

# IDENTIFICATION ET ÉVALUATION DE L'EFFET PROBIOTIQUE DES BACTÉRIES LACTIQUES ISOLÉES DANS DES FROMAGES CAPRINS TRADITIONNELS

H. Dib, E. Hajj Semaan, R. Mrad, J. Ayoub, L. Choueiry, H. Moussa et G. Bitar  
Faculté d'Agronomie, Université Libanaise, Dekwaneh, Liban  
ehajj@ul.edu.lb

(Received 7 September 2010 - Accepted 7 June 2011)

## RÉSUMÉ

Dans le but d'identifier la flore lactique des fromages caprins fabriqués de façon traditionnelle et de rechercher un effet probiotique, une analyse chimique et microbiologique de sept produits collectés de différentes régions libanaises a été réalisée : Laban (L), Labneh Ambarise (LA), Labneh Serdalli (LS), Jebneh Darfieh (JD), Keshek (K), Shankish (Sh) et Labneh Darfieh (LD). Le pH et l'acidité ont été mesurés ; l'isolation des bactéries lactiques a été faite sur géloses sélectives MRS et M17 ; les colonies isolées ont été identifiées par les caractéristiques morphologiques, coloration Gram, catalase et oxydase, production d'ammonium à partir du glucose, croissance dans un bouillon MRS à 10° et 45°C, tolérance aux sels (2, 4 et 6.5% de NaCl), production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose, ainsi que la fermentation des substrats carbonés (API 50CHL et API 20Strep). L'effet probiotique a été évalué par l'inhibition des bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*), la survie à différents pH (1, 2, 3 et 7.2) et le temps nécessaire pour l'acidification du lait entier et écrémé. Les échantillons de Labneh Ambarise et Labneh Darfieh avaient un pH moyen de 4±0.5 et une acidité moyenne de 2%±0.1 (p/p), alors que le pH moyen et l'acidité titrable du fromage Darfieh étaient respectivement 5.22 et 0.62. Aucune présence de bactéries lactiques ne fut détectée dans les échantillons de Labneh Ambarise et de Labneh Darfieh, préservés dans l'huile d'olive. Dans les autres échantillons, vingt cinq souches ont été isolées et identifiées ; neuf appartiennent aux *Lactobacillus plantarum* (L2, Sh2, K2, K3, K4, K5, LS1, LS3 et LS4) ; trois *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (Sh3, LS2 et LS5) ; cinq *Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicum* 2 (JD1, JD2, JD3, JD4 et JD5) ; quatre colonies ont été soupçonnées être *Lactobacillus casei* (L1, Sh4, K1 et K6) ; les quatre restantes seraient des levures (L3, L4, L5, L6). Les souches identifiées ont été capables de produire des substances antimicrobiennes avec un maximum d'inhibition de 20 mm contre *Salmonella* (K1, Sh4, LS1 et JD1), 21 et 19 mm contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* respectivement (L2). À pH = 3, la survie des colonies allait de 50% à 93% pour Sh3, K2, LS2, LS5, JD1 et JD3. La croissance de ces bactéries était inhibée aux pH 1 et 2 (sauf pour JD1 et JD3). Le temps d'acidification du lait inoculé par ces bactéries était supérieur à 10 h en moyenne dépassant le temps d'acidification requis par les ferments lactiques du yaourt (5 h). Le Jebneh Darfieh, par la présence de *Leuconostoc mesenteroides*, montre les caractéristiques les plus intéressantes pour sa tolérance au stress d'acidité et son activité antimicrobienne maximale contre la salmonelle ; il pourrait être utilisé en tant que

probiotique naturel. Les isolats des échantillons de Laban, Shanklish, Keshek et Labneh Serdalli (*L. plantarum* et *L. paracasei* principalement) étaient sensibles au pH=2, avec une activité antimicrobienne importante contre les bactéries pathogènes; leur encapsulation peut les protéger contre les conditions acides. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'identité exacte de certaines bactéries et la nature des sécrétions responsables de l'effet probiotique.

**Mots-clés:** caprins, fromages traditionnels, bactéries lactiques, probiotiques

#### ABSTRACT

In order to identify lactic acid bacteria (LAB) associated with traditional goat cheeses and to assess their probiotic effect, chemical and microbiological analysis were carried out on seven products collected from different Lebanese regions: Laban (L), Labneh Ambarise(LA), Labneh Serdalli (LS), Jebneh Darfieh (JD), Keshek (K), Shanklish (Sh) and Labneh Darfieh (LD). These samples were analysed for their pH and acidity. The isolation of lactic acid bacteria was achieved using two selective media, namely MRS and M17 agar. Isolated strains were identified according to morphology, Gram staining, catalase and oxydase, ammonia production from arginine, carbon dioxide production from glucose, growth in MRS broth at 10°C and 45°C, salt tolerance (2, 4 and 6.5% of NaCl), sugar fermentation with API (Analytical Profile Index) system methods (50CHL and 20Strep). The probiotic potential of isolates to inhibit pathogenic bacteria (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli*), their survival at different pH (1, 2, 3 and 7.2), the time needed to reach acidification end point in full and skimmed milk were assessed. Labneh Ambarise and Labneh Darfieh had an average pH of  $4\pm 0.5$  and a titratable acidity of  $2\%\pm 0.1$  (w/w), while the average pH and titratable acidity of Darfieh cheese were 5.22 and 0.62 respectively. The presence of LAB in one year old samples preserved in olive oil could not be detected. Twenty five strains were isolated and identified from different samples, where nine of them belong to *Lactobacillus plantarum* (L2, Sh2, K2, K3, K4, K5, LS1, LS3 and LS4), three are *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (Sh3, LS2 and LS5) and five are *Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicum* 2 (JD1, JD2, JD3, JD4 and JD5); four colonies are suspected to be *Lactobacillus casei* (L1, Sh4, K1 and K6) and four others are probably yeasts (L3, L4, L5 and L6). Identified strains showed a capacity to produce antimicrobial substances with maximum inhibition diameters of 20 mm against *Salmonella* (K1, Sh4, LS1 and JD1), 21 mm and 19 mm for L2 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. The microorganisms survival rate in simulated gastric juice (SGJ) varied between 50% and 93% at pH 3 (Sh3, K2, LS2, LS5, JD1 and JD3). Their growth was inhibited at pH 1 (0.05% to 0.08%); only JD1 and JD3 showed more than 50% of viability at pH 2. The time needed for milk acidification had an average of more than 10 h exceeding the time required by yogurt starter cultures (5 h). The Jebneh Darfieh sample, rich in *Leuconostoc mesenteroides*, showed the most interesting characteristics of cell viability at pH 2 (50% for JD1 and JD2) and a maximum of 20 mm of inhibition against *Salmonella*. It could be used as a natural source of probiotic. The isolates of the samples Laban, Shanklish, Keshek and Labneh Serdalli (*L. plantarum* and *L. paracasei* mainly) were more sensitive to high acidity (pH=2), but showed good antimicrobial activity against pathogens. Microencapsulation is probably required to protect them from harsh conditions. Further tests are needed to determine the exact identity of some strains and the nature of secreted substances responsible of the probiotic effects.

**Keywords:** goat, artisanal cheese, lactic acid bacteria, probiotics

## INTRODUCTION

Les probiotiques sont des micro-organismes qui, en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé (Corthier, 2006). Ils ont un rôle important dans l'amélioration de la digestion et du transit intestinal, le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et de l'équilibre acido-basique au niveau du côlon.

Les bactéries lactiques forment actuellement un groupe d'organismes utilisés pour l'enrichissement de certains yaourts et laits (Klaenhammer *et al.*, 2007). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), acides aminés, composés organiques (acides lactique et acétique), enzymes (lactase) et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (Soomro *et al.*, 2002). Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (Khan & Ansari, 2007). Les lactobacilles ont été incorporés dans des laits fermentés (Heller, 2001 ; Oliveira *et al.*, 2001), des fromages (Gomes & Malcata, 1998 ; Nayra *et al.*, 2002) et des glaces (Christiansen *et al.*, 1996).

Par ailleurs, toute souche bactérienne isolée, productrice de probiotiques, devrait résister à des conditions très variées telles l'exposition aux enzymes digestives des cavités buccale et gastrique, au pH acide de l'estomac, à la teneur réduite de l'O<sub>2</sub> dans l'intestin, à une température pas toujours optimale... En effet, les laits fermentés contiennent des bifides et des lactobacilles (*Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus acidophilus*) qui transitent avec l'aliment, mais plus de 95% meurent en chemin. Les plus fortes mortalités sont observées dans l'estomac qui est un milieu très acide, au début de l'intestin grêle dont les cellules produisent des défenses, et dans le gros intestin sous l'action de la microflore autochtone. De plus, pour qu'elles soient efficaces, ces bactéries doivent être administrées vivantes et en nombre très important, avec 10<sup>6</sup> d'unités formant colonies (ufc) par gramme du produit jusqu'à la date d'expiration (Charteris *et al.*, 1998).

Le Liban est un pays riche en produits caprins traditionnels (Jebneh Darfieh, Labnet el jarra, Shanklish, Keshek, Labneh Darfiyeh, Chnini, Ambarise...) non valorisés jusqu'à présent. Après l'analyse de leur valeur hygiénique (Chedid, 2007), cette étude vise à isoler et identifier les bactéries lactiques. La résistance des souches isolées à différentes conditions de température, de salinité, d'acidité ainsi que leurs effets en présence de souches pathogènes sont également étudiés afin de prouver une potentielle activité probiotique, ce qui amènerait à leur utilisation à l'échelle industrielle.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Echantillonnage

Des échantillons de produits fromagers caprins traditionnels sont prélevés chez les éleveurs dans des milieux ruraux et transportés à 4 °C dans des flacons stériles pour l'analyse microbiologique. La distribution régionale et le nom des échantillons collectés sont présentés dans le Tableau 1.

### Analyses chimiques

Le pH (Hanna pH meter) et l'acidité titrable (A.O.A.C., 1995 ; Chammas, 2006) ont été mesurés.

**TABLEAU 1**  
**Distribution Régionale et Nom des Echantillons Collectés**

Régions	Béqaa de l'Ouest	Aakkar (Aydamoun)	Nord (Bcharre)	Sud (Rmeich)	Mont Liban (Chouf)
Echantillons	Labneh Ambarise (LA)	Laban (L) Shanklish (Sh) Keshek (K)	Jebneh Darfieh (JD)	Labneh Darfieh (LD)	Labneh Serdalli (LS)

#### Analyses microbiologiques

Les échantillons collectés ont été conservés au maximum 24h à 4 °C avant d'être analysés. Ils ont été dilués ( $10^{-3}$  à  $10^{-6}$ ) puis ensemencés sur milieux de culture gélosés sélectifs. Les lactobacilles ont été dénombrés sur milieu MRS (Scharlau SA Barcelona, Spain) mis à incuber à 37 °C pendant 72 h en anaérobiose (générateurs de CO<sub>2</sub>, Bio Mérieux SA, France). Le dénombrement des streptocoques a été réalisé sur milieu M17 mis à incuber à 37°C pendant 48 h en aérobie (Oxoid, 2007). Chaque échantillon a été ensemencé sur trois boîtes de chacun des milieux.

Après une description morphologique, des tests biochimiques ont été réalisés pour l'étude des caractéristiques physiologiques des bactéries lactiques. Les bactéries Gram positive et catalase négative ont été identifiées par les tests suivants : oxydase (Health Protection Agency, 2010), production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose, croissance en milieu hypersalé (2, 4, 6.5, 8 et 10%), croissance à 10 et 45 °C, et fermentation des sucres avec les galeries API (API 50 CHL, Bio Mérieux, France) pour l'identification des *Lactobacillus sp.* et *Leuconostoc sp.*, et API 20 Strep pour l'identification des *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* et *Pediococcus sp.* (API 20 Strep, Bio Mérieux, France).

#### Evaluation de l'effet probiotique

Trois paramètres ont été testés pour l'évaluation de l'activité probiotique des colonies isolées sur les deux milieux MRS et M17.

L'activité antimicrobienne des bactéries isolées a été testée sur la croissance de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* obtenues de l'Institut de la Recherche Agronomique Libanais (IRAL-Fanar). Le diamètre de la zone d'inhibition a été calculé par la méthode de diffusion sur gélose (Yang, 2000).

La survie des bactéries dans un milieu simulant le jus gastrique (pH = 1, 2, 3) a été estimée par la méthode de Gibson *et al.* (2005) en comparaison avec un témoin (pH=7.2).

Le test d'acidification du lait a été étudié de la manière suivante: 200 ml de lait entier ou écrémé ont été inoculés avec la bactérie à tester et mis à incuber à 37 °C ; le pH a été mesuré toutes les 30 min (Moreton, 1998) jusqu'à atteindre le point final d'acidification de pH=4.6 (Sodini *et al.*, 2002).

Deux probiotiques commerciaux lyophilisés et à base de bactéries lactiques ont été analysés en parallèle aux bactéries isolées dans les fromages traditionnels pour le comptage, l'identification et la recherche de leur effet probiotique. Ce sont (i) l'Infloran (Laboratorio Farmaceutico SIT Specialita Igienico Terapeutiche Srl, Italy) contenant principalement *Lactobacillus acidophilus* (au moins  $10^9$  ufc/g dans une capsule) et (ii) l'Antibiophilus (Laboratoires Lyocentre, France) contenant *Lactobacillus casei* variété *rhamnosus* (au moins  $8 \times 10^8$  ufc/g dans une capsule).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Acidité des échantillons collectés

Le Tableau 2 présente le pH et l'acidité titrable des échantillons analysés. On note l'acidité la plus élevée pour le Keshek (4.3). Elle est due probablement à son mode de préparation à partir de Laban acide ; cette valeur est comparable à celle observée par Oner *et al.* (2004) sur un fromage turc caprin traditionnel. La plus faible valeur a été notée pour le Jebneh Darfieh (0.62).

TABLEAU 2

#### Paramètres Chimiques des Echantillons Analysés

Échantillons	Symbole	pH	Acidité titrable (% p/p)
Labneh Ambarise	LA	3.55	2.90
Labneh Darfiyeh	LD	4.26	1.04
Labneh Serdalli	LS	3.67	2.80
Jebneh Darfiyeh	JD	5.22	0.62
Laban	L	4.30	1.30
Shanklish	Sh	4.94	1.10
Keshek	K	-	4.30

### Bactéries lactiques dans les produits caprins traditionnels

Le Tableau 3 montre le nombre total de bactéries poussant sur les deux milieux MRS et M17. Le Jebneh Darfieh est le plus riche en bactéries lactiques poussant sur les deux milieux de culture avec un total de  $7.5 \times 10^8$  CFU/mL; ce nombre est comparable à celui isolé dans le fromage Tulum (Oner *et al.*, 2004).

Pour le Labneh Ambarise (LA), l'absence de bactéries poussant sur les deux milieux (MRS et M17) serait probablement dû au mode de conservation des échantillons dans

l'huile d'olive et/ou au salage important lors de la période de maturation. Ceci serait responsable de l'inhibition de la croissance bactérienne lactique (Keceli *et al.*, 2007). Le Laban et le Shanklish montrent un nombre comparable de bactéries ( $1.8-2 \times 10^7$  CFU/ml) probablement à cause d'une acidité similaire responsable de la réduction de leur nombre (1.3 et 1.1 respectivement).

Le nombre de bactéries poussant sur MRS étant supérieur à celui poussant sur M17, surtout pour le Keshek ( $3.4 \times 10^7$  contre  $1.7 \times 10^4$ ), montre une prédominance de lactobacilles par rapport aux streptocoques.

TABLEAU 3

**Nombre Logarithmique Total des Bactéries Poussant sur Gélose MRS et M17 (Valeurs Log10)**

	MRS (CFU/ml)	M17 (CFU/ml)	Total (CFU/ml)
Labneh Ambarise	-	-	-
Labneh Darfiyeh	7.00	7.00	7.30
Labneh Serdalli	6.81	5.43	6.83
Jebneh Darfiyeh	8.60	8.54	8.88
Laban	7.18	6.52	7.26
Shanklish	8.29	5.98	7.30
Keshek	7.53	4.23	7.53

Les souches bactériennes isolées sur les milieux de culture ont été identifiées par des tests biochimiques dont les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

Vingt six colonies isolées sur MRS et M17 sont Gram positives, oxydases et catalases négatives à l'exception de quelques souches montrant une catalase positive (Tableau 4). Ces dernières pourraient ne pas être des bactéries lactiques ou montreraient une fausse catalase par la présence d'une enzyme peroxydase. Les coques sont isolées dans le Laban et le Jebneh Darfiyeh ; dans les autres produits, des lactobacilles ont été exclusivement identifiées.

Parmi les lactobacilles identifiés, les *Thermobacterium* ont été exclus car aucune bactérie n'a poussé à 45°C. De plus, et comme les colonies isolées sont toutes homofermentaires, les *Betabacterium* ont également été exclus (Robinson, 2002). Les bactéries appartenaient donc aux *Streptobacterium* (Singh & Sharma, 2009).

En ce qui concerne les coques, les Entérocoques sont exclus car ces dernières poussent à 45°C (Todar, 2008) ; les Pédiocoques sont également exclus, ce genre étant capable de produire de l'ammonium à partir de l'arginine. Par la suite, les bactéries isolées étaient des *Leuconostoc*, *Streptococcus* ou des *Lactococcus*.

TABLEAU 4

Caractéristiques Morphologiques et Physiologiques des Colonies Isolées du Laban (L), du Shanklish (Sh), Keshek (K), Labneh Serdalli (LS) et du Jebneh Darfieh (JD)

P R O D U I T	Bactérie isolées	Tests									
		Gram /cell	Catalase	Oxydase	Croissance (°C)		Ferment.	Arginine	NaCl (%)		
					10	45			2	4	6.5
L a b a n	L1	+/Bâtonnet	+	-	+	-	Ho <sup>(1)</sup>	-	+	+	+
	L2	+/Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	-	-	-
	L3	+/Coque	+	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	L4	+/Coque	+	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	L5	+/Coque	+	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	L6	+/Coque	+	-	+	-	Ho	-	+	+	+
Sh a n k l i s h	Sh1	+/- Bâtonnet	-	-	-	-	Ho	-	-	-	-
	Sh2	+/- Bâtonnet	+	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	Sh3	+/- Bâtonnet	+	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	Sh4	+/- Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+

Suite :

K e s h e k	K1	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	K2	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	K3	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	K4	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	K5	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	K6	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
Se r da l l i	LS1	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	LS2	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	LS3	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	LS4	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
	LS5	+/ Bâtonnet	-	-	+	-	Ho	-	+	+	+
Jeb neh	JD1	+/Coque	-	-	+	-	He <sup>(2)</sup>	-	+	+	+
	JD2	+/Coque	-	-	+	-	He	-	+	+	+
	JD3	+/Coque	-	-	+	-	He	-	+	+	+
Dar fieh	JD4	+/Coque	-	-	+	-	He	-	+	+	+
	JD5	+/Coque	-	-	+	-	He	-	+	+	+

1: homofermentaire

2: hétérofermentaire



Après les tests biochimiques, le métabolisme des sucres carbonés des systèmes API (50CHL et 20Strep) a permis d'identifier, pour chaque produit analysé, les bactéries lactiques isolées (Tableau 5). Ainsi, trois lactobacilles (*plantarum*, *casei* et *paracasei*) et une *Leuconostoc mesenteroides spp. dextranicum 2* ont été identifiés. A noter que plusieurs colonies, isolées dans le Laban (L3, L4, L5 et L6), seraient des levures et non des LAB, et la colonie Sh1 n'a pas été identifiée.

**TABLEAU 5**  
**Bactéries Lactiques Identifiées dans les Échantillons Caprins Analysés**

Echantillons	Bactéries lactiques isolées			
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus casei</i> (suspected)
Laban	L2 (98.9%)*	-	-	L1
Shanklish	Sh2 (98.9%)*	Sh3 (98.9%)*	-	Sh4
Keshkek	K2, K3, K4, K5 (99.5%)*	-	-	K1, K6
Labneh Serdalli	LS1 (88.7%)* LS3, LS4 (98.9%)*	LS2, LS5 (99.5%)*	-	-
Jebneh Darfiyeh	-	-	JD1, JD2, JD3 (99.7%)* JD4, JD5 (90%)*	-

\* : Degré de confiance accordé à l'identification selon le programme API.

#### Evaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées

La dose minimale de colonies dans un probiotique doit être entre 6 et 7 log<sub>10</sub> ufc/g de produit lors de sa vente. La culture des produits Inflan et Antibiohilus sur MRS agar (en anaérobiose à 37 °C et pendant 72 h) montre un nombre supérieur même aux valeurs indiquées sur le produit commercialisé (10.22 et 9.37 log<sub>10</sub> ufc/g respectivement).

#### Caractéristiques de deux probiotiques commerciaux

Les caractéristiques des deux probiotiques commerciaux (Inflan et Antibiohilus) obtenues après culture sur milieu MRS, isolation et identification par des tests biochimiques et le métabolisme des sucres (système API), ont confirmé que les colonies sont bien *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* (Tableau 6). L'effet probiotique de ces bactéries a été évalué dans différentes conditions de croissance. Les résultats présentés dans le Tableau 6 seront utilisés à titre de comparaison.

Une des caractéristiques intéressantes des bactéries lactiques est leur capacité de ralentir et d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes par la production de facteurs inhibiteurs (Yateem *et al.*, 2008). L'effet inhibiteur des colonies isolées a été testé sur la croissance de *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Figure 1). Les colonies isolées dans le Jebneh Darfiyeh ont été testées sur la croissance de *Salmonella* seulement (Figure 1).

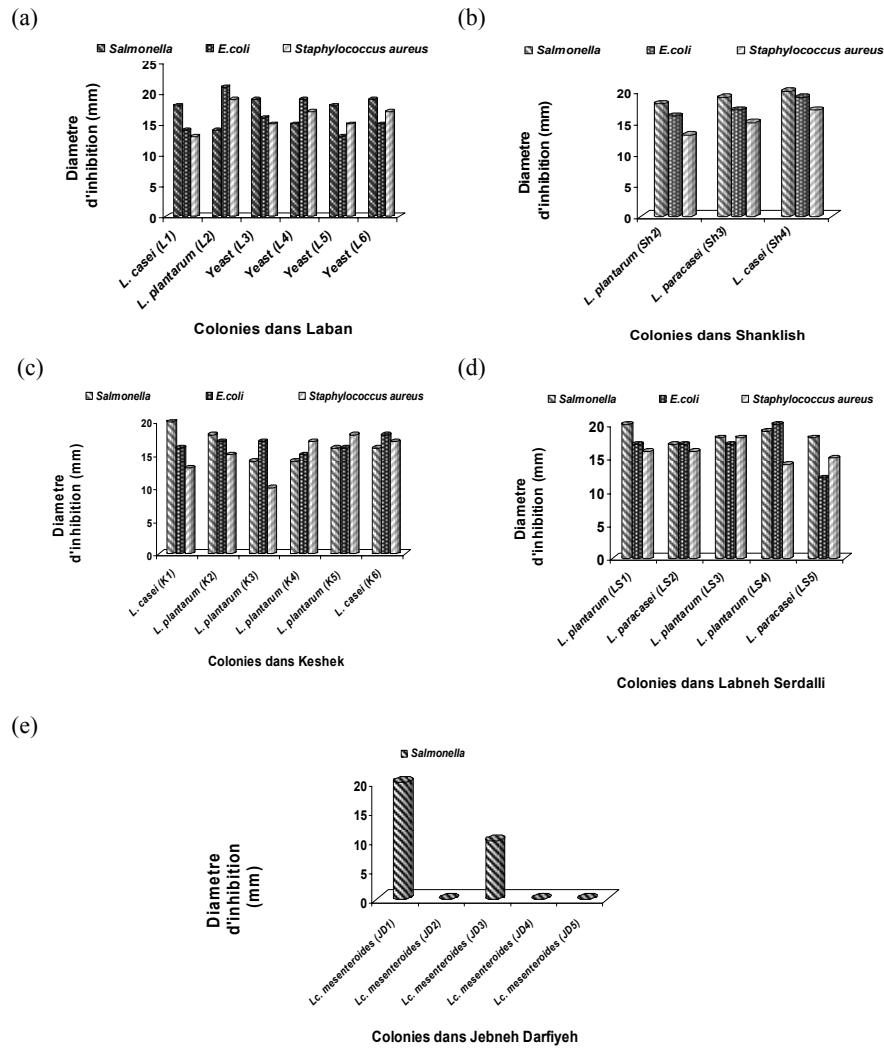
TABLEAU 6

Caractéristiques de 2 Probiotiques Commerciaux et leur Évaluation dans Différentes Conditions de Croissance

T E S T	B A C T E R I E	Aptitude d'acidification <sup>(3)</sup>		Diamètre d'inhibition (mm)			Survie dans le Jus Gastrique Simulé (%)			Tolérance au sel (% NaCl)			Thermorésistance		Réductase	Type de fermentation	Croissance		Production de CO <sub>2</sub>	Production d'ammonium	Oxydase	Catalase	Gram		
		lait entier	lait demi-écrémé	<i>Salmonella</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	pH = 1	pH = 2	pH = 3	2	4	6.5	60 °C, 90 min	65 °C, 30 min			15 °C	45 °C							
	<i>L. acidophilus</i>	+	-	11	2	3	10	10	0	80	97	+	+	+	-	Ac-R <sup>(2)</sup>	Ho <sup>(1)</sup>	+	-	-	-	-	-	+	-
	<i>L. rhamnosus</i>	+	-	8	1	1	8	8	18	41	97	+	+	+	-	Ac-R	Ho	+	+	-	-	-	-	+	+

<sup>(1)</sup> : homofermentaire <sup>(2)</sup> : acide avec coagulation – réduction du Litmus <sup>(3)</sup> : temps (h) pour atteindre le pH de 4.6

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des colonies isolées**



**Figure 1. Diamètres des zones d'inhibition des bactéries pathogènes par des colonies isolées dans le Laban (a), Shanklish (b), Keshek (c), Labneh Sordalli (d) et Jebneh Darfiyeh (e).**

La croissance de la salmonelle a été inhibée avec une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre par Sh4 and K1 (*Lactobacillus casei*), LS1 (*Lactobacillus plantarum*) et JD1 (*Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicum* 2). Bien que L2 (*Lactobacillus plantarum*), L4

(levure), K3 (*Lactobacillus plantarum*) et K4 (*Lactobacillus plantarum*) ont montré la plus faible activité d'inhibition contre *Salmonella* (14 mm), leur activité reste toutefois supérieure à celle des probiotiques lactiques commerciaux comme *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* qui ont montré un diamètre d'inhibition de 11 et de 8 mm respectivement (Ayoub, 2008).

Par ailleurs, la zone d'inhibition de *E. coli* a été la plus large (21 mm) avec L2 et LS4 (*L. plantarum*) et la plus réduite (12 mm) avec LS5 (*L. paracasei*), activité toutefois supérieure à celle des probiotiques lactiques commerciaux *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* (2.5 et 1.5 mm respectivement (Ayoub, 2008)).

En ce qui concerne *Staphylococcus aureus*, L2 (*Lactobacillus plantarum*) a montré une activité inhibitrice de 19 mm; un minimum de 13 mm a été mesuré pour L1, K1 (*Lactobacillus casei*), et Sh2 (*Lactobacillus plantarum*); cette activité est bien supérieure à celle de *L. acidophilus* (2 mm) et *L. rhamnosus* (1 mm) (Ayoub, 2008).

L'activité inhibitrice de la même bactérie était différente selon le produit dans lequel elle a été isolée. Ainsi, il existe deux ou plusieurs sous espèces de la même bactérie dans le même produit. En effet et à titre d'exemple, dans le Keshek, quatre types de *Lactobacillus plantarum* ont été isolés et montrent une activité inhibitrice différente vis-à-vis des bactéries pathogènes. De plus, la même bactérie *Lactobacillus plantarum* a montré une activité inhibitrice maximale contre *Staphylococcus aureus* lorsqu'elle a été isolée dans le Laban (L2) et minimale lorsqu'elle a été isolée dans le Shanklish (Sh2).

#### **Taux de survie des colonies isolées dans différents pH**

Une des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotique est sa capacité de survivre dans des conditions difficiles d'acidité simulant celles du jus gastrique ; ce dernier pouvant varier entre pH 1 après un jeûne et pH 4.5 à la suite d'un repas (Maragkoudakis *et al.*, 2006). La figure 2 montre les taux de survie des bactéries isolées dans des liquides de différents pH: 1, 2, 3 et 7.2.

À pH 7.2, utilisé comme une solution tampon pour les lactobacilles (Maragkoudakis *et al.*, 2006) les colonies ont montré un maximum de viabilité (100%) à l'exception de K4 (*Lactobacillus plantarum*) et Sh4 (*Lactobacillus casei*) qui n'ont survécu à aucun pH. Ce résultat peut être expliqué par la faiblesse de ces colonies ou bien par le besoin d'un pH différent pour leur survie.

Aucune colonie n'a pu supporter le pH très acide (pH=1); l'acidité aurait exercé un stress important sur les colonies empêchant toute croissance (Gibson *et al.*, 2005). *Lactobacillus acidophilus* et *rhamnosus* vendus comme probiotiques sur le marché local montrent aussi une viabilité réduite à pH=1 (0.25% et 18% respectivement (Ayoub, 2008)).

À pH 2, alors que le taux de viabilité ne dépasse pas 8% chez la majorité des colonies isolées, il a été de 50% pour celles isolées du Jebneh Darfiyeh (JD1 et JD3). Cette valeur a été de 80% et de 41% respectivement pour *Lactobacillus acidophilus* et *rhamnosus*. L5 et L6 sont soupçonnées être des levures avec une viabilité importante (60% et 82% respectivement) à pH 2; Kuhle *et al.* (2005) ont identifié une levure probiotique *Saccharomyces boulardii* tolérant un pH de 2.2.

À pH 3, les isolats de Jebneh Darfiyeh JD1 et JD3 (*Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicum*2) montrent une viabilité allant jusqu'à 93% ; il en est de même pour le Labneh Serdalli (91% pour *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (LS2 and LS5) ; le taux de survie de *Lactobacillus plantarum* (LS1, LS3 et LS4) n'a pas dépassé 23%. Dans l'échantillon de Laban, les levures montrent une viabilité allant de 47% à 91%, une viabilité inférieure pour L1 (*Lactobacillus casei*) et L2 (*Lactobacillus plantarum*) : 69 et 22% respectivement. Le Shanklish et le Keshek montrent une large variabilité des taux de survie des colonies (de 15% à 62%); ceci serait dû à la différence entre les sous espèces.

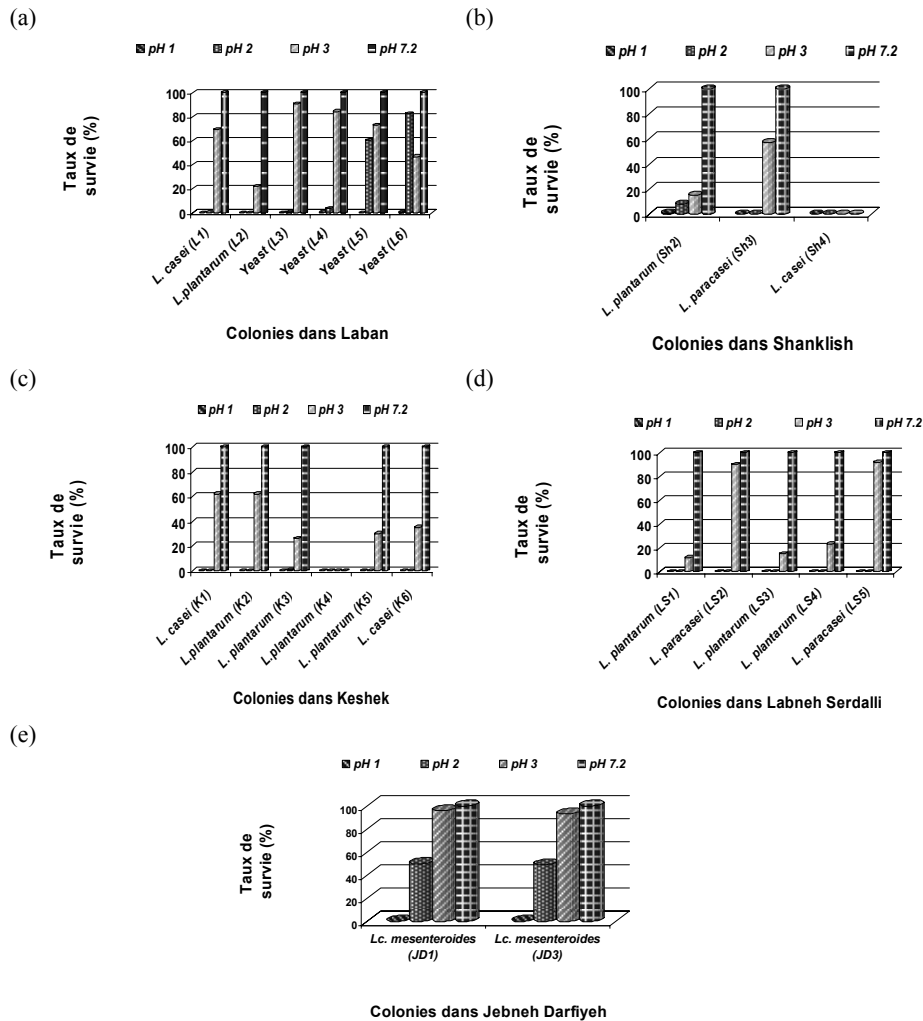


Figure 2. Taux de survie, à différents pH (1, 2, 3 et 7.2), des colonies lactiques isolées dans le Laban (a), Shanklish (b), Keshek (c), Labneh Serdalli (d) et Jebneh Darfiyeh (e).

### Temps d'acidification du lait par les bactéries isolées

Les Lactobacilles peuvent survivre à pH 4.6, pH commun à plusieurs produits fermentés (Maragkoudakis *et al*, 2006). Le Tableau 7 présente le temps nécessaire pour 13 colonies isolées pour atteindre le pH d'acidification dans du lait entier ou écrémé. Le lait joue le rôle de transporteur des probiotiques qui peuvent être utilisés avec les ferments lactiques.

Le pH du lait a été de 6.6 et 6.5 pour les laits entier et écrémé respectivement. Comme le montre le Tableau 7, en présence de K2, K4 et L2 (*Lactobacillus plantarum*) ainsi que K6 (*Lactobacillus casei*) le pH d'acidification est presque atteint après 10 h et demie d'inoculation dans le lait entier (4.62, 4.63, 4.62 et 4.63 respectivement). Les *Lactobacillus acidophilus* ont acidifié le milieu après 10 h d'inoculation. De plus, les milieux contenant LS1 (*L. plantarum*) et LS2 (*L. paracasei*) ont atteint le point final d'acidification (pH 4.6) après 8h40min d'inoculation dans le lait entier, valeur comparable à celle observée avec *L. rhamnosus* où le pH de 4.6 est atteint après une durée de 8 h.

A signaler que l'inoculation dans le lait écrémé n'a permis à aucune colonie des échantillons de Laban et de Keshek d'acidifier le milieu au point final d'acidification, de pH 4.6, même 10 h et demie après inoculation.

TABLEAU 7

**pH des Laits Entier (E) et Écrémé (É) avant (T0) et des Heures après Inoculation par les Colonies Isolées du Laban (L), Keshek (K) et Labneh Serdalli (LS)**

Temps Colonies	T0		T <sub>+9h</sub>		T <sub>+10h</sub>		T <sub>+10h30min</sub>	
	E	É	E	É	E	É	E	É
L1	6.6	6.5	4.83	4.97	4.78	4.90	4.73	4.88
L2	6.6	6.5	4.74	5.09	4.65	5.02	4.62	4.99
L4	6.6	6.5	4.91	4.96	4.86	4.89	4.80	4.85
L5	6.6	6.5	4.89	4.99	4.80	4.92	4.76	4.89
L6	6.6	6.5	4.90	5.06	4.83	4.99	4.78	4.97
K1	6.6	6.5	5.10	5.19	4.95	5.14	4.89	5.09
K2	6.6	6.5	4.77	5.04	4.70	4.96	4.62	4.90
K3	6.6	6.5	4.82	4.98	4.75	4.91	4.70	4.88
K4	6.6	6.5	4.77	4.96	4.68	4.87	4.63	4.83
K5	6.6	6.5	4.78	4.97	4.71	4.91	4.67	4.87
K6	6.6	6.5	4.75	5.03	4.65	4.96	4.63	4.89
LS1	6.6	6.5	4.56	4.78	-	4.71	-	4.66
LS2	6.6	6.5	4.56	4.79	-	4.73	-	4.65

E: Lait entier; É : Écrémé

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La flore lactique identifiée dans les échantillons caprins traditionnels est variable et prometteuse du fait de sa tolérance à une forte acidité et de la possibilité d'inhiber ou de modérer la croissance de bactéries pathogènes. Ces produits peuvent porter le nom de fromages probiotiques naturels sans aucune modification pour ceux contenant des bactéries tolérantes à l'acidité stomacale (JD1 et JD3) ou, pour celles moins tolérantes (Sh3, K1, K2, LS2, LS5, JD1 et JD3). Elles pourraient être protégées et encapsulées pour résister aux conditions acides. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin d'identifier les sous espèces des bactéries isolées (PCR), de déterminer la nature des substances antimicrobiennes élaborées et de les purifier afin de les utiliser au niveau industriel avec ou sans protection.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le Conseil National de la Recherche Scientifique Libanais.

## RÉFÉRENCES

- A.O.A.C. 1995. *Official methods of analysis*. AOAC, Arlington, Virginia.
- Ayoub, J. 2008. *Carry-through potential evaluation of commercial probiotics in various growth conditions*. Academic dissertation, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, Lebanese University.
- Chammas, G. 2006. *Caractérisation et utilisation des souches de bactéries lactiques locales dans le développement de produits laitiers fermentés au Liban*. Thèse doctorat, INAPG, 222.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Development and application of *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 759-768.
- Chedid, M. 2007. *Qualités physicochimique et microbiologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais*. Mémoire de fin d'études, Université Libanaise, Faculté d'Agronomie.
- Christiansen, P.S., Edelsten, D., Kristiansen, J.R. and Nielsen, E.W. 1996. Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51: 502-504.
- Corthier, G. 2006. *Probiotics and Health*. Inra press service. [www.international.inra.fr/press/probiotics](http://www.international.inra.fr/press/probiotics).
- Gibson, G.R., Rouzaud, G., Brostaff, J. and Rayment, R. 2005. *Final technical report for FSA project Ref G01022*. An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects, p. 8-12.
- Gomes, A.M.P. and Xavier Malcata, F. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis *via* technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, 81: 1992-1507.
- Health Protection Agency 2010. Oxidase test. *National Standard Method, BSOPTP 26, Issue 2.1*, [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- Heller, K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374S-379S.

- Keceli, T., Robinson, R.K. and Ghordon, M.H. 2007. The role of olive oil in the preservation of yoghurt cheese (labneh anbaris). *International Journal of Dairy Technology*, 52 (2): 68-72.
- Khan, S.H. and Ansari, F.A. 2007. Probiotics-The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(1): 76-82.
- Klaenhammer, T.R., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. and Barrangou, R. 2007. The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics*, 137: 748S-750S.
- Kuhle, A., Skovgaard, K. and Jespersen, L. 2005. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 29-39.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Moreton, R.S. 1998. *Fermented milk products*. International patent no. W09827824.
- Nayra, S., Sharaf, O.M., Ibrahim, G.A. and Tawfik, N.F. 2002. Incorporation and viability of some probiotic bacteria in functional dairy food: I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 30: 217-229.
- Oliveira, M.N., Sodini, I., Remeuf, F. and Corrieu, G. 2001. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 935-942.
- Oner, Z., Sagdic, O. and Sinsek, B. 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *Eur. Food Res. Technol.*, 219: 455-459.
- Oxoid 2007. [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com).
- Robinson, R.K. 2002. *The microbiology of milk and milk products*. Dairy Microbiology Handbook, third edition.
- Singh, G.P. and Sharma, R.R. 2009. Dominating species of *Lactobacilli* and *Leuconostoc* present among the lactic acid bacteria of milk of different cattle. *Asian J. Exp. Sci.*, 23(1): 173-179.
- Sodini, I., Lucas, A., Oliveria, M.N., Remeuf, F. and Corrieu, G. 2002. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture and probiotics cell counts in fermented milk processing. *J. Dairy Sci.*, 85: 2479-2488 (American Dairy Science Association).
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1): 20-24, 2004.
- Todar, K. 2008. Ph.D. bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Yang, Z. 2000. *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties*. Academic dissertation, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki.
- Yateem, A., Balba, M.T., AL-Surrayai, T., Al-Mutairi, B. and Al-Daher, R. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science*, 3(4): 194-199.