

## Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raïb »

K. Bayoub<sup>1</sup>, F. Elotmani<sup>2</sup>, O. Assobhei<sup>2</sup>, S. Jaoua<sup>3</sup> et A. Soukri<sup>1</sup>

1 : Equipe génie enzymatique et génétique moléculaire, laboratoire de biochimie, Faculté des Sciences Ain Chock, Casablanca Maroc.

2 : Laboratoire de microbiologie appliquée et biotechnologie, Faculté des Sciences El Jadida, Maroc

3 : Laboratoire des biopesticides, centre de biotechnologie de Sfax, Tunisie

### Résumé

Les bactériocines sont des peptides ou protéines produites par des genres bactériens possédant des activités anti-microbiennes, habituellement spécifiques et contre les bactéries des espèces apparentées sans être létales à la souche productrice. Les bactériocines produites par les bactéries Gram + sont dans la plus part des cas petites. Elles perméabilisent la membrane de la cellule hôte. Elles ont une grande activité anti-microbienne spécifique contre les microorganismes pathogènes et d'altération. Le spectre d'activité des bactériocines issues des bactéries Gram + varie de l'étroit au large mais surtout spécifique aux bactéries Gram +.

Dans notre recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une activité anti-bactérienne des bactériocines produites par une série de bactéries lactiques isolées au Maroc à partir du traditionnel lait fermenté « Raïb ». Ces souches ont été identifiées et leur spectre d'activité a été aussi déterminé vis-à-vis d'une quarantaine de souches. Nous avons fait une étude biochimique permettant la caractérisation des bactériocines, ainsi qu'une étude physico-chimique et avons détecté l'activité bactériocine sur gel.

Parallèlement, nous avons mis au point les conditions d'extraction de l'ADN de certaines souches sélectionnées pour leurs performances antimicrobiennes. D'autre part, nous avons mis en évidence les conditions expérimentales pour l'amplification par PCR d'une partie du gène de bactériocine.

**Mots clés :** Bactériocines, Bactéries lactiques, Activité anti-microbienne, Sécurité alimentaire.

### Introduction

Malgré l'application des technologies modernes de transformation des aliments et l'application des principes de qualité, les toxi-infections alimentaires sont à la base de 6.5 à 33 millions de maladies humaines et plus de 9000 morts chaque année dans le monde ( Mead et al., 1999). L'aliment est la source fréquemment mise en cause. Des moyens usuels de prévention tels les traitements physiques (hautes pression, rayons ionisants, pasteurisation, stérilisation, congélation, réfrigération.....), chimiques (nitrites, sulfites.....) compromettent souvent la qualité de l'aliment.

Les chercheurs et les industriels de l'agro-alimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi de conservateurs chimiques pouvant avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Ceci incite à la recherche d'autres alternatives notamment celles qui utilisent des agents biologiques connus pour leur innocuité. Dans cette optique, l'utilisation de souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices semble être une voie d'avenir pour promouvoir de nouvelles catégories d'aliments tels les produits « Bio » contenant des conservateurs dits « naturels ».

Dans ce sens, les bactériocines qui sont des substances antibactériennes produites par les bactéries en l'occurrence les bactéries lactiques, sont des candidats prometteurs à la fois pour exploiter leur pouvoir préservateur et pour réconcilier produits « naturels » et qualité hygiénique des aliments.

L'objectif de notre travail est de caractériser ces substances antimicrobiennes produites par des souches isolées du RAÏB lait traditionnel fermenté, sélectionnées par leur effet bactéricide antagoniste vis-à-vis *Listeria monocytogenes* et d'envisager une approche de purification pour des fins biotechnologiques.

### Matériel et Méthodes

Les souches utilisées dans ce présent travail sont isolées du RAÏB, ces souches ont été sélectionnées pour leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis des germes pathogènes dont *Listeria monocytogenes* utilisée comme souche indicatrice dans notre étude.

Dans un premier temps, nous avons fait appel à une étude microbiologique et biochimique afin de détecter l'activité antibactérienne par les différentes techniques : technique de spot, antagonisme direct sur

milieu solide et test de diffusion. Une étude physico-chimique a été effectuée pour savoir la stabilité de la bactériocine aux différents pH combiné au traitement thermique. Aussi une purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium et une migration sur gel d'électrophorèse Tricine SDS-PAGE a été faite.

### Résultats et discussion

Ces souches sont identifiées comme étant des cocci, Gram-positives, catalase négatives, oxydase négatives. En se basant sur leurs caractères physiologiques et les profils de fermentation des sucres (galerie 50 CHL) quatre souches sont identifiées comme étant des *Lactococcus* et cinq des *Enterococcus*. Ces souches ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis d'une quarantaine de souches. (Elotmani, F. et al 2002).

#### \*Caractérisation physico-chimique de la bactériocine

#### \*\*Effet du pH et de température sur l'activité de la bactériocine

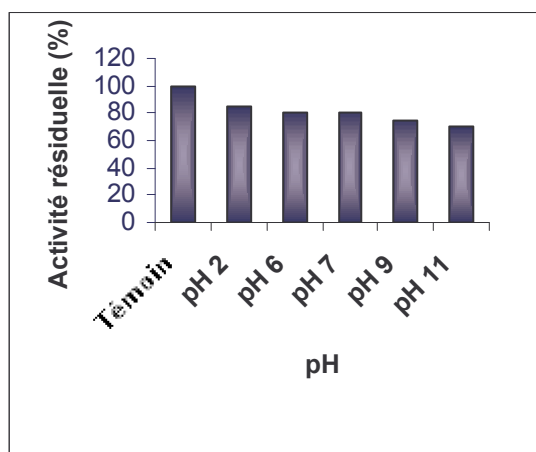


Fig.1 :L'effet du pH sur l'activité bactériocinogène (S3)

Les résultats indiquent la thermorésistance de la bactériocine produite par la souche S3, ainsi l'activité antibactérienne de cette bactériocine reste conservée à -20°C pendant plusieurs mois. Aussi la bactériocine reste active dans une gamme de pH comprise entre 2 et 11, avec une diminution d'activité d'environ 25 % à pH 11, ceci en comparaison avec le témoin dont le pH est de 4,8.

L'effet du pH peut s'expliquer par le fait que la fixation des bactériocines sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles, s'améliore en diminuant le pH (Ennahar et al., 2000).

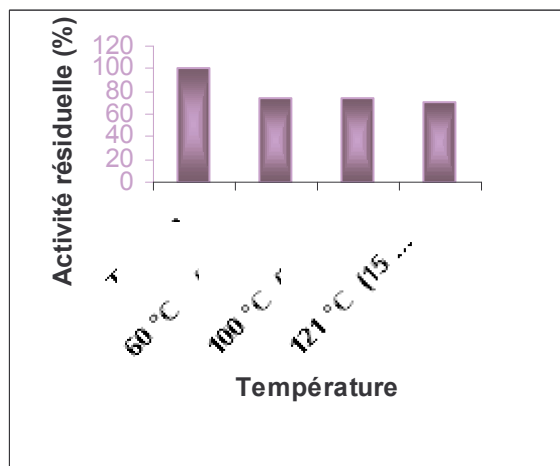


Fig.2 : L'effet de la température sur l'activité bactériocinogène (S3)

D'après Leroy et De Vuyst (1999), l'inactivation de Sakacin K qui est une bactériocine produite par *Lactobacillus sake* CTC 494 et qui a une activité maximale à pH 5, augmente avec le pH. Ceci probablement en raison du degré élevé d'adsorption de cette molécule à la cellule bactérienne.

La production de la bactériocine, selon Choi et al (2000), est influencée par le pH du milieu de culture, le maximum de la production de la bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis subsp. Lactis* A 164 est observé à pH 6.

Lyon et al (1995) a noté que l'activité d'Entérocin EL1 n'est pas touchée par un chauffage à 100°C et qu'elle garde une partie de son activité à 121°C pendant 30 min. Aussi cette activité est détectée dans toute la gamme de pH 2 à pH 11, avec une plus grande activité de pH 2 à pH 7 (pH acide et neutre).

#### \*\*L'effet du pH combiné au traitement thermique

La température et le pH sont deux paramètres qui influencent la stabilité des bactériocines. Pour ce but, une expérience combinant les deux effets a été réalisée.

Nous remarquons que les trois souches testées ont une activité dans une zone de pH large allant de 2 à 11. Concernant la stabilité des bactériocines à pH combiné au traitement thermique, les résultats montrent que les souches résistent à l'autoclavage à des pH acides, en effet, l'activité de la souche S3 est maintenue à pH : 2, 3, 4 et 6 alors qu'elle se perd à pH basique suite au traitement à l'autoclave ceci est valable aussi bien pour le surnageant que pour la fraction dialysée. Pour la souche S1 l'activité disparaît à partir du pH 6 dans le cas de traitement thermique, alors que la souche S2 maintient son activité jusqu'à pH 9, ce qui pourrait être intéressant pour les aliments ayant un pH basique et qui subissent un traitement thermique durant le processus de fabrication. Cependant, la température de l'autoclave semble inactiver une partie des

bactériocines si nous comparons le diamètre des zones d'inhibition enregistré dans le cas de pH sans traitement thermique. Ce n'est pas le cas pour la souche S1 qui montre une suractivité à des pH acides suite à ce traitement. Ce qui pourrait rendre cette souche intéressante en matière de fabrication et stérilisation des aliments ayant un pH acide.

Nous pouvons déduire que la structure des bactériocines est résistante à l'autoclavage, surtout elle est stable à pH acide combiné au traitement thermique, ce qui veut dire qu'elle pourrait être utilisée dans le cas de préparation subissant un traitement thermique pour la préservation.

Nos résultats correspondent à ceux trouvés par Ryan et al 1996, Lacticin 3147 une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* DPC3147 est thermostable en particulier à pH acide. De même pour Choi et al (2000) la bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis subsp. Lactis* A164 est thermostable particulièrement à bas pH.

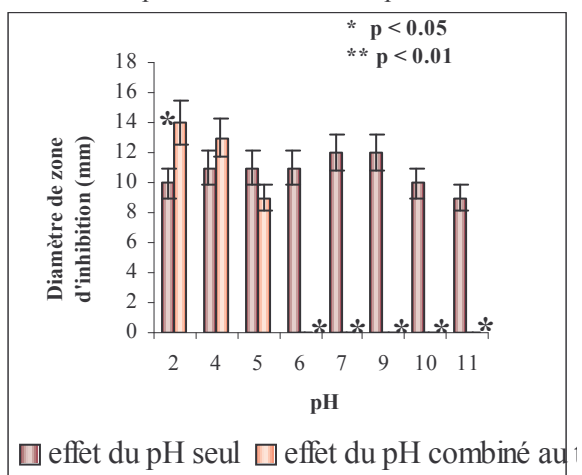


Fig.3 : Effet du pH combiné au traitement thermique (121°C-20 min-) sur la stabilité de bactériocine (La souche S1)

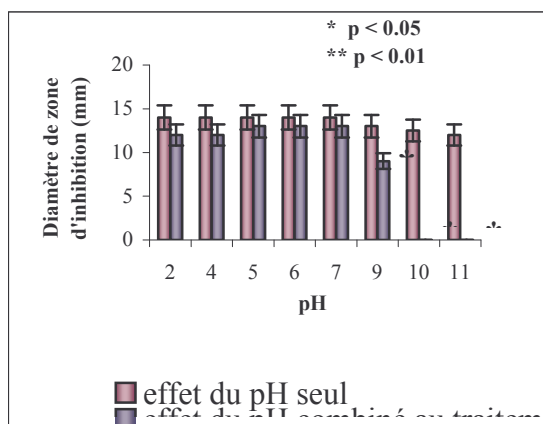


Fig.4 : Effet du pH combiné au traitement thermique (121°C-20 min-) sur la stabilité de bactériocine (La souche S2)

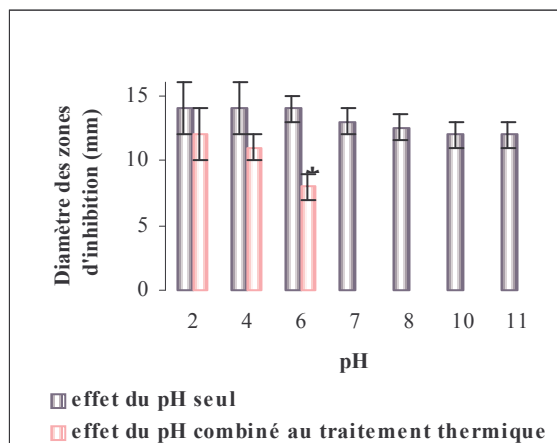


Fig.5 : Effet du pH combiné au traitement thermique (121°C-20 min-) sur la stabilité de bactériocine (la souche S3)

**\*Purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium**

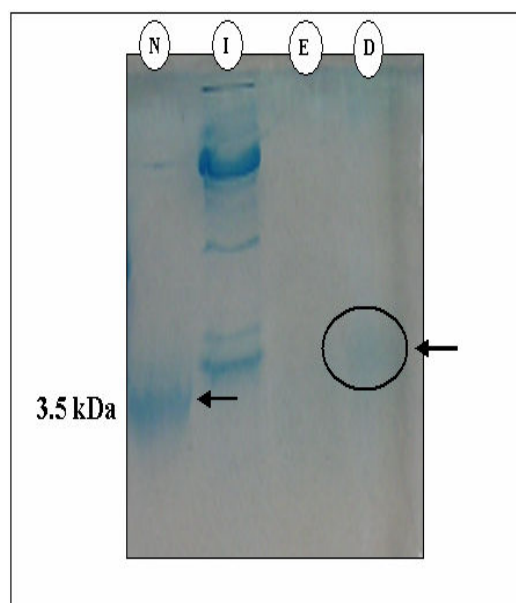


Fig.6 : Gel Tricine SDS-PAGE 16.5%

N : Nisine bactériocine commercialisée  
 I : Intracellulaire : cellules soniquées  
 E : Surnageant de la culture  
 D : Dialysat

Sur le gel Tricine SDS-PAGE 16.5 % coloré, nous observons la bande de la nisine (N) dont la taille de 3.5 kDa est utilisée comme marqueur de taille. La fraction intracellulaire (I) (surnageant des cellules soniquées) présente plusieurs bandes, et la fraction (E) (surnageant de la culture) ne présente aucune

bande vu qu'elle est très diluée, alors que la fraction dialysée (D) présente une bande à peine visible qui est responsable de l'activité antibactérienne sur le gel d'activité.

Ce résultat suggère que la bande responsable de l'activité est différente de celle de la nisine de point de vue « poids moléculaire » (Supérieur à 3.5 kDa), ce qui est confirmé par le résultat de western blot où l'anticorps de la nisine ne reconnaît que la bande de la nisine et non pas notre bande. Aussi la différence de la structure est démontrée par le test de  $\beta$ -mércaptoéthanol qui inhibe l'activité de la nisine à la concentration 45 mM, alors que notre bactériocine est inactivée à partir de 30 mM.

Au cours de ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'activité antibactérienne de bactériocines produites par quelques souches lactique isolées du RAÏB, lait traditionnel fermenté.

En terme de notre étude, nous concluons que notre bactériocine peut être classée comme un peptide thermostable actif contre la *Listeria*, et nous présumons qu'elle appartient à la classe IIa dont la définition est donnée par *Klaenhammer* (1993). En plus, la stabilité à différentes valeurs de pH et la thermostabilité sont des propriétés qui rendent la bactériocine intéressante du point de vue « **biopréservation** », en effet, elle peut être utilisée dans des aliments acides comme non-acides, et aussi être employée dans des aliments réfrigérés, ainsi elle empêcherait la pullulation d'une majorité de microorganismes tel *Listeria monocytogenes* et qui touchent à la sécurité alimentaire.

## Bibliographie

- Choi, H.-J., Cheigh, C.-I., Kim, S.-B. And Pyun, Y.-R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A164 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology* 88, 563-571.
- Elotmani, F., Revol-Junelles, A.-M., Assobhei, O., Millière, J.-B. (2002). Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Raïb, a Moroccan Traditional Fermented Milk. *Current Microbiology* 44, 10-17.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 85-106.
- Klaenhammer TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Reviews* 12, 39-86.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. (1999). Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K. *Appl Environ Microbiol* 65, 974-981.
- Lyon. Wanda J., Olson. Dennis G., and Murano. Elsa A. (1995). Isolation and Purification of Enterocin EL1, a Bacteriocin Produced by a Strain of *Enterococcus faecium*. *Journal of Food Protection* 58, 890-898.
- Mead Paul S., Slutsker Laurence, Dietz Vance, McCaig Linda F., Bresee Joseph S., Shapiro Craig, Griffin Patricia M., and Tauxe Robert V. (1999). Food Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.