitiers stables et de haute qualité pour la santé. Par conséquent, il y a une grande demande de nouvelles cultures 'starter' pouvant être utilisées dans les produits laitiers égyptiens (El Soda et al., 2003).

L'intérêt des consommateurs pour divers produits alimentaires fermentés comme les produits laitiers, les légumes et les viandes fermentées a considérablement augmenté ces dernières années grâce à la perception positive de l'impact sur la santé des consommateurs de ces produits considérés comme bénéfiques. Par conséquent, il y a un besoin évident de recherche de nouveaux agents de conservation des aliments, de préférence d'origine naturelle, et principalement produits par des organismes relativement bien connus et largement acceptés. Dans cet aspect, les bactéries lactiques (LAB) ayant le statut 'Generally recognized as safe' (GRAS) sont de très bons candidats. Les LAB sont largement utilisées dans l'industrie laitière pour leur rôle dans l'acidification du lait, dans le développement de saveur et aussi pour leurs activités protéolytique, antimicrobienne et de production d'exopolysaccharides.

Les allergies alimentaires représentent un important problème de santé publique. Les allergies étaient jusqu'à présent presque toujours liées aux mêmes allergènes (lait de vache, œuf de poule et poissons) (Dutau & Rancé, 2006). Les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes chez les enfants des pays industrialisés. La prévalence de l'allergie alimentaire dans la population générale atteint, enfants et adultes confondus, de 1,4 à 1,8% d'après une enquête anglaise, 4% aux États-Unis, 3,24% dans une enquête française et jusqu'à 8% des enfants de moins de trois ans (Dupont & de Boissieu, 2005). Le lait est une des sources de principaux nutriments, les protéines du lait sont les premiers nutriments exogènes consommés en grande quantité par les nourrissons. Cependant, certains enfants sont allergiques à ces protéines.

Pour cette raison, les LAB à forte activité protéolytique pourraient être utilisées pour aboutir, grâce à l'hydrolyse des épitopes, à une diminution de l'allergénicité du lait et celles à forte activité antimicrobienne pourraient l'être dans l'industrie alimentaire en tant que co-cultures ou cultures starter dans les aliments.

Dans cette étude, l'attention s'est concentrée sur les laits fermentés et fromages recueillis en Égypte, en tant que sources potentielles de LAB pour une application dans l'industrie alimentaire.

Ainsi, la présente étude a été conçue pour inclure les éléments suivants:

Chapitre I :

Isolement et identification des bactéries lactiques (LAB) qui présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers traditionnels Égyptiens.

Chapitre II :

La protéolyse des caséines β et α_1 par *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 isolées de produits laitiers Égyptiens diminue leur immuno-réactivité.

Chapitre III :

Isolement et identification de bactéries lactiques (LAB) qui montrent une activité antimicrobienne dans les produits laitiers traditionnels Égyptiens.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1. Les produits laitiers égyptiens

Administrativement, l'Égypte est divisée en 26 gouvernorats, qui sont classés en quatre groupes. Le premier groupe comprend six gouvernorats urbains (Le Caire, Alexandrie, Domietta, Port-Saïd, Ismaïlia, Suez, Helwan et Octobre). Le deuxième groupe comprend sept gouvernorats ruraux qui sont situés dans le delta du Nil et connus sous le nom de "Lower Egypt ou Fallahin" (Dakahilia, Sharkia, Kalubia, Kafr El-Sheikh, Gharbia, Monoufia et Behera). Le troisième groupe comprend huit gouvernorats ruraux qui sont situés dans la vallée du Nil et connus sous le nom de "Upper-Egypt ou Saide" (Geza, Fayoum, Beni Suief, Menya, Assiout, Souhag, Kena et Assouan). Le quatrième groupe comprend cinq gouvernorats qui sont situés sur les frontières de l'Est et de l'Ouest de l'Égypte et connus sous le nom de "Sahari Egypt ou Badwainu" (La Nouvelle Vallée, Matrouh, le Nord du Sinaï, le Sud du Sinaï et la mer rouge) (Abou-Donia, 2008).

Les procédés de fabrication des produits laitiers égyptiens voient leur origine dans la période pharaonique allant de 3200 à 332 avant Jésus-Christ ; ils ont été développés pendant la période Gréco-Romaine de 332 avant JC à 641 après JC, puis dans la période Arabo-Islamique allant de 641 jusqu'à nos jours. Les procédés de fabrication des produits laitiers traditionnels dans les frontières des gouvernorats doivent être étudiés, parce qu'ils ne l'ont pas été précédemment (Abou-Donia, 1999).

Les principaux produits laitiers égyptiens sont *Laban rayeb*, *Laban Khad*, *Laban Zeer*, *Kishk*, *Laban Zabady*, *Labneh*, fromage *Karish*, fromage *Mish*, fromage *Domiat*, fromage *Ras*. Les Égyptiens ont adopté l'usage de récipients en plastique pour donner des formes spécifiques pour différents types de fromage (*Kashkaval*, *Provolone*, *Mozzarella*, *Medaffarah*, et *Halloumi*), fromage fondu, glace et *Al-samn*.

Généralement, les produits laitiers traditionnels égyptiens sont obtenus sans addition de cultures industrielles. Les principaux fromages traditionnels sont : *Ras*, *Domiat* et *Kareish* et les principaux produits laitiers fermentés sont : *Zabady* et *Laban Rayeb*. En Égypte, différents produits laitiers crus, fabriqués à partir de lait de vache, bufflesse, brebis, chèvre et chamelle sont consommés. Récemment, l'organisation égyptienne de standardisation et de contrôle de la qualité a recommandé que différents produits laitiers soient fabriqués à partir de lait pasteurisé. Cette recommandation visait à produire des produits laitiers de haute qualité pour la santé. Par conséquent, il y a un grand besoin de nouvelles cultures utilisables dans les produits laitiers égyptiens (El Soda et al., 2003).

1.1.1. *Laban Rayeb*

Il est aussi connu sous le nom *Laben Matrad*, lait aigre naturel et lait écrémé fermenté. En Basse Égypte (Lower Egypt), les agriculteurs ou fermiers mettent le lait frais dans un récipient en poterie peu profond ou profond (*Matrad* ou *Shalia*), et le laissent sans agitation dans une pièce chaude et sombre jusqu'à ce que la crème monte et le lait coagule (El-Gendy, 1983).

1.1.2. *Laban Zabady*

Zahads, *Zabadi* ou *Laban Zabady* est le type traditionnel de yaourt fabriqué en Égypte. Normalement, le *Zabady* est fabriqué à partir de lait de bufflesse ou de vache ou d'un mélange des deux. On pense que « *Zabady* » provient du lait fermenté égyptien « *Laban Rayeb* ».

Le lait est filtré à travers un tissu, bouilli pendant quelques minutes puis laissé refroidir jusqu'à une température de 37-45 °C. Le levain est ajouté. Le lait inoculé est transféré dans de petits pots en plastique et mis en incubation. Les incubateurs les plus populaires sont fabriqués à partir de boîtes en bois, chauffées par le charbon ou l'électricité. Pendant la période d'incubation, la température est contrôlée manuellement ou automatiquement. Lorsque le lait commence à coaguler, la source de chaleur est retirée et les pots sont laissés jusqu'à coagulation complète. Les pots sont ensuite retirés dans un lieu froid pour arrêter le développement de l'acidité. L'excès d'acide donne au produit un goût désagréable et peut provoquer ou cause une séparation du lactosérum (El-Gendy, 1983 ; Abou-Donia, 1984, 2004 ; El-Baradei et al., 2008).

1.1.3. Fromage *Karish*

Karish, *Kariesh* ou fromage *Kareish* est le fromage le plus populaire fabriqué à partir du lait écrémé frais, doux. Il contient la plupart des constituants du lait écrémé dont les protéines, une petite quantité de sucre, des vitamines solubles et la majorité du calcium et du phosphore.

Le fromage *Karish* est fabriqué à partir de lait écrémé de bufflonne ou de vache ou d'un mélange des deux. Le lait écrémé utilisé peut être de *Laban Rayeb*, *Laben Khad*, *Laban Zeer* ou du lait écrémé mécaniquement. Ainsi, les détails de la fabrication du fromage *Karish* diffèrent selon le type de lait écrémé et le principe de sa préparation selon la méthode de Fahmi (1950). Le lait écrémé est versé directement dans des pots spéciaux connus sous le nom de "*Shallia* ou *Zeer*" d'une capacité d'environ 4-7 kg. Les pots de lait écrémé sont

conservés à température ambiante jusqu'à coagulation. Après avoir enlevé la couche de crème qui s'est formée après 24 à 36 h pendant l'été et de 2 à 3 jours pendant l'hiver, le caillé est versé sur une natte (un tapis spécial), qui est habituellement faite d'un type de roseau pour drainer le lactosérum. Après quelques heures, l'extrémité de la natte est liée pour permettre à une partie du lactosérum de s'écouler. Ce processus de propagation du caillé, puis pressage dans la natte est répété une ou deux fois. Enfin, la natte est suspendue à son extrémité afin de compléter le drainage du lactosérum (deux ou trois jours ou jusqu'à ce que la texture désirée du fromage soit obtenue). Enfin, le fromage est coupé puis séché, salé, selon le goût souhaité. Le fromage salé est remis pour quelques heures supplémentaires dans la natte et consommé comme fromage frais. La qualité et la composition du fromage *Karish* peuvent varier (le type de lait - la méthode de fabrication - le temps requis pour compléter la vidange du lactosérum - la qualité et la quantité du sel ajouté- la forme du produit final) (El-Gendy, 1983 ; Abou-Donia & El-Soda, 1986).

1.1.4. Fromage *Domiat*

Le fromage *Domiat* ou *Domietta* (*Gebnah Domiat*) est la variété la plus populaire de fromage blanc en Égypte, et doit sa dénomination à la ville et au gouvernorat de Damiette (Dumyât) dans le nord de l'Égypte. Il est aussi connu comme fromage blanc (*Gebnah Baida*) ou comme fromage doux (*Gebnah Tariyah*). Le fromage *Domiat* est fabriqué et consommé non seulement à Damiette, mais aussi dans tous les gouvernorats d'Égypte. Il est bien connu et consommé dans le monde arabe en général. Certains types de fromages en Europe comme la feta ressemblent au fromage *Domiat*. Le fromage *Domiat* aurait son origine en Égypte vers 330 avant JC. Dans le fromage *Domiat*, le sel est ajouté directement dans le lait. La forme finale du fromage *Domiat* varie beaucoup, il peut-être de forme cubique ou cylindrique mais la forme commune est cubique. Le fromage *Domiat* est issu d'une coagulation enzymatique, il est salé et consommé frais ou après stockage.

Le fromage *Domiat* est fabriqué à partir de lait de bufflonne ou de vache ou d'un mélange des deux. Ainsi, les propriétés du fromage *Domiat* diffèrent selon le type de lait utilisé. Le principe de sa préparation repose sur la méthode décrite par Abou-Donia (1986). Le procédé de fabrication peut être résumé comme suit : Après sa standardisation en matière grasse (8, 4 et 2% respectivement pour des fromages entiers, demi et quart) le lait est chauffé à 80 °C puis refroidit à 50 °C avant l'ajout de sel (5-14%) directement dans le lait. Le pourcentage de sel diffère selon la saison de la fabrication, la maturation ou la température de stockage du fromage. Pour le fromage stocké au réfrigérateur, connu localement sous le nom

de fromage Tallaga, le sel est ajouté au lait à un niveau de 5-6% en hiver, 6-7% au printemps et en automne, et 7-8% en été. Pour le fromage stocké à température ambiante connu localement sous le nom de fromage Khazin, on ajoute du sel à un niveau de 8-10% en hiver, 10-12% au printemps et en automne, et 12-14% en été. On ajoute ensuite la présure qui fait cailler le lait pendant 2-3 h à 38 °C. Le coagulum est versé à la louche dans des moules en bois ou en acier, garnis de tissu grossier ou d'un filet. Il existe différentes tailles de moules (petit, moyen ou grand). La durée de drainage varie de 12 à 24 h. Le fromage peut-être consommé frais ou stocké (4-8 mois).

1.1.5. Fromage Ras

Le principal fromage traditionnel égyptien est le fromage Ras. C'est un fromage dur, obtenu par coagulation enzymatique et maturation. Il est assez semblable au fromage grec Kefalotyri. Le nom local ou commercial en Égypte est fromage Romi (Gebnah Romi), sauf dans les marchés d'Alexandrie où il est connu sous le nom de fromage Torky (Gebnah Torky). Il est probable que le fromage Ras de base provienne des Balkans, puis son origine en Égypte remonterait à la première phase industrielle de l'Égypte, après 1818 (Abou-Donia, 2002).

A son arrivée à l'unité de production, le lait est stocké en grande cuve, afin de mélanger le lait de la collecte de plusieurs exploitations. Le lait partiellement entier (3% de matière grasse) est déversé dans de grandes cuves pour y être tiédi puis chauffé à 32 °C (la température ne peut pas être portée au-delà de 40 °C). On ajoute ensuite la présure qui fait cailler le lait en 35 min. Le caillé est découpé puis brassé, afin de lui faire perdre de l'humidité plus rapidement. Les grains sont chauffés à 45 °C pendant 40 min. Le caillé destiné à devenir du fromage blanc sera peu égoutté. Après l'ajout de sel (1% du poids du caillé), le caillé est versé à la louche dans des moules et une pression manuelle est appliquée pour expulser une partie du lactosérum adhérent. Ensuite, la pression mécanique est augmentée pendant 24 h. Les fromages sont salés par immersion dans l'eau salée (solution saline à 20%) pendant 24 heures, opération de quelques heures qui aidera à former progressivement la croûte, révélatrice de la saveur particulière de chaque variété. Après une vidange d'une journée dans un local très aéré à température ambiante, les surfaces de chaque fromage sont couvertes d'une petite quantité de sel (saupoudrage), les fromages sont retournés et le processus de salage à sec répété encore une fois. Les temps de maturation de ce type de fromage est de 2-3 mois (Hofi et al., 1983 ; ESHC, 2001).

1.2. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des microorganismes dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années. Depuis la plus haute antiquité, les hommes ont produit du lait caillé fermenté, du fromage et du beurre. Utilisaient-ils des levains, comme c'était le cas pour la fabrication du pain et dont les premières représentations datent de l'ancien Empire égyptien, soit de plus de 4000 ans ? On ne le sait pas (Chamba, 2009). Il est très probable que les premiers fromages aient été obtenus par coagulation lactique, égouttage spontané, salage et séchage. Pendant la première moitié du 20^e siècle, les efforts des scientifiques et des praticiens laitiers, aussi bien en Europe qu'en Amérique du Nord, Australie et Nouvelle-Zélande, portèrent sur la mise en évidence du rôle des principales espèces, la sélection des souches et la préparation des ferments. La sélection d'un petit nombre d'isolats pour leur activité acidifiante et leur sensibilité aux bactériophages, a eu pour conséquence la mise en évidence du rôle déterminant des autres propriétés des LAB dans l'élaboration de l'ensemble des caractéristiques sensorielles des fromages (Chamba, 2009).

Les LAB forment un groupe hétérogène composé de bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres), dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. La description générale des LAB est à Gram positif, non pathogènes, non sporulantes, catalase négative, tolérant l'acide, aéro-tolérantes, fastidieuses sur le plan nutritionnel (di Cagno et al., 2003).

Les révisions taxonomiques des genres et la description de nouveaux genres signifient que les LAB pourraient, dans leur définition physiologique large, contenir environ 20 genres. Du point de vue pratique ou de leur importance industrielle, les genres suivants sont considérés comme les principaux: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Les genres *Lactobacillus* (Lb.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.), *Streptococcus* (S.) forment le noyau du groupe. Le genre *Bifidobacterium*, souvent pris en compte dans le même contexte que les LAB partage certaines de leurs caractéristiques typiques, mais est phylogénétiquement indépendant et dispose d'un mode unique de fermentation du sucre (Axelsson, 2004; Courtin & Rul, 2004 ; Makarova et al., 2006).

Enfin, Axelsson (2004), a résumé les caractéristiques des bactéries lactiques dans le tableau (1)

Tableau (1) : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques

Caractère	Bacilles		Coques							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i> ^a
CO ₂ du glucose ^b	- ^c	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10° C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45° C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance dans 6,5% de sel	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance dans 18% de sel	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Acide lactique ^e	L	D,L,DL ^f	L	L	L	D	L, DL ^f	L	L	D,DL ^f

+ : réponse positive ; - : réponse négative ; ± : réponse varie selon les espèces ; ND : non déterminé

a : Weissella, les souches peuvent également être sous forme de Bacille

b : Test pour l'homo-ou hétéro-fermentation du glucose : négatif et positif indiquent respectivement, homo-fermentaire et hétéro-fermentaire

c : de petites quantités de CO₂ peuvent être produites, selon les milieux

d : pas de croissance dans 8% de NaCl

e : configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose

f : la production de l'acide D-, L-, ou DL-lactique varie selon les espèces

1.2.1. Application des bactéries lactiques

Les LAB sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits laitiers, de la mer, de la viande, des céréales, des légumes (Leroy et al., 2006 ; Poutanen et al., 2009 ; Zhu et al., 2009 ; Fadda et al., 2010 ; Leroi, 2010). Elles font également partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles produisent de nombreux métabolites comme l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone (CO₂) et le diacétyle. Certaines LAB, notamment celles appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, secrètent du diacétyle. Ce

composé, qui donne l'arôme du beurre, présente une activité antagoniste envers les bactéries à Gram positif et négatif ainsi que certaines levures (El-Ziney et al., 1998 ; Liu, 2003). Les LAB sont largement utilisées dans l'industrie laitière pour leur pouvoir acidifiant du lait et les propriétés de développement de saveur, et aussi pour leurs activités protéolytique, antimicrobienne et de production d'exopolysaccharides. Les LAB jouent un grand rôle dans la fabrication fromagère, lié principalement à trois aspects de leur métabolisme :

A : La production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique du produit. Cet acide est un sous-produit de la fermentation, voie de dégradation des sucres en conditions anaérobies (absence d'oxygène). L'abaissement du pH limite aussi la croissance de bactéries indésirables.

B : L'activité protéolytique.

C : L'inhibition des flores non lactiques si ces isolats sécrètent des bactériocines.

Dans les produits laitiers égyptiens, de nombreuses souches ont déjà été identifiées comme *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, et *Lactobacillus fermentum* (El-Soda et al., 2003).

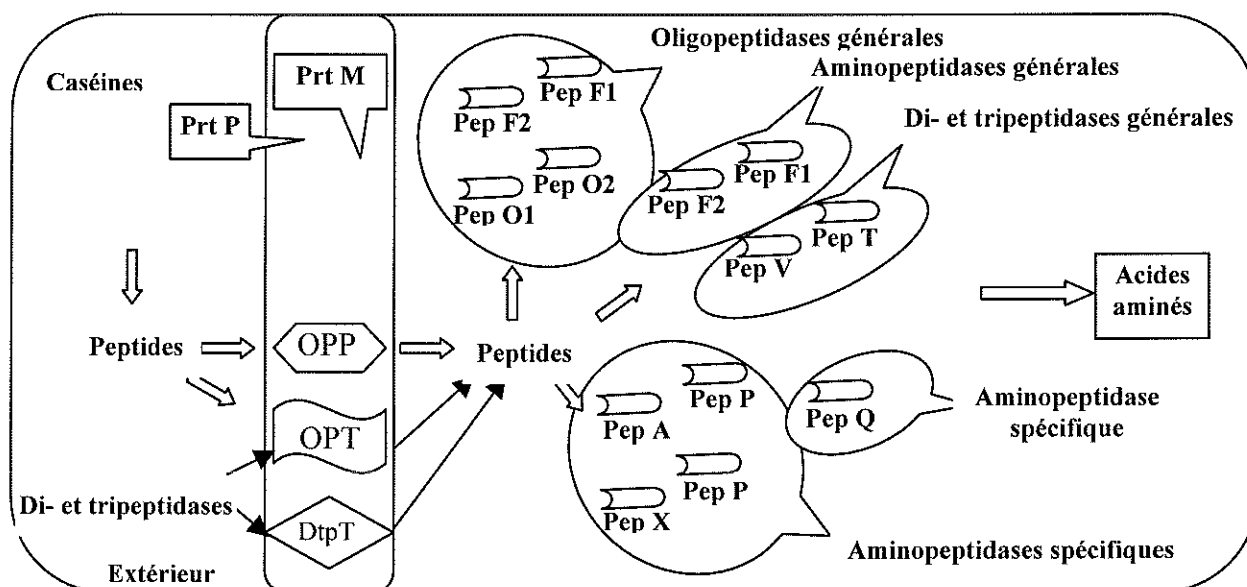
1.3. Activité protéolytique

Les LAB se caractérisent par des besoins nutritionnels complexes. Par exemple, elles ne sont pas capables de synthétiser certains acides aminés à partir d'une source azotée simple. Les besoins en acides aminés des LAB sont variables entre les différents genres bactériens, voire au sein d'une même espèce. Dans le lait, les acides aminés libres ne sont présents qu'à de faibles concentrations. Ainsi, la croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux LAB d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines du lait. Par exemple, l'activité protéolytique est également l'un des critères de sélection des bactéries utilisées dans la production de yoghourt (lait fermenté). Les souches de *Streptococcus thermophilus* présentent généralement une activité protéolytique faible, voire parfois inexistante par l'absence de protéase de paroi (protéase négative). C'est la raison pour laquelle leur croissance et l'acidification du lait sont parfois limitées lorsqu'elles sont utilisées en culture pure, du fait d'une quantité insuffisante en peptides et acides aminés initialement présents dans le produit laitier. En revanche, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est beaucoup

plus protéolytique. Ainsi, il lui est possible d'hydrolyser les caséines en petits peptides et acides aminés assurant sa croissance et celle de *Streptococcus thermophilus* lorsqu'il s'agit de cultures mixtes. Cependant, une activité protéasique très importante peut être à l'origine d'applications potentielles dans le domaine de la santé (Corrieu & Luquet, 2008).

Les LAB sont largement utilisées dans l'industrie laitière pour leur pouvoir acidifiant du lait et les propriétés de développement de saveur, et aussi pour leurs activités protéolytique, antimicrobienne et de production d'exopolysaccharides. L'activité protéolytique des isolats de LAB est également un facteur influençant leur développement dans le lait et la production d'acide. Leur potentiel protéolytique est susceptible de s'exprimer quand elles atteignent leur concentration maximale. Rodriguez et al. (1997) ont montré que l'addition de la souche *Lactococcus lactis* T1 augmentait la production d'acides aminés pendant l'affinage du fromage. Par ailleurs, il sera également important de considérer l'impact de(s) la protéase(s) produite(s) par les LAB sur les propriétés des produits laitiers fermentés pour améliorer la qualité des fromages et maintenir des qualités organoleptiques favorables. De nombreuses souches de LAB productrices de protéases peuvent être utilisées dans l'industrie comme *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, biovar. *Diacetylactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Moulay et al., 2006 ; Ong et al., 2006 ; Pappa et al., 2006 ; Milesi et al., 2007 ; Simova & Beshkova, 2007 ; Tzvetkova et al., 2007 ; Hébert et al., 2008 ; Koch et al., 2008 ; Pescuma et al., 2008 ; Piraino et al., 2008 ; Wang et al., 2008 ; Lonigro et al., 2009 ; Slattery et al., 2010 ; Strahinic et al., 2010 ; Sadat-Mekmene et al., 2011).

Les enzymes protéolytiques ont été identifiées et purifiées et les systèmes de transport intervenant dans la protéolyse caractérisés chez *Lactococcus lactis* depuis de nombreuses années, ce qui a permis l'établissement d'un modèle de caséinolyse en trois étapes (Fig. 1) (Kunji et al., 1996 ; Liu et al., 2010). La première étape repose sur une endoprotéase ancrée à la surface bactérienne et appelée protéase de paroi (ou *prtP*). Lors de la deuxième étape, certains peptides résultant de cette caséinolyse sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (OPP et OPT) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di- et tripeptides présents dans le lait peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et OPT). Dans la troisième étape, dans le cytoplasme bactérien de nombreuses peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés.



Protéases (PrtP, et PrtM) Endopeptidases (PepO1, PepO2, PepF1, et PepF2)

Tripeptidases (PepT) Dipeptidases (PepV)

Aminopeptidases (PepA) Proline-spécifiques (PepP, PepX, et PepQ)

Fig. 1 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Kunji et al., 1996)

1.3.1. Les protéases de la paroi

Les protéases de la paroi (*prt*) ont été étudiées de façon très approfondie chez les *Lactocoques*, puis chez les *Lactobacilles* et enfin récemment chez *Streptococcus thermophilus*. Les études biochimiques sur les protéases de lactocoques montrent qu'elles ont un poids moléculaire compris entre 45 et 180 kDa, un pH optimal d'activité de 5,5 à 7,5, et un point isoélectrique compris entre 4,40 et 4,55 (Kok, 1990 ; Kunji et al., 1996 ; Savijoki et al., 2006). La première étape de la caséinolyse est effectuée pour la croissance bactérienne. Ces dernières années, les connaissances concernant les protéases de paroi des LAB se sont considérablement accrues notamment grâce au développement des techniques de génétique et de biologie moléculaire. Cinq types différents de protéases de LAB ont été clonés et caractérisés : *prtP* de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*, *prtH* de *Lactobacillus helveticus*, *prtR* de *Lactobacillus rhamnosus*, *prtS* de *Streptococcus thermophilus*, et *prtB* de *Lactobacillus bulgaricus* (Savijoki et al., 2006). Chez les Lactocoques, la protéase de paroi est codée par un gène qui est situé sur un plasmide de grande taille. On trouve immédiatement en amont du gène *PrtP*, le gène *PrtM* qui code pour une lipoprotéine de l'enveloppe bactérienne importante pour la maturation de *prtP*. Le ratio d'autolyse dépend de la spécificité, de la localisation et de la quantité de *prtP* (Fernandez-Espla et al., 2000). La spécificité de coupure

des caséines par les protéases de la paroi a été étudiée chez différentes souches de Lactocoques et Lactobacilles en utilisant principalement les caséines comme substrat. L'utilisation de trois types de caséines (α_{S1} , β et κ) a conduit à une classification des protéases de paroi en deux classes principales PI et PIII. Les protéases PIII des lactocoques hydrolysent souvent les trois types de caséines mais à des vitesses différentes. Les protéases de type PI dégradent la caséine β qui est clivée en plus de 100 oligopeptides différents comprenant de 4 à 30 résidus d'acides aminés, et dans une moindre mesure la caséine κ . Kunji et al. (1996) ont classifié *prtP* en sept groupes (a, b, c, d, e, f, et g) selon leur spécificité pour l'hydrolyse de la caséine α_{S1} (le fragment 1-23).

Il est intéressant de noter que des protéases de la paroi n'appartenant pas à la famille des subtilisines ont été aussi identifiées chez quelques souches. Ainsi, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ACA-DC 235 synthétise une métalloprotéase. Les connaissances acquises sur les protéases de surface des LAB ont aussi engendré des applications potentielles dans le domaine de la santé. Les LAB sont des organismes non pathogènes qu'il serait possible d'utiliser comme vecteurs vaccinant pour délivrer un antigène au niveau d'une muqueuse (intestinale). Aussi, une protéine hybridée avec *prtB* est utilisée pour étudier et aider à la protection d'allergies alimentaires provoquées par les protéines du lait (Bernasconi et al., 2002).

1.3.2. Peptidases et acides aminés

Les peptidases sont classées en deux groupes majeurs :

A : Les endopeptidases qui clivent des liaisons peptidiques à l'intérieur des chaînes peptidiques.

B : Les exopeptidases qui nécessitent une extrémité libre et libèrent un ou deux acides aminés aux extrémités d'un peptide.

Pour les LAB, la majorité des exopeptidases sont des aminopeptidases qui libèrent des acides aminés de l'extrémité N-terminale de leur substrat.

Dans ces deux groupes, les peptidases sont classées en fonction de leur spécificité de substrat :

A : Aminopeptidases de large spécificité (*PepN*, *PepC*)

B : Dipeptidases (*PepD*, *PepV*)

C : Tripeptidases (*PepT*)

D : Autres aminopeptidases (*PepG*, *PepL*)

E : Peptidases spécifiques de la proline (*PepP*, *PepI*, *PepX*, *PepQ*, *PepR*)

F : Autres peptidases spécifiques (*PepA*)

G : Carboxypeptidases

H : Endopeptidases (*PepF*, *PepO*, *PepE*)

1.3.3. Transport des acides aminés et des peptides

La capacité des LAB à croître dans un milieu minimum ne contenant que des acides aminés libres comme source d'azote indique que ces microorganismes possèdent des transporteurs fonctionnels. Ils sont suffisamment efficaces pour assurer un rythme d'approvisionnement compatible avec les exigences nutritionnelles exprimées lors de la croissance. Les LAB (Lactocoques) possèdent au moins douze systèmes spécifiques, transportant des acides aminés structurellement proches (Tableau 2). Sur la base de leur dépendance énergétique, trois classes de transporteurs d'acides aminés peuvent être distinguées : celles gouvernées par l'hydrolyse de l'ATP, celles conduites par la force proton moteur, tandis que le contre-transporteur arginine/ornithine est conduit par le gradient de concentration des deux solutés.

Tableau (2) : systèmes de transports d'acides aminés identifiés chez les bactéries lactiques (Kunji et al., 1996)

Transporteur (moteur énergétique)	Acides aminés transportés
Perméase (force proton-motrice)	Alanine, Glycine
	Thréonine, Sérine
	Isoleucine, Leucine, Valine
	Tyrosine, Phénylalanine
	Méthionine
	Histidine
	Lysine
ABC-transporteur (hydrolyse de l'ATP)	Glutamine, Glutamate
	Asparagine
	Proline, Glycine-bétaïne
Contre-transporteur (gradient de concentration)	Arginine / Ornithine
	Glutamate / γ -aminobutyrate

Les peptidases des LAB sont toutes localisées dans le cytoplasme. Le transport de peptides dépend soit de la force proton-motrice, soit de l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs des di- et tripeptides sont classiquement opposés aux transporteurs d'oligopeptides. L'avancée des connaissances concernant le transport de peptides chez d'autres LAB, en particulier *Streptococcus thermophilus* remet en cause cette classification, du moins à l'échelle des LAB. Il a été suggéré que le système de transport d'acides aminés de *Lactobacillus helveticus* est semblable à celui de *Lactococcus lactis*, parce que le mécanisme de séquestration est identique pour les mêmes acides aminés. L'activité des peptidases, en dehors de la libération d'acides aminés importants pour la nutrition azotée, conduit à hydrolyser des peptides amers, et à fournir des petits peptides précurseurs de composés aromatiques (Savijoki et al., 2006).

Le lait renferme peu d'acides aminés sous forme libre. Parmi eux, certains sont en concentration très nettement insuffisante pour satisfaire aux exigences nutritionnelles des LAB. Par ailleurs, dans le lait, les protéases de la paroi semblent ne libérer des peptides qu'à partir des caséines, de sorte que ce sont *a priori* les systèmes de transport de peptides qui doivent assurer la grande majorité de l'approvisionnement intracellulaire en azote. Les études menées chez *Lactococcus lactis* MG1363 ont effectivement confirmé que le système OPP jouait un rôle nutritionnel primordial, étant le seul transporteur de la bactérie capable d'assurer l'approvisionnement en substrats azotés. Le transporteur DPP semblerait impliqué dans l'internalisation de peptides à activité régulatrice, tandis que la fonction du transporteur DtpT n'est pas clairement établie (Kunji et al., 1996 ; Christensen et al., 1999). Chez *Lactococcus lactis* IL1403, l'inactivation du transporteur OPT, seul transporteur fonctionnel d'oligopeptides, affecte très fortement la croissance de la souche dans le lait (Lamarque et al., 2004). Donc, les transporteurs de peptides jouent un rôle essentiel pour l'approvisionnement nutritionnel des LAB.

1.4. Allergie

Les allergies alimentaires représentent un important problème de santé publique. En 1586, Maecello Donati décrit le cas d'un jeune comte qui développait un angio-œdème chaque fois qu'il consommait des œufs. En 1698, dans son traité de l'asthme, Sir John Floyer cite le cas d'un habitant du Comté de Warwick qui se croyait atteint d'asthme par allergie à des fruits consommés en Espagne. Relativement confidentielles autour des années 1970-1980, les allergies étaient presque toujours liées aux mêmes allergènes (lait de vache, œuf de poule et poissons) (Dutau & Rancé 2006). Les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes

chez les enfants des pays industrialisés. La prévalence de l'allergie alimentaire dans la population générale atteint, enfants et adultes confondus, de 1,4 à 1,8% d'après une enquête anglaise, 4% aux États-Unis, 3,24% dans une enquête française et jusqu'à 8% des enfants de moins de trois ans (Dupont & de Boissieu 2005). La description du premier cas certain d'allergie IgE-dépendante au lait de femme est très récente : le patient allergique était le mari qui présentait des symptômes d'allergie cutanée immédiate au moindre contact avec le lait de son épouse lorsque celle-ci nourrissait leur bébé. Dutau & Rancé (2006) rapportent l'observation d'un nourrisson porteur d'un eczéma par allergie au lait de vache, qui, ultérieurement, présentera deux crises d'urticaire après consommation d'hydrolysate de protéines du lait. La particularité de l'histoire clinique est le décalage entre le début clinique (ou l'exploration allergologique n'était pas contributive) et l'apparition retardée, un an plus tard, de tests d'hypersensibilité IgE-dépendante positifs. La littérature mentionne des réactions d'intolérance aux hydrolysats avec une variabilité de 1 à 10%, soit par présence de peptides de poids moléculaire supérieur à 5000 dalton, soit par allergie vraie avec mise en évidence d'IgE contre ces formules. Selon Pétrus et al. (2006) l'allergie aux protéines de lait de vache est la cause la plus fréquente des allergies alimentaires chez le nourrisson. Elle représente entre 3 et 7% des observations pédiatriques. Chez l'enfant, elle représente 12,6% des allergies et occupe la troisième position après l'arachide et l'œuf. Les principales protéines allergisantes du lait sont les caséines (représentant 80% des protéines du lait) et les protéines du lactosérum (alpha-lactalbumine, bêta-lactoglobuline, sérum albumine). Les caséines sont les protéines les plus fortement allergisantes du lait et de ses dérivés (fromage). Elles sont également impliquées dans les réactions allergiques croisées, observées entre le lait de différentes espèces. Selon Attou et al. (2005), l'allergie aux protéines du lait est fréquente chez le nourrisson et le jeune enfant, mais elle peut également apparaître à l'âge adulte. Chatchatee et al. (2001), ont pu montrer que les épitopes reconnus au niveau de la caséine α_{S1} étaient différents selon que les sérums étudiés provenaient de sujets ayant une allergie au lait en bas âge (< 3 ans), ou une allergie persistante au-delà de 9 ans. En ce qui concerne la spécificité des IgE vis-à-vis des caséines α_S de trois ruminants (vache, chèvre et brebis) Baring et al. (2005) ont montré que des différences restreintes dans la structure primaire des caséines de différents espèces animales pouvaient être responsables de spécificités IgE et IgG différentes, mais ils relèvent également par des expériences d'inhibition, l'existence de sensibilisations croisées fréquentes. A la fin des années 1990, les symptômes directement liés aux allergies alimentaires ont été précisés en France sur plus de 500 observations. Plusieurs études ont démontré que certains nouveau-nés et les nourrissons pouvaient se sensibiliser

pendant la vie intra-utérine ou via le lait maternel qui recèle de nombreux allergènes comme, en particulier, l'arachide, la β -lactoglobuline, ou des allergènes de végétaux, ce qui explique la survenue de symptômes cliniques lors de la toute première exposition à l'allergène (Dutau & Rancé 2006).

1.4.1. Définition et mécanismes de l'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire est reconnue comme une réaction immunologique vis-à-vis d'un aliment ou d'un composant d'un aliment normalement bien toléré (habituellement une protéine d'origine alimentaire). La classification retenue dans notre document a été proposée en 1975 par Coombs & Gell décrivant quatre classes, basée sur le mécanisme immunologique. Les classes I à III sont liées aux anticorps alors que la réaction de type IV est cellulaire.

Allergie de Type I : responsable de la réaction de type I peut-être IgE médiée ;

Allergie de Type II (cytotoxiques) : le mécanisme évoqué est la liaison d'un antigène avec une membrane cellulaire et le rôle possible d'IgG et d'IgM activant le complément ;

Allergie de Type III : la constatation d'IgG et d'IgM anti-lait de vache reste actuellement sans signification. L'existence de complexes immuns circulant n'a qu'une faible valeur diagnostique. Après provocation par le lait de vache, on n'a jamais constaté de modifications significatives du complément ou des fractions ;

Allergie de Type IV : à médiation cellulaire ou non anticorps. Les haptènes sont des molécules de faible poids moléculaire (moins de 1 kDa). Le rôle des lymphocytes T est très probable mais encore mal précisé dans les réactions cutanées ou gastro-intestinales.

D'une façon générale, le mécanisme de l'allergie alimentaire IgE médiée se décompose en deux étapes : la sensibilisation et la réaction allergique (Eigenmann, 2009).

Tableau (3): Un glossaire des termes liés à l'allergie (Hayakawa et al., 1999)

Allergie	Initialement définie comme une réaction modifiée lors du contact secondaire avec un antigène ; actuellement, désigne en général une réaction d'hypersensibilité de type I
Anticorps	Molécule produite lors du contact avec un antigène et fixant ce dernier
Antigène	Molécule déclenchant une réponse immunitaire spécifique ou réagissant avec des composants cellulaires lors d'une réponse immunitaire déjà induite. Les antigènes sont en général des protéines et d'autres réactifs de poids moléculaire important
Anopie	Manifestation clinique d'une réaction d'hypersensibilité de type I avec eczéma, asthme et rhinite
Épitope	Déterminant antigénique individuel interagissant avec le paratope de l'anticorps
Paratope	Site d'un anticorps qui permet le contact avec le déterminant antigénique (épitope)
Allergène	Molécule capable d'induire et de se lier à des anticorps de type IgE
L'histamine	Une amine libérée en grandes quantités par les mastocytes
Aliments hypoallergéniques	Aliments modifiés par voie chimique, enzymatique ou génétique possédant une allergénicité inférieure à la normale
IgE	Une classe spécifique d'immunoglobulines sécrétées par les cellules B, se liant à des récepteurs spécifiques sur les mastocytes. La réaction allergique la plus commune est médiée par les IgE
IgG	L'une des cinq classes de molécules d'anticorps, les immunoglobulines IgA, IgD, IgE, IgG et IgM
Les mastocytes	Les cellules du tissu du système immunitaire qui libèrent, par exemple, l'histamine

1.4.2. Principaux allergènes alimentaires

Dans le monde, plus de 90% des allergies alimentaires sont causés par 10 catégories de produits : les céréales (orge, sarrasin, riz, seigle, blé), le lait (lait de vache, etc.), les crustacés (crabe, langouste, homard, crevettes, etc.), les œufs, les poissons (morue, aiglefin, saumon, truite, etc.), les fruits et baies (pomme, banane, goyave, kiwi, papaye, pêche, fraise), les épices (cannelle, moutarde, etc.), les mollusques (palourdes, huîtres, pétoncles, calmars,

etc.), les coques (amandes, noix du Brésil, noisette, pistache, noix) et les légumes (céleri, pommes de terre, tomates) (Hayakawa et al., 1999). Le Tableau (4) montre les allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et chez l'adulte (Moneret-Vautrin, 2008).

Tableau (4) : Allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et chez l'adulte (données du CICBAA) (Moneret-Vautrin, 2008)

	0-1 an 147 enfants (%)	1-3 ans 359 enfants (%)	3-15 ans 468 enfants (%)	Adultes 287 (%)
Œufs	77,5	69,6	24,3	6,3
Lait	29,2	25,6	7	3,5
Arachide	19,7	37,6	49,3	10,1
Fruits et baies	2,7	4,4	10,2	15,7
Légumineuses	0,6	4,4	13,4	5,9
Poissons	0,6	5	10	3,1
Prunoïdées	0	0	0	31,3
Avocat, banane, châtaigne, kiwi	0,6	1,3	5,3	22,6
Apiacées	0	0	1,7	16,4
Blé, céréales	6,1	6,4	2,7	13,2

Les observations enregistrées dans la base de données du Cercle d'Investigations Cliniques et Biologique en Allergie Alimentaire (CICBAA) correspondent aux critères diagnostiques établis par le groupe de travail de l'Académie européenne d'allergologie et d'immunologie clinique.

Le lait et l'œuf sont les deux principaux allergènes chez l'enfant de moins d'un an. Au-delà de trois ans l'arachide est le premier allergène alors que l'allergie au lait et à l'œuf ont considérablement décru. Les légumineuses et les fruits à coques sont bien représentés. Chez l'adulte, les allergies prédominantes sont dues aux fruits prunoïdées, au céleri, aux fruits du groupe latex, aux fruits à coques et au blé (Tableau 4) (Moneret-Vautrin, 2008). Au point de vue socio-économique, les régimes d'éviction sont très contraignants pour les patients atteints d'allergie au lait et entraînent une réduction importante du nombre de produits consommables (INC, 2004). De nombreux cas d'allergies ont été rapportés à la suite de l'ingestion de différents fromages au lait de vache, de chèvre ou de brebis (Umpierrez et al., 1999 ; Besler et al., 2001).

1.4.3. L'allergie aux protéines du lait

La définition de l'allergie au lait est réservée aux réactions anormales reproductibles vis-à-vis d'une ou de plusieurs protéines de ce lait après confirmation par une réaction immunologique spécifique. Considérée comme très rare avant 1950, l'allergie au lait de vache atteint dans les régions développées une fréquence insoupçonnée qui pourrait concerner, voire dépasser 10% des nourrissons avec une certitude démontrée chez plus de 5% des enfants (Paupe et al., 2001, Dupont et al., 2011).

1.4.3.1. Les allergènes du lait de vache

Le lait est une des sources des principaux nutriments. Le lait de vache est constitué en majorité d'eau (84-86 %). La matière sèche comprend des glucides, principalement sous forme de lactose, de la matière grasse en émulsion, de la matière azotée et des sels minéraux. Les protéines du lait de vache se répartissent en deux groupes : les caséines (80%) et le lactosérum (20%) [β -lactoglobuline (9%), α -lactalbumine (4%), sérum albumine (1%), lactoferrine]. Les protéines du lait sont les premiers nutriments exogènes consommés en grande quantité par les nourrissons. Mais certains enfants sont allergiques à ces protéines. L'allergie s'observe chez environ 75% des malades allergiques au lait de vache (caséines et bêta-lactoglobuline) avec une grande variabilité de la réponse IgE selon sa spécificité et son intensité (Ponvert, 2009).

Les protéines alimentaires de poids moléculaire élevé sont absorbées par la muqueuse intestinale, et la formation d'anticorps contre les protéines du lait de vache est une réponse physiologique normale. Dans chaque allergène, les régions spécifiquement reconnues par l'IgE sont nombreuses et largement réparties le long de la molécule protéique. La structure tridimensionnelle est une caractéristique importante de l'allergénicité du lait de vache, mais, outre les épitopes conformationnels, les études de liaison des IgE montrent aussi la présence d'épitopes séquentiels. Cependant, ces épitopes allergéniques, lorsqu'ils ont été caractérisés, sont souvent localisés dans les parties hydrophobes de la molécule, inaccessibles aux anticorps dans la conformation initiale de la protéine. Les épitopes linéaires sont des peptides de taille variable, dépendant de la méthode utilisée pour les isoler et les purifier, mais chez certains patients des peptides d'une petite taille de 12 à 14 résidus d'acides aminés ont été caractérisés pour leur responsabilité dans une part importante de l'allergénicité de la molécule (Paupe et al., 2001 ; Ponvert 2009).

L'allergénicité dépend du nombre d'épitopes et de leur composition en acides aminés. Les épitopes conformationnels (acides aminés rapprochés dans la structure tertiaire de la protéine) sont reconnus par les IgE, alors que les épitopes linéaires (acides aminés adjacents dans la structure secondaire) sont reconnus par les récepteurs sur les lymphocytes T (TCR) (Lifrani, 2006).

1.4.3.2. Structure des allergènes

1.4.3.2.1. Les épitopes

Les protéines allergéniques ont une structure tridimensionnelle (3 D) caractéristique de l'allergénicité. Au niveau moléculaire, elles sont constituées d'une multitude de structures antigéniques immuno-réactives, les épitopes, largement répartis sur toute la molécule et susceptibles de réagir avec les acteurs du système immunitaire : immunoglobulines, lymphocytes B et T. Cependant, il n'y a pas de région ou de structure spécifique qui serait responsable de l'allergénicité. Les épitopes sont hétérogènes. Il existe des épitopes immuno-dominants qui réagissent avec 50% des patients sensibilisés. La sensibilisation aux divers épitopes d'un allergène diffère d'un individu à l'autre et la diversité des récepteurs IgE des patients est très grande.

1.4.3.2.1.1. Classification des épitopes :

La plupart des épitopes sont de nature peptidique et se répartissent en deux groupes : les épitopes discontinus ou conformationnels et les épitopes continus ou séquentiels appelés aussi épitopes linéaires.

Les épitopes conformationnels sont liés à la structure de la protéine dans son état tridimensionnel natif. Ces structures tridimensionnelles, responsables de l'allergénicité sont formées par le rapprochement d'acides aminés éloignés et sont responsables de l'activation des lymphocytes B. Les IgE spécifiques des épitopes discontinus ont une plus forte affinité que les IgE spécifiques des épitopes continus (Lifrani, 2006).

Les épitopes linéaires sont constitués de séquences peptidiques de 5 à 10 acides aminés le long de la séquence. L'immuno-réactivité de ces épitopes est due au seul enchaînement des résidus d'acides aminés. Ils activent les lymphocytes T. Certains épitopes concernent aussi des molécules liées à l'allergène, les déterminants carbohydrates (CCD :

carbohydrate cross-reacting determinants). Les CCD sont des chaînes glucidiques (glycanes) portées par des glycoprotéines. Les CCD sont immunogènes.

1.4.3.2.2. Les haptènes

Ce sont généralement des substances de faible masse moléculaire, incapables de susciter par elles-mêmes la réaction immunitaire, mais pouvant devenir immunogènes et acquérir les propriétés d'un véritable antigène grâce aux molécules porteuses (couplage avec une protéine qui leur sert de support, ou par adsorption à la surface de particules en suspension). Dans ces conditions, l'haptène devient souvent le déterminant antigénique dominant de la molécule. S'il est incapable d'induire la formation des anticorps, il peut toutefois réagir avec eux et déclencher des réactions allergiques (Lifrani, 2006).

1.4.3.3. Les protéines majeures du lait présentant des propriétés allergéniques

1.4.3.3.1. Les caséines

Les caséines ont été définies à l'origine comme des phosphoprotéines qui précipitent à partir du lait cru par acidification à pH 4,6 à 20 °C. Les caséines sont composées de quatre phosphoprotéines : les caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ présentes respectivement dans les proportions 40 :10 :40 :10 (Farrell et al., 2004 ; Cerecedo et al., 2008).

1.4.3.3.1.1. La caséine α_{S1}

La caséine α_{S1} est l'un des principaux allergènes responsables de l'allergie au lait de vache. La chaîne polypeptidique de la caséine α_{S1} est composée de 199 acides aminés et sa masse moléculaire est de 23614 Da. La caséine α_{S1} est caractérisée par un haut contenu de résidus de proline distribués sur l'ensemble de la molécule et une absence de liaison disulfure, conduisant à une structure tertiaire réduite. Ces caractéristiques augmentent la probabilité que les épitopes allergènes majeurs de cette protéine soient linéaires plutôt que conformationnels (Cocco et al., 2003). De nombreux chercheurs ont étudié les épitopes de la caséine α_{S1} responsables de l'allergie :

Spuerger et al. (1996) : AAs 19-30, AAs 93-98 et AAs 141-150 ;

Chatchatee et al. (2001) : AAs 17-36, AAs 39-48, AAs 69-78, AAs 83-102, AAs 109-120, AAs 123-132, AAs 139-154, AAs 159-174 et AAs 173-194 ;

Cocco et al. (2003) : AAs 89-102 ;

Elsayed et al. (2004) : AAs 1-18, AAs 16-35, AAs 67-85, AAs 91-110, AAs 136-155, AAs 152-169 et AAs 166-183 ;

Cerecedo et al. (2008) : AAs 28-50 ;

Lin et al. (2009) : AAs 49-62.

1.4.3.3.1.2. La caséine α_{S2}

La caséine α_{S2} est composée de 207 acides aminés et renferme 10 à 13 groupements phosphate. Sa masse moléculaire de 25230 Da varie en fonction du degré de phosphorylation. La caséine α_{S2} contient moins de proline que les autres caséines. Cerecedo et al. (2008) ont étudié les épitopes responsables de son allergie et ont trouvé les séquences suivantes : AAs 1-20, AAs 13-32, AAs 67-86 et AAs 181-207 ; Lin et al. (2009) ont trouvé la séquence AAs 69-77.

1.4.3.3.1.3. La caséine β

La caséine β est constituée de 209 acides aminés dont 5 résidus phosphoséryle situés du côté N-terminal ; elle a une masse moléculaire de 23983 Da. La caséine β polymérise à température ambiante, alors qu'à 4 °C la molécule demeure sous forme monomérique. La présence de nombreux résidus prolyle régulièrement répartis tout au long de la chaîne polypeptidique impose à la caséine β de ne posséder que peu de structure secondaire ordonnée. Cependant, les résultats obtenus par dichroïsme circulaire montrent que la caséine β comporte environ 10% d'hélice α et 13% de feuillets β . Cerecedo et al. (2008) ont étudié les épitopes responsables de l'allergie à la caséine β et ont trouvé les fractions suivantes : AAs 25-50, AAs 52-74 et AAs 154-173 ; Lin et al. (2009) ont ajouté le peptide AAs 16-39.

1.4.3.3.1.4. La caséine κ

La caséine κ est une phospho-glyco-protéine de 169 résidus d'acides aminés et a une masse moléculaire de 19007 Da. En raison de la faible quantité de phosphosérine au niveau de sa structure primaire (un seul groupe), la caséine κ ne fixe que deux moles de calcium par mole de protéine à pH neutre. Cette caséine est insensible au calcium et stabilise les autres caséines phosphorylées vis-à-vis de ce cation. Elle possède aussi la propriété remarquable d'être hydrolysée par la présure (chymosine), protéase acide à aspartate sécrétée par l'abomasum du jeune veau : une seule liaison peptidique est préférentiellement rompue, la

liaison Phe105-Met106. La caséine κ renfermerait 23% d'hélice α et 31% de feuillets β . Cerecedo et al. (2008) ont étudié les épitopes responsables de l'allergie à la caséine κ et ont trouvé la séquence AAs 34-53.

1.4.3.4. Les protéines majeures du lactosérum

Les protéines du lactosérum représentent environ 20% des protéines totales du lait. Deux protéines sont majoritaires : la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine qui représentent respectivement 45% et 20% des protéines du lactosérum. Les autres protéines présentes sont la sérum albumine qui provient du sang, des immunoglobulines, la lactoferrine.

1.4.3.4.1. La β -lactoglobuline et ses caractéristiques allergéniques

La β -lactoglobuline (BLG) est la principale protéine du lactosérum du lait de vache et aussi l'une des protéines du lait les plus étudiées pour ses propriétés allergéniques. La BLG possède 162 résidus d'acides aminés, renferme 2 ponts disulfure ainsi qu'une fonction thiol libre et sa masse moléculaire est de 18400 Da. La BLG se présente dans le lait sous forme de dimères de 36 kDa. Plusieurs variants génétiques ont été mis en évidence (12 au total). Cependant, les plus couramment présents dans le lait de vache sont les variants A et B retrouvés en proportions égales (Ochirkhuyag, 1999). De nombreux chercheurs ont étudié les épitopes responsables de l'allergie à la BLG et ont décrit les peptides suivants :

Sélo et al. (1999) : AAs 1-8, AAs 9-14, AAs 25-40, AAs 41-60, AAs 84-91, AAs 92-100, AAs 102-124 et AAs 149-162 ;

Sharma et al. (2001) : AAs 48-55 ;

Prioult et al. (2005) : AAs 41-60, AAs 102-124, AAs 149-162 ;

Cerecedo et al. (2008) : AAs 58-77 ;

Lin et al. (2009) AAs 106-119 ;

Pescuma et al. 2011 : AAs 41-60, AAs 102-124, AAs 149-162.

1.4.3.4.2. L' α -lactalbumine et ses caractéristiques allergéniques

L' α -lactalbumine bovine est une métallo-protéine composée de 123 résidus d'acides aminés, de masse moléculaire 14400 Da et comportant 4 ponts disulfure (Ochirkhuyag, 1999). Sharma et al. (2001) ont étudié les épitopes responsables de l'allergie à l' α -lactalbumine et ont trouvé le peptide AAs 42-49.

1.5. Bactériocines de bactérie lactiques

Les LAB sont utilisées depuis longtemps de façon consciente ou non pour leur activité antimicrobienne. Les produits alimentaires ayant subi une maturation faisant intervenir les LAB, comme les produits laitiers, sont protégés contre la plupart des contaminations microbiennes ultérieures. Cette propriété est le résultat de la production par les LAB de nombreuses molécules antimicrobiennes comme les acides organiques (acides lactique et acétique), le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Les bactériocines sont définies comme étant des molécules de nature protéique ou peptidique, synthétisées par voie ribosomale par des bactéries et présentant une action antimicrobienne contre des souches distinctes de la souche productrice (Morisset et al., 2005). Leur activité peut-être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps mais la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988). Il définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu & Thonart, 2009). Différentes classifications de bactériocines ont été établies sur la base de leur séquence, de leur masse moléculaire ou de leur stabilité à la chaleur. La classification retenue dans notre document a été proposée en 1993 par Klaenhammer décrivant quatre classes de bactériocines, puis modifiée par trois classes dans les dernières années (Nes et al., 1996 ; Ennahar et al., 1999). Récemment, Zouhir et al. (2010) ont proposé une nouvelle classification basée sur la structure qui regroupe les bactériocines en 12 classes.

Tableau (5) : Classification des bactériocines de bactéries lactiques

Classes	Sous-classes
I : Lantibiotiques	Groupe Nisine
	Groupe Lacticine 481
	Groupe Lacticine S
	Groupe à 2 composants
II : Bactériocines non-modifiées, thermostables	Classe IIa : anti-Listeria
	Classe IIb : bactériocines à deux composants
	Classe IIc : autres bactériocines
III : Bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur	Groupe Helvéticine J
	Groupe Lacticine A

1.5.1. Classe I : Lantibiotiques

1.5.1.1. Caractéristiques

Il s'agit de peptides de taille réduite (< 5 kDa), stables à la chaleur, renfermant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine. A cause de la présence de ce type d'acides aminés, les bactériocines de classe I ont été nommées lantibiotiques. Il existe deux types de lantibiotiques, type A (lantibiotiques linéaires) et type B (lantibiotiques globulaires).

1.5.1.2. Sous-classes des lantibiotiques de type A :

Les lantibiotiques linéaires et cationiques structurés contenant jusqu'à 34 acides aminés, en hélice α , amphiphile et de masse moléculaire < 4 kDa. Ces bactériocines sont principalement synthétisées par les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et également par des genres n'appartenant pas aux LAB comme *Staphylococcus* ou *Bacillus*. Les membres les plus étudiés de cette classe sont la nisine produite par *Lactococcus lactis*. La nisine a une action contre un certain nombre de bactéries à Gram positif (*Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Mycobacterium*). La nisine semble utiliser deux modes d'action en fonction de sa concentration dans le milieu (McAuliffe et al., 2001).

1.5.1.3. Sous-classes des lantibiotiques de type B : Les lantibiotiques de type B sont des peptides (19 acides aminés) de 1,8 à 2,1 kDa adoptant une structure globulaire plus rigide que celle des peptides de type A et présentant une charge globalement nulle ou négative (Sahl et Bierbaum 1998 ; McAuliffe et al., 2001 ; Twomey et al., 2002).

Certains lantibiotiques comme la cytolysine (*Enterococcus faecalis* DS16) (Gilmore et al., 1994), la lacticine 3147 (*Lactococcus lactis* DPC3147) (Ryan et al., 1999) et la plantaricine W (*Lactobacillus plantarum* W) (Holo et al., 2001) ont deux composants.

1.5.2. Classe II : Peptides non modifiés

1.5.2.1. Caractéristiques

La classe II est constituée de peptides de masse moléculaire < 10 kDa. Ces bactériocines sont thermostables et ne subissent pas de modification post-traductionnelle. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Elles agissent principalement en perméabilisant la membrane de la cellule cible (Héchard & Sahl, 2002). Cette classe est la plus largement représentée avec plus de 50 bactériocines ; elle est divisée en trois sous-classes (IIa, IIb et IIc).

1.5.2.2. Sous-classe IIa

1.5.2.2.1. Caractéristiques

La sous-classe IIa regroupe des peptides (27 à 48 acides aminés) ayant une structure similaire et généralement une activité contre *Listeria monocytogenes*. Ce type de bactériocines est semblable à la pédiocine et présente une séquence N-terminale conservée YGNGVxCxxxxCxV. La sous-classe IIa présente une partie N-terminale hydrophobe et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006). Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire (Dortu & Thonart, 2009). Actuellement, 27 bactériocines de sous-classe IIa produites par des LAB ont été décrites. La sakacine P (*Lactobacillus sakei* LTH674), la curvacine A (*Lactobacillus curvatus* LTH1174), l'entéroccine P (*Enterococcus faecium* P13), l'entéroccine A (*Enterococcus faecium* DPC1146), la lactococcine MMFII (*Lactococcus lactis* MMFII), la bactériocine 31 (*Enterococcus faecalis* YI717) et la pédiocine PA-1 (*Pediococcus acidilactici* PAC 1.0) sont quelques exemples de

cette sous-classe IIa (Klaenhammer, 1993 ; Aymerich et al., 1996 ; Cintas et al., 1997 ; Ennahar et al., 2000).

1.5.2.2.2. Mode d'action

La plupart des études relatives au mode d'action des bactériocines concerne celles de la sous-classe IIa. Ces bactériocines ont un spectre d'activité relativement faible, limité à *Listeria*, quelques LAB, comme *Enterococcus* et *Lactobacillus*, et certains *Clostridium*. Pour toutes les bactériocines de sous-classe IIa dont le mode d'action a été étudié, celui supposé est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit sa perméabilisation, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dalet et al., 2000 ; Héchard et al., 2001 ; Gravesen et al., 2002 ; Arous et al., 2004 ; Vadyvaloo et al., 2004 ; Bauer & Dicks, 2005). Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine entre elles (Ennahar et al., 2000 ; Fimland et al., 2000 ; Diep et al., 2007).

1.5.2.3. Sous-classe IIb

1.5.2.3.1 Caractéristiques

La sous-classe IIb regroupe les bactériocines à deux composants peptidiques ayant une masse moléculaire inférieure à 10 kDa et un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40. L'activité optimale dépend de l'action conjuguée des deux peptides. Ces peptides peuvent être soit actifs individuellement, mais ils agissent de façon synergique quand ils sont associés (comme les entérocin L50A/L50B), soit inactifs individuellement. Les deux peptides sont très différents dans leur séquence. L'entérocin L50 (A et B) (*Enterococcus faecium* L50), l'entérocin B (*Enterococcus faecium* T136/C492 et BFE900), l'acidocine J1132 (*Lactobacillus acidophilus* JCM1132), l'entérocin Q (*Enterococcus faecium* L50), la bactériocine AS-48 (*Enterococcus faecalis*) et la lactococcine A/B (*Lactococcus lactis*) sont quelques exemples de la sous-classe IIb (van Belkum et al., 1991 ; Tahara et al., 1997 ; Floriano et al., 1998 ; Cintas et al., 2000).

1.5.2.3.2. Mode d'action

Les bactériocines de sous-classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram⁺. Les bactériocines de la sous-classe IIb agissent en dépolarisant et en perméabilisant la membrane plasmique de la cellule cible. La plupart des

études montre une dissipation de la force proton motrice et une dissipation du ΔpH ainsi qu'une fuite d'ions potassium (Moll et al., 1999 ; Castellano et al., 2003). Ces éléments tendent à penser que ces bactériocines forment des pores au niveau de la membrane cible. De plus, une étude portant sur la lactococcine G a montré qu'elle était inactive sur les liposomes, suggérant qu'une molécule d'ancrage à cette bactériocine est nécessaire à son activité (Morgan et al., 2005). La lactococcine G est produite par *Lactococcus lactis* et est active contre diverses LAB et certaines souches de *Clostridium*. Cette bactériocine dissipe le potentiel de membrane alors qu'elle n'a pas d'effet sur le pH (Nissen-Meyer et al., 1992). Ceci suggère qu'elle soit capable de former des pores imperméables aux protons. En revanche, cette étude a montré un flux important de potassium et d'autres cations monovalents. La lactococcine G induit une fuite d'acides aminés. La concentration d'ATP intracellulaire est également fortement diminuée (Moll et al., 1996). Une étude a montré par spectrophotométrie infrarouge par transformation de Fourier, que les deux peptides de la lactocine 705 (peptides α et β) interagissaient avec une membrane composée de dipalmitoyl-phosphatidylcholine. Le peptide interagissait avec la surface de la membrane plasmique et le peptide β avec la partie hydrophobe et pourrait ainsi former un oligomère transmembranaire ayant une action sur la perméabilité membranaire. L'activité de la lactocine 705 est potentiel-dépendante et elle provoque une fuite d'ions K^+ et de P_i illustrant sa capacité à former des pores dans les membranes (Castellano et al., 2007).

Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités α et β est en général de 1:4 pour la lactocine 705. La sous-unité Lac705 β augmente l'action inhibitrice d'un surnageant dilué de *Lactobacillus casei* CRL705 et la sous-unité Lac705 α protège les cellules de *Lactobacillus plantarum* CRL691 de l'inhibition. Les deux peptides sont nécessaires pour dissiper la force protons motrice ($\Delta\psi$ et ΔpH) de *Lactobacillus plantarum* CRL691. Ces données suggèrent que des deux composants de la lactocine 705, le peptide Lac705 α est responsable de la reconnaissance du récepteur, et le peptide Lac705 β est le composant actif de la membrane cellulaire de *Lactobacillus plantarum* CRL691 (Cuozzo et al., 2003).

1.5.2.4. Sous-classe IIc

1.5.2.4.1 Caractéristiques

La sous-classe IIc regroupe des peptides variés. Elle était initialement réservée par Klaenhammer (1993) aux bactériocines activées par réduction de groupes thiols, dont le représentant est la lactococcine B. Cependant, il a été depuis montré que la réduction d'un

groupe thiol n'était pas indispensable à l'activité antimicrobienne de cette bactériocine (Venema et al., 1996). Les bactériocines de la sous-classe IIc sont cationiques. La classification actuelle définit les bactériocines de sous-classe IIc comme étant les bactériocines n'ayant pas toutes les caractéristiques des sous-classes IIa et IIb (Hécharde & Sahl, 2002).

1.5.2.4.2. Mode d'action

Ces bactériocines sont très différentes du point de vue structural, il n'est donc pas surprenant que leur mode d'action le soit aussi comme le montrent les exemples suivants. La lactococcine A est l'une des premières bactériocines dont le mode d'action a été étudié. Cette bactériocine, sécrétée par *Lactococcus lactis*, provoque une dissipation du potentiel de membrane et la sortie d'acides aminés dans le milieu extra cellulaire. Cette bactériocine formerait des pores au niveau de la membrane plasmique et serait dépendante d'une protéine réceptrice, car elle ne présente pas d'activité envers les liposomes formés à partir de phospholipides de *Lactococcus* (van Belkum et al., 1991). Ce dernier résultat a conduit les auteurs à proposer que cette bactériocine a besoin d'une molécule associée à la membrane pour être active. Ce besoin est en accord avec son spectre d'action très étroit. La lactococcine 972, est un homodimère d'un peptide de 66 résidus d'acides aminés et sécrété par *Lactococcus lactis* IPLA972 (Martinez et al., 1996). La lactococcine 972 n'agit pas sur la perméabilisation de la membrane mais inhibe un précurseur de la paroi, la N-acétylglucosamine, entraînant une malformation pariétale. Cette bactériocine inhibe aussi la formation du septum, nécessaire à la division cellulaire ; le traitement par la lactococcine 972 aboutit également à une augmentation du volume de la cellule (Mazotta & Montville, 1997).

1.5.3. Classe III : Protéines

1.5.3.1. Caractéristiques

Les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille. Il s'agit de protéines dont la masse moléculaire est supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La plupart d'entre-elles sont produites par le genre *Lactobacillus* comme l'helvéticine J produite par *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger & Klaenhammer, 1990), la lacticine B produite par *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot & Klaenhammer, 1984) et l'enterolysine A produite par *Enterococcus faecium* (Nilsen et al., 2003).

1.5.4. Classe IV : Bactériocines complexes

1.5.4.1. Caractéristiques

Les bactériocines de classe IV étaient définies comme des protéines associées à une composante non protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique, nécessaire à leur activité biologique. La plantaricine S, par exemple, possède une activité antimicrobienne sensible à des enzymes lipolytiques et glycolytiques (Jimenez-Diaz et al., 1993).

1.5.5. Les applications des bactériocines dans les produits alimentaires

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ*. Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique.

1.5.5.1. Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées

Elles sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Aujourd'hui, la nisine est la seule bactériocine ayant reçu l'acceptation de nombreux pays pour être utilisée en préservation alimentaire et acceptée comme additif alimentaire (E234) (Schillinger et al., 1996 ; Ennahar et al., 1999 ; Guinane et al., 2005).

1.5.5.2. Immobilisation des bactériocines sur les cellules productrices

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films tel que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (Luchansky, & Call, 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Ghalfi et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

1.5.5.3. Application de la bactérie productrice de bactériocines

L'utilisation des bactéries productrices de bactériocines peut être intéressante tant au niveau législatif qu'économique. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La composition du produit et les conditions de stockage doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines. La concentration en molécule inductrice doit être suffisante, son interaction avec la matrice alimentaire peut donc être un facteur limitant.

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être utilisées en combinaison avec un autre starter utilisé pour conférer les propriétés organoleptiques désirables. Dans ce cas, la bactérie productrice de bactériocine ne doit pas détériorer les qualités organoleptiques de l'aliment fermenté et la bactériocine produite ne doit pas avoir d'activité contre le starter (Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

Par ailleurs, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente favorable des aliments. Si celle-ci est sensible à la bactériocine, son déséquilibre pourra conduire à la croissance de microorganismes résistants aux bactériocines, pathogènes et/ou altérants avec des conséquences sanitaires et/ou organoleptiques défavorables. Les LAB (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*) productrices de bactériocines peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens pour empêcher la croissance de certaines bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae* (Schillinger & Lucke, 1989 ; Sarantinopoulos et al., 2002 ; Giraffa 2003 ; Leroy et al., 2003 ; Yamamoto et al., 2003 ; Labioui et al., 2005 ; Batdorj et al., 2006 ; Foulquié Moreno et al., 2006 ; Klibi et al., 2008 ; Yoon et al., 2008 ; Renye et al., 2009 ; Ben Belgacem et al., 2010).

MATERIELS ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

Le lait écrémé en poudre, le Triton X-100, le peroxyde d'hydrogène à 3% ont été obtenus chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Les produits suivants provenaient de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) : glycérol, citrate de sodium, Tris, chlorure de potassium, milieu de Luria-Bertani (LB), ampicilline, vancomycine, ciprofloxacine, protéinase K, trypsine, α -chymotrypsine, catalase, α -amylase, lipase, dodécyl sulfate de sodium (SDS), acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), pefabloc SC (4 - (2-aminoéthyl) chlorhydrate de fluorure de benzènesulfonyl (AEBSF), acide trifluoracétique, acétate de sodium, chlorure de potassium (KCl), sodium phosphate dodécahydrate dibasiques ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), potassium dihydrogénophosphate très pur (KH_2PO_4), Tween 80, alcool polyvinylique, et 4-méthylumbelliferyl phosphate (4-MUP). Les milieux de culture MRS (de Man-Rogosa-Sharpe), M17 et BHI (Brain Heart Infusion) ont été obtenus chez Biokar (Beauvais, France). Agar, extrait de levure et dithiothréitol (DTT) ont été achetés chez Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France). Le chlorure de sodium, l'hydroxyde de sodium et la glycine ont été obtenus chez Panréac (Lyon, France). Le milieu YPD (extrait de levure-peptone-glucose) a été acheté chez Serva (St Germain en Laye, France). Le fournisseur d'acide chlorhydrique et d'acétonitrile était Carlo Erba (Val de Reuil, France) et le fournisseur d'antibiotiques (chloramphénicol, pénicilline, tétracycline et gentamicine) était Euromedex (Souffelweyersheim, France). La solution d'acrylamide 40% a été obtenue chez Fisher Bioreagents (New Jersey, USA). L'urée et le glucose provenaient de chez ACROS (New Jersey, USA) ; le 2-mercaptoéthanol et le bleu de Coomassie R250 étaient de chez Fluka (Allemagne). Tous les produits utilisés étaient de qualité analytique.

2.2. Échantillons de collection

Soixante-quinze échantillons de produits laitiers égyptiens ont été obtenus à partir des marchés locaux des villes égyptiennes suivantes : Alexandrie, Kafr El-Sheikh, Tanta et Damiette. Les fromages sont : Cheddar (fromage à pâte dure, coagulation enzymatique, maturation), Ras (fromage à pâte dure, coagulation enzymatique, maturation), Domiatti (fromage doux, coagulation enzymatique, salé et frais, pouvant être stocké) et Kareish (fromage doux, coagulation acide, légèrement salé) et le produit laitier fermenté étudié est le Laban rayeb (Tableau 6).

Tableau (6): Distribution des produits laitiers recueillis en Égypte

Ville	Produits Laitiers	Nombre d'échantillons
Alexandrie	Fromage Ras	5
	Fromage Cheddar	3
	Fromage Domiatti	5
	Fromage Kareish	3
	Laban rayeb	4
Kafr El-Sheikh	Fromage Ras	4
	Fromage Cheddar	3
	Fromage Domiatti	5
	Fromage Kareish	3
	Laban rayeb	3
Tanta	Fromage Ras	5
	Fromage Cheddar	3
	Fromage Domiatti	5
	Fromage Kareish	3
	Laban rayeb	4
Damiette	Fromage Ras	3
	Fromage Cheddar	3
	Fromage Domiatti	5
	Fromage Kareish	3
	Laban rayeb	3
Total		75

2.3. Isolement des isolats de LAB

Pour chaque échantillon de fromage, 10 g étaient pesés et dissous de façon stérile dans 90 ml de citrate de sodium (2%, p/p) et homogénéisés. Des dilutions décimales ont été réalisées dans une solution saline [0.9% NaCl (P/V)] jusqu'à 10^{-8} . Un millilitre de chaque dilution était placé sur milieu agar M17 (coques) et MRS (bacilles) avec le lait. Les plaques étaient incubées 48 h à 37 °C.

Pour chaque échantillon de lait Rayeb, 10 ml étaient pipetés de manière stérile dans 90 ml de solution saline [0.9% NaCl (p/v)] et mélangés. Des dilutions décimales ont été réalisées dans la même solution jusqu'à 10^{-8} . Un millilitre de chaque dilution était placé sur milieu agar M17 (coques) et MRS (bacilles) avec le lait. Les plaques étaient incubées 48 h à 37 °C. Les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies entre 30 et 300 étaient choisies pour la purification.

2.4. Identification des isolats de LAB

Après purification sur milieux MRS et M17, les isolats étaient examinés sous microscope puis testés pour leur coloration de Gram et leur activité catalase. Les cultures ont été rayées sur des supports appropriés pour leur purification. Les isolats purifiés ont été conservés à -20 °C dans le lait écrémé reconstitué stérile (12,5%, p/v) additionné de 30% (p/v) de glycérol.

2.4.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est la coloration la plus utilisée en bactériologie, permettant de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries. C'est une coloration différentielle qui permet de répartir les bactéries en deux groupes : les bactéries à Gram-positif fixent le cristal violet et apparaissent violettes et les bactéries à Gram-négatif ne fixent pas le cristal violet et apparaissent roses ; par contre, elles sont colorées par la safranine. Les LAB sont Gram-positives.

2.4.2. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la libération de molécules d'eau et d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène, molécule toxique pour les bactéries. Le test catalase permet une première orientation dans la classification d'une souche bactérienne pure. Les LAB sont dépourvues de catalase. Une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3% (v/v) est ajoutée sur une colonie placée sur une lame de microscope. La réaction est dite positive lorsqu'une effervescence est observée.

2.4.3. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S

L'ADN génomique des bactéries a été extrait par le kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) et utilisé comme matrice pour l'amplification du gène

ARNr 16S. La réaction PCR était réalisée dans un volume total de 50 µl contenant du tampon PCR (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8,4), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de chaque dNTPs, 1 U de Taq ADN polymérase (QIAGEN GmbH, Hilden, Allemagne), 1 µM de chaque amorce et 40 ng d'ADN dans un volume final de 50 µl. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide des amorces fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rd1 (5'-TAAGGAGGTGATCCAGGC3') construites selon la méthode de Weisburg et al. (1991). La réaction PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Techno Scientifiques Barloworld, Cambridge, UK) avec un programme de 35 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 56 °C pendant 1,15 min, (3) étape d'élongation à 72 °C pendant 1,15 min. Après ces 35 cycles, une étape finale à 72 °C pendant 5 min était réalisée. 3 µl de produit PCR étaient analysés sur un gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) dans un tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) pendant 30 min à 100 V et la lecture a été réalisée par Trans UV-éclairage. Le séquençage de l'ADN a été effectué par le service de séquençage de MilleGen (Labège, France).

2.5. Méthodes de détection de l'activité protéolytique

2.5.1. Test sur le lait écrémé UHT

Les différents isolats ont été réactivés deux fois par mélange de 50 µl de la pré-culture avec 950 µl de lait UHT écrémé de marque « Délishé » et incubation d'une nuit à 37 °C. Le mélange a été dilué au 1/10 (v/v) dans du tampon échantillon contenant 4% de dodécyl sulfate de sodium (SDS), 3% de 2-mercaptoéthanol, 20% de glycérol, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 et chauffé à 100°C pendant 3 min, puis analysé par électrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE).

2.5.2. Activité protéolytique déterminée sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé

Pour étudier l'activité protéolytique, les isolats ont été repiqués (5% inoculum) dans les milieux MRS et M17. Les isolats ont été testés sur le lait UHT et celles qui ont donné des résultats positifs ont été testés sur le milieu Milk-Citrate-Agar (MCA) (Fira et al., 2001) contenant : 4,4% de poudre de lait écrémé, 0,8% de Na-citrate, 0,1% d'extrait de levure, 0,5% de glucose et 1,5% d'agar. Les cellules ont été cultivées sur milieu MCA après 48 h d'incubation. Les cellules ont été collectées et re suspendues à DO₆₀₀ = 10 dans un tampon phosphate (Na⁺) 100 mM de pH 6,8. Les cellules ont été mélangées avec les différents substrats : caséinate de sodium (12 mg/ml) et lactosérum dénaturé (85 °C/20 min) (5 mg/ ml)

(1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 3 et 24 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, une centrifugation était réalisée (10 min à 8000 g) et le surnageant clair prélevé puis analysé par SDS-PAGE d'une part, et en chromatographie de phase inversée d'autre part.

2.5.3. Facteurs influençant l'activité protéolytique

2.5.3.1. Effet du pH

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité des protéases, les cellules ont été cultivées sur le milieu MCA après 48 h d'incubation. Les cellules collectées étaient re-suspendues à $DO_{600}=10$ dans un tampon phosphate de différentes valeurs de pH (5,4 ; 5,7 ; 6,0 ; 6,5 et 7,2) et dans 100 mM de Tris-HCl à pH 8.2. Les cellules ont été mélangées avec le substrat: caséinate de sodium (12 mg/ml) (1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, on centrifugeait (10 min à 8000 g) et on prélevait le surnageant clair pour analyse par SDS-PAGE.

2.5.3.2. Effet de la température

Pour déterminer l'influence de la température sur l'activité des protéases, les cellules ont été cultivées sur le milieu MCA après 48 h d'incubation. Les cellules ont été collectées et re-suspendues à $DO_{600}=10$ dans un tampon phosphate de pH 7,2. Les cellules ont été mélangées avec le substrat : caséinate de sodium (12 mg/ml) (1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à différentes températures 30, 37 et 42 °C. À la fin de la période d'incubation, on centrifugeait (10 min à 8000 g) et on prélevait le surnageant clair pour analyse par SDS-PAGE.

2.5.3.3. Effet des inhibiteurs

Pour déterminer le type de protéases, les cellules ont été cultivées sur le milieu MCA après 48 h d'incubation. Les cellules étaient collectées et re-suspendues à $DO_{600}=10$ dans un tampon phosphate de pH 7,2. Différents inhibiteurs ont été ajoutés à la suspension cellulaire à une concentration finale de 10 mM et incubés à 37 °C pendant 1 h avant l'ajout du substrat. Les inhibiteurs testés étaient l'EDTA, l'acide iodoacétique et le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), ou le pefabloc SC (4 - (2-aminoéthyl) chlorhydrate de fluorure de benzènesulfonyl (AEBSF). Le PMSF (50 mM dans l'isopropanol) a été dilué dans du tampon phosphate 10 mM (pH 7,2) à une concentration équivalente à celle des autres inhibiteurs. Les cellules ont été mélangées avec le substrat : caséinate de sodium (12 mg/ml ;

1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 5 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, on centrifugeait (10 min à 8000 g) et on prélevait le surnageant clair pour analyse par SDS-PAGE.

2.6. SDS-PAGE

L'analyse par SDS-PAGE permet une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les échantillons ont été appliqués à un gel de polyacrylamide 12 et 15%. Le tampon de migration contenait : Tris 50 mM, glycine 0,384 M et du SDS 0,1%. Les échantillons migraient sous une intensité constante de 10 mA dans le gel de concentration et de 20 mA dans le gel de séparation. Après migration, le gel était coloré avec le Bleu de Coomassie R250 pendant 1 h puis décoloré pendant 2 h. Les gels ont été numérisés avec un scanner d'images III (GE Healthcare, USA) et l'intensité des bandes a été quantifiée par un logiciel d'image. Les analyses sont effectuées en utilisant le logiciel Fuji Film Image Gauge V3.0 (Fuji Photo Film Co. Ltd, Japon). Les résultats ont été exprimés par le rapport entre l'aire et l'intensité de la bande. La réduction de l'intensité de la bande pendant l'incubation a été exprimée en pourcentage d'hydrolyse (Ong et al., 2006).

2.7. RP-HPLC

La RP-HPLC a été utilisée pour étudier l'activité protéolytique des souches. L'HPLC en phase inversée permet une séparation hautement résolutive des protéines et des peptides selon leur hydrophobie. Les échantillons de caséinate de sodium (12 mg/ml) et de lactosérum dénaturé (5 mg/ml) (1:1, v/v) incubés avec les souches ont été solubilisés dans de l'urée 9 M, puis centrifugés (12 000 g, 5 min) avant injection sur la colonne. 50 µl des différents échantillons ont été injectés sur une colonne analytique Symmetry C₁₈ (2,1 x 150 mm). L'élution était réalisée en 45 min avec un débit de 0.2 ml/min par un gradient linéaire de 0% à 100% de solvant B. Le solvant A était : H₂O, acide trifluoracétique (TFA) 0,11% et le solvant B était : H₂O/acétonitrile/TFA (20/80/0,09) (v/v/v). L'analyse par RP-HPLC a été réalisée avec un système Waters (Milford, MA). Les résultats ont été analysés par un logiciel Millenium 32 (Waters) (Bertrand-Harb et al., 2003).

2.8. Purification des caséines α_{S1} et β à partir de la caséine totale

La caséine totale a été préparée à partir de lait frais par précipitation à pH 4,6 avec de l'HCl 6 N par centrifugation (4 000 g, 20 min). Les caséines β et α_S (α_{S1} et α_{S2}) ont été

préparées à partir de caséine totale par chromatographie échangeuse d'anions (FPLC ; BioCad / Sprint, PerSeptive Biosystems, USA) selon la méthode de Thorn et al. (2008). La caséine totale (50 mg/ml) a été remise en suspension dans un tampon Tris-HCl 50 mM, urée 8 M, de pH 8,0, dithiothréitol 20 mM (DTT). La colonne source Q Sepharose High Performance ($v = 50$ ml) a été équilibrée avec le tampon A (Tris-HCl 25 mM, urée 4 M, pH 8,2, DTT 5 mM) et l'élution a été réalisée avec un gradient de 0 à 30% de tampon B (tampon A + NaCl 1 M) à un débit de 5 ml/min. Les caséines β et α_s ont été recueillies, dialysées et lyophilisées. Les caséines α_s (35 mg/ml) ont été re-suspendues dans un tampon acétate de sodium 20 mM, urée 8 M, de pH 6,0, DTT 20 mM. La colonne Source Q ($V = 8$ ml) a été équilibrée avec un tampon C (acétate de sodium 20 mM, urée 4 M, de pH 6, DTT 5 mM) et l'élution a été réalisée avec un gradient de 0 à 30% de tampon D (tampon C + NaCl 1 M) à un débit de 5 ml/min. La caséine α_{s1} a été recueillie, dialysée et lyophilisée.

2.9. Identification des peptides par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS)

Les expérimentations de spectrométrie de masse ont été menées à la plate-forme « Biopolymères Biologie Structurale » située au centre INRA de Nantes (Unité de recherche INRA 1268)

(http://www.nantes.inra.fr/plateformes_et_plateaux_techniques/plateforme_bibs)

Les peptides résultant de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} ont été séparés par chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC), équipé d'un système Waters HPLC (pompe Waters 616, détecteur Waters 600). La colonne C_{18} (2 mm, 4 μ m, Jupiter PROTEO, Phenomenex) est pré-équilibrée avec le solvant A (H_2O , TFA 0,11%, v/v) à un débit de 0,15 ml/min. Après injection, un gradient linéaire de solvant B (acétonitrile 80%, H_2O 20%, TFA 0.09%, v/v/v) est programmé pendant 30 min et suivi d'un lavage de 2 min à 100% du même tampon. L'éluat est analysé sur le système Q ion-Trap (Finnigan MAT, San Jose, CA) équipé d'une source nanospray. Les ions entrant dans le spectromètre de masse sont analysés en continu et quand un peptide est détecté, le balayage passe en mode MS/MS afin d'obtenir son spectre de fragmentation. Pour l'identification des peptides, les listes de pics sur les spectres MS/MS sont extraites et comparées aux bases de données en utilisant l'outil bioinformatique MASCOT <http://matrixscience.com> et son module dédié à l'analyse de spectres MS/MS.

2.10. Identification des types de protéases par PCR

L'extraction de l'ADN génomique des bactéries (*Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1) a été réalisée avec le kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen).

La réaction PCR a été préparée dans un volume total de 50 µl contenant du tampon PCR 1X (Tris-HCl 10 mM, de pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1%), 200 µM de chaque dNTPs, 0,025 U/µl de Taq ADN polymérase (Promega, Madison, WI, USA), 1 µM de chaque amorce et 40 ng d'ADN matrice. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide des amorces pour huit gènes de protéases connues (*PrtP/PrtM*, *PrtB*, *PrtH*, et *PrtR*) comme indiqué sur le Tableau 7.

La réaction PCR comprend une dénaturation à 94 °C pendant 4 min, 30 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 45 °C pour *PrtP/PrtM*, 50 °C pour *PrtB*, 55 °C pour *PrtR* et *PrtH* pendant 1 min, (3) étape d'élongation à 72 °C pendant 1,5 min. L'analyse des résultats d'amplification est faite par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent.

Tableau (7). Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les protéases connues

Gène	Amorce	Séquence 5' → 3'	Taille d'amplification (bp)	TM	réf.
<i>prtP</i> <i>/prtM</i>	P700	GCTTGAATTCGTTGTCGCTGCGGTTGT	685	56 °C	1
	M700	GCATGAATTCAATGCACGATAAATGAG			
<i>prtB</i>	B10	GGTGTGCTCCTGATGCCAGC	597	56 °C	1
	B20	CCCCGTTTAACAAGTCAAGTT			
<i>prtH</i>	Jp23	GCTTGGATAGTAGCGTTAGC	1034	56 °C	1
	Jp25	GGTGAACAACTGAAGACG			
<i>prtR</i>	I2	CAACACCGGGACCACGGTG	1052	55 °C	1
	IP6Xba	CTGATCGTGGACGGTGTTC			

1: Strahinic et al. (2010)

2.11. ELISA compétitif

Des plaques de microtitration 96 puits à fond plat (Maxi Sorp, Nunc, Roskilde, Denmark) (plaque 1) ont été utilisées dans cette étude. 100 µl d'une solution de caséine α_{S1} ou β ont été déposés dans les puits et incubés pendant 3 h à 30 °C. La concentration en protéines était de 5 µg/ml dans du PBS 1 M, pH 7,4 (NaCl 0,136 M, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,76 mM et Na_2HPO_4 12 H₂O 10,14 mM). Pour le contrôle négatif (blanc), la caséine était remplacée par un volume égal (100 µl) de PBS. Tous les puits étaient recouverts de 100 µl d'anticorps monoclonal de souris anti IgE humaine, clone M604199 (Ab1, Fitzgerald, Concord, USA) dilué au 1:2500 dans du PBS. Après l'incubation, un lavage est réalisé trois fois avec du PBS contenant 0,1% (v/v) de Tween-20 (PBS/T) et saturé pendant 1 h à 37 °C en déposant 250 µl d'une solution de PBS/T contenant 1% (p/v) de polyvinyl alcool (PBS/T/PVA). Une gamme étalon a été réalisée en appliquant 100 µl de dilutions en série de 160 à 0,15 ng/ml (5000 UI) d'IgE humain (WHO référence internationale, code 75/502).

Un pool de 7 sérums d'enfants allergiques à la caséine α_{S1} et un pool de 5 sérums d'enfants allergiques à la caséine β (obtenus du laboratoire d'immuno allergologie de l'hôpital académique d'Angers, France) ont été utilisés après approbation du comité d'éthique interne à l'hôpital. Les sérums étaient dilués au 1:10 et mélangés avec des volumes égaux (60 µl:60 µl) de dilutions en séries de caséine α_{S1} et d'hydrolysats de caséine α_{S1} dans du PBS/T/PVA 1% (1000, 640, 160, 40, 10, 2,5, 1, 0,25 et 0,062 µg/ml) sur une plaque séparée (plaque 2) et incubés à 37 °C pendant 1 h.

Une fraction aliquote de 100 µl était transférée de chaque puits de la plaque 2 vers les puits recouverts de caséine de la plaque 1 ou le contrôle négatif. Après une incubation d'une nuit à 4 °C, les plaques ont été lavées trois fois avec du PBS/T et incubées pendant 2 h à 37 °C avec un anticorps secondaire (IgE polyclonal anti-humain conjugué à la phosphatase alcaline, Sigma) dilué au 1:1000 dans du PBS/T/PVA. Après 3 lavages de la plaque avec du PBS/T, l'anticorps secondaire libre était révélé par addition de 4-méthylumbelliferyl phosphate (4-MUP) dilué au 1:5 dans du Tris-HCl, pH 9,8. L'émission de fluorescence était mesurée après 90 min d'incubation à 37 °C avec le lecteur de microplaque FLX 800 (Biotech Instruments, Inc., Winooski, VT), avec un filtre d'excitation à 360 nm et un filtre d'émission à 440 nm. Les paramètres de lecture de l'appareil étaient réglés pour une lecture par le haut avec une sensibilité de 45. Les contrôles utilisés incluaient l'anticorps secondaire.

2.12. Étude de l'activité antimicrobienne

2.12.1. Les isolats de LAB

Les études d'activité antimicrobienne ont été menées avec les mêmes isolats que ceux décrits précédemment. Les isolats isolés et purifiés étaient conservés à -20°C dans du lait écrémé reconstitué stérile (12,5%, p/v) additionné de 30% (p/v) de glycérol. Avant leur utilisation, les isolats étaient répliqués deux fois dans le milieu liquide approprié et cultivés pendant une nuit.

2.12.2. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont : (i) *Lactobacillus bulgaricus* 340 (Rhodia Food, France) propagés dans du bouillon MRS à 37°C ; (ii) *Enterococcus faecium* HKLHS (INRA, Nantes, France), *Listeria ivanovii* (ATCC), *Listeria innocua* CIP 80.11 (ONIRIS, Nantes, France), *Listeria monocytogenes* EGDe 107776 (ONIRIS), *Salmonella enterica* 13076 (ATCC), *Bacillus cereus* (ONIRIS), *Staphylococcus aureus* CIP 53154 (ONIRIS), et *Pseudomonas aeruginosa* (ONIRIS) cultivés dans du bouillon BHI à 37°C ; (iii) *Escherichia coli* ATCC 23355 cultivé dans un bouillon de LB à 37°C ; (iv) *Candida pseudotropicalis* (INRA) et *Saccharomyces cerevisiae* DSH 213.83 (ONIRIS) cultivés à 30°C dans un milieu YPD.

Les souches bactériennes étaient répliquées deux fois dans le milieu liquide approprié et cultivées pendant une nuit. Les différents milieux étaient solidifiés par l'ajout d'agar à 0,8% pour les tests d'activité antimicrobienne.

2.12.3. Méthode de diffusion en puits pour la détection de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne du surnageant de culture obtenu par centrifugation à 8000 g pendant 10 min à 4°C (503 isolats) et ajusté à pH 6,5 avec NaOH 1 N, a été déterminé par la méthode de diffusion en puits (Schillinger & Lucke, 1989) avec de légères modifications. 100 μl d'une culture de 16 h de la bactérie indicatrice (*Lactobacillus brevis* F145) étaient inoculés dans 20 ml de milieu approprié gélosé (0,8%, p/v). Après refroidissement et solidification de la gélose, des puits de 7 mm de diamètre étaient creusés sur la gélose à l'aide d'un emporte-pièce. 50 μl de l'échantillon à tester étaient déposés dans les puits. Après 1 h de diffusion à température ambiante et dans des conditions stériles, les boîtes de Pétri étaient incubées avec *Lactobacillus brevis* F145. La présence d'une zone claire d'inhibition de croissance de la souche indicatrice autour du puits était considérée comme une réaction positive. Les isolats

actifs contre *Lactobacillus brevis* F145 (24 isolats) ont été testés en outre pour leur activité antimicrobienne contre d'autres souches.

2.12.4. Facteurs influant l'activité antimicrobienne

2.12.4.1. Effet des enzymes

L'effet de diverses enzymes sur l'activité antimicrobienne des LAB a été déterminé. A 200 µl de surnageant étaient ajoutés 20 µl des enzymes suivantes: protéinase K, trypsine, α -chymotrypsine, catalase, α -amylase et lipase à une concentration finale de 0,1 mg/ml dans du tampon phosphate 20 mM de pH 7. Le mélange était incubé à 37 °C pendant 2 h. L'activité enzymatique était stoppée par un chauffage à 100 °C pendant 5 min. L'activité bactériocine résiduelle était déterminée contre la souche indicatrice *Lactobacillus brevis* F145 comme décrit précédemment.

2.12.4.2. Effet du pH

La stabilité de la substance active aux pH acide et basique a été étudiée en ajustant le pH du surnageant aux valeurs désirées (2 à 10) par l'ajout de NaOH 5 N ou d'HCl 5 N. Après 2 h d'incubation à 37 °C, le pH était ajusté à 6,5 et l'activité bactériocine résiduelle était déterminée contre la souche indicatrice *Lactobacillus brevis* F145 comme décrit précédemment.

2.12.4.3. Effet de la température

Pour évaluer la thermostabilité de la substance active, 1 ml de surnageant de culture était neutralisé et incubé à 100 °C pendant 10 et 30 min, et à 121 °C dans un autoclave pendant 20 min. Dans tous les cas, l'activité résiduelle était déterminée contre la souche indicatrice *Lactobacillus brevis* F145 comme décrit précédemment.

2.13. Production d'une bactériocine par *Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980

Un millilitre de pré-culture de souche *Enterococcus faecium* TX1330 ou *Enterococcus faecium* E980 était inoculé dans 30 ml de bouillon M17 puis incubé à 37 °C dans des conditions de pH non régulé. La croissance bactérienne était contrôlée chaque heure par la mesure du pH et de la turbidité (densité optique, DO_{600nm}). Pour mettre en évidence une activité antibactérienne dans le surnageant de culture, la méthode de dilution en série sur milieu gélosé a été utilisée (Yamamoto et al., 2003). Cette méthode permet de déterminer

l'activité en unités arbitraires (U.A.). Le surnageant de culture était dilué en série deux fois avec du milieu M17. Parallèlement, 20 ml de milieu nutritif gélosé étaient mélangés avec une culture de 16 h de *Lactobacillus brevis* F145 (100 µl) dans une boîte de Pétri. Le surnageant dilué (10 µl) était déposé à la surface du milieu gélosé. Les boîtes de Pétri étaient ensuite incubées pendant 18 h à 37 °C. L'activité antibactérienne était ensuite déterminée en U.A. par millilitre de milieu de culture selon la formule suivante :

$$2^n \times 1000 \mu\text{l}/10 \mu\text{l} = \text{U.A./ml}$$

n représentant la réciproque de la dilution la plus élevée pour laquelle une inhibition de croissance de la souche sensible est observée.

2.14. Effet de la température, du pH et de sel sur la production de bactériocine

Des volumes de 200 ml de bouillon M17 étaient inoculés avec des pré-cultures de souche *Enterococcus faecium* TX1330 ou *Enterococcus faecium* E980 et incubés à différentes températures (4, 10, 30, 37 et 45 °C).

La production de bactériocines a été également étudiée pendant 24 h à 37 °C avec du bouillon M17 contenant 6,5% de NaCl ou du bouillon M17 à pH 9,6 pour ces deux souches.

L'activité antimicrobienne contre la souche indicatrice *Lactobacillus brevis* F145 a été déterminée par la méthode de diffusion en puits après centrifugation et ajustement du pH du surnageant à 6,5 (Batdorj et al., 2006).

2.15. Caractérisation des entérocinés par PCR

L'ADN génomique des bactéries (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) a été utilisé comme matrice pour l'identification des gènes codant pour des entérocinés.

La réaction PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Techno Barloworld Scientific, Cambridge, UK). Le mélange réactionnel contenait (concentration finale) : 1 X tampon de réaction (Tris-HCl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM et Triton X-100 0,1%) , 200 µM de chaque dNTPs, 0,025 U/µl de Taq ADN polymérase (Promega), 1 µM de chaque amorce et 40 ng d'ADN dans un volume final de 50 µl. Des amorces pour huit gènes d'entérocinés connues (A, B, P, 31, Q, AS48, L50A et Cyl) ont été utilisées comme décrit dans le Tableau 8.

L'échantillon subit ensuite 30 cycles d'amplification (94 °C/30s ; Tm/ 30s ; 72 °C/30s) précédé d'une étape de dénaturation de l'ADN (95 °C pendant 5 min) et une élongation finale de 5 min à 72 °C permettant à la polymérase d'achever l'élongation des brins d'ADN. La

température d'hybridation dépend de chaque couple d'amorces (Tableau 3). Trois microlitres de produit PCR étaient analysés après une électrophorèse de 30 min à 100 V sur un gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) dans un tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) et la lecture était réalisée sous UV.

Tableau (8). Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les enterocines connues

Gene	Amorce	Séquence 5' → 3'	Amplification taille (bp)	TM	Réf.
A	AF	GGTACCACTCATAGTGGAAA	130	58 °C	1
	AR	CCCTGGAATTGCTCCACCTAA			
B	BF	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG	180	56 °C	1
	BR	AGAGTATACATTTGCTAACCC			
P	PF	GCTACGCGTTCATATGGTAATGGT	132	60 °C	1
	PR	ATGTCCCATACCTGCCAAACCAGAAGC			
31	31F	CCTACGTATTACGGAAATGGT	130	58 °C	3
	31R	GCCATGTTGTACCCAACCATT			
Q	QF	GGAATAAGAGTAGTGGAATACTGATAT GAGAC	653	60 °C	1
	QR	AAAGACTGCTCTTCCGAGCAGCC			
AS48	AS48F	GAGGAGTATCATGGTTAAAGA	253	56 °C	1
	AS48R	ATATTGTTAAATTACCAA			
L50A	Ent 1 Fw	NNNNCCATGGGAGCAATCGCAAAA	135	50 °C	2
	Ent 1 Rev	NNNNAAGCTTAATGTTTTTTAATCCACT CAAT			
Cyl	Cyl F	GGCGGTATTTTTACTGGAGTN	248	58 °C	3
	Cyl R	CCTACTCCTAAGCCTATGGTA			

1: de Vuyst et al. (2003) 2: Batdorj et al. (2006) 3: Klibi et al. (2008)

2.16. Détection des facteurs de virulence

L'ADN génomique des bactéries (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) a été utilisé comme matrice pour l'identification des gènes codant pour des

facteurs de virulence connus : *asal* (substance d'agrégation), *cyl A* et *cyl B* (cytolysine), *ace* (protéine de liaison du collagène), *efaAfs* (antigène *Enterococcus faecalis* endocardite), et *espfm* (protéine de surface d'entérocoques). Leur présence a été vérifiée par amplification spécifique des gènes concernés grâce à des amorces spécifiques détaillées dans le Tableau 9, par PCR classique. *Enterococcus faecalis* MM4594 a été utilisé comme contrôle positif.

La réaction PCR était réalisée dans un volume total de 50 µl contenant du tampon PCR 1X (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, et 0,1% de Triton X-100), 200 µM de chaque dNTPs, 0,025 U/µl de Taq ADN polymérase (Promega), 1 µM de chaque amorce et 40 ng d'ADN dans un volume final de 50 µl. Les séquences des amorces de cinq gènes de virulence connues, *asal*, *cyl A* et *cyl B*, *ace*, *efaAfs* et *espfm* ont été utilisées (Tableau 9).

La réaction PCR (*asal*, *ace* et *espfm*) a été réalisée dans un thermocycleur (Techno Scientifiques) programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95 °C pendant 5 min, 35 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 56 °C pendant 1 min, (3) étape d'élongation à 72 °C pendant 1 min. La réaction PCR (*efaAfs*) a été réalisée dans le thermocycleur programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95 °C pendant 5 min, 35 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 54 °C pendant 1 min, (3) étape d'élongation à 72 °C pendant 1 min. La réaction PCR (*Cyl A*) a été réalisée dans le thermocycleur programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95 °C pendant 5 min, 30 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94 °C pendant 45 s, (2) étape d'hybridation à 58 °C pendant 45 s, (3) étape d'élongation à 72 °C pendant 45 s. La réaction PCR (*Cyl B*) a été réalisée dans le thermocycleur programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95 °C pendant 5 min, 35 cycles composés de 3 étapes : (1) étape de dénaturation à 94 °C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 52 °C pendant 1 min, (3) étape d'élongation à 72 °C pendant 1 min. Après ces cycles, une étape finale à 72 °C pendant 10 min était réalisée. 3 µl de produit PCR étaient analysés sur un gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) dans un tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) pendant 30 min à 100 V et la lecture a été réalisée par éclairage UV.

Tableau (9). Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les facteurs de virulence connus

Gène	Amorce	Séquence 5' → 3'	Amplification taille (bp)	TM	Ref.
<i>asaI</i>	ASA11	GCACGCTATTACGAACTATGA	375	56 °C	1
	ASA12	TAAGAAAGAACATCACCACGA			
<i>Ace</i>	ACE-F	GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG	1008	56 °C	3
	ACE-R	GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC			
<i>EfaAfs</i>	TE5	GACAGACCCTCACGAATA	705	54 °C	2
	TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA			
<i>Esp</i>	ESP14F	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	510	56 °C	1
	ESP12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG			
<i>Cyl A</i>	CYTI	ACTCGGGGATTGATAGGC	688	58 °C	1
	CYTIb	GCTGCTAAAGCTGCGCTT			
<i>Cyl B</i>	CYTB1	AAGTACACTAGTAGAACTAAGGGA3	2020	52 °C	4
	CYTB2	ACAGTGAACGATATAACTCGCTATT			
	CYTLL2	GCTTCACCTCACTAAGTTTTATAG			

1: Vankerckhoven et al. (2004) 2: Eaton & Gasson (2001) 3: Ben Omar et al. (2004)

4: Semedo et al. (2003)

2.17. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résistances aux antibiotiques des deux souches isolées, *Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980 ont été évaluées par la méthode de diffusion en disque contre l'ampicilline, le chloramphénicol, la ciprofloxacine, la vancomycine, la gentamicine, la pénicilline et la tétracycline. Les seuils de sensibilité ont été définis d'après la méthode éditée par le Comité National pour Standards de Laboratoire Clinique (CNSLC) (Karmarkar et al., 2004). Une fraction aliquote (100 µl) d'une culture bactérienne (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) issue de la phase stationnaire de croissance était additionnée à 20 ml de milieu approprié gélosé (0,8%, p/v). Après refroidissement et solidification de la gélose, des disques (Prat Dumas, Couze-Saint-Front, France, 9 mm) étaient déposés à la surface du milieu de croissance et des concentrations croissantes d'antibiotiques (0,0 ; 0,2 ; 0,4 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 64 ; 128 ; 256 ; 512 ; 750 et 1500 µg/ml)

ont été déposées sur les disques. Les boîtes ont été incubées 1 h à température ambiante dans des conditions stériles avant une incubation de 24 h à 37 °C (Andrews, 2001). La présence d'une zone claire d'inhibition de croissance de la souche indicatrice autour du disque est considérée comme une réaction positive. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'un antimicrobien qui inhibe la croissance d'un micro-organisme après une nuit d'incubation. Les valeurs de CMI sont utilisées pour déterminer la résistance des micro-organismes à un agent antimicrobien et pour estimer les concentrations critiques. Les valeurs de la CMI ont été comparées aux concentrations critiques décrites par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (2008).



RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I :

**Isolement et identification des bactéries lactiques (LAB) qui
présentent une forte activité protéolytique dans
les produits laitiers traditionnels Égyptiens.**

**Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for
their proteolytic activity**

**El-Ghaish, S., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M.,
Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J.-M.**

Food Chemistry, 2010, 120: 758–764

RÉSUMÉ

Sélection des espèces de lactococci isolés à partir de produits laitiers égyptiens pour leurs activités protéolytiques

Deux-cent quatre-vingt trois isolats de Cocci ont été isolés de produits laitiers traditionnels égyptiens collectés dans quatre régions. Six isolats de coques montraient une activité protéolytique sur le caséinate de sodium. Ces isolats ont été purifiés et identifiés par amplification de l'ADNr et séquençage comme étant : *Enterococcus faecalis* HH22 (4 isolats) et *Enterococcus faecium* DO623 (2 isolats). L'activité protéolytique d'*Enterococcus faecalis* HH22 était plus élevée que celle d'*Enterococcus faecium* DO623.

Une SDS-PAGE montre que le pH optimal d'activité protéolytique est de 6,5 pour *Enterococcus faecium* DO623 mais se situe entre 6,5 et 7,2 pour *Enterococcus faecalis* HH22. La température optimale d'activité protéolytique est de 42 °C pour les deux souches. Les résultats obtenus démontrent que les protéases sont principalement des métallo-protéases. Cependant, on trouve des protéases à sérine pour *Enterococcus faecalis* HH22.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Screening of strains of *Lactococci* isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity

Shady El-Ghaish^a, Michèle Dalgalarrrondo^a, Yvan Choiset^a, Mahmoud Sitohy^{a,b}, Iskra Ivanova^c, Thomas Haertlé^a, Jean-Marc Chobert^{a,*}

^a UR 1268, Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, F-44300 Nantes, France

^b Zagazig University, Biochemistry Department, Faculty of Agriculture, Zagazig, Egypt

^c Department of General and Applied Microbiology, Sofia University, Bulgaria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2009

Received in revised form 6 October 2009

Accepted 4 November 2009

Keywords:

LAB

Lactococcus

Cheese

Proteolysis

ABSTRACT

A collection of cocci isolates (293) obtained from traditional Egyptian dairy products collected from four Egyptian regions yielded 151 lactic acid bacteria (LAB) cocci isolates. Among them, 24 isolates were characterised as highly proteolytic. SDS–PAGE showed that 6 isolates were the most proteolytically active, which were classified into *Enterococcus faecalis* HH22 (4 isolates) and *Enterococcus faecium* D0623 (2 isolates). The proteolytic activity of *E. faecalis* was higher than that of *E. faecium* (particularly on β -casein). The maximal degradation of milk proteins was achieved at pH 6.5–7.2 (*E. faecalis*) or pH 6.5 (*E. faecium*) and at 42 °C for both strains. The proteolytic activities of the two strains were inhibited mostly by the presence of EDTA, showing that their proteases belong mainly to metalloproteases. A slight inhibition of proteolysis by PMSF in the case of *E. faecalis* HH22 suggests a limited inclusion of serine proteases in its protease system.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The role of raw milk microflora is evident in cheese maturation when the sensorial characteristics of cheeses made from raw milk are compared with those of cheeses prepared from pasteurised or micro-filtered milk (Beuvier et al., 1997). These comparisons show that flavour intensity score is significantly higher in raw milk-based cheeses than in cheeses made out of pasteurised milk. The fermented raw milk products and traditional cheeses are rich sources of strains with new properties. Screening and characterisation of these microfloras is highly interesting in order to isolate new strains or isolates with technological functions potentially applicable in the food industry.

Lactic acid bacteria (LAB) are defined as a group of micro-aerophilic, Gram-positive micro-organisms fermenting hexose sugars to lactic acid. This functional classification includes a variety of industrially important genera, including *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, and *Lactobacillus* species (Makarova et al., 2006). LAB are a heterogeneous group of bacteria used as starter cultures for dairy, meat, and vegetable fermentations

(Yamamoto, Togawa, Shimoska, & Okazaki, 2003). They also contribute to various industrial applications in food and beverage fermentation, bulk and fine chemicals production as well as in manufacture of pharmaceuticals (Zhu, Zhaping, & Li, 2009). Moreover, LAB are well known as producers of many secondary metabolites such as bacteriocins (De Vuyst & Leroy, 2007) and exopolysaccharides (Welman & Maddox, 2003).

The gastrointestinal tracts of humans and animals are the habitats of *Enterococci* (Gelsomino, Vancanneyt, Condon, Swings, & Cogan, 2001). These bacteria are important for environmental, food, and clinical microbiology applications. Their technological importance stems from their inclusion in the production of various European fermented foods such as sausages and cheeses, where they are purposefully added to the product as a starter culture (Bover-Cid, Hugas, Izquierdo-Pulido, & Vidal-Carou, 2001). *Enterococci* can grow in the restrictive environment of high salt content and at the low pH of cheeses (Wessels, Jooste, & Mostert, 1991) and do contribute to the ripening and to the development of aroma in these products due to their hydrolytic (proteolytic and esterolytic) activities as well as to the production of diacetyl (Sarantinopoulous, Kalantzopoulos, & Tsakalidou, 2002).

Proteolysis is considered as one of the most important biochemical processes involved in manufacturing of many fermented dairy products (Fox, 1989), irrespective of the contribution of the proteolytic/peptidolytic enzymes of LAB to organoleptic properties of

* Corresponding author. Address: UR 1268 INRA, Biopolymères Interactions Assemblages, Equipe Fonctions et Interactions des Protéines Laitières, B.P. 71627, 44316 Nantes, Cedex 3, France. Tel.: +33 2 40 67 52 30; fax: +33 2 40 67 50 84. E-mail address: chobert@nantes.inra.fr (J.-M. Chobert).

the final milk products. Proteolysis could also contribute to preventing allergenic problems frequent in children under 3 years of age due to a poor digestion of milk proteins (Pescuma et al., 2009).

The aim of this work was to screen and identify the *Enterococcus* species from traditional Egyptian dairy products for their proteolytic activities. The factors affecting proteolytic activity, such as pH, temperature, and presence of inhibitors were also studied. The proteolytically active strains obtained, could be used in the production of different hypoallergenic dairy products.

2. Material and methods

2.1. Samples collection

Twenty samples of traditional dairy products were obtained from the local markets of four Egyptian cities: Alexandria, Tanta, Kafr El-Sheikh, and Damietta. Traditional dairy products included Domiatti cheese (fresh or 4 month-stored rennet coagulated soft cheese), Ras cheese (fresh hard cheese prepared from rennet coagulated raw milk) and Rayeb milk (home-made fermented milk).

2.2. Isolation and identification of LAB cultures

An amount from each dairy product (10 g) was weighted, added aseptically to 90 ml of sodium citrate (2%, w/v) and homogenised in a sterile bag. The resulting homogenate was decimal and serially diluted up to 10^{-8} using Ringer solution [0.9% NaCl (w/v)]. One millilitre from each dilution was plated onto M17 and de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) agar. For Rayeb milk, 10 ml of each sample was pipetted aseptically into 90 ml of Ringer solution and mixed thoroughly. Serial dilutions (10^{-1} to 10^{-8}) were made and 1 ml of the appropriate dilution was pour plated onto M17 and MRS agar (Beukes, Bester, & Mostert, 2001). All plates were incubated at 37 °C for 48 h and colonies from M17 and MRS agar plates were selected according to their shape and colour from plates with colony numbers between 30 and 300. They were examined with an optical microscope for Gram staining. Catalase activity was detected by placing drops of 3% H_2O_2 (w/v) on cultures. The cultures were classified as Gram-positive, catalase-negative rods (*Lactobacilli*) and Gram-positive, catalase-negative (*Lactococci*). For purification, the cultures were streaked on suitable media and the purified strains were reconstituted in sterile skim milk (12.5%, w/v) supplemented with 30% (w/v) glycerol and stored at –20 °C.

2.3. Amplification and sequencing of 16S rDNA

DNA was extracted from the isolates according to Delley, Mollet, and Hottinger (1990) and was used as a template for 16S rRNA gene amplification. In the reaction universal primers fD1 (5'-AGA-GTITGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-TAAGGAGGTGATCCAGGC-3') were used (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991). DNA amplifications were performed in DNA thermal cycler model (Techno, Barloworld scientific, Cambridge, UK). The reaction mixture contained: PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 1 mM of each primer and 40 ng DNA in a final volume of 50 µl. PCR amplifications were performed under the following conditions: denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 56 °C for 1.15 min, and DNA extension at 72 °C for 1.15 min. A final extension was added at 72 °C for 5 min. Amplicons were analysed on 1% (w/v) agarose gel with ethidium bromide (0.5 mg/ml) in 0.5× TAE (Tris acetate-EDTA) buffer for 30 min at 100 V and made visible by UV trans-illumination. DNA sequencing was carried out by MilleGen sequencing service (Labège, France).

2.4. Determination of growth and acidity curves

Overnight cultures of *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623 were grown either in skim milk or in M17 broth (5%) of culture starter. After vortex mixing, the culture was divided into appropriate aliquots to be analysed after certain time periods of incubation at 37 °C. The optical density (OD) of strain was followed at 600 nm with a HITACHI U-1100 UV-Visible spectrophotometer (Japan). The change of pH was determined using a pH meter. Experiments were performed three times and the results are expressed as the mean plus the standard error.

2.5. Proteolytic activity

Proteolytic activity was followed qualitatively using the skim milk agar medium for screening and selection or quantitatively using different chemical techniques as follows.

2.5.1. Proteolytic activity on skim milk agar

Egyptian dairy products were serially diluted with Ringer solution to 10^{-8} , mixed well and inoculated onto plates containing 1.4% skim milk (Délisse, UHT skim milk, France) agar (0.8%). Inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h to detect extra cellular cell-bound proteinases giving rise to clear zones surrounding colonies which were taken as a positive indicator of proteolysis (Pailin, Kang, Schmidt, & Fung, 2001).

2.5.2. Proteolytic activity measured using UHT skim milk

The different isolates were reactivated twice by inoculating 50 µl of the previously prepared pre-culture into 950 µl of Délisse UHT skim milk and incubating overnight at 37 °C. The last mixture was diluted 1/10 (v/v) in sample buffer containing 4% sodium dodecyl sulphate (SDS), 3% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and heated at 100 °C for 3 min then analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

2.5.3. Proteolytic activity measured on caseinate and whey milk fractions

A pre-culture was prepared by inoculating an aliquot of 50 µl of the isolate Sh7-7 (*E. faecium* DO623), and Sh13-4 (*E. faecalis* HH22) into 950 µl M17 broth and incubated overnight at 37 °C. An aliquot (~0.5 ml) of the activated pre-culture was applied on the top of milk-citrate-agar (MCA) plates containing 4.4% skim milk powder, 0.8% Na-citrate, 0.1% yeast extract, 0.5% glucose and 1.5% agar (Fira et al., 2001). The plates were incubated for 48 h at 37 °C prior to cell collection. Collected fresh cells were re-suspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2) and brought to final optical density (OD_{600}) of 10 just before application. One volume of the last suspension was combined with an equivalent volume of the solutions of different milk protein fractions taken as substrates for the proteolytic activity. Sodium caseinate and whey proteins were obtained at a laboratory scale by precipitation at pH 4.6. The concentration of whey proteins was 5 mg/ml, while that of Na-caseinate was 12 mg/ml. The final mixtures were incubated for different periods (3, 6, 9, and 24 h) at 37 °C. Controls were prepared by incubating equivalent protein fractions solutions for the same periods without adding cells. At the end of incubation periods, cells were pelleted by centrifugation (10 min at 8000 g) and the clear supernatant was analysed by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).

2.6. Factors influencing proteolytic activity

2.6.1. Effect of pH

The cell suspensions, in 100 mM Na-phosphate buffer at different pH values (5.4, 5.7, 6.0, 6.5, and 7.2) or in 100 mM Tris–HCl buffer at pH 8.2 were mixed with substrate (12 mg/ml Na-caseinate) dissolved in the same buffer (at the same pH) at a 1:1 volume ratio and incubated for 24 h at 37 °C. A control was performed similarly without adding the bacterial cells. Protein hydrolysis and peptide formation was analysed by SDS–PAGE. Extent of hydrolysis was quantified by determination of the colour intensity of the protein fraction bands.

2.6.2. Effect of temperature

The cell suspension (in 100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.2) was mixed with Na-caseinate (12 mg/ml) dissolved in the same buffer at a 1:1 volume ratio and incubated for 24 h at 30, 37, and 42 °C. Control was prepared similarly except cells were not added. Protein hydrolysis and peptide formation were analysed by SDS–PAGE.

2.6.3. Effect of inhibitors

Whole cells were re-suspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2) to an approximate OD₆₀₀ of 10. Different inhibitors were added to the cellular suspension at a concentration of 10 mM and incubated at 37 °C for 1 h before adding the substrate (12 mg/ml Na-caseinate in 100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.2) at a 1:1 volume ratio and extending the incubation period for further 5 h. The tested inhibitors were EDTA, iodoacetic acid and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). PMSF (50 mM in isopropanol) was diluted in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) to a concentration equivalent to that used for other inhibitors. A sample prepared without addition of the bacterial cells served as control. Protein hydrolysis and peptide formation were analysed by SDS–PAGE.

2.7. SDS–PAGE

The samples were applied to a 12% polyacrylamide slab gel. The migration buffer contained 50 mM Tris, 0.384 M glycine and 0.1% SDS. After running at 10 mA on the stacking gel and 20 mA on the running gel, staining was performed with Coomassie Brilliant Blue followed by a convenient destaining. The gels were scanned with Image scanner III (GE Healthcare, USA) and the intensity of the bands was quantified by Image software. Analysis was performed by using Fuji Film Image Gauge V3.0 software (Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan). Data were expressed as the ratio of the area and intensity of the band. The reduction in the intensity of band during incubation with respect to the original intensity was expressed as percentage of hydrolysis.

2.8. RP–HPLC

RP–HPLC was performed to analyse the cell free supernatant of strains cultured on different milk protein sources in 100 mM phosphate buffer, pH 7. During incubation at 37 °C, 100 µl of the culture was withdrawn after different periods and diluted 1/1 (v/v) with 9 M urea then centrifuged (12 kg, 5 min) before injection on the column. The samples were separated with a C₁₈ symmetry column from Waters (2.1 × 150 mm) using a Waters (Milford, MA) HPLC system Alliance with the following conditions: flow-rate, 0.2 ml/min, solvent A, trifluoroacetic acid (TFA) 0.055% (v/v) in water, solvent B, acetonitrile/water/TFA, 80/20/0.045 (v/v/v). Elution was performed with a linear gradient of solvent B from 0% to 100% (45 min). Detection was performed with a Waters 996 photodiode

array detector at 220 nm. Data were analysed by Empower software (Waters).

3. Results and discussion

3.1. Identification of various LAB isolates

A collection of 293 isolates was isolated from traditional Egyptian dairy products. Examination with optical microscope allowed to classify 215 isolates as cocci of which 151 isolates were Gram-positive and catalase-negative (LAB). The isolated LAB cocci represented about 70% of cocci isolates, which is in agreement with Beukes et al. (2001) who collected different samples of fermented milk from different rural areas in South Africa and found a predominance of the Gram-positive and catalase-negative bacteria (LAB).

3.2. Proteolytic activity

3.2.1. Determination of proteolytic activity on skim milk agar

Skim milk agar technique was used to qualitatively examine the proteolytic activity of the 151 LAB cocci. Most of the examined isolates gave clear zones after 24 h of incubation (data not shown), showing their proteolytic activities. The size of the clear zone in skim milk agar indicates the extent of proteinases produced from *Lactobacilli* (Pailin et al., 2001). Based on the area and clarity of the clear zones, the isolates could be classified into 4 groups: I – highly (24 isolates), II – intermediately (33 isolates), III – poorly (70 isolates) and IV – non-proteolytic (24 isolates). The most proteolytic strains (24 isolates) were mainly found in the stored Domiatti cheese samples. This distinction is mainly due to the long duration of the storage of Domiatti cheese allowing the development of the proteolytic activity of the LAB. This result may clearly show that the development of different classes of proteolytic LAB was mainly dependent on the type and mode of cheese fabrication. Long duration of cheese storage most probably favored the development of highly proteolytic LAB in Domiatti cheese as compared to the short period of fresh Ras cheese ripening (45 days).

3.2.2. Determination of proteolytic activity on UHT skim milk

To determine the quantitative proteolytic activity, the 24 LAB cocci isolates showing the highest proteolytic activities on skim milk agar media were inoculated into UHT skim milk for 24 h at 37 °C and their proteolytic activity was observed by SDS–PAGE (Fig. 1). It can be seen that 14 isolates hydrolysed efficiently milk proteins after 24 h of cultivation while 10 isolates did not show measurable proteolytic activity. The extent of hydrolysis (Fig. 1) varied among these isolates showing 6 strains with very high proteolytic activity (samples 1, 2, 3, 4, 5, and 6). The sources of these highly proteolytic strains were stored Domiatti cheeses collected from different regions: Alexandria (samples 1 and 2), Damietta (sample 3) and Tanta (samples 4, 5, and 6).

These 6 isolates were further purified by cultivation on M17 and identified by 16S rDNA amplification and sequencing as the following strains: samples 1 and 5, *E. faecalis* HH22; samples 2, 3, 4, and 6, *E. faecium* DO623.

It can be concluded that the genus *Enterococci* was predominant in Egyptian dairy products, in accordance with the finding reported previously by El Soda, Ahmed, Omran, Osman, and Morsi (2003) who found that *Enterococci* represented more than 40% of the isolates among them the species *E. faecium* and *E. faecalis* represented 32% and 3%, respectively. Similarly, the level of enterococcal species in Roncal and Idiazábal cheeses after 120 days of ripening and in other types of ewe's-milk cheeses was reported as high (Arizcum, Barcina, & Torre, 1997) where the dominating

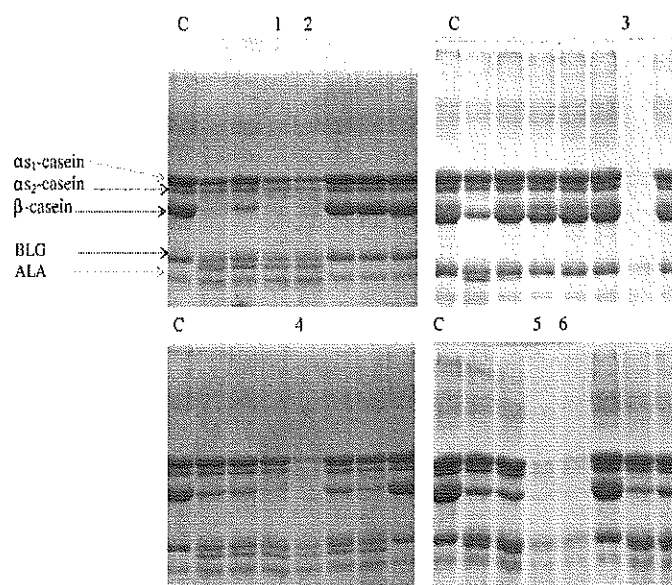


Fig. 1. SDS-PAGE (12%) of UHT skim milk treated with proteolytic LAB cocci isolates for 24 h at 37 °C. C: control. Samples 1 and 2: Domiatti cheese from Alexandria, Sample 3: Domiatti cheese from Damietta. Samples 4, 5 and 6: Domiatti cheese from Tanta.

species were *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, and *E. avium*. Moreover, it can be reported that the genus *Enterococci* was predominant among the highly proteolytic LAB cocci isolates. Although Domiatti cheese contains a high percentage of added salt, *Enterococci* can survive well in it since they can grow in salt concentration as high as 6.5% or more (Franz & Holzapfel, 2004, chap. 6).

3.3. Characterisation of *E. faecium* DO623 and *E. faecalis* HH22

3.3.1. Growth and acidification kinetics

Data in Fig. 2 (upper part) represent the growth (A_{600nm}) on M17 broth media and acidification curves of *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623 during 24 h of incubation at 37 °C. The exponential

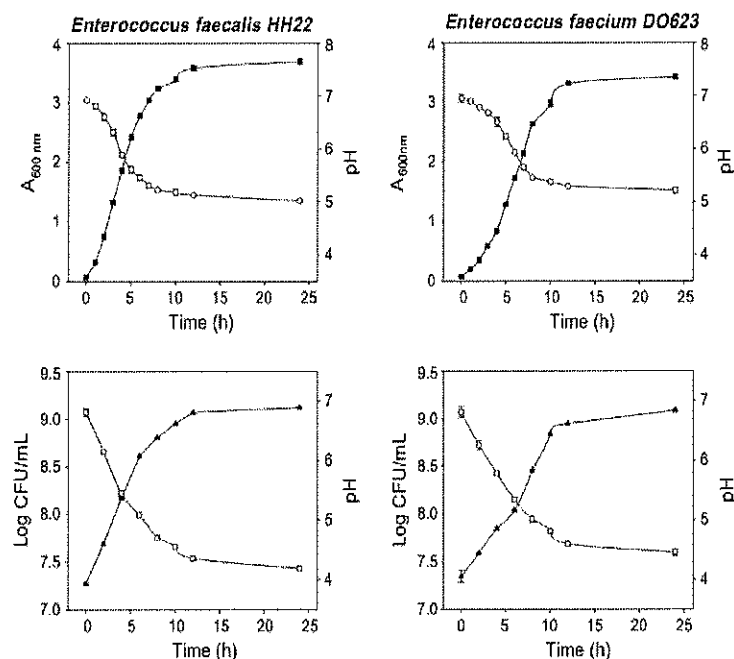


Fig. 2. Growth curve in M17 broth (■) or in skim milk (▲) and pH curve (○) of *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623 during incubation at 37 °C for 24 h. Experiments were performed three times and the results are expressed as mean plus the standard error.

(log) growth phase was reached between 2 and 7 h for *E. faecalis* HH22 and between 4 and 8 h for *E. faecium* DO623. The higher growth of *E. faecalis* HH22 was associated with higher acidification.

The maximal OD (A_{600nm}) obtained after 24 h incubation at 37 °C was 3.69 and 3.42 for *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623, respectively. The pH of *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623 decreased gradually from 6.92 to 5.02 and from 6.95 to 5.21, respectively, after 24 h of incubation at 37 °C in M17 broth.

Growth curve (log cfu/ml) in UHT skim milk and pH values were also measured (Fig. 2, lower part). After 24 h of incubation at 37 °C, the curve of the log of the total cell count simulated nearly that of A_{600nm} with minor deviations for the two strains mainly due to the complexity of the milk medium. When cultivated on UHT skim milk *E. faecalis* HH22 entered the log phase between 2 and 6 h while *E. faecium* DO623 entered the log phase between 6 and 10 h. It can be confirmed that the rate of growth of *E. faecalis* HH22 was higher than that of *E. faecium* DO623 in UHT skim milk and M17 broth media.

3.3.2. Determination of proteolytic activities

As revealed by SDS-PAGE (Fig. 3a and c), during incubation at 37 °C casein degradation (particularly β -casein) could be observed after 3 h with *E. faecalis* HH22 but only after 6 h with *E. faecium* DO623. The proteolysis extent increased with the time of incubation, reaching a maximum after 24 h. *E. faecalis* HH22 was more casein-degrading than *E. faecium* DO623. The degree of hydrolysis after 24 h incubation with *E. faecalis* HH22 reached 100% for all casein fractions (β -, α_{S1} -, and α_{S2} -caseins) while *E. faecium* DO623 degraded β -casein by 62%, α_{S1} -casein by 43% and α_{S2} -casein by 35% only. Hence, for *E. faecium* DO623, proteolytic activity was mainly directed against β -casein. Similar results were reported for home made yogurts where about 80–90% of β -casein were hydrolysed with lower hydrolysis levels in the case of α_{S1} - and α_{S2} -caseins under the action of 21 lactobacillus isolates collected from three types of Balkan home made yogurts (Tzvetkova et al., 2007). It can be concluded that the proteases of *E. faecalis* HH22

and *E. faecium* DO623 can be classified as PIII type, which degrades α_{S1} -, β - and κ -caseins, according to the protease classification of Kunji, Mierau, Hagting, Poolman, and Konings (1996).

The RP-HPLC profile of caseins hydrolysed by *E. faecalis* HH22 (Fig. 3b) showed that 24 h hydrolysis of caseins generated populations of medium sized peptides with moderate hydrophilic properties, eluting mainly in the time range 20–31 min while the peaks representing the intact casein fractions disappeared altogether. Single big peak and very small peaks appeared in the elution time range 10–20 min. Similarly, the RP-HPLC profile of the caseins hydrolysed for 24 h by *E. faecium* DO623 (Fig. 3d) showed that the generated peptides were mostly of medium sizes, but the peaks representing the intact caseins were still persistent albeit of smaller areas. These results are in agreement with those of Gardini et al. (2001) obtained with *E. faecalis* EF37. In conclusion, the rate of protein hydrolysis by *E. faecalis* HH22 was higher than that obtained in the presence of *E. faecium* DO623.

The proteolytic activity of *E. faecalis* HH22 on whey proteins was observed by SDS-PAGE (Fig. 4). Proteolysis was observed after 6 h of incubation at 37 °C for β -lactoglobulin (BLG) but not for α -lactalbumin (ALA). The extent of hydrolysis increased with the time of incubation to reach a maximum after 24 h, being 32% for whole whey protein (43% and 22% of BLG and ALA, respectively). *E. faecium* DO623 was inactive against whey proteins (data not shown).

Proteolysis of whey proteins with *E. faecalis* HH22 is similar to what was observed by Pescuma, Hébert, Mozzi, and Font de Valdez (2007) who reported that *Lactobacillus acidophilus* CRL 636, *Streptococcus thermophilus* CRL 804 and *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* CRL 454 hydrolysed the major whey proteins (21% and 26% of BLG and ALA, respectively). The differences in the observed extents of hydrolysis may be due to the different strains used in each study.

3.3.3. Effect of pH on proteolytic activities

As observed in Fig. 5 (upper part), there was no proteolysis at pH 5.4 by *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623. Proteolytic activity

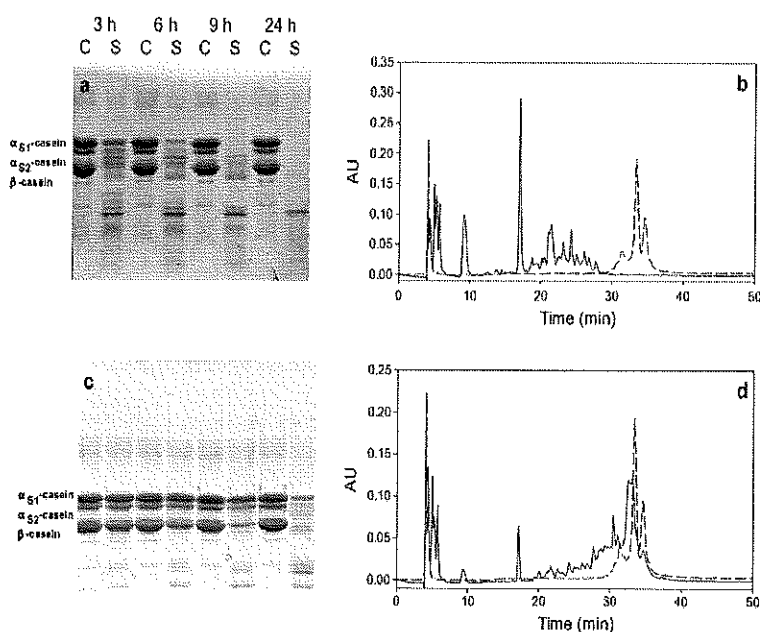


Fig. 3. SDS-PAGE (a and c) of Na-caseinate incubated for 3, 6, 9, and 24 h at 37 °C at pH 7.2 with *E. faecalis* HH22 (a and b) and *E. faecium* DO623 (c and d). RP-HPLC profiles (b and d) were obtained after 24 h hydrolysis. Sample (S, —) as compared to control (C, ---).

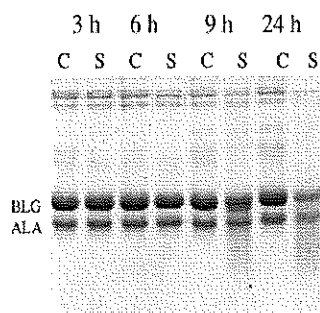


Fig. 4. SDS-PAGE profile of denaturated whey proteins incubated for 3, 6, 9, and 24 h at 37 °C at pH 7.2 with *E. faecalis* HH22 (S) as compared to control (C).

started to be perceived at pH 5.7 for strain *E. faecalis* HH22. Maximal protein degradation was observed in the 6.5–7.2 pH range for *E. faecalis* HH22 and at pH 6.5 for *E. faecium* DO623. Further increase of pH led to a decrease in proteolysis. However, the extent of hydrolysis at basic pH (7.2–8.2) was higher than in acidic pH (5.7–6.0) for the two strains. It can be concluded that the optimal pH of the proteolytic enzymes of these bacterial strains is 6.5 and that basic conditions are more favourable for proteolysis than acidic conditions. These results are in agreement with what was observed by Fira et al. (2001) who reported pH 6.5 as the optimal for the proteolytic activities of some thermophilic lactobacilli.

3.3.4. Effect of temperature on proteolytic activities

As shown in Fig. 5 (lower part), the highest proteolytic activity was observed at 42 °C, temperature at which 96% and 65% of caseins (α_{S1} -, α_{S2} -, and β -caseins) was degraded by *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623, respectively, after 24 h of incubation. Decrease of the temperature to 37 °C affected only slightly the proteolytic activity as the extent of casein degradation was maintained near 90% and 55% for *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623, respectively. Further decrease of the incubation temperature to 30 °C decreased greatly the proteolytic activities down to 59% and 47% for *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623, respectively. These results are also in agreement with those of Fira et al. (2001) who found that the optimal temperatures for β -casein degradation by the strains *L. acidophilus* BGRA43 and *L. delbrueckii* BGPF1 were 45 °C and 40 °C, respectively.

3.3.5. Effect of inhibitors on proteinase activities

The most important decrease of proteolytic activities of the two types of strains was observed (Fig. 6) in the presence of EDTA as compared to the control performed in the absence of inhibitor (no inhibition). Otherwise, addition of iodoacetic acid did not affect the rate of protein degradation. Meanwhile, addition of PMSF decreased only slightly protein proteolysis by 14% in the case of *E. faecalis* HH22 but did not affect the proteolysis induced by *E. faecium* DO623.

Since the proteolytic activity was mainly inhibited in the presence of EDTA, the protease systems of both of the tested strains consist mainly of metalloproteases. The small inhibition of proteolysis

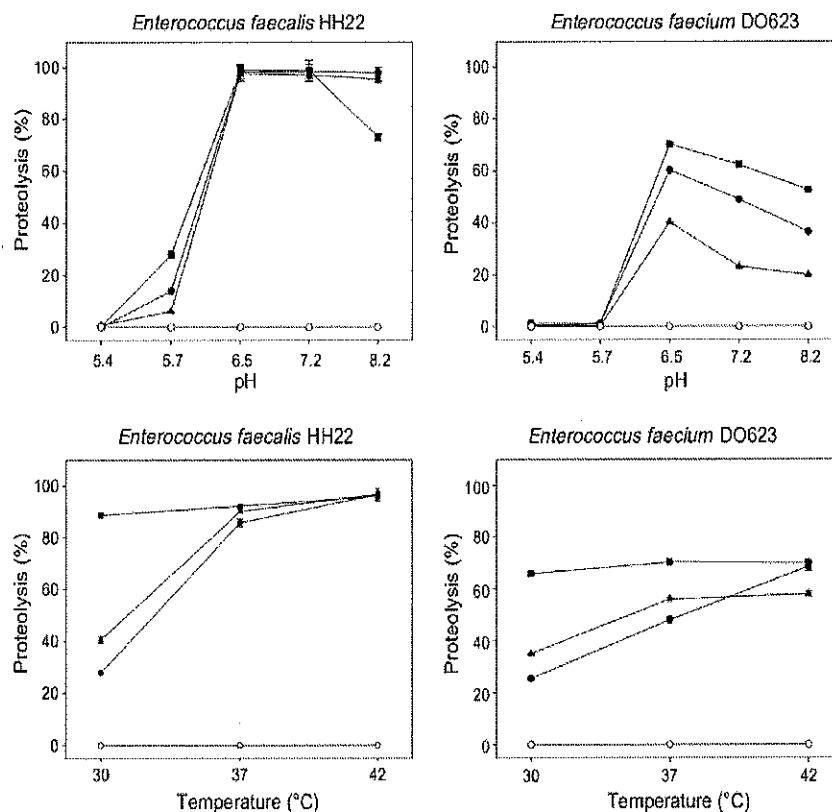


Fig. 5. Hydrolysis of Na-caseinate by *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623 at different pH values after 24 h incubation at 37 °C (upper part) and at different temperatures after 24 h incubation at pH 7.2 (lower part).

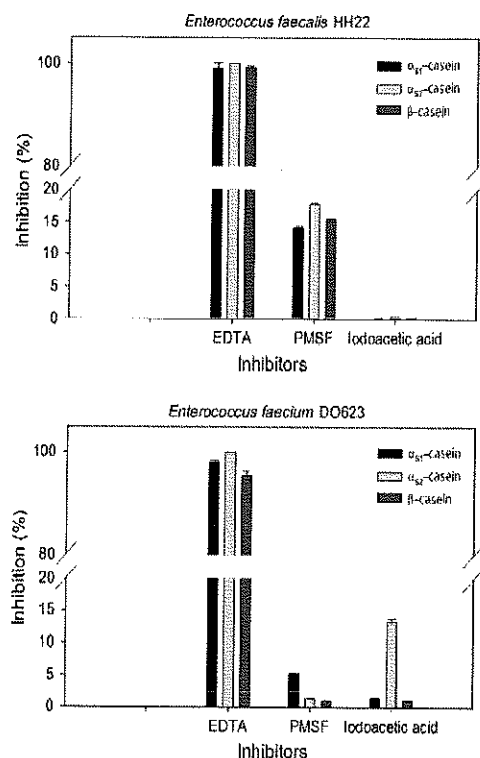


Fig. 6. Effect of inhibitors (EDTA, PMSF, Iodoacetic acid) on hydrolysis of Na-caseinate by *E. faecalis* HH22 and *E. faecium* DO623.

observed in the presence of PMSF in the case of *E. faecalis* HH22 may be due to the presence of small quantities of serine proteases in this strain in addition to the main metalloproteases in contrast with *E. faecium* DO623 whose protease system contains metalloproteases only. These results are in agreement with those of Pereira, Barreto Crespo, and San Romão (2001) and Del Papa, Hancock, Thomas, and Perego (2007) but disagree with those of Tsakalidou, Anastasiou, Vandenberghe, van Beeumen, and Kalantzopoulos (1999) who found the crude proteinase of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178 was strongly inhibited by PMSF but slightly inhibited by EDTA. These differences are due certainly to the different strains involved in each case.

4. Conclusion

The studied strains with their distinct proteolytic activity may be a well adapted tool for the production of new dairy products or may give the same traditional products but with different physicochemical and sensorial properties originating from the new specified proteolytic activity. Alternatively, the obtained proteolytic activity can be used in the production of hypoallergenic dairy products.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude for the support of this work in the frame of project #982164 "Study of antimicrobial and hypoallergenic products of lactic acid bacteria" to NATO Science for Peace program, and for the doctoral fellowship of Shady El Ghailsh to the Egyptian Ministry of Foreign Affairs and Education.

References

- Arizcun, C., Barcina, Y., & Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from raw milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Lait*, 77, 729–736.
- Beukes, E. M., Bester, H. B., & Mostert, J. F. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 189–197.
- Beuvier, S., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., et al. (1997). Ripening and quality of Swiss type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal*, 7, 311–323.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2001). Amino acid decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 185–189.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194–199.
- Del Papa, M. F., Hancock, L. L., Thomas, V. C., & Perego, M. (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 8835–8843.
- Delley, M., Mollet, B., & Hottinger, H. (1990). DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1967–1970.
- El Soda, M., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G., & Mossi, A. (2003). Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese making. *Emirates Journal of Agricultural Sciences*, 15(2), 51–71.
- Hira, D., Kojic, M., Banina, A., Spasojevic, I., Strahinic, I., & Topisirovic, L. (2001). Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 123–130.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379–1400.
- Franz, C. M. A. P., & Holzapfel, W. H. (2004). The genus *Enterococcus*: Biotechnological and safety issues. In A. von Wright, S. Salminen, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria* (3rd ed., pp. 199–247). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M., Galgano, F., Crudele, A. M., Favati, F., et al. (2001). Effects of pH, temperatures and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 105–117.
- Gelsomino, R., Vancannet, M., Condon, S., Swings, J., & Cogan, T. M. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheese making factory. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 177–188.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187–221.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611–15616.
- Pailin, T., Kang, D. H., Schmidt, K., & Fung, D. Y. C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 45–49.
- Pereira, C. I., Barreto Crespo, M. T., & San Romão, M. V. (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochil*. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 211–216.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Dalgalarondo, M., Haertlé, T., Mozzi, F., Chobert, J.-M., et al. (2009). Effect of exopolysaccharides on hydrolysis of β -lactoglobulin by *Lactobacillus acidophilus* CRL 836 in an in vitro gastric/pancreatic system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5571–5577.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2007). Hydrolysis of whey protein by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1738–1746.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2002). *Enterococcus faecium* in the microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 93–105.
- Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, I., van Beeumen, J., & Kalantzopoulos, G. (1999). Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: Characterization and specificity for β -casein. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2035–2040.
- Tzvetkova, I., Dalgalarondo, M., Danova, S., Iliev, I., Ivanova, I., Chobert, J.-M., et al. (2007). Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. *Journal of Food Biochemistry*, 31(5), 680–702.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspective and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21, 269–274.
- Wessels, D., Jooste, P. J., & Mostert, J. F. (1991). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from raw milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 349–352.
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimoda, M., & Okazaki, M. (2003). Purification and characterization of novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain BJ-11. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5746–5753.
- Zhu, Y., Zhai, Y., & Li, Y. (2009). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 597–610.

Chapitre I :

**Isolement et identification des bactéries lactiques (LAB) qui
présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers
traditionnels Égyptiens.**

**Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from
egyptian Ras cheese with proteolytic activity**

**El-Ghaish, S., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M.,
Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J.-M.**

European Food Research and Technology, 2010, 230: 635–643

RÉSUMÉ

Caractérisation d'un nouvel isolat de *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 du fromage Egyptien Ras présentant une activité protéolytique

Plus de deux cents isolats ont été obtenus de produits laitiers égyptiens traditionnels (fromage Domiatti, fromage Ras, et Laban Rayeb) collectés dans les marchés locaux d'Alexandrie, Tanta et Kafr El-Sheikh. Les isolats étaient examinés au microscope puis testés pour leur coloration de Gram et leur activité catalase. Les bactéries lactiques sont Gram-positives et catalase négatives. Huit isolats montraient une activité protéolytique sur le lait écrémé UHT. Ces isolats ont été purifiés et identifiés par amplification de l'ADNr et séquençage comme *Lactobacillus fermentum* IFO3956.

Une SDS-PAGE montre que le pH optimal d'activité protéolytique est de 6,5 et que la température optimale d'activité protéolytique est de 37 °C. Le profil RP-HPLC des hydrolysats de caséinate de sodium après protéolyse par *Lactobacillus fermentum* IFO3656 montre de nombreux peptides de taille moyenne. Pour le lactosérum, après analyse par SDS-PAGE 15%, l'activité protéolytique était limitée. Les résultats obtenus démontrent que les protéases sont principalement des métallo-protéases ; cependant des activités cystéine-protéase et sérine-protéase ne sont pas exclues.

Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity

Shady El-Ghaish · Michèle Dalgalarrrondo ·
Yvan Choiset · Mahmoud Sitohy · Iskra Ivanova ·
Thomas Haertlé · Jean-Marc Chobert

Received: 9 November 2009 / Revised: 8 December 2009 / Accepted: 13 December 2009 / Published online: 24 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract More than 200 isolates were obtained from 15 Egyptian traditional dairy products (Domiat cheese, Ras cheese and Rayeb milk) collected from local markets of Alexandria, Tanta and Kafr El-Sheikh. Examination with optical microscope of these dairy samples allowed to classify 92 bacilli, 64 of which were identified as lactobacilli. The proteolytic activity of lactobacilli isolates was tested on skim milk agar. Eight isolates showing a high proteolytic activity were further tested on UHT skim milk. The strain showing the highest proteolytic activity was purified and identified as *Lactobacillus fermentum* IFO 3656. The specific proteolytic activity of this strain and the factors affecting it (pH, temperature and presence of inhibitors) were studied. The proteolysis targeted mainly caseins (73% of whole casein), especially β -casein (85%). Smaller portions of whey proteins were proteolyzed (20%) essentially β -lactoglobulin. The proteolysis process gave rise to medium-sized peptide populations. The optimum conditions for the proteolysis activity of the studied strains were pH 6.5 and 37 °C. Proteolytic activities were very

slightly affected by the increase of the temperature to 42 °C or the pH to 8.2. The protease system of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 is most probably composed from a high amount of metalloproteases and small amount of cysteine and serine proteases.

Keywords Lactic acid bacteria · *Lactobacillus* · Cheese · Proteolysis

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are gram-positive, non-sporulating, catalase-negative, aero-tolerant, acid tolerant, nutritionally fastidious, strictly fermentative micro organisms that lack cytochromes and produce lactic acid as the major end product of carbohydrate metabolism. LAB play a key role in the biochemical events taking place during cheese ripening [1]. LAB are widely used in the dairy industry for their milk acidification and flavor development properties. The genera typically included under this group include *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* [2].

Lactobacilli can be found in a variety of natural ecological niches, such as plants or plant-derived materials, animals and in raw milk. Historically, lactobacilli have been deliberately introduced in fermented food products as a means of food preservation. Nowadays, they are considered as food additives for their putative probiotic properties. *Lactobacillus fermentum* is the major heterofermentative *Lactobacillus* species of the human gut and it is also widely employed in industrial fermentations as well as in starter cultures in the dairy industry [3]. *Lactobacillus fermentum* is included in the natural starter used for producing Parmigiano Reggiano cheese and in several other

S. El-Ghaish · M. Dalgalarrrondo · Y. Choiset · M. Sitohy ·
T. Haertlé · J.-M. Chobert (✉)
UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages,
INRA, 44300 Nantes, France
e-mail: chobert@nantes.inra.fr

M. Sitohy
Biochemistry Department, Faculty of Agriculture,
Zagazig University, Zagazig, Egypt

I. Ivanova
Department of General and Applied Microbiology,
Sofia University, Sofia, Bulgaria

Italian and Swiss cheeses [4]. *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus rhamnosus* are probiotic agents with proven efficacy in the treatment and prevention of urogenital infections in women [5]. The genus *Lactobacillus* presently embraces more than 50 recognized species of non-pathogenic bacteria, which in addition to their probiotic effects are indispensable agents for the fermentation of foods and feed. *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, isolated from fermented plant material, is an obligate hetero-fermentative organism, producing CO₂, ethanol, acetate and lactate from metabolized glucose [6].

The structural components of the proteolytic system of LAB can be divided into three groups on the basis of their function: (i) proteinases, which split caseins to peptides, (ii) peptidases hydrolyzing peptides and (iii) transport systems that translocate the breakdown products across the cytoplasmic membrane [7]. The ability to produce extracellular proteinases is a very important feature of LAB. These proteinases catalyze the hydrolysis of milk proteins, providing the amino acids essential for growth of LAB [8]. Proteolysis by microbial enzymes in yogurt is a desirable process improving milk digestibility and enhancing nutritional quality of yogurt [9, 10]. It is generally accepted that proteolytic system of LAB degrades proteins and hence changes the texture, the taste and the aromas of fermented products [11]. Proteolysis is often followed by a reduction of the number of epitopes and consequently by a decrease in allergenicity of hydrolyzed proteins [12].

The aim of the present work was to characterize and specify the proteolytic activity of the newly discovered proteolytically active strain *Lactobacillus fermentum* IFO 3956. The factors affecting this proteolytic activity e.g. pH, temperature, and presence of inhibitors were studied. Such a strain may be a good tool for the production of new dairy products or may give the same traditional products but with different physicochemical and sensorial properties originating from its new specified proteolytic activity. Alternatively, proteolytic activity of this strain can be used in the production of hypoallergenic dairy products.

Materials and methods

Samples collection

As much as 15 samples of traditional dairy products were obtained from the local markets of Egyptian cities: Alexandria, Tanta and Kafr El-Sheikh. Traditional dairy products include Domiatti cheese (soft cheese, rennet coagulated), Ras cheese (ripened hard cheese made from

rennet coagulated raw milk) and Rayeb milk (home made, fermented milk).

Isolation and identification of LAB cultures

As much as 10 g of each cheese sample was weighed, added aseptically to 90 mL of sodium citrate (2%, w/v) and homogenized in a sterile bag. The resulting homogenate was decimally and serially diluted using Ringer solution (0.9% NaCl [w/v]) up to 10⁻⁸. About 1 mL from each dilution was pour plated onto M 17 and de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar. In case of Rayeb milk, 10 mL of each sample was pipetted aseptically into 90 mL of Ringer solution and mixed thoroughly. Serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁸) were made and 1 mL of the appropriate dilution was pour plated onto M 17 and MRS agar [13]. All plates were incubated at 37 °C for 48 h. Colonies from M 17 and MRS agar plates were selected according to their shape and color from plates with colony numbers between 30 and 300 [14]. They were examined with an optical microscope for gram staining and catalase production. The cultures were classified as gram-positive, catalase-negative rods (lactobacilli) and gram-positive, catalase-negative (cocci). The cultures were streaked on suitable media for their purification. The purified strains were stored at -20 °C in sterile reconstituted skim milk (12.5% w/v) supplemented with 30% (w/v) glycerol [15].

Amplification and sequencing of 16S rDNA

DNA was extracted from the isolates according to Delley et al. [16] and was used as a template for 16S rRNA gene amplification. In the reaction universal primers rD1 (5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5' TAAGG AGGTGATCCAGGC3') were used [17]. DNA amplifications were performed in DNA thermal cycler model (Techno, Barloworld scientific, Cambridge, UK). Mix reaction contained: PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 1 mM of each primer and 40 ng DNA in a final volume of 50 µL. PCR amplifications were performed under the following conditions: denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 56 °C for 1.15 min and DNA extension at 72 °C for 1.15 min. A final extension was added at 72 °C for 5 min. Amplicons were analyzed on 1% (w/v) agarose gel with ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹) in 0.5 × TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) buffer, pH 8.2–8.4, for 30 min at 100 V and made visible by UV trans-illumination. DNA sequencing was carried out by MilleGen sequencing service (Labège, France).

Determination of growth and acidity curves

An overnight culture of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 was grown either in skim milk or in MRS broth (5% of culture starter, after shaking with vortex, the culture was divided into appropriate aliquots to be analyzed after certain time periods). The optical density (OD) of strain was followed at 600 nm with a HITACHI U-1100 UV-Visible spectrophotometer (Japan). The change of pH was determined using a pH meter [18]. Experiments were performed three times and the results are expressed as the average curve with the standard error bars.

Proteolytic activity

Proteolytic activity was followed qualitatively using the skim milk agar medium for screening and selection or quantitatively using different chemical techniques as follows.

Proteolytic activity screening (skim milk agar)

A 1.4% skim milk ("Délisse", UHT skim milk, France) agar (0.8%) was used. Egyptian dairy products were serially diluted with Ringer solution to 10^{-8} , mixed well and spread onto the plates. To detect extra cellular cell-bound proteinases, inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h. Protein digestion was observed by the production of clear halos surrounding colonies. A clear zone corresponding to proteolysis was accepted as a positive indicator of proteolysis [19].

Proteolytic activity on UHT skim milk

The different isolates were reactivated twice by combining 50 μ L of the previously prepared pre-culture with 950 μ L of "Délisse" UHT skim milk and incubated overnight at 37 °C. The last mixture was diluted 1/10 (v/v) in sample buffer containing 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and heated at 100 °C for 3 min then analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Proteolytic activity studied on whole casein and denatured whey protein

To analyze the proteolytic activity, a pre-culture was prepared by adding an aliquot of 50 μ L of the isolate Sh15-3 (*Lactobacillus fermentum* IFO 3956), stored at 4 °C, to 950 μ L MRS broth and incubated overnight at 37 °C.

An aliquot (~0.5 mL) of the activated pre-culture was applied to the top of milk-citrate agar (MCA) plates [8] containing 4.4% skim milk powder, 0.8% Na-citrate, 0.1% yeast extract, 0.5% glucose and 1.5% agar. The plates were incubated for 48 h at 37 °C prior to cell collection. Collected fresh cells were re-suspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2) and brought to final optical density (OD_{600}) of 10 just before application. One volume of the last suspension was combined with equivalent volume of the solutions of different milk protein fractions taken as substrates for determination of the proteolytic activity. The concentration of whey proteins (denatured by a heating at 85 °C for 20 min) was 5 mg mL⁻¹, while that of Na-caseinate was 12 mg mL⁻¹. The final mixtures were incubated for different periods (3, 6, 9 and 24 h) at 37 °C. Equivalent protein fraction solutions were incubated for the same periods without adding cells and served as controls. At the end of incubation periods, cells were pelleted by centrifugation (10 min at 8,000g) and the clear supernatant was analyzed by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).

Factors influencing proteolytic activity

Effect of pH

To determine the influence of pH on the proteinase activity, the reaction mixtures containing bacterial cells and casein were incubated either in 100 mM Na-phosphate buffer at different pH values (5.4, 5.7, 6.0, 6.5 and 7.2) or in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 8.2 for 24 h at 37 °C. The cell suspension was mixed with substrate dissolved in the same buffer at a 1:1 volume ratio. Na-caseinate (12 mg mL⁻¹) was used as substrate. Control was performed similarly without adding the bacterial cells. Protein hydrolysis and peptide formation was analyzed by SDS-PAGE and by the quantification of the extent of hydrolysis by the determination of the relative color intensity of the protein fraction bands.

Effect of temperature

The reaction mixtures containing cells and casein were incubated in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2) for 24 h at 30, 37 and 42 °C. The cell suspension was mixed with Na-caseinate (12 mg mL⁻¹) dissolved in the same buffer at a 1:1 volume ratio. Protein incubated for the same periods without adding cells was used as control. Protein hydrolysis and peptide formation was analyzed by SDS-PAGE.

Effect of inhibitors

Whole cells were re-suspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2) to an approximate OD_{600} of 10. Different inhibitors were added to the cellular suspension at a concentration of 10 mM and incubated at 37 °C for 1 h before adding the substrate (12 mg mL^{-1} Na-caseinate in 100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.2) at a 1:1 volume ratio and extending the incubation period for further 5 h. The tested inhibitors were EDTA, iodoacetic acid and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). PMSF (50 mM in isopropanol) was diluted in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) to equivalent concentration of the other inhibitors. Control was similarly prepared except the addition of the bacterial cells. Protein hydrolysis and peptide formation were analyzed by SDS-PAGE.

SDS-PAGE

The samples were applied to a 12% polyacrylamide slab gel. The migration buffer contained 50 mM Tris, 0.384 M glycine and 0.1% SDS. After running at 10 mA on the stacking gel and 20 mA on the running gel, staining was performed with Coomassie Brilliant Blue followed by a convenient destaining. The gels were scanned with Image scanner III (GE Healthcare, USA) and the intensity of the bands was quantified by Image software. Analysis was performed by using Fuji Film Image Gauge V3.0 software (Fuji Photo Film Co. Ltd. Japan). Data were expressed as the ratio of the area and intensity of the band. The reduction in the intensity of band during incubation with respect to the original intensity was expressed as percentage of hydrolysis [20].

RP-HPLC

RP-HPLC was performed to analyze the peptide profile arising from the enzyme activity of strains cultured on different milk protein sources in 100 mM phosphate buffer, pH 7. During incubation at 37 °C, 100 μL of the culture was withdrawn after different periods and diluted 1/1 (v/v) with 9 M urea then centrifuged (12,000g, 5 min) before injection on the column. The samples were separated with a Symmetry Waters ($2.1 \times 150 \text{ mm}$) using a Waters (Milford, MA) HPLC system with the following conditions: flow-rate, 0.2 mL min^{-1} ; solvent A, trifluoroacetic acid (TFA) 0.05% (v/v) in water; solvent B, acetonitrile/water/TFA, 80/20/0.045 (v/v/v). Elution was performed with a linear gradient of solvent B from 0 to 100% (45 min). Detection was performed with a Waters 996 photodiode array detector at 220 nm. Data were analyzed by Millenium32 software (Waters) as previously described [12].

Results and discussion

Identification of various LAB isolates

More than 200 isolates were isolated from traditional Egyptian dairy products collected from the local markets of three Egyptian cities, Alexandria, Tanta and Kafr El-Sheikh. Traditional dairy products included Domiatti cheese, Ras cheese and Rayeb milk. Examination with optical microscope of these dairy samples allowed to classify 92 rod-shaped bacilli isolates (Table 1) of which 64 isolates were gram-positive and catalase-negative (lactobacilli). The isolated lactobacilli represented about 70% of bacilli isolates, which is in accordance with Beukes et al. [13] who collected different samples of fermented milk from different rural areas in South Africa and found that the predominant microbial group was gram-positive and catalase negative (LAB).

The distribution (region and type of product) of 64 lactobacilli isolates is shown in Table 1. It can be observed that the majority (90%) of lactobacilli isolates were found in the samples collected from Kafr El-Sheikh and Tanta (26 and 32 isolates, respectively). A relatively little number (6 isolates), representing only 10% of the whole identified LAB strains, was collected from Alexandria. The geographical location, extent of urbanization and the enhanced industrialization activities in Alexandria compared to the countryside nature of the other two regions (Kafr El-Sheikh and Tanta) may explain the difference in the number of the developed LAB in the dairy products in each case.

It can be also observed that the majority of identified lactobacilli strains were isolated from Domiatti cheese, particularly in the case of Kafr El-Sheikh and Tanta samples, amounting to 65 and 60% of the total, respectively. This may be due to two factors: the moisture content and the duration of storage. Domiatti cheese has high moisture

Table 1 Identification of lactobacilli isolates in dairy products collected from Egyptian local regions

City	Dairy product	Number of samples	Number of isolates	
			Bacilli	Lactobacilli
Alexandria	Ras cheese	1	4	1
	Rayeb milk	2	5	3
	Domiatti cheese	2	3	2
Kafr El-Sheikh	Ras cheese	2	8	4
	Rayeb milk	2	5	5
	Domiatti cheese	2	20	17
Tanta	Ras cheese	1	7	4
	Rayeb milk	1	14	9
	Domiatti cheese	2	26	19
Total		15	92	64

content reaching up to 55–65% compared to 25–35% in the case of Ras cheese. Domiatti cheese samples were collected after 1–2 months of storage while Rayeb milk was stored for a maximum of 3 days. This may explain why the last product did not give rise to a big number of LAB in spite of its high moisture content.

Proteolytic activity

Proteolytic activity screening (skim milk agar)

Skim milk agar is an effective and rapid medium to detect the extracellular cell-bound proteinases as shown by a clear zone surrounding the colonies. Application of this technique to the 64 identified LAB showed that most of strains have given clear zones after 24 h of incubation (data not shown), showing their proteolytic activities. The strains can be classified into 4 groups according to the extent of their proteolytic activity based on the clear zone area: highly proteolytic (8 isolates), intermediate (17 isolates), poor (29 isolates) and non-proteolytic (10 isolates). The size of the clear zone in skim milk agar is determined by the extent of proteinases activity produced from lactobacilli [19].

The most proteolytic strains (8 isolates) were mainly found in the Ras cheese samples (6 isolates) while the non-proteolytic strains (10 isolates) were mainly isolated from Rayeb milk (6 isolates). This distinction is mainly due to the long ripening and storage duration in Ras cheese compared to a shorter duration in Rayeb milk. The proteolytic activity of the LAB is developed during long storage. An intermediate proteolytic activity (17 isolates) was mostly found in Domiatti cheese (13 isolates). This result may clearly show that the development of different classes of proteolytic LAB is mainly dependent on the type and protocol of cheese-making. Long duration of cheese ripening most probably favors the development of highly proteolytic LAB, as observed with the hard cheese samples (Ras cheese) with up to 6 months ripening durations.

Proteolytic activity studied with UHT skim milk

The 7 lactobacilli isolates showing the highest proteolytic activities on skim milk agar media were inoculated into UHT skim milk for 24 h at 37 °C and their proteolytic activity was observed by SDS-PAGE (Fig. 1). It can be shown that 6 strains proteolyzed efficiently the milk proteins after 24 h of cultivation (samples 1, 2, 3, 5, 6 and 7) while one strain gave very slight milk proteolysis (sample 4). The extent of proteolysis differentiated 3 strains showing very high degree of hydrolysis (samples 5, 6 and 7) and other 3 strains with relatively lower degrees of hydrolysis (samples 1, 2 and 3). The source of the highly

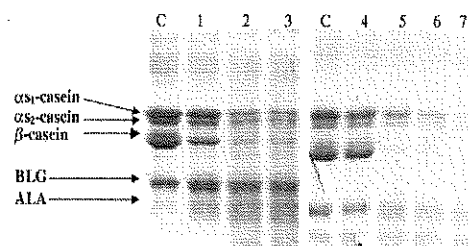


Fig. 1 SDS-PAGE of UHT skim milk treated with some proteolytic lactobacilli strains for 24 h at 37 °C

proteolytic strains was Ras cheese collected from Tanta while the source of low proteolytic strains was Ras cheese collected from Alexandria and Kafr El-Sheikh. Sample 7 showing the highest proteolytic activity was isolated from Ras cheese collected from Tanta (code Sh15-3). This strain was purified by cultivation on MRS and identified by 16S rDNA amplification and sequencing as *Lactobacillus fermentum* IFO 3956.

Characterization of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956

Growth and acidification kinetics

Data in Fig. 2a represent the growth and acidification curves of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 in MRS broth media during 24 h of incubation at 37 °C. Growth exponential (log) phase comprised between 4 h and 12 h. Similarly, the exponential phase of acid development occurred around the same period (between 4 and 11 h). The pH of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 decreased gradually from 6.5 to 3.5 after 24 h of incubation at 37 °C in MRS broth where the cell optical density (OD₆₀₀) reached a maximum of 3.9.

Growth curve and pH values were also measured after replacing MRS broth media by UHT skim milk (Fig. 2b); after 24 h growth, the log of the total cell count was calculated instead of the OD₆₀₀. Similar growth and acidity development curves were obtained with minor deviations due to the complexity of the milk media (Fig. 2b). When cultivated on UHT skim milk the bacteria entered the log phase after 3 h against 4 h in the case of MRS broth thanks to the richer nutritional source in the case of UHT milk. Additionally, the milk media is more convenient for lactobacilli strains being its original source. Pereira et al. [21] found that *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus homohatchii* isolated from meat source showed higher proteolytic activity when grown in a peptone-rich medium, such as MRS. On UHT skim milk, the pH decreased from 6.88 to 3.5 after 24 h of incubation at 37 °C. At the same time, the log of bacterial cell count reached a maximum of 9.0–9.5 (CFU⁻¹) after the same period of incubation

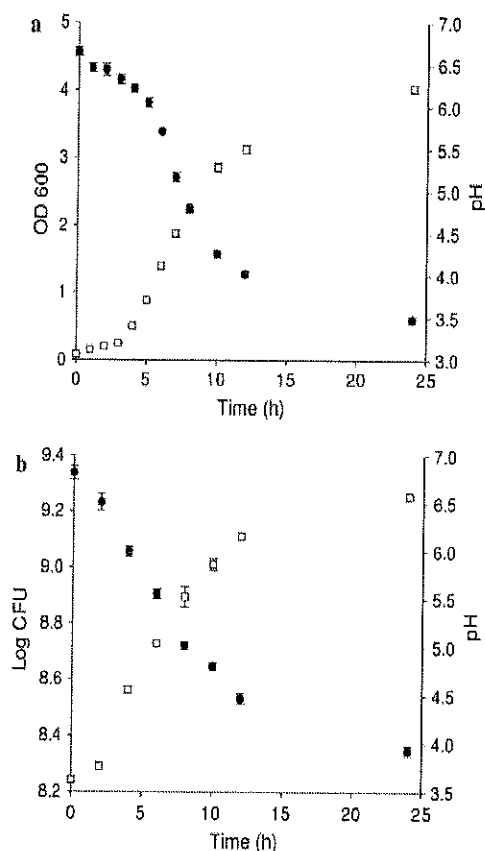


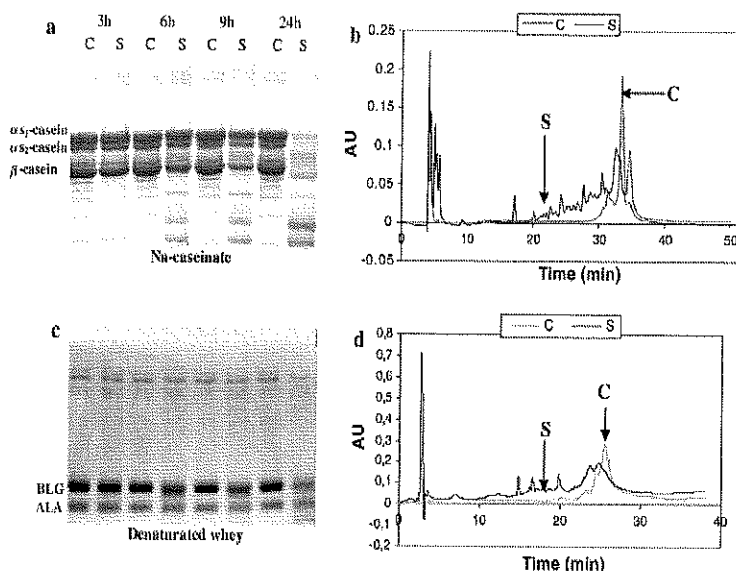
Fig. 2 Growth curve (open square) and pH value (filled circle) of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 grown in MRS broth (a) and skim milk (b) at 37 °C during 24 h

(24 h). These results are in agreement with those obtained by Vrancken et al. [22] who studied the growth, sugar consumption, lactic and acetic acids production and mannitol production of *Lactobacillus fermentum* IMDO 1301.01 and found that the maximum cell density was obtained between pH 4.0 and 7.0.

Proteolytic activity on casein and denaturated whey proteins

Lactobacillus fermentum IFO 3956 was grown in milk citrate agar and after 48 h of incubation at 37 °C the bacterial cells were harvested and brought into a suspension of 10 OD₆₀₀ in 100 mM Na-phosphate buffer pH (7.2). Solutions of Na-caseinate (12 mg mL⁻¹) in the same buffer were combined with the bacterial cell suspensions at 1:1 (v/v) ratio. After 3, 6, 9 and 24 h of incubation casein hydrolysis was revealed by SDS-PAGE (Fig. 3a). Proteolysis could be observed after 6 h of incubation at 37 °C, especially for β -casein. The proteolysis increased with the time of incubation reaching a maximum after 24 h. All milk protein fractions were proteolyzed albeit at different degrees. Calculation of the extent of hydrolysis (after 24 h incubation) by the determination of the relative color intensity of the protein fraction bands shows that β -casein was the most proteolyzed (85%) followed by α _{S1}-casein (68%) then α _{S2}-casein (47%). Consequently, it can be concluded that the proteases of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 may be classified as PIII type, which proteolyzes α _{S1}-, β - and κ -caseins according to Kunji et al. [7]. Similar data were reported by Tzvetkova et al. [23] on 21 lactobacillus isolates collected from three types of Balkan home

Fig. 3 SDS-PAGE (a and c) and RP-HPLC (b and d) profiles of Na-caseinate and denaturated whey proteins incubated for different periods (3, 6, 9 and 24 h) with *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 (S) as compared to control (C) at 37 °C



made yogurts, indicating that about 80–90% of β -casein was hydrolyzed with lower hydrolysis levels in the case of α_{S1} - and α_{S2} -caseins. The RP-HPLC profiles (Fig. 3b) of the same samples show that hydrolysis of milk proteins generated medium-sized peptide populations with moderate hydrophilic properties, eluting mainly in the time range 20–31 min. Very small peaks appeared in the elution time range 10–20 min.

In another set of experiments, the suspensions of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 were combined with whey proteins solutions (5 mg mL^{-1}) at 1:1 (v/v) ratio. After 3, 6, 9 and 24 h of incubation whey hydrolysis was revealed by SDS-PAGE (Fig. 3c). Proteolysis started to be observed after 6 h of incubation at 37°C for β -lactoglobulin (BLG) but not for α -lactalbumin (ALA). The extent of hydrolysis increased with the time of incubation to reach a maximum after 24 h. BLG was proteolyzed (35%) while ALA was not. The RP-HPLC profile (Fig. 3d) of the hydrolysate showed the presence of small-sized peptide populations with moderate hydrophilic properties appearing mainly in the elution time range 10–20 min. Only one small peak appeared in the elution time range 5–10 min. In conclusion, the proteolysis process targeted mainly caseins and in particular β -casein (85% proteolysis) while smaller quantities of whey proteins were proteolyzed (20%), and mainly BLG. Pescuma et al. [24] reported that *Lactobacillus acidophilus* CRL 636, *Streptococcus thermophilus* CRL 804 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* CRL 454 hydrolyzed the major whey proteins (BLG and ALA) by 21% and 26%, respectively. These differences in the percentage of hydrolysis may be due to the different strains used in each study.

Effect of pH on proteolytic activity

Lactobacillus fermentum IFO 3956 was grown in milk citrate agar and after 48 h of incubation at 37°C the cells were transferred into a suspension of $10 \times \text{OD}_{600}$ at different pHs (5.4–7.2) in 100 mM Na-phosphate buffers or in Tris-HCl (pH 8.2). Solutions of Na-caseinate (12 mg mL^{-1}) with similar pH values were combined with the cell buffer with the corresponding pH. After 24 h of incubation, hydrolysis of casein was observed by SDS-PAGE (Fig. 4). There was no proteolysis at pH 5.4. Proteolytic activity started to be perceived at pH 5.7 and reached a maximum at pH 6.5. Further increase of pH value led to a decrease in proteolytic activity. However, the extent of hydrolysis at basic pH (7.2–8.2) was higher than that in acidic pH (5.7–6.0). It can be concluded that the optimal pH of the proteolytic enzymes of this bacterial strain is 6.5 and that basic conditions are more favorable for proteolysis than acidic conditions. These results remain in agreement with what was proposed by Fira et al. [8] who determined proteolytic activities of some

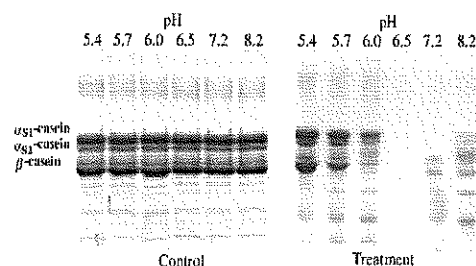


Fig. 4 SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolyzed by *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 at different pH values after 24 h incubation at 37°C

thermophilic lactobacilli the optimal pH of which was found to be 6.5.

Effect of temperature on proteolytic activity

To determine the influence of temperature on the proteolytic activity of the strain *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, similar experiments as described above were performed except that the bacteria cells were transferred to phosphate buffer pH 7.2 and after adding to the casein solutions (12 mg mL^{-1}), the solutions were incubated at different temperatures (30°C , 37°C and 42°C) before following the proteolysis of caseinate by SDS-PAGE (Fig. 5). The highest proteolytic activity was observed at 37°C , temperature at which 57% of caseinate was proteolyzed after 24 h of incubation. Raising the temperature up to 42°C slightly affected the proteolytic activity as the extent of casein hydrolysis was maintained near 55%. Otherwise,

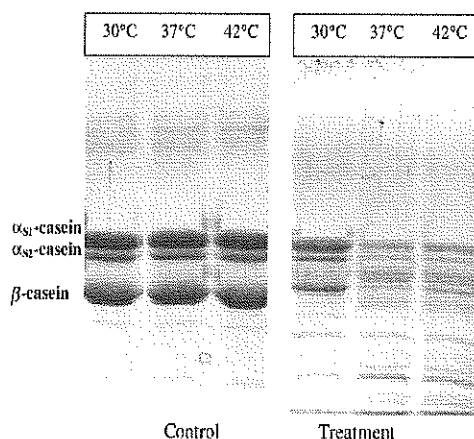


Fig. 5 SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolyzed by *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 at different temperatures after 24 h incubation at pH 7.2

lowering the incubation temperature to 30 °C decreased the proteolytic activity since the extent of casein hydrolysis was only 31%. These results are in agreement with those of Fira et al. [8] who found that the optimal temperatures for β -casein proteolysis by the strains *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 and *Lactobacillus delbrueckii* BGPF1 were 45 and 40 °C, respectively.

Effect of inhibitors on proteinase activity

Three protease inhibitors, EDTA, iodoacetic acid and PMSF, were added at a concentration of 10 mM to the cell suspension ($10 \times OD_{600}$) of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 in 100 mM Na-phosphate buffer, pH 7.2, for 1 h incubation at 37 °C before adding to Na-caseinate solution (12 mg mL^{-1}) at 1:1 (v/v) ratio. The incubation was extended for another 5 h before taking the samples to determine the proteolysis by SDS-PAGE (Fig. 6). Inhibitors decreased the extent of proteolysis as compared to control performed in absence of inhibitor (lane 2). The most important decrease of proteolytic activity was observed in the presence of EDTA (lane 3) while PMSF (lane 4) and iodoacetic acid (lane 5) only slightly decreased proteolysis. β -Casein was proteolyzed by 59% in the absence of inhibitor. This extent of hydrolysis was reduced close to 0 after the addition of EDTA as compared to 52%

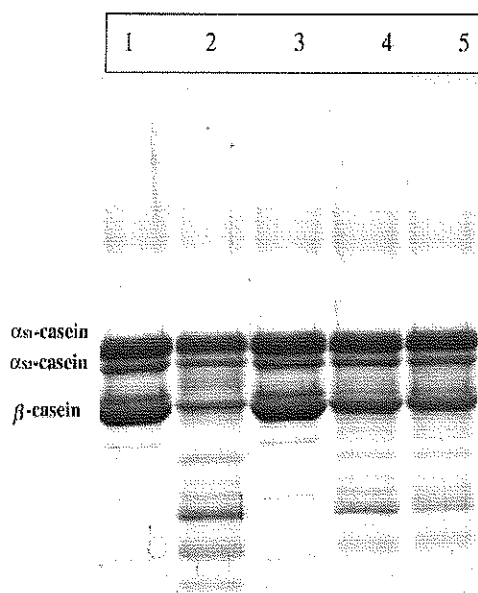


Fig. 6 SDS-PAGE of Na-caseinate treated with *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 in the presence of EDTA (lane 3), PMSF (lane 4) and iodoacetic acid (lane 5). Lane 1 Na-caseinate, lane 2 Na-caseinate treated by *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 in absence of inhibitors

in the presence of other inhibitors (iodoacetic acid and PMSF). Additionally, in the presence of EDTA, the extent of proteolysis of α_{S1} - and α_{S2} -caseins was close to zero compared with 15.4 and 23.5% of hydrolysis obtained, respectively, in its absence. Iodoacetic acid and PMSF did not affect the proteolysis extent of α_{S5} -caseins.

Since all three types of inhibitors tested exert an effect on proteolysis, it can be concluded that the strain *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 may produce several types of proteases. The proteolytic activity was mainly inhibited by the presence of EDTA, showing that the dominant proteases are metalloproteases. The slight inhibition of proteolysis observed in the presence of iodoacetic acid and of PMSF demonstrated that proteolytic system of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 may contain also cysteine proteases and a small proportion of serine proteases. These results agree with those of Pereira et al. [21] but disagree with those of Tsakalidou et al. [25] who found the crude proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178 was strongly inhibited by PMSF but only slightly inhibited by EDTA. These differences are likely due to the differences in the strains studied.

Conclusions

In conclusion, the new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3656 from Egyptian Ras cheese showed significant proteolytic activity. The proteolysis process targeted mainly caseins, showing a hydrolysis extent of 73% of whole casein with β -casein being the most proteolyzed (85%) while only smaller portion of whey proteins were hydrolyzed (20%) mainly β -LG. Proteolysis process mainly gives rise to medium-sized peptide populations, which will favor the production of good quality milk products treated by this strain. The optimal pH of proteolytic activity of this bacterial strain is 6.5 and also somewhat more basic conditions are more favorable for the proteolysis than acidic conditions. The optimal temperature for *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 proteases is 37 °C but they are still more active at higher temperatures (42 °C) than at lower temperature (30 °C). The protease system of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 is mainly composed of metalloproteases with small amounts of cysteine proteases and serine proteases. The obtained proteolytic activity could be used in the production of hypoallergenic dairy products.

Acknowledgments We would like to express our gratitude for the support of this work in the frame of project # 982164 "Study of antimicrobial and hypoallergenic products of lactic acid bacteria" to NATO Science for Peace program, and for the doctoral fellowship of Shady El Ghaish to the Egyptian Ministry of Foreign Affairs and Education.

References

- Di Cagno R, de Angelis M, Upadhyay VK, McSweeney PLH, Minervini F, Gallo G, Gobetti M (2003) Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *Int Dairy J* 13:145–157
- Courtin P, Rul F (2004) Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as study model. *Lait* 84:125–134
- Dickson EM, Riggio MP, Macpherson L (2005) A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *J Med Microbiol* 54:299–303
- Smacchi E, Gobetti M (1998) Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactobacillus fermentum* DT41. *FEBS Microbiol Lett* 166:197–202
- Reid G (1999) The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 65:3763–3766
- Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa K, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKey LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res* 15:151–161
- Kunji ERS, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:187–221
- Fira D, Kujic M, Banina A, Spasojevic I, Strahinic I, Topisirovic L (2001) Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J Appl Microbiol* 90:123–130
- Abraham AG, de Antoni GL, Añon MC (1993) Proteolytic activity of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk. *J Dairy Sci* 76:1498–1505
- Zourari A, Accolas J-P, Desmazeaud MJ (1992) Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72:1–34
- McSweeney PLH, Sousa MJ (2000) Biochemical pathway for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80:293–324
- Bertrand-Harb C, Ivanova IV, Dalgalarrrondo M, Haertlé T (2003) Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *Int Dairy J* 13:39–45
- Beukes EM, Bester HB, Mostert JF (2001) The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int J Food Microbiol* 63:189–197
- Öksüztepe G, Patir B, Calicioglu M (2005) Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum cheese. *Turk J Vet Anim Sci* 29:873–879
- Moulay M, Aggad H, Benmechene Z, Guessas B, Henni DE, Kihal M (2006) Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World J Dairy Food Sci* 1:12–18
- Delley M, Mollet B, Hottinger H (1990) DNA Probe for *Lactobacillus delbrueckii*. *Appl Environ Microbiol* 56:1967–1970
- Weisburg WG, Barns SM, Peletier DA, Lane DJ (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bact* 173:697–703
- Ammor S, Dufour E, Zagorec M, Chaillou S, Chevallier I (2005) Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiol* 22:529–538
- Pailin T, Kang DH, Schmidt K, Fung DY (2001) Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Let Appl Microbiol* 33:45–49
- Ong L, Henriksson A, Shah NP (2006) Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lh. casei*, *Lh. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int Dairy J* 16:446–456
- Pereira CI, Barreto Crespo MT, San Romão MV (2001) Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int J Food Microbiol* 68:211–216
- Vrancken G, Rimaux T, de Vuyst L, Leroy F (2008) Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO130101 reveals adaptation to acidic sourdough ecosystem. *Int J Food Microbiol* 128:58–66
- Tzvetkova I, Dalgalarrrondo M, Danova S, Iliev I, Ivanova I, Chobert J-M, Haertlé T (2007) Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. *J Food Biochem* 31:680–702
- Pescuma M, Hébert EM, Mozzi F, Font de Valdez G (2007) Hydrolysis of whey protein by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *J Appl Microbiol* 103:1738–1746
- Tsakalidou E, Anastasiou R, Vandenbergh I, van Beeumen J, Kalantzopoulos G (1999) Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: characterization and specificity for β -casein. *Appl Environ Microbiol* 65:2035–2040

TRAVAUX COMPLEMENTAIRES

CHAPITRE I

Isolement et identification des bactéries lactiques (LAB) qui présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers traditionnels égyptiens

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Isolement des isolats de LAB

Sept-cent deux isolats ont été isolés des produits laitiers égyptiens collectés dans différentes régions (Tableau 10). Après purification sur les milieux MRS et M17, les isolats étaient examinés au microscope puis testés pour leur coloration de Gram et leur activité catalase. Les bactéries lactiques sont Gram-positives et catalase négatives. Les isolats ont été classés en bâtonnets (173 isolats) et coques (330 isolats), démontrant la prédominance des coques par rapport aux bâtonnets, ce qui est en accord avec les résultats d'El Soda et al. (2003) et El-Baradei et al. (2008).

Tableau (10): Distribution des bactéries lactiques qui présentent une forte activité protéolytique dans les produits laitiers traditionnels égyptiens

Ville	Produits Laitiers	Nombre d'échantillons	Bactéries		Bactéries lactiques		Bactéries lactiques protéolytiques	
			Coques	Bacilles	Coques	Bacilles	Coques	Bacilles
Alexandrie	Fromage Ras	5	12	3	9	2	2	1
	Fromage Cheddar	3	8	0	6	0		1
	Fromage Domiatti	5	22	2	14	2	2	
	Fromage Kareish	3	16	7	9	5		
	Laban rayeb	4	19	4	13	3		

Kafr El-Sheikh	Fromage Ras	4	8	7	5	6	2	2
	Fromage Cheddar	3	7	1	6	1		
	Fromage Domiatti	5	45	17	27	15	2	
	Fromage Kareish	3	31	16	21	14	1	
	Laban rayeb	3	27	4	18	3		
Tanta	Fromage Ras	5	31	6	19	5	3	3
	Fromage Cheddar	3	9	3	8	3		1
	Fromage Domiatti	5	51	23	32	20	3	
	Fromage Kareish	3	23	21	17	18		
	Laban rayeb	3	31	13	24	10	1	
Damiette	Fromage Ras	4	23	12	13	10	1	1
	Fromage Cheddar	3	13	5	10	4		
	Fromage Domiatti	3	41	29	29	25	1	1
	Fromage Kareish	5	47	14	28	12		
	Laban rayeb	3	31	20	22	15		1
Total		75	495	207	330	173	18	11

Fromage Ras (Fromage dur, coagulation enzymatique, maturation)

Fromage Domiatti (Fromage doux, coagulation enzymatique, salé et frais, stocké)

Fromage Kareish (Légèrement salé, fromage doux, coagulation acide)

Laban rayeb (Produit laitier fermenté)

Activité protéolytique

Activité protéolytique mesurée sur du lait écrémé UHT

Cinq-cents trois isolats de LAB (bâtonnets : 173 isolats et coques : 330 isolats) ont été testés pour déterminer leur activité protéolytique sur du lait UHT écrémé pendant 24 h à 37 °C. Les différents isolats ont été réactivés deux fois en mélangeant 50 µl de la pré-culture à 950 µl de lait UHT écrémé de marque « Délissee », suivi d'une incubation d'une nuit à 37 °C. Le mélange a été ensuite dilué au 1/10 (v/v) dans du tampon échantillon et chauffé à 100 °C pendant 3 min, puis analysé par électrophorèses sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Quarante-deux isolats montraient une activité protéolytique sur le lait UHT écrémé après une incubation de 24 h à 37 °C. Les isolats ont été classés en bacilles (17 isolats) et coques (25 isolats) (Fig. 2).

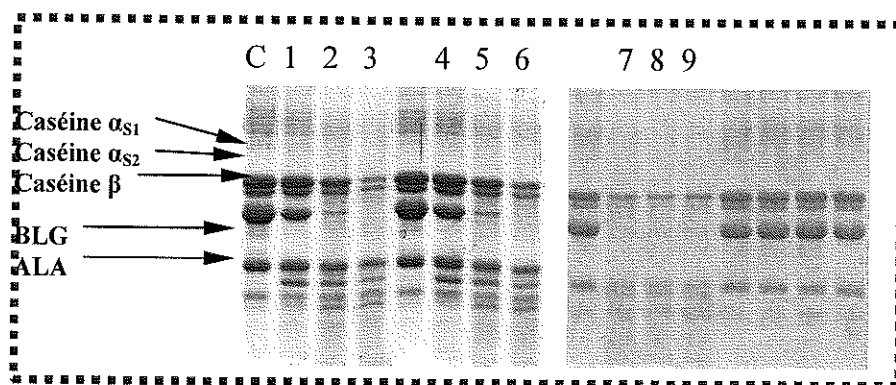


Fig. 2: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en présence de différents isolats et contrôle sur du lait UHT écrémé. C : Contrôle sans isolat ; 1, 3, 4, 6, 7, 9 : coques obtenus à partir de fromage Ras ayant subi une maturation et originaire de Tanta ; 2, 5 et 8 : lactobacilles

Activité protéolytique déterminée sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé

Les 42 isolats montrant une activité protéolytique sur le lait UHT écrémé après une incubation de 24 h à 37 °C ont été repiqués (5% inoculum) dans les milieux MRS et M17. Ces isolats ont été alors testés sur le milieu Milk-Citrate-Agar (MCA) (Fira et al., 2001). Les cellules ont été mélangées avec les différents substrats : caséinate de sodium (12 mg/ml) et lactosérum dénaturé par un chauffage à 85 °C pendant 20 min (5 mg/ml) (1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à 37°C. À la fin de la période d'incubation, une centrifugation était réalisée (10 min à 8000 g) et le surnageant clair prélevé puis analysé par SDS-PAGE. Vingt-neuf isolats (bacilles : 11 isolats et coques : 18 isolats) montraient une activité protéolytique sur le caséinate de sodium après une incubation de 24 h à 37 °C (Fig. 3). Pour le lactosérum, après analyse par SDS-PAGE 15% (Fig. 3) l'activité protéolytique était limitée.

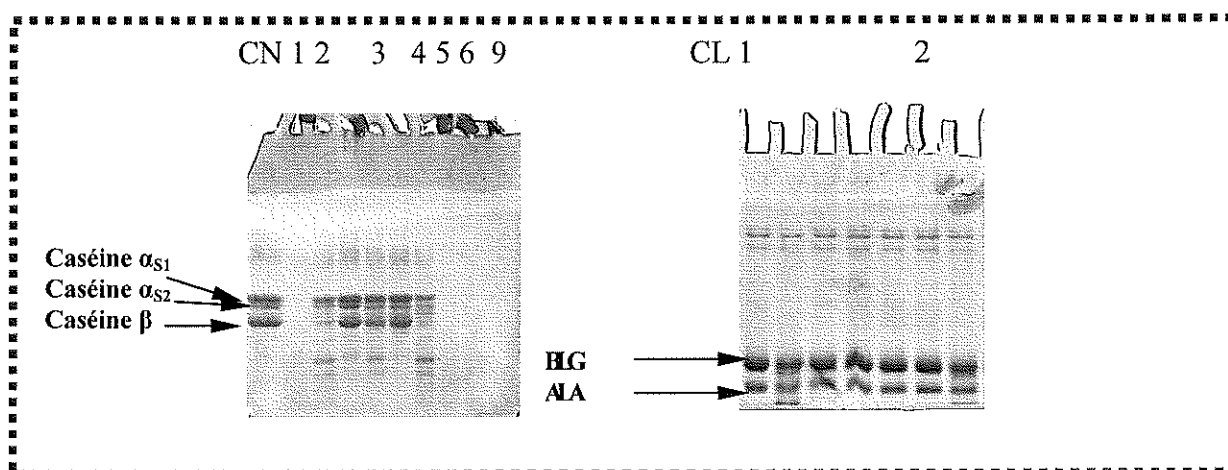


Fig. 3: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en présence des différents isolats et contrôle sur du lait UHT écrémé. CN, CL : Contrôles ; 1, 3, 4, 6, 9 : Coques obtenus à partir de fromage Ras ayant subi une maturation et originaire de Tanta ; 2, et 5 : Lactobacilles

Ces isolats ont été purifiés et identifiés par amplification de l'ADNr 16S et séquençage comme étant : *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (3 isolats), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (4 isolats), *Lactobacillus plantarum* JDM1 (4 isolats), *Enterococcus faecium* DO623 (5 isolats), *Enterococcus faecium* E1162 (1 isolat), *Enterococcus faecium* C68 (4 isolats), *Enterococcus faecalis* HH22 (6 isolats), *Enterococcus faecalis* T8 (2 isolats) (Tableau 11). On peut en conclure que le genre *Enterococcus* est prédominant dans les produits laitiers égyptiens, ce qui est en conformité avec les résultats présentés précédemment par El Soda et al. (2003).

Tableau (11): Distribution et identification des souches protéolytiques collectées à partir des produits laitiers Égyptiens

No.	Code	Nom	Produits Laitiers	Ville
1	Sh14-2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956	Fromage Ras	Alexandrie
2	Sh 15-3	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956	Fromage Ras	Tanta
3	Sh 2-1	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956	Laban Rayeb	Damiette
4	Sh 16-1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2	Fromage Cheddar	Alexandrie
5	Sh 20-4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2	Fromage Ras	Kafr El-Sheikh
6	Sh31-2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2	Fromage Ras	Kafr El-Sheikh
7	Sh50-2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2	Fromage Ras	Tanta
8	Sh 34-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	Fromage Cheddar	Tanta
9	Sh3BSM	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	Fromage Domiatti	Damiette
10	Sh4BSM	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	Fromage Ras	Damiette
11	Sh 40-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	Fromage Ras	Tanta
12	Sh 9-1	<i>Enterococcus faecium</i> DO623	Fromage Domiatti	Tanta
13	Sh7-7	<i>Enterococcus faecium</i> DO623	Fromage Domiatti	Alexandrie
14	Sh12-2	<i>Enterococcus faecium</i> DO623	Fromage Domiatti	Tanta
15	Sh14-2	<i>Enterococcus faecium</i> DO623	Fromage Domiatti	Damiette
16	Sh25-3	<i>Enterococcus faecium</i> DO623	Fromage Ras	Alexandrie
17	Sh 17-3	<i>Enterococcus faecium</i> E1162	Fromage Kareish	Kafr El-Sheikh
18	Sh18-5	<i>Enterococcus faecium</i> C68	Fromage Ras	Kafr El-Sheikh
19	Sh 48-2	<i>Enterococcus faecium</i> C68	Fromage Domiatti	Kafr El-Sheikh
20	Sh 18-3	<i>Enterococcus faecium</i> C68	Fromage Ras	Alexandrie
21	Sh24-2	<i>Enterococcus faecium</i> C68	Fromage Ras	Tanta
22	Sh 39-2	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	Fromage Ras	Damiette
23	Sh 11-3	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	Fromage Domiatti	Alexandrie
24	Sh 13-4	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	Fromage Domiatti	Tanta
25	Sh 63-1	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	Fromage Ras	Tanta
26	Sh 1-5	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	Fromage Ras	Kafr El-Sheikh
27	Sh 43-5	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	Fromage Domiatti	Kafr El-Sheikh
28	Sh 3-5	<i>Enterococcus faecalis</i> T8	Fromage Ras	Tanta
29	Sh 27-3	<i>Enterococcus faecalis</i> T8	Laban Rayeb	Tanta

Détection des facteurs de virulence

Pour des impératifs de sécurité, il est indispensable de mettre en évidence l'absence de facteur de virulence, notamment les gènes « transférables » conférant la résistance aux antibiotiques chez la souche étudiée. Cette démarche permet de valider l'utilisation de cette souche bactérienne comme ferment ou en co-culture dans les processus et les matrices alimentaires. L'ADN génomique des bactéries *Enterococcus faecium* DO623, *Enterococcus faecium* E1162, *Enterococcus faecium* C68, *Enterococcus faecalis* HH22, *Enterococcus faecalis* T8 a été utilisé comme matrice pour l'identification des gènes codant pour des facteurs de virulence connus : *asal*, *cyl A* et *cyl*, *ace*, *efaAfs* et *espfm*. Leur présence a été vérifiée par amplification spécifique des gènes concernés grâce à des amorces spécifiques

détaillées dans le Tableau 9, par PCR classique. *Enterococcus faecalis* MM4594 a été utilisé comme contrôle positif. Les gènes *asal*, *cyl A*, *ace* ont été trouvés dans *Enterococcus faecium* DO623, *Enterococcus faecium* E1162, *Enterococcus faecium* C68, *Enterococcus faecalis* HH22 et *Enterococcus faecalis* T8 mais les gènes *cyl B* et *espfm ace* n'ont été trouvés dans aucune souche. Dans une étude réalisée sur des produits carnés fermentés artisanaux tunisiens, 10 des 24 *Enterococcus faecium* ont été déclarés exempts de tous les facteurs de virulence testés (Ben Belgacem et al., 2010). Pour cette raison, nous avons poursuivi nos études sur les souches suivantes : *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1.

Facteurs influençant l'activité protéolytique

Cinétique d'activité protéolytique

Pour étudier la cinétique d'activité protéolytique, *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 ont été testés sur le même milieu (MCA) (Fira et al., 2001) comme décrit ci-dessus. Les cellules collectées étaient re-suspendues dans un tampon phosphate de pH 7,2. Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 3, 6, 9 et 24 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, on prélevait le surnageant clair pour l'analyser par SDS-PAGE.

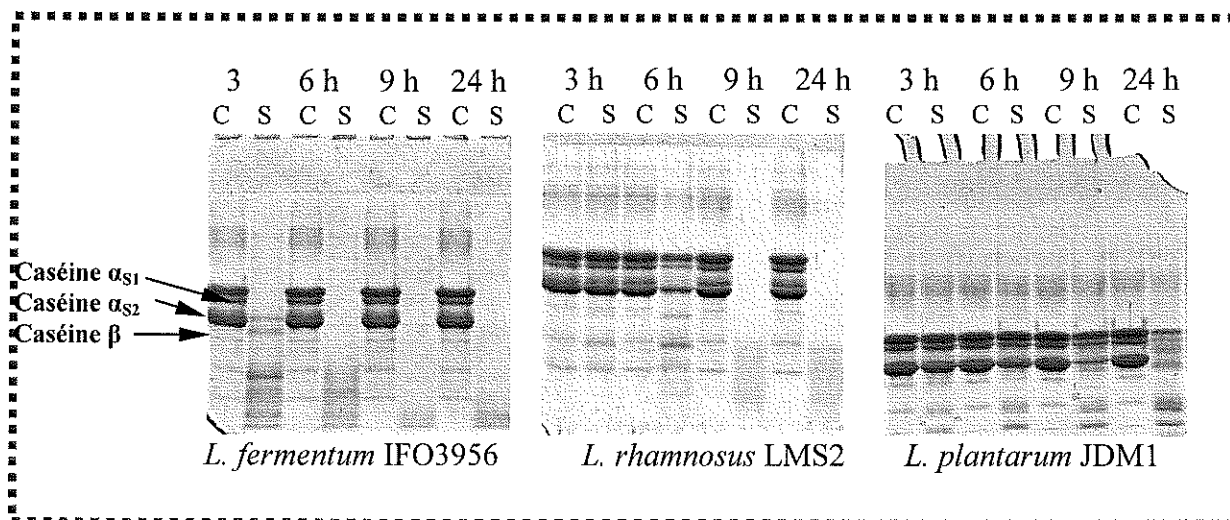


Fig. 4: SDS-PAGE du caséinate de sodium après différents temps d'incubation (3, 6, 9 et 24 h) avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 à 37° C. S : caséinate de sodium incubé avec la souche ; C : caséinate de sodium incubé sans souche.

Pour *Lactobacillus fermentum* IFO3956, l'activité protéolytique sur du caséinate de sodium a été révélée par SDS-PAGE après 3, 6, 9 et 24 h d'incubation (Fig. 4). Une dégradation protéolytique a été observée après 3 h d'incubation ; elle augmentait avec le temps d'incubation pour atteindre un maximum après 24 h (Fig. 4). Toutes les fractions de caséines ont été dégradées après 6 h d'incubation.

Pour la deuxième souche étudiée, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, après 3, 6, 9 et 24 h d'incubation sur du caséinate de sodium, l'activité protéolytique a été révélée par SDS-PAGE (Fig. 4). Comme précédemment, l'activité protéolytique variait en fonction du temps. Une dégradation protéolytique a pu être observée après 6 h d'incubation en particulier pour la caséine β . Les caséines α_{S1} , α_{S2} et β étaient dégradées après 9 h d'incubation.

Pour la troisième souche étudiée, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, après 3, 6, 9 et 24 h d'incubation sur du caséinate de sodium, on mesurait l'activité protéolytique par SDS-PAGE. Une dégradation protéolytique a pu être observée après 6 h d'incubation, en particulier pour la caséine β et elle augmentait avec le temps d'incubation pour atteindre un maximum après 24 h (Fig. 4).

Par conséquent, selon les critères retenus par Kunji et al. (1996), il peut être conclu que les protéases produites par *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus*

LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 appartiennent au groupe P III puisqu'elles sont capables d'hydrolyser les caséines α_{S1} , α_{S2} et β .

Effet du pH

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité des protéases, les souches précédentes ont été testées sur le milieu MCA (Fira et al., 2001) mais les cellules collectées étaient re-suspendues dans un tampon phosphate de différentes valeurs de pH (5,4 ; 6,0 ; 6,5 et 7,2) et dans 100 mM de Tris-HCl à pH 8,2. Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, on prélevait le surnageant clair pour l'analyser par SDS-PAGE. La Figure 5 montre que le pH optimal d'activité protéolytique est de 6,5 pour *Lactobacillus plantarum* JDM1 mais se situe entre 6,5 et 7,2 pour les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et *Lactobacillus rhamnosus* LMS2.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Fira et al. (2001) qui ont déterminé l'activité protéolytique de certains lactobacilles thermophiles et ont trouvé un pH optimal de 6,5.

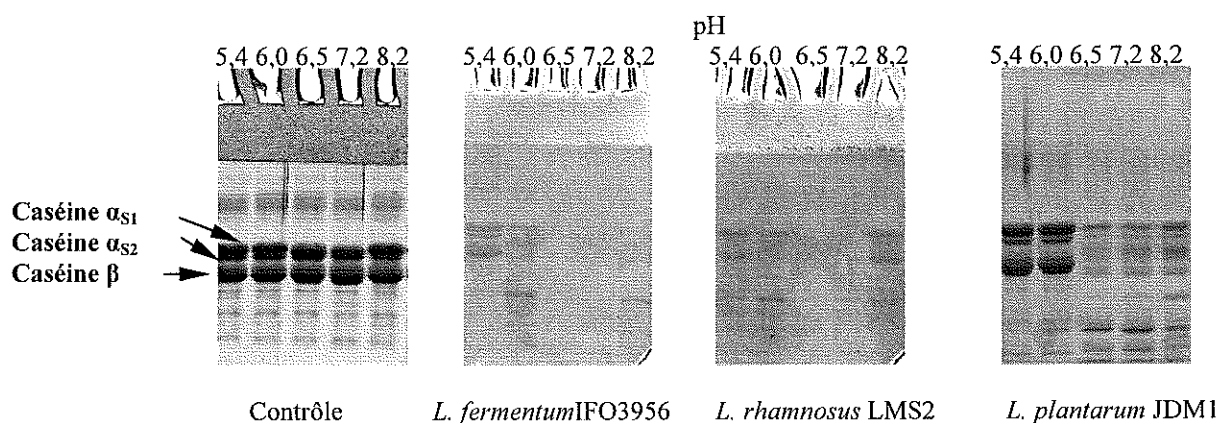


Fig. 5: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en présence de différentes souches et contrôle sur du caséinate de sodium à différents pH.

Effet de la température

Pour déterminer l'influence de la température sur l'activité des protéases, les souches précédentes ont été testées sur le même milieu (MCA) (Fira et al., 2001). Les cellules collectées étaient re-suspendues dans un tampon phosphate de pH 7,2. Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à différentes températures : 25, 30, 37 42 et 50°C. À la fin de la période d'incubation, on prélevait le surnageant clair pour l'analyser par SDS-PAGE. La Figure 6 montre que la température optimale d'activité protéolytique est située entre 37 et 42 °C pour toutes les souches.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Fira et al. (2001) qui ont trouvé que les températures optimales pour la protéolyse par *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 et *Lactobacillus delbrueckii* BGPF1 était respectivement de 45 et 40 °C.

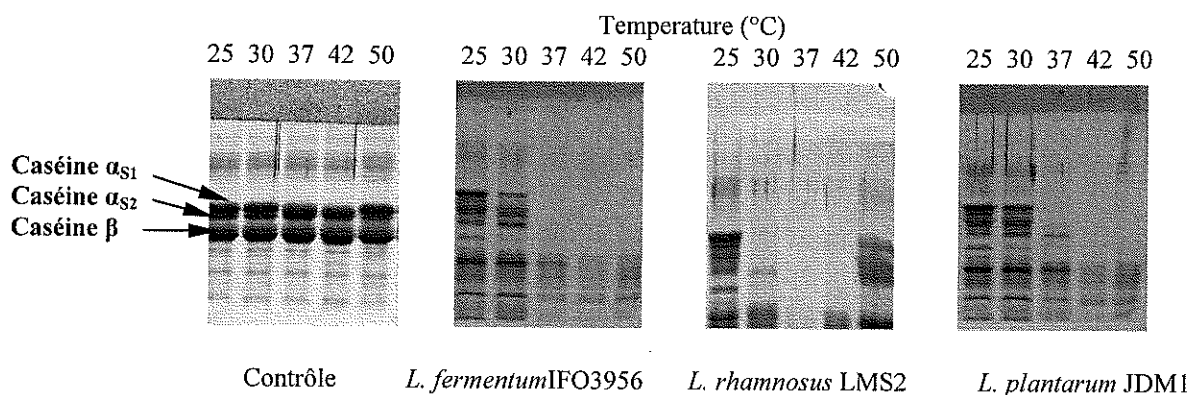


Fig. 6: SDS-PAGE à 12% d'échantillons obtenus après 24 h d'incubation à différentes température en présence de différentes souches et contrôle sur du caséinate de sodium.

Effet des inhibiteurs

Pour déterminer à quel type de protéases correspondent les activités protéolytiques observées, les souches précédentes ont été testées sur le milieu (MCA) (Fira et al., 2001). Les cellules collectées étaient re-suspendues dans un tampon phosphate de pH 7,2. Différents inhibiteurs (EDTA pour inhiber les métallo-protéases, acide iodoacétique pour inhiber les protéases acides et Pefabloc pour inhiber la sérine protéases) ont été ajoutés à la suspension cellulaire à une concentration finale de 10 mM et incubés à 37 °C pendant 1 h avant l'ajout du substrat. Les inhibiteurs testés étaient dilués dans un tampon phosphate 10 mM de pH 7,2 à une concentration équivalente à celle des autres inhibiteurs. Les cellules ont été mélangées avec le substrat : caséinate de sodium (12 mg/ml ; 1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 5 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, on prélevait le surnageant clair pour l'analyser par SDS-PAGE (Fig. 7). Les résultats obtenus démontrent que les protéases sont principalement des métallo-protéases. Cependant, on retrouve des protéases à sérine pour *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (Fig. 7).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Pereira et al. (2001), mais en désaccord avec ceux de Tsakalidou et al. (1999) qui ont trouvé que la protéinase brute de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178 était fortement inhibée par le PMSF, mais peu inhibée par l'EDTA. Ces différences peuvent être attribuées au type de souches étudiées.

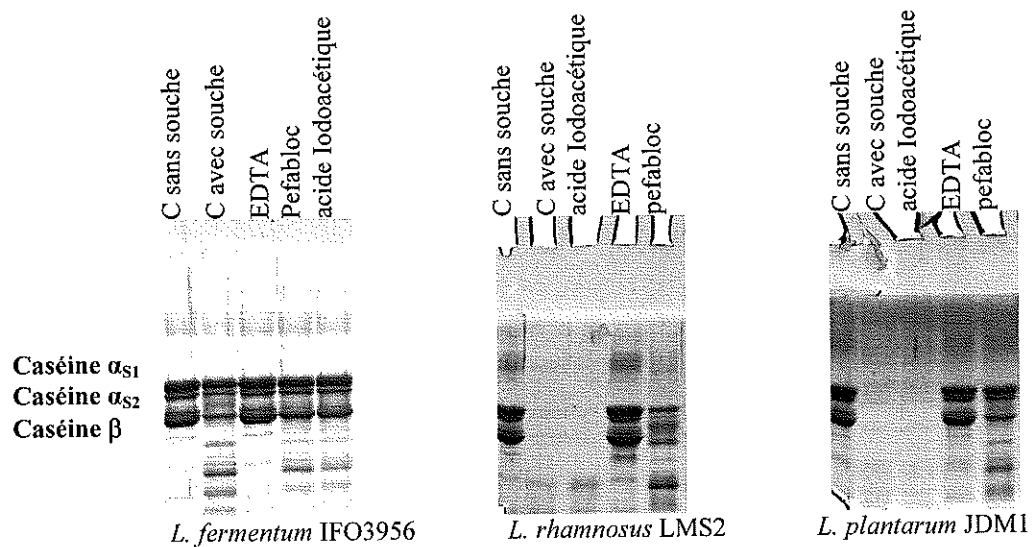


Fig. 7: SDS-PAGE du caséinate de sodium (C) hydrolysé par le surnageant de culture de *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1, en présence ou non d'inhibiteurs

Chapitre II :

La protéolyse des caséines β et α_{s1} par *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 isolées de produits laitiers égyptiens diminue leur immuno-réactivité.

Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from egyptian milk products decreases α_{s1} -casein immuno-reactivity

**El-Ghaish, S., Rabesona, H., Choiset, Y., Sitohy, M.,
Haertlé, T., & Chobert, J.-M.**

Journal of Dairy Research, 2011, 78, 203-210.

RÉSUMÉ

La protéolyse de la caséine α_{S1} par *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolée de produits laitiers égyptiens diminue son immunoréactivité

L'activité de la protéinase de *Lactobacillus fermentum* IFO3956 était plus élevée quand les cellules étaient cultivées sur du lait écrémé reconstitué à 10% mais l'activité de la protéase la plus faible était observée sur un milieu sans lait (MRS). L'extraction des protéases liées à la cellule de *Lactobacillus fermentum* IFO3956 induite par la présence de lait était plus efficace en utilisant 1% de Tween 80 tandis que l'utilisation de SDS à 1% inhibe toute activité protéolytique. Deux bandes ont été observées par zymogramme en présence de gélatine, indiquant que l'activité protéolytique correspondait à la présence d'au moins deux types d'enzymes. L'analyse par spectrométrie de masse des hydrolysats de caséine α_{S1} avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956 révélée la présence de 24 peptides ayant des tailles allant de 5 à 36 acides aminés, dont 9 peptides phosphorylés. La plupart des peptides identifiés provenaient de la partie N-terminale de la caséine α_{S1} . La souche bactérienne étudiée pourrait hydrolyser la caséine α_{S1} dans de nombreux sites, y compris les épitopes déclenchant la réaction allergique à cette caséine (par exemple, en positions 23, 30, 41, 71, 91, 98, 126, 179). En conséquence, l'immuno réactivité de la caséine α_{S1} peut être considérablement réduite par son hydrolyse avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956.

Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of α_{S1} -casein

Shady El-Ghaish¹, Hanitra Rabesona¹, Yvan Choiset¹, Mahmoud Sitohy^{1,2}, Thomas Haertlé¹ and Jean-Marc Chobert^{1*}

¹ UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, F-44300 Nantes

² Zagazig University, Biochemistry Department, Faculty of Agriculture, Zagazig, Egypt

Received 27 September 2010; accepted for publication 19 January 2011

Proteinase activity of *Lactobacillus fermentum* IFO3956 cells was higher when they were grown on milk-based media than on 10% reconstituted skim milk. The lowest protease activity was observed when cells were grown on milk-free media. The extraction of milk-induced cell-bound proteases from *Lb. fermentum* IFO3956 was most efficient using 1% Tween 80 while the use of 1% SDS inhibited all proteolytic activity. Two bands of ~35 and >100 kDa were observed by zymogram, indicating that proteolytic activity corresponded to the presence of at least two types of enzymes or two molecular forms of one enzyme. Mass spectrometry analyses of α_{S1} -casein hydrolysates detected 24 peptides with sizes ranging from 5 to 36 amino acids, including 9 phosphorylated peptides, resulting from the fermentation of *Lb. fermentum* IFO3956 of α_{S1} -casein. Most of the identified peptides originated from the N-terminal portion of α_{S1} -casein. The studied bacterial strain could hydrolyze α_{S1} -casein in many sites including the epitopes triggering the allergic reactions against α_{S1} -casein e.g. at the positions 23, 30, 41, 71, 91, 98, 126, 179. After hydrolysis of α_{S1} -casein with *Lb. fermentum* IFO3956 the recognition and the binding of this casein to IgE from the pooled sera of 18 patients with cow's milk allergy was significantly reduced.

Keywords: Egyptian dairy products, *Lactobacillus fermentum*, proteolytic activity, allergy.

Cow milk is one of the first foods incorporated into the human diet, either replacing or supplementing maternal milk. Allergy to cow milk (CMA) concerns ~2.5% of children below 3 years of age, the feeding of an infant, allergic to cow milk casein, may be a major problem (Anderson, 1996). Caseins are the main milk allergens and account for 80% of the total protein in cow milk. They include 4 fractions α_{S1} - (32%), α_{S2} - (10%), β - (28%) and κ -caseins (10%). Bovine α_{S1} -casein is one of the major allergens responsible for CMA (Nakajima-Adachi et al. 1998). It is a single-chain phosphoprotein of 199 amino acid residues, characterized by a high content of prolyl residues, which are distributed throughout the molecule. It lacks disulphide bonds, which results in its reduced structural stability (Kumosinski et al. 1991). These factors increase the chance that the major allergenic epitopes of α_{S1} -casein are linear rather than conformational (Cocco et al. 2003), thus making this casein a good subject for study of the linear epitope breakdown by proteolysis.

An increasing interest in reduction of the allergenicity of foods during processing points to the potential use of enzyme modifications to cleave the allergic proteins and to produce hypoallergenic foods (Itoh, 1996). Immuno-reactivity of milk proteins can be decreased by proteolysis (Peñas et al. 2006). Nowadays, protein hydrolysates are also included in specific formulations, as well as hypoallergenic infant formulas to reduce their antigenicity as compared with intact protein. Proteolytic systems of *lactobacilli* are complex and are composed of proteinases and peptidases with different sub-cellular locations. Proteases of cells grown on milk showed similar hydrolytic activity on α_{S1} - and β -caseins (Cocco et al. 2003). Most of work on proteolytic activity of *lactobacilli* has been carried out using strains grown in culture media containing milk.

In a previous study (El-Ghaish et al. 2010), we characterized the proteolytic activity of *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from milk products from Egypt describing the factors affecting this activity. Isolating new strains or isolates of nonstarter lactic acid bacteria (NSLAB) with technological functions potentially applicable in the food industry is scientifically or commercially highly interesting and important. These NSLAB can be used in different types

*For correspondence; e-mail: chobert@nantes.inra.fr

of cheeses, especially those produced from raw milk due to their positive influence on cheese manufacture through lipolytic activity, citrate utilization, and production of aromatic volatile compounds as well as proteolytic and antimicrobial properties. In the current study, this strain was used in optimal conditions allowing the highest proteinase activity towards a major allergen component (α_{S1} -casein). The obtained hydrolysates were characterized by LC/MS/MS mass spectrometry to confirm the hydrolysis of the epitopes. The binding strength of the hydrolysates with IgE was evaluated by competitive ELISA to confirm the potential impact of hydrolysis on immuno-reactivity of α_{S1} -casein.

Material and Methods

Materials

All products were of analytical grade and obtained from different companies such as Merck, Germany (skim milk powder, calcium chloride and Triton X-100), Sigma-Aldrich, USA (glycerol, sodium citrate, Tween-20, Tween-80, sodium acetate, magnesium sulphate, manganese sulphate, cysteine, sodium dodecyl sulphate, gelatin, Tris, ammonium sulphate, trifluoroacetic acid, potassium chloride, polyvinyl alcohol and 4-methylumbelliferyl phosphate), Biokar diagnostics, France (MRS and meat extract), Fisher Bioblock Scientific, France (yeast extract and agar), Acros, USA (glucose), Panréac, France (di-potassium phosphate, potassium phosphate, glycine and sodium chloride), BD, France (peptone), Bio Basic INC., Canada (Coomassie Brilliant Blue G-250), Fisher BioReagents, USA (polyacrylamide), Applied Biosystems, Ireland (acetonitrile), Riedel-deHaën, Germany (potassium dihydrogen phosphate).

Purification of α_{S1} -casein from total casein

Total casein was prepared from fresh milk by precipitation at pH 4.6 with 6 M-HCl followed by centrifugation (4000 g, 20 min) according to Maillart & Ribadeau Dumas (1988). α_S -Caseins (α_{S1} - + α_{S2} -caseins) were prepared from total casein by anion exchange chromatography (FPLC; BioCad/Sprint, PerSeptive Biosystems, USA) according to Thorn et al. (2008). Total casein (50 mg/ml) was re-suspended in 50 mM-Tris-HCl + 8 M-urea, pH 8.0 + 20 mM-dithiothreitol (DTT). Column source Q Sepharose High Performance (v=50 ml) was equilibrated with buffer A (25 mM-Tris-HCl + 4 M-urea, pH 8.2 + 5 mM-DTT) and elution was performed with gradient from 0 to 30% buffer B (buffer A + 1 M-NaCl) at a flow rate of 5 ml/min. α_S -Caseins were collected, dialyzed and lyophilized. α_S -Caseins (35 mg/ml) were re-suspended in 20 mM-sodium acetate + 8 M-urea, pH 6.0 + 20 mM-DTT. Column source Q (V=8 ml) was equilibrated with buffer C (20 mM-sodium acetate + 4 M-urea, pH 6 + 5 mM-DTT) and elution was performed with a gradient from 0 to 30% buffer D (buffer C + 1 M-NaCl) at a flow rate of 5 ml/min. α_{S1} -Casein was collected, dialyzed and lyophilized.

Strain and growth conditions

Lb. fermentum IFO3956 was isolated from traditional Ras cheese collected from local markets of Lower Egypt (Tanta city) and identified by 16S rRNA gene amplification. The purified strain was re-grown in sterile skim milk (12.5%, w/v) supplemented with 30% (w/v) glycerol and stored at -20°C . Before use, the strain was grown twice in MRS broth.

Four different media were used to study the production of the *Lactobacillus* proteinase: MCA (milk-citrate-agar), RSM (10% reconstituted skim milk), MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) and CYG (casein-yeast extract-glucose). MCA is composed of 4.4% skim milk powder, 0.8% Na-citrate, 0.1% yeast extract, 0.5% glucose and 1.5% agar. RSM is 10% reconstituted skim milk and the composition of MRS (g/l) was as follows: polypeptone, 10; meat extract, 10; yeast extract, 5; glucose, 20; Tween 80, 1.08; di-potassium phosphate, 2; sodium acetate, 5; ammonium citrate, 2; magnesium sulphate, 0.2 and manganese sulphate, 0.05. CYG composition (g/l) was as follows: yeast extract, 3; peptone, 5; cysteine, 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05; sodium acetate, 5; sodium citrate, 4.4; potassium phosphate, 2; sodium caseinate, 10; glucose, 10 and Tween 80, 1 ml.

Influence of the media on the proteolytic activity

The pH of each medium was adjusted to 6.8. In case of MCA media, an aliquot (~ 0.5 ml) of the activated pre-culture was applied on the top of MCA plates (Fira et al. 2001). The plates were incubated for 48 h at 37°C prior to cell collection. For RSM, MRS and CYG media (Hébert et al. 1997), a pre-culture was prepared by inoculating these media with 5% (v/v) overnight culture and incubation at 37°C for 24 h. Fresh cells were collected from different media and re-suspended in 100 mM-Na-phosphate buffer (pH 6.8) and brought to final optical density (OD_{600}) of 20 just before application. One volume of the cellular suspension was combined with an equivalent volume of solution of sodium caseinate (12 mg/ml) in 100 mM-Na-phosphate buffer (pH 6.8) so that the OD_{600} of the final combined suspension is equal to 10, and incubated for different periods (5 and 24 h) at 37°C . The control was sodium caseinate (12 mg/ml) in 100 mM-Na-phosphate buffer, pH 6.8 without addition of strain, the volume of which being replaced by the buffer in order to keep equivalent concentration of protein. All samples were analyzed by SDS-PAGE.

Extraction and characterization of cell wall-bound proteases

Cells were collected from MCA media as previously described and washed twice with 100 mM-Na-phosphate buffer (pH 6.8) containing 20 mM- CaCl_2 . To extract cell-wall-bound proteases, the washed cells were incubated with 1% of different detergents (SDS, Tween 80 and Triton X-100) dissolved in 100 mM-Na-phosphate buffer (pH 6.8) for 16 h at 37°C with agitation. Supernatants were collected by

centrifugation (12000 g at 4 °C for 20 min). The released protease was considered as an indication of intracellular enzyme (Tsakalidou et al. 1999). The proteolytic activity of the supernatants was measured by SDS-PAGE. One volume of the supernatants was combined with an equivalent volume of solution of sodium caseinate (12 mg/ml) in 100 mM-Na-phosphate buffer (pH 6.8). The final mixtures were incubated for different periods (3 and 24 h) at 37 °C. Control was prepared as described above. All samples were analyzed by gelatin Zymogram (12% polyacrylamide) and by SDS-PAGE.

SDS-PAGE

The samples were applied to a 12% polyacrylamide slab gel. The migration buffer contained 50 mM-Tris, 0.384 M-glycine and 0.1% SDS. After running at 10 mA on the stacking gel and 20 mA on the running gel, staining was performed with Coomassie Brilliant Blue G-250 followed by a convenient destaining. The gels were scanned with Image scanner III (GE Healthcare, USA) and the intensity of the bands was quantified by Image software. Analysis was performed by using Fuji Film Image Gauge V3.0 software (Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan). Data were expressed as the ratio of the area and intensity of the band. The reduction in the intensity of band during incubation with respect to the original intensity was taken as the percentage of hydrolysis (Ong et al. 2006).

Gelatin-SDS-PAGE Zymogram

The samples were applied to a 12% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin, where the migration buffer consisted of 50 mM-Tris, 0.384 M-glycine and 0.1% SDS. After running at 10 mA on the stacking gel and 20 mA on the running gel at 4 °C, the gel was washed twice in 2.5% Triton X-100 for 30 min then twice in distilled water for 15 min. Washed gel was placed in incubation buffer (50 mM-Tris-HCl, 100 mM-NaCl, 5 mM-CaCl₂, pH 7) for 16 h at 37 °C before fixation in a solution of 4% ethanol/H₃PO₄ (1/1, v/v), twice for 60 min, then the gel was washed in 2% phosphoric acid for 60 min. Finally, the gel was transferred to a sensitization solution (17% ethanol, 15% (NH₄)₂SO₄, 2% H₃PO₄) for 20 min before staining with 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250 and fixing in 4% ethanol/H₃PO₄ (1/1, v/v). The gel was rinsed twice for 10 min in distilled water and destained in 20% ethanol for 10 min before keeping in distilled water. Bands revealing activity appeared as clear zones on the blue gel. The gel was scanned with Image scanner III and the location of the clear bands was marked and compared with the standard molecular weights.

Characterization of α_{S1} -casein hydrolysates

Preparation of hydrolysates. α_{S1} -Casein hydrolysates produced by *Lb. fermentum* IFO3956 were prepared as previously described for sodium caseinate (El-Ghaish et al. 2010) except the concentration of α_{S1} -casein was 5 mg/ml.

At the end of incubation periods (3, 6 and 24 h), the supernatant was analyzed by SDS-PAGE (12% polyacrylamide), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

LC/MS/MS analyses. Mass spectrometry analyses were conducted on the platform "Biopolymers-Interaction-Structural Biology" located at the INRA centre of Nantes (INRA Research Unit 1268) (http://www.nantes.inra.fr/plateformes_et_plateaux/techniques/plateforme_bibs).

α_{S1} -Casein peptides were separated by reversed phase-HPLC (RP-HPLC) with a Waters HPLC system (Waters 616 pump controlled by Waters 600 controller) coupled to a Finnigan LCQ ion trap spectrophotometer (Finnigan MAT, San Jose, CA). The column (2 mm×150 mm, 90 Å, 4 µm, Jupiter, PROTEO, Phenomenex) was equilibrated with solvent A (0.11% trifluoroacetic acid (TFA) in distilled water, v/v) at a flow rate of 0.15 ml/min. After injection, the column was washed for 5 min with 100% solvent A then elution was performed by applying a linear gradient to 100% of solvent B (80% acetonitrile, 20% H₂O, 0.09% TFA, v/v/v) from 5 to 35 min followed by a 2 min step at 100% solvent B.

Spectra were acquired in automated MS/MS mode. The scan rate for MS mode was set between the masses of 400 to 2000 Da. Peptide identification was performed using the Mascot software (version 2.5, Matrix Science) on the MS/MS ion search mode with the following parameters: enzyme: none, peptide mass tolerance: 1.5 Da, fragment mass tolerance: 0.6 Da, fixed modification: phosphorylation. Identification was performed by comparing the obtained peptides with α_{S1} -casein sequences.

Competitive ELISA. Wells of 96 microplates (Maxi Sorp, Nunc, Roskilde, Denmark) (plate 1) were coated with 100 µl per well of α_{S1} -casein diluted to 5 µg/ml in 1 M-PBS pH 7.4 (0.136 M-NaCl, 2.68 mM-KCl, 1.76 mM-KH₂PO₄, and 10.14 mM-Na₂HPO₄ 12 H₂O) for 3 h at 30 °C. Negative control (blank) was prepared by replacing α_{S1} -casein with equal volume (100 µl) of PBS. All wells were coated with 100 µl of a mouse monoclonal anti-human IgE, clone M604199 (Ab1, Fitzgerald, Concord, USA) diluted to 1:2500 in PBS. After coating, all wells were washed three times with PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS/T) and saturated with 250 µl of the PBS/T solution containing 1% (w/v) polyvinyl alcohol (PBS/T/PVA) for 1 h at 37 °C. Standard curve was performed with adding 100 µl of serial dilutions from 160 to 0.15 ng/ml (5000 IU) of human serum IgE (WHO international reference preparation Code 75/502), to the wells coated with the antihuman IgE antibody only (without α_{S1} -casein).

A pool of 18 sera from patients allergic to α_{S1} -casein was collected by the Laboratory of Immuno-Allergology of Academic Hospital, Angers, France and used after approval of the internal Ethical Committee of the hospital. The serum pool was diluted to 1:10 and mixed with equal volumes

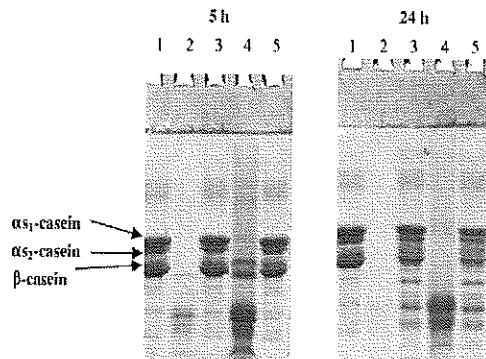


Fig. 1. SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolysate obtained by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 after 5 and 24 h incubation at 37 °C on different media [MCA (lane 2); CYG (lane 3); RSM (lane 4); MRS (lane 5)] as compared to control (Na-caseinate without strain, lane 1).

(60:60, $\mu\text{H}_2\text{O}$) of serial dilutions of α_{S1} -casein or α_{S1} -casein hydrolysate in 1% PBS/T/PVA (1000, 640, 160, 40, 10, 2.5, 1, 0.25, and 0.062 $\mu\text{g/ml}$) on a separate plate (plate 2) and incubated at 37 °C for 1 h.

An aliquot of 100 μl was transferred from each well in the plate 2 to the wells coated with α_{S1} -casein in plate 1 or the negative control. After an overnight incubation at 4 °C, the plates were washed three times with PBS/T and incubated for 2 h at 37 °C with the secondary antibody (alkaline-phosphatase-conjugated polyclonal antihuman IgE, Sigma) diluted 1:1000 on PBS/PVA. After three washings with PBS/T, the free secondary antibody was revealed by the addition of 4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP) substrate diluted 1:5 in Tris-HCl, pH 9.8. The fluorescence emission was measured after 90 min of incubation at 37 °C with the FLX800 plate reader (Biotech Instruments, Inc., Winooski, VT) fitted with a 360 nm excitation filter and a 440 nm emission filter.

The calculation of the results was performed as described by Taheri-Kafrani et al. (2009). The concentration of protein (inhibitor) needed to inhibit 50% of IgE binding (IC_{50}) was calculated from the inhibition curves by relating fluorescence intensity to inhibitor concentration. The $\text{C}_{50\%}$ is the concentration of α_{S1} -casein binding 50% of the IgE in the sera of the CMA patient group. The value obtained by dividing the $\text{C}_{50\%}$ of the hydrolyzed α_{S1} -casein by $\text{C}_{50\%}$ of the intact α_{S1} -casein is an indicator of the effect of the proteolysis on the IgE binding and consequently of the immuno-reactivity of the α_{S1} -casein. The experiment was realized in triplicate.

Results and Discussion

Effect of the culture medium on proteinase activity

Proteinase activity of *Lb. fermentum* IFO3956 cells grown in different media (MCA, CYG, RSM and MRS) is shown in

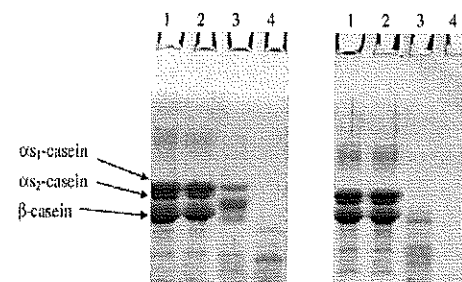


Fig. 2. SDS-PAGE profile of Na-caseinate hydrolysate (3 and 24 h incubation at 37 °C) by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 supernatants obtained by treating bacterial cells with different detergents: 1% SDS (lane 2); 1% Triton X-100 (lane 3); and 1% Tween 80 (lane 4) as compared to non-hydrolyzed Na-caseinate (lane 1).

Fig. 1. The rate of casein hydrolysis was much higher in the milk-based media (MCA and RSM; lanes 2 and 4, respectively) than in the free-milk media (CYG and MRS; lanes 3 and 5, respectively) either after 5 or 24 h of incubation at 37 °C. Highest extent of proteolysis was achieved in MCA (lane 2) followed by RSM (lane 4). However, the band intensity of casein fractions indicate that the degree of hydrolysis in MCA after 5 h is still superior to that achieved in RSM medium after 24 h incubation at 37 °C. The free-milk media exhibited limited hydrolysis only, after 24 h incubation at 37 °C but practically nothing after 5 h. It can also be observed that all major casein fractions were nearly hydrolysed to the same degree without any noticeable preference.

These results remain in agreement with those of Hébert et al. (1997), studying the influence of different media (RSM, CYG and MRS) on the proteolytic activity of *Lb. helveticus* CRL 581 showing that the highest protease activity was achieved in the cells growing in milk media and the lowest one in the free-milk medium (MRS). This suggests that the synthesis of proteolytic enzymes is stimulated by milk medium. Also, the micro-array analysis showed that the growth of *Lb. helveticus* CNRZ32 is associated with raised expression of the genes of cell-envelope associated proteinases (Pederson et al. 1999; Smeianov et al. 2007) and with raised expression of the genes of a variety of intercellular peptidases as well as with raised expression of the genes of a specific protein required for proteinase maturation in milk-based medium than MRS (Smeianov et al. 2007).

Characterization of the cell-bound proteases

The ability of *Lb. fermentum* IFO3956 supernatant to hydrolyze α_{S1} -, α_{S2} - and β -caseins was tested after growing the bacterial cells in MCA for 48 h at 37 °C, then extracting the cells with different detergents and assessing the proteolytic activity of the supernatants, after incubation with sodium caseinate for 3 and 24 h at 37 °C, by SDS-PAGE (Fig. 2). Proteolysis of casein fractions could be observed after 3 h incubation at 37 °C with the proteases extracted by

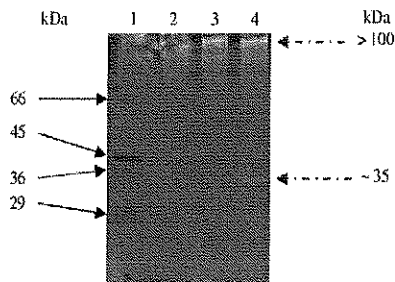


Fig. 3. Gelatin SDS-PAGE zymogram patterns of *Lactobacillus fermentum* IFO3956 supernatants obtained after cultivation for 48 h at 37 °C on MCA and subsequent incubation for 24 h at 37 °C with different detergents [1% SDS (lane 2); 1% Triton X-100 (lane 3) and 1% Tween 80 (lane 4)]. Lane 1 is molecular weight markers.

1% Triton X-100 (Fig. 2, lane 3) and 1% Tween-80 (Fig. 2, lane 4) while no proteolysis could be detected with the proteases extracted with 1% SDS (Fig. 2, lane 2). The proteolysis increased with the time of incubation reaching a maximum after 24 h. The protease extracted with 1% Tween-80 was more active than that extracted with 1% Triton X-100 either after 3 or 24 h incubation at 37 °C with the substrate. The proteases extracted in these conditions could hydrolyze all casein fractions albeit to different degrees. Consequently, the proteases of *Lb. fermentum* IFO3956 can be classified to PIII type according to Kunji et al. (1996), being able to cleave α_{S1} -, β -, and κ -caseins. Based on the band colour density, α_{S1} - and α_{S2} -caseins were completely hydrolyzed (100%) while β -casein was only hydrolyzed to 90% after incubation of sodium caseinate at 37 °C for 24 h with proteases extracted with 1% Triton X-100. However, the degree of hydrolysis of these two fractions was similar (100%) in case of the proteases extracted with 1% Tween 80, independently of the time of incubation (3 or 24 h). Similar results were observed by Tzvetkova et al. (2007) on 21 *Lactobacilli* isolates gathered from three types of Balkan home-made yogurts. However, the cell-wall bound proteinase of *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC178 was found to hydrolyze mainly β -casein and to lower extent α_{S1} - and κ -caseins (Tsakalidou et al. 1999). Consequently it was classified as PI-type proteinase.

Cell-free supernatants of *Lb. fermentum* IFO3956 showed two clear bands (corresponding to 35 and >100 kDa) on gelatin-zymogram (Fig. 3). Similar band pattern was obtained using casein instead of gelatin as a substrate in the zymogram (data not shown). These results indicate the presence of at least two types of proteolytic enzymes of molecular masses 35 and >100 kDa. The low molecular band (35 kDa) was obtained only with 1% Tween-80 extraction (Fig. 3, lane 4). The high molecular mass band (>100 kDa) was seen in case of the extracts of the protease with either 1% Triton X-100 or 1% Tween-80 (Fig. 3, lanes 3 & 4, respectively) but not with 1% SDS extraction (Fig. 3, lane 2). The proteinase inhibition by SDS was reported by Wang et al. (2008), Mohamed et al. (2009), and Tanskul

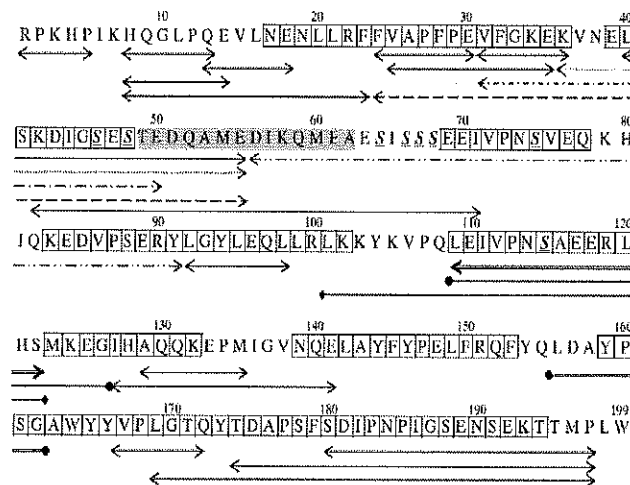
et al. (2009). Hence, it is possible that the band of high molecular mass may be ascribed to the mature oligomeric form of cell-wall bound proteinase while the band of low molecular mass may be its degradation product. It has been reported that the mature proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 has a molecular mass of 180–190 kDa although breakdown products of smaller sizes could be detected upon isolation (Laan & Konings, 1989). It has been reported also that cell-envelope proteinases of LAB are synthesized as pre-proteins of approximately 2000 amino acid residues (Fernandez Espla et al. 2000).

Characterization of α_{S1} -casein hydrolisates

LC/MS/MS Mass Spectrometry. Figure 4 shows the sequence of bovine α_{S1} -casein (199 amino acids). This primary structure contains as reported by Chatchatee et al. (2001), 8 epitopes defined as 5 major plus 3 minor IgE-binding epitopes. The major epitopes are the following peptide fragments: N17-K36, K83-K102, L109-L120, N139-F153 and Y159-T194. The minor epitopes are: E39-S48, E69-Q78 and M123-K132. These epitopes are marked on Fig. 4 by bordered boxes. Similar results were reported by Wang et al. (2010) stating that the major epitopes are the peptides F28-I44, Q78-L95, L109-S122 and A163-F179. Cerecedo et al. (2008) observed using peptide microarray, a single region differentially recognized by the reactive IgE group (peptide F28-E50). The reported new epitopes were already observed by Chatchatee et al. (2001) with slight differences so they are not indicated on the diagram. However, a new epitope reported by Lin et al. (2009) is different hence, it is marked on the diagram by shadowed box. Mass spectrometry analyses of hydrolysate of α_{S1} -casein obtained after the incubation with *Lb. fermentum* IFO3956 for 24 h at 37 °C revealed the presence of 24 peptides of different sizes, ranging from 5 to 36 amino acids (634-2662 to 1520-5089 Da) and included 9 phosphorylated peptides (F24-E55, V31-E50, K36-E55, L40-E55, K42-I71, D56-Y91, L101-S122, L109-S122 and L109-G126) (Table 1, Fig. 4). Phosphorylated peptides were shown to be much more resistant to hydrolysis by peptidases from *Lb. fermentum* IFO3956 than other peptides, what remains in accordance with what was observed by Deutsch et al. (2000) using the three LAB *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus*. There was only one epitope (L109-L120) that resisted hydrolysis, which is characterized by the presence of one phosphoserine residue located nearly in the centre and in a highly hydrophobic domain since 6 out of 12 residues are hydrophobic amino acids (2 L, 1 I, 1 V, 1 P, 1 A). Although this epitope contains 3 glutamyl residues, which are preferably hydrolyzed by this *Lactobacilli* protease, the hydrophobic nature and the presence of phosphorylated serine hindered the enzymatic action. On the other hand, there were two phosphorylated epitopes subject to the hydrolytic action of *Lb. fermentum* IFO3956 (E39-K58 and E69-Q78) but their cleavage site is far away from the phosphorylated serines.

Table 1. Characterization of the 24 peptides contained in hydrolysate of α_{S1} -casein by *Lactobacillus fermentum* IFO3956

Sequence assignment (α_{S1} -casein amino acids)	Peptide sequence	Experimental mass (Da)
1–5	RPKHP	634.2662
8–13	HQGLPQ	679.1466
8–14	HQGLPQE	808.2517
8–23	HQGLPQEVLENLLRF	953.9858
13–18	QEVLE	730.1142
24–30	FVAPFPE	806.1401
24–55	FVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAME	1266.5461
25–35	VAPFPEVFGKE	1219.9210
31–36	VFGKEK	707.2372
31–50	VFGKEKVNELSKDIGSESTE	1177.9427
36–55	KVNELSKDIGSESTEDQAME	1185.4203
40–55	LSKDIGSESTEDQAME	950.3427
42–71	KDIGSESTEDQAMEDIKQMEASISSSEEI	1239.9660
56–91	DIKQMEASISSSEI V P N S V E Q K H I Q K E D V P S E R Y	1520.5089
92–98	LGYLEQL	835.1534
92–98	LGYLEQL	835.1534
101–122	LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHS	886.9328
109–122	LEIVPNSAEERLHS	837.2816
109–126	LEIVPNSAEERLHSMKEG	1060.0959
127–141	IHAQQKEPMIGVNQE	861.3992
129–135	AQQKEPM	831.2434
156–162	LDAYPSG	722.1302
169–197	LGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMP	1549.2976
174–197	TDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMP	1268.1127
180–197	SDIPNPIGSENSEKTTMP	958.8286

**Fig. 4.** α_{S1} -Casein sequence and peptides released by the proteolytic action of *Lactobacilli fermentum* IFO3956 after 24 h incubation at 37 °C, as indicated by arrows. The peptides marked by borders show the main 8 epitopes reported originally by Chatchatee et al. (2001) and the peptide marked by a shadow refers to a new epitope reported by Lin et al. (2009). The sequence uses the one-letter amino acid code and the phosphorylated serines are indicated by $\underline{S}$.

It can also be observed that the proteolytic cleavage occurred preferentially at glutamic acid (E, 9 cleavages), leucine (L, 8 cleavages), proline (P, 4 cleavages). Similar

results were obtained by Hébert et al. (2008). They characterized the pattern of α_{S1} - and β -casein breakdown and release of bioactive peptide by cell envelope proteinase

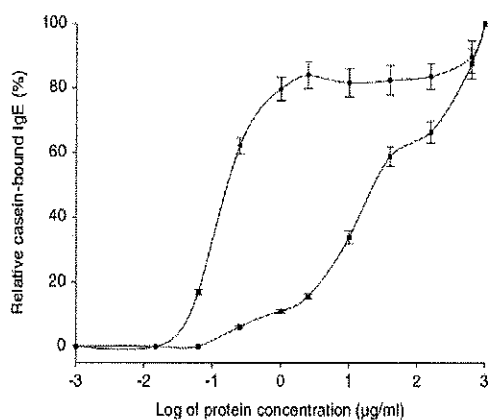


Fig. 5. Binding of α_{S1} -casein (●) and its *Lactobacillus fermentum* hydrolysate (▲) to IgE in the sera pool of CMA patients. Averages are indicated by horizontal black bar.

from *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 and determined that this strain prefers glutamic acid (E) and glutamine (Q) from α_{S1} -casein. The preference to cleave proline exclusively from the C-side is typical of prolyl endopeptidases, which are serine proteases widely distributed in bacteria, which can be used also to hydrolyze proline-rich prolamines (Shan et al. 2004). On the other hand, it was previously reported that cell-envelope proteinases from LAB have a strong preference for hydrophobic caseins (Swaigood, 1982). Majority of identified peptides originated from the N-terminal portion (15 peptides) and smaller number (9 peptides) from the C-terminal end of α_{S1} -casein (Table 1 & Fig. 4).

Competitive ELISA. Data in Fig. 5 show the binding of intact α_{S1} -casein or its *Lb. fermentum* IFO3956 hydrolysate to the IgE in sera pool of 18 CMA patients. It is observed that the binding of α_{S1} -casein hydrolysate to IgE was considerably weaker from binding with intact α_{S1} -casein. The $C_{50\%}$ of intact α_{S1} -casein was about 0.17 $\mu\text{g/ml}$ while what was observed for the α_{S1} -casein hydrolysate was as high as 24.8 $\mu\text{g/ml}$. This means that the binding of the hydrolyzed protein is about 150 times lower than that of the intact protein. This weaker binding of IgE could lead to weaker allergic reactions. Consequently, the hydrolysis of α_{S1} -casein by *Lb. fermentum* IFO3956 would attenuate allergic reactions. It can be observed in Fig. 5 that for concentrations of α_{S1} -casein equal to or higher than 1.0 $\mu\text{g/ml}$ the maximum value of binding of IgE to over 80% is obtained while the binding of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ hydrolysate of α_{S1} -casein is less than 10%. The high binding activity of α_{S1} -casein to IgE is evidently due to the presence of numerous specific epitopes defined or still unknown. The diminution of the IgE binding of the hydrolysates of α_{S1} -casein is due to the breakdown of some of the known epitopes of α_{S1} -casein as seen in Fig. 5. The persistence of weak binding of the α_{S1} -casein hydrolysates may be due to the resistance of some epitopes to the

proteolysis, which still bind to IgE such as the epitope LEIVPNSVEQ (109–120). All other epitopes are cleaved by the proteolytic activity of *Lb. fermentum* IFO3956 at more than one site except two epitopes (E69-Q78 and N139-F153), which were cleaved at only one site. Some other unidentified epitopes may be also binding with IgE.

Analysis of the peptides during α_{S1} -casein hydrolysis by *Lb. fermentum* IFO3956 showed the ability of the proteases of this strain to hydrolyze many allergic-epitopes (e.g. cleavage of peptide bonds F23-F24, E30-V31, E39-L40, S41-K42, E55-D56, I71-V72, Y91-L92, L98-L99, G126-I127, E141-L142, 162 and F179-S180) of α_{S1} -casein. Consequently, the immuno-reactivity of milk protein may be considerably reduced by hydrolyzing α_{S1} -casein with *Lb. fermentum* IFO3956.

Similar results were found by Tzvetkova et al. (2007) who studied the hydrolysis of major dairy proteins by LAB from traditional Bulgarian yogurts. It was shown that during fermentation process, milk proteins are acidified by the production of lactic acid and are hydrolyzed by proteases and peptidases from bacteria. This proteolysis is followed by a reduction of the number of epitopes and consequently by a decrease in allergenicity of hydrolyzed protein.

In conclusion, the studied strain *Lb. fermentum* IFO3956 displays proteolytic activity, which can be useful for the formulation of diversified novel dairy products or to improve health properties of traditional products. It can also be used for the hydrolysis of proline-rich proteins normally resisting hydrolysis like cereal prolamines. Depending on the reduced recognition and binding by IgE of α_{S1} -casein hydrolyzed by *Lb. fermentum* IFO3956, this strain may be used for the production of milk and possibly milk products with reduced α_{S1} -casein immuno-reactivity.

We would like to express our gratitude for the support of this work in the frame of project # 982164 "Study of antimicrobial and hypoallergenic products of lactic acid bacteria" to NATO 'Science for Peace' program, and for the doctoral fellowship of Shady El-Ghaish to the Egyptian Ministry of Foreign Affairs and Education.

References

- Anderson JA 1996 Allergic reactions to foods. *Critical reviews of Food Science and Nutrition* 36 519–538
- Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, Lin J, Bardina L, Dieguez MG, Wang J, Muriel A, Hoz B & Sampson HA 2008 Mapping of IgE and IgG4 sequential of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122 589–594
- Chalchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K & Sampson HA 2001 Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α_{S1} -casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107 379–383
- Cocco MR, Järvinen KM, Sampson HA & Beyer K 2003 Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in α_{S1} -casein, a major cow's milk allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112 433–437
- El-Ghaish S, Dalgalarondo M, Cholet Y, Sliohy M, Ivanova I, Haertlé T & Chobert J-M 2010 Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *European Food Research Technology* 230 635–643

- Deutsch S-M, Mollé D, Cagnaire V, Piot J-M, Atlan D & Lortal S 2000 Hydrolysis of sequenced β -casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Applied and Environmental Microbiology* 66 5360–5367
- Fernandez Espla MD, Garoult P, Monnet V & Rul F 2000 *Streptococcus thermophilus* cell wall anchored proteinase: release, purification, biochemical and genetic characterisation. *Applied and Environmental Microbiology* 66 4772–4778
- Fira D, Kojic M, Banina A, Spasojevic I, Strahinic I & Topisirovic L 2001 Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90 123–130
- Itoh Y 1996 Current status of development of substitute, hypoallergenic and anti-allergic foods for food allergy. *Bio Industry* 13 36–43
- Hébert EM, Raya R & De Giori GS 1997 Characterization of cell membrane-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CRL 581. *Current Microbiology* 35 161–164
- Hébert EM, Mamone G, Picariello G, Raya RR, Savoy G, Ferranti P & Addeo F 2008 Characterization of pattern of α_{s1} - and β -casein breakdown and release of bioactive peptide by cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology* 74 3682–3689
- Kumosinski TF, Brown EM & Farrel HM Jr 1991 Three dimensional molecular modeling of bovine caseins: α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Science* 74 2889–2895
- Kunji ERS, Mierau I, Hagling A, Poolman B & Konings WN 1996 The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 187–221
- Laan H & Konings WN 1989 The mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* 55 3103–3106
- Lin J, Bardina L, Shreffler WG, Andreane DA, Ge Y, Wang J, Burni FM, Fu Z, Han Y & Sampson HA 2009 Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 315–322
- Mailhiart P & Ribadeau Dumas B 1988 Preparation of β -lactoglobulin and β -lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *Journal of Food Science* 53 743–752
- Mohamed AIA, Morishima I, Babiker EE & Mori N 2009 Dubiumin a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Photochemistry* 70 483–491
- Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Ise W, Honma K, Nishiwaki S, Hirota M, Shimizu N, Katsuki T, Ametani A, Kohno Y & Kaminogawa S 1998 Determinant analysis of IgE and IgG4 antibodies and T cells specific for bovine α_{s1} -casein from the same patients allergic to cow's milk: Existence of α_{s1} -casein-specific B cells and T cells characteristic in cow's-milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101 660–671
- Ong L, Henriksson A & Shah NP 2006 Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* 16 446–456
- Pederson JA, Mileski CJ, Weimer BC & Steele JL 1999 Genetic characterisation of a cell envelope associated proteins from *Lactobacillus helveticus* CNR232. *Journal of Bacteriology* 181 4592–4597
- Peñas E, Prestamo G, Baeza ML, Martínez-Molero MI & Gomez R 2006 Effect of combined high pressure and enzymatic treatment on the hydrolysis and immuno-reactivity of dairy whey proteins. *International Dairy Journal* 16 831–839
- Shan L, Mart T, Sollid LM, Gary GM & Khosla C 2004 Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochemical Journal* 383 311–318
- Smeianov VV, Wechter P, Broadbent JR, Hughes JE, Rodriguez BT, Christensen TV, Ardo V & Steele JL 2007 Comparative high density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Applied and Environmental Microbiology* 73 2661–2672
- Swaisgood H 1982 Chemistry of milk proteins. In *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. 1 (Ed. PF Fox) pp 1–59. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Taheri-Kafrani A, Gaudin J-C, Rabesona H, Nioi C, Agarwal D, Drouet M, Choher J-M, Bordbar AK & Haertlé T 2009 Effect of heating and glycation of β -lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cows milk allergy patients. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 57 4974–4982
- Tanskul S, Hiraga K, Takada K, Rungratchote S, Sunfinalerit P & Oda K 2009 An alkaline serine-proteinase from a bacterium isolated from bat feces: purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 73 2393–2398
- Thorn DC, Ecroyd H, Sunde M, Poon S & Carver JY 2008 Amyloid fibril formation by bovine milk α_{s2} -casein occurs under physiological conditions yet is prevented by its natural counterpart, α_{s1} -casein. *Biochemistry* 47 3926–3936
- Tsakalidou E, Anastasiou R, Vandenberghie I, van Beeumen J & Kalantzopoulos G 1999 Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: characterization and specificity for β -casein. *Applied and Environmental Microbiology* 65 2035–2040
- Tzvetkova I, Dalgalarondo M, Danova S, Iliev I, Ivanova I, Choher J-M & Haertlé T 2007 Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. *Journal of Food Biochemistry* 31 680–702
- Wang J, Lin J, Bardina L, Goldis M, Nowak-Węgrzyn A, Shreffler WG & Sampson HA 2010 Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 695–702
- Wang SL, Huang TY, Wang CY, Liang TW, Yen YH & Sakata Y 2008 Bioconversion of squid pen by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* TKU010 for the production of proteases and lettuce growth enhancing biofertilizers. *Bioresource Technology* 99 5436–5443

TRAVAUX COMPLEMENTAIRES

CHAPITRE II

La protéolyse des caséines β et α_{S1} par les protéases de *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 isolées de produits laitiers égyptiens diminue leur immuno-réactivité

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 ont été repiqués (5% inoculum) dans le milieu MRS. Ces souches ont été testées sur le milieu Milk-Citrate-Agar (MCA) (Fira et al., 2001). Les cellules collectées étaient re-suspendues dans un tampon phosphate de pH 6,5. Les cellules ont été mélangées avec la caséine α_{S1} ou la caséine β (5 mg/ml) (1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, une centrifugation était réalisée (10 min à 8000 g) et le surnageant clair prélevé puis analysé par SDS-PAGE et RP-HPLC.

La Figure 8 montre que les caséines α_{S1} et β ont été dégradées après 24 h d'incubation à 37 °C.

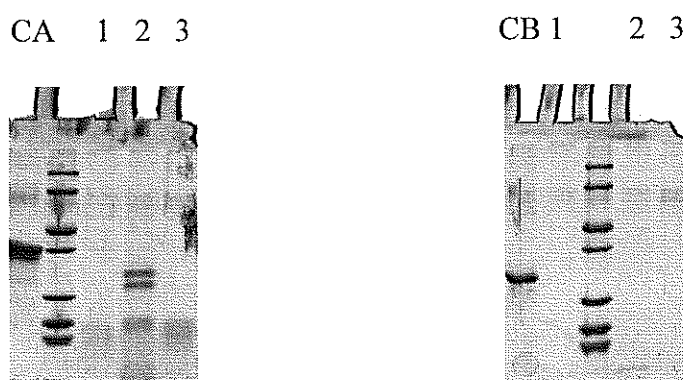


Fig. 8: SDS-PAGE des caséines α_{S1} et β après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (1), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (2) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (3) à 37 ° C. CA : caséine α_{S1} incubée sans souche ; CB : caséine β incubée sans souche.

Profils RP-HPLC

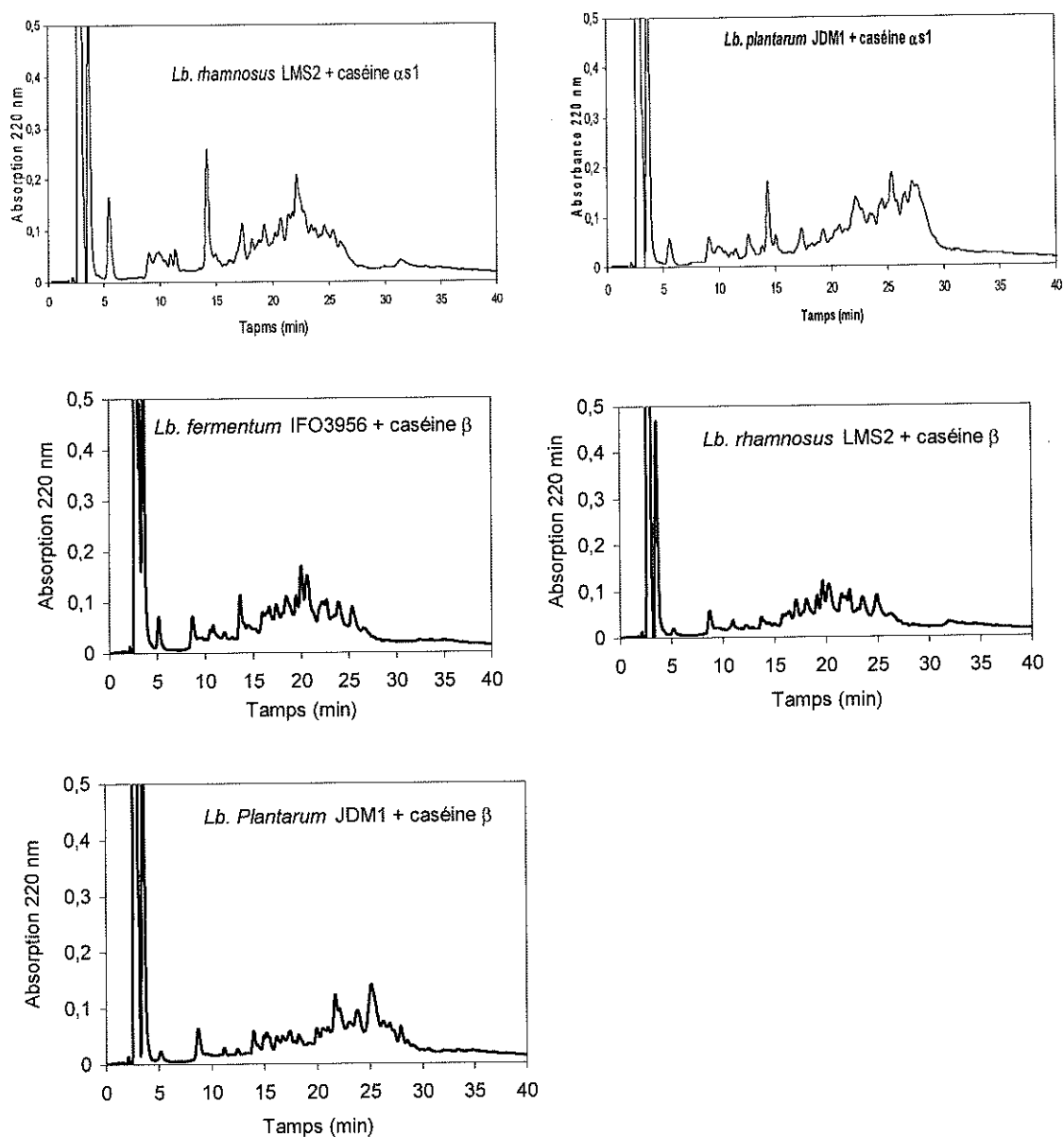


Fig. 9: Profils RP-HPLC des caséines α_{s1} et β après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 à 37 °C.

La présence de peptides n'a été observée (Fig. 9) que dans le cas de l'utilisation des souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment par SDS-PAGE. Le profil HPLC des hydrolysats de caséines α_{s1} et β après protéolyse par les souches étudiées montre que de nombreux peptides de petite ou moyenne taille, hydrophiles, sont générés.

Par ailleurs, l'analyse des profils HPLC des hydrolysats obtenus par l'utilisation de différentes souches a montré qu'ils étaient différents et que chaque hydrolysat devait donc être étudié en test ELISA.

Types de protéases produites par les lactobacilles

Des amplifications PCR ont été réalisées sur l'ADN des souches de *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 qui présentaient une activité protéolytique (Fig. 10). Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide des amorces pour huit gènes de protéases connues (*PrtP*/*PrtM*, *PrtB*, *PrtH*, et *PrtR*) comme indiqué sur le Tableau 7.

On peut observer que les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 sont similaires dans leur production de protéases mais que celles produites par la souche *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 sont différentes.

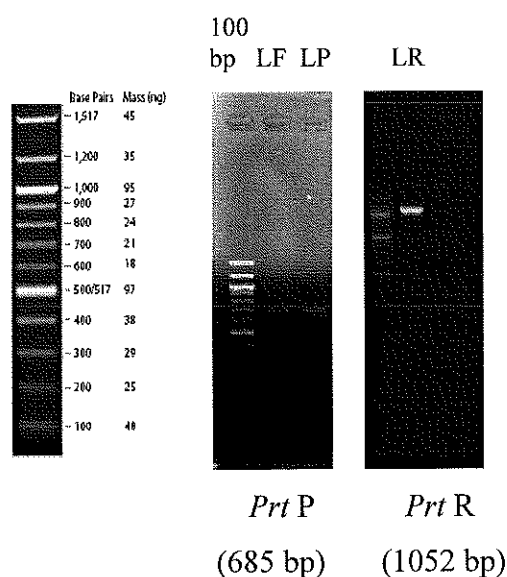


Fig. 10: Détection par PCR de gènes codant pour des protéases connues dans les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (LF), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (LR) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (LP).

Les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 renferment le gène de structure de la protéase *PrtP*, tandis que la souche *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 contient les gènes de structure de la protéase *PrtR*. Aucune présence des gènes de structure des protéases *PrtB* ou *PrtH* n'a été détectée dans les trois souches testées.

Des résultats similaires ont été obtenus par Strahinic et al. (2010) et Pastar et al. (2003). Strahinic et al. (2010) ont étudié l'activité protéolytique de différents *Lactobacillus plantarum* issus d'isolats naturels et examiné les gènes de structure des protéases. Grâce à des amorces spécifiques ils ont trouvé que toutes les souches protéolytiques de *Lactobacillus plantarum* contenaient le gène de prt P. Aucune présence des gènes des protéases *PrfB*, *prtR* ou *PrfH* n'a été détectée dans toutes les souches testées. Pastar et al. (2003) ont identifié un isolat de *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 renfermant le gène *prt R*.

ELISA compétitif

La Figure 11 montre la fixation de la caséine α_{S1} intacte et de ses hydrolysats obtenus par l'activité protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 sur les IgE d'un pool de sept sérums de patients. La fixation aux IgE des hydrolysats de caséine α_{S1} obtenus par l'action protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et de *Lactobacillus plantarum* JDM1 était considérablement plus faible que celle de la caséine α_{S1} native.

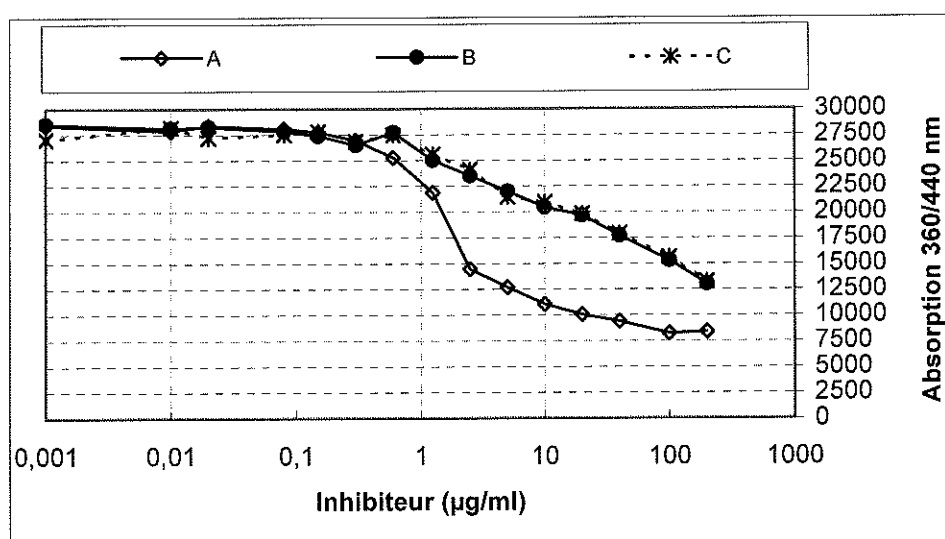


Fig. 11: Immuno-réactivité des hydrolysats de caséine α_{S1} après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (B) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (C) à 37 °C et d'un contrôle (A) obtenu par incubation de la caséine α_{S1} en absence de souche.

Tableau (12): Inhibition de la fixation des IgE avec la caséine α_{S1} (contrôle) et ses hydrolysats obtenus par l'action protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 après 24 h d'incubation à 37 °C

	caséine α_{S1}		
	Contrôle	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1
IC ₅₀ (µg/ml)	1,87	50,6	50,6

L'IC₅₀% de la caséine α_{S1} intacte était d'environ 1,87 µg/ml, alors qu'il s'élevait à 50,6 µg/ml pour ses hydrolysats obtenus par l'action protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (Tableau 12). Cela signifie que la fixation de la caséine α_{S1} hydrolysée est d'environ 27 fois plus faible que celle de la protéine intacte. Cette fixation plus faible aux IgE pourrait conduire à de plus faibles réactions allergiques. En conséquence, l'usage des hydrolysats de caséine α_{S1} obtenus par l'action protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et de *Lactobacillus plantarum* JDM1 pourrait conduire à des réactions allergiques atténuées.

De la même manière, nous avons étudié la fixation aux IgE d'un pool de cinq sérums de patients allergiques, de la caséine β et de ses hydrolysats obtenus par l'action protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, *Lactobacillus plantarum* JDM1 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956. Il a été observé que la fixation aux IgE des trois hydrolysats de caséine β était considérablement plus faible que celle de la caséine β intacte (Fig. 12).

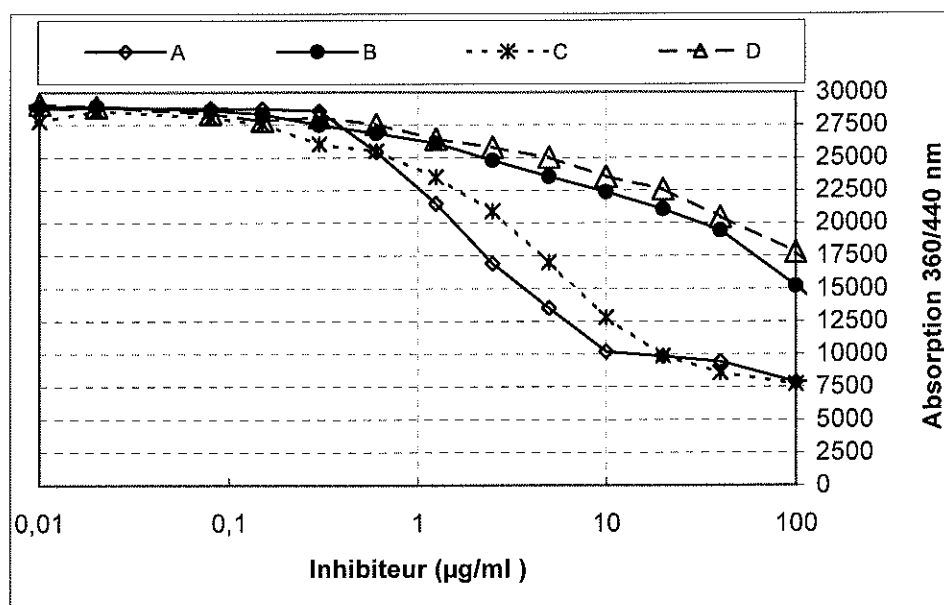


Fig. 12: Immuno-réactivité des hydrolysats de caséine β après 24 h d'incubation avec *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (D), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (B) et *Lactobacillus plantarum* JDM1 (C) à 37° C et d'un contrôle (A) obtenu avec de la caséine β incubée sans souche.

L'IC₅₀% de la caséine β intacte était d'environ 2,04 μ g/ml, alors que les valeurs obtenues avec les hydrolysats de caséine β étaient nettement plus élevées, respectivement de 60,9 et 74,5 μ g/ml pour *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956. Cependant, aucune différence significative n'était observée avec *Lactobacillus plantarum* JDM1 (2,38) (Tableau 13). Cela signifie que la fixation aux IgE de la caséine β hydrolysée est d'environ 30 (*Lactobacillus rhamnosus* LMS2) et 37 (*Lactobacillus fermentum* IFO3956) fois plus faible que celle de la protéine intacte. Cette fixation plus faible aux IgE pourrait conduire à de plus faibles réactions allergiques. En conséquence, l'hydrolysate de la caséine β obtenu par l'activité protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et de *Lactobacillus fermentum* IFO3956 atténuerait ou diminuerait les réactions allergiques.

Tableau (13): Inhibition de la fixation des IgE à la caséine β (contrôle) et à ses hydrolysats obtenus par l'activité protéolytique de *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, *Lactobacillus plantarum* JDM1 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956 après 24 h d'incubation à 37 °C

	Caséine β			
	Contrôle	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956
IC ₅₀ (μ g/ml)	2,04	60,9	2,38	74,5

En conséquence, l'immuno réactivité des caséines β et α_{S1} peut être considérablement réduite par l'hydrolyse de la caséine α_{S1} avec *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, *Lactobacillus plantarum* JDM1 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et par l'hydrolyse de la caséine β avec *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956.

Des résultats similaires ont été trouvés par Tzvetkova et al. (2007) qui ont étudié l'hydrolyse des protéines majeures du lait par des LAB utilisées pour la fabrication traditionnelle de yaourts bulgares. Il a été démontré que pendant le processus de fermentation, les protéines du lait sont acidifiées par la production d'acide lactique et sont hydrolysées par des protéases et peptidases des bactéries. Cette protéolyse est suivie d'une réduction du nombre d'épitopes et par conséquent par une diminution de l'allergénicité des protéines hydrolysées.

Chapitre III :

Isolement et identification de bactéries lactiques (LAB) qui montrent une activité antimicrobienne dans les produits laitiers traditionnels égyptiens

Characterization of two safe *Enterococcus* strains producing enterocins isolated from Egyptian dairy products

**El-Ghaish, S., Hadji-Sfaxi, I., Ahmadova, A., Choiset, Y., Rabesona, H.,
Sitohy, M., Haertlé, T., & Chobert, J.-M.**

Beneficial Microbes, 2011, 2, 15-27.

RÉSUMÉ

Caractérisation de deux espèces d'*Enterococcus* sans facteurs de virulence, isolées de produits laitiers Égyptiens, produisant des entérocinés

Deux souches actives (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) isolées de produits laitiers égyptiens se sont révélées capables de produire plusieurs bactériocines (*ent* A, *ent* B, *ent* P et *ent* L50A) présentant une activité considérable contre *Listeria monocytogenes*. L'activité antibactérienne n'était pas affectée par le traitement du surnageant de culture avec de la catalase, mais était complètement éliminée après un traitement avec la protéase K, l' α -chymotrypsine et la trypsine, ce qui confirme la nature protéique des agents antimicrobiens. L'activité antimicrobienne était stable sur une large gamme de pH (2-10) et après des traitements thermiques sévères (100 °C pendant 10 min). La quantité de bactériocine produite dans les milieux de culture des souches isolées actives atteignait son maximum à la fin de la phase exponentielle et restait stable jusqu'à la fin de la période d'incubation (24 h). L'analyse des souches *Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980 par les méthodes de biologie moléculaire a révélé l'absence de gènes de facteurs de virulence *astI*, *cyl* A et *cyl* B, *ace*, *efaAfs* et *espfm* quand on les comparait avec la souche *Enterococcus faecalis* MM4594 présentant ces facteurs. *Enterococcus faecium* TX1330 était sensible à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à la vancomycine, à la gentamicine et à la pénicilline, mais était résistante à la tétracycline. *Enterococcus faecium* E980 était sensible à l'ampicilline, à la ciprofloxacine, à la vancomycine, à la gentamicine et à la pénicilline, mais était résistante à la tétracycline et au chloramphénicol. L'ensemble de ces résultats montre que ces deux souches (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) productrices d'entérocinés, dépourvues de facteurs de virulence et surtout sensibles aux antibiotiques, peuvent être utilisées comme levain ou en co-culture dans les processus de fabrication alimentaire.

Characterization of two safe *Enterococcus* strains producing enterocins isolated from Egyptian dairy products

S. El-Ghaish¹, I. Hadji-Sfadi^{1,2}, A. Alunadova^{1,3}, Y. Choiset¹, H. Rabesona¹, M. Sitohy^{1,4}, T. Haertlé¹ and J.-M. Chobert¹

¹Institut National de la Recherche Agronomique, UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, Equipe Fonctions et Interactions des Protéines, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France; ²Université Carthage 7 Novembre, INSAT, Unité Génie Biologique, Tunis, Tunisia; ³Baku State University, Biotechnical and Biochemistry Chair, Khalilov Street 23, 370602 Baku, Azerbaijan; ⁴Zagazig University, Faculty of Agriculture, Biochemistry Department, 44511 Zagazig, Egypt; jean-marc.chobert@nantes.inra.fr

Received: 12 January 2011 / Accepted: 11 February 2011
© 2011 Wageningen Academic Publishers

Abstract

Five bacterial cocci isolates were selected from a wide pool of 503 isolates collected from traditional Egyptian dairy products on the basis of their inhibitory activities against *Lactobacillus brevis* F145, *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Enterococcus faecium* HKLHS, *Listeria ivanovii* ATCC, *Listeria innocua* CIP 80.11 and *Listeria monocytogenes* EGDe 107776. These 5 isolates were identified as *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980 by 16S rDNA amplification and sequencing. The antibacterial activity of the two strains was not affected by treatment of the cell free culture supernatant with catalase but their activities disappeared completely when digested with protease K, α -chymotrypsin and trypsin. The antimicrobial substance was stable over a wide range of pH (2-10) and was active after heating at 100 °C for 10 min. Bacteriocin yield in two strains reached a maximum (1,600 AU/ml) at the end of the exponential phase (6 h) and remained stable until the end of 24 h-incubation period when the medium reached pH 5.5. Maximal production of bacteriocin was obtained when growing the bacterial cells at temperatures ranging between 30 and 37 °C. Bacteriocin production was unaffected when the bacterial cells grew under severe conditions of pH (9.6) and in high salt (6.5% NaCl). Thanks to PCR gene amplification the bacteriocins produced by *E. faecium* TX1330 could be identified as enterocins A and B structural genes, while the bacteriocins produced by *E. faecium* E980 could be identified as enterocins P and L50A structural genes, which can be classified into two enterocin subclasses (IIa and IIc), respectively. PCR amplification demonstrated that the two studied strains did not contain virulence factors *asaI*, *cyl A* and *B*, *ace*, *eflAfs* and *espfm*. These two strains were sensitive to most of the tested antibiotics but were resistant to tetracycline. *E. faecium* E980 was also resistant to chloramphenicol.

Keywords: 16S rRNA, enterococci, Egyptian dairy products, antimicrobial, food safety

1. Introduction

Screening and characterisation of non-starter lactic acid bacteria for potential technological or biological functions is highly interesting for possible new industrial applications. Lactic acid bacteria (LAB) are commonly defined as Gram-positive, non-sporulating, catalase-negative, aero-tolerant, acid tolerant, nutritionally fastidious, strictly fermentative organisms that lack cytochromes and produce lactic acid as the major end product of carbohydrate metabolism.

LAB embrace a variety of industrially important genera, including *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* and *Lactobacillus* species (Di Cagno *et al.*, 2003).

Studies on the microbial content of many traditional cheeses in the Mediterranean countries have indicated that enterococci play an important role in their ripening. They are used as non-starter LAB in different types of cheeses, especially those produced from raw milk. The positive

action of enterococci in cheese production is due to specific biochemical activities such as lipolysis, citrate utilisation, production of aromatic volatile compounds, proteolysis and antimicrobial antagonism (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). In a recent survey of the bacterial surface-ripening flora of French and German cheeses, different *Enterococcus* spp. strains were found to have a long history of safe use in food (Sarantinopoulos *et al.*, 2001).

Currently, the genus *Enterococcus* has been defined as containing more than 20 species, with *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* being the most largely distributed in food systems. Enterococci play important roles in dairy technology. Some enterococci of dairy origin (*E. faecalis* and *E. faecium*) have also been reported to produce bacteriocins (enterocins), with antimicrobial activity limiting food spoilage or inhibiting growth of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* spp. (Giraffa, 2003).

Enterocins produced by enterococci usually belong to class II bacteriocins, which are small, cationic, hydrophobic and heat-stable peptides with a generally strong anti-*Listeria* effect (Giraffa, 2003). Extensive research has been carried out on the characterisation of enterocins, or enterocin-producing strains, for potential applications in dairy technology. Several studies have demonstrated the inhibitory effect of enterocin-producing *E. faecium* or *E. faecalis* strains against artificially contaminated with *L. monocytogenes* dairy systems such as milk, soft cheeses and soymilk. The presence and anti-*Listeria* activity of enterocins produced by protective cultures in cheeses was observed at the end of ripening while no or negligible effects on the organoleptic properties of the products were observed. Therefore, the functionality of enterocin-producing strains in industrial conditions depends strongly on the cheese systems and the applied technologies (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Oumer *et al.*, 2001). Potential technological applications of enterocins produced during cheese manufacture qualify enterococci as potential starters or protective cultures in cheese industry. Enterococci can propagate in intestinal or environmental conditions, forming persistent colonies that survive even adverse medium conditions such as extreme pH, temperature and salinity (Giraffa, 2003).

E. faecium and *E. faecalis* species have been applied in human, probiotic supplements. *E. faecium* predominates in different fermented foods, including sausages, cheeses, fermented vegetables, and fermented milk, all with long histories of safe consumption (Hugas *et al.*, 2003). It plays a beneficial role in the production of a variety of fermented food products, and contributes to the ripening and aroma development of these products (Yoon *et al.*, 2008). In Denmark, a fermented milk product containing *E. faecium* SF 68 has been sold for many years because

of its hypocholesterolaemic benefits for the consumer (Agerbaek *et al.*, 1995).

The fear that antimicrobial resistance genes or genes encoding virulence factors can be transferred to other bacteria in the gastrointestinal tract creates the need to verify their absence before use. A virulence factor is an effector molecule that enhances the ability of micro-organisms to cause disease. Some virulence factors are aggregation substances, gelatinase, extra-cellular superoxide and extracellular surface protein (Franz *et al.*, 2003).

The selection of safe *Enterococcus* strains for potential use in the food industry as co-cultures or starter cultures depends not only on their antimicrobial or bacteriocin activities but also on the absence of pathogenic hazards produced by virulence factors. Hence, the studied strains from traditional Egyptian dairy products were screened for the potential production of enterocins as well as the absence of transferable antibiotic resistances and absence of virulence factors. Genetic and chemical characterisation of the antimicrobial substances was carried out, i.e. genotyping, stability against enzymes, pH, heat and the factors influencing its production.

2. Material and methods

Materials

Skimmed milk powder, Triton X-100, and 3% hydrogen peroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Glycerol, sodium citrate, tris, potassium chloride, Luria-Bertani (LB) medium, ampicillin, vancomycin, ciprofloxacin, proteinase K, trypsin, α -chymotrypsin, catalase, α -amylase and lipase were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The media MRS (De Man-Rogosa-Sharpe), M17 and BHI (Brain Heart Infusion) were obtained from Biokar Diagnostics (Beauvais, France). Agar was purchased from Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France). Sodium chloride and sodium hydroxide were obtained from Panréac (Lyon, France). YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) was purchased from Serva (St. Germain en Laye, France). The supplier of hydrochloric acid was Carlo Erba (Val de Reuil, France) and the supplier of antibiotics (chloramphenicol, penicillin, tetracycline and gentamicin) was Euromedex (Souffelweyersheim, France). All other products used were of analytical grade.

Strains

Lactobacillus bulgaricus 340 (Rhodia Food, Paris, France) was grown on MRS at 37 °C. *E. faecium* HKLHS (INRA, Nantes, France), *Listeria ivanovii* (ATCC, Molsheim, France), *Listeria innocua* CIP 80.11 (ONIRIS, Nantes, France), *L. monocytogenes* EGDc 107776 (ONIRIS), *Salmonella enterica* 13076 (ATCC), *Bacillus cereus*

(ONIRIS), *S. aureus* CIP 53154 (ONIRIS), and *Pseudomonas aeruginosa* (ONIRIS) were grown on BHI at 37 °C. *Escherichia coli* ATCC 23355 was grown on LB at 37 °C. *Candida pseudotropicalis* (INRA) and *Saccharomyces cerevisiae* DSH 213.83 (ONIRIS) were grown on YPD at 30 °C.

Samples collection

Seventy-five samples of traditional dairy products, Cheddar cheese (enzymatic coagulated hard cheese), Ras cheese (hard cheese prepared from rennet coagulated raw milk), Domiatti cheese (enzymatic coagulated soft cheese), Kareish cheese (acid coagulated soft cheese), and Rayeb milk (home-made fermented milk) were collected from the local markets of four Egyptian cities, Alexandria, Kafr El-Sheikh, Darnietta and Tanta. The first three cities are located on the northern Mediterranean coast, to the east, middle and west, respectively, while the fourth one is situated in Delta just to the south of Kafr El-Sheikh.

Isolation and identification of lactic acid bacteria cultures

An amount (10 g) of each dairy product was weighed, added aseptically to 90 ml of sodium citrate (2%, w/v) and homogenised in a sterile bag. The resulting homogenate was decimally and serially diluted up to 10^{-8} using Ringer solution (0.9% NaCl, w/v). One ml from each dilution was plated onto M17 and MRS agar. All plates were incubated at 37 °C for 48 h and grown colonies were selected according to their shape and colour from plates with colony numbers between 30 and 300. They were examined with an optical microscope for Gram staining. Catalase activity was detected by placing drops of 3% H_2O_2 (w/v) on cultures. The cultures were classified into bacilli (Gram-positive, catalase-negative rods) and cocci (Gram-positive, catalase-negative spheres). The cultures were further purified by streaking on suitable media and the purified isolates were reconstituted in sterile skimmed milk (12.5%, w/v) supplemented with 30% (w/v) glycerol and stored at -20 °C.

Antimicrobial activity assay

The different isolates were reactivated by combining 50 µl of the pre-culture with 950 µl of M17 or MRS broth and incubation at 37 °C overnight. The antimicrobial activity of cell-free supernatant was determined by well diffusion method (Schillinger and Lucke, 1989) with slight modification. Cell-free supernatant was obtained after centrifuging the overnight cultures (16–18 h) at 8,000 rpm for 10 min at 4 °C and adjusting the pH to 6.5. An aliquot of 100 µl culture of the indicator test bacteria (*Lactobacillus brevis* F145) grown to the early stationary growth phase in nutrient medium, was added to 20 ml of soft nutrient agar (0.8%, w/v). Wells were made in the lawn of hardened soft agars in Petri dishes and aliquots (50 µl) of the supernatant

were poured in them. The plates were left for 1 h at room temperature in sterile conditions before incubating at 37 °C for 24 h. A clear zone was accepted as positive.

The isolates active against *L. brevis* F145 (24 strains) were tested further for their antimicrobial activities against other strains such as *L. bulgaricus* 340, *E. faecium* HKLHS, *L. ivanovii* ATCC, *L. innocua* CIP 80.11, *L. monocytogenes* EGDc 107776, *S. enterica* ATCC 13076, *B. cereus*, *S. aureus* CIP 53154, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 23355 (BAS), *C. pseudotropicalis* and *S. cerevisiae* DSH 213.83.

Factors affecting antimicrobial activity

Enzymes

The effect of various enzymes on antibacterial activity against *L. brevis* F145 was determined according to Noonpakee *et al.* (2003) with slight modification. 200 ml of filter-sterilised cell-free supernatant of the isolate was incubated with 20 µl of the following enzymes: proteinase K, trypsin, α -chymotrypsin, catalase, α -amylase and lipase at a final concentration of 0.1 mg/ml in 20 mM phosphate buffer, pH 7. After 2 h of incubation at 37 °C, enzyme activity was stopped by heating at 100 °C for 5 min. Negative control was made with 200 µl MRS or M17 broth and 20 µl sterilised water. Positive control was constituted from 200 µl bacterial supernatant and 20 µl sterilised water. The residual antibacterial activity was determined by spot-on-lawn method (Batdorj *et al.*, 2006).

pH

The pH of cell-free supernatant was adjusted to values between 2 and 10 with NaOH or HCl. After 2 h incubation at 37 °C, the pH was readjusted to 6.5 in all samples and the residual bacteriocin activity was determined as described earlier against *L. brevis* F145.

Heat treatment

Volumes of cell-free supernatant (5 ml) were boiled in a water bath at 100 °C for 10 and 30 min and in an autoclave at 121 °C for 20 min. Unheated samples were used as controls.

16S rDNA amplification, identification and sequencing

DNA was extracted from the isolates using Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and used as a template for 16S rRNA gene amplification. The universal primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-TAAGGAGGTGATCCAGGC-3') were used (Weisburg *et al.*, 1991). DNA amplifications were performed in DNA thermal cycler model (Techno; Barloworld Scientific, Cambridge, UK). The mix reaction contained: PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 1.5 mM

MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen GmbH), 1 mM of each primer and 40 ng DNA in a final volume of 50 µl. PCR amplifications were performed under the following conditions: denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 56 °C for 1.15 min and DNA extension at 72 °C for 1.15 min. A final extension was added at 72 °C for 5 min. Amplicons were analysed on 1% (w/v) agarose gel with ethidium bromide (0.5 mg/ml) in 0.5×TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) buffer pH 8.2-8.4, for 30 min at 100 V and made visible by UV trans-illumination. DNA sequencing was carried out by MilleGen sequencing service (Labège, France).

Production of bacteriocin-like substance

One millilitre of an overnight culture of the tested isolate was added to 30 ml M17 medium and incubated at 37 °C under non-regulated pH conditions. Cell growth was monitored every hour for turbidity (OD_{600nm}) and pH determination. Antimicrobial activity was calculated according to spot-on-lawn method (Yamamoto *et al.*, 2003) and expressed as AU/ml (arbitrary units per ml). Soft nutrient agar was solidified in a sterile Petri dish after addition of 100 µl of an overnight culture of *L. brevis* F145. Cell-free supernatants were serially diluted two-fold with M17 medium. An aliquot (10 µl) of each dilution was spotted onto the plate before overnight incubation at 37 °C. The titre was defined as the reciprocal of the highest dilution (2ⁿ) causing the inhibition of the indicator lawn. Thus, the AU of antimicrobial activity per millilitre was defined as 2ⁿ × 1000 µl / 10 µl.

Factors affecting production of bacteriocin

Temperature

Ten ml of an overnight culture of the tested isolate were inoculated into 200 ml of M17 broth media and incubated at different temperatures, 4, 10, 30, 37, and 45 °C. Bacteriocin production was determined by spot-on-lawn method against *L. brevis* F145 (Batdorj *et al.*, 2006).

pH and salt

Bacteriocin production was also determined as above but the isolates were grown in M17 broth containing 6.5% NaCl or M17 broth at pH 9.6 for 24 h at 37 °C and compared to control (pH 6.5 and without salt).

Enterocin typing by PCR gene amplification and identification

DNA was extracted from overnight *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980 cultures by Dneasy Blood & Tissue Kit as previously described. Primer sequences for eight

genes of known enterocins (A, B, P, 31, Q, AS48, L50A and Cyl) were used for gene amplification (Table 1). The DNA extract from the two defined strains was used as templates for gene amplification of the eight known enterocins. DNA amplification was performed in DNA thermal cycler model. Mix reaction contained (final concentration): 1× reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.1% Triton X-100), 200 µM of each dNTPs, 0.025 U/µl Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 1 µM of each primer and 40 ng DNA in a final volume of 50 µl. For the amplifications of genes encoding enterocins A, 31 and Cyl, the thermocycler was programmed to the following conditions: denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 58 °C for 30 s and DNA extension at 72 °C for 30 s. For the amplifications of the genes encoding enterocins B and AS48, the thermocycler was programmed at the following conditions: denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 56 °C for 30 s and DNA extension at 72 °C for 30 s. For the amplifications of genes encoding enterocins P and Q, the thermocycler was programmed at the following conditions: denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 60 °C for 30 s and DNA extension at 72 °C for 30 s. For the amplifications of genes encoding enterocin L50A, the thermocycler was programmed at the following conditions: denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 50 °C for 45 s and DNA extension at 72 °C for 30 s. In all cases a final additional 10 min extension was applied at 72 °C. Amplicons were spread on 1.2% (w/v) agarose gel with ethidium bromide (0.5 mg/ml) in 0.5× TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) buffer pH 8.2-8.4, for 30 min at 100 V and visualised by UV trans-illumination.

Detection of virulence factors by PCR amplification

DNA was extracted from overnight cultures of *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980 by Dneasy Blood & Tissue Kit using *E. faecalis* MM4594 as positive control. Primer sequences for five known virulence genes, *asaI* (aggregation substance), *cyl A* and *cyl B* (cytolysin), *ace* (collagen-binding protein), *efaAfs* (*E. faecalis* endocarditis antigen), and *espfm* (enterococcal surface protein) were used (Table 1). DNA extracts of the two strains were used as templates for virulence gene amplification. DNA amplifications were performed in DNA thermal cycler model. Mix reaction was the same as described above. In case of the amplifications of genes *asaI*, *ace* and *espfm*, the thermocycler was programmed as following: denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 56 °C for 1 min and DNA extension at 72 °C for 1 min. For the amplifications of gene *efaAfs* the thermocycler was programmed as following: denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 54 °C for 1 min and

Table 1. PCR primers and products used for the detection of genes encoding for the virulence factors and known enterocins.

Gene	Primer	Sequence 5' → 3'	Product size (bp)	TM	Reference
Virulence factors					
asaI	ASA11	GCACGCTATTACGAACATGA	375	56 °C	Vanckerckhoven <i>et al.</i> (2004)
	ASA12	TAAGAAAGAACATCACCACGA			
ace	ACE-F	GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG	1,008	56 °C	Ben Omar <i>et al.</i> (2004)
	ACE-R	GTCTGTCTTTTCACCTTGTTTC			
efaAfs	TE5	GACAGACCCTCAGCAATA	705	54 °C	Eaton and Gasson (2001)
	TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA			
esp	ESP14F	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	510	56 °C	Vanckerckhoven <i>et al.</i> (2004)
	ESP12R	AATTGATCTTTAGCATCTGG			
CylA	CYT1	ACTCGGGGATTGATAGGC	688	58 °C	Vanckerckhoven <i>et al.</i> (2004)
	CYT1b	GCTGCTAAAGCTGCGCTT			
CylB	CYT81	AAGTACACTAGTAGAACTAAGGGA3	2,020	52 °C	Semedo <i>et al.</i> (2003)
	CYT82	ACAGTGAACGATATAACTCGCTATT			
	CYTLL2	GCTTCACGCTCACTAAGTTTTATAG			
Type of enterocins					
A	AF	GGTACCACTCATAGTGGAAA	130	58 °C	De Vuyst <i>et al.</i> (2003)
	AR	CCCTGGAATTGCTCCACCTAA			
B	BF	CAAAATGTAAAAGAAATTAAGTACG	180	56 °C	De Vuyst <i>et al.</i> (2003)
	BR	AGAGTATACATTGCTAACCC			
P	PF	GCTACCGCTTCATATGGTAATGGT	132	60 °C	De Vuyst <i>et al.</i> (2003)
	PR	ATGTCCCATACCTGCCAAACGAGAAGC			
31	31F	CCTACGTATTACGGAAATGGT	130	58 °C	Klibi <i>et al.</i> (2008)
	31R	GCCATGTTGTACCAACCAATT			
Q	QF	GGAATAAGAGTAGTGGAACTGATATGAGAC	653	60 °C	De Vuyst <i>et al.</i> (2003)
	QR	AAAGAGTGCTCTTCGAGCAGCC			
AS48	AS48F	GAGGAGTATCATGGTTAAAGA	253	56 °C	De Vuyst <i>et al.</i> (2003)
	AS48R	ATATTGTTAAATTACCAA			
L50A	Ent 1 Fw	NNNNCCATGGGAGCAATCGCAAAA	135	50 °C	Beldorj <i>et al.</i> (2006)
	Ent 1 Rev	NNNNAAGCTTAATGTTTTTAAATCCACTCAAT			
Cyl	Cyl F	GCGGATTTTTACTGGAGTN	248	58 °C	Klibi <i>et al.</i> (2008)
	Cyl R	CCTACTCCTAAGCCTATGGTA			

DNA extension at 72 °C for 1 min. For the amplifications of genes *cylA* the thermocycler was programmed as following: denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, primer annealing at 58 °C for 45 s and DNA extension at 72 °C for 45 s. For the amplifications of genes *cylB* the thermocycler was programmed as following: denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 52 °C for 1 min and DNA extension at 72 °C for 1 min. In all cases a final additional 10 min extension was applied at 72 °C. Amplicons were analysed as described above.

Disk diffusion antibiotic sensitivity testing

The antibiotic resistances of the two isolated strains, *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980 were assessed against ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, penicillin, and tetracycline by disk diffusion antibiotic sensitivity testing. The breakpoints were

defined according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) method (Karmarkar *et al.*, 2004). An aliquot (100 µl) of the bacterial culture (*E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980) grown to the early stationary growth phase in M17 medium was added to 20 ml of soft M17 agar (0.8%, w/v) and left to solidify. The antibiotic disks (Prat Dumas, Couze-St-Front, France; 9 mm) were placed on the surface of the inoculated media and aliquots (30 µl) of the antibiotic solutions with different concentrations were poured on the disks. The plates were left for 1 h at room temperature under sterile conditions before incubating for 24 h at 37 °C (Andrews, 2001). The applied antibiotic concentrations were 0.0, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 750 and 1,500 µg/ml. A clear zone surrounding the disk was taken as positive. Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the growth of microorganism after overnight incubation. MIC values are used to confirm the resistance of microorganisms

to an antimicrobial agent and to estimate MIC breakpoints. MIC values were compared to MIC breakpoints described by the European Food Safety Authority (EFSA, 2008).

3. Results and discussion

Isolation and identification of various LAB isolates

The greater part of the dairy isolates (71.7%) was Gram-positive and catalase-negative, i.e. LAB what remains in agreement with what was reported by Beukes *et al.* (2001) in a parallel study in South Africa. Data in Table 2 indicate that 503 LAB isolates were recovered from 75 traditional dairy product samples being Gram-positive, and catalase-negative. Optical microscopy classified this group into 330 cocci and 173 lactobacilli isolates, i.e. 65.6% and 34.4% of the total LAB isolates, respectively. This result shows the predominance of cocci over lactobacilli, which is consistent with reports by El Soda *et al.* (2003) and El-Baradei *et al.* (2008).

Antimicrobial activity

All LAB isolates (503) were tested primarily for their inhibitory actions against *L. brevis* F145 by well diffusion method revealing that only 24 cocci isolates were active.

These 24 active cocci isolates were tested further against other bacteria and yeasts, revealing 18 isolates with inhibitory activities against *L. bulgaricus* 340, 16 isolates with inhibitory activities against *E. faecium* HKLHS, 9 isolates with inhibitory activities against *L. ivanovii* ATCC, 8 isolates inhibiting growth of *L. innocua* CIP 80.11 and 5 isolates with inhibitory activity against *L. monocytogenes* EGDe 107776. No inhibitory activities were observed against *S. enterica* ATCC 13076, *B. cereus*, *S. aureus* CIP 53154, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 23355, *C. pseudotropicalis* and *S. cerevisiae* DSH 213.83. The 5 cocci isolates (named S2, S14, Sh36, SA2 and S46) with inhibitory activities against *L. monocytogenes* EGDe 107776 were also the most active against all other tested strains. The results obtained remain in agreement with previous studies indicating that enterococci produce bacteriocins termed enterocins, which are small peptides with activities against closely related Gram-positive bacteria including spoilage or pathogenic bacteria, such as *Listeria* spp. (Batdorj *et al.*, 2006; Belgacem *et al.*, 2010; De Vuyst and Vandamme, 1994; Giraffa, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003).

Table 2. Geographical distribution of lactic acid bacteria (LAB) isolates collected from Egyptian dairy products.

City	Dairy products	Number of samples	Number of total isolates		Number of LAB isolates	
			Cocci	Bacilli	Cocci	Bacilli
Alexandria	Ras cheese	5	12	3	9	2
	Cheddar cheese	3	8	0	6	0
	Domlatti cheese	5	22	2	14	2
	Kareish cheese	3	16	7	9	5
	Laban rayeb	4	19	4	13	3
Kafr El-Sheikh	Ras cheese	4	8	7	5	6
	Cheddar cheese	3	7	1	6	1
	Domlatti cheese	5	45	17	27	15
	Kareish cheese	3	31	16	21	14
	Laban rayeb	3	27	4	18	3
Tanla	Ras cheese	5	31	6	19	5
	Cheddar cheese	3	9	3	8	3
	Domlatti cheese	5	51	23	32	20
	Kareish cheese	3	23	21	17	18
	Laban rayeb	8	31	13	24	10
Damiette	Ras cheese	23	12	13	10	10
	Cheddar cheese	3	13	5	10	4
	Domlatti cheese	3	41	29	29	25
	Kareish cheese	5	47	14	29	12
	Laban rayeb	3	31	20	22	15
Total		75	495	207	330	173

Effects of enzymes, pH and heat treatments

The pH of the supernatants of the 5 cocci isolates (S2, S14, Sh36, SA2 and S46) was adjusted to 6.5 before combining with 0.1 mg/ml of different enzymes (catalase, protease K, α -chymotrypsin, trypsin, α -amylase and lipase) and re-assessing their antibacterial activity against *L. brevis* F145 as indicated in Table 3. It can be observed that treatment with catalase did not reduce the inhibitory activities of 4 isolates (S14, SA2, S46 and Sh36) while only S2 isolate activity was inhibited. This indicates that in most cases the bacterial inhibitory activities are not due to hydrogen peroxide but to other antimicrobial compounds secreted into the growth medium. The antimicrobial activity observed in the case of S2 isolate was at least partially due to hydrogen peroxide production. These results are in line with what was reported by Batdorj *et al.* (2006) and Yoon *et al.* (2008) who found that the antimicrobial activity of *Enterococcus durans* did not decrease in the presence of catalase, thus excluding its inhibition by hydrogen peroxide.

The antibacterial activity of S14, SA2, S46 and Sh36 was completely inactivated by treating their supernatant of culture with protease K, α -chymotrypsin and trypsin. In

the case of S2 isolate, total reduction of the antimicrobial activity was exclusively observed after α -chymotrypsin treatment while only a partial reduction was observed after trypsin and protease K treatments. These results indicate that the antimicrobial substances produced by these isolates may be of proteinaceous nature and belong to bacteriocins. Most of the antibacterial activities of the cocci isolates were not inhibited by the lipase or α -amylase except S46 isolate, which was completely inhibited by α -amylase. This may indicate that the bacteriocin of S46 isolate may involve a carbohydrate moiety. The protein nature of the antimicrobial agent was also demonstrated in a similar study on *E. durans* A5-1, as the antibacterial activity was completely eliminated after treatment with proteinase K and α -chymotrypsin. However, the activity was not completely inactivated by other proteases such as trypsin and pepsin (Batdorj *et al.*, 2006). Data in Table 3 show that the antimicrobial substances in different isolates were active over a wide range of pH (2-10) in accordance with the results obtained for enterocin A5-11 by Batdorj *et al.* (2006) and in the case of *E. faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product (Yoon *et al.*, 2008). This may mean that the active substance is quite soluble and hence active at different pH values.

Table 3. Effect of some physicochemical factors on the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolates against *Lactobacillus brevis* 145.¹

Isolated strains	S2	S14	SA2	S46	Sh36
Enzymes					
Control +	+++	+++	+++	+	+++
Control -	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-
Trypsin	+	-	-	-	-
Proteinase K	+	+	-	-	-
Catalase	++	+++	+++	+	+++
Lipase	++	++	+	+	+
α -Amylase	++	+	+	+	+
pH					
Control +	+++	+++	+++	+	+++
Control -	-	-	-	-	-
2	++	+++	+++	+	+++
5	++	+++	+++	+	+++
7	+++	+++	+++	+	+++
10	+++	+++	+++	+	+++
Heat treatments					
Control +	+++	+++	+++	+	+++
Control -	-	-	-	-	-
100 °C / 10 min	+++	+++	+++	+	+++
100 °C / 30 min	++	+++	+++	+	+++
121 °C / 20 min	+	++	+++	+	+++

¹ Activity is represented as diameters of inhibition zones in mm: - = no inhibition; + = inhibition zone <3 mm; ++ = inhibition zone 3-6 mm; +++ = inhibition zone >6 mm.

S2, S14, Sh36, SA2 and S46 cocci isolates were completely heat stable at 100 °C/10 min but a little bit less stable at 100 °C/30 min. Heat stability was reduced at 121 °C/20 min especially for 2 isolates (S2 and Sh36) followed by S14 and SA2; S46 lost completely its activity after this heat treatment. The observed heat and pH stability of antimicrobial activity of the cocci isolates are in accordance with previous studies on characterised enterocins. Enterocin 900 isolated from *E. faecium* BFE 900 was reported to be heat stable, retaining its activity after heating at 121 °C for 15 min and was active at pH values ranging from 2.0 to 10.0 (Franz *et al.*, 1996). Enterocin P, isolated from *E. faecium* P13 is heat resistant (60 min at 100 °C, 15 min at 121 °C) (Cintas *et al.*, 1997). Enterocin SE-K4 produced by *E. faecalis* K-4 is very heat stable (Eguchi *et al.*, 2001). Enterocin E-760 isolated from *E. durans*, *E. faecium*, or *Enterococcus hirae*, retained its antimicrobial activity after 5 min at 100 °C and was stable at pH values between 5.0 and 8.7 (Line *et al.*, 2008).

Strain Identification

The 5 antimicrobial active cocci isolates (S2, S14, Sh36, SA2 and S46) were identified by 16S rDNA amplification and sequencing yielding two different strains, i.e. *E. faecium* TX1330 for three isolates (S2, S14 and Sh36) and *E. faecium* E980 for 2 isolates (SA2 and S46). The two identified cocci strains were further characterised for enterocin production and factors influencing it, enterocin type, virulence factors and resistance to antibiotics.

Production of bacteriocin-like inhibitory substance

Bacteriocin production and the pH of the media of the two identified strains were followed over 24 h of bacterial growth on M17 medium (Figure 1). The amount of bacteriocin produced by the 2 studied strains reached a maximum (1,600 AU/ml) at the end of the logarithmic phase (6 h) and remained stable to the end of the 24 h incubation time, while the pH dropped to 5.5 during the same period. In a similar study on *E. faecalis* strain RJ-11, Yamamoto *et al.* (2003) noticed that the amount of bacteriocin in the culture fluid reached the maximum level in the early stationary phase, the point at which the pH of the medium was equal to 5.

Factors influencing bacteriocin production

The influence of temperature, pH and salt concentration on bacteriocin production was determined for the two identified strains. The two strains were grown in M17 broth for 24 h at different temperatures (4, 10, 30, 37 and 45 °C). The maximum production of bacteriocin of the 2 strains against *L. brevis* F145 was observed when the temperature was in the range 30–37 °C, but a relative reduction was seen when the temperature was raised to 45 °C (data not shown). At relatively low temperatures (4 and 10 °C) the rate of

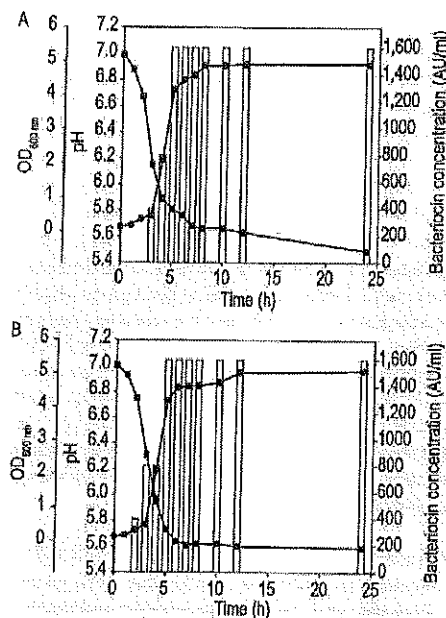


Figure 1. Evolution of bacteriocin production during the growth of (A) *Enterococcus faecium* E980 and (B) *Enterococcus faecium* TX1330 in M17 broth at 37 °C. Bacteriocin concentration is expressed as arbitrary units per milliliter (AU/ml), pH (■); OD 600 nm (●).

growth of *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980 as well as bacteriocin production were almost negligible after 24 h.

The two strains were grown in M17 broth at 37 °C under extreme conditions of pH (9.6) and salt concentration (6.5% NaCl) and compared to control (pH 6.5, without salt) yielded no difference in bacteriocin production, which suggests that the 2 strains can resist these severe conditions. This is a good result for industrial purposes since the changes in growing conditions that might occur during production will not affect the rate of bacteriocin production.

Enterocin typing

PCR amplifications were performed on the DNA templates of *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980 that previously exhibited antimicrobial activity against *L. monocytogenes* (Figure 2). It can be observed that the 2 strains are different in the enterocin they produced. Every strain has two different structural genes. The strain *E. faecium* TX1330 contains enterocins A and B structural genes, while the strain *E. faecium* E980 contains enterocins P and L50A structural genes. The enterocin composition of *E. faecium*

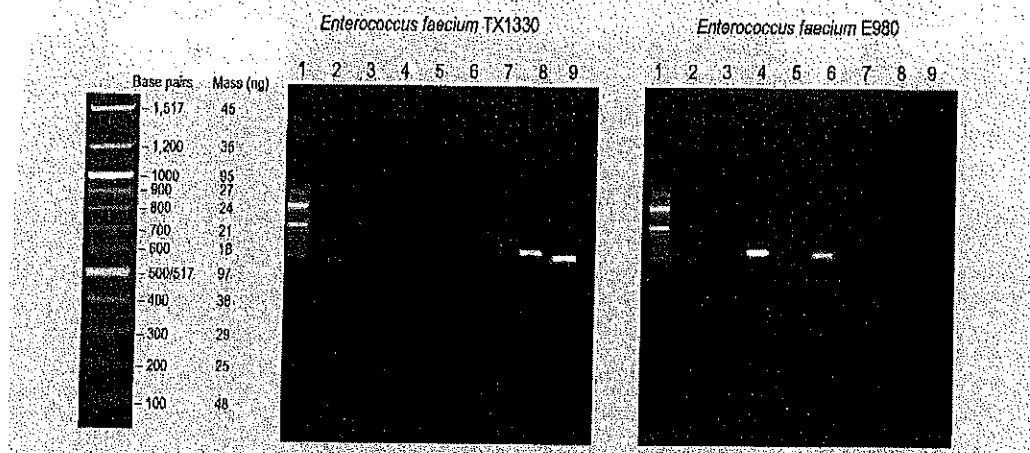


Figure 2. PCR detection of genes encoding known enterocins in *Enterococcus faecium* isolates. Lane 1: molecular marker (100 bp); lane 2: enterocin 31; lane 3: enterocin S48; lane 4: enterocin L50A; lane 5: enterocin Q; lane 6: enterocin P; lane 7: enterocin Cyl; lane 8: enterocin B and lane 9: enterocin A.

TX1330 is similar to previously studied 6 enterococci strains, *E. faecium* 26, *E. faecium* 386, *E. faecium* 131, *E. faecium* 134, *E. faecium* 135 and *E. faecium* 137, while that of *E. faecium* E980 is identical to the strain *E. faecium* 27 (De Vuyst *et al.*, 2003).

Based on structural, physicochemical and molecular properties, LAB bacteriocins could be subdivided into three major classes (I, II and III). Class II bacteriocins are small (4-6 kDa) cationic, hydrophobic, heat-stable peptides, which are divided into 3 subclasses (IIa, IIb, IIc). Subclass IIa, which is characterised by the consensus sequence YGNGV and a strong anti-*Listeria* effect (Ennahar *et al.*, 2000) comprises enterocin A (Aymerich *et al.*, 1996), enterocin P (Cintas *et al.*, 1997), enterocin CRL35 (Farias *et al.*, 1996), enterocin 31 (Tomita *et al.*, 1996). Subclass IIb requires two polypeptide chains for full activity. Subclass IIc are bacteriocins that do not belong to other subgroups, e.g. enterocin B (Casaus *et al.*, 1997), enterocin L50A and L50B (Cintas *et al.*, 1997), enterocin AS-48 (Martinez-Bueno *et al.*, 1994). Hence, the enterocins identified for strain *E. faecium* TX1330 (enterocins A and B structural genes) can be attributed to subclass IIa and IIc, respectively. Likewise, the enterocins identified for the strain *E. faecium* E980, which contains enterocins P and L50A structural genes can be classified under subclass IIa and IIc, respectively. In conclusion, the enterocins identified for the two strains belong to a common class (class II) and more specifically to common subclasses (IIa and IIc) although they are different from each other.

Virulence factors

For safety requirements, it is indispensable to prove the absence of virulence gene factors and transferable antibiotic resistance in the studied strains (*E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980) enabling their acceptable and permissible applications as starter cultures or co-cultures in some food systems. A virulence factor is an effector molecule that increases the ability of microorganisms to cause disease beyond that intrinsic to the species background (Mundy *et al.*, 2000). The presence of five known virulence factors [asaI (aggregation substance), *cylA* and *cylB* (cytolysin), *ace* (collagen-binding protein), *efaAfs* (*E. faecalis* endocarditis antigen), and *espfm* (extracellular or enterococcal surface protein)] was traced in the 2 enterococci strains studied by PCR amplification (Figure 3). Comparing the electrophoretic patterns of the detected virulence factors in the 2 studied strains (*E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980) with a positive control strain (*E. faecalis* MM4594) indicates that they were devoid of these virulence factors. This is in accordance with previous results on similar strains. Generally, *E. faecium* strains of food origin were reported free of the virulence factors with some exceptions (Eaton and Gasson, 2001). *E. faecium* strains isolated from Chungkukjang were reported free of virulence determinants (Yoon *et al.*, 2008). Likewise, *E. faecium* isolated from traditional fermented meat products produced in the north of Portugal was generally found to be free of virulence determinants (Barbosa *et al.*, 2010). In a study performed on artisanal Tunisian fermented meat products, 10 out of 24 *E. faecium* isolates were found to be free of all tested virulence factors (Belgacem *et al.*, 2010).

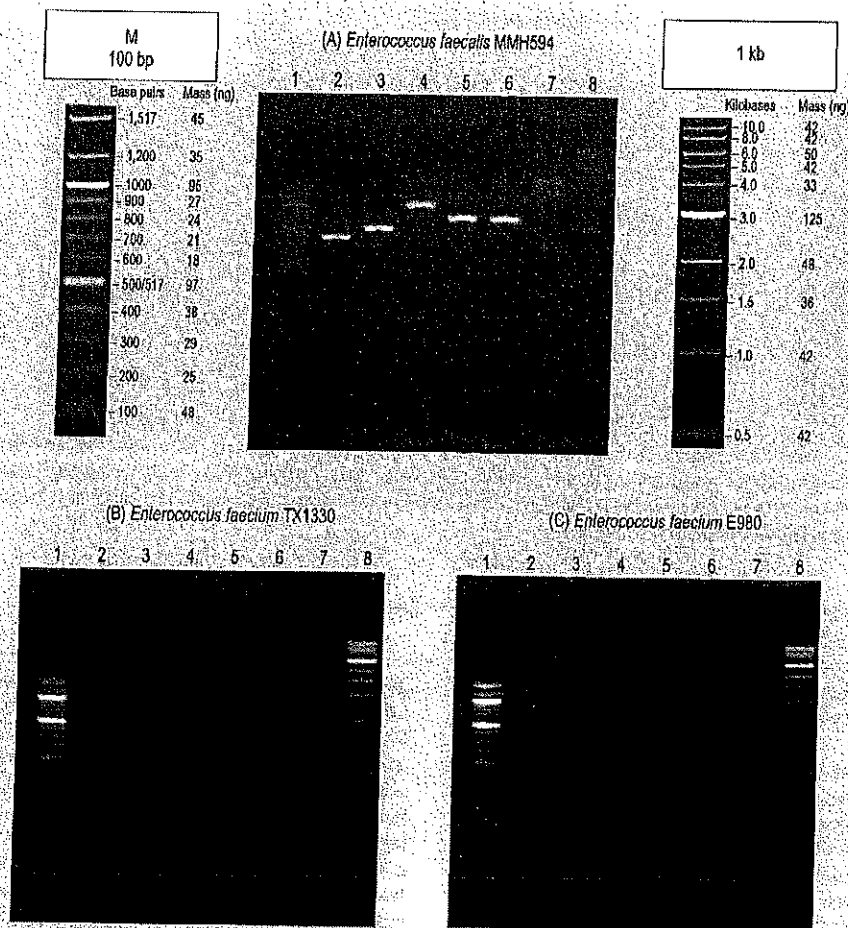


Figure 3. Multiplex PCR detection of genes encoding major virulence factors in (B) *Enterococcus faecium* TX1330 and (C) *E. faecium* E980 as compared to (A) the reference strain, *Enterococcus faecalis* MMH594. Lane 1: molecular marker (100 bp); lane 2: *asa1*; lane 3: *esp*; lane 4: *ace*; lane 5: *efaAfs*; lane 6: *cylA*; lane 7: *cylB* and lane 8: molecular marker (1 kb).

Antibiotic resistance

The potential role of enterococci as reservoirs of antibiotic resistance genes capable of spreading to other strains or species is a matter for concern (Valenzuela *et al.*, 2008). The antibiotic resistance is mainly associated with the MIC breakpoints as described by the EFSA (2008). The antibiotic resistance of the 2 studied strains was assessed against different known antibiotics with the following respective breakpoints: ampicillin (≤ 4 $\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol (≤ 8 $\mu\text{g/ml}$), ciprofloxacin (≤ 4 $\mu\text{g/ml}$), vancomycin (≤ 4 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (≤ 32 $\mu\text{g/ml}$), penicillin (≤ 4 $\mu\text{g/ml}$), and tetracycline (≤ 2 $\mu\text{g/ml}$) by disk diffusion antibiotic sensitivity testing (Table 4). Based on the indicated breakpoints and

the obtained MIC it can be concluded that *E. faecium* TX1330 strain was sensitive to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, and penicillin but resistant to tetracycline. On the other hand, *E. faecium* E980 strain was sensitive to ampicillin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, and penicillin but resistant to tetracycline and chloramphenicol. This limited antibiotic resistance of the 2 strains may keep their application within safety framework. A study on the antibiotic resistance pattern of enterococci isolated from food of animal origin in Germany revealed that 54 *E. faecium* strains were sensitive to ampicillin and vancomycin but resistant to tetracycline and chloramphenicol. *E. faecium* isolates separated from foods (meat, dairy and vegetables foods) in Morocco were

Table 4. Antibiotic resistance of *Enterococcus faecium* E980 and *E. faecium* TX1330.

Antibiotics	Breakpoints ¹ (µg/ml)	Minimum inhibitory concentration (µg/ml) ²														
		0	0.2	0.4	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	750	1,500
<i>Enterococcus faecium</i> E980																
Ampicillin	4	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Penicillin	4	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Chloramphenicol	8	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Ciprofloxacin	4	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vancomycin	4	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tetracycline	2	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gentamicin	32	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecium</i> TX1330																
Ampicillin	4	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Penicillin	4	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Chloramphenicol	8	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ciprofloxacin	4	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vancomycin	4	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tetracycline	2	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gentamicin	32	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—

¹ Minimum inhibitory concentration breakpoints according to the EFSA (2008).² + = resistant; - = sensitive.

found to be sensitive to ampicillin, penicillin and gentamicin but resistant to tetracycline (Valenzuela *et al.*, 2008). The basis of tetracycline resistance was attributed to the potential transfer of the associated resistance gene [TCR, *tet* (S)+] in *Enterococcus italicus* (Zago *et al.*, 2010), which was isolated from human clinical specimens as well as various dairy products indicating the ability of this microorganism to horizontally transfer *tet*(S)+ or other resistance genes.

4. Conclusions

The 2 active strains (*E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980) isolated from Egyptian dairy products were proved capable of producing a variety of bacteriocins (ent A, ent B, ent P and ent L50A) with considerable activity against *L. monocytogenes*. The antibacterial activity was not affected by treatment of the supernatant of culture with catalase but was completely eliminated after treatment with protease K, α -chymotrypsin and trypsin, confirming the proteinaceous nature of the antimicrobial agents. The antimicrobial activity was stable over a wide pH range (2-10) and resisted intense heating (100 °C/10 min). The amount of bacteriocin produced in the media of active isolated strains reached its maximum at the end of the logarithmic phase and remained constant until the end of the 24 h incubation period. Electrophoretic analysis revealed the absence in the 2 studied strains (*E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980) of the virulence genes (*asaI*, *cyl A* and *cyl B*, *ace*, *efaAfs*, and *espfm*) as compared with a positive strain (*E.*

faecalis MM4594). *E. faecium* TX1330 strain was sensitive to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, and penicillin but resistant to tetracycline. *E. faecium* E980 was sensitive to ampicillin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, and penicillin but resistant to tetracycline and chloramphenicol.

The results obtained show that the two studied strains, *E. faecium* TX1330 and *E. faecium* E980, were producers of enterocins, devoid of virulence factors, mostly sensitive to antibiotics, and may safely be employed as useful starter cultures or co-cultures.

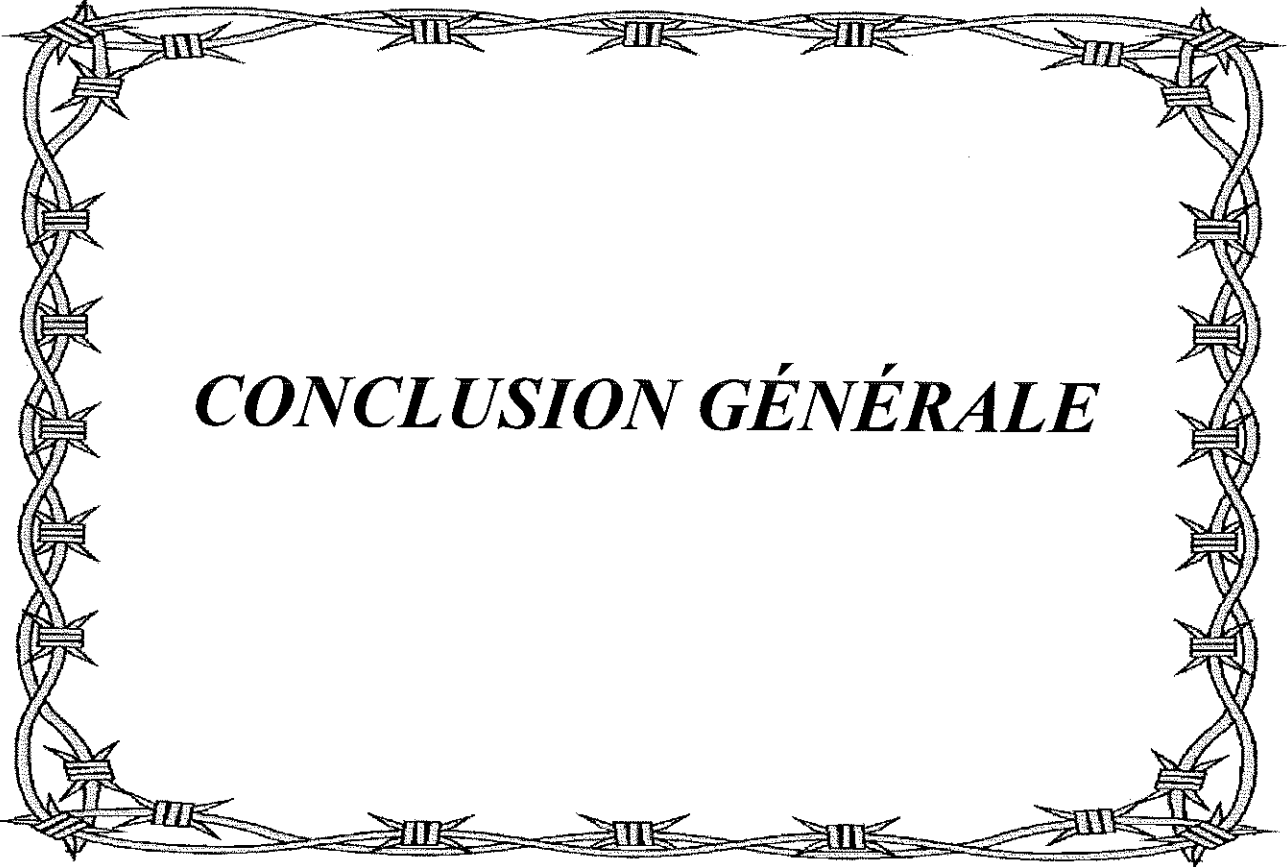
Acknowledgments

Shady El-Ghaish expresses his gratitude to the Egyptian Ministry of Foreign Affairs and Education for funding his PhD thesis and to NATO 98164 SIP funding for allowing him to initiate this study. Imen Hadji-Sfaxi acknowledges the fellowship of programme FUNGINIB, ANR-09-ALIA-005-03. Aynur Ahmadova expresses her gratitude for NATO 98164 SIP project funding and to the French Ministry (Service d'Action Culturelle et Scientifique de l'Ambassade de France à Bakou) for supporting her PhD in co-tutelle.

References

- Agerbaek, M., Gerdes, L.U. and Richelsen, B., 1995. Hypocholesterolemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European Journal of Clinical Nutrition* 49: 346-452.
- Andrews, M.G., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 Suppl. 1: 5-16.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F., 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1676-1682.
- Barbosa, J., Gibbs, P.A. and Teixeira, P., 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the north of Portugal. *Food Control* 49: 346-452.
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, E., Prévost, H., Chobert, J.-M. and Haertlé, T., 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology* 101: 837-848.
- Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. and Manal, M., 2010. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control* 21: 462-470.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M. and Gálvez, A., 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 118-130.
- Beukes, E.M., Bester, H.B. and Mostert, J.F., 2001. The microbiology of South African traditional fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 63: 189-197.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, R.E. and Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287-2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, R.E. and Nes, I.F., 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4321-4330.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds.) *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London, UK, pp. 91-142.
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M.R. and Revets, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84: 299-318.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Minervini, F., Gallo, G. and Gobbetti, M., 2003. Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *International Dairy Journal* 13: 145-157.
- Eaton, T.J. and Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1628-1635.
- Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S.-H., Doi, K., Ohmomo, S. and Ogata, S., 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 247-253.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogler, J.C., 2008. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 121: 295-301.
- El Soda, M., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G. and Morsi, A., 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese-making. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 15: 51-71.
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A., 2000. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology* 70: 291-301.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 732: 1-15.
- Farias, M.E., Farias, R.N., De Ruiz Holgado, A.R. and Sesma, E., 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL 35, a 'pediocin-like' bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL 35. *Letters in Applied Microbiology* 22: 417-419.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106: 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H., 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology* 29: 255-270.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schillinger, K.H. and Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods – a continuum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88: 105-122.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-222.
- Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M.T., 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 223-233.
- Katnarkar, M.G., Gershom, E.T. and Mehta, R.R., 2004. Enterococcal infections with special reference to phenotype characterization and drug resistance. *Indian Journal of Medical Research* 119: 22-25.
- Klibi, N., Jouini, A., Rojo-Bezares, B., Masmoudi, A., Ruiz-Larrea, Boudabous, A. and Torres, C., 2008. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical enterococcal isolates of Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 653-657.

- Line, J.E., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perehytn, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S., Siragusa, G.R. and Stern, N.J., 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1094-1100.
- Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J. and Coyette, J., 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology* 176: 6334-6339.
- Mundy, L.M., Sahm, D.E. and Gilmore, M., 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 513-522.
- Noonpakee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S., 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from *nam*, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* 81: 137-145.
- Oumer, B.A., Gaya, P., Fernandez-García, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M. and Nunez, M., 2001. Functionality, proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin producing adjunct culture. *Journal of Dairy Research* 68: 117-129.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgakaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11: 621-647.
- Schillinger, U. and Lucke, F., 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Tonreiro, R. and Barreto Crespo, M.T., 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine haemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2569-2576.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and Ike, Y., 1996. Cloning and genetic organization of bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative element pY117. *Journal of Bacteriology* 178: 3585-3595.
- Valenzuela, A.S., Ben Omar, N., Abriouel, H., López, R.L., Ortega, E., Cañamero, M.M. and Gálvez, A., 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2648-2652.
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. and Goossens, H., 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4473-4479.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M. and Okazaki, M., 2003. Purification and characterization of novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5746-5753.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J. and Hwang, H.J., 2008. Properties and safety aspect of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT-Food Science and Technology* 41: 925-933.
- Zago, M., Huys, G. and Giorgio, G., 2010. Molecular basis and transferability of tetracycline resistance in *Enterococcus italicus* LMG 22195 from fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 142: 234-236.



CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Activité protéolytique

Les isolats utilisés dans cette étude ont été identifiés par amplification et séquençage de l'ADN 16S comme étant : *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (3 isolats), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (4 isolats), *Lactobacillus plantarum* JDM1 (4 isolats), *Enterococcus faecium* DO623 (5 isolats), *Enterococcus faecium* E1162 (1 isolat), *Enterococcus faecium* C68 (4 isolats), *Enterococcus faecalis* HH22 (6 isolats) et *Enterococcus faecalis* T8 (2 isolats). Cela démontre que le genre *Enterococcus* est prédominant dans les produits laitiers traditionnels Égyptiens. Tous ces isolats montraient une forte activité protéolytique. Les protéases produites par *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 appartiennent au groupe P III puisqu'elles sont capables d'hydrolyser les caséines α_{S1} , α_{S2} et β . Le pH optimal d'activité protéolytique est de 6,5 pour *Lactobacillus plantarum* JDM1 mais se situe entre 6,5 et 7,2 pour *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et *Lactobacillus rhamnosus* LMS2. La température optimale d'activité protéolytique est située entre 37 et 42 °C pour tous les isolats étudiés. Les résultats obtenus démontrent que les protéases sont principalement des métallo-protéases. Cependant, on retrouve des protéases à sérine pour *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1. *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 renferment le gène de la protéase *PrtP*, tandis que *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 contient le gène de la protéase *PrtR*. Aucune présence des gènes codant les protéases *PrtB* ou *PrtH* n'a été détectée dans tous les isolats testés. L'analyse par RP-HPLC des hydrolysats obtenus après incubation des caséines α_{S1} et β avec les bactéries lactiques montre la production de peptides de petites et moyennes tailles, principalement hydrophiles. L'immuno réactivité des caséines β et α_{S1} mesurée par interaction avec les IgE peut être considérablement réduite par hydrolyse de la caséine α_{S1} avec *Lactobacillus rhamnosus* LMS2, *Lactobacillus plantarum* JDM1 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956, et de la caséine β avec *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus fermentum* IFO3956. Ainsi, *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 pourraient être utilisés pour réduire la reconnaissance par les IgE des caséines α_{S1} et β .

Les perspectives pour la suite de ce travail peuvent être orientées vers la sélection de souches de LAB afin de les introduire au sein des levains classiques utilisés jusqu'à présent, offrant ainsi plusieurs actions bénéfiques. Ce processus nécessitera l'adaptation des protocoles de production existants, en fonction des conditions de culture des nouvelles LAB introduites, et l'introduction de nouvelles technologies dans le système de fabrication traditionnelle du fromage. L'utilisation de cultures de lactobacilles en traitement adjuvant dans le développement du fromage Ras devrait générer l'accumulation de quantités plus élevées d'acides aminés libres et d'acides gras libres qui contribuent à la saveur du fromage Ras, en agissant comme précurseurs des composés d'arôme du fromage. Les LAB peuvent être utilisées dans l'hydrolyse de protéines de soja dans des formules enrichies solubles, dans des régimes spéciaux ou des mélanges avec des protéines de céréales.

Activité antimicrobienne

Les 2 souches actives (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) isolées à partir de produits laitiers égyptiens se sont révélées capables de produire plusieurs bactériocines (*ent* A, *ent* B, *ent* P et *ent* L50A) présentant une activité considérable contre *Listeria monocytogenes*. L'activité antibactérienne n'a pas été affectée par le traitement du surnageant de culture avec de la catalase, mais a été complètement éliminée après le traitement avec la protéase K, l' α -chymotrypsine et la trypsine, ce qui confirme la nature protéique des agents antimicrobiens. L'activité antimicrobienne était stable sur une large gamme de pH (2-10) et après des traitements thermiques sévères (100 °C pendant 10 min). La quantité de bactériocine produite dans les milieux de culture des souches isolées actives a atteint son maximum à la fin de la phase exponentielle et est restée stable jusqu'à la fin de période d'incubation (24 h). L'analyse des souches *Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980 par des techniques de biologie moléculaire a révélé l'absence de gènes de facteurs de virulence *asII*, *cyl* A et *cyl* B, *ace*, *efaAfs* et *espfm* quand on les comparait avec la souche *Enterococcus faecalis* MM4594 présentant ces facteurs. *Enterococcus faecium* TX1330 était sensible à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à la vancomycine, à la gentamicine et à la pénicilline, mais était résistante à la tétracycline. *Enterococcus faecium* E980 était sensible à l'ampicilline, à la ciprofloxacine, à la vancomycine, à la gentamicine et à la pénicilline, mais était résistante à la tétracycline et au chloramphénicol. L'ensemble de ces résultats montre que ces deux souches (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) productrices d'entérocinés, dépourvues de facteurs de virulence et surtout sensibles aux antibiotiques, peuvent être utilisées comme levain ou en co-culture dans les processus de fabrication alimentaire et peuvent être des candidats prometteurs pour des applications antivirales, antifongiques ou autres.

ENGLISH CONCLUSION

ENGLISH CONCLUSION

Proteolytic activity

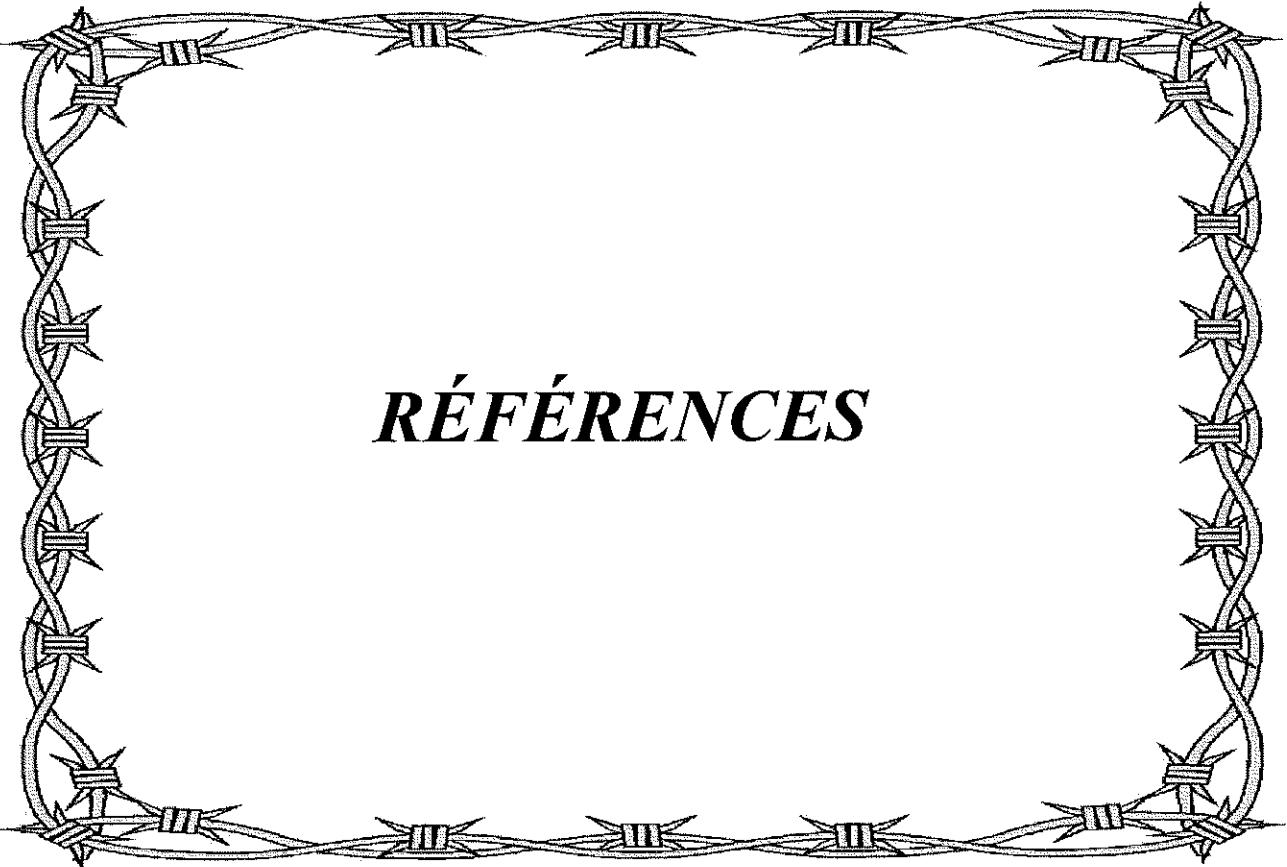
The isolates used in this study were identified by 16S rDNA amplification and sequencing as: *Lactobacillus fermentum* IFO3956 (3 isolates), *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 (4 isolates), *Lactobacillus plantarum* JDM1 (4 isolates), *Enterococcus faecium* DO623 (5 isolates), *Enterococcus faecium* E1162 (1 isolate), *Enterococcus faecium* C68 (4 isolates), *Enterococcus faecalis* HH22 (6 isolates), and *Enterococcus faecalis* T8 (2 isolates), showing that the genus *Enterococci* was predominant in Egyptian dairy products. All these strains showed a strong proteolytic activity. Proteases produced by *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 and *Lactobacillus plantarum* JDM1 may be classified as P III type, since they proteolysed α_{S1} -, α_{S2} - and β -caseins. The optimal pH of activity of proteases of *Lactobacillus plantarum* JDM1 is 6.5. It is in the range 6.5–7.2 for *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 and *Lactobacillus fermentum* IFO3956. The optimum temperature for proteolytic activity is between 37 and 42 °C for all the strains studied. The results show that proteases are mainly metallo-proteases. However, there are small amount of serine proteases for *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 and *Lactobacillus plantarum* JDM1. The strains *Lactobacillus fermentum* IFO3956 and *Lactobacillus plantarum* JDM1 included *PrtP* protease, while the strain *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 contain *PrtR* protease. No presence of genes encoding proteases *PrtB* and *PrtH* has been detected in all strains tested. The RP-HPLC profiles of α_{S1} - and β -caseins generated populations of small and medium sized peptides with moderate hydrophilic properties. Depending on the reduced recognition and binding by IgE of α_{S1} -, and β -caseins hydrolyzed by *Lb. fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 and *Lactobacillus plantarum* JDM1 these strains may be used for the production of milk products with reduced α_{S1} - and β -caseins immuno-reactivity.

Future research efforts may be oriented towards the selection of mixed cultures of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) providing several beneficial advantages. This process will require the adaptation of the existing production protocols to the nature and specifications of NSLAB and will involve introducing new food technology in the traditional system of cheese manufacture. The use of adjunct cultures of lactobacilli in Ras cheese may generate higher amounts of free amino acids and free fatty acids, which can contribute to the cheese flavor, as they may represent flavor precursors. LAB may be used in the enzymatic hydrolysis of soybean protein yielding soluble formulas that can be utilized in special diets or mixed with cereal proteins.

Antimicrobial activity

The 2 active strains (*Enterococcus faecium* TX1330 and *Enterococcus faecium* E980) isolated from Egyptian dairy products were proved capable of producing a variety of bacteriocins (*ent* A, *ent* B, *ent* P and *ent* L50A) with considerable activity against *Listeria monocytogenes*. The antibacterial activity was not affected by treatment of the supernatant of culture with catalase but was completely eliminated after treatment with protease K, α -chymotrypsin and trypsin, confirming the proteinaceous nature of the antimicrobial agents. The antimicrobial activity was stable over a wide range of pH (2–10) and resisted severe heating (100 °C/10 min). The amount of bacteriocin produced in the media of active isolated strains reached its maximum at the end of logarithmic phase and remained constant until the end of 24 h incubation period at 37 °C. Analysis of *Enterococcus faecium* TX1330 and *Enterococcus faecium* E980 by the molecular biology techniques has revealed the absence of the virulence factor genes (*asal*, *cyl A* and *cyl B*, *ace*, *efaAfs*, and *espfm*) as compared with a positive strain (*Enterococcus faecalis* MM4594). *Enterococcus faecium* TX1330 strain was sensitive to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, and penicillin but resistant to tetracycline. *Enterococcus faecium* E980 was sensitive to ampicillin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, and penicillin but resistant to tetracycline and chloramphenicol.

Since two studied enterocin producing strains (*Enterococcus faecium* TX1330 and *Enterococcus faecium* E9800) were proved devoid of the virulence factors and mostly sensitive to antibiotics they may be used as safe and useful starter cultures or co-cultures and may be promising candidates for antiviral, antifungal and other applications.



RÉFÉRENCES

Références Bibliographiques

- Abou-Donia, S.A.** (1984). Egyptian fresh fermented milk products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 19: 7-18.
- Abou-Donia, S.A.** (1986). Egyptian *Domiat* soft white cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 21: 167-190.
- Abou-Donia, S.A.** (1999). Geographical distribution and historical development of ancient Egyptian dairy products. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 27: 359-368.
- Abou-Donia, S.A.** (2002). Recent developments in *Ras* cheese research. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 30: 155-166.
- Abou-Donia, S.A.** (2004). Recent developments in *Zabady* and Egyptian *Labneh* research. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 32: 1-15.
- Abou-Donia, S.A.** (2008). Origin, history and manufacturing process of Egyptian dairy products: an overview. *Alexandria Journal for Food Science and Technology*, 5: 51-62.
- Abou-Donia, S.A. and El-Soda, M.A.** (1986). Egyptian soft pickle ripened *Mish* cheese. *Indian Journal of Dairy Science*, 39: 1-15.
- Andrews, M.G.** (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (supplement): 5-16.
- Arous, S., Dalet, K. and Héchard, Y.** (2004). Involvement of the *mpo* operon in resistance to class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 238: 37-41.
- Attou, D., Caherec, A., Bensakhria, S., Dookna, P. and Faverge, B.** (2005). Allergie aux laits de chèvre et de brebis sans allergie associée au lait de vache: revue générale à propos d'une observation à rebondissements. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45: 601-607.
- Axelsson, L.** (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand** (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (pp. 1-66), 3rd edition, Marcel Dekker, Inc., USA.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F.** (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a

- new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1676-1682.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R.** (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26: 328-334.
- Baring, C., Schulmeister, U., Swoboda, I., Bessot, J.C., Spitzauer, S. and Pauli, G.** (2005). Allergie aux protéines du lait de vache sans allergie associée au lait de brebis chez l'adulte. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45: 608-611.
- Batdorj, B., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.-M. and Haertlé, T.** (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 837-848.
- Bauer, R. and Dicks, L.M.T.** (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 201-216.
- Ben Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez-Cañamero, M., Gálvez, A. and Manai, M.** (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food control*, 21: 462-470.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M. and Gálvez, A.** (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 118-130.
- Bernasconi, E., Germond, J.-E., Delley, M., Fritsché, R. and Corthésy, B.** (2002). *Lactobacillus bulgaricus* proteinase expressed in *Lactococcus lactis* is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine β -lactoglobulin fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2917-2923.
- Bertrand-Harb, C., Ivanova, I.V., Dalgalarrrondo, M., and Haertlé, T.** (2003). Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *International Dairy Journal*, 13: 39-45.
- Besler M., Steinhart, H. and Paschke, A.** (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B*, 756: 207-228.

- Castellano, P., Raya, R. and Vignilo, G.** (2003). Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 35-43.
- Castellano, P., Vignolo, G., Fariás, R.N., Arrondo, J.L. and Chehín, R.** (2007). Molecular view by Fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 415-420.
- Cerecedo, I., Zamora, J., Shreffler, W.G., Lin, J., Bardina, L., Dieguez, M.G., Wang, J., Muriel, A., Hoz, B. and Sampson, H.A.** (2008). Mapping of IgE and IgG4 sequential of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122: 589-594.
- Chamba, J.F.** (2009). Les bactéries lactiques: Historique et perspectives. In: **D. Drider and H. Prévost** (Eds.), *Bactéries lactiques: Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles* (pp. 1-14), 1^{ère} édition, ECONOMICA, France.
- Chatchatee, P., Järvinen, K.M., Bardina, L., Beyer, K. and Sampson, H.A.** (2001). Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α_{s1} -casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107: 379-383.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A. and Steele, J.L.** (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 217-246.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, P.E. and Nes, I.F.** (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4321-4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernandez, P.E. and Nes, I.F.** (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182: 6806-6814.
- Cocco, M.R., Järvinen, K.M., Sampson, H.A. and Beyer, K.** (2003). Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in α_{s1} -casein, a major cow's milk allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112: 433-437.
- Coombs, R.R.A., and Gell P.G.H.** (1975). Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: **Moise, J.-A.** (2007), *Recherche et*

- caractérisation de souches de bactéries lactiques à forte activité protéolytique d'intérêt pour diminuer l'allergie aux protéines du lait. Master 2, Agrocampus Rennes, France, 58 pages.
- Corrieu, G. and Luquet, F.-M.** (2008). Bactéries lactiques: De la génétique aux ferments, 1^{ère} édition, Lavoisier, France.
- Courtin, P. and Rul, F.** (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as study model. *Lait*, 84: 125-134.
- Cuozzo, S.A., Castellano, P., Sesma, F.F.M., Vignolo, G.M. and Raya, R.R.** (2003). Differential roles of the two-component peptides of Lactocin 705 in antimicrobial activity. *Current Microbiology*, 46: 180-183.
- Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y. and Héchard, Y.** (2000). The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Current Microbiology*, 41: 441-443.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P.** (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International of Dairy Journal*, 16: 1058-1071.
- de Vuyst, L., Foulquié Moreno, M.R. and Revets, H.** (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 299-318.
- Di Cagno, R., de Angelis, M., Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Minervini, F., Gallo, G. and Gobbetti, M.** (2003). Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *International Dairy Journal*, 13: 145-147.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I.F.** (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 13: 2384-2389.
- Dortu, C. and Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13: 143-154.
- Dupont, C. and de Boissieu, A.** (2005). Aliments et dermatite atopique. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45: 114-126.
- Dupont, C., Chouraqui, J.P., de Boissieu, D., Bocquet, A., Bresson, J.L., Briend, A., Darmaun, D., Frelut, M.L., Ghisolfi, J., Girardet, J.P., Goulet, O., Hankard, R.,**

- Rieu, D., Rigo, J., Vidailhet, M. and Turck, D.** (2011). Prise en charge diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. *Archives de Pédiatrie*, 18: 79-94.
- Dutau, G. and Rancé, F.** (2006). Histoire de l'allergie alimentaire. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46: 312-323.
- Eaton, T.J. and Gasson, M.J.** (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1628-1635.
- Egypt Standards for Hard Cheese** (2001). Part 5: Ras Cheese, ES : 1007/2001. Ministry of Industry and Technological Development, Egypt.
- Eigenmann, P.A.** (2009). Mechanisms of food allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, 20: 5-11.
- El Soda, M., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G. and Morsi, A.** (2003). Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese-making. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 15: 51-71.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J.C.** (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 295-301.
- El-Gendy, S.M.** (1983). Fermented foods of Egypt and Middle East. *Journal of Food Production*, 46: 358-367.
- Elsayed, S., Eriksen, J., Øysæd, L.K., Idsøe, R. and Hill, D.J.** (2004). T cell recognition pattern of bovine milk α_{S1} -casein and its peptides. *Molecular Immunology*, 41: 1225-1234.
- El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J. and Jakobsen, M.** (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol co fermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*, 20: 913-916.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.** (1999). Class II bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 705-716.
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.** (2000). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology*, 70: 291-301.

- European Food Safety Authority**, (2008). Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The European Food Safety Authority, 732: 1-15.
- Fadda, S., López, C. and Vignolo, G.** (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*, 86: 66-79.
- Fahmi, A.H.** (1950). Studies on *Karish* cheese. Ph.D. Thesis, Reading University, Reading, England.
- Farrell, H.M. Jr, Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Bulter, J.E. and Creamer, L.K.** (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87: 1641-1674.
- Fernandez Espla, M.D., Garoult, P., Monnet, V. and Rul, F.** (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall anchored proteinase: release, purification, biochemical and genetic characterisation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4772-4778.
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L. Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G. and Nissen-Meyer, J.** (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocins activity less temperature dependent and is a major determinant of antimicrobial spectrum. *Journal Bacteriology*, 182: 2643-2648.
- Fira, D., Kojic, M., Banina, A., Spasojevic, I., Strahinic, I. and Topisirovic, L.** (2001). Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 123-130
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R.** (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4883-4890.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and de Vuyst, L.** (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 1-24.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L. and Ben Omar, N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51-70.
- Ghalfi, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., Thonart, P.** (2006). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in

- cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *Journal of Food Protection* 69: 1066-1071.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R. and Clewell, D.B.** (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of Bacteriology*, 176: 7335-7344.
- Giraffa, G.** (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 215-222.
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W. and Knøchel, K.** (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 148: 2361-2369.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P.** (2005). A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1316-1325.
- Hayakawa, K., Linko, Y.Y. and Linko, P.** (1999). Mechanism and control of food allergy. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32: 1-11.
- Hébert, E.M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R.R., Savoy, G., Ferranti, P. and Addeo, F.** (2008). Characterization of pattern of α_{S1} - and β -casein breakdown and release of bioactive peptide by cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3682-3689.
- Héchard, Y. and Sahl, H.G.** (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84: 545-557.
- Héchard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y. and Frère, J.** (2001). Analysis of δ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{Man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147: 1575-1580.
- Hofi, A.A., El-Ghandour, M.A., Hammed, Y.A. and Hagrass, A.E.A.** (1983). Production of Ras cheese from recombined milk, I. Curd characteristics. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 11: 77.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. and Nes, I.F.** (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147: 643-651.

- Institut National de la Consommation (INC)** (2004). Les allergies alimentaires. Hebdo N° 1311 13-19 septembre 2004.
- Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M. Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. and Piard, J.C.** (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1416-1424.
- Joerger, M. and Klaenhammer, T.R.** (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of Bacteriology*, 172: 6339-6347.
- Karmarkar, M.G., Gershom, E.T. and Mehta, P.R.** (2004). Enterococcal infections with special reference to phenotypic characterization and drug resistance. *Indian Journal of Medical Research*, 119: 22-25.
- Klaenhammer, T.R.** (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R.** (1993). Genetic of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-86.
- Klibi, N., Jouini, A., Rojo-Bezares, B., Masmoudi, A., Ruiz-Larrea, Boudabous, A. and Torres, C.** (2008). Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical enterococcal isolates of Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 653-657.
- Koch, S., Eugster-Meier, E., Oberson, G., Meile, L. and Lacroix, C.** (2008). Effects of strain and growth conditions on autolytic activity and survival to freezing and lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* isolated from cheese. *International Dairy Journal*, 18: 187-196.
- Kok, J.** (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 15-42.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W.N.** (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 187-221.
- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yacoui, M. and Ouhssine, M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin – Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144: 237-250.
- Lamarque, M., Charbonnel, P., Aubel, D., Piard, J.-C., Atlan, D., and Juillard, V.** (2004). A Multifunction ABC Transporter (Opt) Contributes to Diversity of Peptide

- Uptake Specificity within the Genus *Lactococcus*. *Journal of Bacteriology*, 186: 6492–6500.
- Leroi, F.** (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27: 698-709.
- Leroy, F., Foulquié Moreno, M.R., and de Vuyst, L.** (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bactericin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 235-240.
- Leroy, F., de Winter, T., Adrian, T., Neysens, P. and de Vuyst, L.** (2006). Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 417. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 102-111.
- Lifrani, A.** (2006). Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires et mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et à la colle de poisson. Thèse doctorale présentée à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon pour obtenir le grade de Docteur en Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire UMR (914), France, 157 pages.
- Lin, J., Bardina, L., Shreffler, W.G., Andrae, D.A., Ge, Y., Wang, J., Burni, F.M., Fu, Z., Han, Y. and Sampson, H.A.** (2009). Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123: 315-322.
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A. and Siezen, R.** (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11, 1-15.
- Liu, S.** (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 115-131.
- Lonigro, S.L., Valerio, F., de Angelis, M., de Bellis, P. and Lavermicocca, P.** (2009). Microfluidic technology applied to cell-wall protein analysis of olive related lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 6-11.
- Luchansky, J.B. and Call, J.E.** (2004). Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *Journal of Food Protection*, 67: 1017-1021.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou,**

- Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodsteine, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R. Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J. Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 103: 15611-15616.
- Martinez, B., Suarez, J.E. and Rodriguez, A. (1996). Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, 142: 2393-2398.
- Mazotta, A.S. and Montville, T.J. (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *International Journal of Applied Microbiology*, 82: 32-38.
- McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R.P. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 285-308.
- Milesi, M.M., Candiotti, M. and Hynes, E. (2007). Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1427-1433.
- Moll, G.N., Ubbink-Kok, T., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, L.F., Konings, W.N. and Driessen, A.J. (1996). Lactococcin G is a potassium ion-conducting two component bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 178: 600-605.
- Moll, G.N., van den Akker, E., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, L.F., Konings, W.N. and Driessen, A.J. (1999). Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *Journal of Bacteriology*, 181: 4848-4852.
- Moneret-Vautrin, D.A. (2008). Épidémiologie de l'allergie alimentaire. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 48: 171-178.
- Morgan, S.M., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2005). Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2606-2611.
- Morisset, D., Berjeaud, J.-M., Frère, J. and Héchard, Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques. In: F.-M. Luquet, and G. Corrieu (Eds.), Bactéries lactiques et probiotiques (pp. 113-194), 1^{ère} édition, LAVOISIER, France.

- Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D.E. and Kihal, M.** (2006). Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy & Food Science*, 1: 12-18.
- Nes, F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H.** (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek international*, 70: 113-128.
- Nilsen, T., Nes, I.F. and Holo, H.** (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2975-2984.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, F.** (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174: 5686-5692.
- Ochirkhuyag, B.** (1999). Caractérisation des caséines du lait de jument: Propriétés biologiques de lait équin fermenté (Koumiss). Thèse doctorale, Faculté des sciences et des techniques, Université de Nantes, France, 95 pages.
- Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N.P.** (2006). Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*, 16: 446-456.
- Pappa, E.C., Kandarakis, I.G., Zerfiridis, G.K., Anifantakis, E.M. and Sotirakoglou, K.** (2006). Influence of starter cultures on the proteolysis of Teleme cheese made from different types of milk. *Lait*, 86: 273-290.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., and Jovanovic, G.** (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5802-5811.
- Paupe, J., Paty, E., de Blic, J. and Scheinmann, P.** (2001). L'allergie au lait de vache du nourrisson. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 41: 424-436.
- Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T., and San Romão, M.V.** (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*, 68: 211-216.

- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F. and Font de Valdez, G.** (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 25: 442-451.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Rabesona, H., Drouet, M., Choiset, Y., Haertlé, T., Mozzi, F., Font de Valdez, G. and Chobert, J.-M.** (2011). Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 12: 487-492.
- Pétras, M., Lacrampe, M., Villefranche, C., Gossarizza, G. and Dutau, G.** (2006). Allergie aux protéines de lait et aux hydrolysats de protéines de lait: à propos d'une observation au diagnostic retardé. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46: 416-418.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeney, P.L.H. and Parente, E.** (2008). Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. *International Dairy Journal*, 18: 81-92.
- Ponvert, C.** (2009). Quoi de neuf en allergologie pédiatrique en 2007-2008? Partie 3: allergies cutanées, alimentaires et médicamenteuses (une revue de la littérature internationale d'octobre 2007 à septembre-octobre 2008). *Revue française d'allergologie*, 49: 383-396.
- Poutanen, K., Flander, L. and Katina, K.** (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26: 693-699.
- Prioult, G., Pecquet, S. and Fliss, I.** (2005). Allergenicity of acidic peptides from bovine β -lactoglobulin is reduced by hydrolysis with *Bifidobacterium lactis* NCC362 enzymes. *International Dairy Journal*, 15: 439-448.
- Renye Jr, J.A., Somkuti, G.A., Paul, M. and Van Hekken, D.L.** (2009). Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheese. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 261-268.
- Richard, C., Cañon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H. and Drider, D.** (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology*, 23: 175-183.
- Rodriguez, J., Requena, T., Valero, E., Martinez-Castro, I., López-Fandiño, R. and Juárez, M.** (1997). Proteolysis and volatile components of reduced-fat cheeses made

- from ultrafiltered milk and different starters supplemented with lactobacilli and Lac-Prt-lactococci. *Lait*, 77: 717-728.
- Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P. and Meaney, W.J.** (1999). The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 2108-2114.
- Sadat-Mekmene, L., Jardin, J., Corre, C., Mollé, D., Richoux, R., Delage, M.-M., Lortal, S. and Gagnaire, V.** (2011). Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α_{S1} -casein. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 179-186.
- Sahl, H.G. and Bierbaum, B.** (1998). Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 52: 41-79.
- Sarantinopoulous, P., Kalantzopoulous, G. and Tsakalidou, E.** (2002). *Enterococcus faecium* in the microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 93-105.
- Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P.** (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394-406.
- Schillinger, U. and Lucke, F.** (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901-1906.
- Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.H.** (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 158-164.
- Sélo, I., Clément, G., Bernard, H., Chatel, J.-M., Créminon, C., Peltre, G. and Wal, J.-M.** (1999). Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy*, 29: 1055-1063.
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R. and Barreto Crespo, M.T.** (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2569-2576.
- Sharma, S., Kumar, P., Betzel, C. and Singh, T.P.** (2001). Structure and function of proteins involved in milk allergies. *Journal of Chromatography B*, 756: 183-187.

- Simova, E. and Beshkova, D.** (2007). Effect of growth phase and growth medium on peptidase activities of starter lactic acid bacteria. *Lait*, 87: 555-573.
- Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G.F., Beresford, T. and Ross, R.P.** (2010). Invited review: *Lactobacillus helveticus* – A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93: 4435-4454.
- Spuergin, P., Mueller, H., Walter, M., Schiltz, E. and Forster, J.** (1996). Allergenic epitopes of bovine α_{S1} -casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy*, 51: 306-312.
- Strahinic, I., Kojic, M., Tolinacki, M., Fira, D. and Topisirovic, L.** (2010). The presence of *prtP* proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3-18. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 43-49.
- Tahara, T., Yoshioki, S., Utsumi, R. and Kanatani, K.** (1997). Isolation and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* JCM 2124. *FEMS Microbiology Letters*, 148: 97-100.
- Thorn, D.C., Ecroyd, H., Sunde, M., Poon, S., and Carver, J.Y.** (2008). Amyloid fibril formation by bovine milk α_{S2} -casein occurs under physiological conditions yet is prevented by its natural counterpart, α_{S1} -casein. *Biochemistry*, 47: 3926–3936.
- Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, I., van Beeumen, J., and Kalantzopoulos, G.** (1999). Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: characterization and specificity for β -casein. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2035–2040.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C.** (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
- Tzvetkova, I., Dalgalarrrondo, M., Danova, S., Iliev, I., Ivanova, I., Chobert, J.-M. and Haertlé, T.** (2007). Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. *Journal of Food Biochemistry*, 31: 680-702.
- Umpiérrez, A., Quirce, S., Maranón, F., Cuesta, J., Garcia-Villamuza, Y., Lahoz, C., and Sastre, J.** (1999). Allergy to goat and sheep cheese with good tolerance to cow cheese. *Clinical and Experimental Allergy*, 29: 1064-1068.

- Vadyvaloo, V., Snoep, J.L., Hasting, J.W. and Rautenbach, M.** (2004). Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150: 335-340.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.A., Kok, J. and Venema, G.** (1991). Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbial*, 57: 493-498.
- Vankerckhoven, V., van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. and Goossens, H.** (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asal*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4473-4479.
- Venema, K., Dost, M.H., Venema, G. and Kok, J.** (1996). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 142: 2825-2830.
- Wang, S.L., Huang, T.Y., Wang, C.Y., Liang, T.W., Yen, Y.H. and Sakata, Y.** (2008). Bioconversion of squid pen by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* TKU010 for the production of proteases and lettuce growth enhancing biofertilizers. *Bioresource Technology*, 99: 5436-5443.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.** (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimoska, M. and Okazaki, M.** (2003). Purification and characterization of novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5746-5753.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J. and Hwang, H.J.** (2008). Properties and safety aspect of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 925-933.
- Zhu, Y., Zhaping, Y. and Li, Y.** (2009). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 597-610.
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I. and Ben Hamida, J.** (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *The Protein Journal*, 29: 432-439.

RESUMÉ et MOTS CLÉS

TITRE EN FRANÇAIS: Usage des bactéries lactiques issues de produits laitiers fermentés ou de fromages locaux obtenus en Egypte dans la protéolyse des protéines du lait afin de diminuer leurs propriétés allergéniques et dans l'obtention de produits antimicrobiens

Résumé

Les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus plantarum* JDM1 et *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 montraient une forte activité protéolytique. Les souches *Lactobacillus fermentum* IFO3956 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 renferment le gène de la protéase *PrtP*, tandis que la souche *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 contient le gène de la protéase *PrtR*. Les protéases produites par les souches de lactobacilles isolés appartiennent au groupe *PIII* puisqu'elles sont capables d'hydrolyser les caséines α_{s1} , α_{s2} et β . *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 et *Lactobacillus plantarum* JDM1 pourraient être utilisés pour réduire la reconnaissance par les IgE des caséines α_{s1} et β . Les perspectives pour la suite de ce travail peuvent être orientées vers la sélection de souches de LAB afin de les introduire au sein des levains classiques utilisés jusqu'à présent, et offrant ainsi plusieurs actions bénéfiques.

Les souches actives (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) isolées à partir de produits laitiers égyptiens se sont révélées capables de produire plusieurs bactériocines (*ent A*, *ent B*, *ent P* et *ent L50A*) présentant une activité considérable contre *Listeria monocytogenes*. L'analyse des souches *Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980 par les méthodes de biologie moléculaire a révélé l'absence de gènes de facteurs de virulence *asal*, *cyl A* et *cyl B*, *ace*, *efaAfs* et *espfm* quand on les comparait avec la souche *Enterococcus faecalis* MM4594 présentant ces facteurs. L'ensemble de ces résultats montre que ces deux souches (*Enterococcus faecium* TX1330 et *Enterococcus faecium* E980) productrices d'entérocoques, dépourvues de facteurs de virulence et surtout sensibles aux antibiotiques, peuvent être utilisées comme levain ou en co-culture dans les processus de fabrication alimentaire et peuvent être des candidats prometteurs pour des applications antivirales, antifongiques ou autres.

Mots-clés : Produits laitiers Égyptiens, bactéries lactiques, activité protéolytique, allergénicité, activité antimicrobienne

Title : The use of lactic acid bacteria collected from Egyptian fermented dairy products in the proteolysis of milk proteins for reduced allergenicity and in the production of antimicrobial agents

Abstract

The strains *Lactobacillus fermentum* IFO3956, *Lactobacillus plantarum* JDM1, et *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 showed a strong proteolytic activity. The strains *Lactobacillus fermentum* IFO3956 and *Lactobacillus plantarum* JDM1 included *PrtP* protease, while the strain *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 contain *PrtR* protease. No presence of genes encoding proteases *PrtB* and *PrtH* has been detected in all strains tested. Proteases produced by isolated lactobacillus strains may be classified as *P III* type, since they proteolysed α_{s1} -, α_{s2} - and β -caseins. Depending on the reduced recognition and binding by IgE of α_{s1} -, and β -caseins hydrolyzed by *Lb. fermentum* IFO3956, *Lactobacillus rhamnosus* LMS2 and *Lactobacillus plantarum* JDM1 these strains may be used for the production of milk products with reduced α_{s1} - and β -caseins immuno-reactivity. Future research efforts may be oriented towards the selection of mixed cultures of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) providing several beneficial advantages.

The active strains (*Enterococcus faecium* TX1330 and *Enterococcus faecium* E980) isolated from Egyptian dairy products were proved capable of producing a variety of bacteriocins (*ent A*, *ent B*, *ent P* and *ent L50A*) with considerable activity against *Listeria monocytogenes*. Analysis of *Enterococcus faecium* TX1330 and *Enterococcus faecium* E980 by the methods of molecular biology has revealed the absence of the virulence factor genes (*asal*, *cyl A* and *cyl B*, *ace*, *efaAfs*, and *espfm*) as compared with a positive strain (*Enterococcus faecalis* MM4594). Based on the obtained results showing that the two studied strains producers of enterocins were devoid of virulence factors and mostly sensitive to antibiotics, *Enterococcus faecium* TX1330 and *Enterococcus faecium* E980 may be used as safe and useful starter cultures or co-cultures and may be promising candidates for antiviral, antifungal and other applications.

Key-words : Egyptian dairy products, lactic acid bacteria, proteolytic activity, allergy, antimicrobial activity

Directeur de thèse

NOM Prénom : EL-GHAISH Shady

Adresse : INRA-BIA-FIP rue de la Géraudière

Code Postal – Ville : BP 71627 44316 NANTES cedex3, France

Dr. Jean-Marc CHOBERT