

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase.
Arg : Arginine.
B : *Bifidobacterium*.
Ba(OH)₂ : Hydroxyde de baryum.
BM : Bleu de méthylène.
BMM : Basal medium minimal.
BSA : Bovine Serumalbumine.
C55 : Transporteur lipidique «undécaprényl-phosphate».
CCM : Chromatographie sur couche mince.
CHSp : CHS peptoné.
Cit : Citrate.
CPS : Polysaccharides capsulaires.
DO : Densité optique.
DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.
dTDP : désoxy-thymidine-diphosphate.
En : *Enterococcus*.
EPS : Exopolysaccharides.
Esc : Esculine.
Ex.L : Extrait de levure.
Glu (ou G) : Glucose.
GRAS : Generally Recognized As Safe.
H₂SO₄ : Acide sulfurique.
HClO₄ : Acide perchlorique.
HePS : Hétéropolysaccharide.
HoPS : Homopolysaccharide.
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.
HS : Hypersaccharosé.
K₂HPO₄ : Phosphate dipotassique.
KH₂PO₄ : Phosphate de potassium.
L : *Lactobacillus*.
Lac (ou L) : Lactose.
Lc : *Lactococcus*.
Ln : *Leuconostoc*.
LPS : Lipopolysaccharides.
LTA : Acide lipotéichoïque.
mPa·s : milli Pascal·secondes.
Na₂HPO₄ : Phosphate disodique.
NaH₂PO₄ : Phosphate de sodium.
NH₄Cl : Chlorure d'ammonium.
Pep : Peptone.
PEP-PTS : Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system.
PFGE : Electrophorèse en champ pulsé.

Po : Poise.

rep-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés.

Rf : Rapport frontal.

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

S : *Streptococcus*.

Sac : Saccharose.

t : Tamponné.

TCA : Acide trichloracétique.

TFA : Acide trifluoroacétique.

Tm : Milieu témoin.

UDP : Uridine diphosphate.

UFC : Unité formant colonie.

VP : Voges-Proskauer.

Sommaire

	Pages
Liste des figures	i
Liste des tableaux	iii
Liste des abréviations	iv
Introduction	1
1. Synthèse bibliographique	5
1.1 Les bactéries lactiques	6
1.1.1 Propriétés des bactéries lactiques	6
1.1.2 Taxonomie et classification des bactéries lactiques	6
1.1.2.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	9
1.1.2.2 Le genre <i>Enterococcus</i>	10
1.1.2.3 Le genre <i>Streptococcus</i>	10
1.1.2.4 Le genre <i>Lactococcus</i>	10
1.1.2.5 Le genre <i>Leuconostoc</i>	11
1.1.2 Intérêts et applications des bactéries lactiques	12
1.2 Les exopolysaccharides	14
1.2.1 Généralités sur les EPS des bactéries lactiques	14
1.2.2 Diversité structurale	14
1.2.3 Relation structure-fonction des EPS	15
1.2.3.1 Effet du poids moléculaire	15
1.2.3.2 Effet de la conformation de la chaîne	16
1.2.3.3 Effet de la charge	16
1.2.4 Rôles et utilisations des EPS	17
1.2.5 Classification des EPS	19
1.2.6 Facteurs essentiels affectant la biosynthèse des EPS	25
1.2.6.1 Effet de la souche bactérienne et du stade de croissance	26
1.2.6.2 Effet du milieu de culture	26
1.2.6.3 Effet de la température d'incubation	28
1.2.6.4 Effet de la vitesse d'acidification	29
1.2.6.5 Effet du pH	29
1.2.6.6 Effet de la quantité d'oxygène	30
1.2.7 Biosynthèse des EPS des bactéries lactiques	30
1.2.8 Génétique de la production des EPS	36
2. Matériel et Méthodes	39
2.1. Matériel biologique	40
2.2. Milieux de culture	40
2.3. Méthodes	41
2.3.1 Isolement des souches lactiques	41
2.3.2 Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique	42

2.3.2.1	Observation macroscopique et microscopique	42
2.3.2.2	Recherche de la catalase	42
2.3.2.3	Conservation des souches	42
2.3.3	Caractérisation physiologique et biochimique des bactéries lactiques	43
2.3.3.1	Caractérisation physiologique	43
2.3.3.2	Caractérisation biochimique	44
2.3.4	Screening des souches productrices d'EPS	47
2.3.4.1	Etude qualitative	47
2.3.4.1.1	Examen macroscopique sur milieux gélosés	47
2.3.4.1.2	Utilisation du colorant cationique	48
2.3.4.2.1	Viscosité apparente	49
2.3.4.2.2	Viscosité intrinsèque	51
2.3.4.2.3	Dosage colorimétrique des EPS	51
2.3.4.2.3.1	Préparation des échantillons	51
2.3.4.2.3.2	Extraction et purification des EPS	51
2.3.4.2.3.3	Concentration des EPS	54
2.3.4.2.3.4	Dosage des EPS	54
2.3.4.2.3.4.1	Dosage des protéines	55
2.3.4.2.3.4.2	Dosage des oses totaux	56
2.3.5	Optimisation de la production d'EPS	57
2.3.5.1	Effet du pH et de la température	58
2.3.5.1.1	pH et température optimums de croissance	58
2.3.5.1.2	pH et température optimums de production d'EPS	58
2.3.5.2	Effet du milieu de culture	58
2.3.5.2.1	Effet des substrats carbonés	59
2.3.5.2.2	Effet des substrats azotés	59
2.3.5.2.3	Effet des substrats phosphatés	59
2.3.5.3	Effet du temps d'incubation	60
2.3.5.3.1	Cinétique de croissance	60
2.3.5.3.2	Cinétique d'acidification	60
2.3.5.3.3	Cinétique de production d'EPS	60
2.3.6	Caractérisation des monosaccharides	61
2.3.6.1	Hydrolyse des EPS	61
2.3.6.2	Vérification de l'efficacité de méthodes d'hydrolyse et identification des monosaccharides par CCM	62
2.3.6.3	Identification des monosaccharides par HPLC	64
2.3.7	Activité rhéologique sur lait	65
3.	Résultats et discussion	66
3.1	Isolement, confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique	67
3.2	Caractérisation physiologique et biochimique des bactéries lactiques	68
3.3	Caractérisation du profil de fermentation des carbohydrates	73
3.4	Recherche des souches productrices d'EPS	75

3.4.1	Etude qualitative	75
3.4.1.1	Examen visuel	75
3.4.1.2	Coloration au Rouge de Ruthénium	79
3.4.2	Etude quantitative	80
3.4.2.1	Mesure des viscosités	80
3.4.2.2	Rendement en EPS	83
3.5	Optimisation de la production d'EPS	87
3.5.1	Effet du pH et de la température	87
3.5.2	Effet du milieu de culture	90
3.5.2.1	Effet des substrats carbonés	91
3.5.2.2	Effet des substrats azotés	93
3.5.2.3	Effet des substrats phosphatés	96
3.5.3	Effet de la durée d'incubation	98
3.6	Identification des monosaccharides	101
3.7	Activité rhéologique sur lait	105
4.	Conclusion et perspectives	107
5.	Références bibliographiques	110
6.	Annexe	



Introduction

Dans un souci croissant des consommateurs envers la qualité des produits alimentaires disponibles sur le marché, des exigences de plus en plus rigoureuses sont recommandées quant à la qualité des ingrédients utilisés, et ont été enregistrées (**Agence canadienne d'inspection des aliments, 2014 in Arfaoui, 2014**).

Les consommateurs sont en quête perpétuelle de bien-être et ne cessent de vouloir préserver leur santé. L'industrie se doit de trouver de meilleures options afin de leur offrir des produits de qualité. Pour relever ce défi et répondre aux attentes du consommateur, les bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides (EPS) *in situ* pendant la fermentation sont une alternative de choix.

A l'aide de ces bactéries bénéficiant d'un statut GRAS (Generally Recognized As Safe), il est possible de fabriquer des produits laitiers fermentés avec un comportement rhéologique amélioré et en même temps de répondre à une forte demande des consommateurs pour des produits naturels sans additifs, suite à la production d'une large gamme de métabolites, tels que les acides organiques, les EPS, etc. (**Gaspar et al., 2013 ; Landeta et al., 2013**).

A l'heure actuelle, l'utilisation des EPS bactériens, couvre de vastes domaines qui vont de l'industrie alimentaire ou pharmaceutique à la récupération assistée du pétrole (**Ho, 2008**). Cette utilisation est basée principalement sur les aptitudes épaississantes, gélifiantes, stabilisantes et émulsifiantes des EPS afin d'améliorer la consistance et la texture des aliments (**Ruas-Madiedo et al., 2002a ; Welman et Maddox, 2003**).

De plus, les EPS confèrent des propriétés nutraceutiques (immunomodulatrices, anti-tumorales, anti-diabétiques, anti-obésités, anti-oxydantes et amélioration du transit digestif), qui sont fortement affectées par la structure chimique des EPS et la conformation de la chaîne (**Sanchez et al., 2006 ; Vinderola et al., 2006 ; Bruneton, 2009 ; Yang et Zhang, 2009 ; Liu et al., 2011 ; Wijeskara et al., 2011 ; Thakur et al., 2012 ; Ahmed et al., 2015, 2016**).

De ce fait, plusieurs industriels et chercheurs ont focalisé leurs travaux sur les EPS des bactéries lactiques, leur classification, leur composition chimique, leur structure, leur biosynthèse, leur ingénierie (**De Vuyst et al., 2001**), leurs effets sur les produits laitiers fermentés (**Hassan et al., 2003a ; Gentès, 2011**) ou sur les produits carnés (**Ho, 2008**), ainsi que sur le perfectionnement de la recherche biomédicale.

En outre, ces souches lactiques offrent la possibilité d'augmenter la viscosité du yoghourt et de diminuer la susceptibilité à la synérèse, ce qui est particulièrement intéressant pour les pays interdisant l'addition des gélifiants ou épaississants aux laits fermentés.

Considérés comme des stabilisants naturels et appartenant à la classe des fibres alimentaires, les EPS peuvent remplacer l'ajout de polysaccharides commerciaux utilisés actuellement tels que la gélatine (E441), l'amidon (E1401 et suivants), l'alginate (E400), le carraghénane (E407 ou E407a) ou certains dérivés de cellulose (E460 à 466) (**Cerning, 1990 ; Trachoo, 2002**).







Cependant, l'emploi des EPS des bactéries est encore marginalisé à cause de leur faible rentabilité de production, du coût élevé et du manque de méthodes simples et efficaces d'extraction et de purification ainsi que de la disponibilité d'autres stabilisants d'origine

végétale à faible coût (**Doleyres et al., 2005**). Ceux-ci représentent des inconvénients majeurs pour l'exploitation dans les produits fermentés, ce qui a retardé leur épanouissement dans le monde.

L'Union Européenne n'a en effet autorisé qu'en 2011 l'addition de dextrane produit par *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-521F dans les produits de boulangerie en tant qu'agent de texture, et ce à raison de moins de 5% en masse sur le produit fini. L'Amérique du Nord, particulièrement le Canada, a accepté leur usage et de ce fait, la demande pour des produits plus crémeux et onctueux s'accroît. L'Algérie reste encore loin à les commercialiser pour pouvoir percer sur le marché industriel car notre pays ne dispose pas de souches productrices d'EPS entièrement caractérisées et performantes.

Ce manuscrit comprend, en premier lieu, une revue bibliographique portant sur les bactéries lactiques, leurs intérêts en tant que productrices de biosubstances épaississantes (EPS), de façon générale, et plus précisément, sur les facteurs prépondérants dans la biosynthèse de ces biopolymères. En deuxième lieu, une étude expérimentale qui décrit les principales techniques appliquées en vue d'étudier les bactéries lactiques et leurs EPS, une troisième partie est réservée aux résultats obtenus au cours de ce travail et leur discussion. Finalement, une conclusion, qui récapitule les principaux résultats obtenus et, qui présente les perspectives que nous souhaitons envisager, plus tard, pour cette thématique de recherche.

Le présent travail consiste à isoler, à sélectionner des souches de bactéries lactiques productrices d'EPS les plus performantes, à évaluer leur conditions de biosynthèse ainsi qu'à valoriser leur caractère mucoïde et filant, offrant l'avantage de moduler les propriétés rhéologiques des produits fermentés, surtout laitiers, en tant qu'agents visqueux et gélifiants. Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectif de:

-  Isoler des souches de bactéries lactiques productrices d'EPS à partir de lait de chamelle et de viande rouge et revivifier celles de la collection du Laboratoire des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB).
-  Confirmer la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique en utilisant des méthodes classiques régulièrement appliquées au niveau de notre laboratoire.
-  Identifier ces souches en ayant recours à des tests classiques bactériologiques d'identification.
-  Mettre en évidence la production d'EPS en employant des méthodes qualitatives et quantitatives de détection afin de repérer les meilleurs isolats producteurs d'EPS.
-  Optimiser les conditions de production de ces biopolymères en étudiant l'effet des différents paramètres qui agissent sur cette biosynthèse.
-  Caractériser les monosaccharides constituant ces EPS à l'aide de techniques de chromatographie.



Déterminer l'existence d'une activité rhéologique de la part des EPS de nos souches dans le lait écrémé stérile.



Synthèse bibliographique

1.1 Les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries ubiquistes qui depuis longtemps se sont avérées utiles à l'homme. Celui-ci les a regroupées dans un ensemble dont le nom lui-même est évocateur de leur caractéristique métabolique principale : la production d'acide lactique. Leurs habitats sont extrêmement variés : lait, végétaux, peaux des animaux, eau de mer, eau douce, poisson, viande, excréments et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Kleerebezem *et al.*, 2003 ; Tettelin *et al.*, 2005 ; Makarova *et al.*, 2006 ; Bartlett *et al.*, 2007 ; Feldgarden *et al.*, 2009**). Cependant, elles sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...) (**Gálvez *et al.*, 2011**).

1.1.1 Propriétés des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes (**De Roissart, 1986**). Elles sont généralement mésophiles. Certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4.0-4.5 et certaines sont encore actives à pH 9.6 ou pH 3.2. Elles ont des tolérances très variables en sel. Elles survivent dans un milieu à faible activité d'eau (A_w), et résistent à l'éthanol (10-15% éthanol) et au CO₂ (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Ces bactéries sont capables de fermenter les sucres principalement en acide lactique. Certaines ont un métabolisme homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation sont de l'acide lactique) alors que d'autres ont un métabolisme hétérofermentaire facultatif (elles produisent l'acide lactique et l'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol, du diacétyle et du CO₂) (**Vandamme *et al.*, 1996**).

Elles peuvent être sous forme de bâtonnets ou de coques. Elles sont Gram⁺, immobiles, non sporulantes, anaérobies ou microaérophiles (**Carr *et al.*, 2002**). Elles sont dépourvues de catalase (certaines souches possèdent une pseudo catalase sur des milieux riches en hème), de nitrate réductase et de cytochrome oxydase (**Dellaglio *et al.*, 1994 ; Atlan *et al.*, 2008**). En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine (**Guiraud, 2003**).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les vitamines, les acides gras, les peptides, les bases puriques et les pyrimidiques (**Larpent, 1989 ; Novel, 1993 ; Prescott *et al.*, 1999**).

1.1.2 Taxonomie et classification des bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par **Orla-Jensen** au début du XXe siècle (**1919**), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini de point de vue

taxonomique (**Lahtinem et al., 2012**). En revanche, la description morphologique d'**Orla-Jensen (1919)** a constitué la base de la classification des bactéries lactiques.

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (**De Roissart et Luquet, 1994 ; Holzapfel et al., 2001**).

Cependant, l'apport des nouvelles approches de taxonomie bactérienne (phylogénie, génétique), a permis d'affiner cette classification (**Schleifer, 1987 ; Vandamme et al., 1996**), ce qui a conduit à regrouper les bactéries lactiques en 11 genres (**Stilles et Holzapfel, 1997**).

Les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (**Gevers, 2002**), qui demeurent pratiques dans l'identification préliminaire des microorganismes.

Par conséquent, les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), ainsi que la composition en bases Guanine+Cytosine (G+C) de l'ADN sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (**Holzapfel et al., 2001**). Le **tableau 1** présente différentes caractéristiques des bactéries lactiques dont quelques propriétés cellulaires et biochimiques ainsi que des informations génétiques.

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres bactériens comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Dortu et Thonart, 2008**).

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière. Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers (**Champagne, 1998 ; Langella et al., 2001**).

Tableau 1 : Caractéristiques de quelques bactéries lactiques.

Bactérie lactique	Propriétés cellulaires		Propriétés biochimiques			Informations génétiques		Référence
	Aspect	Habitat	T° optimale (°C)	CO ₂	Configuration acide lactique	% GC	Taille génome (Mpb)	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	bacille	intestin	37	-	D, L, (D+L)	59	2,1	(Suzuki <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A	bacille	intestin, tractus génital	37-41	-	D, L, (D+L)	60	2,3	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
<i>Carnobacterium</i> sp. AT7	bacille chaîne	viande, poisson	25-43	-	L	35	2,4	(Bartlett <i>et al.</i> , 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i> AR01/DG	coque isolé	intestin	37	-	L	37	2,8	(Feldgarden <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	bacille chaîne	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-42	+/-	D, L, (D+L)	46	2,9	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-41	+/-	D, L, (D+L)	51	2,1	(Morita <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPCe 4571	bacille	fromage	25-36	+/-	D, L, (D+L)	37	2,1	(Callanan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	bacille isolé	plantes, tractus gastrointestinal	25-35	+/-	D, L, (D+L)	44	3,3	(Kleerebezem <i>et al.</i> , 2003)
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	bacille chaîne	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-37	+/-	D, L, (D+L)	38	2	(Copeland <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-38	+/-	D, L, (D+L)	46	3	(Kankainen <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-39	+/-	D, L, (D+L)	41	1,9	(Chaillou <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-40	+/-	D, L, (D+L)	32	1,8	(Claesson <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	coque, chaîne, paire	lait, fromage, yaourt	40	-	L	35	2,4	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	coque isolé	viande, plante	20-30	+	D	38	1,8	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	coque isolé, chaîne, paire	viande, plante	40	+	D	37	2	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	coque isolé, chaîne	vin	17-25	+	D	37	1,8	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	tétrade*	viande, plante, fromage	30	-	D, L	37	1,8	(Makarova <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	coque isolé	peau	37	-	L	35	2,1	(Tettelin <i>et al.</i> , 2005)
<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	coque isolé	plante	30	+	D, (D+L)	37	1,9	(Qin <i>et al.</i> , 2009)

+ : Production de dioxyde de carbone (CO₂) / - : Absence de production de CO₂.
D : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D ; L : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L ; D+L : L'acide lactique est sous forme racémique.
* : Une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

En outre, le genre *Enterococcus* fait l'objet de nombreuses études en raison de sa position entre risque sanitaire et intérêt technologique (Giraffa, 2003). En effet, les espèces de ce genre peuvent participer à l'élaboration des caractéristiques sensorielles (Giraffa, 2003) mais elles ne sont pas reconnues sans risque et n'ont pas le statut de GRAS car elles possèdent des gènes codant pour des facteurs de virulence (Elsner *et al.*, 2000).

Les genres bactériens utilisés dans cette étude, sont indiqués comme suit :

1.1.2.1 Le genre *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Cette hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G+C qui peut varier de 32 à 53% (Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet *et al.*, 2005).

Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, capables de croître à des valeurs de pH entre 3 et 8 et sur une gamme de température allant de 2°C à 53°C et dont l'optimum est compris entre 30°C et 40°C et pour un pH de 5.5 à 6.2 (Salveti *et al.*, 2012).

Les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus ubiquitaires (Desmazeaud, 1992). Ils sont capables de coloniser des habitats très variés. Ils ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen (1919) en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004):

- **Groupe I** "*Thermobacterium*": comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *L. helveticus*, *L. delbrueckii* et *L. acidophilus*.

- **Groupe II** "*Streptobacterium*": regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles qui se développent à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sake* et *L. plantarum*.

- **Groupe III** "*Betabacterium*": ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *L. fermentum*, *L. buchneri* et *L. brevis*.

1.1.2.2 Le genre *Enterococcus* :

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type α et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *S. faecalis*) et ses variétés (*En. durans* et *En. bovis*) (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008).

Les enterocoques sont des coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol (Tamime, 2002 ; Paulsen *et al.*, 2003 ; Ho *et al.*, 2007). Ce sont des microorganismes anaérobies aérotolérants, oxydase et catalase négatives (Paulsen *et al.*, 2003).

Ils ont une température de croissance optimale de 35°C bien que la plupart des espèces de ce genre peuvent croître à des températures allant de 10 à 45°C. Ils peuvent aussi croître en présence de 6.5% de NaCl ou de 40% de bile et à pH 9.6 (De Roissart et Luquet, 1994). Ils survivent à un traitement de 60°C pendant 30°C (certaines exceptions existent quant à ces capacités). Ces caractères les distinguent des lactocoques.

1.1.2.3 Le genre *Streptococcus* :

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tels que *S. salivarius* et *S. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques utilisée en technologie alimentaire est *S. thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des "autres streptocoques", mais ensuite transférée au groupe des streptocoques oraux à cause du degré d'homologie de son ADN avec l'ADN de *S. salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

S. thermophilus se différencie par son habitat ; lait et produits laitiers ; et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet *et al.*, 2005). Cependant, cette bactérie est incapable de croître à des valeurs de pH supérieures à 9.6, à une concentration égale ou supérieure à 4% (p/v) de NaCl et en présence de 0.1% (p/v) de bleu de méthylène (Klaenhammer *et al.*, 2002).

1.1.2.4 Le genre *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram⁺ dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Les espèces du genre *Lactococcus* ont un métabolisme

homofermentaire et produisent exclusivement de l'acide lactique L(+) à partir du lactose (Dellaglio *et al.*, 1994).

Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les cellules de *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C. Ces bactéries sont aussi inaptées à croître en présence de 6.5% de NaCl, à pH 9.6 et sont thermosensibles (De Roissart et Luquet, 1994). Excepté l'espèce *Lc. garvieae*, elles ne sont pas hémolytiques.

Parmi les lactocoques, *Lc. lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Corroler *et al.*, 1998 ; Dalmasso *et al.*, 2008).

1.1.2.5 Le genre *Leuconostoc* :

La famille des *Leuconostocaceae* contient des cellules sphériques groupées en paires ou en chaînes, immobiles, non pigmentées, souvent lenticulaires (Devoyod et Poullain, 1988 ; González *et al.*, 2007).

Ces souches sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire et également par l'incapacité à hydrolyser l'arginine. Ce dernier caractère les distingue des lactobacilles hétérofermentaires (González *et al.*, 2007).

Les espèces de ce genre sont généralement non-acidophiles et préfèrent un pH du milieu initial entre 6 et 7 (Björkroth *et al.*, 2014). La température optimale de croissance de ce genre se situe entre 25°C et 30°C. Leur croissance est toujours lente. Les leuconostocs sont habituellement rangés dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio *et al.*, 1994).

Le développement de *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu suite à la formation des colonies mucilagineuses après synthèses d'exopolysaccharides (EPS) (Devoyod et Poullain, 1988 ; Guiraud, 2003).

Les études phylogénétiques de *Leuconostoc* montrent une diversité dans ce genre, qui comprend les quatre espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* (et ses trois sous espèces : ssp. *mesenteroides*, ssp. *cremoris* et ssp. *dextranicum*), *Ln. lactis*, *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (Collins *et al.*, 1993 ; Chenoll *et al.*, 2003 ; Eom *et al.*, 2007 ; Hu *et al.*, 2009).

Ces bactéries sont présentes dans de nombreux habitats naturels. Elles représentent notamment la microflore lactique dominante des végétaux frais. Les leuconostocs sont fréquemment impliqués dans la fabrication d'aliments composés de végétaux fermentés, l'espèce *Ln. mesenteroides* étant majoritaire en début de fermentation avant que des bactéries plus acidifiantes dominent par la suite (Dellaglio *et al.*, 1994).

1.1.2 Intérêts et applications des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Streit et al., 2007**).

■ Dans le domaine de l'agriculture, les bactéries lactiques sont utilisées comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. **Salawu et al. (2001)** et **Khuntia et Chaudhary (2002)** ont observé chez le bétail nourri avec ces fourrages une augmentation de 5 à 10% des performances zootechniques telles que la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière.

L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des équipes suggèrent un effet probiotique affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (**Weinberg et al., 2004 ; Gollop et al., 2005**).

■ Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des microorganismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par l'amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées en industrie laitière sont *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (**Salminen et al., 2004**).

Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-sociales chez le nourrisson, des propriétés anti-cancérogènes, anti-hypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori*, ou le traitement de dysfonctionnements intestinaux (**Rodriguez et al., 2003**).

■ En industrie laitière, elles interviennent essentiellement dans la fabrication des laits fermentés tels que le yogourt, le fromage, le beurre, le babeurre, le kéfir et le koumiss et ce via l'amélioration de la conservation, de la texture et de la saveur (**Drouault et Corthier, 2001**).

De ce fait, elles contribuent à développer les qualités organoleptiques des produits laitiers par la formation de l'acide lactique, l'acétaldehyde, le diacétyle, les peptides et les acides aminés, qui sont des précurseurs d'arômes (**Samarzija et al., 2001**). Ceci s'opère via le catabolisme des acides aminés, considéré comme la voie majeure de la formation de molécules aromatiques dans les produits laitiers fermentés.

Certaines souches présentent une activité antibactérienne et l'application de souches lactiques bactériocinogéniques qui leur permettent de se placer comme bio-conservateurs (**Erkkilä et**

al., 2001; Nieto-Lozano *et al.*, 2002 ; Dicks *et al.*, 2004 ; Todorov *et al.*, 2007 ; Settanni et Corsetti, 2008).

Les bactéries lactiques ont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ou améliorer la fermentation de nombreux aliments comme la choucroute, les saucisses ou les olives vertes, grâce à leurs propriétés d'acidification et de production de polysaccharides (Settanni et Corsetti, 2008).

*L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Dans la fabrication des produits carnés fermentés, les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone. Par conséquent, l'amélioration des propriétés d'ordre physicochimiques et microbiologiques de la viande en inhibant le développement d'espèces pathogènes ou d'altération et en améliorant de la texture, la couleur et la flaveur du produit carné fermenté (Hugas et Monfort, 1997; Bozkurt et Erkmen, 2002 ; Papamanoli *et al.*, 2003 ; Klingberg *et al.*, 2005 ; Visessanguan *et al.*, 2006 ; Béal *et al.*, 2008 ; Drider et Prevost, 2009).

*En ce qui concerne l'activité polysaccharidique, plusieurs études ont rapporté l'isolement et l'analyse des souches de bactéries lactiques, notamment *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, ayant la capacité de produire les EPS (Tableau 2) (Grobben *et al.*, 1998 ; Duboc et Mollet, 2001; Zajsek *et al.*, 2013). Ces substances sont importantes pour la structure des produits laitiers fermentés car elles représentent un intérêt technologique et économique majeur de par leurs propriétés stabilisantes, gélifiantes et épaississantes (Cerning, 1990 ; Canquil *et al.*, 2007 ; Ai *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Exemples d'utilisation des bactéries lactiques en industrie alimentaire (Romain, 2011).

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Lait, Viande, Végétaux, Céréales	Yaourts, lait s fermentés, kéfirs, fromages Saucissons secs, jambons secs Choucroute, olives, « yaourts » au lait de soja Pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux, Lait	Choucroute, olives, vin Fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	Végétaux, Viande	Choucroute Saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourts, lait s fermentés, fromages

1.2 Les exopolysaccharides :

1.2.1 Généralités sur les EPS des bactéries lactiques :

Les EPS sont produits par de nombreuses espèces de bactéries provenant de diverses niches écologiques (**Badel *et al.*, 2011**). En raison de leur forte production, une grande partie des recherches sur les EPS s'est concentrée sur les bactéries à Gram⁻ (**Ricciardi et Clementi, 2000**). Ces bactéries ne sont pas reconnues comme étant de grade alimentaire et le processus d'approbation de leur EPS est long.

Par contre, les bactéries lactiques sont reconnues comme GRAS ce qui rend leurs EPS très intéressants pour l'industrie agroalimentaire (**De Vuyst *et al.*, 2001**).

Ces bactéries lactiques sont capables au cours de leur métabolisme de synthétiser des polysaccharides de surface. Les polysaccharides sont soit des constituants de la paroi, soit excrétés à l'extérieur de la cellule. De tels polysaccharides sont appelés polysaccharides exocellulaires ou encore EPS, terme proposé tout d'abord par **Sutherland (1972)** puis repris par **Cerning *et al.* (1992)** comme appellation générale.

1.2.2 Diversité structurale :

Les EPS sont des glucides constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et/ou de dérivés de glucides avec beaucoup d'embranchement, ce qui se traduit par une grande diversité structurale.

En effet, deux molécules identiques de sucre simple peuvent former onze disaccharides différents, alors que deux acides aminés identiques ne peuvent constituer qu'un seul di-peptide. A cette illustration, il peut s'y ajouter : la diversité des sucres simples composant les EPS (glucose, mannose, acide glucuronique, rhamnose, galactose, xylose), le nombre des sucres simples, la configuration absolue du sucre (D ou L), la configuration anomérique (α ou β) et la forme cyclique. Les molécules d'EPS peuvent également adopter des structures d'ordre supérieur, par exemple, les molécules de xanthane qui seraient organisées en hélices double-brin antiparallèles (**Lemoine *et al.*, 1997 ; Marshall *et al.*, 2001 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a ; Säwen *et al.*, 2010**).

Les résidus monosaccharidiques sont reliés entre eux par des liens glycosidiques formant par l'élimination d'une molécule d'eau entre le groupe hémiacétal hydroxyle de l'extrémité de l'un et le groupe hydroxyle primaire ou secondaire du résidu suivant. Le groupement hydroxyle peut être dérivé par estérification et être présent sous forme d'acétate, de sulfate ou de phosphate.

1.2.3 Relation structure-fonction des EPS :

Malgré les effets bénéfiques des EPS sur les produits laitiers fermentés, aucune corrélation n'a été démontrée entre de tels effets et la quantité d'EPS produite (**Van Marle et Zoon, 1995 ; Bouzar et al., 1997 ; Sebastiani et Zelger, 1998 ; Ruas-Madiedo et De los Reyes-Gavilan, 2005 ; Purwandari et al., 2007**).

Plusieurs études portant sur l'effet de ces polymères sur les propriétés rhéologiques/physiques de produits laitiers fermentés tendent à démontrer que la concentration en EPS ne serait pas le facteur déterminant pour moduler les propriétés rhéologiques/physiques de ces produits fermentés (**De Vuyst et al., 2003 ; Doleyres et al., 2005**).

La fonctionnalité des EPS serait plutôt reliée aux caractéristiques structurales des EPS ainsi qu'à leurs interactions avec les autres constituants du milieu comme les protéines. Le poids moléculaire (**Faber et al., 1998 ; Petry et al., 2003**), la conformation (flexibilité et ramification) de la chaîne (**Tuinier et al., 2001**) et la charge (**Girard et Schaffer-Lequart, 2007a ; Ayala-Hernandez et al., 2009 ; Turgeon et Plesca, 2009**) des EPS influenceraient les propriétés rhéologiques/physiques des produits laitiers fermentés. La relation structure-fonction des EPS produits par des bactéries lactiques est présentée au **tableau 3**.

1.2.3.1 Effet du poids moléculaire :

Le poids moléculaire constitue un facteur important qui détermine les propriétés fonctionnelles des EPS, en particulier leur capacité viscosifiante (**Laws et Marshall, 2001**). La viscosité intrinsèque de l'EPS est directement proportionnelle à sa masse moléculaire et à son rayon hydrodynamique (**Kleerebezem et al., 1999**).

Tuinier et al. (2001) ont étudié l'effet du poids moléculaire, de la rigidité et de la ramification d'EPS purifiés produits par *Lc. lactis* ssp. *cremoris*. La valeur de viscosité intrinsèque était plus faible dans le cas de l'EPS de plus faible poids moléculaire.

Dans une autre étude, la viscosité des laits fermentés semblait également être positivement corrélée avec une augmentation du poids moléculaire de l'EPS (**Faber et al., 1998, 2001**), qui ont étudié deux souches de *S. thermophilus* produisant des EPS aux caractéristiques structurales identiques sauf pour le poids moléculaire. Des différences significatives de viscosité ont été remarquées : des valeurs plus élevées ont été mesurées avec l'EPS de haut poids moléculaire comparativement à l'EPS de plus faible poids moléculaire. Également une étude assez récente de **Mende et al., 2013**, a montré que le poids moléculaire contribue à la rigidité et à la viscosité apparente du lait acidifié.

1.2.3.2 Effet de la conformation de la chaîne :

Une structure spécifique d'EPS n'est pas nécessairement reliée à des valeurs absolues de texture et de viscosité. La longueur et le degré de ramification de la chaîne affectent les propriétés rhéologiques/physiques des produits laitiers fermentés.

Pour un poids moléculaire donné, les polysaccharides linéaires ont tendance à s'étendre en solution et occuper un volume plus grand que les polysaccharides ramifiés qui sont capables de se compacter et ainsi occuper un petit volume dans la solution (**Whistler et BeMiller, 1997**). Toutefois, ils vont contribuer à augmenter la viscosité des solutions (**Whistler et BeMiller, 1997**).

La rigidité de la chaîne peut avoir un effet sur la viscosité, **Tuinier et ses collaborateurs (2001)** ont mis en évidence une corrélation positive entre la rigidité de la chaîne de l'EPS produit par *Lc lactis* ssp. *cremoris* et la viscosité intrinsèque.

Il est à remarquer qu'un EPS est considéré rigide si sa chaîne présente une mobilité réduite autour de certaines liaisons grâce aux certains types de liens dont les plus rencontrés dans les EPS des bactéries lactiques sont " $\beta(1-4)$ " et " $\alpha(1-3)$ " (**Whistler et BeMiller, 1997 ; Tuinier et al., 1999 ; De Vuyst et al., 2001 ; Laws et Marshall, 2001**).

D'autres liaisons telles que " $\beta(1-3)$ ", " $\beta(1-5)$ ", " $\beta(1-6)$ ", " $\alpha(1-2)$ ", " $\alpha(1-4)$ " et " $\alpha(1-6)$ " peuvent aussi exister dans les EPS produits par certaines bactéries lactiques (**De Vuyst et al., 2001**). Les liaisons " $\beta(1-4)$ " donnent une plus grande rigidité à la chaîne comparé aux liaisons " $\beta(1-2)$ " et " $\beta(1-3)$ " alors que les liaisons α donnent des chaînes plus flexibles que les liaisons β (**Tuinier et al., 1999 ; Laws et Marshall, 2001**).

1.2.3.3 Effet de la charge :

La plupart des EPS sont à caractère non ionique. Toutefois, certaines souches de bactéries lactiques produisent des EPS anioniques dû à la présence de charges négatives sur certains groupements carboxyliques et/ou phosphates (**Goh et al., 2005**).

Ces polysaccharides anioniques peuvent former des interactions attractives (liaisons électrostatiques) avec les caséines chargées positivement à pH acide et ainsi, augmenter la fermeté du gel. Tandis qu'un polysaccharide neutre aura tendance à se dissoudre plus facilement dans le lactosérum (**Robijn et al., 1995 ; van den Berg et al., 1995 ; Robijn et al., 1996 ; Girard et Schaffer-Lequart, 2007b, 2008**).

De ce fait, **Girard et Schaffer-Lequart** en (**2007b**) et (**2008**) ont étudié l'effet des EPS ajoutés dans le lait avant acidification sur la formation et les propriétés finales du gel laitier. Ils ont observé un pH de gélification élevé avec les EPS anioniques dû aux fortes interactions de déplétion entre les caséines et les EPS tous les deux chargés négativement. Un résultat similaire a été obtenu par **Tuinier et al. (2001)** et **Laneuville et Turgeon (2014)**.

Tableau 3 : Relation structure-fonction des EPS aux caractéristiques structurales connues et produits par des bactéries lactiques (**Gentès, 2011**).

Souches ^A	État des EPS ^B	Milieu et condition de culture	Propriété rhéologique ou physique	Caractéristique structurale ^C			Référence
				Rigidité et ramification	Poids moléculaire	Charge	
<i>L. rhamnosus</i> (1)	Purifié	Lait écrémé (10 %) 10 h, 30°C	Formation de gel	n.d.	n.d.	+	Turgeon et Plesca, 2009
			Module élastique	n.d.	n.d.	+	
			Synérèse	n.d.	n.d.	+/-	
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> (2)	Purifié	Perméat de lactosérum enrichi, 20 h, 30°C	Viscosité intrinsèque	+	+	n.d.	Tuinier et al., 2001
<i>L. sakei</i> (1)	Purifié	Milieu semi-défini 48 h, 20°C	Viscosité	n.d.	=	+	van den Berg et al., 1995
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (3)	<i>In situ</i>	Lait écrémé (11 %) 10 h, 25 ou 40°C	Formation de gel	n.d.	n.d.	+	Girard et Schaffer-Lequart, 2007a
			Résistance aux cisaillements	=	n.d.	+	
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (3)	<i>In situ</i>	Lait écrémé (10 %) 25 h, 42°C	Viscosité	n.d.	+	n.d.	Petry et al., 2003
<i>S. thermophilus</i> (2)	<i>In situ</i>	Lait écrémé (12 %) 16 h, 32°C	Viscosité	=	+	=	Farber et al., 1998
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> (1)	<i>In situ</i>	Perméat de lait enrichi 12 h, 30°C	Module élastique	n.d.	n.d.	+	Ayala-Hernandez et al., 2009
			Viscosité	n.d.	n.d.	+	

^AS = *Streptococcus*, L = *Lactobacillus*, Lc = *Lactococcus* et le chiffre entre parenthèse correspond au nombre d'EPS qui ont été comparés.
^BL'état des EPS réfère à leur utilisation dans le milieu soit sous forme purifiée ou produit *in situ*.
^CLes abréviations signifient : effet positif (+), effet négatif (-), pas d'effet (=) ou effet non mesuré (n.d.) sur les propriétés rhéologiques/physiques.

1.2.4 Rôles et utilisations des EPS :

Les rôles si diversifiés des EPS reviennent à la diversité de leurs structures qui représente donc une riche source de polymères possédant des propriétés fonctionnelles variées qui peuvent servir dans une multitude d'applications industrielles.

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser ces EPS joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (**Ruas-Madiedo et al., 2002a ; Welman et Maddox, 2003**). Ces composés polymères sont reconnus pour augmenter la viscosité et diminuer la synérèse des produits laitiers fermentés (**Sutherland, 1998 ; Kleerebezem et al., 1999 ; Laws et Marshall, 2001**).

Behare et al. (2010) ont comparé l'effet d'une souche de *S. thermophilus* IG16 produisant des polysaccharides capsulaires (CPS) et des EPS libres (filants) sur la flaveur, la couleur et l'apparence du lassi, produit laitier Indien semblable au yogourt, par rapport à une souche non productrice d'EPS. Ils ont constaté que la présence d'EPS a permis d'améliorer significativement la flaveur, l'apparence et la couleur du lassi tout en réduisant la synérèse. Un tel effet a été démontré par **Hassan (2008)**, qui a rapporté que les EPS peuvent d'autant plus se retrouver dans le lactosérum pour ainsi le lier et le retenir dans le produit, ce qui augmente la rétention d'eau et diminue la tendance à la synérèse.

Les EPS contribueraient également à protéger les bactéries lactiques contre les environnements hostiles et/ou toxiques, l'attaque des phages, les composés antibiotiques, le stress osmotique, la séquestration de certains cations essentiels ainsi que la reconnaissance cellulaire (**Ruas-Madiedo et al., 2002a ; Broadbent et al., 2003**).

Il semble qu'il existe une relation entre l'encapsulation de la bactérie et les phénomènes de virulence. En augmentant l'hydrophobicité de la surface bactérienne, la capsule diminue sa disposition à être absorbée par les neutrophiles. **Zhang et al. (2013)** ont démontré l'importance des EPS de l'espèce *L. plantarum* C88 isolés du tofu fermenté traditionnel Chinois, dans la capacité de résister au peroxyde d'hydrogène et dans l'activité de capture des radicaux (tels le radical hydroxyle et le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl "DPPH" libre), *in vitro* et la capacité d'amélioration du statut antioxydant des souris soumises à une souche oxydante induite par D-galactose, *in vivo*.

Certaines études suggèrent que les EPS ont la capacité de faciliter la colonisation et la contribution à la formation de biofilms suite à l'adhésion des bactéries entre elles ou aux tissus de l'hôte tout en formant une matrice isolante. De ce fait, ils assurent un rôle de barrière protectrice et sélective en laissant passer les nutriments et en excluant les molécules antimicrobiennes comme certains antibiotiques ou désinfectants (**Looijesteijn et al., 2001 ; Xue et al., 2013**).

C'est le cas de la souche multirésistante de *Staphylococcus aureus*, à l'origine d'infections nosocomiales graves, qui se multiplie en biofilm (**Brady et al., 2011**). Les bactéries peuvent ainsi se multiplier afin de persister et de coloniser les tissus de l'hôte et également procéder à des échanges de matériel génétique de par leur proximité (**Wolcott et al., 2013**).

Ces dernières années, plusieurs études ont suggéré l'effet bénéfique sur la santé des EPS produits par quelques souches probiotiques. Ces biopolymères pourraient contribuer à la santé des consommateurs en tant que prébiotiques ou par leur effet anti-tumoral, anti-ulcère, anti-inflammatoire, immunomodulateur ou anti-cholestérolémique (**De Vuyst et Degeest, 1999 ; Ruas-Madiedo et al., 2002a ; Sanchez et al., 2006 ; Vinderola et al., 2006 ; Bruneton, 2009 ; Yang et Zhang, 2009 ; Liu et al., 2011 ; Wijeskara et al., 2011 ; Thakur et al., 2012**).

*L'activité anti-tumorale a été montrée avec *Lc. lactis* ssp. *cremoris* KVS20 et leur EPS, qui augmentait le pouvoir cytotoxique des macrophages (**Kitazawa et al., 1991**). En plus, **Zubillaga et al. (2001)** ont observé un retardement de la croissance des cellules cancéreuses par l'EPS KGF-C soluble dans l'eau et extrait de grains de kéfir.

*En ce qui concerne l'immunoréactivité des EPS, **Górska-Frączek et al. (2013)** ont détecté par le test immuno-enzymatique ELISA cette réactivité en employant des anticorps de lapins issus d'une immunisation directe avec les bactéries *L. johnsonii* 142 et 151, *L. animalis murinus* 148, *L. reuteri* 115 et *L. casei* 0912. L'EPS de la souche *L. johnsonii* 151 réagit avec le sérum polyclonal anti-*Lactobacillus* contre les cellules de toutes les souches citées auparavant sauf le sérum contrôlé pris avant immunisation (**Vinderola et al., 2006**).

En outre, il est possible d'évaluer ces polymères pour montrer qu'ils sont des vaccins potentiels (**Sutherland, 1990**). L'antigénicité de ces polysaccharides dépend de leurs compositions osidiques, de leurs masses molaires et de leurs conformations en solution. La réponse des anticorps est donc spécifique d'une structure osidique donnée pour une espèce bactérienne précise. Actuellement, les vaccins sur le marché concernent par exemple les sérogroupes A, C et Y de méningocoques ou les vaccins multivalents pour *S. pneumoniae*.

1.2.5 Classification des EPS :

Quel que soit l'origine de polysaccharides produits (végétale, microbienne ou algale), ils sont classés selon plusieurs critères :

La localisation dans la cellule :

(i) Le premier groupe rassemble les polysaccharides du cytosol, ils servent de source de carbone et d'énergie à la cellule (**Nicklin et al., 1999 ; Deltre, 2005**),

(ii) Le second groupe concerne les constituants de la paroi (polysaccharides structuraux) tels que les acides téichoïques, les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 1**) (**Nicklin et al., 1999 ; Deltre, 2005**),

(iii) Le troisième groupe réunit les polysaccharides excrétés à l'extérieur des cellules, qui peuvent être divisés en deux groupes (**Figure 1**) :

a) Les polysaccharides capsulaires (CPS) sont liés par des liaisons covalentes à la surface de la paroi des cellules sous forme de capsule (**Cerning, 1995 ; Boels et al., 2001 ; Macedo et al., 2002b ; Walling et al., 2005 ; Topisirovic et al., 2006 ; Canquil et al., 2007 ; Ai et al., 2008**).

b) Les exopolysaccharides (EPS) ne sont pas attachées à la surface cellulaire mais ils sont libérés et excrétés dans l'environnement (**Cerning, 1995 ; Boels et al., 2001 ; Macedo et al., 2002b ; Walling et al., 2005 ; Topisirovic et al., 2006 ; Canquil et al., 2007 ; Ai et al., 2008**).

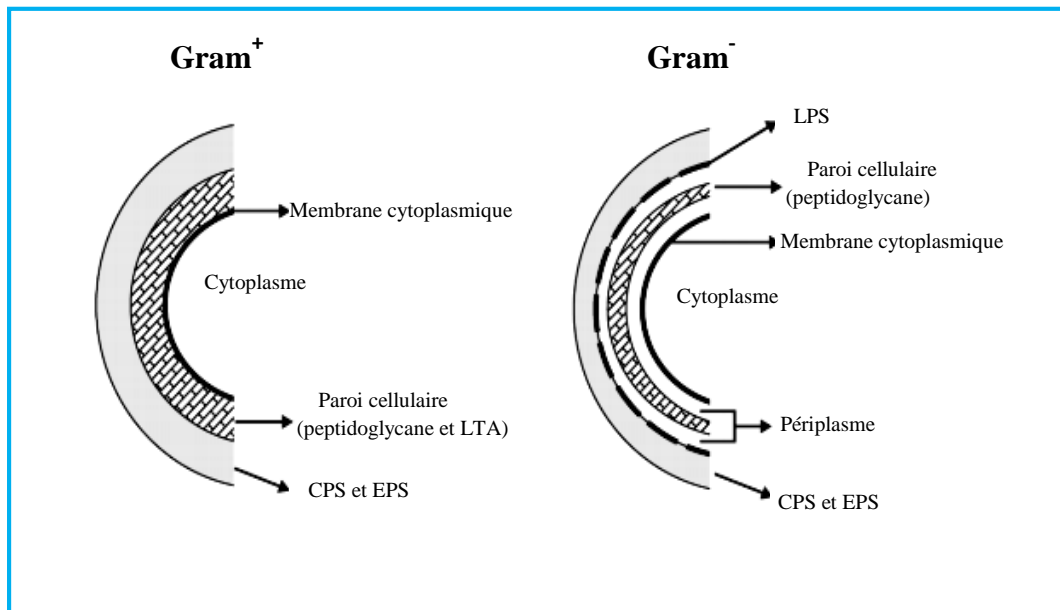


Figure 1 : Localisations cellulaires des polysaccharides produits par les bactéries à Gram⁻ et à Gram⁺ (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005).

LTA : acide lipotéichoïque ; LPS : lipopolysaccharide ; CPS : polysaccharide capsulaire ; EPS : exopolysaccharide.

Techniquement, cette différenciation par la localisation entre CPS et EPS peut s'avérer délicate (Cerning *et al.*, 1992 ; Cerning, 1995). Elle est souvent très floue. En revanche, les EPS se différencient des CPS par la mise en jeu de liaisons faibles de type hydrogène et électrostatiques, non covalentes. Et donc, ils peuvent être séparés des cellules par simple centrifugation contrairement aux CPS (Whitfield, 1988 ; Cerning *et al.*, 1992 ; Cerning, 1995 ; Branda *et al.*, 2005).

🚩 La composition chimique :

Devant la grande diversité de compositions et de structures des EPS, il est difficile d'établir une classification de ces molécules complexes. Néanmoins, dès 1972, Sutherland propose une classification établie selon la nature de leurs composants. Deux classes sont alors définies : les homopolysaccharides (HoPS) et les hétéropolysaccharides (HePS).

(i) **Homopolysaccharides :** Les HoPS consistent en des unités répétitives d'un seul type de monosaccharides (D-glucose ou D-fructose) dont le poids moléculaire élevé est de 2.7 à 21.6x10⁶Dalton (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a). Plusieurs genres bactériens peuvent produire un ou plusieurs de ces polysaccharides : *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* (Jeanes *et al.*, 1956 ; Adeyeye *et al.*, 1988 ; Llaubères *et al.*, 1990 ;

Dueñas-Chasco *et al.*, 1995, 1997, 1998 ; Monsan *et al.*, 2001 ; Kralj *et al.*, 2002 ; Bounaix *et al.*, 2009).

Les HoPS se composent de quatre sous-groupes:

a) α -D-glucanes: composés particulièrement de résidus α (1-6) glucose ou quelques résidus α (1-3) glucose. Les degrés de branchements sont variables. Les principales souches productrices de ce type d'EPS sont : *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et ssp. *dextranicum* (dextrane) et *S. mutans* (mutane) (**Figure 2**).

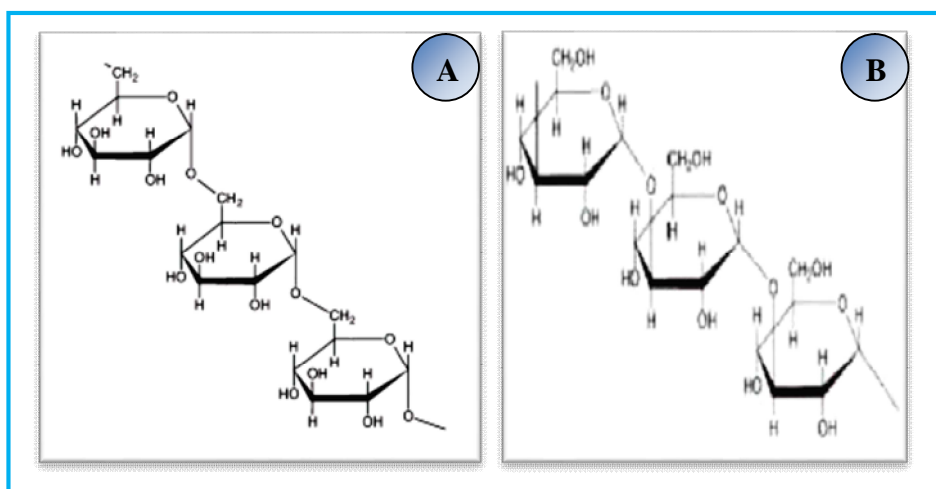


Figure 2 : Structure d'HoPS (Monsan *et al.*, 2001 ; Van Calsteren *et al.*, 2002).

A : dextrane ; B : mutane.

b) β -D-glucanes : composés de résidus β (1-3) glucose avec des branchements en β (1-2). Ils sont produits par *Pediococcus* et *Lactobacillus* (glucane).

c) Fructanes : composés de résidus β (2-6) D-fructose. Ils peuvent avoir de branchements β (2-1), un exemple de ce type d'EPS est le levane de *S. salivarius*.

d) Autres : composés d'unités de sucres structurellement identiques et répétées avec des liens glycosidiques différents comme le polygalactane. Le **tableau 4** indique les principaux HoPS bactériens.

Tableau 4 : Exemples d'HoPS bactériens (Lamothe, 2000).

Nom	Type de polysaccharide	Souche productrice
Cellulose	β -glucane	<i>Acetobacter xylinum</i>
Dextrane	α -glucane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Mutane	α -glucane	<i>Streptococcus mutans</i>
Pullulane	α -glucane	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Inuline	β -frutane	<i>Streptococcus mutans</i>
Levane	β -frutane	<i>Streptococcus salivarius</i>
Polygalactane	Autre	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>

(ii) **Hétéropolysaccharides** : Les HePS sont formés de plusieurs sous-unités répétées constituées chacune de trois à huit monosaccharides, dont les liaisons osidiques ainsi que le pourcentage de ramification sont variables (**Figure 3**). Les EPS sont souvent des biopolymères de très grande masse moléculaire allant de 10^4 à 10^6 Dalton (Kleerebezem *et al.*, 1999 ; De Vuyst *et al.*, 2001 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b ; Behare *et al.*, 2009).

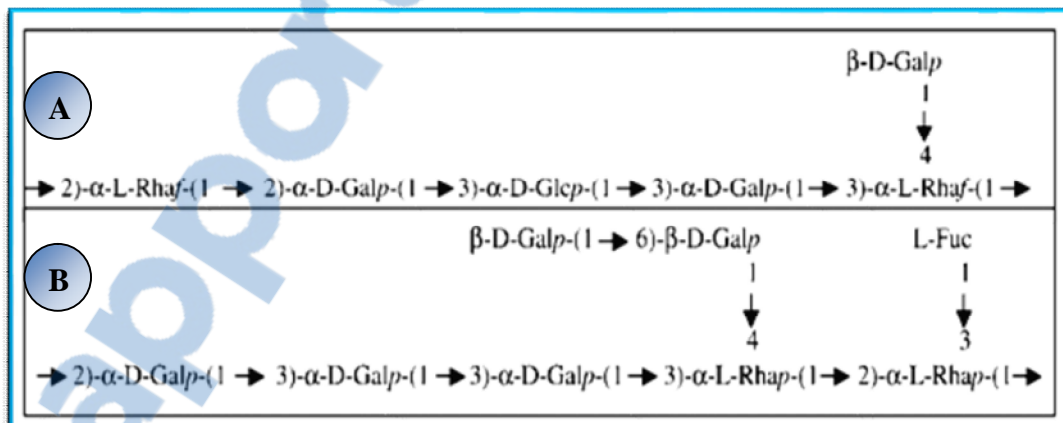


Figure 3 : Composition et structure du motif répété de l'EPS par *S. thermophilus* Sfi39 (A) et *S. thermophilus* MR-1C9 (B) (Lemoine *et al.*, 1997 ; Marshall *et al.*, 2001).

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; GalNAc : N-acétyl-D-galactose ; Glc : glucose ; Rha : rhamnose ; Ac,O-acétyl groupe ; *p* : pyranose configuration et *f* : furanose configuration.

Leur composition, beaucoup plus diversifiée que celle des HoPS bactériens, inclue des oses neutres (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose), acides (acide glucuronique, acide galacturonique, etc.) ou encore aminés (N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-galactosamine).

La plupart de ces résidus sont également présents chez les animaux et les végétaux. Les EPS de ces cellules eucaryotes se distinguent par la production, dans certains cas, de pentoses comme le D-ribose ou le D-xylose, qui sont beaucoup moins fréquents dans les polysaccharides dérivés des procaryotes (**Sutherland, 1990**). Ces pentoses ont un grand intérêt industriel et cosmétique.

Les HePS sont, par ailleurs, fréquemment sujets à des additions de substituants organiques (exemples : acides aminés, pyruvate) ou inorganiques (exemples : sulfate, phosphate) qui leur confèrent des propriétés physiques et biologiques supplémentaires et augmentent leur diversité. **Nichols** a établi dans sa revue, une liste des composants saccharidiques ou autres des EPS bactériens (**Tableau 5**) (**Nichols et al., 2005**).

Tableau 5 : Composition des EPS bactériens (**Nichols et al., 2005**).

Type	Composé	Exemple	Type de liaison
Sucres	Pentoses	D-Arabinose D-Ribose D-Xylose	
	Hexoses	D-Glucose D-Mannose D-Galactose D-Allose L-Rhamnose L-Fucose	
	Sucres aminés	D-Glucosamine D-Galactosamine	
	Acides uroniques	Acide Glucuronique Acide Galacturonique	
Autres	Acide acétique		O-Acyl, N-Acyl
	Acide succinique		O-Acyl
	Acide pyruvique		Acétal
	Acide phosphorique		Ester, Diester
	Acide sulfurique		Ester

Les bactéries lactiques mésophiles comme *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* et *L. casei* ou les bactéries thermophiles comme *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* sont connues pour leur synthèse d'HePS (**Nguyen et Nguyen, 2013**). Le **tableau 6** montre des exemples de souches bactériennes productrices d'HePS.

Tableau 6 : Exemples d'HePS procaryotes (Lamothe, 2000).

Polysaccharides	Souche productrice
Acetane	<i>Acetobacter xylinum</i>
Alginate	<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Gellane	<i>Pseudomonas elodea</i>
Acide hyaluronique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus sp.</i> Groupes A et C
Succinoglycane	<i>Rhizobium meliloti</i>
Xanthane	<i>Xanthomonas campestris</i>
CPSs	<i>Erwinia sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Haemophilus sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus sp.</i> Etc.
EPSs	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , etc.

Il est à noter qu'une tentative a été faite pour dissocier les EPS des bactéries lactiques mésophiles selon leur composition en monomères. Quatre groupes principaux ont été distingués (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005) :

- EPS contenant seulement le galactose,
- EPS contenant le galactose et le glucose,
- EPS contenant le galactose, le glucose et le rhamnose,
- Autres (sucres aminés et acides).

✚ L'EPS produit :

Certaines bactéries lactiques peuvent produire deux types de polysaccharides (CPS et EPS) tandis que d'autres produisent juste l'un des deux (Cerning *et al.*, 1992 ; Hassan *et al.*, 2003b, 2008).

La production d'EPS est souvent associée à l'expression du "caractère filant". Le caractère filant dans les laits fermentés est caractérisé par la tendance du produit fermenté à former des fils quand il est brassé et tiré par une aiguille ou une cuillère.

Selon leurs capacités à produire des EPS, les souches ont été classées en filantes ou non filantes (Hassan, 2008). De ce fait, un produit non filant n'est guère une preuve d'absence de production d'EPS. Cependant, Van Marle et Zoon (1995) ont observé que certaines souches de bactéries lactiques non filantes produisaient des quantités importantes d'EPS qui ont dépassé celles produites par certaines souches filantes.

Hassan (2008) a proposé une classification des bactéries lactiques en fonction de la forme d'EPS produit en quatre groupes (**Figure 4**) :

- a) Groupe I: des souches filantes qui produisent des CPS et des EPS libres;
- b) Groupe II: des souches filantes qui produisent seulement des EPS libres;
- c) Groupe III: des souches non filantes qui produisent des CPS et des EPS libres;
- d) Groupe IV qui n'est pas encore confirmé et incluant des souches non filantes produisant seulement des EPS libres.

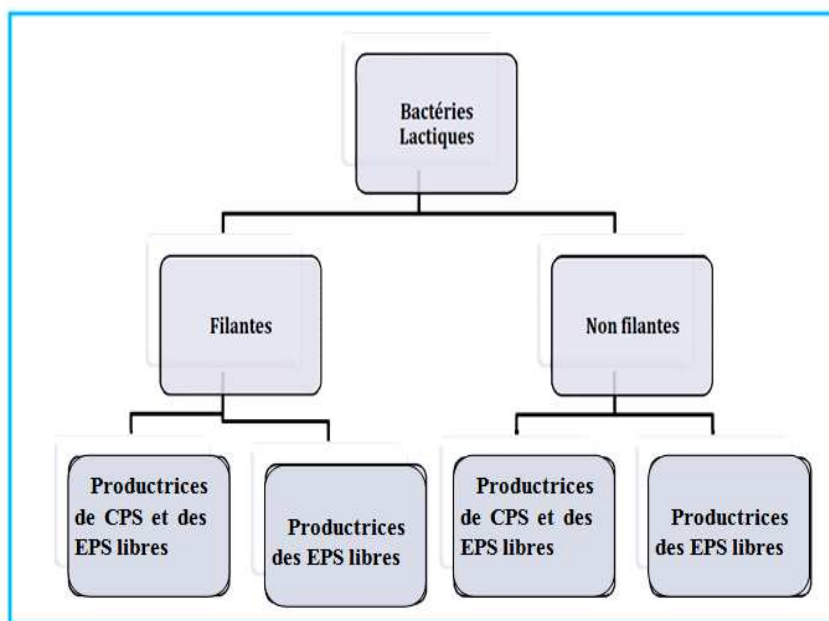


Figure 4 : Classification des bactéries lactiques selon le type d'EPS produit (**Hassan, 2008**).

1.2.6 Facteurs essentiels affectant la biosynthèse des EPS :

Selon de nombreux auteurs, la production d'EPS dépend, principalement, de la souche, du taux de croissance, de la température d'incubation, du milieu de culture, de la vitesse d'acidification, du pH et de la quantité d'oxygène requis dans le milieu de culture (**Ricciardi et Clementi, 2000** ; **Looijesteijn et al., 2001** ; **Guzel-Seydimet al., 2005** ; **Behare et al., 2009** ; **Ismail et Nampootheri, 2010**).

Ces paramètres peuvent influencer la quantité mais aussi la composition et la taille des EPS (**Cerning, 1990** ; **Vaningelgem et al., 2004**). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés concernant l'influence de ces paramètres sur la production des EPS.

Parmi les facteurs influençant la synthèse d'EPS par les bactéries lactiques, nous citons :

1.2.6.1 Effet de la souche bactérienne et du stade de croissance :

La production des EPS par les bactéries lactiques est en fonction de la souche étudiée, elle peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien. Leur biosynthèse et leur sécrétion peuvent avoir lieu durant des phases de croissance différentes (**Degeest et De Vuyst, 1999 ; Degeest et al., 2001 ; Lebeer et al., 2007a,b**).

Certaines bactéries les synthétisent durant toutes les étapes de croissance tandis que d'autres ne les produisent qu'en fin de phase exponentielle ou au stade stationnaire (**Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005**). La relation entre la croissance bactérienne et la production d'EPS est complexe et dépend du flux de carbone intracellulaire de la glycolyse, des conditions de culture ainsi que des espèces et des souches productrices.

1.2.6.2 Effet du milieu de culture :

La composition du milieu de culture influence la production d'EPS. Au début des recherches sur la production des EPS par les bactéries lactiques, aucune production n'a été observée dans des milieux semi-définis comme le MRS (**De Man et al., 1960 ; Cerning et al., 1992 ; De Vuyst et al., 1998 ; Ruas-Madiedo et al., 2005 ; Behare et al., 2009**).

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le lait (**Cerning et al., 1986, 1988, 1990 ; Garcia-Garibay et Marshall, 1991 ; Cerning et al., 1992 ; De Vuyst et al., 1998 ; Behare et al., 2010 ; Tidona et al., 2016**) ou dans un milieu à base du lactosérum (**Gassem et al., 1997 ; Macedo et al., 2002a, b**).

Des milieux semi-synthétiques et synthétiques ont aussi été utilisés (**Cerning et al., 1994 ; Grobбен et al., 1995 ; van den Berg et al., 1995 ; Grobбен et al., 1996 ; Grobбен et al., 1997 ; Kimmel et Roberts, 1998 ; Dupont et al., 2000 ; Grobбен et al., 2000 ; Petry et al., 2000 ; Pham et al., 2000 ; Torino et al., 2000**). En effet, un milieu chimiquement défini est plus approprié pour l'étude de la biosynthèse des EPS par les bactéries lactiques et des voies métaboliques impliquées. Dans ces milieux, il n'y a pas de composants qui interfèrent avec la quantification et avec l'analyse des EPS comme la peptone ou l'extrait de viande ou de levure (**Kimmel et Roberts, 1998 ; Torino et al., 2000**).

D'ailleurs, même si la majorité des bactéries peuvent produire des EPS dans n'importe quel milieu, la production peut être optimisée sous certaines conditions dans certains milieux définis (**Dupont, 1998**). Des modifications dans la structure et la quantité des EPS ont été décrites souvent comme réponse aux différentes conditions de vie environnementales et physiologiques (**Lloret et al., 1998**).

* Source de carbone :

La source de carbone a une influence majeure sur la biosynthèse des EPS par les bactéries. En plus du type de sucres (glucose, galactose, etc.) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production des EPS (**Cerning et al., 1992, 1994 ; Gamar et al., 1997**).

Ceming et al. (1994) ont étudié les effets de différentes sources de carbone à différentes concentrations sur la production d'EPS chez *L. casei* CG11. La souche est capable de produire des EPS avec les différents sucres ajoutés (glucose, mélibiose, lactose, galactose, etc.). Néanmoins, l'ajout du glucose dans le milieu synthétique de base permet la meilleure production d'EPS alors que lorsque le lactose est ajouté la production est faible. En effet, à une concentration de 20g/l de glucose, la production d'EPS peut atteindre 160mg/l produit. Alors que, pour une même concentration de lactose, la production d'EPS n'atteignait que 45mg/l.

Gancel et Novel (1994) ont étudié les conditions de production d'EPS pour une souche de *S. salivarius* ssp. *thermophilus* et ont aussi remarqué que le glucose et le fructose favorisent la production d'EPS, mais ralentissent la croissance alors que l'inverse est observé avec le lactose et le saccharose.

Par contre, **Lule et al. (2016)** ont remarqué que la production de dextrane par *Ln. mesenteroides* est importante en présence de saccharose (15%). **Roberts et al. (1995)** ont rapporté que la souche de *Bifidobacterium longum* BB-79 produit plus d'EPS lorsque le milieu de croissance M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**) est additionné de lactose comparativement au glucose, saccharose ou fructose.

Cette différence pourrait être expliquée par la propension de *B. longum* à utiliser le lactose, préférentiellement au glucose comme sucre simple. Contrairement à plusieurs autres bactéries, où le glucose a souvent un effet répressur, chez *B. longum*, le lactose semble réprimer le transport du glucose (**Parche et al., 2006**).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont été effectués au niveau du laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB), **Benasla (2012)** et **Kersani (2013)** ont montré que le milieu MRS hypersaccharosé (MRSHS) (**De Man et al., 1960 ; Dupont, 1998**) donne un bon rendement en EPS pour les souches de lactobacilles comparativement aux autres substrats carbonés.

* Source d'azote :

L'omission d'un ou de plusieurs acides aminés, dans le but d'étudier son effet sur la production d'EPS n'a influencé ni la biosynthèse, ni la composition en sucres, bien qu'elle a affecté la croissance des cellules de *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus* en diminuant la densité cellulaire (**Grobbs et al., 1998**). D'après **Torres et al. (2014)**, les matières azotées ne participent pas directement au mécanisme de biosynthèse des EPS mais elles sont essentielles à la croissance bactérienne.

Un environnement riche en carbone et pauvre en azote (ratio carbone : azote élevé) favorise la production d'EPS (**Shene et al., 2008**). Par contre, un faible ratio carbone : azote favorise la production d'EPS à faible poids moléculaire alors qu'un équilibre optimal entre la source de carbone et d'azote est nécessaire pour obtenir des productions accrues d'EPS (**Degeest et De Vuyst, 1999 ; Shene et al., 2008**). Les autres caractéristiques structurales (conformation et composition en sucres) n'ont pas été affectées.

Cependant, les travaux de **Dupont et al. (2000) ; Macedo et al. (2002a, b) ; Bergmaier et al. (2003)** et **Champagne et al. (2007)**, ont montré que la nature de la source d'azote (extrait de levure, peptone ou hydrolysate de lactalbumine) et des vitamines, peut affecter le poids moléculaire des EPS.

D'autres travaux ont porté sur la quantité d'EPS produite par diverses souches de *S. thermophilus* dans du lait enrichi ou non de peptone et d'extraits de levures (**van Geel-Schutten et al., 1998**). Pour tous les microorganismes étudiés, le rendement le plus élevé a été observé dans le lait enrichi. De plus, ces auteurs ont noté que la présence de matière azotée influence positivement le poids moléculaire des EPS.

Les travaux de **Cerning** ont montré que l'addition de 1% de caséine dans le lait écrémé provoque une augmentation de la production d'EPS par *L. bulgaricus* (**Cerning et al., 1986, 1990**). Tandis que l'addition de 1% de casaminoacides dans l'ultrafiltrat augmente la production d'EPS en plus d'en changer la composition (**Cerning et al., 1990**).

La souche productrice *L. bulgaricus* 416 produit 60mg/l d'EPS dans du lait écrémé et ne produit que très peu de viscosité. Avec l'ajout de 1% de casaminoacides, la même souche, incubée dans les mêmes conditions, peut produire jusqu'à 285mg/l d'EPS et avoir une viscosité de 165milli Pascal-secondes (mPa.s). La souche de *L. bulgaricus* CNRZ737 produit jusqu'à 425mg/l d'EPS et a une viscosité de 220mPa.s dans du lait écrémé enrichi de 1% de casaminoacides. Cette souche ne semble pas capable de produire des EPS dans un milieu autre que du lait (**Cerning et al., 1986**).

★ *Source de phosphore :*

Le phosphate exerce un effet sur le milieu surtout lorsqu'il sert de tampon (**William et Wimpenny, 1977 ; Manresa et al., 1987**). Les résultats semblent montrer que le phosphate influence le rendement en EPS bien que le pH du milieu soit maintenu près de la neutralité.

Le meilleur rendement a été obtenu pour 6.0g/l de phosphate de potassium alors que l'absence de phosphate de potassium élimine presque toute production (**Racine, 1991**).

1.2.6.3 Effet de la température d'incubation :

La température d'incubation a un impact sur la production d'EPS (**Looijesteijn et al., 2001 ; Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005**). Les résultats de plusieurs études sur l'effet

de la température sur la production d'EPS sont contradictoires et ceci peut être expliqué par les spécificités de la souche utilisée par chaque laboratoire.

Plusieurs études ont montré que la température optimale de production des EPS était inférieure à celle optimale de croissance bactérienne (**Cerning et al., 1992 ; van den Berg et al., 1995 ; Gassem et al., 1997 ; Ricciardi et Clementi, 2000**). Ceci peut être expliqué par le fait qu'en deçà de la température optimale, la croissance bactérienne est ralentie et la bactérie produit ainsi moins de constituants cellulaires (acides téichoïques). Alors, les enzymes impliquées dans la synthèse des parois bactériennes (glucosyl-transférases et polymérases) ainsi que certains intermédiaires lipidiques (les esters phosphates, les alcools isoprénoides) sont plus disponibles pour la synthèse des EPS (**Sutherland, 1972**).

L'étude menée par **Garcia-Garibay et Marshall (1991)** a montré que la production des EPS par *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2772 augmente à des températures élevées soit entre 40 et 45°C. De même **Grobben et al. (1995)** ont constaté une production élevée des EPS produits par *L. delbrueckii* à une température de croissance élevée. Par contre, **Zisu et Shah (2003)** ont montré qu'une température élevée (42°C) diminue la quantité de l'EPS produit par *S. thermophilus* 1275.

De Vuyst et al. (1998) et **Looijesteijn et al. (2001)** ont observé une production accrue d'EPS aux températures optimales de croissance.

1.2.6.4 Effet de la vitesse d'acidification :

La production d'EPS est influencée par la vitesse d'acidification (**Looijesteijn et al., 2000 ; Vaningelgem et al., 2004**). Dans un milieu synthétique, une vitesse d'acidification rapide résulte en une diminution de la production d'EPS par *Lc .lactis* ssp. *cremoris* en fermentation continue (**Looijesteijn et al., 2000**). De plus, le même milieu de culture limité en glucose et jumelé avec une lente vitesse d'acidification a favorisé la production d'EPS.

1.2.6.5 Effet du pH :

L'effet du pH sur la production des EPS dépend énormément des conditions du milieu mais aussi de la souche même. Souvent les études sont réalisées sans contrôle de pH ou à un pH fixe de fermentation (c'est-à-dire un pH stable tout le long d'une fermentation à pH contrôlé) (**Dupont, 1998 ; Looijesteijn et al., 2001 ; Lin et Chang, 2007**).

Certains auteurs ont montré qu'un contrôle de pH durant la fermentation augmente le rendement en EPS (**Grobben et al., 1995 ; Mozzi et al., 1996 ; Gassem et al., 1997**). La fermentation à un pH contrôlé de 6 et à 30°C augmente la production des EPS jusqu'à 3.6 fois chez *L. casei* (**Mozzi et al., 1996**). De même la production d'EPS par *S. thermophilus* était maximale à pH 6.2 (**De Vuyst et al., 1998**). L'effet du contrôle de pH est dans certains cas plus important que l'optimisation du milieu de culture.

Racine (1991) a montré que lorsque le pH n'est pas contrôlé, une addition adéquate de phosphate de potassium contribue à son maintien au-dessus de pH 6.0, valeur sous laquelle la

production est parfois compromise. Les changements du pH extracellulaire peuvent affecter non seulement la synthèse d'EPS mais également la distribution de produits finaux et l'activité de certaines enzymes (pyruvate kinase, lactate déshydrogénase, pyruvate formate-lyase) impliquées dans le métabolisme des bactéries lactiques.

En général, le pH optimum pour la production d'EPS est proche de celui optimal pour la croissance (Mozzi *et al.*, 1994, 1996 ; Gamar *et al.*, 1998 ; Grobber *et al.*, 1998 ; Petry *et al.*, 2000). Gassem *et al.* (1997) suggèrent qu'un pH supérieur permettrait de conserver les cellules en phase exponentielle de croissance sur une plus longue période et ainsi augmenter la production d'EPS.

1.2.6.6 Effet de la quantité d'oxygène :

Les études portant sur la quantité d'oxygène requis dans le milieu de culture sont contradictoires.

Certains auteurs ont rapporté que l'aération du milieu pendant la culture n'est pas nécessaire pour la production d'EPS par les bactéries lactiques. D'autres auteurs, au contraire, ont constaté qu'une basse tension en oxygène stimule la production (De Vuyst *et al.* 1998 ; Looijesteijn et Hugenholtz 1999). Les plus fortes productions d'EPS sont atteintes avec une faible tension en oxygène ou en anaérobiose (van den Berg *et al.*, 1995).

Gamar *et al.* (1998) ont identifié une concentration d'oxygène de 10% comme étant optimale pour la production d'EPS par *L. rhamnosus* C83. Egalement, Pham *et al.* (2000) ont étudié l'effet de l'oxygène sur la production d'EPS par *L. rhamnosus* R. Des concentrations en oxygène basses (jusqu'à 20%) ont augmenté la croissance et la production d'EPS. Cependant, la production spécifique a été plus élevée pour des conditions anaérobies et aérobies. Les auteurs ont conclu que des conditions de stress ont induit la production d'EPS.

1.2.7 Biosynthèse des EPS des bactéries lactiques :

Le site de la synthèse des EPS et la nature des précurseurs permettent de distinguer deux types principaux de biosynthèse par les bactéries lactiques : la polymérisation a lieu en dehors de la cellule (produisant des HoPS) ou au niveau de la membrane cellulaire (produisant des HePS).

Dans le premier cas, ce sont principalement, *Ln. mesenteroides* (dextranes), qui produisent des HoPS; alors que les HePS sont produits par des bactéries lactiques mésophiles (exemple. *L. casei*) et thermophiles (exemple. *L. bulgaricus*).

✚ Les HoPS sont synthétisés en dehors de la cellule grâce à des enzymes excrétés par la bactérie (Cerning, 1990). Ils sont synthétisés généralement par deux mécanismes différents : par une glycosyl-transférase extracellulaire ou par une synthétase membranaire.

1- Pour le premier mécanisme : la réaction de polymérisation s'effectue par l'intermédiaire des glycosyl-transférases extracellulaires, qui transfèrent un monosaccharide à partir d'un disaccharide à une chaîne croissante de polysaccharide. Puisque leur production est plutôt

simple, elle est indépendante du métabolisme énergétique central et les variations de la structure sont limitées aux types de liaisons et les embranchements.

En fait, la plupart de ces HoPS sont synthétisés de la même manière, c'est-à-dire en utilisant des glucane-sucrases extracellulaires en tant que donneur glycosylique de fructose ou de glucose (**De Vuyst et Degeest, 1999**).

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des glucanes et des fructanes sont appelées les glycosyl-transférases et les fructosyl-transférases, respectivement (**Figure 5A1**) (**Korakli et Vogel, 2006**).

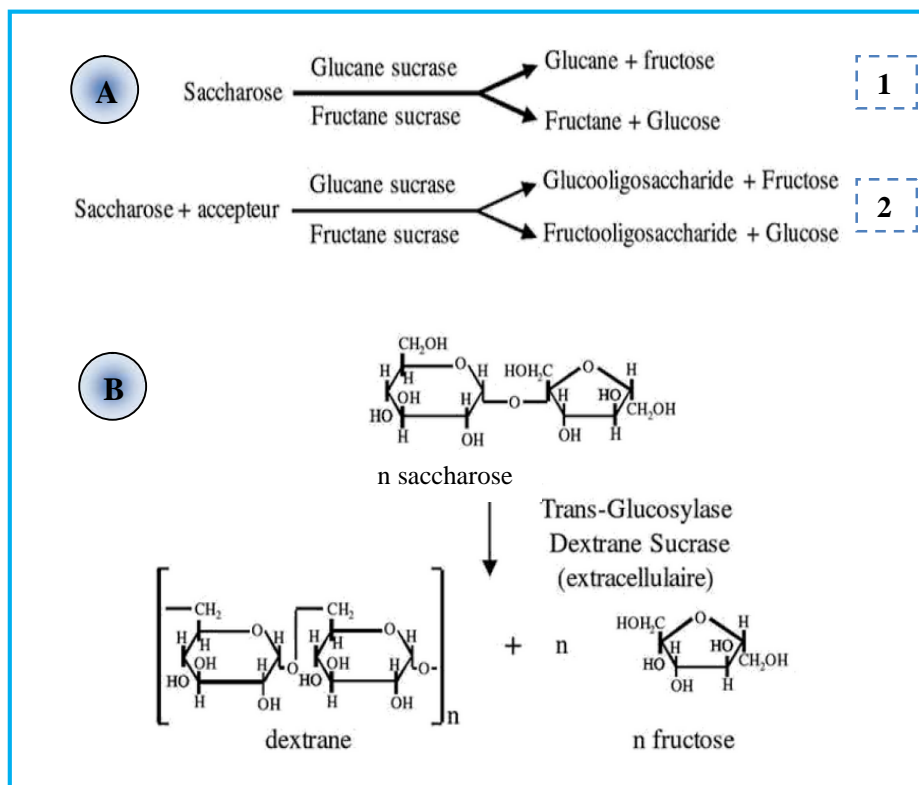


Figure 5 : Biosynthèse des HoPS par les glycosyl-transférases chez les bactéries lactiques (**Monsan *et al.*, 2001**).

A : mécanisme général ; B : exemple de la biosynthèse du dextrane par la dextrane-sucrase.

Les enzymes synthétisant le glucane sont aussi appelées les glucane-sucrases (**Figure 5A1**). Ces enzymes peuvent utiliser l'énergie du lien osidique du saccharose pour catalyser le transfert du sucre correspondant. En plus de la synthèse de polymères ayant une masse moléculaire élevée, les glucane-sucrases (**Figure 5A2**), en présence de saccharose et d'une molécule acceptrice efficace (comme le maltose), catalysent généralement la production d'oligosaccharides de faible masse moléculaire (**Koepsell *et al.*, 1953**).

Par exemple, dans la production du dextrane, seulement une enzyme est utilisée, la dextrane-sucrase (trans-glycosylase), qui fait le transfert du saccharose vers un réducteur afin d'allonger la chaîne de dextrane selon la réaction indiquée ci-dessus (**Figure 5B**). Le dextrane peut être produit à partir de cultures cellulaires de *Ln. mesenteroides* ou de préparations de l'enzyme sans cellules vivantes, éventuellement immobilisées (**Cerning, 1990**).

2- Pour le deuxième mécanisme : la réaction est régulée par la synthétase. Dans ces systèmes, il semble qu'une glycosyl-transférase membranaire intégrée, produite par certaines espèces de *Pediococcus* et *Oenococcus*, est en mesure de faciliter la polymérisation simultanément à la translocation à travers la membrane.

Cette enzyme catalyse les liaisons successives de sucres de type $\beta(1-2)$ et $\beta(1-3)$ afin d'effectuer l'exportation du glucane. La sécrétion de l'EPS se produit en présence d'une molécule de transporteur lipidique. Ce volet sera détaillé plus tard dans l'étape 4 de la synthèse des HePS.

✦ La synthèse des HePS, par contre, a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique. Elle se déroule en quatre étapes : le transport de sucre dans le cytoplasme et la synthèse des sucres-1-phosphate, la synthèse des sucres nucléotidiques, l'assemblage de l'unité répétée et en dernier la polymérisation et l'exportation des EPS de la cellule pour former l'HePS, avec un poids moléculaire final élevé, d'environ 1×10^6 Dalton. La **Figure 6** montre les voies métaboliques impliquées dans le catabolisme des sucres et dans l'anabolisme des EPS chez certaines bactéries lactiques

1- Transport des sucres et synthèse de sucres-1-phosphate : le déplacement des mono ou disaccharides vers le cytoplasme est un processus soigneusement régulé. Les trois différents systèmes de transport observés chez les bactéries lactiques sont : la translocation avec hydrolyse d'ATP par une ATPase, le système de transport symport et antiport et le transport avec phosphorylation via le système PEP-PTS (phosphoenolpyruvate-dépendent phosphotransferase system) (**De Vos et Vaughan, 1994**).

La bactérie *Lc. lactis* qui fermente le lactose possède un système PEP-PTS spécifique qui peut importer le lactose dans le cytoplasme en formant le lactose-6-phosphate (**De Vuyst et al., 2001 ; Laws et al., 2001**).

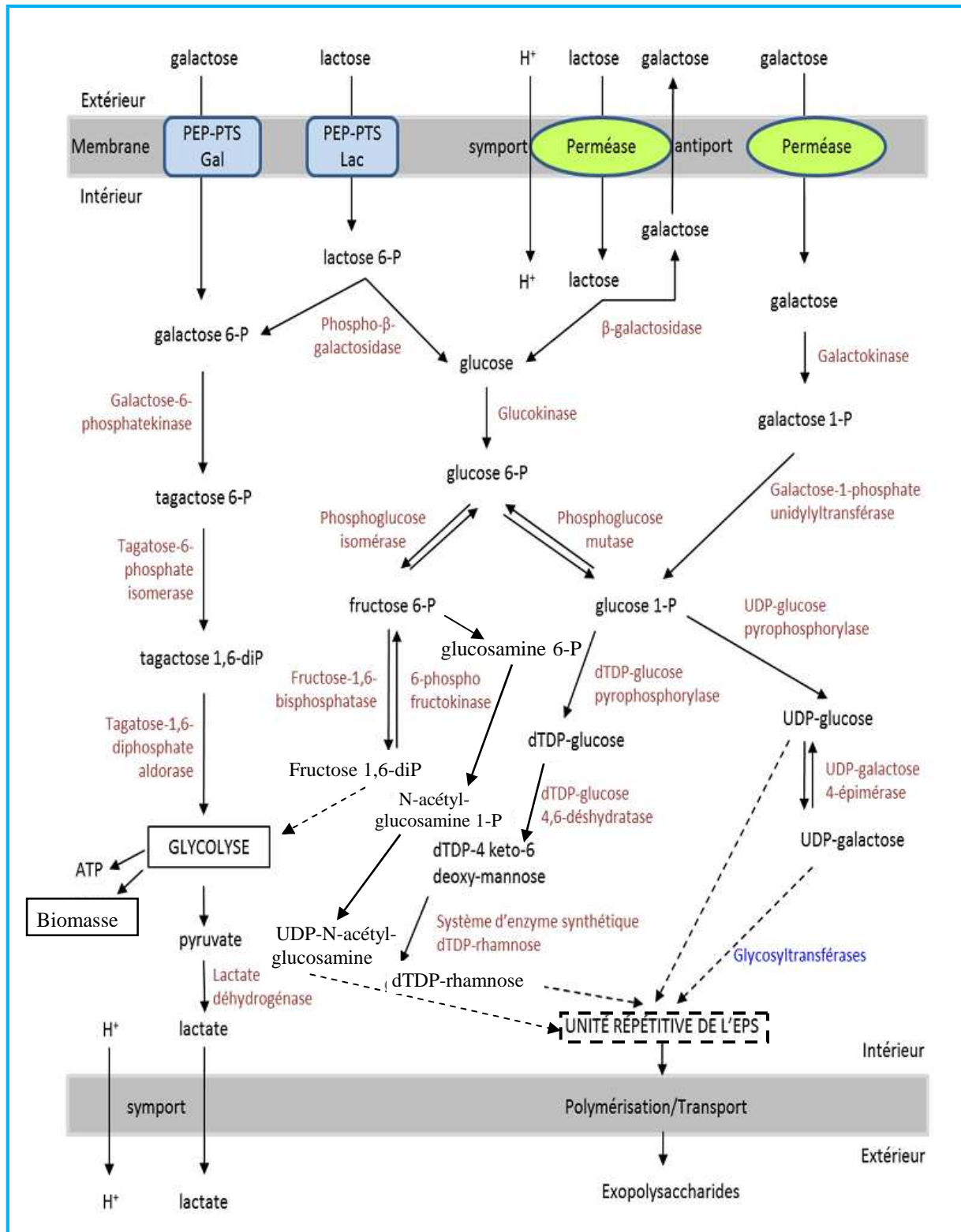


Figure 6 : Représentation schématique des voies métaboliques impliquées dans le catabolisme des sucres et dans l'anabolisme des EPS chez certaines bactéries lactiques (Modifié par De Vuyst *et al.*, 2001).

UDP : uridine-diphosphate ; dTDP : désoxy-thymidine-diphosphate.

2- Synthèse des sucres nucléotidiques : les sucres nucléotidiques comme l'UDP-glucose, l'UDP-galactose ou le dTDP-rhamnose sont requis pour la construction des HePS. Ils sont formés dans le métabolisme des glucides qui commence avec le transport des sucres.

Le glucose-1-phosphate est un précurseur important pour la synthèse des sucres nucléotidiques et il est converti en UDP-glucose par l'UDP-glucose pyrophosphorylase. L'UDP-glucose est converti ensuite en UDP-galactose ou UDP-acide glucuronique par l'UDP-glucose 4-épimérase ou le glucose déshydrogénase, respectivement (**Degeest et De Vuyst, 2000 ; Boels et al., 2001**). Plusieurs de ces enzymes ne sont pas seulement actives dans la synthèse des EPS, mais aussi impliquées dans d'autres activités métaboliques (**Ramos et al., 2001**).

Le dTDP-rhamnose est synthétisé à partir du glucose-1-phosphate. Le glucose-1-phosphate est converti en dTDP-glucose par la dTDP-glucose pyrophosphorylase. Par la suite, une série d'enzymes sera impliquée, la dTDP-glucose-4,6 déshydratase, la dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3,5 épimérase et la dTDP-4-keto-L-rhamnose réductase, dans la synthèse du rhamnose nucléotidique (**Ramos et al., 2001**).

Ces précurseurs intracellulaires ont été dosés par résonance magnétique nucléaire ^{31}P pour deux souches de *Lc. lactis*, une souche productrice (EPS⁺) et une souche non-productrice (EPS⁻) (**Ramos et al., 2001**).

Les concentrations des précurseurs d'EPS, l'UDP-glucose et l'UDP-galactose, ont été plus faibles dans la souche EPS⁺ que dans la souche EPS⁻. Les précurseurs de la biosynthèse du peptidoglycane, l'UDP-N-acétylglucosamine et l'UDP-N-acétylmuramoyl-pentapeptide, ont été les produits dérivés des UDP-sucres majeurs détectés chez les deux souches, mais leur concentration a été plus élevée dans la souche EPS⁺, ce qui confirme la compétition entre la synthèse d'EPS et la croissance cellulaire (**Ramos et al., 2001**).

3- Assemblage de l'unité répétée : une fois que les sucres nucléotidiques sont formés, les glycosyl-transférases commencent leur activité pour la formation de la chaîne de sucres (**Figure 7**) suite à l'ajout séquentiel des sucres activés à partir des molécules donneuses vers le transporteur membranaire undécaprényl-phosphate.

Les glycosyl-transférases primaires qui lient le premier sucre au transporteur lipidique (C55) sont hautement homologues dans les bactéries à Gram⁺ (**Campbell et al., 1997**).

Par ailleurs, les transporteurs lipidiques, qui se trouvent ancrés à la membrane cytoplasmique, semblent jouer un rôle important. Ce sont des esters phosphates et des alcools isoprénoïdes à longues chaînes, identiques à ceux décrits dans la biosynthèse des LPS et du peptidoglycane.

Le rôle des transporteurs lipidiques dans la synthèse des EPS serait de servir d'ancrage et de faciliter la formation précise et ordonnée de la chaîne glucidique et le transport à travers la membrane cellulaire.

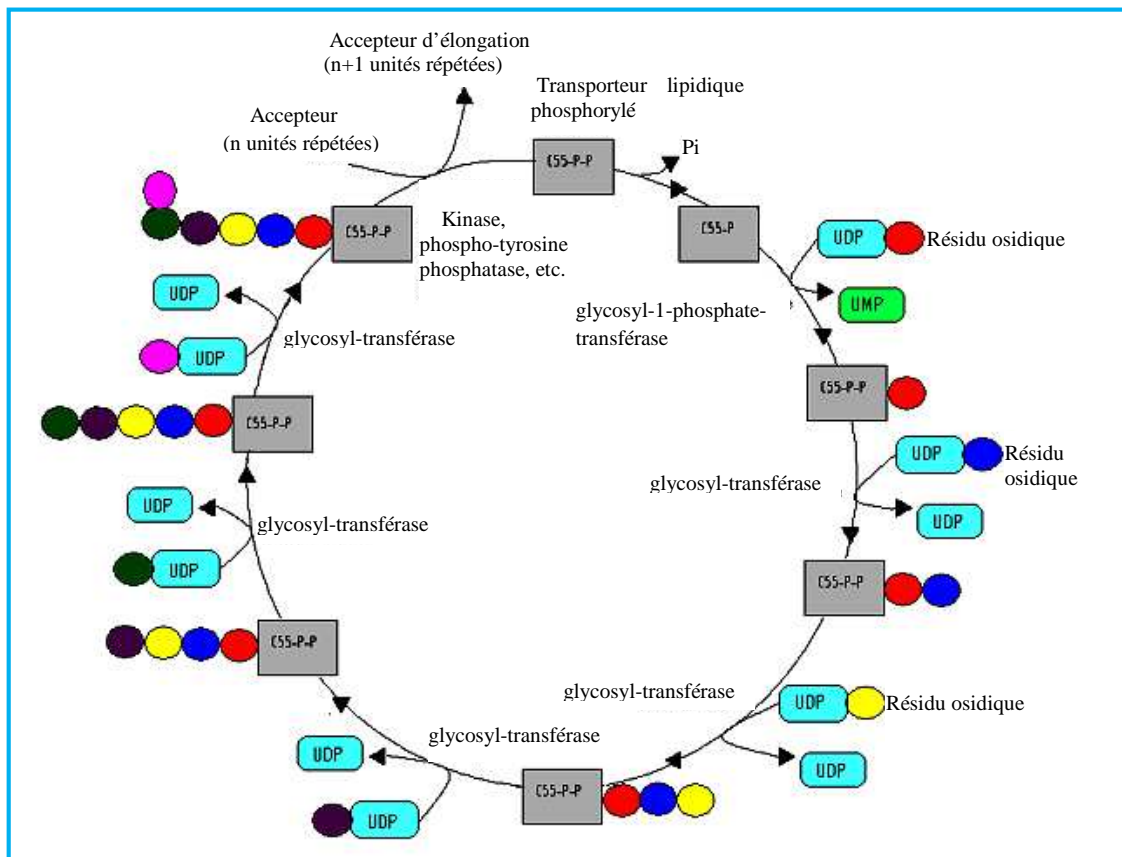


Figure 7 : Assemblage d'unité répétée d'un EPS (Stingele *et al.*, 1996, 1999a,b ; De Vuyst et Degeest, 1999 ; Broadbent *et al.*, 2003).
UMP : uridine-monophosphate.

4- Polymérisation et exportation : les sous-unités répétées sont transportées à travers la membrane avant la polymérisation, où plusieurs unités répétées sont liées ensemble par une polymérase (De Vuyst *et al.*, 2001 ; Laws *et al.*, 2001).

Certains polysaccharides sont polymérisés sur le côté interne de la membrane cytoplasmique suivi de l'exportation du polymère. Certaines protéines, liées à des lipides, pourraient jouer un rôle comme flippase-exportateur et polymérase de l'unité répétitive (De Vuyst *et al.*, 2001).

Après l'excrétion, le polymère est soit libéré (EPS) ou reste attaché à la surface de la cellule formant la capsule (CPS). Le mécanisme de la polymérisation, de la détermination de la longueur de chaîne et de l'exportation n'est pas encore clair (Bergmaier, 2002).

1.2.8 Génétique de la production des EPS :

La synthèse des EPS est généralement réalisée par des protéines codées par des gènes organisés en *cluster*, appelés *cluster cap*, *cps* ou *eps* selon les espèces. Chez les bactéries lactiques, ces clusters présentent très souvent une même organisation fonctionnelle mais une très forte variabilité génétique conduit à des polysaccharides de nature très différente (Tyvaert, 2005).

Souvent la fonction et l'activité de l'opéron *eps* sont confirmées par la disruption du gène de la priming glycosyl-transférase (Dabour et Lapoint, 2005 ; Dertli *et al.*, 2013). Sa fonction a été précisée par des analyses d'expression hétérologue et homologue chez plusieurs espèces bactériennes (Videira *et al.*, 2005 ; Minic *et al.*, 2007 ; Nierop-Groot et Kleerebezem, 2007). Néanmoins, ces expérimentations sont très lourdes, le clonage et l'expression des glycosyl-transférases parfois difficiles, ce qui pourrait expliquer le faible nombre d'études de fonctionnalité (Jolly et Stinglele, 2001).

Le premier travail portant sur les gènes structuraux impliqués dans la production des EPS par les bactéries lactiques a porté sur les gènes de *S. thermophilus* Sfi6 (Stinglele *et al.*, 1996). Les auteurs ont trouvé un seul locus chromosomique responsable pour la production d'EPS.

Depuis, plusieurs autres opérons *eps* de bactéries lactiques ont été décrits (Stinglele *et al.*, 1996, 1999a,b ; Provencher *et al.*, 2003 ; Dabour et LaPointe, 2005 ; Péant *et al.*, 2005). van Kranenburg *et al.* (1997) ont identifié les gènes responsables de la production d'EPS chez *Lc. lactis* NIZO B40 et ont montré que ces gènes sont de nature plasmidique.

Cependant, les deux opérons *eps* des bactéries lactiques les mieux caractérisés sont probablement ceux de *Lc. lactis* NIZO B40 et de *S. thermophilus* Sfi6. La souche de *Lc. lactis* NIZO B40 héberge le plasmide pNZ4000 de 42.180kb qui contient l'opéron *eps* de 12kb (van Kranenburg *et al.*, 2000). Chez *S. thermophilus* Sfi6, le locus chromosomique est de taille de 14.52kb qui regroupe les 13 gènes impliqués dans la production de l'EPS (Stinglele *et al.*, 1996).

Tous les gènes sont organisés dans un locus montrant une bonne conservation en ce qui concerne leur organisation (Boels *et al.*, 2001). Ils codent pour des enzymes impliquées dans la régulation, la biosynthèse de l'unité répétée, la détermination de la longueur de la chaîne et l'exportation et la polymérisation du polymère (Jolly et Stinglele, 2001 ; Broadbent *et al.*, 2003) (Figure 8).

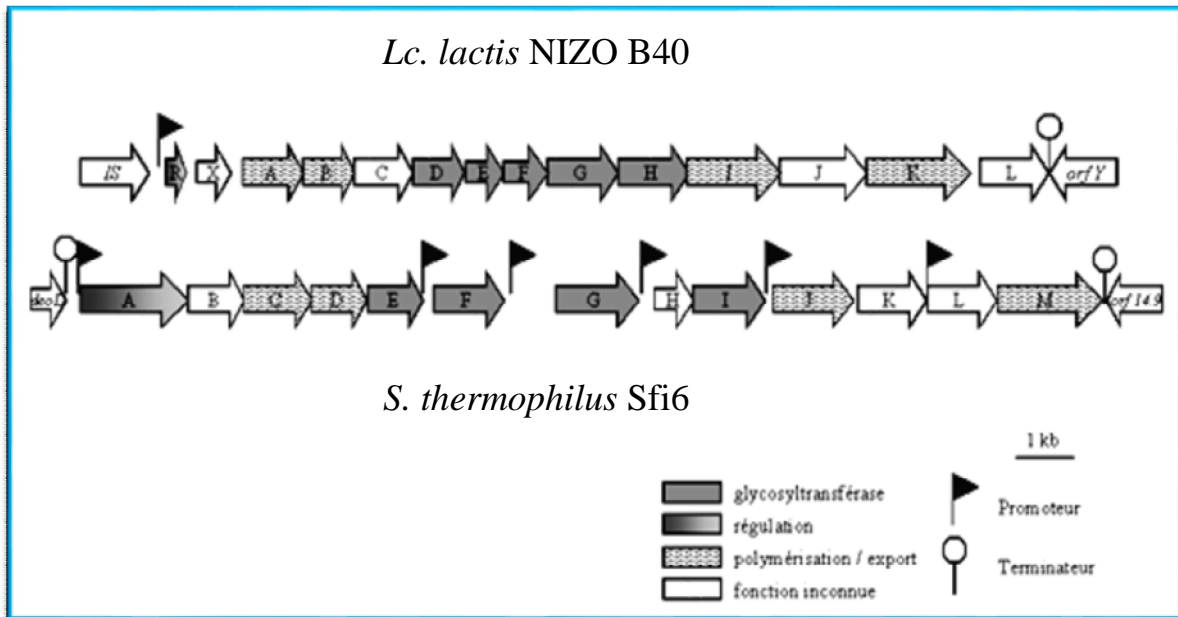


Figure 8 : Organisation des gènes codant pour la production d'EPS chez *Lc. lactis* NIZO B40 (plasmidique) et chez *S. thermophilus* Sfi6 (chromosomique) (De Vuyst *et al.*, 2001).

Par la comparaison des séquences, les fonctions de la plupart des gènes ont pu être trouvées. Les gènes *epsA* et *epsB* sont impliqués dans la régulation. Les produits des gènes *epsDEFGH* et *epsJ* sont supposés agir comme glycosyl-transférase avec comme première enzyme l'EpsD (van Kranenburg *et al.*, 1997 ; Bourgoïn *et al.*, 1999), qui commence la construction de la chaîne glucidique de l'unité répétitive en attachant une molécule de l'UDP-glucose à un transporteur lipidique (van Kranenburg *et al.*, 1997).

Ensuite, les autres glycosyl-transférases (EpsE, EpsF, EpsG) continuent à construire l'épine dorsale de l'unité répétitive. EpsH et EpsJ sont supposées être impliquées dans l'attachement des molécules de ramification, le rhamnose et le galactose-phosphate. EpsI et EpsK sont homologues à des protéines de polymérisation et d'exportation impliquées dans la production des LPS chez les bactéries à Gram⁻.

Il est à noter que l'expression des gènes *epsE*, *epsF*, *epsG* et *epsI* dans *Escherichia coli* et des réactions des glycosyl-transférases *in vitro* ont permis d'identifier les produits EpsE comme étant une β -galactose transférase, EpsG une $\alpha(1-3)$ -N-acétyl-galactosamine transférase et EpsI une $\beta(1-3)$ -glycosyl-transférase. EpsF serait alors une $\alpha(1-6)$ -galactose transférase, car *epsF* est le seul gène codant pour une glycosyl-transférase qui n'a pas été assigné.

Les gènes *epsC* et *epsD* sont putativement impliqués dans la polymérisation des unités. Tandis que, *epsK*, *epsL* et *epsM* sont responsable de l'exportation des oses (Bourgoïn *et al.*, 1999). Finalement, *epsJ* serait impliqué dans la polymérisation des unités répétitives.

Pour certaines souches, les séquences de gènes codant pour la production d'EPS par les bactéries lactiques, ainsi que la structure de l'EPS correspondant et les voies métaboliques des sucres sont connues. Il y a cependant encore un manque de données sur le rapport entre les séquences de gènes et la production d'EPS.

Il reste à éclaircir s'il y a des éléments contrôlant l'expression des gènes, ou si les gènes sont toujours actifs et le niveau de contrôle se trouve plutôt au niveau de l'activité des enzymes impliquées.

Néanmoins, il a déjà été possible de contrôler la production d'EPS non seulement par les conditions de fermentation mais aussi en appliquant des techniques génétiques. Ces techniques s'avèrent dans plusieurs cas, très prometteuses, menant à des bactéries lactiques modifiées productrices de grande quantité (**Stingele et al., 1996 ; Welman et Maddox, 2003**).

Les premiers résultats utilisant l'expression hétérologue des gènes *eps* de *S. thermophilus* Sfi6 dans la souche *Lc. lactis* MG1363 (EPS⁻) montrent que cette technique peut résulter dans la production d'EPS par la souche réceptrice (**Stingele et al., 1996**).

Toutefois, seulement de faibles quantités d'EPS ont été produites dans l'hôte hétérologue. L'EPS produit avait une masse moléculaire semblable mais une structure différente de celle de la souche originale. Même si une meilleure connaissance des mécanismes impliqués est encore nécessaire, ces résultats sont très prometteurs pour des travaux futurs.

La sur-expression des gènes *eps* peut résulter dans des productivités augmentées et les EPS produits peuvent avoir des structures et des propriétés modifiées. Ils pourraient être utilisés comme nouveaux agents épaississants. Cependant, les bactéries lactiques génétiquement modifiées et leurs produits doivent être approuvés légalement et être acceptés par les producteurs et consommateurs.

D'autre part, les opérons peuvent être interrompus par l'insertion de différents transposons, sans toutefois perdre leur fonctionnalité (**Pluvinet et al., 2004 ; Dan et al., 2009**).

Dans d'autres cas, une simple insertion peut induire une variation de phase dans un gène essentiel et faire apparaître des polysaccharides de structure différente ou des mutants *eps*- (**Bentley et al., 2006 ; Touati et al., 2007**).

Parfois encore, le remaniement des opérons s'accompagne de la délétion de gènes essentiels et la synthèse d'EPS n'est plus possible. C'est le cas chez la souche *Lc. lactis* NIZO B35 (**Kleerebezem et al., 1999**).



Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique :

Notre étude a été réalisée sur quatre-vingt-treize souches de coques lactiques et vingt souches de lactobacilles. Ces souches bactériennes appartiennent à la collection du Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB) de l'université d'Oran1 Ahmed Ben Bella.

Elles ont été isolées à partir de différents produits naturels du territoire Algérien (ghars «pâte de dattes», lait de chamelle, lait maternel, lait de vache, lben, saumure d'olive, viande ovine) et de Mauritanie (lait de chamelle), conservées sur géloses inclinées (MRS glucosé «GMRS» et M17 lactosé «LM17») (De Man *et al.*, 1960 ; Terzaghi et Sandine, 1975) ou sous glycérol à 20%.

Nous avons également isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle et de viande rouge de la région d'Oran.

Deux autres souches de la collection ont été utilisées dans cette étude comme témoins, *Ln. mesenteroides* (EPS⁺) codée CHBK325 et *Enterococcus* sp. (EPS⁻) codée H3, isolées respectivement à partir de lait de chamelle collecté de la région de Béchar et du blé fermenté de Relizane.

2.2 Milieux de culture :

En raison de leurs exigences nutritionnelles complexes et variées, les souches lactiques ont été cultivées sur des milieux riches. Les milieux de culture sont utilisés sous forme liquide ou solide par l'addition de 15g/l d'agar agar. Il s'agit des milieux suivants :

- ◆ Le milieu GMRS (MRS glucosé) (De Man *et al.*, 1960), utilisé pour les pré-cultures, les cultures et la conservation des souches de lactobacilles.
- ◆ Le milieu MRSHS (De Man *et al.*, 1960 ; Dupont, 1998), employé pour la production d'EPS par les souches de lactobacilles.
- ◆ Le milieu LM17 (M17 lactosé) (Terzaghi et Sandine, 1975), utilisé pour les pré-cultures, les cultures et la conservation des souches de coques lactiques.
- ◆ Le milieu M17HS (Terzaghi et Sandine, 1975 ; Dupont, 1998), utilisé pour la production d'EPS par les coques lactiques.
- ◆ Le milieu MSE (Mayeux *et al.*, 1962), employé pour la production d'EPS par la souche de *Ln. mesenteroides* et pour la vérification de la production d'EPS par les souches utilisées dans cette étude expérimentale.
- ◆ Le milieu BMM (Basal medium minimal) (Morishita *et al.*, 1981), utilisé pour l'optimisation de la production d'EPS.
- ◆ Le milieu BMMHS (Morishita *et al.*, 1981 ; Dupont, 1998), utilisé pour la mesure de la viscosité ainsi que le dosage des EPS.
- ◆ D'autres milieux sont utilisés pour la caractérisation phénotypes des isolats lactiques [milieu KMK (Kempler et McKay *et al.*, 1980), milieu de Falkow (Falkow, 1958), etc.].

- ◆ Le lait écrémé stérile commercial “*Candia Silhouette*” employé pour la conservation des souches et pour les cultures des souches.

Les milieux étaient stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, à l’exception du milieu BMM et du lait écrémé (120°C, 10 minutes).

La composition des différents milieux de cultures employés est présentée en annexe.

2.3 Méthodes:

2.3.1 Isolement des souches lactiques :

La mise en évidence des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus, a fait l’objet de travaux de recherche réalisés surtout au niveau de notre laboratoire LBMB. **Zadi- Karam (1998)** s’est intéressée à la mise en valeur de souches lactiques à partir du lait de chamelle. D’autres études se sont focalisées à les isoler à partir de certains produits carnés car ces bactéries sont responsable à la fermentation de ces produits alimentaires d’origine carnée (**Garry et Le Guern, 1999**).

C’est pour cette raison, deux réservoirs naturels ont été choisis comme source d’isolement des bactéries lactiques: le lait de chamelle émanant d’une ferme d’élevage et la viande rouge fraîche de l’abattoir, relevant de la région d’Oran, Algérie. Les échantillons ont été entreposés sous glace dans une glacière, préalablement désinfectée, pour éviter toute prolifération microbienne. Le temps écoulé entre l’obtention des échantillons et l’arrivée au laboratoire est compris entre 1 heure et 1 heure 30 minutes.

Une fois au laboratoire, l’échantillon de la viande a été découpé aseptiquement en morceaux de 30g puis introduit dans 90ml de bouillons GMRS et/ou LM17 et celui provenant du lait qui a été collecté dans des flacons stériles de 100ml, sont pré-incubés pendant 24heures à 30°C. Ceci, afin de favoriser le développement de la flore lactique endogène mésophile. A partir de ces cultures mères, des séries de dilutions décimales (jusqu’à 10⁻⁶) ont été réalisées: 1ml de chaque culture dans 9ml de l’eau physiologique stérile.

Après homogénéisation, 0.1ml de chaque dilution est étalée sur deux milieux gélosés (MRSHS et/ou M17HS) dont lesquels le substrat osidique (20g/l de glucose ou 5g/l de lactose) est remplacé par 50g/l de saccharose (**De Man et al., 1960 ; Terzaghi et Sandine, 1975 ; Dupont, 1998**).

Trois boîtes de Pétri par dilution sont incubées en anaérobiose dans une jarre à 30°C durant 24 à 48heures.

Après croissance sur ces milieux spécifiques, des colonies bien individualisées, visqueuses (productrices d'EPS) et gluantes ont été sélectionnées (**Leveau et al., 1991 ; Smitinont et al., 1999**).

2.3.2 Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :

La purification des souches de la collection, à partir de cultures conservées sous glycérol à 20% ou sur gélose inclinée, a débuté par une revivification des souches par un double enrichissement dans les bouillons GMRS et/ou LM17.

Les souches sont ensuite ensemencées sur milieux solides MRSHS et/ou M17HS afin de sélectionner celles qui produisent des biosubstances polymériques exocellulaires.

Une fois sélectionnées, elles sont repiquées trois fois successivement sur milieu LM17 pour les coques et sur GMRS pour les lactobacilles selon la méthode des quadrants en vue d'obtenir des isollements plus espacés après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C.

Concernant les souches isolées à partir de deux produits naturels, la purification était réalisée telle que mentionnée précédemment.

Les colonies bien isolées sont retenues pour vérifier leur pureté et leur appartenance au groupe lactique pour ensuite les conserver et les caractériser phénotypiquement.

2.3.2.1 Observation macroscopique et microscopique : les colonies isolées sont soumises à une observation macroscopique qui consiste à décrire sur milieu solide leurs caractères cultureux (forme, taille, consistance, contour, aspect, opacité). Une observation microscopique s'en suit après une coloration de Gram d'un frottis bactérien, qui permet de préciser leurs types morphologiques (taille, forme), leurs modes d'associations et de définir le Gram auxquelles elles appartiennent.

2.3.2.2 Recherche de la catalase : Cette enzyme permet la dégradation de l'eau oxygénée, sa présence est mise en évidence en déposant, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10% sur une colonie isolée (**Guiraud, 2003**). La décomposition de l'eau oxygénée (H_2O_2) se traduit par un dégagement de bulles de gaz (d'oxygène) selon la réaction suivante :



2.3.2.3 Conservation des souches : Les souches pures sont conservées selon trois méthodes différentes :

✚ **Conservation de courte durée:** La conservation des isolats est effectuée sur gélose inclinée GMRS et/ou LM17. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C. Le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines.

✚ **Conservation de longue durée:** Des cultures pures sont placées dans des tubes eppendorfs (ou cryotubes) contenant les bouillons GMRS (bacilles) ou LM17 (cocci) additionnés de glycérol à 40% stérile (V:V) puis conservées à -20°C (**Herrero et al., 1996**).

Un second mode de conservation est également utilisé consistant à cultiver les souches pures dans du lait écrémé stérile à 70% (enrichi par 0.05% d'extrait de levure) supplémenté de 30% de glycérol à 40% (Samelis *et al.*, 1994). Les cultures sont incubées à 30°C et dès coagulation du lait, elles sont placées à -20°C.

✚ Conservation de longue durée par lyophilisation: Des cultures bactériennes sont concentrées par centrifugation puis lavées à l'eau distillée stérile. La biomasse est centrifugée de nouveau pour éliminer le surplus du milieu liquide. Le culot est ensuite congelé afin que l'eau soit transformée en glace puis lyophilisé (lyophilisateur CHRIST).

La poudre ainsi formée est conditionnée dans des ampoules de lyophilisat scellées et stockée, en général, en atmosphère fraîche 0-4°C pour une longue durée de conservation (Guiraud, 1998).

2.3.3 Caractérisation physiologique et biochimique des bactéries lactiques :

Cette caractérisation concerne seulement les souches jeunes (de 18 à 24 heures) de coques lactiques productrices d'EPS. Elle a été effectuée par la réalisation d'un certain nombre de tests clés rapportés par Guiraud (1998). Pour la plupart des tests établis, des milieux spécifiques ont été utilisés dont la composition est mentionnée en annexe. La lecture consiste en la détection ou le développement d'un trouble dans les milieux reflétant ainsi une croissance bactérienne.

2.3.3.1 Caractérisation physiologique:

Les tests physiologiques utilisés sont indiqués comme suit :

◆ Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des thermophiles (Leveau *et al.*, 1991). L'aptitude des souches à croître à 10°C, 30°C, 37°C et 45°C a été vérifiée en ensemencant quatre tubes de LM17 à partir de chaque culture purifiée.

Les cultures incubées à 37°C et à 45°C sont examinées au bout d'un délai de 24 à 48 heures et celle à 10°C après 7 à 10 jours. La croissance bactérienne est appréciée par l'apparition de trouble. En fonction des températures, les isolats des genres ont été testés comme suit: *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* à 10°C, *Leuconostoc* à 37°C, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc* à 45°C (Carr *et al.*, 2002).

La température de 30°C a été choisie en vue de déterminer la température optimale de la réalisation des autres tests de la pré-identification.

◆ Croissance des souches dans des conditions hostiles :

Ces tests sont réalisés pour la caractérisation des lactocoques des entérocoques et des streptocoques (Schleifer *et al.*, 1985 ; Hardie et Wiley, 1995 ; Stiles et Holzapfel, 1997).

✓ **Tolérance au pH alcalin et au pH acide :**

Des cultures jeunes sont ensemencées sur bouillon LM17 tamponné (LM17t: phosphate disodique (Na_2HPO_4)/phosphate de sodium (NaH_2PO_4), 0.1M), acidifié à pH 5.0 et alcalinisé à pH 9.6, en vue de différencier entre les genres : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Lahtinen *et al.*, 2012) .

Après une incubation à 30°C pendant 24 à 72 heures, la croissance est appréciée par examen des milieux de culture et par comparaison avec un tube de milieu de culture non ensemencé incubé à la même température (Carr *et al.*, 2002 ; Mathara *et al.*, 2004).

✓ **Croissance en présence de NaCl :**

La croissance en présence de différentes concentrations de NaCl donne des renseignements précieux pour la pré-identification. Les cultures à tester sont ensemencées sur des bouillons LM17 hypersalés à 6.5%, à 10% et à 15% de NaCl. Après une incubation à 30°C pendant 24 à 72 heures, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

✓ **Thermorésistance :**

Elle consiste en un chauffage du bouillon ensemencé par une culture jeune à une température de 60°C pendant 30 minutes (Teuber et Geis, 2006). Les isolats traités par ce chauffage sont incubés à 30°C pendant 24 à 72 heures.

2.3.3.2 Caractérisation biochimique:

Les tests biochimiques effectués au cours de cette étude sont :

◆ **Recherche du type fermentaire :**

Ce test consiste à connaître le type métabolique de la souche à tester par lequel le substrat carboné est dégradé et un dégagement gazeux (CO_2) est recueilli dans la cloche de Durham. Les homofermentaires (*Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*) se développent dans le milieu en utilisant ce substrat carboné mais ne produisent pas de gaz. Au contraire, les hétérofermentaires (*Leuconostoc*) produisent du CO_2 dans la cloche.

Chaque souche jeune est cultivée dans 10ml de bouillon MSE (Mayeux *et al.*, 1962) muni d'une cloche de Durham. L'incubation se fait à 30°C pendant 2 à 7 jours. Après incubation, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Harrigan et McCane, 1976 ; Garvie, 1984 ; Schillinger et Lücke, 1987) susceptible d'être utilisé par notre bactérie.

◆ **Croissance sur le lait bleu de Sherman :**

Ce test permet de mettre en évidence le développement des bactéries en présence de bleu de méthylène et de différencier entre *Streptococcus* et *Lactococcus*. En effet, les espèces de lactocoques vont utiliser une partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de

ce fait, la couleur du lait ne virera que légèrement vers le blanc (**Schillinger et Lücke, 1987 ; Devriese et Pot, 1995**).

Les souches sont ensemencées dans des tubes contenant 9ml de lait écrémé stérile additionné de 1ml de bleu de méthylène à 1% et/ou 3% pour obtenir un lait à 0.1 et 0.3% de bleu de méthylène (**Leveau et al., 1991**). Elles sont ensuite incubées durant une période de 24 à 48 heures à 30°C.

Le bleu de méthylène capte et fixe les molécules d'hydrogène transportées par la chaîne respiratoire bactérienne en présence de la réductase bactérienne, il vire alors du bleu à l'incolore, sachant qu'il est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. La décoloration du bleu de méthylène est d'autant plus rapide que le nombre de bactéries est élevé (**Delarras, 2007**).

◆ Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :

Ce test est réalisé sur milieu de Falkow (**Falkow, 1958**) contenant un indicateur de pH qui est le pourpre de bromocrésol. Les souches bactériennes sont parallèlement cultivées dans un milieu de base "sans arginine" et dans un milieu à l'arginine et sont recouverts d'une couche de paraffine stérile. L'incubation se fait à 30°C pendant 4 à 7 jours. La culture dans le milieu de base se traduit par un virage au jaune dû au métabolisme du glucose.

Les bactéries qui possèdent l'enzyme ADH vont acidifier le milieu en fermentant le glucose et par conséquent, l'indicateur de pH virage du violet vers le jaune. Cette acidification favorise l'activité de l'ADH qui va dégrader l'arginine en libérant de l'ammoniac. Ce qui entraîne une alcalisation du milieu qui se manifeste par un virage de l'indicateur de pH au violet. En revanche, les bactéries dépourvues de cette enzyme restent jaunâtre.

◆ Hydrolyse de l'esculine :

Ce test concerne la recherche de l'enzyme esculine hydrolase qui catalyse l'esculine (hétéroside) en glucose et escutéline. Ce dernier réagit avec les ions de fer III trouvés dans le citrate ferrique ammoniacal pour former un précipité noir dans le tube.

L'activité enzymatique a été mise en évidence chez les souches de coques lactiques sur le milieu gélosé à esculine. Après ensemencement par piqûre centrale et incubation à 30°C pendant 2 à 3 jours, l'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement du milieu (**Guiraud et Galzy, 1980**). Les souches de *S. thermophilus* sont dépourvues de cette activité enzymatique.

◆ Production d'acétoïne :

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges-Proskauer (VP) (**Harrigan et McCane, 1976 ; Facklam et Elliott, 1995**). Après une incubation de 24 à 48 heures à 30°C sur milieu Clark et Lubs, 0.5ml de réactif de l' α naphthol à 6 % dans l'éthanol absolu (VPI) et

0.5ml d'une solution de la soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP11) sont ajoutées à la culture.

Les tubes sont soigneusement agités puis inclinés pendant 10 minutes à température ambiante. La production d'acétoïne se manifeste par formation d'un anneau rouge à la surface du milieu. Cette coloration traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude et se combine avec l' α naphthol en donnant un complexe rouge.

◆ Recherche de la citratase :

Ce test consiste à mettre en évidence l'enzyme citratase. L'utilisation du citrate est un facteur indispensable de la production des composés aromatiques chez les espèces aromatisantes de *Leuconostoc* dans les produits laitiers (Ignacio-Sanchez *et al.*, 2005).

Le citrate est fermenté par les bactéries en présence de glucose. Ceci est traduit par une coloration bleue sur milieu KMK (Kempfer et McKay, 1980). Ce dernier contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. Les bactéries qui utilisent le citrate, sont capables de fermenter le citrate en présence de la citratase, et apparaissent bleues suite à l'inhibition de la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferrique. Par contre, les souches qui sont incapables de le fermenter apparaissent blanches.

Les souches sont cultivées sur boîtes ou dans des tubes contenant du milieu KMK et incubées à 30°C pendant 3 à 5 jours. La présence de cette enzyme se manifeste par la présence de colonies bleues, dans le cas contraire, elles apparaissent blanches sur un fond jaune-vert.

◆ Production de CO₂ à partir du citrate :

Cette recherche est faite en inoculant la souche dans un tube contenant 10.5ml de lait écrémé stérile (10%) puis en ajoutant une solution de 0.5ml de citrate de sodium stérile (10%) dans chaque tube. Après agitation, 4ml de gélose blanche fondue et refroidie est versée stérilement dans le milieu. La souche est incubée à 30°C pendant 3 à 5 jours.

L'utilisation du citrate se manifeste par la production du gaz dans la masse du milieu provoquant une fragmentation de la gélose dans le tube (Harrigan et McCane, 1976 ; Leveau *et al.*, 1991).

◆ Test d'hémolyse :

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose Columbia additionnée de 10% de sang de mouton. Après incubation pendant une période de 24 heures à 30°C, le type d'hémolyse a été examiné.

Les souches peuvent être α hémolytiques si les colonies sont entourées d'une zone d'hémolyse partielle, β hémolytiques si la zone d'éclaircissement autour des colonies est importante (hémolyse totale) ou γ hémolytiques si l'hémolyse est absente.

◆ **Pré-identification par la galerie API 50CH :**

Les souches ont été sélectionnées pour une caractérisation biochimique à l'aide de galeries API 50CH (bioMérieux, France), composées de 50 microtubes contenant des substrats déshydratés appartenant aux carbohydrates et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques), permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes.

API 50CH est utilisée en combinaison avec milieu 50 CHS peptoné (50 CHSp) additionné de rouge de phénol comme indicateur de pH. L'inoculum est préparé à une densité de 4 sur l'échelle Mac Farland dans le milieu 50 CHSp à partir des cultures pures sur LM17. L'inoculum est ensuite réparti à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans les tubes de la galerie tout en respectant les conditions d'asepsie.

L'incubation est effectuée à 30°C. Une première lecture de résultat est faite après 24 heures, la seconde après 48 heures et la troisième après 72 heures d'incubation.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se manifestent par des virages colorés spontanés (sans ajout de réactif) à cause de l'acidification du milieu traduisant la fermentation du sucre testé. Par conséquent, changement de la couleur des tubes. Les résultats obtenus sont traités à l'aide d'un logiciel apiwebTM (bioMérieux).

2.3.4 Screening des souches productrices d'EPS :

Il existe plusieurs façons de détecter la présence des polysaccharides afin de sélectionner les souches productrices de ces polymères exocellulaires. Dans cette étude, ces derniers sont détectés tout d'abord, qualitativement, par un examen visuel ou par coloration, ensuite, quantitativement, par mesure des viscosités et par dosage colorimétrique (Dupont, 1998).

2.3.4.1 Etude qualitative :

Cette étude est effectuée sur différents milieux dont des conditions de culture variables.

2.3.4.1.1 Examen macroscopique sur milieux gélosés :

Il repose sur l'examen macroscopique des colonies en différents milieux gélosés. Comme signalé au début de cette recherche (voir section 2.3.2), toutes les souches utilisées dans cette étude (lactobacilles et coques lactiques) ainsi que les deux témoins (CHBK325 et H3) sont ensemencées par stries en surface sur les milieux suivants: GMRS, MRSHS, LM17 et M17HS.

Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, l'aspect visuel des colonies sur boîtes est examiné et comparé.

La production d'EPS se manifeste par l'apparition de grosses colonies présentant un aspect gluant et visqueux sous forme de gouttelettes d'eau sur le milieuensemencé (**Leveau et al., 1991 ; Smitinont et al., 1999**).

En se basant sur l'apparence de la colonie productrice (**Dave et Save, 1996**), plusieurs phénotypes peuvent être attribués par les souches lactiques productrices d'EPS "visqueuse : filante", "mucoïde" et "slime : gluante". Les deux termes "filant" et "mucoïde" ont souvent été employés de façon interchangeable dans les articles décrivant des isolats visqueux de bactéries lactiques (**Ceming, 1990**).

Le phénotype filant est défini comme la capacité des colonies à former des longs filaments visqueux lorsqu'elles sont touchées avec une anse à inoculer (**Vescovo et al., 1989**), alors que le phénotype mucoïde désigne des colonies d'aspect brillant et gluant qui ne forment pas de filament (**Dierksen et al., 1997**).

2.3.4.1.2 Utilisation du colorant cationique :

Il est possible de sélectionner des clones bactériens producteurs d'EPS, appelés clones mucoïdes (Muc^+), en additionnant un colorant cationique au milieu de croissance, rouge de ruthénium (**Stingele et al., 1996**).

❖ Principe de la technique :

Le colorant cationique utilisé dans cette étude est le rouge de ruthénium qui donne une coloration rose au milieu de culture (**Stingele et al., 1996**). Ce colorant possède une affinité aux polysaccharides anioniques et neutres de la paroi bactérienne. Il se fixe sur le peptidoglycane de la paroi de ces bactéries en induisant des interactions ioniques avec les anions organiques ou inorganiques environnants. Cette interaction entraîne une coloration de la colonie de la souche non-productrice (non-mucoïde) et elle apparaît rose. Ces clones sont appelés Muc^- (**Gancel et al., 1988**).

Alors que, la souche productrice d'EPS ne présente pas d'affinité au colorant suite au masquage de la couleur par l'EPS produit et donc, la colonie demeure blanche sur un fond rose. Ces clones présentent un phénotype Muc^+ (**Gancel et al., 1988 ; Dupont, 1998**).

❖ Mode opératoire :

Les souches bactériennes sontensemencées par touches sur des boîtes contenant le milieu à base de lait écrémé, extrait de levure (0.05%), saccharose (5%) et rouge de ruthénium (0.02%) (**Gancel et al., 1988 ; Samelis et al., 1994 ; Dupont, 1998**).

Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les clones blanchâtres Muc^+ sont retenus pour l'étude ultérieure.

2.3.4.2 Etude quantitative :

Cette étude est réalisée sur milieu BMMHS.

2.3.4.2.1 Viscosité apparente :

Il existe plusieurs façons de mesurer la viscosité et, par le fait même, différentes unités de mesure. Cette mesure a pour but de suivre la production d'EPS d'une culture en milieu liquide (Cerning *et al.* 1986, 1988 ; Poli *et al.*, 2010).

Lors de cette étude, la viscosité produite par les EPS est, tout d'abord, mesurée directement dans le bouillon BMMHS. Il s'agit d'une viscosité extrinsèque (apparente) (Dupont, 1998). Celle-ci nous renseigne sur le pouvoir filant de nos souches.

❖ Principe de la mesure :

La viscosité (η) est la propriété d'une substance à résister à une contrainte de cisaillement (larges déformations) (Duboc et Mollet, 2001), qui apparaît dès qu'un fluide est physiquement déplacé, comme en versant, pulvérisant, mélangeant, etc. Les fluides fortement visqueux nécessitent donc plus de force pour se déplacer que les substances moins visqueuses.

Cette viscosité est corrélée au temps nécessaire à une bille sphérique pour chuter d'une distance bien définie. La mesure de viscosité dynamique repose donc sur la mesure de la vitesse de chute de la bille (Brizard *et al.*, 2005).

Une bille sphérique est introduite dans un long tube transparent cylindrique avec deux repères \underline{a} et \underline{b} , rempli d'un fluide de masse volumique (ρ) pour déterminer sa viscosité, et dans lequel s'effectue le parcours de la bille (Brizard *et al.*, 2005). Le temps nécessaire à la chute de la bille dans une distance repérée de \underline{a} à \underline{b} (distance d) est chronométré. Le viscosimètre utilisé pour cette étude est appelé viscosimètre à chute de bille Thermo Scientific™ HAAKE (Figure 9).

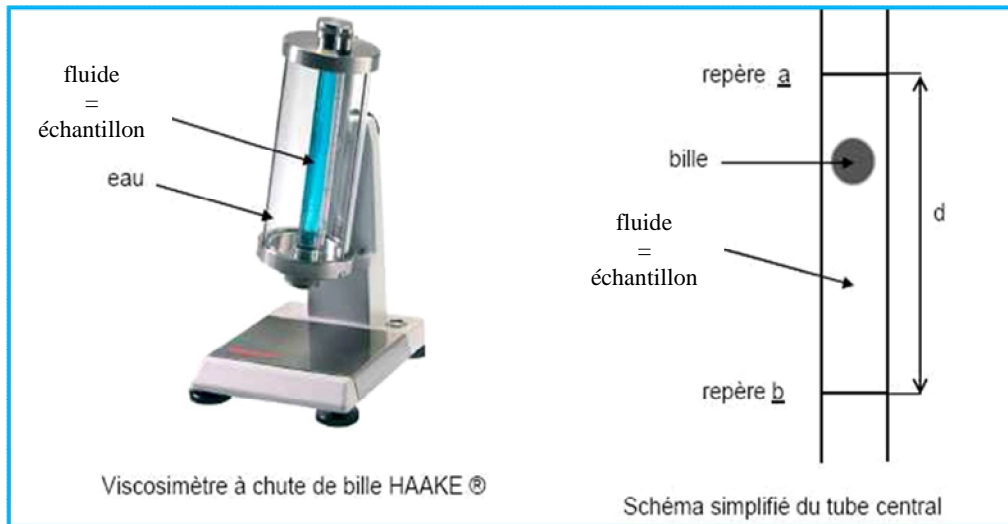


Figure 9 : Viscosimètre à chute de bille type HAAKE™.

<http://www.directindustry.fr/prod/thermo-scientific-scientific-instruments-and-aut/product/7217-797323.html>

La viscosité (η) est exprimée en unité standardisée internationale mPa·s ou en unité fondamentale "poise" (Po), avec 1mPa·s=1cPo (centiPoise). Elle est calculée en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Viscosité } (\eta) = K (\rho_1 - \rho_2) t$$

K : constante de la bille ($K = 2/9R^2g/d = 0.7\text{mPa}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^3/\text{g}\cdot\text{s}$. Avec, R: rayon de la bille, g : gravité (9.81ms^{-1}), d : distance entre **a** et **b**),

ρ_1 : masse volumique de la bille,

ρ_2 : masse volumique de l'échantillon,

t : temps de chute de la bille.

❖ *Mode opératoire :*

A partir des pré-cultures jeunes de 18 heures en bouillon LM17, les souches testées ainsi que les deux témoins (CHBK325 et H3) sont inoculés à 2% dans le bouillon BMMHS.

Après incubation à 30°C pendant 3 à 5 jours, deux paramètres ont été testés:

Le premier paramètre testé, consiste à mesurer la densité optique (DO) des échantillons à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis Optizen POP spectrophotometer) pour estimer la croissance microbienne en vue de la rapporter à la viscosité. Le blanc est réalisé avec un milieu BMMHS stérile (non ensemencé).

Le deuxième paramètre mesuré est la viscosité extrinsèque, à partir des cultures microbiennes en milieu BMMHS, à l'aide d'un viscosimètre à chute de bille (Thermo Scientific™ HAAKE) afin d'estimer le pouvoir filant des souches.

2.3.4.2.2 Viscosité intrinsèque :

La viscosité des EPS est estimée, dans ce cas, à partir d'un échantillon purifié, subissant au préalable une étape d'extraction en utilisant la méthode mise au point par l'équipe de **Cerning et al. (1994)** (voir section 2.3.4.2.3), l'EPS étant dissout dans de l'eau distillée et/ou dans de l'eau déionisée. Il s'agit d'une viscosité intrinsèque (non apparente) (**Dupont, 1998**), calculée selon l'équation de **Huggins (1942)** :

$$\text{Viscosité intrinsèque } (\eta_i) = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

η_i : viscosité intrinsèque en m³/Kg,

η_{sp} : viscosité spécifique ($\eta_{sp} = \eta_r - 1$),

C : concentration de la solution osidique en Kg/m³,

η_r : viscosité relative ($\eta_r = \eta / \eta_0$). Avec η : viscosité dynamique d'une solution colloïdale, η_0 : viscosité dynamique du solvant (η_0 eau distillée=1mPa.s, η_0 eau déionisée=0.9mPa.s).

2.3.4.2.3 Dosage colorimétrique des EPS :

Avant de procéder au dosage, les échantillons polysaccharidiques ont été préparés et les EPS ont été extraits de diverses cultures bactériennes par précipitation à l'éthanol selon le protocole décrit par **Cerning et ses collaborateurs en 1994**, purifiés à l'acide trichloracétique (TCA) puis dosés selon **Dubois et al. (1956)**.

2.3.4.2.3.1 Préparation des échantillons :

A partir des pré-cultures jeunes en bouillon M17HS, des flacons de 50ml de bouillon BMMHS sont inoculés à 2% par les souches productrices d'EPS (CHBK325 et souches testées). L'incubation est réalisée à 30°C pendant 3 à 5 jours.

2.3.4.2.3.2 Extraction et purification des EPS :

Une fois les échantillons préparés, les EPS sont isolés en utilisant la méthode de **Cerning et al. (1994)** dont les étapes suivies sont représentées dans la **figure 10**.

Après incubation, les échantillons sont placés pendant 15 minutes dans une eau bouillante afin d'inactiver les enzymes capables de dégrader les polymères. Ils sont ensuite refroidis à 4°C, transvidés dans des tubes Falcon et centrifugés à 9950g pendant 30 minutes à 4°C afin de séparer le culot cellulaire du surnageant renfermant les polysaccharidiques.

Le culot de cellules est jeté et trois volumes d'éthanol froid (95%) sont ajoutés au surnageant en vue de précipiter les polysaccharides (**Petry *et al.*, 2000 ; Deggest *et al.*, 2001**). Les échantillons sont gardés à 4°C pendant au moins 3 heures avant d'être centrifugés de nouveau pendant 30 minutes à 4°C à une gravité de 9950g.

Le culot de polysaccharides est remis en suspension dans de l'eau déionisée puis transvasé dans un boudin de dialyse (d'un seuil d'exclusion de 1000Dalton). Les échantillons sont gardés dans la glace lors du transfert dans les boudins de dialyse pour éviter toute dégradation enzymatique. Les échantillons sont ensuite dialysés contre de l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C, avec de fréquents changements d'eau. Cette étape permet d'éliminer les sucres résiduels, les sels et les acides aminés du milieu de culture.

Après dialyse, le contenu des boudins est transféré dans des ballons rodés et concentré par lyophilisation à l'aide d'un lyophilisateur (Christ) et/ou évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor BÜCHI Water bath B-480) (voir annexe). Les concentrés sont dissous dans de TCA à 10% afin de précipiter les protéines (**van den Berg *et al.*, 1995 ; Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005**). Cette étape est suivie d'une centrifugation à 5000rpm pendant 15 minutes pour enlever les protéines (**Dupont *et al.*, 2000 ; Pham *et al.*, 2000**).

Le culot de polysaccharides est lavé trois fois avec TCA puis dialysé pendant 5 jours à 4°C avec un changement fréquent d'eau distillée. Les échantillons de polysaccharides sont de nouveau lyophilisés et/ou évaporés.

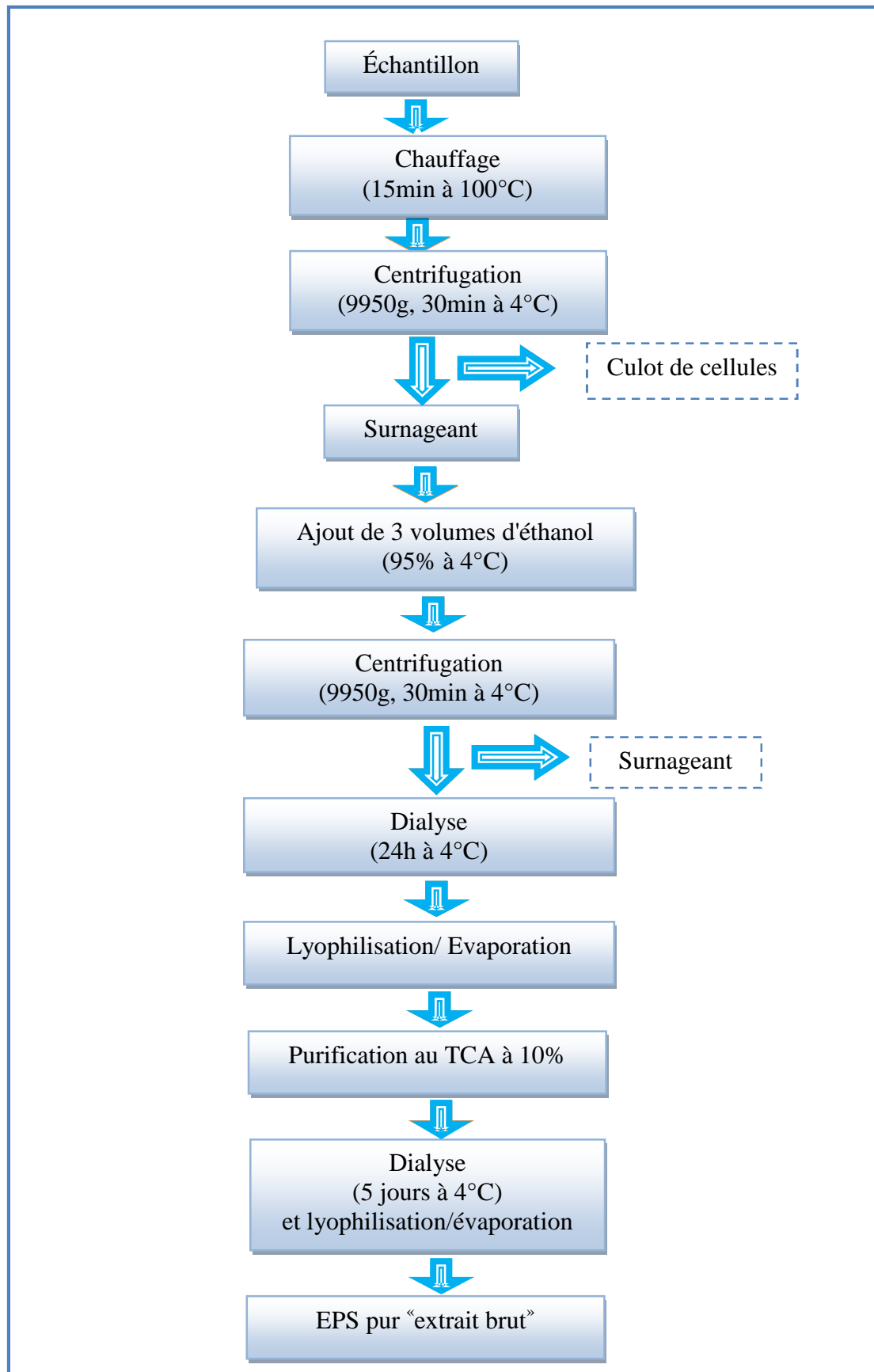


Figure 10 : Schéma des étapes d'extraction et de purification des EPS produits par nos souches dans le bouillon BMMHS (Cerning *et al.*, 1994).

2.3.4.2.3.3 Concentration des EPS :

Les EPS sont concentrés par lyophilisation et/ou évaporation comme signalé précédemment afin de déterminer le procédé le plus adéquat permettant une meilleure récupération de polysaccharides.

❖ *Principe de lyophilisation* :

La lyophilisation appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression. Elle consiste à éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans un produit (échantillon), préalablement congelé à -20°C pendant 24 heures. Ceci signifie que l'eau se sublime, c'est-à-dire que l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux (**De Beer et al., 2006**), sans passer par la phase liquide.

Le procédé de lyophilisation est composé de 3 étapes principales, successives et indissociables (**Wang, 2000**) :

- La congélation qui transforme l'eau libre en cristaux de glace,
- La dessiccation primaire (sublimation) qui permet de sublimer les cristaux de glace formés,
- La dessiccation secondaire (désorption) qui élimine l'eau liée et non congelée adsorbée à la surface des pores de la matière sèche ou incluse dans la masse du lyophilisat.

❖ *Principe de l'évaporation* :

L'évaporateur rotatif ou le rotavapor est un appareil utilisé pour évaporer un solvant dans le but de récupérer le solide qui y est dissous et donc, une concentration de la solution (**Esquenet, 2003**).

Au cours de ce procédé, le liquide bout et les vapeurs sont condensées dans le réfrigérant et le solvant tombe dans le ballon de récupération. Le soluté, en général solide dans ces conditions, se dépose sur la paroi du ballon principal. La basse pression permet d'abaisser la température d'ébullition du solvant, ce qui accélère considérablement l'évaporation et évite tout risque de dégradation thermique éventuelle du produit qui sera concentré dans le ballon.

2.3.4.2.3.4 Dosage des EPS :

Les EPS purifiés et lyophilisés sont resuspendus dans 10 ml d'eau déionisée et dosés selon la méthode de dosage des sucres totaux de **Dubois et al. (1956)**. Avant d'effectuer le dosage des EPS, les matières azotées résiduelles sont quantifiées par la méthode colorimétrique de **Bradford (1976)** afin d'évaluer la qualité de l'extraction et d'éviter les interférences lors de la quantification et de la caractérisation des EPS (**Gentés, 2011**). Les dosages sont réalisés en triplicata.

2.3.4.2.3.4.1 Dosage des protéines :

La teneur en protéines dans les extraits bruts d'EPS est déterminée par la méthode de **Bradford (1976)**.

❖ Principe de la technique :

Le dosage des protéines par la méthode de **Bradford (1976)** utilise le réactif du même nom, dont le constituant principal est le bleu de Coomassie G250 (voir annexe). Sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il se lie aux protéines présentes par des interactions non-covalentes (ponts hydrogène, interactions hydrophobes et interactions ioniques) et aux groupements aromatiques.

Cette mesure permet de doser la teneur en protéine dans les échantillons à tester par rapport à la courbe d'étalonnage au sérum albumine bovine (BSA), en se basant sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie G250 après liaison avec les acides aminés.

❖ Mode opératoire :

* Pour la gamme étalon de Bovine Serumalbumine (BSA) :

La gamme d'étalonnage est effectuée avec une solution de BSA (**Tableau 7**). Une solution de 0.2mg/ml de BSA est préparée à partir d'une solution mère de 1mg/ml.

Tableau 7 : La gamme étalon pour le dosage des protéines (méthode de **Bradford**).

Tube	0	1	2	3	4	5
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactifs de Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1

* Pour le dosage des protéines dans les échantillons :

1ml de réactif de Bradford était mélangé à 100µl de chaque échantillon. Après agitation, les échantillons sont laissés 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. La densité optique est lue par spectrophotométrie à 595nm. Elle est proportionnelle à la masse de protéines dans chaque échantillon. Cette masse protéique est exprimée en µg.

2.3.4.2.3.4.2 Dosage des oses totaux:

L'appréciation de la quantité des sucres totaux contenus dans la fraction d'EPS, y compris les hydrates de carbone de bas poids moléculaire qui peuvent être présents, est mesurée selon la méthode colorimétrique de phénol-acide sulfurique (**Dubois *et al.*, 1956**).

❖ *Principe de la technique :*

Les oses sont stables en milieu acide et la méthode de dosage de **Dubois *et al.* (1956)**, repose sur le fait que l'ajout de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) provoque l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, à chaud, et une déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de 5-hydroxyméthyl-furfural par cyclisation et déshydratation (**Figure 11**).

Les furfurals interagissent avec les composés phénoliques (phénol) par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration en sucres et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable. De petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées et la présence de protéines ou de peptides n'influence pas le dosage.

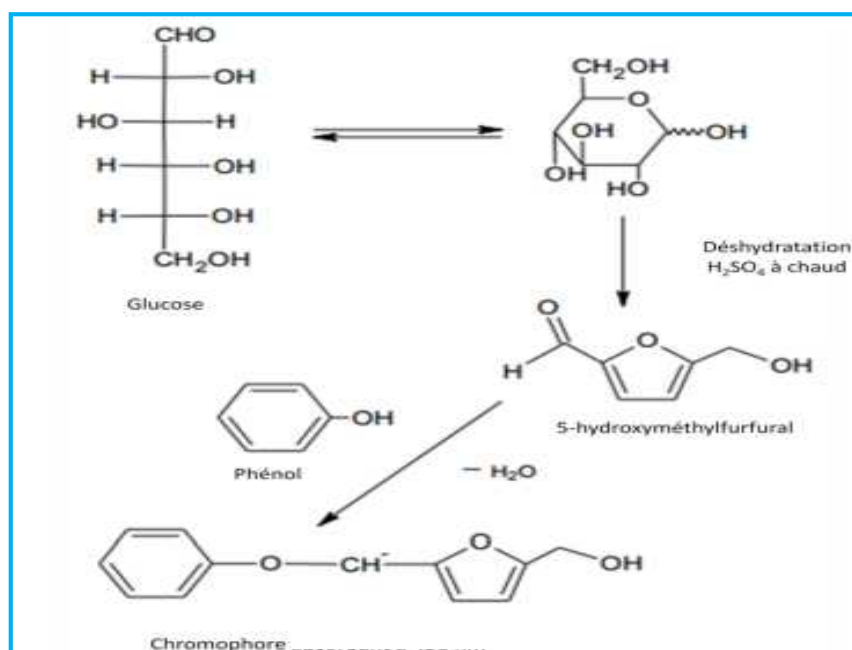


Figure 11 : Réactions du dosage colorimétrique des sucres totaux avec la méthode au phénol-acide sulfurique.

❖ *Mode opératoire:*

* Etablissement d'une gamme étalon de glucose et dosage des sucres :

La gamme d'étalon de glucose est établie à partir d'une solution mère de glucose à 15mg/ml soluble dans de l'eau distillée.

Dans un premier temps, des solutions de glucose standard sont préparées comme le montre le **tableau 8** avec différentes concentrations de ce substrat qui varient entre 0mg/l et 1200mg/l.

Tableau 8 : Préparation des solutions de glucose standard.

Tube	A	B	C	D	E	F	G
Solution de glucose 15mg/ml (ml)	0	0.1	0.2	2	3	6	8
Eau distillée (ml)	100	99.9	99.8	98	97	94	92

Dans un deuxième temps, et à partir des solutions de glucose standard, des tubes à essai sont remplis avec du phénol et d'acide sulfurique (**Tableau 9**).

Tableau 9 : La gamme étalon pour le dosage des oses totaux.

Numéro de l'échantillon	1	2	3	4	5	6	7
Solution de glucose standard (tube)	A	B	C	D	E	F	G
Volume de solution de glucose standard (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Volume de phénol 5% (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Volume d'acide sulfurique 95% (ml)	5	5	5	5	5	5	5

Dans des tubes à essai, 1ml de chacun échantillon d'EPS extrait de nos souches est mélangé avec 1ml d'une solution aqueuse de phénol à 5%. Sans toucher les parois des tubes, 5ml d'acide sulfurique à 95% sont ajoutés.

Les tubes sont immédiatement agités et laissés environ 10 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite placés dans un bain-marie à 25°C pendant 15 minutes. La mesure de l'intensité de la couleur a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 485 nm. Le blanc est fait avec le tube 1 dont sa concentration est de 0mg/l.

Les quantités des oses totaux sont exprimées en mg/l d'équivalent glucose, selon une courbe standard préparée à partir d'une solution de glucose à une concentration donnée. Les souches les plus rentables en quantité d'EPS sont sélectionnées pour la poursuite de cette étude.

2.3.5 Optimisation de la production d'EPS :

Pour une production maximale d'EPS, différents facteurs ont été optimisés sous certaines conditions. Ces facteurs agissent sur la synthèse d'EPS, les conditions de culture, la

composition du milieu (Guzel-Seydim *et al.*, 2005 ; Ismail et Nampoothiri, 2010), la souche, la température, le pH et la durée d'incubation (Gancel et Novel, 1994 ; Grobber *et al.*, 1996 ; De Vuyst et Degeest, 1999 ; Ricciardi et Clementi, 2000 ; Looijesteijn *et al.*, 2001 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a ; Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005 ; Behare *et al.*, 2009). A ceux-ci, s'ajoutent d'autres facteurs, utilisés comme seule source de sucre, d'azote, etc.

Lors des essais, l'effet de ces facteurs a été étudié sur les meilleures souches productrices d'EPS dont nous faisons varier successivement un paramètre tout en gardant les autres constants. La meilleure réponse de chaque paramètre étudié a été conservée comme constante pour les études suivantes.

2.3.5.1 Effet du pH et de la température :

Avant de passer à la détermination de conditions physicochimiques optimales de la synthèse de ces biopolymères, les conditions optimales de croissance sont recherchées afin de les rapporter à la production d'EPS, et ceci d'après les données bibliographiques.

2.3.5.1.1 pH et température optimums de croissance :

Les souches de coques lactiques sont inoculées dans le bouillon LM17t ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) à différents pH (5.8 - 6.0 - 6.2 - 6.4 et 7.0) et incubées à 30°C pendant 3 à 5 jours.

Elles sont aussi incubées à différentes températures (25 - 28 - 30 - 32 - 37 et 45°C) pendant 3 à 5 jours tout en maintenant le pH du milieu LM17t à une valeur fixe (optimale).

Après incubation, la croissance bactérienne est estimée par la mesure de la densité optique à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le blanc est réalisé avec un milieu LM17t stérile pour chaque pH testé.

2.3.5.1.2 pH et température optimums de production d'EPS :

A partir de pré-cultures jeunes sur LM17, les souches productrices d'EPS sont ensemencées à 1% dans le bouillon BMMHSt à différents pH allant de 5.8 à 7 et incubées pendant 3 à 5 jours aux mêmes valeurs de températures signalées ci-dessus.

Après incubation, la production d'EPS est appréciée par la mesure de viscosité apparente à l'aide d'un viscosimètre à chute de bille (voir section 2.3.4.2.1).

2.3.5.2 Effet du milieu de culture :

Différents milieux de cultures ont été testés comparativement pour choisir celui qui permet une production accrue d'EPS.

Les milieux solidifiés sont ensemencés par stries en surface selon la méthode des quadrants. Les milieux utilisés sont le M17HS (Terzaghi et Sandine, 1975 ; Dupont, 1998), le MSE (Mayeux *et al.*, 1962) et le lait écrémé enrichi par 0.05% d'extrait de levure et par 5% de

saccharose (**Gancel et al., 1988 ; Samelis et al., 1994 ; Dupont, 1998**) (ou par 0.5% de lactose, ceci à titre de témoin).

Après incubation à 25°C pendant 3 à 5 jours, l'aspect gluant des colonies sur ces milieux est comparé.

2.3.5.2.1 Effet des substrats carbonés :

En poursuivant le travail mené par l'équipe LBMB sur la production d'EPS (**Benasla, 2012**), deux oses ont été choisis (lactose et saccharose) pour étudier l'effet de différentes concentrations de sucres sur leur synthèse.

En se basant sur la littérature (**Racine, 1991**), des concentrations croissantes en saccharose et en lactose ont été utilisées: 20 - 40 - 60 - 80 et 100g/l. Pour chaque concentration de sucre étudié, 50ml de milieu BMMt sontensemencés à 1% à partir d'une pré-culture jeune sur LM17 liquide.

La culture est incubée à 25°C pendant 3 à 5 jours, le taux de croissance des bactéries est estimé par la mesure de la densité optique à 600nm et la viscosité apparente est mesurée à l'aide d'un viscosimètre à chute de bille.

2.3.5.2.2 Effet des substrats azotés :

Quatre substrats azotés ont été testés pour étudier leur effet sur le rendement en polysaccharides (peptone, extrait de levure, chlorure d'ammonium et caséine).

Des ensemencements à 1% de bactéries sont effectués sur bouillon BMMt contenant 20 - 40 - 60 - 80 et 100g/l de peptone ou d'extrait de levure. Les concentrations utilisées en chlorure d'ammonium (NH_4Cl) sont de: 0 - 0.25 - 0.5 - 0.75 et 1g/l (**Racine, 1991**) et celle de la caséine est de 1% (**Cerning et al., 1986, 1990**). L'incubation est réalisée à 25°C pendant 3 à 5 jours. La densité optique et la viscosité extrinsèque sont estimées respectivement avec un spectrophotomètre et un viscosimètre à chute de bille.

2.3.5.2.3 Effet des substrats phosphatés :

Les travaux de **Racine (1991)** ont démontré que le phosphate influe sur le rendement en EPS d'où les concentrations de phosphate ont été variées. Deux substrats phosphatés ont été testés: le phosphate de potassium (KH_2PO_4) et le phosphate dipotassique (K_2HPO_4).

Le BMMt est supplémenté avec différentes concentrations en substrats phosphatés (0 - 2 - 4 et 6g/l de KH_2PO_4 ou de K_2HPO_4) et inoculé à 1% par les souches testées, préalablement inoculées dans le bouillon LM17.

Après incubation à 25°C pendant 3 à 5 jours, la densité optique ainsi que la viscosité apparente ont été mesurées.

2.3.5.3 Effet du temps d'incubation :

Cette étude a été réalisée en flacon avec des souches productrices d'EPS inoculées dans le milieu BMM optimisé dont son pH est maintenu à une valeur de pH optimale pour l'ensemble des souches utilisées. Ce milieu estensemencé à 2% par des pré-cultures jeunes, pré-cultivées sur LM17 liquide.

Après incubation à 25°C, la cinétique de croissance, d'acidification et de production d'EPS sont suivies:

2.3.5.3.1 Cinétique de croissance :

Le suivi de la biomasse bactérienne lors de la fermentation est fait par lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 600nm.

Un volume de 1ml est prélevé aseptiquement de chaque culture toutes les 20 heures pendant 100 heures d'incubation à 25°C, et transféré dans une cuve à spectrophotomètre. Le blanc est fait avec du milieu BMM optimisé nonensemencé avant chaque lecture.

2.3.5.3.2 Cinétique d'acidification :

L'évolution de l'activité acidifiante et du pH du milieu de chaque échantillon est réalisée par titration et par pH-métrie. Toutes les 20 heures, 30ml de milieu BMM optimisé sont prélevés et répartis, après homogénéisation, dans 3 béchers, à raison de 10ml chacun.

Après avoir mesuré le pH, la quantité d'acide lactique produite par nos souches est déterminée avec de la soude (N/9), sous agitation, en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine à 1% dans l'éthanol absolu (Accolas *et al.*, 1977). Le volume de la soude, versé pour le virage de la couleur du milieu au rose pâle persistant au moins 10 secondes, est alors noté, à cet instant.

L'acidité est exprimée en g/l et calculée selon la formule suivante:

$$\text{Acidité (D}^\circ\text{)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

V_{NaOH} : le volume moyen de la soude versée pour titrer l'acide lactique contenu dans chaque échantillon dans les trois tests effectués. Avec 1°Dornic correspond à 0.1g d'acide lactique produit par litre (Accolas *et al.*, 1977).

2.3.5.3.3 Cinétique de production d'EPS :

La production d'EPS est suivie en fonction du temps, chaque 20 heures et pendant 100 heures (Racine, 1991 et Gamar *et al.*, 1998), parallèlement à la croissance bactérienne, afin de déterminer l'influence de la durée d'incubation sur la production de ces biosubstances exocellulaires.

Toutes les 20 heures, un échantillon de 50ml est prélevé aseptiquement, les EPS produits par nos souches lactiques sont extraits et purifiés. Les teneurs en protéines et en sucres dans les extraits bruts d'EPS sont dosés par les méthodes colorimétriques afin d'apprécier leur quantité globale en oses ainsi leur pureté (contaminants protéiques) (voir pages 55 et 57). Un autre échantillon de 15ml est prélevé stérilement pour la mesure de la viscosité apparente avec un viscosimètre à chute de bille (voir page 50).

2.3.6 Caractérisation des monosaccharides :

Afin d'élucider la composition osidique d'un polysaccharide, une hydrolyse d'EPS par des acides concentrés et des températures élevées, est obligatoire pour la rupture de toutes les liaisons glycosidiques (**Bergmaier, 2002 ; Ruiz, 2005**).

Sachant que, les monosaccharides n'ont pas tous la même résistance aux conditions d'hydrolyse, et donc, il faut contrôler les conditions avec précision jusqu'à la conversion totale de l'EPS (**Bergmaier, 2002**). Une fois libérés, les monosaccharides sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

2.3.6.1 Hydrolyse des EPS :

L'hydrolyse des EPS est une étape préliminaire indispensable pour définir les conditions optimales de la libération des oses simples et d'oligosaccharides. Cette hydrolyse a été réalisée en utilisant des acides forts selon deux procédés distinctifs et sous certaines conditions (l'acide sulfurique et l'acide perchlorique) afin de mettre en œuvre celui permettant une rupture totale des liaisons glycosidiques.

❖ *Principe de l'hydrolyse acide :*

Elle consiste à hydrolyser l'échantillon à analyser par un acide. La dépolymérisation peut être conduite avec des acides de forces et de concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température et temps de réaction), selon la nature et la structure du polysaccharide, tels que l'utilisation de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique ou de l'acide trifluoroacétique (TFA) à des températures élevées (**Morrison et Stewart, 1988 ; Ruiz, 2005**).

En effet, les différents types de liaisons osidiques présentent des taux d'hydrolyse variables en fonction de la stabilité relative des liaisons en (1-6), (1-4), (1-3) et (1,2). Cela signifie que, la nature des liaisons glycosidiques entre deux unités osidiques présente une différence de stabilité par rapport au cas usuel de deux unités glucosidiques liées en (1-4). Les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre sous la forme furanose ou deoxy (**Delattre, 2005**).

❖ *Mode opératoire:*

Le premier procédé consiste à mélanger 10mg de polysaccharides purifiés et séchés avec 2ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 2N. Le mélange est maintenu 4 heures à 100°C. Au terme de cette période, les hydrolysats sont neutralisés avec de l'hydroxyde de baryum ($Ba(OH)_2$) à 0.3N (**Graber et al., 1988**), après retour à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés 10 minutes à 3500rpm. Le surnageant est filtré en utilisant des filtres millipores de 0.22 μ m.

Le second procédé, est réalisé selon **Tieking et al. (2003)** avec des modifications mineures, faisant intervenir l'acide perchlorique ($HClO_4$) à 70% additionné à la poudre d'EPS (15%). Les échantillons sont incubés à 100°C pendant 1 heure. Le perchlorate est neutralisé avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 5M. Après centrifugation à 12000rpm pendant 5 minutes à 4°C, le précipité est éliminé et le surnageant est filtré.

Les filtrats obtenus par les deux procédés d'hydrolyse acide sont analysés par CCM et par HPLC pour identifier les oses composant les EPS extraits de nos souches à partir du bouillon BMM optimisé.

2.3.6.2Vérification de l'efficacité de méthodes d'hydrolyse et identification des monosaccharides par CCM :

Dans le but de vérifier si l'hydrolyse a bien eu lieu pour pouvoir séparer les composants des EPS et caractériser les monosaccharides constituant ces biopolymères, les hydrolysats obtenus sont analysés par CCM. Cette technique a été réalisée selon la méthode décrite par **Farag (1978)**.

❖ *Principe de la technique :*

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice, cellulose, etc.), fixée sur une plaque de verre ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Par ailleurs, chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile (**Delattre, 2005**). Par conséquent, les substances vont migrer à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Chacun des constituants est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins retenu (adsorbé) sur la phase stationnaire.

❖ *Mode opératoire :*

Le protocole de migration se présente comme suit :

✓ **Phase mobile :**

Un seul système a été utilisé selon **Farag (1978)** dont la phase mobile est constituée d'un mélange de solvant acide acétique-chloroforme-eau (35:30:5). Le mélange est introduit au fond de la cuve bien fermée par l'étanchéité du couvercle et laissé pendant quelques heures pour assurer la saturation maximale de l'atmosphère de la cuve en vapeur de la phase mobile. Cette saturation a pour but de limiter l'évaporation de la phase mobile depuis la cuve chromatographique.

✓ **Phase stationnaire :**

Des plaques en gel de silice prêtes à l'emploi, sont utilisées comme phase stationnaire, sont de type Silica gel 60 F₂₅₄ de 0.25mm d'épaisseur, sur feuille d'aluminium (**Wang et Fang, 2004**).

✓ **Préparation des plaques chromatographiques :**

Une ligne de dépôt est tracée à 1.5cm du bord inférieur des plaques puis sont activées dans l'étuve à 50°C pendant 20 minutes. Une fois activées, les plaques sont prêtes pour le dépôt des échantillons.

✓ **Préparation et dépôt des échantillons :**

10mg de chacun des échantillons obtenus (CHBK325 et souches à analyser) ainsi que les sucres standards (étalons) sont dissouts dans 1ml d'un mélange méthanol et eau (1:1).

Pour la présente étude, différents étalons oses qui peuvent renfermer les polysaccharides étaient utilisés. Il s'agit du glucose, du raffinose, d'arabinose, du saccharose, du lactose, du galactose, du fructose et du dextrane (**Doat, 1974** modifié).

A l'aide d'un microtube capillaire, 20µl de chaque échantillon sont déposés sur la plaque de CCM, d'où chaque dépôt est séché à l'aide d'un sèche-cheveux. Ces plaques sont soigneusement placées dans la cuve de sorte que la ligne de dépôt soit au-dessus de la phase mobile.

La cuve est ensuite refermée tout en veillant à son déplacement ou sa vibration pendant l'élution. Quand le solvant arrive à 1cm du bord supérieur, les plaques sont retirées doucement et le front du solvant est marqué avec un crayon.

✓ **Révélation :**

Les solutés étant incolores, pour les faire apparaître par une réaction chimique, un révélateur est préparé en mélangeant au moment de l'emploi, 50ml de permanganate de potassium (20g/l) avec 50ml de carbonate de sodium anhydre (40g/l) dans un pulvérisateur.

Après le dépôt de la plaque sur une table propre, le révélateur est vaporisé sur l'ensemble de la surface. La plaque est séchée à l'aide d'un sèche-cheveux jusqu'à l'apparition des spots

colorés (ou taches). Pour identifier la composition des extraits en monosaccharides de différents échantillons, le rapport frontal (Rf) de chaque tache de migration est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rapport frontal (Rf)} = \frac{\text{La distance parcourue par la substance}}{\text{La distance parcourue par le solvant}}$$

2.3.6.3 Identification des monosaccharides par HPLC :

Pour confirmer l'identification des EPS la technique analytique de chromatographie HPLC s'est avérée nécessaire.

❖ *Principe de la technique :*

La HPLC est, actuellement, indubitablement la technique de séparation la plus largement employée pour l'analyse simultanée de toutes les classes de composés naturels y compris les oses. Ces composés sont solubles dans la phase mobile et une phase, dite fixe ou stationnaire, exerce sur eux un effet retardateur (**Rosset *et al.*, 1991**).

Les études de mécanismes de rétention des solutés ont permis de montrer une interdépendance des trois éléments du système chromatographique (phase stationnaire, phase mobile, soluté) (**Maloumbi *et al.*, 2006**).

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

❖ *Mode opératoire :*

5µl d'échantillon hydrolysé est injecté dans la colonne de chromatographie AGILENT 1100 Zorbax carbohydrates (4.6IDx150mm, 5µm) à 20°C. Les échantillons sont élués à une vitesse de 1ml/minute avec l'eau déionisée en présence de monosaccharides contenant le glucose, le raffinose, l'arabinose, le saccharose, le lactose, le galactose, le fructose et le dextrane, à une concentration de 0.1mg/ml préparés dans l'eau déionisée.

2.3.7 Activité rhéologique sur lait:

Ce test est effectué par ensemencement du lait écrémé stérile (10ml) par 1ml d'EPS pur, ceci après son extraction et sa purification selon la méthode décrite par **Cerning et al. (1994)**.

Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, le levain lactique possède un pouvoir épaississant si le gel formé présente une certaine rhéologie visqueuse (**Bourgeois et Leveau, 1991**). Cette rhéologie est définie comme étant l'étude de la déformation et de l'écoulement de fluides (**Ma et Barbosa-Canovas, 1995**).

L'activité rhéologique est évaluée par mesure de la densité des échantillons, qui est une grandeur sans dimension qui désigne le rapport entre la masse volumique d'un volume donné du liquide considéré et la masse volumique du même volume d'eau. Elle est égale :

$$\text{Densité (D)} = \frac{\rho \text{ échantillon T}}{\rho \text{ eau T}}$$

$\rho_{\text{échantillon}} = m/v$ à une température donnée,

$\rho_{\text{eau}} = 1000 \text{Kg/m}^3$ à une température donnée (4°C),

T= température.

La masse volumique d'un liquide est définie par le quotient de la masse d'une certaine quantité de ce liquide divisée par son volume à une température donnée. Elle est habituellement notée ρ et s'exprime en Kg/m^3 .



3 - Résultats et Discussion

3.1 Isolement, confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :

Le lait cru représente une source de nouvelles souches de bactéries lactiques pouvant présenter des potentialités fermentaires (**Kacem et al., 2002, 2004 ; Zadi-Karam et Karam, 2006 ; Idoui et Karam, 2008**) intéressantes pour les industries alimentaires et pharmaceutiques. Elles contribuent aussi à la conservation de la viande et d'autres produits sous certaines conditions contrôlées, essentiellement l'acidité (**Rodriguez-Calleja et al., 2005 ; Ho, 2008**).

Cinquante-deux souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de deux biotopes naturels riches en substances nutritives (protéines, matière grasse, etc.), le lait de chamelle et la viande rouge provenant de la région d'Oran. Quarante-trois coques lactiques et neuf lactobacilles ont été obtenus sur milieux GMRS et/ou LM17. Dans nos conditions expérimentales, nous avons obtenu une majorité de coques par rapport aux bâtonnets. La même constatation avait été observée par **Kacem et al. (2002)** et **Franciosi et al. (2009)**.

Sur milieux MRSHS et/ou M17HS, huit coques lactiques ont été sélectionnés, trois isolats à partir du lait de chamelle (L4, L5 et L6) et cinq à partir de viande rouge fraîche (V1, V2, V3, V4 et V5).

Après revivification des souches de la collection du laboratoire LBMB par un double enrichissement dans les bouillons GMRS et/ou LM17, quatre bactéries lactiques (VO18, VO17, VO12 et VO4) provenant de la viande ovine de Relizane ont été choisies par rapport à leur caractère épaississant.

Lors de cette étude, toutes les souches retenues sont caractérisées par la production de biosubstances épaississantes. Elles se présentent sous forme de colonies de grosse taille, d'aspect gluant sur milieu M17HS alors que sur LM17 solide elles donnent des petites colonies blanchâtres, rondes à contour régulier, lisses et légèrement bombées.

L'observation microscopique des bactéries après coloration de Gram a révélé qu'elles sont toutes à Gram positif, de formes cellulaires lenticulaires ou coques, disposées en paires, en chainettes ou isolées. La forme lenticulaire oriente la pré-identification des différentes souches au genre *Leuconostoc*. Selon **Garvie (1986)**, les corps cellulaires de leuconostocs peuvent être sphériques, mais souvent lenticulaires, surtout lorsqu'ils sont cultivés sur milieu gélosé. Quant à l'autre forme cocci retrouvée, il reste à déterminer à quel genre bactérien appartiennent ces souches.

L'absence de dégagement gazeux chez l'ensemble des bactéries étudiées montre qu'elles sont toutes dépourvues de l'activité catalasique.

✘ Les résultats obtenus confirment la pureté des souches sélectionnées et leur appartenance au groupe des coques lactiques.

3.2 Caractérisation physiologique et biochimique des bactéries lactiques :

Au total, 7 coques lactiques ont été pré-identifiés à *Leuconostoc* en se basant sur leur morphologie. Les résultats de caractérisation des bactéries par des méthodes phénotypiques sont regroupés dans le **tableau 10** et le **tableau 11**. La **figure 12** illustre des exemples de ces résultats.

Tableau 10 : Caractérisation physiologique des bactéries étudiées.

Souches	Températures (°C)				pH		[NaCl] (%)			Thermorésistance (60°C, 30 minutes)
	10	30	37	45	5	9.6	6.5	10	15	
L4	±	+	±	±	±	-	±	-	-	-
L5	-	+	±	-	-	-	±	-	-	-
L6	±	+	-	-	-	-	+	±	-	-
V1	+	+	±	-	±	-	-	-	-	-
V2	-	+	±	±	-	-	±	-	-	-
V3	±	+	±	±	-	-	-	-	-	-
V4	±	+	±	-	±	-	±	-	-	-
V5	-	+	±	±	±	-	-	-	-	-
VO18	-	+	±	-	-	±	±	-	-	-
VO17	-	+	±	-	±	-	-	-	-	-
VO12	-	+	±	±	-	-	-	-	-	+
VO4	-	+	±	±	±	-	+	+	-	-

+ : bonne croissance, - : pas de croissance, ± : faible croissance.

A partir de ces résultats, plusieurs observations peuvent être faites :

- A 10°C, 37°C et à 45°C : l'ensemble des bactéries testées sont incapables de se développer à 10°C et à 45°C mais poussent faiblement à 37°C, à l'exception de la souche L6. Ceci montre qu'elles sont mésophiles.
- A 30°C : toutes les bactéries croissent à 30°C.
- Aux pH 5 et 9.6 : la majorité des souches poussent légèrement dans un milieu acide. Par ailleurs, aucune croissance n'est constatée en milieu alcalin, excepté pour la souche VO18.
- A 6.5, 10 et à 15% de NaCl : la majorité des bactéries résistent faiblement à 6.5% NaCl. Les isolats L6 et VO4 sont les plus résistants. D'après **Zadi-Karam et Karam (2006)**, les bactéries qui croissent dans le lait camelin sont adaptées à sa salinité et peuvent par conséquent être exploitées dans les transformations technologiques et dans la fermentation des produits salés tels les fromages salés, les olives et les concombres.

VO4 et L6 croissent en présence de 10% NaCl. Aucune croissance n'est observée à 15% NaCl.

Nous pouvons noter que les souches V1, V5, VO18 et VO17 isolées de la viande sont sensibles à toutes les concentrations de NaCl testées.

- L'incubation des cultures à 60°C pendant 30 minutes a permis de révéler que la souche VO12 est thermorésistante.

Tableau 11 : Caractérisation biochimique des bactéries.

Souches	Het	Lait de Sherman		ADH	Esc	Acétoïne	Cit	CO ₂ /Cit	Hémolyse
		0.1%	0.3%						
L4	+	-	-	-	+	-	±	±	γ
L5	+	+	+	-	+	-	±	±	γ
L6	+	-	-	-	+	-	-	-	γ
V1	+	-	-	-	+	-	+	+	γ
V2	+	-	-	-	+	-	-	-	γ
V3	+	-	-	-	+	-	-	-	γ
V4	+	-	-	-	+	-	-	-	γ
V5	-	+	+	-	+	-	+	+	γ
VO18	-	±	-	-	-	-	-	-	γ
VO17	-	-	-	-	-	-	+	+	γ
VO12	-	+	+	-	±	-	±	±	γ
VO4	-	-	-	-	+	-	-	-	γ

+ : réaction positive, - : réaction négative, Het : hétérofermentaire, ADH : arginine dihydrolase, Esc : esculine, Cit : citratase, CO₂/Cit : dégagement du CO₂ à partir du citrate.

A partir du **tableau 11** et de la **figure 12**, plusieurs remarques peuvent être faites :

- Type fermentaire : tous les isolats lactiques sauf VO18, VO17, VO12, VO4 et V5 produisent du gaz (CO₂) à partir du glucose, accumulé dans la cloche de Durham. Ces bactéries sont donc hétérofermentaires, ce qui est un caractère spécifique pour *Leuconostoc*. Ceci est renforcé par le test de l'ADH qui s'avère négatif pour ces bactéries (Mathot *et al.*, 1994). Les souches VO18, VO17, VO12, VO4 et V5 sont homofermentaires.
- Lait bleu de Sherman : quelques souches (L5, V5 et VO12) réduisent le milieu lait contenant 0.1% et/ou 0.3% de bleu de méthylène. La souche VO18 le réduit légèrement à une concentration de 0.1%.

Concernant les autres souches testées, la couleur du lait demeure bleue car elles sont incapables de le réduire.

- ADH: toutes les souches n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine vue l'absence de l'enzyme ADH (ADH⁻). Ceci confirme le résultat d'hétérofermentation qui suggère l'appartenance de la totalité des bactéries testées au genre *Leuconostoc*.
- Esc : toutes les souches sont capables d'hydrolyser l'esculine, traduite sur gélose à esculine par un noircissement, excepté pour VO18 et VO17, qui sont donc Esc⁻.
- VP : absence totale d'anneau rouge à la surface du milieu, ce qui indique que nos souches ne sont pas productrices d'acétoïne (VP⁻).
- Cit et CO₂/Cit : l'utilisation du citrate se manifeste par une coloration bleue sur milieu KMK et par une production du gaz sur lait additionné de citrate. Le caractère de la fermentation du citrate semble être variable chez les souches étudiées. Trois souches (V1, V5 et VO17) fermentent le citrate et produisent du CO₂ d'une façon importante. Par contre, les souches (L4, L5 et VO12) dégradent moyennement le citrate avec un dégagement relativement faible de CO₂. La quantité du CO₂ dégagé est proportionnelle à la quantité de citrate consommé et dépend de la souche étudiée.
- Hémolyse : absence d'halo clair autour de la colonie, ce qui montre que les bactéries sont de type γ hémolytique et ne présentent, en conséquence, aucun caractère de pathogénicité.
- ✘ En récapitulant les résultats de la caractérisation phénotypique, les isolats codés (L4, L5, L6, V1, V2, V3 et V4) présentent une forme lenticulaire, un caractère hétérofermentaire, hydrolysent l'esculine, ne produisent pas l'acétoïne, n'hydrolysent pas l'arginine, certains se développent à 45°C et en présence de 6.5% de NaCl, alors que la plupart croissent faiblement à 37°C, fermentent le citrate avec production du CO₂ ainsi que leur aptitude à synthétiser les EPS. Ces caractéristiques rattachent ces isolats au genre *Leuconostoc* (Novel, 1993 ; Mathot *et al.*, 1994 ; Larpent *et al.*, 1997 ; Bjökroth et Holzapfel, 2006 ; Ogier *et al.*, 2008).
- ✘ Par contre, les souches restantes (VO18, VO17, VO12, VO4 et V5), ont une forme cocci, un métabolisme homofermentaire, thermosensibles, la majorité ne pousse ni à 45°C, ni à 6.5% de NaCl, ni à pH 9.6 mais réduit le bleu de méthylène. Nous pouvons donc suggérer que les souches codées VO18, VO12 et V5, appartiennent au genre *Lactococcus*. Cependant, cette pré-identification à un genre bactérien est à confirmer.

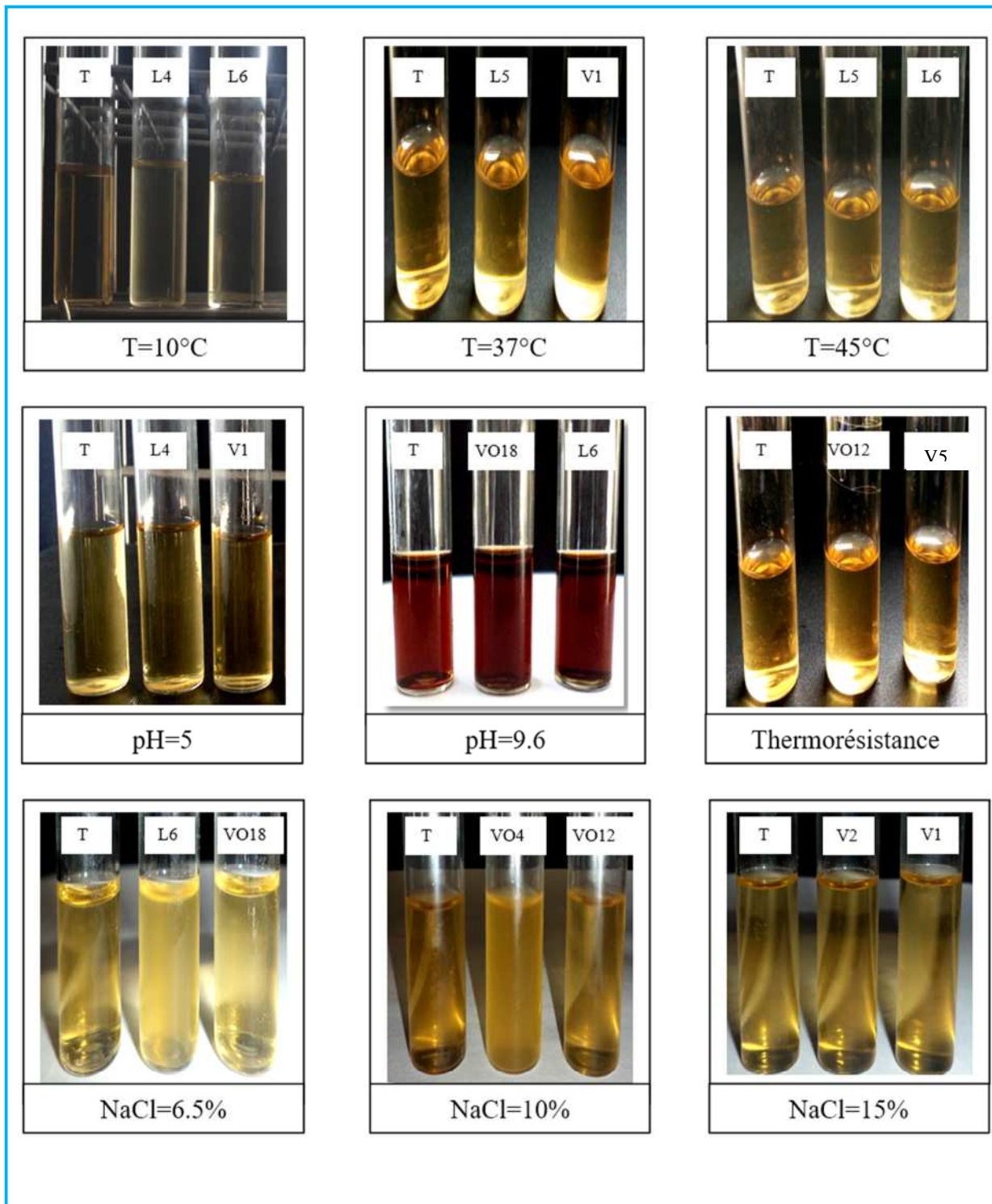


Figure 12: Tests de caractérisation phénotypique des bactéries.
T : témoin.



Figure 12 (suite): Tests de caractérisation phénotypique des bactéries.
 T : témoin ; Arg⁻ : sans arginine ; Arg⁺ : avec arginine ; BM : bleu de méthylène.

3.3 Caractérisation du profil de fermentation des carbohydrates :

Selon leur potentiel de production d'EPS, cinq souches ont été choisies pour inoculer des galeries biochimiques API 50 CH en vue d'étudier leur profil fermentaire. Les **tableaux 12** et **13** montrent les résultats obtenus. Ces profils ont été traités à l'aide du logiciel d'identification apiwebTM qui permet l'identification des bactéries.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

- L'étude comparative de la fermentation des hydrates de carbone par certains coques lactiques a révélé des profils fermentaires plus ou moins différents au sein de la même espèce. C'est par exemple le cas de la souche V3 qui dégrade le galactose alors que L6 ne le fermente plus. Cette observation a été notée par **Karam (1995)** ; **Zadi-Karam (1998)** et **Kacem et al. (2002)** qui ont rapporté que les bactéries lactiques appartenant à la même espèce peuvent présenter des profils fermentaires différents.
- Les coques (L4, L5, L6 et V3) pré-identifiés préalablement comme *Leuconostoc* ont la capacité de dégrader le glucose, le fructose, le lactose, le saccharose, le raffinose, le L-arabinose et les autres carbohydrates (**Tableau 12**). **Idoui et al. (2009)** ont remarqué que les souches SB20 et SB25 de *Ln. mesenteroides* étaient capables de fermenter le raffinose, le lactose ou le saccharose mais pas l'arabinose. **Belkheir (2017)** a constaté que des espèces de *Ln. mesenteroides* étaient incapables de fermenter le L-arabinose et le raffinose.
- La souche V5 est capable d'hydrolyser les sucres cités auparavant sauf le L-arabinose.
- Les isolats lactiques codés L4, L5, L6 et V3 sont identifiés phénotypiquement à l'aide du logiciel apiwebTM en tant que *Ln. mesenteroides* avec un pourcentage de ressemblance supérieur à 99% et la souche V5 comme étant *Lc. raffinolactis* avec 96.7% de similitude.

Tableau 12: Profils fermentaires de certains coques lactiques.

Souche \ Sucres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49								
L4	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-					
L5	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
V3	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
V5	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : réaction positive, - : réaction négative.

- 0: Témoin
- 1: Glycérol
- 2: Erythritol
- 3: D-arabinose
- 4: L-arabinose
- 5: Ribose
- 6: D-xylose
- 7: L-xylose
- 8: Adonitol
- 9: β-Méthyl-xyloside

- 10: Galactose
- 11: Glucose
- 12: Fructose
- 13: Mannose
- 14: Sorbose
- 15: Rhamnose
- 16: Dulcitol
- 17: Inositol
- 18: Mannitol
- 19: Sorbitol

- 20: α-Méthyl-mannoside
- 21: α-Méthyl-glucoside
- 22: N-acétyl-glucosamine
- 23: Amygdaline
- 24: Arbutine
- 25: Esculine
- 26: Salicine
- 27: Cellobiose
- 28: Maltose
- 29: Lactose

- 30: Mélibiose
- 31: Saccharose
- 32: Tréhalose
- 33: Inuline
- 34: Melezitose
- 35: Raffinose
- 36: Amidon
- 37: Glycogène
- 38: Xylitol
- 39: Gentiobiose

- 40: D-turanose
- 41: D-lyxose
- 42: D-tagatose
- 43: D-fucose
- 44: L-fucose
- 45: D-arabitol
- 46: L-arabitol
- 47: Gluconate
- 48: 2-céto-gluconate
- 49: 5-céto-gluconate

Tableau 13 : Identification de coques lactiques donnée par le logiciel apiweb™.

Souches	Identifiée à	Pourcentage de similitude
L4	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp.	99.7%
L5	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp.	99.1%
L6	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp.	99.9%
V3	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp.	99.7%
V5	<i>Lc. raffinolactis</i>	96.7%

3.4 Recherche de souches productrices d'EPS :

Comme mentionné au début de cette partie, les souches lactiques utilisées ont été évaluées par rapport à leur potentialité à produire les EPS, ceci afin de sélectionner les plus performantes.

3.4.1 Etude qualitative :

3.4.1.1 Examen visuel :

Selon **Welman *et al.* (2003)** ; **Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan (2005)** ; **Sanchez *et al.* (2005)** et **Nieto-Arribas *et al.* (2010)**, le procédé de sélection des souches bactériennes productrices d'EPS repose fondamentalement sur le développement de l'aspect mucoïde des colonies sur différents milieux gélosés. La taille de ces colonies mucilagineuses est appréciée pour déterminer macroscopiquement les isolats les plus performants pour cette activité.

Cette détection macroscopique a été réalisée sur des milieux MRS et M17 dont la composition osidique est modifiée (2% glucose, 0.5% lactose ou 5% saccharose). Les milieux GMRS et LM17 sont utilisés respectivement pour la croissance des lactobacilles et des coques lactiques et serviront de témoins. Le **tableau 14** montre les résultats obtenus pour la détection du caractère mucoïde et gluant des EPS produits par certaines souches sur milieux solides. La **figure 13** montre des exemples de l'aspect macroscopique des colonies de certaines de ces souches lactiques sur les mêmes milieux.

Tableau 14 : Caractère mucoïde et gluant des EPS sur différents milieux gélosés.

Souches	LM17	M17HS	GMRS	MRSHS
L4	-	+++	-	++
L5	-	+++	-	++
L6	-	+++	-	++
V1	-	+++	-	+
V2	-	++	-	+
V3	-	+++	-	++
V4	-	++	-	+
V5	-	+++	-	+
VO18	-	++	-	+
VO17	-	++	-	+
VO12	-	++	-	+
VO4	-	++	-	+
Autres coques lactiques	-	-	-	-
Tous les lactobacilles	-	-	-	-

+++ : hautement mucoïde, ++ : moyennement mucoïde, + : faiblement mucoïde, - : non-mucoïde.

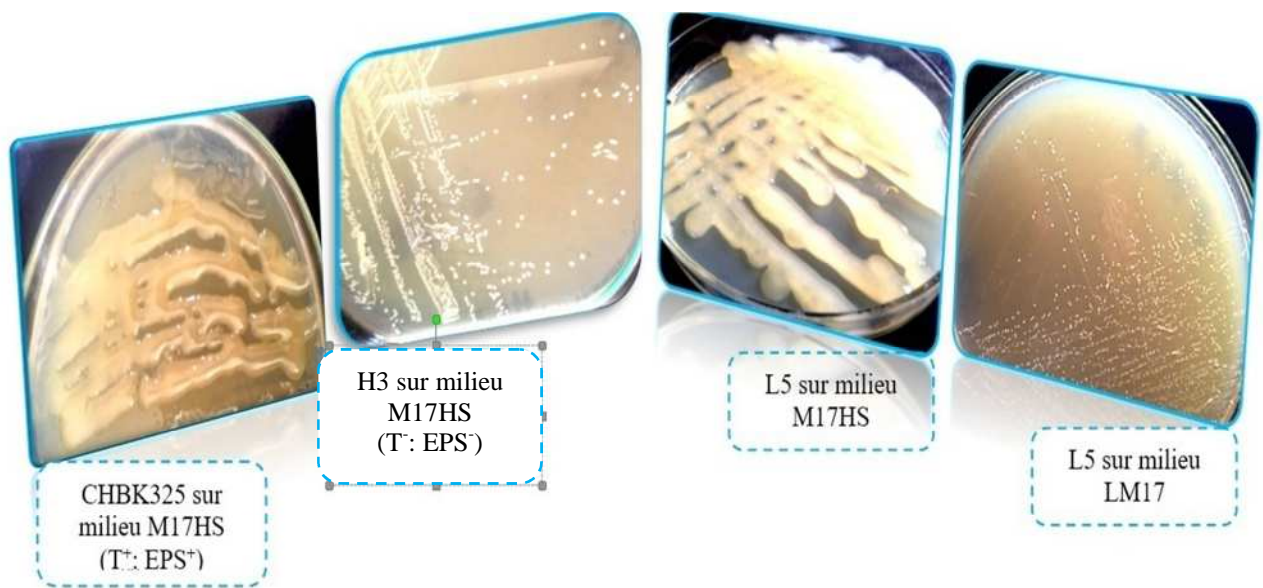




Figure 13 : Aspect macroscopique des colonies de souches lactiques sur milieux solides.
T : souche témoin

Les remarques suivantes peuvent être notées :

- Douze souches de coques lactiques sur les 165 testées sont capables de produire des polymères exocellulaires sur milieux hypersaccharosés solides. **Smitinont et al. (1999)**, étudiant 104 isolats lactiques provenant de divers aliments fermentés traditionnels Thaïlandais, ont rapporté que seuls les cocci étaient capables de produire des EPS sur milieux solides et liquides contenant du saccharose. De plus, divers auteurs (**van den Berg et al., 1993 ; van Geel-Schutten et al., 1998 ; Sanni et al., 2002**) ont signalé la rareté des colonies muqueuses et la diminution de la biodiversité des bactéries lactiques productrices d'EPS, en particulier celles appartenant à l'espèce *S. thermophilus*. A titre d'exemple, l'étude faite par **Van der Meulen (2007)** montre que seulement dix isolats parmi 174 isolats de bactéries lactiques se sont avérés producteurs d'EPS.
- Les douze souches testées dans ce travail ont été isolées de lait de chamelle ou de viande fraîche (L4-6, V1-V5, VO4-18). D'après **Patil et al. (2015)**, le lait est l'environnement favorable à la sécrétion d'EPS de plusieurs souches de bactéries lactiques. Sur les produits à base de viande, la croissance des bactéries lactiques entraîne l'apparition de substance visqueuse à cause de la production de polysaccharides (**Labadie, 1999 ; Vermeiren et al., 2005**).
- Les colonies bactériennes apparaissent sur ces milieux hypersaccharosés sous forme de grosses colonies gluantes et de tailles différentes. Cet aspect, semblable au témoin

positif (CHBK325), est typiquement lié aux colonies des bactéries productrices d'EPS. Ce phénotype a été décrit par **Dupont (1998)**.

- Nos résultats révèlent que les coques présentent le caractère mucoïde et gluant mais non filant sur ces milieux gélosés. **Tidona et al. (2016)** ont constaté que les colonies bactériennes de *S. thermophilus* EPS⁺ cultivées sur milieu gélosé M17 n'ont pas montré le phénotype filant. Selon **Vedamuthu et Neville (1986)** ; **Kojic et al. (1992)** ; **Dierksen et al. (1997)** et **Ruas-Madiedo et De Los Reyes-Gavilan (2005)**, les souches mucoïdes ou slimes ne sont pas toutes visqueuses parce que les colonies mucoïdes donnent un aspect scintillant et gluant sur les milieux solides mais ne produisent pas de filaments visqueux.
- Le caractère mucoïde varie d'une souche à l'autre et est plus important sur milieu M17HS que sur MRSHS. Ce dernier est préconisé pour les lactobacilles producteurs d'EPS. Par conséquent, le milieu M17HS est favorable à la détection visuelle des souches mucoïdes de coques lactiques. La même observation a été faite par **Benasla (2012)** et **Kersani (2013)** qui ont rapporté que le milieu MRSHS est privilégié pour la mise en évidence de la production d'EPS par les lactobacilles. D'après **Guzel-Seydim et al. (2005)** et **Ismail et Nampoothiri (2010)**, les EPS de bactéries lactiques sont d'une grande variété dépendant du type de souches, des conditions de culture et de la composition du milieu.
- Les lactobacilles nouvellement isolés du lait de chamelle et de la viande rouge (neuf souches) étaient inaptes à synthétiser des EPS (non-mucoïdes). Quant aux vingt bactéries de la collection du laboratoire LBMB, sélectionnées par **Benasla (2012)** comme étant EPS⁺ sur milieu MRSHS, nous n'avons trouvé aucune colonie mucoïde sur des milieux hypersaccharosés, bien que leur croissance soit importante (**Figure 19**). Ces résultats pourraient s'expliquer par une perte du caractère épaississant due à son instabilité. Ceci est en accord avec les observations de **Kersani (2013)**, sur la perte du caractère mucoïde par la souche de lactobacille LVK11.
- Plusieurs auteurs ont rapporté l'instabilité de la production d'EPS (**Macura et Townsley, 1984** ; **Cerning et al., 1988** ; **Cerning et al., 1992** ; **Degeest et De Vuyst, 1999**) à la suite d'une série de repiquages ou d'une incubation prolongée (**Macura et Townsley, 1984** ; **Cerning et al., 1990** ; **Garcia-Garibay et Marshall, 1991**). De même, il peut y avoir dégradation des EPS par des glycohydrolases extracellulaires durant l'entreposage (**Macura et Townsley, 1984** ; **Cerning et al., 1988** ; **Degeest et De Vuyst, 1999** ; **Petry et al., 2003**) ou une instabilité génétique comme la perte du gène de production d'EPS (**Jolly et Stinglele, 2001**).
- ♣ Repiquage successifs de souches : La diminution ou la perte du caractère épaississant lors de repiquages subséquents ne semble pas associée à une diminution de croissance. D'après **Garcia-Garibay et al. (1991)** une souche de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

peut perdre son caractère épaississant lorsque repiquée plusieurs fois dans le lait alors que la population se maintient entre 5×10^7 et 1×10^8 UFC/ml.

- ♣ Présence de glycohydrolases: Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les polysaccharides dans du lait ou un autre produit laitier. Cette hypothèse était rapportée pour la première fois par **Cerning et al. (1988)** dans une étude sur les EPS des bactéries lactiques mésophiles dont le contenu d'un échantillon en EPS chauffé à 90°C pendant 10 minutes a été comparé au contenu d'un autre échantillon natif (non traité). Par conséquent, la concentration en EPS était de 40% plus élevée lorsqu'un traitement thermique est appliqué avant l'extraction.
- ♣ Perte du gène : les gènes codant pour la production d'EPS sont généralement localisés sur des plasmides des bactéries lactiques mésophiles (exemples *Lc. lactis*, *Leuconostoc*) (**Kleerebezen et al., 1999 ; Chamba, 2008**) ou sur le chromosome des bactéries lactiques thermophiles (exemples *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*) (**Gassem et al., 1997 ; Faber et al., 1998, 2001**).

Pour les souches mésophiles, plusieurs auteurs ont attribué cette instabilité à la perte du plasmide codant pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse des polysaccharides, engendrant la perte de production d'EPS (**Kojic et al., 1992 ; Lonvaud-Funel et al., 1993 ; van Kranenburg et de Vos, 1998 ; van Kranenburg et al., 2000**). La présence de séquences d'insertion dans le locus *eps* et des réarrangements génétiques, les transferts horizontaux intra- et inter-espèces durant des cultures mixtes, pourraient être à l'origine d'un arrêt de la production d'EPS chez les souches thermophiles (**Gancel et Novel, 1994 ; Stinglele et al., 1996 ; Bourgoïn et al., 1999**).

- ✘ Au vu de ces résultats, douze souches de coques lactiques productrices d'EPS ont été retenues pour la suite de cette étude en se basant sur leur phénotype mucoïde. Celui-ci s'avère simple et pratique pour détecter la production d'EPS, mais est malheureusement très peu sensible (**Ruas-Maldiedo et de los Royes-Gavillan, 2005**). Il faut donc d'autres méthodes plus efficaces pour étudier le caractère mucoïde.

3.4.1.2 Coloration au Rouge de Ruthénium :

La production d'EPS a été évaluée par la couleur de la colonie cultivée sur gélose au lait enrichie en extrait de levure et saccharose et additionnée de rouge de ruthénium. L'utilisation de ce colorant cationique qui ne présente pas d'affinité pour les EPS excrétés, permet de sélectionner les colonies Muc⁺ qui apparaissent blanchâtres. **Bouzar et al. (1995)** ont utilisé cette technique pour la sélection de clones d'une souche de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* produisant différents polysaccharides extracellulaires. De cette même façon, **Stringele et al. (1996)** ont sélectionné une souche de *S. thermophilus* possédant le caractère de production d'EPS.

Contrairement au témoin négatif (souche H3) qui apparaît rose, les douze bactéries sélectionnées donnent des colonies blanchâtres sur le fond rose du milieu. La couleur blanchâtre vient du fait que les EPS produits empêchent le colorant de teinter le peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries (**Figure 14**). **Mora et al. (2002)** ont constaté que la moitié des souches de *S. thermophilus* analysées pouvaient se développer sous la forme de colonies blanches ou roses dans un milieu solide lait écrémé supplémenté du rouge ruthénium, indiquant leur capacité à produire des EPS.

L'intensité de la couleur blanche est variable d'une souche à l'autre, révélant des capacités différentes de production d'EPS indiquant ainsi la synthèse et la sécrétion des EPS, ce qui implique la confirmation du caractère mucoïde de ces souches (Muc⁺).

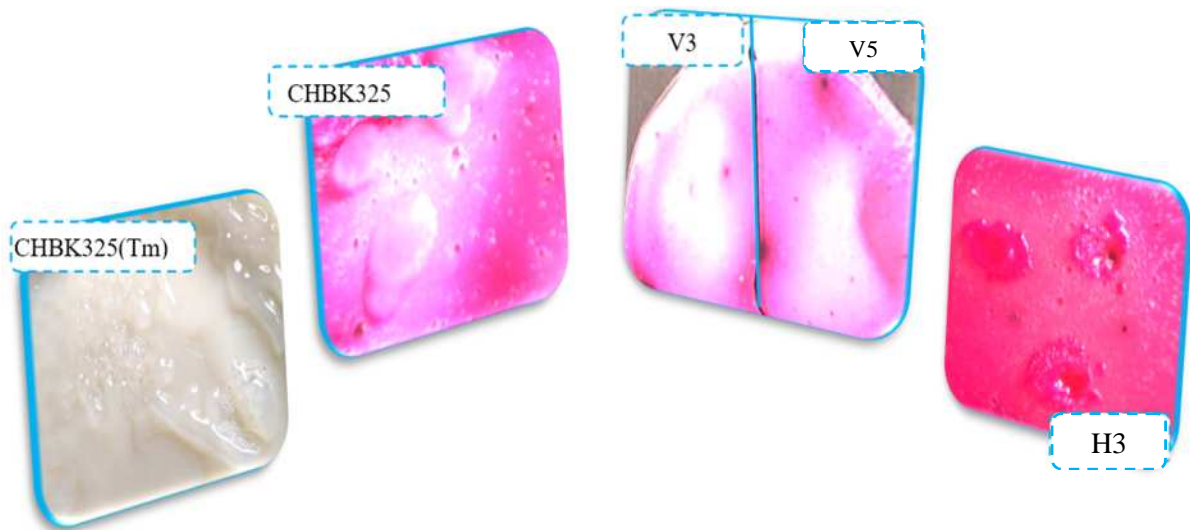


Figure 14 : Colonies blanches et roses sur gélose au lait écrémé additionnée de rouge ruthénium.

Tm : milieu témoin : milieu à base de lait écrémé supplémenté d'extrait de levure, de saccharose et sans colorant.

3.4.2 Etude quantitative de la production d'EPS

3.4.2.1 Mesure des viscosités :

La viscosité est déterminée à l'aide d'un viscosimètre à chute de bille. La mesure de la viscosité a été utilisée pour estimer la production d'EPS d'une bactérie dans un milieu liquide (**Cerning et al., 1986, 1988**). La croissance microbienne a permis d'estimer la biomasse sur le même milieu fermenté (BMMHS) afin de la rapporter à la viscosité apparente. La viscosité intrinsèque des EPS a été évaluée après les avoir extraits et purifiés selon la méthode de **Cerning et al. (1994)**. Le **tableau 15** représente les résultats obtenus. La **figure 15** montre l'aspect filant de souches L4 et L5 sur bouillon BMMHS.

Le milieu BMMHS est choisi pour minimiser les interférences possibles dues au milieu de culture. Certains composés tels les mannanes contenus dans l'extrait de levure et la peptone trouvée dans les milieux complexes pourraient être considérés comme des composés contaminants, car ils sont inclus dans les calculs de composition en monomères et du rendement, et par conséquent fausser les résultats de dosage et d'analyse des EPS (**Garcia-Garibay et Marshall, 1991 ; Cerning et al., 1992 ; Kimmel et al., 1998 ; Torino et al., 2000 ; Ruas-Madiedo et al., 2005**).

Il a été montré par **Dupont (1998)**, **Benasla (2012)** et **Kersani (2013)** que l'utilisation du milieu BMMHS pour préparer l'inoculum de départ (pré-culture) ne permet pas l'obtention d'une population d'environ 10^9 bactéries par ml ($DO_{600nm} \approx 1$). Le LM17 est plus favorable à la croissance des coques lactiques et permet donc l'obtention d'une meilleure population de départ. C'est la raison pour laquelle, nous avons utilisé ce milieu pour la préparation de l'inoculum de départ dans le bouillon LM17.

Tableau 15 : Croissance des souches mucoïdes et viscosité apparente sur bouillon BMMHS ainsi qu'intrinsèque.

Souches	Croissance microbienne	Viscosité apparente η (mPa.s)		Viscosité intrinsèque η_i (m ³ /Kg)	
	DO=600nm	BMMHS	Eau distillée	Eau désionisée	
L4	0.694	2.90	1.08	1.53	
L5	0.564	2.80	1.56	1.79	
L6	0.815	2.70	2.95	2.44	
V1	0.771	1.80	ND	ND	
V2	0.588	1.40	ND	ND	
V3	0.664	2.10	1.53	1.71	
V4	0.763	2.40	ND	ND	
V5	0.210	2.20	2.16	1.61	
VO18	0.020	1.40	ND	ND	
VO17	0.280	1.60	ND	ND	
VO12	0.532	1.50	ND	ND	
VO4	0.136	2.30	ND	ND	
CHBK325	0.084	1.90	2.87	3.67	
H3	0.536	0.49	0	0	
Témoin non ensemencé	0	0.46	0	0	

ND : Non déterminé.

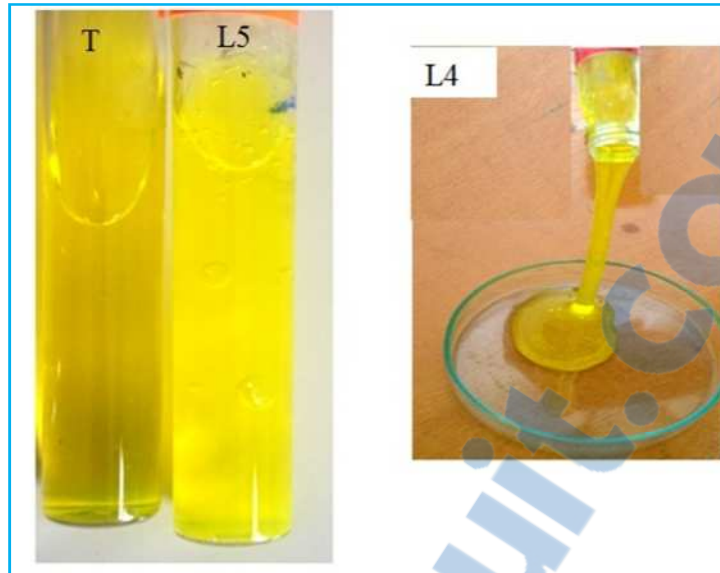


Figure 15 : Aspect filant des souches sur bouillon BMMHS.
T : témoin.

A partir de ces résultats, nous constatons que :

- Toutes les souches étudiées étaient capables de croître et de produire des EPS, comme montré par la mesure de viscosité indiquant la présence du phénotype filant (**Figure 15**), sur bouillon BMMHS, sachant qu'elles n'étaient pas filantes sur milieux solides. Ce milieu est riche en oligoéléments, vitamines, acides aminés et bases nécessaires à la croissance et à la production d'EPS (**Cerning et al., 1994 ; van den berg et al., 1995 ; Pham et al., 2000 ; Torino et al., 2000**). D'après **Béal et al. (2008)**, certaines bactéries lactiques sont capables de produire des EPS dont l'accumulation provoque alors une viscosité des milieux. Les souches de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *S. thermophilus* produisant des EPS sont utilisées en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (**Amatayakul et al., 2006 ; Durlu-Özkaya et al., 2007**).
- La croissance bactérienne et les deux types de viscosité des EPS varient considérablement d'une souche à l'autre. Il est important de se rappeler que la production d'EPS dépend d'abord de la souche étudiée, ce ne sont pas toutes les souches de bactéries à Gram⁺ qui produisent des polysaccharides qui sont excrétés dans le milieu et la production peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien (**Dupont, 1998**). D'autre part, elle est corrélée au volume occupé par les polysaccharides dans la solution, au poids moléculaire et à la conformation de la chaîne (rigidité et ramification) du polysaccharide (**Whistler et BeMiller, 1997 ;**

Faber et al., 1998 ; Tuinier et al., 2001 ; Petry et al., 2003 ; Girard et Schaffer-Lequart, 2007a ; Ayala-Hernández et al., 2009 ; Turgeon et Plesca, 2009).

- Les valeurs des viscosités sont différentes et élevées allant de 1.40 à 2.90mPa.s pour la viscosité extrinsèque et de 1.08 à 2.95m³/kg pour l'intrinsèque. Sachant que le milieu est considéré visqueux si la viscosité est supérieure à 1mPa.s (données du laboratoire El-Feth et **Tableau 15**), quand elle est inférieure à 0.5mPa.s le milieu demeure liquide (cas de la souche H3 suite à l'absence de la production d'EPS). Par contre, la DO est moins importante (DO<1). Cela signifie que la viscosité est inversement proportionnelle au taux de croissance pour certaines souches. Par exemple, la souche VO18 à DO=0.02 donne une viscosité apparente de 1.40mPa.s. Ceci indique que la croissance est presque nulle, tandis que la production d'EPS est favorisée, traduite par une augmentation de la viscosité. Selon **Ghazouli (2013)**, la bonne production bactérienne se traduit par un aspect visqueux des colonies filantes, tandis qu'une faible production bactérienne montre un aspect moins visqueux.
- Nos résultats permettent d'émettre l'hypothèse que pour ces souches la production d'EPS n'est pas liée à la croissance mais plutôt qu'il y a une compétition entre ces deux mécanismes. Ceci rejoint les observations de **Sutherland (1972)** et **Ramos et al. (2001)** qui ont noté l'existence d'une concurrence entre la production d'EPS et la biosynthèse du polymère de la paroi cellulaire.
- Deux souches peuvent avoir la même quantité d'EPS mais pas forcément le même taux de croissance et *vice versa*. Les deux souches (V4 et VO4) produisent des viscosités apparentes identiques, autour de 2.3mPa.s, quoique la biomasse est dissemblable : DO₆₀₀=0.763 pour V4 et DO₆₀₀=0.136 pour VO4.
- La viscosité apparente des EPS produits dans le bouillon BMMHS est supérieure à celle de la viscosité intrinsèque d'échantillons purifiés suspendus dans l'eau distillée ou déionisée, à l'exception de CHBK325 et L6.
- La comparaison des valeurs de la viscosité intrinsèque des EPS montre que la viscosité est plus significative chez les échantillons suspendus dans l'eau déionisée par rapport à l'eau distillée, sauf L6. C'est le cas pour la souche V5 dont la viscosité intrinsèque mesurée dans l'eau distillée est de 2.16m³/Kg et descend à 1.61m³/Kg dans l'eau déionisée. Ceci est dû à la différence de la viscosité dynamique (η) des échantillons d'EPS et des eaux utilisées (η_0) ainsi qu'aux minéraux contenus dans l'eau distillée qui ont une forte influence sur la production d'EPS (**Sutherland, 1982**). Par contre, ils sont absents dans l'eau déionisée.

3.4.2.2 Rendement en EPS :

Pour estimer la quantité des EPS dans un milieu fermenté, il faut utiliser une méthode de dosage spécifique. La meilleure façon de les doser quantitativement est de les extraire du milieu de culture.

Les polysaccharides bactériens extracellulaires précipitent en présence d'éthanol. L'addition d'un solvant organique au surnageant résulte en une précipitation de toutes les macromolécules, incluant les EPS de la solution. La précipitation avec l'éthanol s'est établie comme la méthode standard d'extraction des EPS (**Bermaiger, 2002**). Ces derniers sont ensuite dialysés et concentrés par lyophilisation et/ou évaporation, visant à retirer la plus grande partie d'eau ou autre liquide apportée lors de la dialyse.

Après les avoir purifiés pour enlever les protéines et les résidus du milieu pouvant interférer lors du dosage, il est possible de les doser par une méthode colorimétrique comme celle de **Dubois (1956)** à l'acide sulfurique et phénol. Les protéines présentes dans les extraits bruts d'EPS sont dosées selon la méthode de **Bradford (1976)**. La quantité des sucres et la qualité de ces extraits sont importantes (**Kimmel et al., 1998**) car la présence d'impuretés résiduelles peut modifier la fonctionnalité des EPS (**Gentès, 2011**).

Les courbes d'étalonnage sont tracées (**Figures 16 et 17**) pour déduire les concentrations en glucose et les quantités en protéines contenues dans chaque extrait brut d'EPS. La **figure 18** regroupe les résultats obtenus pour les deux procédés de concentration (lyophilisation ou évaporation) des EPS produits par les coques lactiques.

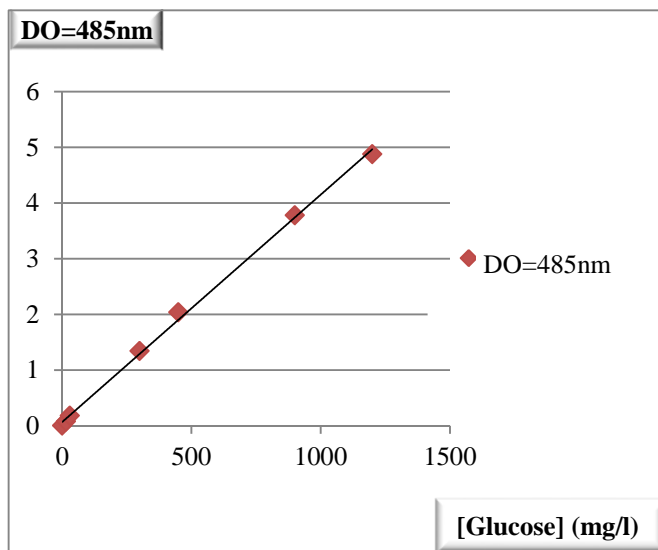


Figure 16 : Courbe étalon de dosage du glucose.

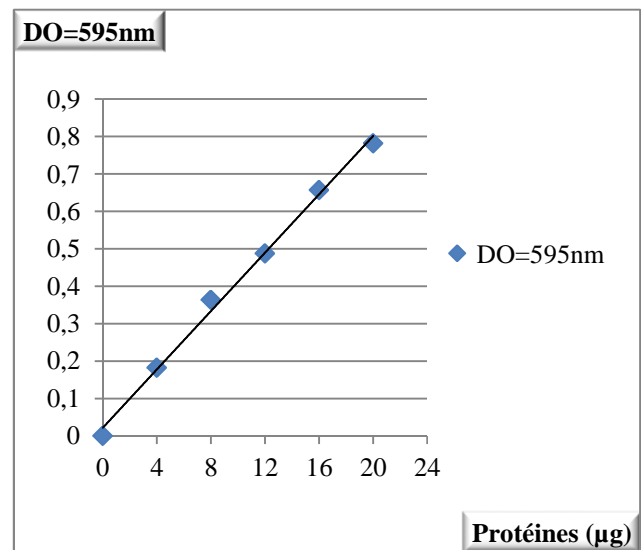


Figure 17 : Courbe étalon de dosage des protéines.

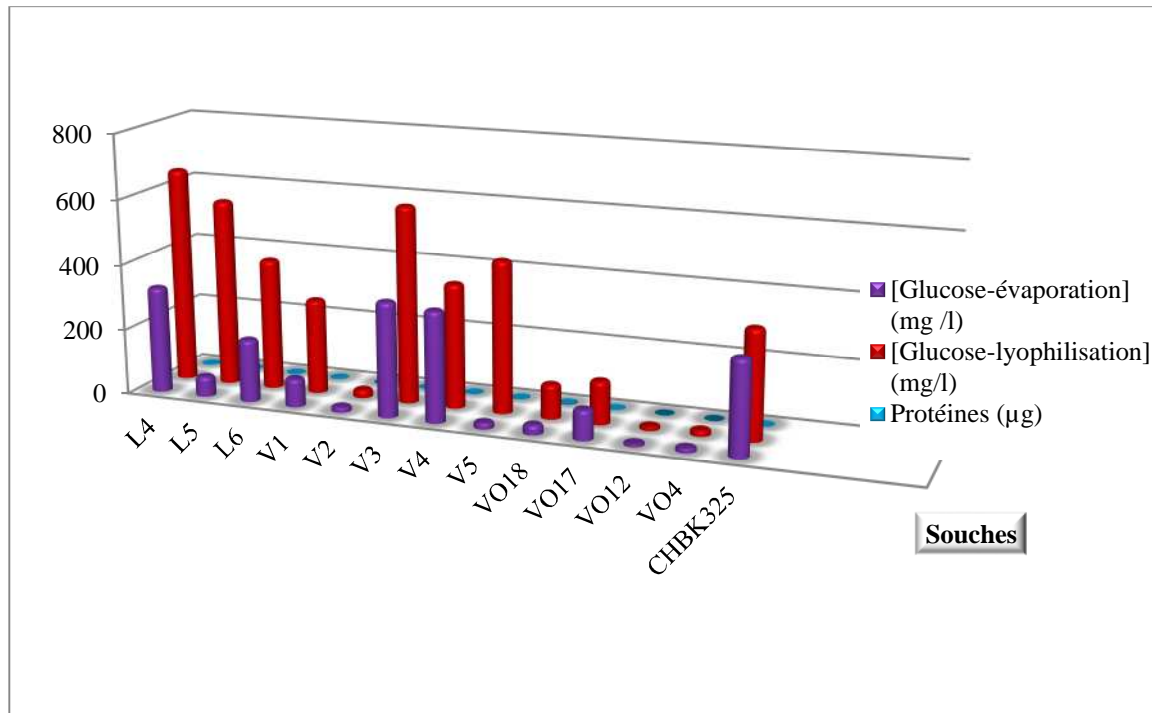


Figure 18 : Quantités d'EPS et de protéines dans les extraits bruts concentrés par deux procédés distincts.

A partir des résultats du dosage, nous constatons que :

- Le rendement de la production d'EPS est nettement plus important chez tous les échantillons concentrés par lyophilisation que par évaporation. Nous citons l'exemple de la souche L4 dont la quantité d'EPS mesurée par lyophilisation (658mg/l) est deux fois plus élevée que celle de l'évaporation (325mg/l). Ceci est dû soit à des pertes quantitatives des EPS dialysés lors de la condensation des vapeurs dans le réfrigérant, ainsi que le rejet dans le ballon de récupération de l'eau déionisée ou du TCA dont lequel ils étaient dissous, soit également à leur dégradation lors de l'ébullition des dialysats polysaccharidiques dans le ballon principal au cours de l'évaporation ou à la quantité d'inoculum de départ.
- Quel que soit le procédé de concentration utilisé, la quantité d'EPS varie énormément et dépend de la souche étudiée. La souche VO18 produit une quantité de 105mg d'équivalent glucose/l, alors que V5 en produit 462mg/l. Des observations similaires ont été faites par plusieurs auteurs (**Bouzar et al., 1997 ; Ludbrook et al., 1997 ; Grobber et al., 1998 ; Sanchez et al., 2004 ; Vijayenda et Sarath Babu, 2008 ; Badel et al., 2011 ; Benasla, 2012 ; El-Gizawy et al., 2013**), qui ont montré que la quantité d'EPS produite par des souches lactiques, notamment *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, peut varier considérablement d'une souche à l'autre.

- En comparant le **tableau 15** avec la **figure 18**, nous pouvons noter que certaines souches produisent des grandes quantités en EPS, et ont une viscosité apparente élevée. Le rendement le plus élevé en EPS est obtenu par la souche L4 (658mg/l) avec une viscosité apparente autant élevée (2.90mPa.s). **Han et al. (2016)** ont suggéré que les souches qui produisent beaucoup EPS pourraient contribuer à l'augmentation de la viscosité du lait fermenté.
- Pour d'autres souches (V2, VO4, etc.), il n'y a pas de corrélation claire entre la production d'EPS et les propriétés rhéologiques de ces polymères (viscosité). Sachant qu'il y a très peu d'études caractérisant les EPS sur les aspects rhéologiques (**Bergmaier, 2002**). Nos résultats rejoignent les observations faites par plusieurs auteurs (**Cerning et al., 1986; Wachter-Rodarte et al., 1993 ; Van Marle et Zoon, 1995 ; Petry et al., 2003 ; Iwański et al., 2012**). De même, **Sebastiani et Zelger (1998)** n'ont pas pu trouver un rapport entre la quantité d'EPS produite par différentes souches thermophiles et la viscosité du lait et du milieu M17 fermentés.
- La teneur des contaminants protéiques dans les extraits d'EPS de différentes souches est comprise entre 0.15 et 1.21µg. Ces taux sont nettement faibles comparativement à ceux des EPS qui sont compris entre 13 et 658mg/l. Ces derniers correspondent à ceux obtenus par **Ruas-Madiedo et al. (2002b) ; De Vuyst et al. (2003)** et **Vaningelgem et al. (2004)**, ayant observés des taux d'EPS aux alentours de 100mg/l pour *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ou compris entre 20 et 600mg/l avec *S. thermophilus*, mais nettement inférieurs à ceux de **Han et al. (2014)** qui étaient de 32g/l pour *Ln. mesenteroides* BD1710 cultivée sur milieu de jus de tomate additionné de saccharose.
- La concentration en EPS obtenue permet de limiter leur utilisation à l'échelle industrielle, ceci nécessite une amélioration de cette production et une bonne connaissance des conditions de biosynthèse. D'après **Doleyres et al. (2005)** l'utilisation des EPS comme ingrédients dans les produits fermentés dans lesquels ils ne sont pas produits naturellement, est limitée en raison de leur faible rendement de production (50 à 650mg/ml) et du coût élevé de leur récupération.
- Quant à la teneur en protéine, **Oda et al. (1983)** ont observé une petite quantité de protéines dans un polysaccharide isolé de *L. helveticus jugurti*. De même **Gentès (2011)** a détecté une faible quantité de protéines dans les échantillons d'EPS (<0.9mg/l). Par contre, **Savadojo (2004)** a trouvé des taux variables en protéines contenues dans les EPS extraits de différentes souches, compris entre 0.17mg/l (0.11%) et 6.35mg/l (2.08%).
- Les faibles quantités de protéines rencontrées lors de notre étude dans les extraits bruts d'EPS de coques lactiques dévoilent l'efficacité d'étape de purification au TCA. Ceci a permis d'éliminer la majeure partie de la teneur initiale en protéine, et par conséquent, cette dernière n'interfère pas dans le dosage par la méthode au phénol-acide sulfurique (**Gentès, 2011**).

✗ Les études quantitatives et qualitatives d'EPS nous ont permis de sélectionner les cinq coques lactiques identifiés aux espèces *Ln. mesenteroides* pour les souches (L4, L5, L6, V3) et *Lc. raffinolactis* pour V5, comme meilleures souches productrices d'EPS.

3.5 Optimisation de la production d'EPS :

Selon Dupont (1998), la production d'EPS peut être optimisée sous certaines conditions dans certains milieux définis.

3.5.1 Effet du pH et de la température :

L'étude de l'effet du pH et de la température sur la croissance et sur la production d'EPS a été estimée, respectivement, sur bouillons LM17t et BMMHSt par mesure de la densité optique et de la viscosité apparente (Figures 19 et 20).

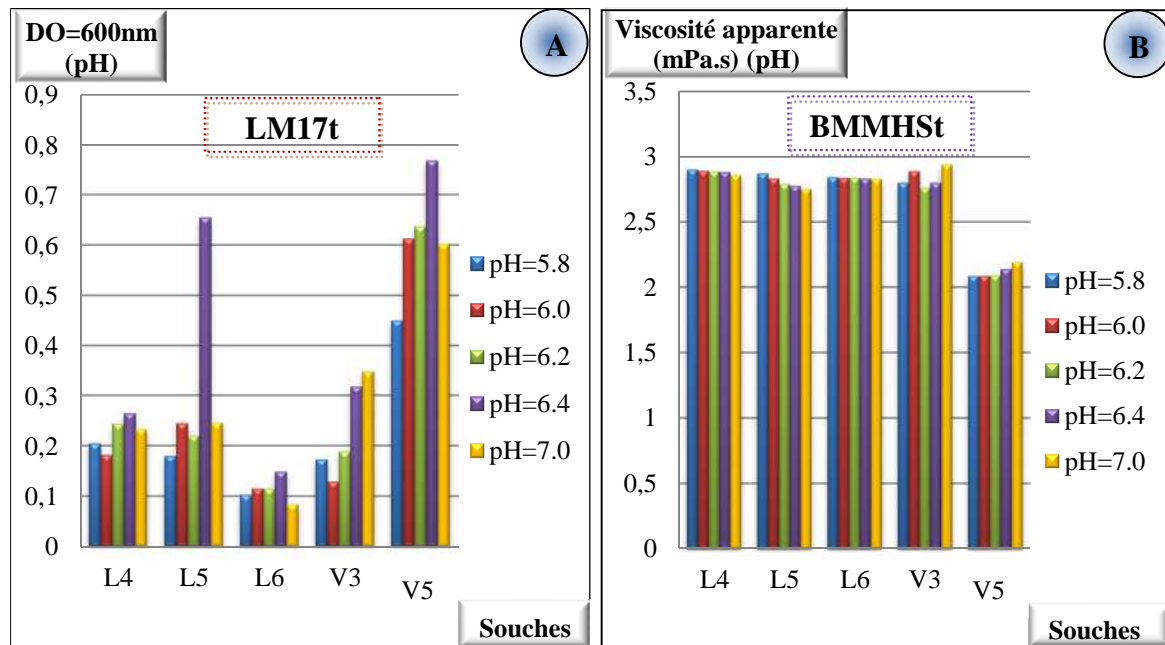
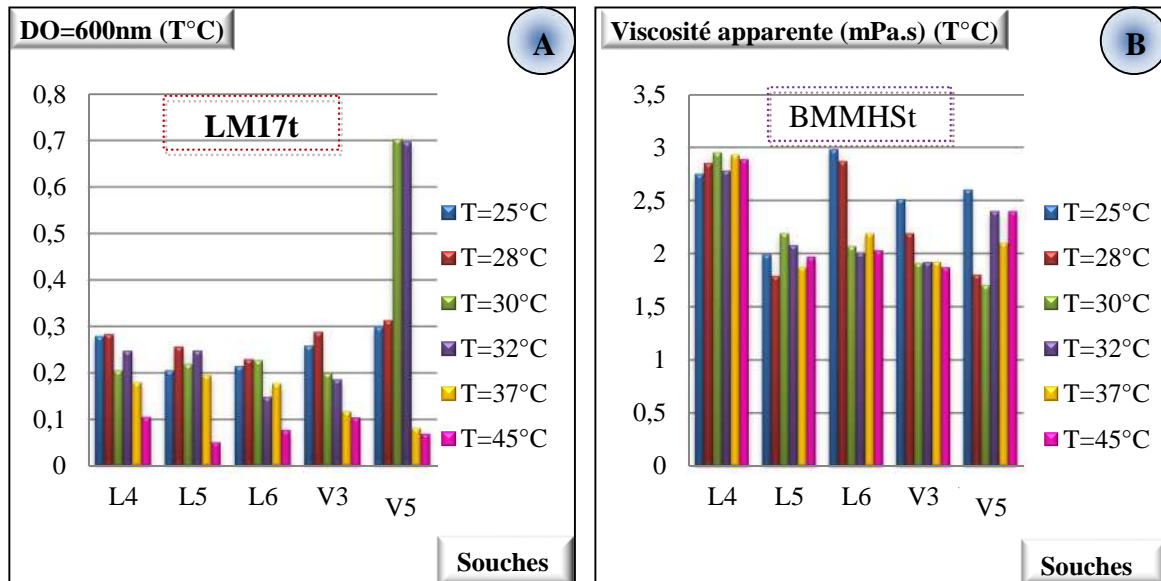


Figure 19 : Effet du pH sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).



Les remarques suivantes peuvent être notées :

- Les valeurs de densité optique révèlent une croissance faible ($DO < 0.8$) des coques lactiques cultivés sur bouillon LM17t quand ils sont soumis à différentes conditions physico-chimiques.
- Le pH optimum de croissance est de 6.4 pour toutes les souches testées, sauf pour V3 qui est de 7.0. La température optimale de croissance est de 28°C, excepté pour V5 qui est de 30°C.
- Les valeurs de la viscosité apparente sur milieu BMMHSt liquide sont élevées, quel que soit le paramètre étudié à n'importe quelle valeur. Elles se situent entre 2.09 et 2.94mPa.s pour le pH et entre 1.7 et 2.98mPa.s pour la température.
- Le pH optimum de production d'EPS est 5.8 pour l'ensemble des souches et 7.0 pour V3 et V5. La température optimale pour une meilleure viscosité d'EPS est de 25°C pour les bactéries L6, V3 et V5, et de 30°C pour les deux bactéries L4 et L5. Selon **Devoyod et Poullain (1998)** ; **Vijayendra et al. (2008)**, **Vijayendra et Sharath Babu (2008)**, **Joshi et Koijam (2014)** et **Lule et al. (2015)**, la croissance de *Ln. mesenteroides* sans production de dextrane est notée sur milieu dépourvue de saccharose alors que le maximum de biopolymères est obtenu à des températures de 13 à 25°C et pH de 6.5.
- ✗ Tous ces résultats montrent l'impact des paramètres physico-chimiques aussi bien sur la production d'EPS que sur la croissance bactérienne, en fonction de la bactérie

étudiée. **Racine (1991)** a montré que le pH optimal pour la production de polymères dépend des espèces concernées. La température a un effet sur la production d'EPS, en tenant l'exemple de la souche *Lc. cremoris* B35, qui produit une quantité supérieure d'EPS à 20°C qu'à 30°C dans un lait écrémé supplémenté avec de l'extrait de levures tandis que la souche *Lc. cremoris* B891 produit une quantité similaire d'EPS aux deux températures (**Ruas-Madiedo et De Los Reyes-Gavila, 2005**).

- Dans notre expérimentation le pH optimum de production de ces polymères est inférieur à celui de la croissance pour les trois souches L4, L5 et L6. Pour V5, il est supérieur à celui de la croissance alors qu'il est identique pour V3.
- L'étude des facteurs influençant la production de polysaccharides par les bactéries lactiques a permis de déterminer qu'en général un pH compris entre pH 6.0 et 6.5 est favorable à la production d'EPS (**Mozzi et al., 1994 ; Gassem et al., 1997 ; Kimmel et Roberts, 1998**). D'après **Wilkinson (1958)** les valeurs de pH proches de la neutralité sont les meilleures pour la plupart des souches productrices d'EPS. Chez les espèces de *Ln. mesenteroides*, la production maximale de dextrane est obtenue à un pH initial de 6.8 (**Moosavi-nasab et al., 2010**) ou de 7.0 (**Sarwat et al., 2008**). **Santos et al. (2005)** ont étudié l'effet du pH sur l'activité de la dextrane-sucrase, intervenant lors de la production de dextrane, enzyme isolée de *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F et ont révélé qu'un pH de 5.5 est approprié pour une activité enzymatique optimale pour une production maximale de dextrane.
- Dans notre étude, la température qui stimule la synthèse maximale d'EPS est supérieure à celle optimale pour la croissance de L4 et L5. Par contre, elle est inférieure pour les autres souches.
- Il a été rapporté que la température influence le rendement, la vitesse de production et la distribution de masse moléculaire du dextrane (**Jeanes, 1966**). Dans de nombreux cas, la production maximale d'EPS est obtenue à une température de production inférieure à la température optimale de croissance (**Sarwat et al., 2008 ; Devi et al., 2014**). De même, **Lule et al. (2016)** ont constatés que la production du dextrane par *Ln. mesenteroides* BA08, est maximale à 25°C, une valeur légèrement au-dessous de la température optimale de croissance.
- Cependant, **Garcia-Garibay et Marshall (1991)** ont trouvé une production spécifique d'EPS deux fois plus élevée pour une température (48°C) supérieure à la température optimale de la croissance de la souche *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (37 à 42°C). Toutefois, la production d'EPS est meilleure (120mg/l) à température élevée, soit entre 40 et 45°C alors que la croissance est ralentie (7×10^7 UFC/ml et 5×10^7 UFC/ml).

Puisque la croissance bactérienne étant ralentie, la production de composés pour le développement des cellules l'est aussi. Conséquemment, les transporteurs lipidiques sont moins sollicités et plus disponibles pour la synthèse d'EPS (**Cerning, 1995**).

3.5.2 Effet du milieu de culture :

La majorité des bactéries productrices d'EPS utilise un sucre comme source d'énergie et de carbone, et un sel d'ammonium ou des acides aminés comme source d'azote. Des ions comme le Mg^{2+} , K^+ , Fe^{3+} et Ca^{2+} qui agissent comme cofacteurs sont essentiels à la synthèse des polysaccharides (Sutherland, 1982).

Les sources nutritives souvent utilisées sont : le lait écrémé, le lactosérum enrichi ou non, un lait standardisé dans les fabrications de yogourt ou de fromage, un milieu semi-défini, un milieu chimiquement défini (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005 ; Behare *et al.*, 2009). Lule *et al.* (2016) ont montré que le milieu à base de lactosérum supplémenté de différents nutriments tels que le saccharose, l'extrait de levure et le K_2HPO_4 peut servir de milieu idéal pour la production de dextrane par les leuconostocs à l'échelle industrielle.

Dans le présent travail, la production d'EPS a été évaluée sur différents milieux gélosés (M17HS, lait écrémé enrichi et MSE) comprenant des sources nutritives variables en vue d'apprécier celui qui favorise une bonne production d'EPS caractérisée par un phénotype mucoïde important sur milieu solide. La **figure 21** montre l'influence du milieu de culture sur la production d'EPS.

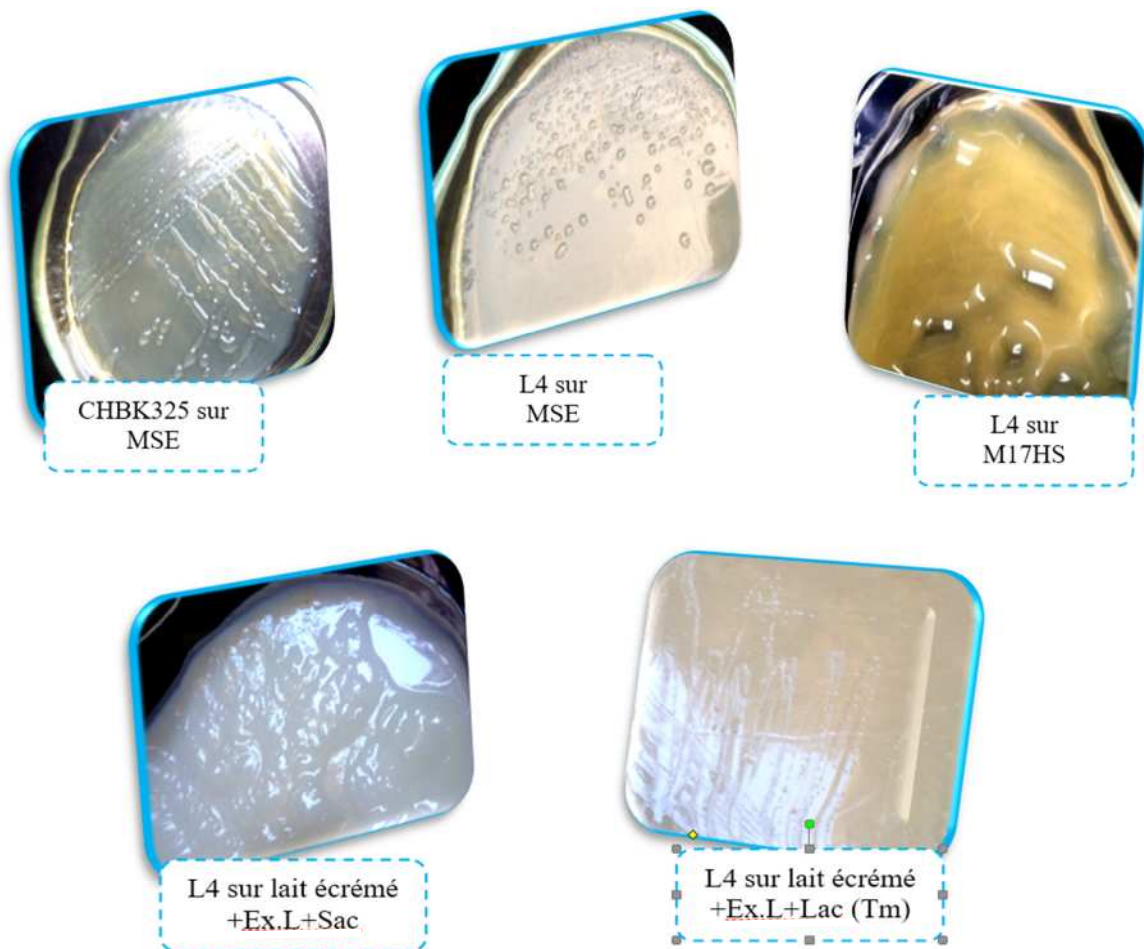


Figure 21 : Effet du milieu de culture sur la production d'EPS.

Ex.L : extrait de levure, Lac : lactose, Sac : saccharose, Tm : milieu témoin.

Plusieurs observations peuvent être faites:

- Pour une même souche, la production d'EPS est différente sur les milieux testés: MSE, lait écrémé enrichi (Ex.L+Sac) et M17HS. Le meilleur résultat est obtenu sur le troisième milieu où le caractère mucoïde développé est important, révélé par l'apparition des colonies de grande taille, transparentes, mucoïdes et gluantes. **Zhang et al. (2001)** ont rapporté que *S. thermophilus* ST1 produit une quantité maximale d'EPS sur lait écrémé saccharosé.
- Bien que le milieu MSE soit spécifique pour la production d'EPS par les leuconostocs, la production sur ce milieu était faible.
- Le milieu M17HS s'est avéré le plus favorable à la production d'EPS par les cinq coques lactiques testées. Ceci concorde avec les observations faites au début de ce travail sur l'importance du milieu M17HS solide pour la sélection des souches mucoïdes par observation macroscopique (voir section 3.4.1.1).

3.5.2.1 Effet des substrats carbonés :

L'influence de la source de carbone sur la production des EPS a été étudiée sur bouillon BMMt dont la source et les concentrations en carbone usées sont variables (lactose et saccharose) (**Figures 22 et 23**). Ces derniers sont utilisés comme seule source osidique.

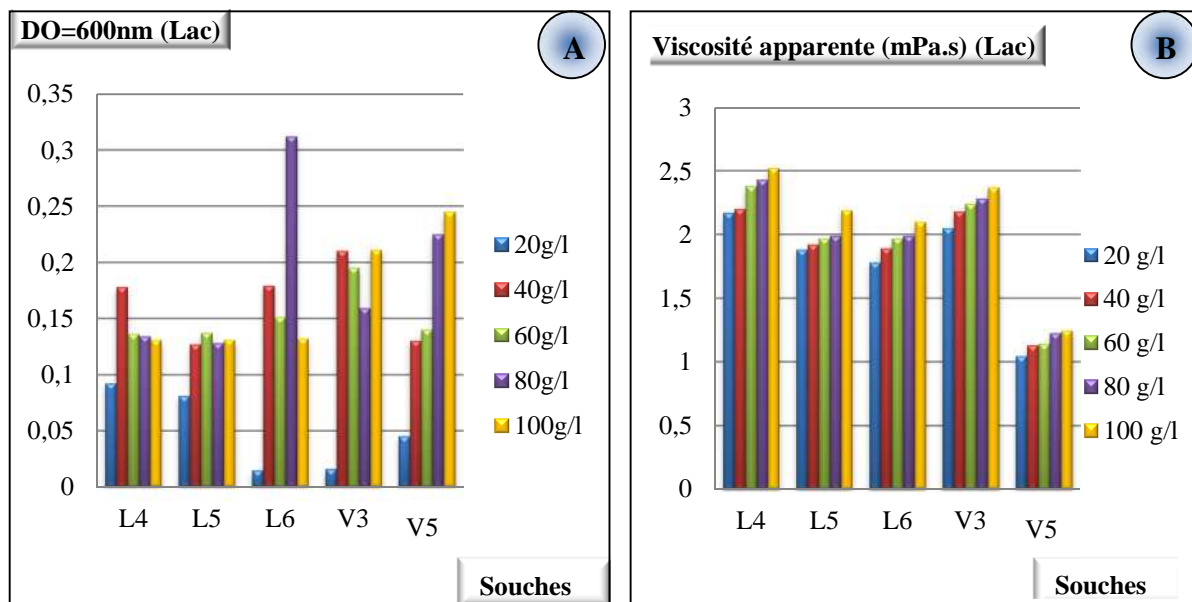


Figure 22 : Effet du lactose sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).

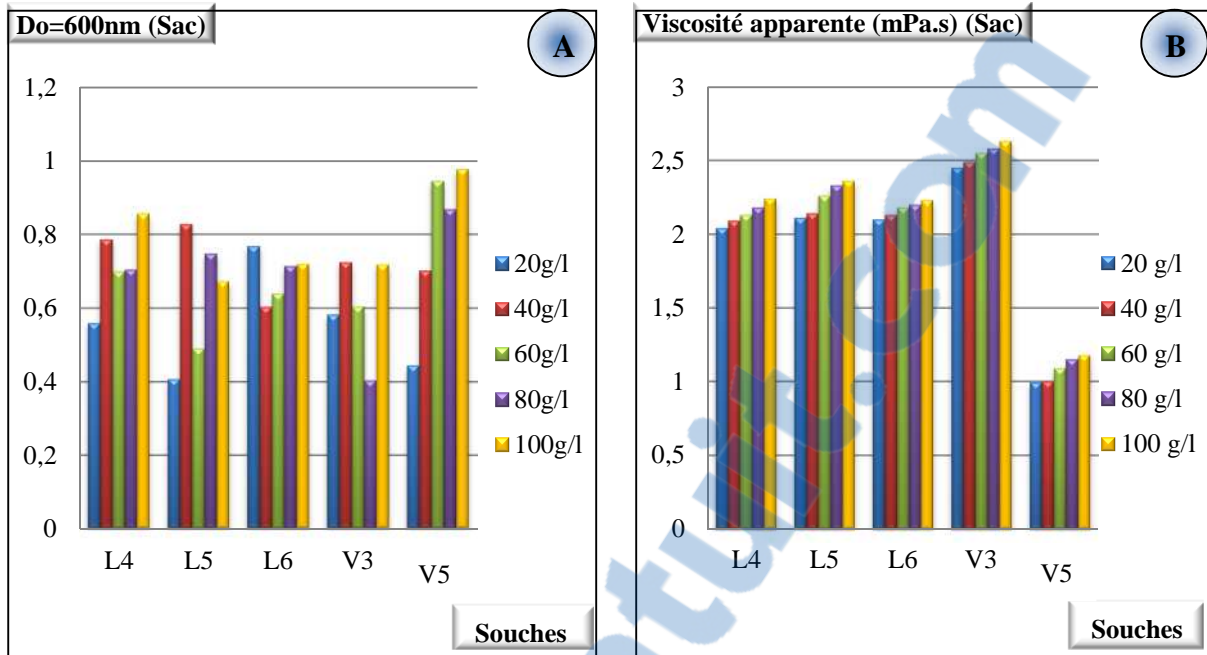


Figure 23 : Effet du saccharose sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).

Les observations suivantes peuvent être faites :

- La croissance microbienne est meilleure sur milieu BMMt saccharosé que lactosé.
- La viscosité varie en fonction de la taille des EPS qui est une fonction de la source de carbone (**Ghazouli, 2013**). Dans notre étude, les souches ont produit une viscosité apparente sur les deux substrats carbonés testés en milieu liquide alors qu'aucun phénotype mucoïde n'avait été constaté sur milieu gélosé contenant du lactose. Effectivement certaines souches de bactéries lactiques ne produisent pas de polymères sur un milieu gélosé mais en produisent en milieu liquide sous certaines conditions bien définie (**Dupont, 1998**).
- La viscosité du milieu est proportionnelle aux concentrations de lactose chez les souches étudiées, cela veut dire que plus la concentration de lactose est élevée plus le rendement en polysaccharide augmente. A titre d'exemple, L6 produit une viscosité apparente de 1.78mPa.s à une concentration en lactose de 20g/l alors qu'à une concentration de lactose de 100g/l, la viscosité atteint une valeur maximale de 2.1mPa.s.
- Une production abondante d'EPS est enregistrée en milieux contenant de fortes concentrations en saccharose (80 à 100g/l), pour la majorité des souches testées. Plusieurs auteurs (**Dupont, 1998 ; Kuntiya et al., 2010 ; Grosu-Tudor et Zambir, 2011 ; Benasla, 2012 ; Seesuriyachan et al., 2012 ; Lule et al., 2016 ; Belkheir, 2017**) ont observé la contribution du saccharose dans la production maximale

d'EPS par les souches lactiques. L'ajout de 100g/l de saccharose au milieu induit une surproduction très nette d'EPS chez certaines souches, bien que 75% n'utilisent pas le saccharose comme substrat de croissance (van Geel-Schutten *et al.*, 1998 ; Dimopoulou, 2013).

➤ Velasco *et al.* (2007) ont expliqué l'influence de la source de carbone sur la synthèse des biopolymères, celle-ci est liée à l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des EPS. L'activité de la perméase, enzyme nécessaire pour la pénétration des sucres, et l'activité de l'UDP-glucose pyrophosphorylase, enzyme nécessaire pour la synthèse du sucre précurseur UDP-glucose, sont significativement influencées par la source de carbone utilisée par la bactérie. Une faible activité de l'UDP-glucose pyrophosphorylase va donner des faibles quantités de l'UDP-glucose et par conséquent, un faible rendement de la production des EPS.

3.5.2.2 Effet des substrats azotés :

L'étude de l'effet des substrats azotés sur la production d'EPS est réalisée en utilisant différentes sources azotés (extrait de levure, peptone, NH₄Cl et caséine) (Figures 24, 25, 26 et 27). Etant donné que, les concentrations en extrait de levure et en peptone utilisées sont identiques à celles des sources de carbones pour avoir le même ratio C/N.

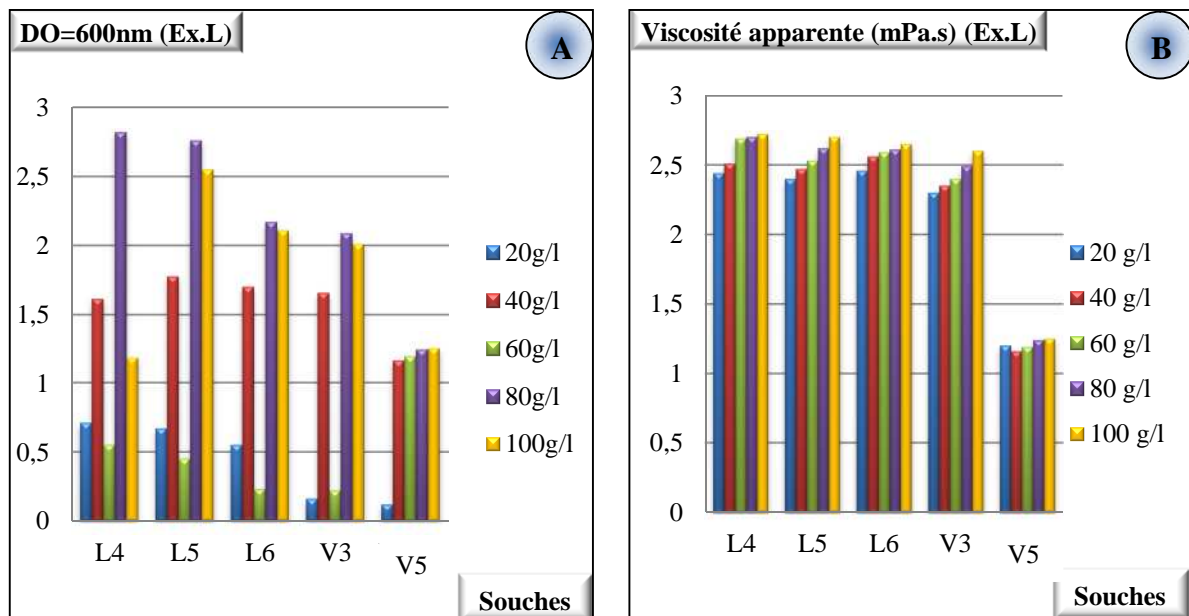


Figure 24 : Effet de l'extrait de levure sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).

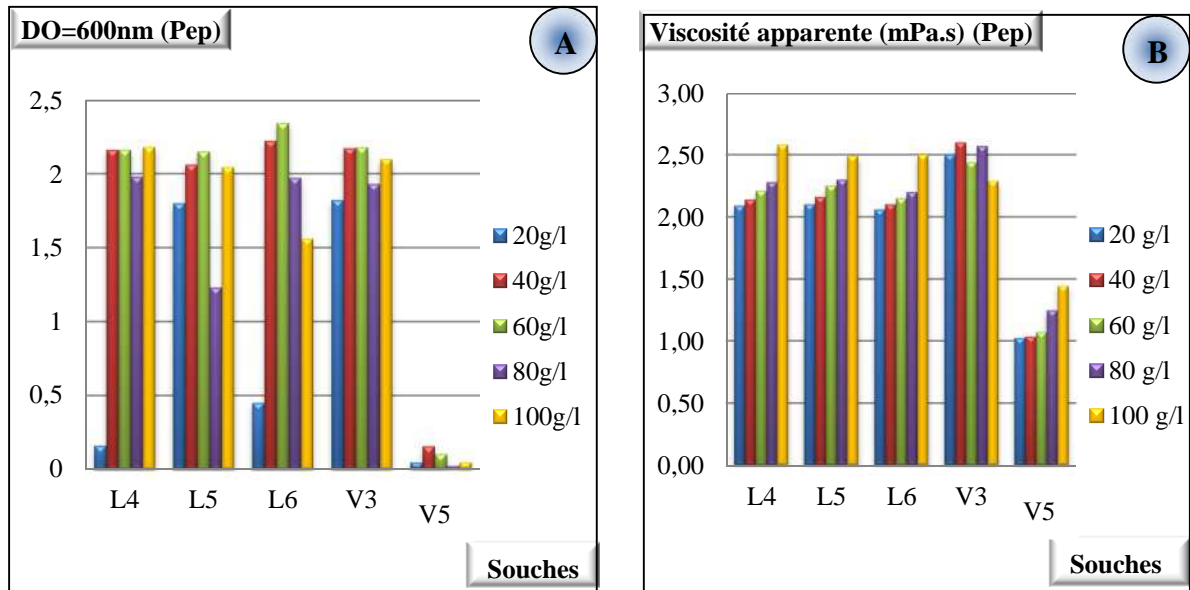


Figure 25 : Effet de la peptone sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).
Pep : peptone.

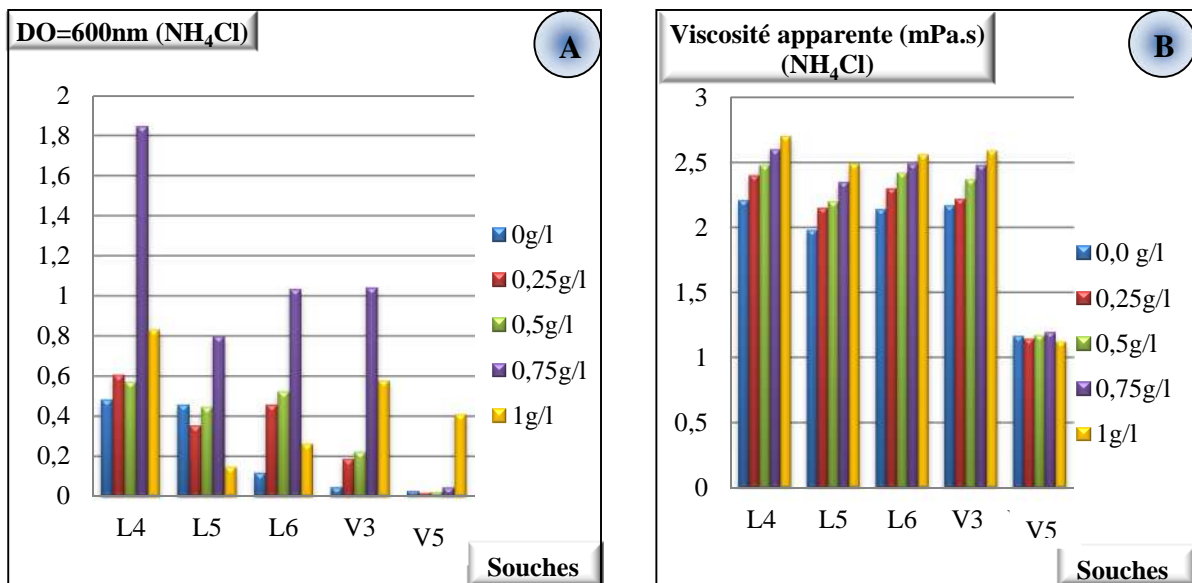


Figure 26 : Effet du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).

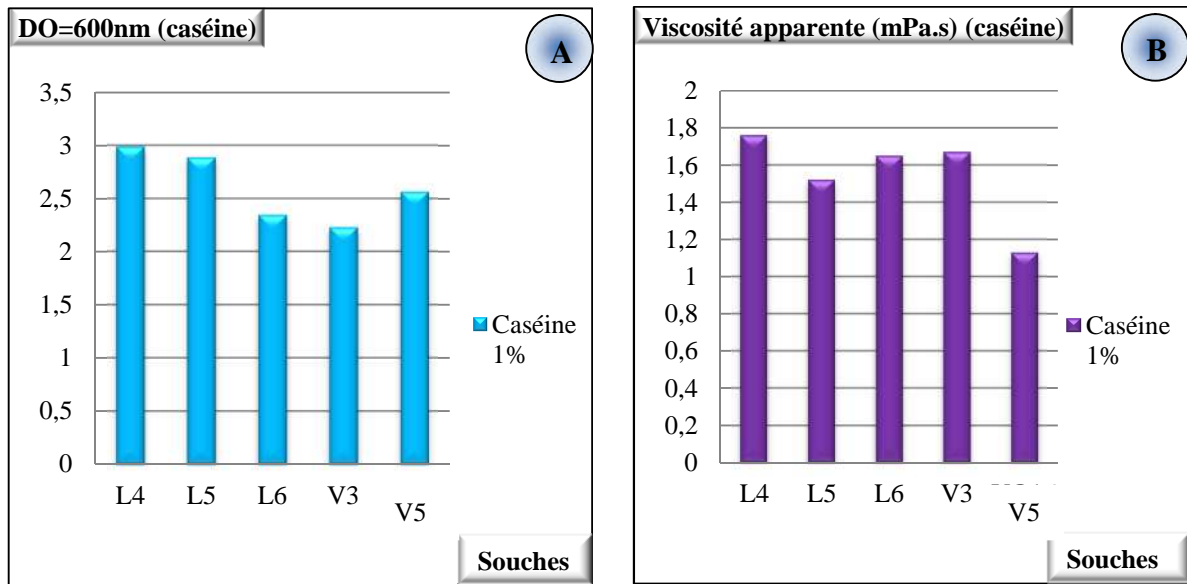


Figure 27 : Effet de la caséine sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).

De l'ensemble des résultats obtenus, nous retenons que :

- La biomasse microbienne et la viscosité sont importantes dans du bouillon BMMt enrichi avec du saccharose (100g/l) et avec des concentrations élevées en substrats azotés (80 à 100g/l d'extrait de levure ou de peptone). Un équilibre quantitatif optimal entre les deux sources (carboné et azoté) permet d'obtenir une production maximale d'EPS (De Vuyst et Degeest, 1999 ; Shene *et al.*, 2008). Sebastiani et Zelger (1998) ont trouvé que l'ajout de peptone au milieu a augmenté considérablement la production d'EPS par une souche de *S. thermophilus*, de même que la viscosité du milieu. En revanche, Majumder *et al.* (2009) ont obtenu une production optimale de glucane dans un milieu de lactosérum contenant à une concentration en extrait de levure comprise entre 2 à 3%.
- La présence de 1% de caséine (Figure 27) favorise la croissance (DO>2) tout en ralentissant la production d'EPS.
- Nos résultats montrent la contribution des trois substrats azotés cités ci-dessus dans la biosynthèse des EPS, mais surtout dans la croissance microbienne. Ceci est en accord avec la suggestion de Torres *et al.* (2014) sur la participation directe des substrats azotés dans la croissance bactérienne et indirectement dans le mécanisme de production d'EPS (voir partie synthèse bibliographique).
- Quant au chlorure d'ammonium (Figure 26), son absence a permis d'obtenir une viscosité d'environ 2mPa.s pour la majorité des souches testées. L'augmentation des

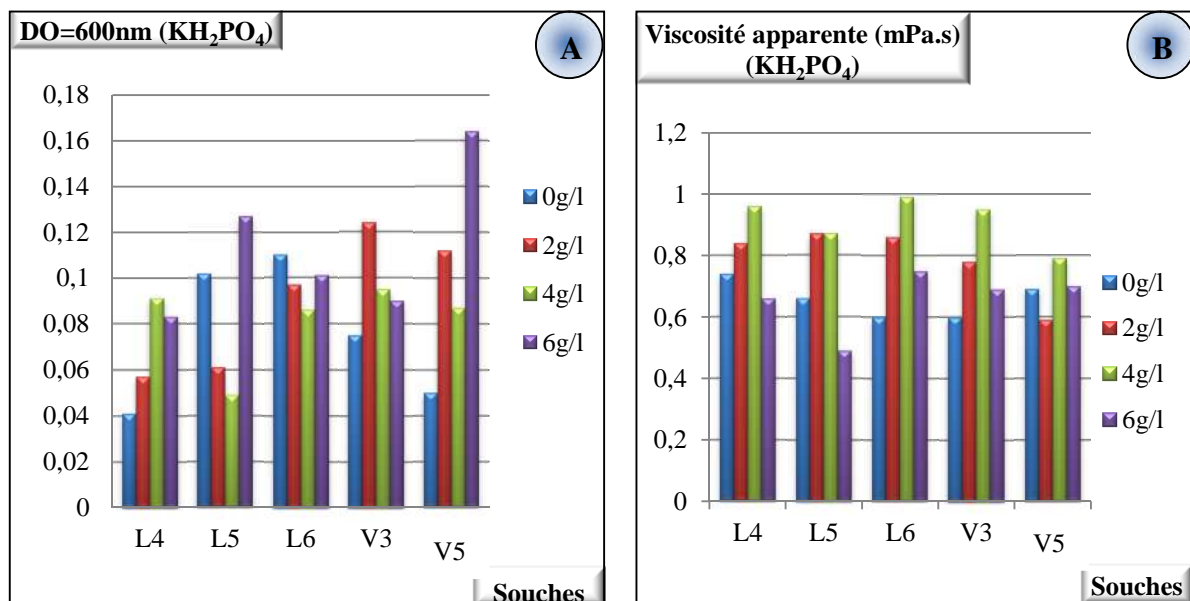
quantités de NH_4Cl permet une augmentation de la viscosité apparente des EPS excrétés dans le milieu de culture. Plusieurs auteurs ont montré que le rendement en EPS augmentait lorsque le milieu était pauvre en azote et riche en carbone (**Williams et Wimpenny, 1977 ; Duguid et Wilkinson, 1984 ; Congregado et al., 1985**).

➤ La production atteint son maximum à une concentration de 1g/l de NH_4Cl pour l'ensemble des souches testées, excepté V5 pour laquelle le maximum est obtenu à la concentration de 0.5g/l. Ces valeurs diffèrent de celles rapportées par **Racine (1991)** qui a trouvé que le rendement en polysaccharide est élevé à une concentration de 0.25g/l de chlorure d'ammonium.

✘ De point de vue économique et d'après les résultats obtenus, nous pouvons retenir le chlorure d'ammonium (e.g. 1g/l) comme meilleure source d'azote pour une production optimale d'EPS.

3.5.2.3 Effet des substrats phosphatés :

Différentes concentrations de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4 ont été utilisées pour tester l'influence de ces substrats sur la production d'EPS ainsi que sur la croissance des souches testées (**Figure 28**).



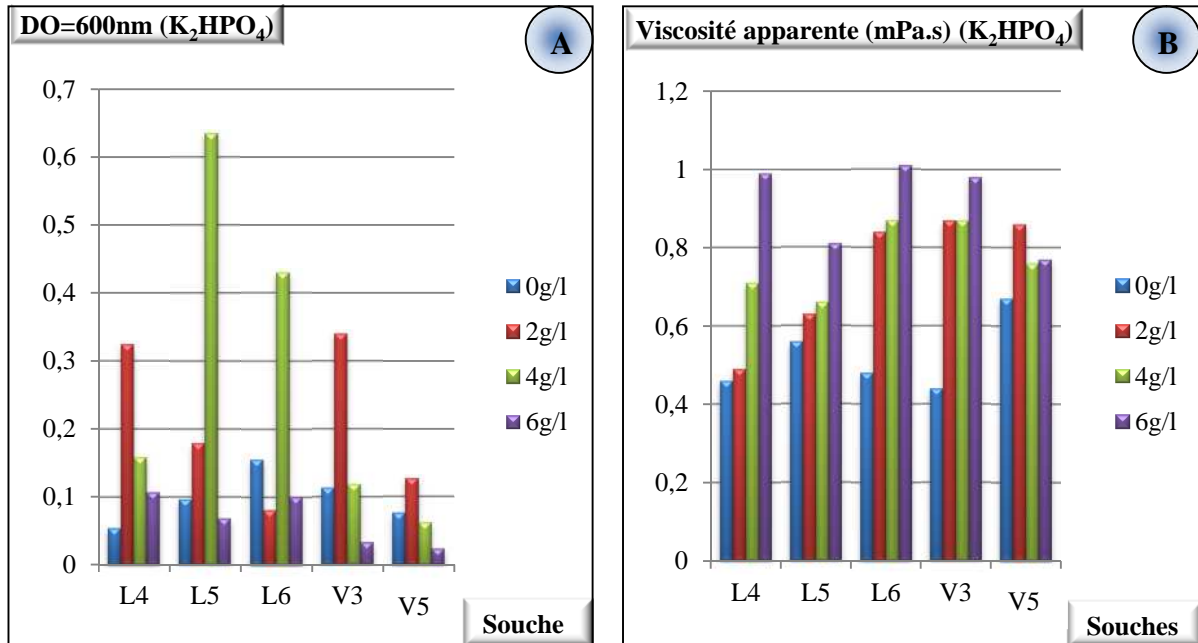


Figure 28 : Effet du phosphate sur la croissance (A) et sur la production d'EPS (B).

Plusieurs constats peuvent être observés :

- Les valeurs de densité optique obtenues sont minimales pour toutes les souches cultivées sur milieu BMM additionné de différentes concentrations de substrats phosphatés.
- Chez toutes les souches, la concentration optimale du K₂HPO₄ et du KH₂PO₄ est respectivement de 6g/l et de 4g/l alors que **Racine (1991)** a remarqué une production accrue d'EPS à une concentration de 6 g/l de KH₂PO₄ et **Liu et al. (2016)** ont observé un rendement élevé en EPS produit par la souche *L. acidophilus* à une quantité de 3.38g/l de K₂HPO₄.
- Dans notre étude, la différence de viscosité produite par les coques lactiques en concentrations croissantes en source de phosphates n'est pas significative. Pour la souche L6, la viscosité atteint un maximum de 0.99mPa.s pour une concentration de 4g/l de KH₂PO₄ et atteint 1.01mPa.s pour une concentration de 6g/l de K₂HPO₄.
- Par contre, l'absence de ces sources de phosphate provoque l'arrêt de la production d'EPS, l'invariabilité de la viscosité et donc le milieu restera liquide. Ces résultats rejoignent les observations faites par **Racine (1991)** qui a établi que l'absence de phosphate de potassium élimine presque toute production. **Liu et al. (2016)** ont également montré que le phosphate dipotassique a une grande influence sur le rendement en EPS.

3.5.3 Effet de la durée d'incubation :

Les cinétiques de croissance, d'acidification et de production d'EPS ont été établies afin de suivre l'évolution de la croissance, la production de l'acide lactique et des EPS. Elles sont déterminées à des intervalles de temps de 20 heures (de 0 heure jusqu'à 100 heures) comme décrit dans la partie "Matériel et Méthodes" dans un milieu BMM optimisé. Les **figures 29** et **30** indiquent des exemples de résultats obtenus.

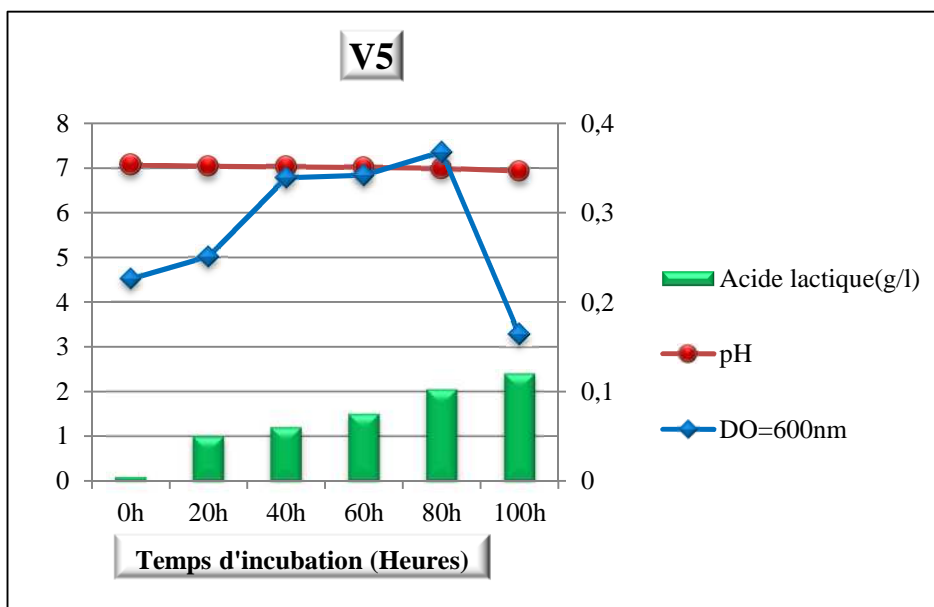
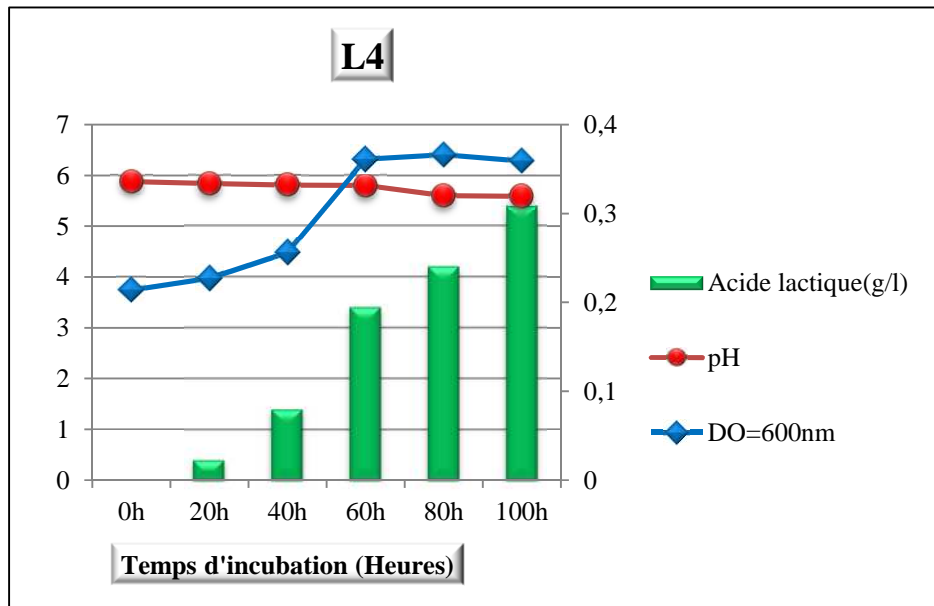


Figure 29 : Evolution de la croissance et d'acidification des souches L4 et V5.

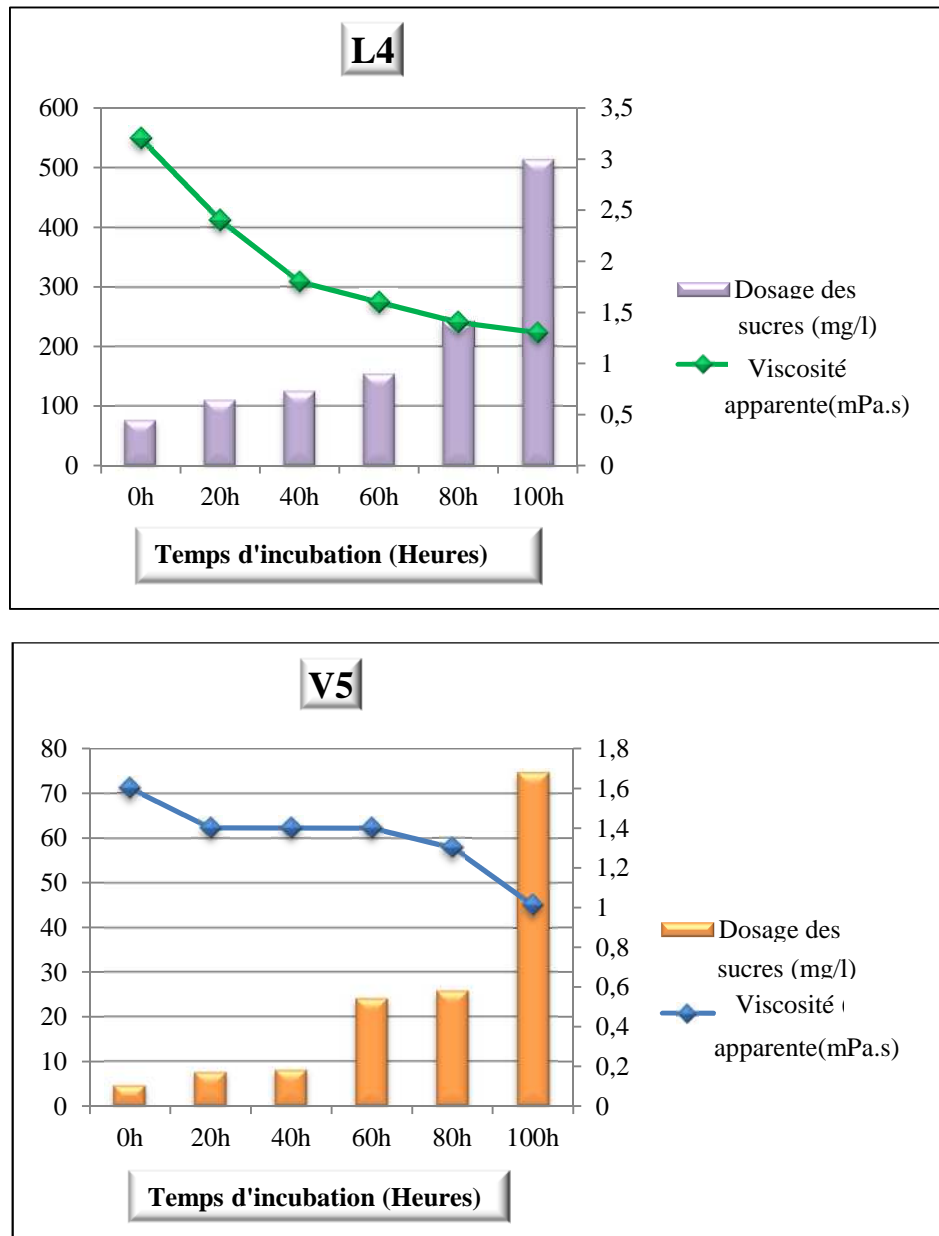


Figure 30 : Cinétique de production d'EPS des souches L4 et V5.

De l'ensemble des résultats obtenus, nous retenons que :

- La croissance microbienne augmente tout au long de la culture puis se stabilise chez toutes les souches. Elle est lente et atteint sa valeur maximale à 80 heures, puis elle diminue par la suite. Elle reste faible puisqu'elle est d'un maximum de $DO=0.366$ pour la souche L4. Ces résultats correspondent à ceux trouvés par **Benasla (2012)** qui a trouvé une faible croissance pour une souche de lactobacille (CHM18) dans un milieu BMMHS et une évolution de la croissance similaire.

- Le pH reste relativement stable pour l'ensemble des souches tout au long de la culture. La production d'acide lactique augmente légèrement en fonction du temps. Elle reste assez faible et liée à la croissance. **Benasla** en **2012** a fait le même constat pour deux souches de lactobacilles (LVK11 et CHM18) dont la croissance et la production d'acide lactique étaient mesurées en présence de saccharose.
- Toutes les souches testées sont faiblement acidifiantes (acidité < 4g/l), à l'exception de L4 où l'acidité atteint une valeur de 5.4g/l à 100 heures.
- La viscosité apparente diminue en fonction du temps pour l'ensemble des souches. Nous prenons l'exemple de la souche L4 à 0 heure, la viscosité est de 3.2mPa.s alors qu'elle baisse jusqu'à 1.3mPa.s à 100 heures. Cette baisse de viscosité a été expliquée par la présence des produits métaboliques, tel l'acide lactique, qui peuvent agir sur la viscosité selon **Teggatz et Morris (1990)** et par l'incubation prolongée selon **Macura et Townsley (1984)**. **Benezech et Maingonnat** en **1994** ont trouvé que la viscosité apparente diminue au cours du temps pour les laits fermentés. **Pham et al. (2000)** ont étudié la relation entre les enzymes de dégradation, la diminution de la viscosité et le poids moléculaire d'EPS durant un temps d'incubation prolongé chez *L. rhamnosus* R. Cette étude a mis en évidence la présence des glycohydrolases intracellulaires. Les auteurs ont supposé un effet possible des glycohydrolases sur la diminution de la viscosité dans le milieu.
- Contrairement à la viscosité, la concentration en polysaccharides augmente au cours du temps atteignant sa valeur maximale aux alentours de 100 heures d'incubation pour toutes les souches testées. Par exemple, la souche L4 en produit jusqu'à 514.04mg/l. Ceci indique clairement que la viscosité n'est pas liée à la production des EPS et confirme l'hypothèse émise auparavant. La même observation a été faite par **Sebastiani et Zelger (1998)** qui ont montré que la viscosité du milieu liquide n'était pas nécessairement corrélée avec la quantité d'EPS produite, et est fonction du type de polymère et des interactions des EPS avec d'autres constituants du milieu de culture, soit principalement les ions et les protéines (**Duboc et Mollet, 2001 ; Gentès, 2011**). **Lin et Chien (2007)** ont rapporté que la production d'EPS dépend des souches de bactéries lactiques et de la durée de la fermentation. Cette dernière influence la quantité et le poids moléculaire des EPS.
- La quantité d'EPS produite est dépendante de la souche de bactérie lactique testée. Les concentrations en EPS observées pour toutes les souches étudiées sont les suivantes : pour L4 entre 76.34 et 514.04mg/l; L5 de 13.09 à 198.55mg/l ; L6 de 14.37 à 206.81 mg/l ; V3 de 8.67mg/l à 166.58mg/l et V5 de 4.6 à 74.72mg/l. **Looijesteijn et al. (2001)** ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactérie lactique, les résultats peuvent être différents.

- Les valeurs du dosage des protéines contenues dans les échantillons d'EPS purifiés sont comme suit : L4 de 0.05 à 5.41 μ g ; L5 de 0.15 à 1.02 μ g ; L6 de 0.02 à 3.94 μ g ; V3 de 0.15 à 2.15 μ g et V5 de 0.076 à 1.35 μ g. Ces valeurs sont très inférieures à celles (0.11g de protéine \approx 1.42%) trouvées par **Kimmel et al. (1998)** et à celles (8.8% et 14% de protéine) relevées par **Bejar et al. (1996)**. Ceci indique la pureté de nos échantillons d'EPS.
- Nous constatons également que la production d'EPS par les souches étudiées n'est pas étroitement liée à la croissance, étant noté que la production d'EPS atteint sa valeur maximum après 80 heures d'incubation, moment auquel la croissance décline. Selon **Sutherland (1990)** la croissance n'est pas associée à la production EPS, pour des souches comme *Xanthomonas* et *Alcaligenes*, le même constat est fait pour *Ln. mesenteroides* BA08 qui produit une quantité maximale de dextrane en phase stationnaire précoce (**Qader et al., 2005 ; Vijayendra et Sarath Babu, 2008**).
- **Velasco et al. (2007)** ont montré que la faible activité enzymatique de la perméase n'affecte pas seulement le taux de production, mais elle peut également retarder la production des EPS de la phase exponentielle à la phase stationnaire de la croissance bactérienne.
- **Sutherland (1972)** avait émis une hypothèse pour expliquer ce phénomène, a suggéré que lorsque la croissance des cellules bactériennes est ralentie, la synthèse de polymères est stimulée. Ceci revient à la grande disponibilité des enzymes et des intermédiaires lipidiques dans la biosynthèse des CPS et des EPS.
- D'après les résultats obtenus, les leuconostocs restent les plus producteurs d'EPS par rapport aux lactocoques. Les quantités de polymères retrouvées sont plus importantes, comme rapporté par **Sarwat et al. (2008) ; Onilude et al. (2013)** et **Lule et al. (2015)**.

3.6 Identification des monosaccharides :

L'hydrolyse des EPS extraits des cinq souches lactiques étudiées a été effectuée selon deux procédés différents (traitement chimique et thermique).

Les hydrolysats sont identifiés, tout d'abord, par CCM en vue de déterminer la composition monosaccharidique des EPS mais aussi pour vérifier si l'hydrolyse a été réalisée par comparaison des Rf des spots d'hydrolysats avec ceux des étalons d'oses. La **figure 31** montre les résultats d'analyse des hydrolysats monosaccharidiques par CCM. Le **tableau 16** représente les RF des sucres étalons ainsi des échantillons d'EPS.

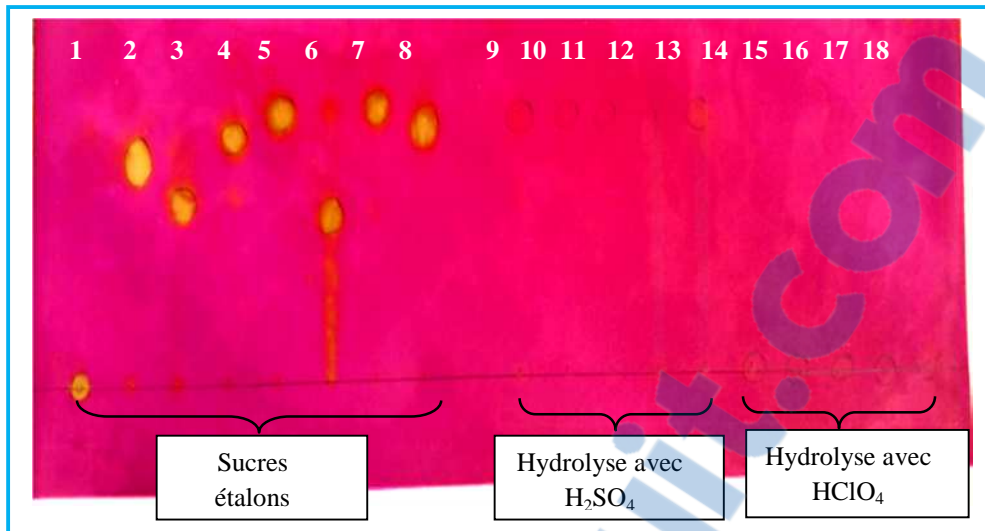


Figure 31 : Profil osidique des différents extraits d'EPS hydrolysés par deux procédés distinctifs et analysés par CCM dans le système (acide acétique: chloroforme: eau).

1 : dextrane ; 2 : saccharose ; 3 : lactose ; 4 : galactose ; 5 : fructose ; 6 : raffinose ; 7 : arabinose ; 8 : glucose ; 9 : souche L4 ; 10 : souche L5 ; 11 : souche L6 ; 12 : souche V3 ; 13 : souche V5 ; 14 : souche L4 ; 15 : souche L5 ; 16 : souche L6 ; 17 : souche V3 ; 18 : souche V5.

Tableau 16 : Les Rf des différents oses étalons et des constituants d'EPS obtenus par le système (acide acétique : chloroforme : eau).

Spots d'ose	Rf	Spots d'ose	Rf
1	0	10	0.47
2	0.4	11	0.47
3	0.31	12	0.45
4	0.43	13	0.47
5	0.5	14	0
6	0.28	15	0
7	0.5	16	0
8	0.45	17	0
9	0.47	18	0

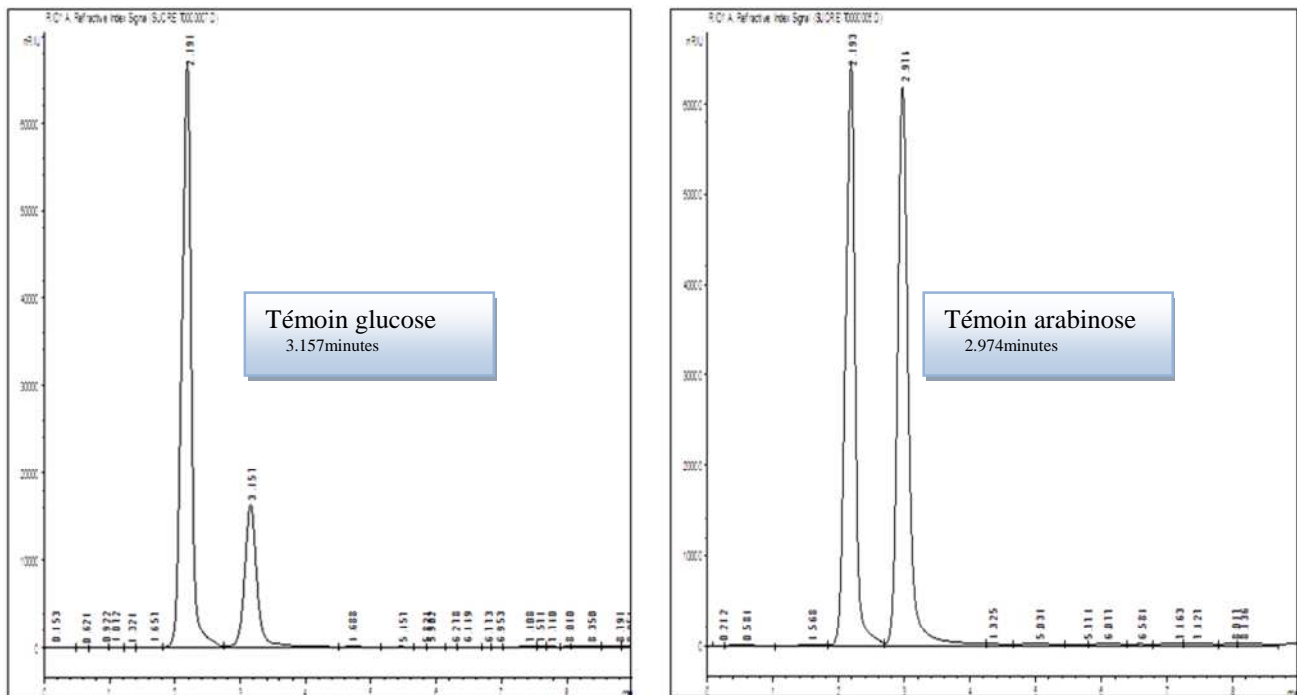
A la lumière de ces résultats, il ressort ce que suit :

- Par comparaison des Rf des taches apparues dans l'extrait d'EPS hydrolysé avec H_2SO_4 à $100^\circ C$ pendant 4 heures avec ceux des étalons, il apparaît que les EPS sont hydrolysés par cet acide fort et leurs principaux constituants sont le galactose (spot 4),

l'arabinose (spot 8) et le glucose (spot 8). L'EPS de la souche V3 (spot 12) est constituée de glucose (Rf identique à celui du sucre étalon glucose, spot 8).

- Aucune hydrolyse n'est observée avec le 2^{ème} procédé d'hydrolyse (HClO₄ à 100°C pendant 1 heure), car nous remarquons la similitude de migration du dextrane commercial (spot 1) avec celles des échantillons étudiés (spots 14, 15, 16, 17 et 18). Ceci a été expliqué par **Tieking *et al.* (2003)** qui ont rapporté que l'acide sulfurique permet d'hydrolyser les glucanes alors que l'acide perchlorique est efficace pour hydrolyser les fructanes. Ces résultats nous laissent supposer que les EPS des souches étudiées sont composés de glucanes et non pas de fructanes.

Nous avons confirmé ces résultats par analyse chromatographique liquide en haute pression (HPLC). Des exemples de résultats obtenus sont montrés dans la **figure 32** pour les échantillons issus des souches L6 et V5.



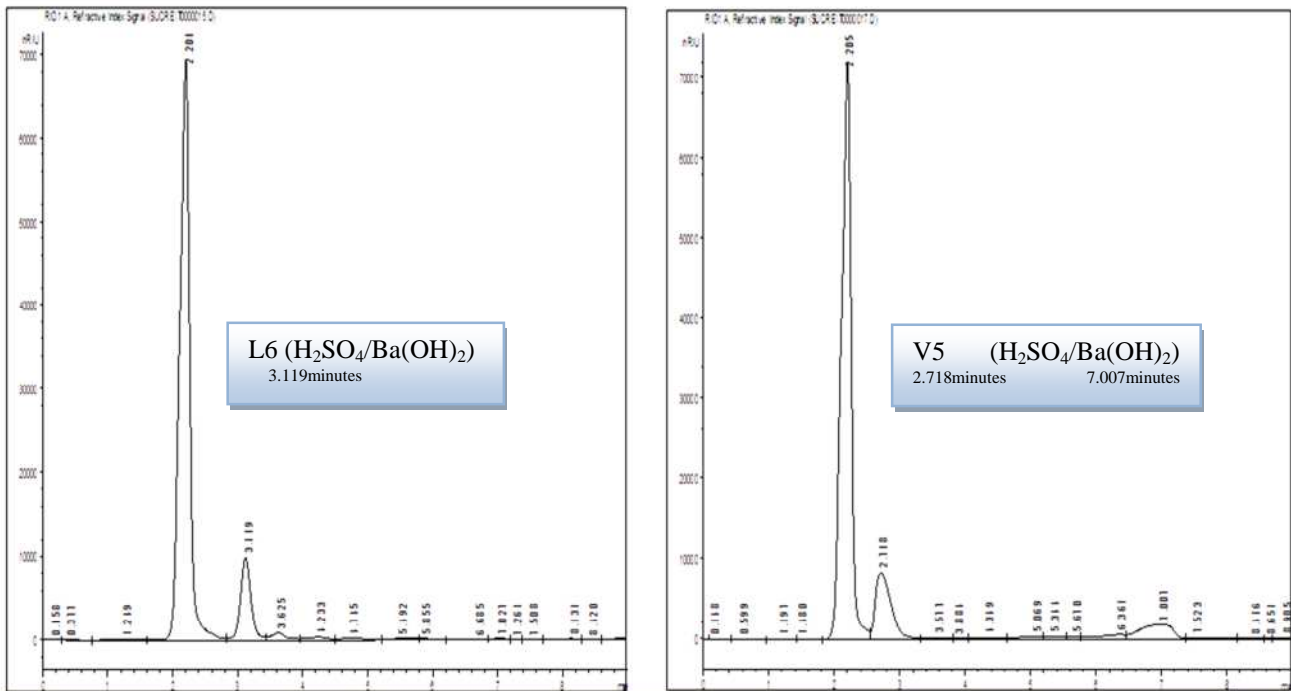


Figure 32 : Chromatogrammes d’HPLC de témoins osidiques et des hydrolysats osidiques de L6 et V5 traités par H₂SO₄.

- En comparaison avec les sucres standards, les chromatogrammes d’HPLC ont révélé, effectivement, que les EPS synthésés par les leuconostocs (L4, L5, L6 et V3) contiennent en majorité du glucose, donnant ainsi un pic important élué à 3.119minutes. Ces résultats permettent de les classer dans le groupe d’HoPS de type glucane. **Belkheir (2017)** a trouvé que l’EPS de *Ln. mesenteroides* 8 est constitué de fructose.
- L’hydrolysat osidiques de lactocoque V5 est formé de deux types de glucides indiqués par deux pics différents dans le temps de rétention et concentration. Le premier est plus concentré, composé d’arabinose dont le temps de rétention est de 2.718minutes, alors que le second, moins concentré, est élué à 7.007minutes d’où sa constitution n’a pas été déterminée car il ne correspond pas aux sucres étalons. Ceci nous laisse suggérer que cet EPS est formé d’un autre ose libre (non utilisé comme témoin) ou lié à d’autres constituants organiques ou inorganiques. Sachant que ces derniers rentrent dans la composition de certains polymères bactériens. Par conséquent, l’EPS de la souche V5 est classé dans le groupe des HePS.

3.7 Activité rhéologique sur lait :

Les polysaccharides sont des molécules aptes à conférer, à faible concentration, des propriétés rhéologiques particulières aux solutions aqueuses. Les principales utilisations de ces molécules sont liées à cette aptitude qui conditionne leurs potentialités d'application.

Les potentialités texturantes des bactéries lactiques sont principalement utilisées pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés (Monnet *et al.*, 2008).

La transformation du lait en yaourt s'accompagne aussi d'un changement des propriétés rhéologiques en passant d'un liquide à un gel à destruction non réversible (Paci Kora, 2004) (Figure 33). La texture des gels de type yogourt réfère à plusieurs attributs tels la fermeté, l'onctuosité et la sensation en bouche (Clark et Plotka, 2004).

De plus, ces bactéries de grade alimentaire évitent d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tels que les texturants et les épaississants, surtout lors de la production des yaourts (Monnet *et al.*, 2008).

Le pouvoir épaississant et gélifiant de nos échantillons d'EPS purs est établi par ajout d'un volume de 1ml d'EPS pur à 10ml de lait écrémé (Candia *Silhouette*) comme indiqué dans la partie "Matériel et Méthodes" et par le calcul de la densité (Figure 34).



Figure 33 : Formation du gel par l'EPS de la souche L5 sur lait écrémé.

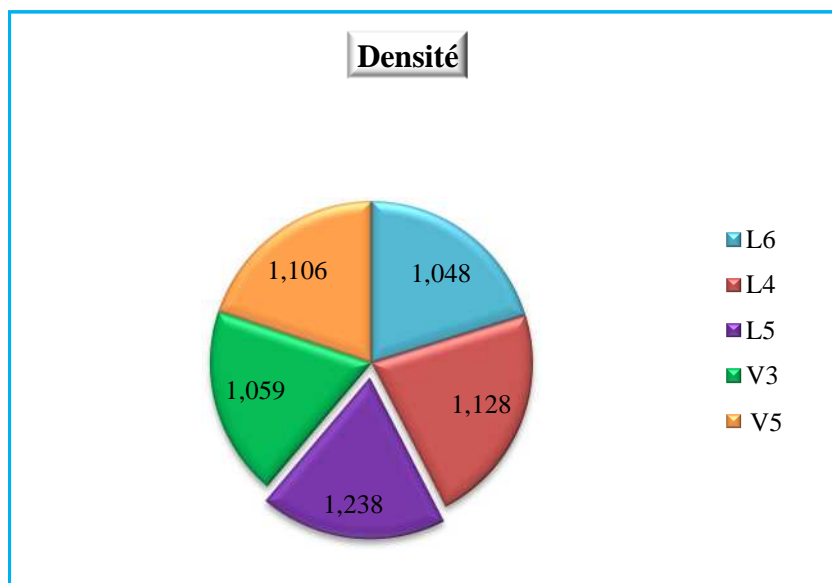


Figure 34 : Densités des EPS des souches étudiées sur lait écrémé.

- Tous les EPS purs des souches ont donné au lait un aspect filant avec formation d'un gel visqueux : lorsqu'ils coulent sur la paroi interne des tubes, ils présentent une viscosité élevée d'où leur caractère épaississant, texturant et gélifiant, qui pourrait intéresser les industriels pour des applications alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques en tant qu'agents épaississants naturels. Les résultats obtenus correspondent à ceux de **Bourgeois et Leveau (1991)**.
- La densité du lait écrémé stérile sans ajout d'EPS est de 1.041, ce qui correspond à la densité moyenne du lait écrémé mentionnée dans la littérature, qui est de 1.036 (**Amiot et al., 2002**). L'ensemble des EPS de nos échantillons ont une densité supérieure à celle du lait écrémé stérile. L'EPS produit par la souche V5 par exemple donne une densité de 1.106. Celui de la souche L5 a le pouvoir épaississant le plus important puisque sa densité est de 1.238.
- Il est à noter que la matière grasse est le seul constituant qui possède une densité inférieure à 1 et de ce fait, plus un lait ou un produit laitier contient un pourcentage élevé en matière grasses, plus sa densité sera basse. Inversement les solides non gras ont tous une densité supérieure à 1 et par conséquent, plus la teneur en solides non gras est élevé plus la densité du produit laitier sera élevée (**Amiot et al., 2002**).



Conclusion et perspectives

L'un des challenges actuels des industriels est d'exploiter des bactéries de grade alimentaire dans différents domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques autant qu'agents acidifiants, texturants, gélifiants et visqueux. Les bactéries lactiques sont avérées comme meilleures candidates pour l'usage et l'étude de ces activités grâce à leur capacité à synthétiser des métabolites tels que les EPS. Ces derniers ont la possibilité d'améliorer les propriétés organoleptiques et rhéologiques des produits fermentés.

Dans le présent travail, les bactéries épaississantes ont été recherchées dans différents biotopes naturels, dont huit souches (L4, L5, L6, V1, V2, V3, V4 et V5) étaient isolées à partir de lait de chamelle et de viande rouge et quatre souches (VO18, VO17, VO12 et VO4) provenant de la collection du laboratoire LBMB à partir de la viande ovine. Par la suite, elles étaient identifiées en ayant recours à des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les nouvelles souches isolées appartiennent à *Ln. mesenteroides*, à l'exception V5 à *Lc. raffinolactis*, alors que celles de la collection à *Lactococcus* sp.

Ces bactéries ont été valorisées et examinées selon leurs potentialités à produire des EPS par réalisation des études qualitatives et quantitatives. Plusieurs milieux gélosés hypersaccharosés additionnés ou non de colorant cationique, le rouge de ruthénium, ont été utilisés dévoilant la présence de grosses colonies blanchâtres, mucilagineuses et non filantes. Ceci montre l'existence de l'aspect mucoïde.

Le caractère filant, repose sur la mesure de la viscosité apparente sur bouillon BMMHS ou la viscosité intrinsèque des EPS dissouts dans de l'eau distillée et/ou déionisée, ainsi que sur le dosage des sucres totaux après extraction et purification des échantillons d'EPS concentrés par lyophilisation et évaporation, a révélé une différence dans la production d'EPS d'une souche à l'autre au sein du même groupe (effet souche).

Pour l'ensemble des souches testées, la viscosité apparente n'était pas corrélée à la quantité d'EPS produite. Le rendement en EPS était significativement plus élevé par lyophilisation par rapport à l'évaporation, comprenant entre 19 et 658mg/l avec une viscosité allant de 1.40 à 2.90mPa.s pour la viscosité apparente et de 1.53 à 2.44 m³/Kg pour la viscosité intrinsèque des EPS solubles dans de l'eau déionisée. Ces résultats confirment le phénotype visqueux de ces coques.

La mesure de la quantité protéique globale dans les extraits bruts d'EPS a permis d'évaluer leur qualité suite aux valeurs infimes de ces contaminants constatées dans ces résidus polysaccharidiques, ce qui a reflété l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée. En effet, cinq coques (L4, L5, L6, V3 et V5) étaient sélectionnés comme meilleures souches productrices de ces biopolymères exocellulaires.

Cette production était optimisée sous certaines conditions de culture d'où la meilleure biosynthèse était obtenue sur M17HS, s'avérant comme milieu idéal pour la culture des coques lactiques dotés de cette activité mucoïdique. En revanche, l'étude de l'effet des

paramètres physicochimiques (pH et température) sur cette production a donné des résultats variables selon la bactérie étudiée.

L'impact des substrats carbonés et azotés sur cette biosynthèse a montré qu'un rendement maximum d'EPS est trouvé pour une concentration de saccharose entre 80 et 100g/l et de 1g/l pour le NH_4Cl . Quant aux substrats phosphatés, les concentrations optimales sont de l'ordre de 6g/l pour le K_2HPO_4 et de 4g/l pour le KH_2PO_4 .

Les cinétiques de croissance et de production de biopolymères ont indiqué que la production des EPS n'était pas étroitement liée à la croissance mais plutôt une compétition entre ces deux mécanismes. Elle a atteint sa valeur maximale après 80 heures d'incubation, moment où la croissance diminue. Par exemple, la souche L4 en produit jusqu'à 514.04mg/l à 100 heures.

L'évolution du pH et d'acidification ont divulgué que la majorité des souches sont faiblement acidifiantes.

L'identification des monomères osidiques constituant les EPS, préalablement hydrolysés par l'acide fort et la chaleur élevée, par les techniques de chromatographies (CCM et HPLC), a révélé que les polymères de *Leuconostoc* étaient de type glucane composés majoritairement de glucose (HoPS). Alors que l'EPS de la souche de lactocoque (V5) était constitué d'arabinose et d'un autre sucre non déterminé par HPLC et il fait partie de la classe des HePS.

L'étude de l'activité rhéologique a approuvé le pouvoir épaississant et gélifiant des EPS de nos souches dans le lait écrémé.

Lors de la poursuite de cette étude, il serait souhaitable de l'approfondir en :

- ① Confirmant l'identification des coques lactiques par utilisation des outils moléculaires (rep-PCR, ARNr16S, etc.).
- ① Etudiant l'effet d'autres facteurs agissant sur la production d'EPS comme la vitesse d'agitation et d'acidification.
- ① Identifiant la composition osidique de V5.
- ① Localisant et identifiant les gènes codant pour la biosynthèse d'EPS et les rendre plus stables.
- ① Déterminant la relation entre le poids moléculaire, conformation de chaîne et le rendement en EPS.
- ① Testant ces souches à l'échelle industrielle en les incorporant à des produits fermentés tel le yogourt.



Références bibliographiques

- Accolas, J.P., Bloquel, R. et Regnier, J.** (1977). Acidifying properties of the thermophilous lactic bacteria in relation to the manufacture of yoghurt. *Lait*. **67**: 1-23.
- Adeyeye, A., Jansson, P.E. et Lindberg, B.** (1988). Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 37. *Carbohydrate Research*. **180**: 295-299.
- Agence canadienne d'inspection des aliments.** (2014). *In* : **Arfaoui, L.** (2014). Compréhension des effets des propriétés intrinsèques des exopolysaccharides produits in situ seuls ou en présence de polysaccharides commerciaux sur la microstructure et les propriétés rhéologiques du yogourt ferme. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.
- Ahmed, A.A., Fedail, J.S., Musa, H.H., Kamboh, A.A., Sifaldin, A.Z. et Musa, T.H.** (2015). Gum arabic extracts protect against hepatic oxidative stress in alloxan induced diabetes in rats. *Pathophysiology*. **22**: 189-194.
- Ahmed, A.A., Fedail, J.S., Musa, H.H., Kamboh, A.A., Sifaldin, A.Z. et Musa, T.H.** (2016). Gum arabic suppressed diet-induced obesity by alteration the expression of mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in mouse liver. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. **7**: 15-20.
- Ai, L., Zhang, H., Guo, B., Chen, W., Wu, Z. et Wu, Y.** (2008). Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. *Carbohydrate Polymers*. **74**: 353-357.
- Amatayakul, T., Halmos, A.L., Sherkat, F. et Shah N.P.** (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*. **16**: 40-51.
- Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P. et Simpson, R.** (2002). Science et technologie du lait. *In*: Transformation du Lait. Lapointe-Vignola, C. Eds Presses Internationales Polytechniques. Montréal, Québec. 1-28.
- Atlan, D., Béal, C., Chouyekh, H., Gaudu, P., Hols, P., Juillard, V., Ladero, V., Lortal, S., Loubière, P., Monnet, C., Monnet, V. et Yvon, M.** (2008). Bactéries lactiques : Métabolisme et ingénierie métabolique. *In*: Bactéries Lactiques, de la génétique aux ferments. Corrieu, G. et Luquet, F.M. Eds Techniques et Documentations, Lavoisier. Paris, France. 271-509.
- Ayala-Hernandez, I., Hassan, A.N., Goff, H.D. et Corredig, M.** (2009). Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Food Hydrocolloids*. **23**(5): 1299-1304.
- Badel, S., Bernardi, T. et Michaud, P.** (2011). New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. **29**: 54-66.
- Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A. et Davis, M. E.** (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality *in vivo* imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **104**:15549-15554.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. et Obert, J.P.** (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In* : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Corrieu, G. et Luquet, F.M. Eds Tec et Doc, Lavoisier. Paris, France. 661- 765.

- Behare, P.V., Singh, R., Nagpal, R., Kumar, M., Tomar, S.K., et Prajapati, J.B.** (2009). Comparative effect of exopolysaccharides produced *in situ* or added as bio-ingredients on dahi properties. *Milchwissenschaft*. **64**: 396-400.
- Behare, P.V., Singh, R., Tomar, S.K., Nagpal, R., Kumar, M. et Mohania, D.** (2010). Effect of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological attributes of fat-free lassi. *Journal of Dairy Science*. **93**: 2874-2879.
- Béjar, V., Calvo, C., Moliz, J., Díaz-Martínez, F. et Quesada, E.** (1996). Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **59**:77-86.
- Belkheir, K.** (2017). Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie : Réalisation de ferments lactiques. Thèse de doctorat. Université d'Oran1, Algérie.
- Benasla, A.** (2012). Production d'exopolysaccharides par des souches de lactobacilles. Mémoire de magister. Université d'Oran1, Algérie.
- Benezech, T. et Maingonnat, J.F.** (1994). Characterization of the rheological properties of yoghurt. *Journal of Food Engineering*. **21**(4): 447-472.
- Bentley, S.D., Aanensen, D.M., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M., Donohoe, K., Harris, D., Murphy, L., Quail, M.A., Samuel, G., Skovsted, I.C., Kalltoft, M.S., Barrell, B., Reeves, P.R., Parkhill, J. et Spratt, B.G.** (2006). Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLOS Genetics*. **2**(3):e31.
- Bergmaier, D.** (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.
- Bergmaier, D. Lacroix, C. et Champagne, C.P.** (2003). Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology*. **95**:1049-1057.
- Björkroth, J. et Holzappel, W.** (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes*. **4**: 267-319.
- Björkroth, J. A., Dicks, L. M. T. et Endo, A.** (2014). The genus *Weissella*. In: Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy. Holzappel, W. H. et Wood B. J. B. Eds John Wiley et Sons Ltd. Chichester, West Sussex, UK. 418-428.
- Boels, I. C., van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezen, M. et de Vos, W.M.** (2001). Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**: 723-732.
- Bounaix, M.S, Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B. et Fontagné-Faucher, C.** (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**(22):10889-10897.
- Bourgeois, C.M. et Leveau, J.Y.** (1991). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires: Contrôle microbiologique. Vol 3. Eds Techniques et Documentations. Lavoisier. Paris, France. 454.

- Bourgoin, F., Pluvinet, A., Gintz, B., Decaris, B. et Guédon, G.** (1999). Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Gene*. **233**(1-2):151-61.
- Bouzar, F., Cerning, J. et Desmazeaud, M.** (1995). Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science*. **79**: 205-211.
- Bouzar, F., Cerning, J. et Desmazeaud, M.** (1997). Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed strain starter cultures in yogurt production. *Journal of Dairy Science*. **80**: 2310-2317.
- Bozkurt, H. et Erkmen, O.** (2002). Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). *Meat Science*. **61**: 149-156.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye bindings. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Brady, R.A., O'May, G.A., Leid, J.G., Prior, M.L., Costerton, J.W. et Shirliff, M.E.** (2011). Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infection and Immunity*. **79**: 1797-1803.
- Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. et Kolter, R.** (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiology*. **13**: 20-26.
- Brizard, M., Megharfi, M., Mahe, E. et Verdier, C.** (2005). Design of a high precision falling-ball viscometer. *Review of Scientific Instruments*. **76**: 25-109.
- Broadbent, J.R., McMahan, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J. et Moineau, S.** (2003) Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*. **86**(2): 407-423.
- Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 50.
- Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K. et McAuliffe, O.** (2008). Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *Journal of Bacteriology*. **190**: 727-735.
- Campbell, J., Davies, G., Bulone, V., Henrissat, B.** (1997). A classification of nucleotidediphospho-sugar glycosyl-transferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. **326**: 929-939.
- Canquil, N., Vilarroel, M., Bravo, S., Rubilar, M. et Shene, C.** (2007). Behavior of the rheological of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. **68**: 270-279.
- Carr, F.J., Chili, D. et Maida, N.** (2002). The Lactic Acid Bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**: 281-370.
- Cerning, J.** (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **7**: 113-130.
- Cerning, J.** (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. **75**: 463-472.
- Cerning, J., Bouillanne, C. et Desmazeaud, M.J.** (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters*. **10**: 255-260.

- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. et Landon, M.** (1986). Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters*. **8**: 625-628.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon M. et Desmazeaud, M.J.** (1992). Isolation and characterisation of exopolysaccharide from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **75**(3): 692-699.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. et Desmazeaud, M.J.** (1990). Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sciences des Aliments*. **10**: 443-451.
- Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M.J. et Topisirovic, L.** (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 3914-3919.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.M., Dudez, A.M., Martin, V., Beaufile, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V. et Zagorec, M.** (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology*. **23**(12): 1527-1533.
- Chamba, F.J.** (2008). Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In: Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Corrieu, G. et Luquet, F.M. Eds Techniques et Documentations, Lavoisier. Paris, France. 787-813.
- Champagne, C., Gardner, N.J. et Lacroix, C.** (2007). Fermentation technologies for the production of exopolysaccharides synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *Electronic Journal of Biotechnology*. **10**(2): 211-220.
- Champagne, C.P.** (1998). Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Eds Fondation des Gouverneurs et Edisen. Sainte-Hyacinthe, Canada. 213.
- Chenoll, E., Macian, M.C. et Aznar, R.** (2003). Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology*. **26**: 546-556.
- Claesson, M.J., Li, Y., Leahy, S., Canchaya, C., van Pijkeren, J.P., Cerdeño-Tárraga, A.M., Parkhill, J., Flynn, S., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Higgins, D., Shanahan, F., Fitzgerald, G.F, van Sinderen, D. et O'Toole, P.W.** (2006). Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **103**: 6718-6723.
- Clark, S. et Plotka, V.C.** (2004). Yogurt and sour cream: Operational procedures and processing equipment. In: Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology. Hui, Y.H. et al., Eds Taylor et Francis, CRC Press. New York, USA. 159-182.
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. et Wallbanks, S.** (1993). Taxonomic studies of some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**: 595-603.
- Congregado, F., Estanol, I., Espuny, M.J., Fusté, M.C., Manresa, M.A., Marqués, AM., Guinea, J. et Simon-Pujol, M.D.** (1985). Preliminary studies on the production and composition of polyaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp.EPS-5028. *Biotechnology Letters*. **7**(12): 883-888.



- Copeland, W.E., Keeler, G., Angold, A. et Costello, E.J.** (2007). Traumatic events and posttraumatic stress in childhood. *Archives of General Psychiatry*. **64**(5): 577-584.
- Corrieu, G. et Luquet, F. M.** (2008). Bactéries lactiques: De la génétique aux ferments. Eds Techniques et Documentations, Lavoisier. Paris, France. 849.
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N. et Gueguen, M.** (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Applied of Environmental Microbiology*. **64**: 4729-4735.
- Dabour, N. et LaPointe, G.** (2005). Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 7414-7425.
- Dalmasso, M., Prestoz, S., Rigobello, V. et Demarigny, Y.** (2008). Behavior of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in a four *Lactococcus* strain starter during successive milk cultures. *Food Science and Technology International*. **14**: 469-477.
- Dan, T., Fukuda, K., Sugai-Bannai, M., Takakuwa, N., Motoshima, H. et Urashima, T.** (2009). Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **73**(12): 2656-2664.
- Dave, R.I. et Shah, N.P.** (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. **79**:1529-1536.
- De Beer, T.R.M., Baeyens, W. R.G., Ouyang, J., Vervaet, C. et Remon, J.P.** (2006). Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension. *Analyst*. **131**: 1137-1144.
- De Man, J.C., Rogosa, M. et Sharpe, M.E.** (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. **23**: 130-135.
- De Roissart, H. et Luquet, F.M.** (1994). Les bactéries lactiques. Vol 1. Eds Lorica, Uriage. France. 1-286.
- De Roissart, H.B.** (1986). Les bactéries lactiques. *Dans* : Le lait et les produits laitiers. Luquet, F. M. Eds Techniques et Documentations, Lavoisier. Paris, France. 343-407.
- De Vos, W. M. et Vaughan, E. E.** (1994) Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **15**: 217-237.
- De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem, F., Degeest, B.** (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**: 687-707.
- De Vuyst, L. et Degeest, B.** (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **23**: 153-177.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. et Degeest, B.** (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*. **84** (6): 1059-1068.
- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adrian, T., Marshall, V., Degeest, B. et Vaningelgem, F.** (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as

- functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*. **13**: 707-717.
- Degeest, B. et De Vuyst, L.** (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharides production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 2863- 2870.
- Degeest, B. et De Vuyst, L.** (2000). Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharides biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 3519-3527.
- Degeest, B., Janssens, B. et De Vuyst, L.** (2001). Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 470-477.
- Delarras, C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Delarras, C. Eds Techniques et Documentations, Lavoisier. Paris, France. 476.
- Delattre, C.** (2005). Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat. Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, C. et Janssen, D.** (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: Bactéries lactique . de Roissart, H. et Luquet, F.M. Eds Lorica, Uriage. France. 25-116.
- Dertli, E., Colquhoun, I.J., Gunning, A.P., Bongaerts, R.J., Le Gall, G., Bonev, B.B., Mayer, M.J. et Narbad, A.** (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**: 31938-31951.
- Desmazeaud, M.** (1992). Les bactéries lactiques. In: Les groupes microbiens d'intérêts laitiers. Eds Cepil. Paris, France. 9-60.
- Devi, C. S, Reddy, S. et Mohanasrinivasan, V.** (2014). Fermentative production of dextran using *Leuconostoc* sp. isolated from fermented food products. *Frontiers in Biology*. **9**: 244-253.
- Devoyod, J.J. et Poullain, F.** (1988). Les *leuconostocs*, propriétés: Leur rôle en technologie laitière. *lait*. **68**: 249-280.
- Devriese, L.A. et Pot, B.** (1995). The genus *Enterococcus*. In: The genera of lactic acid bacteria. Wood, B.J.B. et Holzappel, W.H. Eds Blackie Academic et Professional. London. 327-367.
- Dicks, L.M.T., Mellett, F.D. et Hoffman, L.C.** (2004). Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*. **66**: 703-708.
- Dierksen, K.P., Sandine, W.E. et Trempey, J.E.** (1997). Expression of ropY and mucoid phenotypes in *Lactococcus lactis*, *Journal of Dairy Science*. **80**: 1528-1536.
- Dimopoulou, M.** (2013). Les polysaccharides de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, de l'élucidation de leurs structures et voies de biosynthèse à leur valorisation technologique. Thèse de doctora. Université de Bordeaux2, France.

- Doat, J.** (1974). Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des gommés et des bois tropicaux. *Revue Bois et Forêts Tropiques*. **156**: 63-74.
- Doleyres, Y., Schaub, L. et Lacroix, C.** (2005). Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced *in situ* or added as bioingredients on yogurt properties. *Journal of Dairy Science*. **88**: 4146-4156.
- Dortu, C. et Thonart, P.** (2008). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. **13**(1): 143-154.
- Drider, D. et Prevost, H.** (2009). Bactéries lactiques : Physiologie, métabolisme, génomique et application industrielle. Eds Economisa. Paris, France. 381- 427.
- Drouault, S. et Corthier, G.** (2001). Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. *Veterinary Research*. **32**: 101-117.
- Duboc, P. et Mollet, B.** (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. **11**(9): 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A et Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. **28**: 350-356.
- Dueñas-Chasco, M.T., Irastorza-Iribas, A., Fernandez, K. et Bilbao, A.** (1995). Heterofermentative *Lactobacilli* causing ropiness in basque country ciders. *Journal of Food Protection*. **58**: 76-80.
- Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A. et Gil-Serrano, A.M.** (1998). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp G-77. *Carbohydrate Research*. **307**: 125-133.
- Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Franco-Rodriguez, G., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A. et Gil-Serrano, A.M.** (1997). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*. **303**: 453-458.
- Duguid, J.P et Wilkinson, J.F.** (1984). Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella* sp. strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**(6): 1304-1308.
- Dupont, I.** (1998). Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.
- Dupont, I., Roy, D. et Lapointe, G.** (2000) Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **24**: 251-255.
- Durlu-Özkaya, F., Aslim, B. et Taha Özkaya, M.** (2007). Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft-Food Science and Technologie*. **40**: 564-568.
- El-Gizawy, S.A., Barakat, O., Sharaf, O.M., El-Shafei, K., Fathy, F.A. et El-Sayed, H.S.** (2013). Effet of growth conditions on the production of exopolysaccharides by

- microencapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and use it to improve of Kareish cheese. *Journal of Applied Sciences Research*. **9** (2): 1097-1109.
- Elsner, H. A., sobottka, I., Mack, D., Laufs, R., Claussen, M. et Wirth, R.** (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **19**: 39-42.
- Eom, H.J., Seo, D.M. et Han, N.S.** (2007). Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. **117**: 61-67.
- Erkkilä, S., Suihko, M.L., Eerola, S., Petäjä, E. et Mattila-Sandholm, T.** (2001). Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 205-210.
- Esquenet, C.** (2003). Propriétés structurales et dynamiques des solutions de polyélectrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs. Thèse de doctorat. Université Joseph-Fourier-Grenoble, France.
- Faber, E. J., Van Den Haak, M. J., Kamerling, J. P. et Vliegthart, J.F.G.** (2001). Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohydrate Research*. **331**: 173-182.
- Faber, E.J., Zoonb, P., Kamerlinga, J.P., Johannes, K. et Vliegthart, F.G.** (1998). The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*. **310**(4): 269-276.
- Facklam, R. et Elliott, J. A.** (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. **8**: 479-495.
- Falkow, S.** (1958). Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of salmonellae and shigellae. *American Journal of Clinical Pathology*. **29**: 598-600.
- Farag, S.** (1978). Separation and analysis of some sugars by using thin layer chromatography. *Journal of the ASSBT*. **20**: 251-254.
- Feldgarden, M., Young, S.K., Kodira, C.D., Zeng, Q., Koehrsen, M., Alvarado, L., Berlin, A., Freedman, E., Gellesch, M.D., Larson, L., Lewis, B., Mehta, T., Park, D., Pearson, M., Roberts, A., Saif, S., Shea, T., Sheony, N., Sisk, P., Stolte, C., Sykes, S., Walk, T., White, J., Yandava, C., Gimore, M., Manson, J., Palmer., K., Carniol, K., Lander, E., Nusbaum, C., Galagan, J. et Birren, B.** (2009). The Genome Sequence of *Enterococcus faecalis* strain AR01/DG. *The Broad Institute Genome Sequencing Platform*. bases 1 to 1531.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. et Poznanski, E.** (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal*. **19**: 3-11.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N. et Lucas, R.** (2011). Food Applications and Regulation: Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Eds Drider, D. et Rebuffat, S. Spain. 253-390.

- Gamar, L., Blondeau, K. et Simonet, J.M.** (1997). Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*. **83**: 281-287.
- Gamar, L., Blondeau, K. et Simonet, J.M.** (1998). Influence of culture conditions on polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*. **85**: 664-672.
- Gancel, F. et Novel, G.** (1994). Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures 1: Conditions of production. *Journal of Dairy Science*. **77**: 685-688.
- Gancel, F., Novel, G., Carcano, D., Loones, A. et Ramos, P.** (1988). Procédé de sélection de clones bactériens producteurs d'exopolysaccharides et clones producteurs obtenus. Brevet N°: R 2 632 968-A1. France 8808009.JH.
- Garcia-Garibay, M. et Marshall, V.M.E.** (1991). Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**: 325-328.
- Garry, P. et Le Guern, L.** (1999). Les bactéries lactiques. *Bulletin de liaison du CTSCCV*. **9**: 423-429.
- Garvie, E.I.** (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc*'s from other lactic acid bacteria. In: *Methods in Microbiol.* Vol 16. Bergan, T. Eds Academic Press. New York, USA. 147-177.
- Garvie, E.I.** (1986). Gram positive cocci- Genus *Leuconostoc*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Eds. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt J.G. et. Baltimore, M.D: The Williams and Wilkins Co. 1071-1075.
- Gaspar, P., Carvalho, A.L., Vinga, S.A., Santos, H. et Neves, A.R.** (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. **31**: 764-788.
- Gassem, MA., Schmidt, K.A. et Frank, J.F.** (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Journal of food science*. **62**: 171-173.
- Gentès, M.C.** (2011). Compréhension du rôle structural d'exopolysaccharides de bactéries lactiques dans des systèmes laitiers fermentés enrichis en amidon modifié. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.
- Gevers, D.** (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse de Doctorat. University of Ghent, Faculty of Science. Belgique.
- Ghazouli, R.** (2013). Etude structurale et génétique des exopolysaccharides produits par l'espèce *Rhizobium sllae*. Thèse de doctorat. Université de Constantine1, Algérie.
- Giraffa, G.** (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. **88**(2-3): 215-222.
- Girard, M. et Schaffer-Lequart, C.** (2007a). Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *International Dairy Journal*. **17**(6): 666-673.
- Girard, M. et Schaffer-Lequart, C.** (2007b). Gelation of skim milk containing anionic exopolysaccharides and recovery of texture after shearing. *Food Hydrocolloids*. **21**: 1031-1040.
- Girard, M. et Schaffer-Lequart, C.** (2008). Attractive interactions between selected anionic exopolysaccharides and milk proteins. *Food Hydrocolloids*. **22**: 1425-1434.

- Goh, K.K.T., Haisman, D.R. et Singh, H.** (2005). Development of an improved procedure for isolation and purification of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**: 202-208.
- Gollop, N., Zakin, V. et Weinberg, Z.G.** (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 662-666.
- González, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J.m., Fresno, J.M. et Tornadijo, M.E.** (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*. **18**: 716- 722.
- Górska-Frączek, S., Sandström, C., Kenne, L., Paściak, M., Brzozowska, E., Strus, M., Heczko, P. et Gamian, A.** (2013). The structure and immunoreactivity of exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus johnsonii* strain 151. *Carbohydrate Research*. **378**: 148-153.
- Graber, M., Morin, A., Duchiron, F. et Monsan, P.F.** (1988). Microbial polysaccharides containing 6-desoxysugars. *Enzyme and Microbiol Technolgy*. **10**: 197-260.
- Grobben, G.J., Boels, I.C., Sikkema, J., Smith, M.R. et de Bont, J.A.M.** (2000). Influence of ions on growth and production of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Journal of Dairy Research*. **67**: 131-135.
- Grobben, G.J., Chin-Joe, I., Kitzen, V.A., Boels, I.C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M.R. et de Bont, J.A.M.** (1998). Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. *Applied of Environmental Microbiology*. **64**: 1333-1337.
- Grobben, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R. et de Bont, J.A.M.** (1995). Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Bacteriology*. **79**: 103-107.
- Grobben, G.J., Smith, M.R., Sikkema, J. et de Bont, J.A.M.** (1996). Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **46**: 279-284.
- Grobben, G.J., van Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterfeld, A., Sala, G., Smith, M.R., Sikkema, J. et de Bont, J.A.M.** (1997). Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48**: 516-521.
- Grosu-Tudor, S. et Zamfir, M.** (2011). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Romanian fermented vegetable. *Romanian Biotechnological Letters*. **16**(6): 148-154.
- Guiraud, J.** (1998). Microbiologie Alimentaires : Technique et ingénierie. Série agroalimentaire. Eds Dunod. Paris, France. 89-95.
- Guiraud, J.** (2003). Microbiologie alimentaire : Technique d'analyse microbiologiques. Eds Techniques et Documentations, Dunod. Paris, France. 90-292.
- Guiraud, J. et Galzy, P.** (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Eds l'Usine Nouvelle-Paris, France. 157-158.
- Guiraud, J.P. et Rosec J.P.** (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237- 251.
- Guzel-Seydim, Z.B., Sezgin, E. et Seydin, A.C.** (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Control*. **16**: 205-209.

- Haddie, J.M.** (1986). Other streptococci. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology*. Eds. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt J.G. et. Baltimore, M.D: The Williams and Wilkins Co. **1**: 1070.
- Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C. et Wu, Z.** (2014). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers*.**112**: 556-562.
- Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H. et Zhang, L.** (2016). Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharides producing lactic acid Bacteria. *BioMed Research International*. **7945675**: 2314-6133.
- Hardie, J.M. et Whiley, R.A.** (1995). The genus of *Streptococcus*. *In: The genera of lactic acid bacteria*. Wood, B.J.B. et Holzappel, W.H. Eds Aspen publishers. Gaithersburg, USA.
- Harrigan, W.F. et McCane, M.E.** (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Eds Academic Press. Orlando. 66-81.
- Hassan, A.N.** (2008). ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. **91**: 1282-1298.
- Hassan, A.N., Frank, J.F. et Soda, E.I.** (2003b). Observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* **13**: 755-762.
- Hassan, A.N., Ipsen, R., Janzen, T. et Qvist, K.B.** (2003a). Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*. **86**: 1632-1638.
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B. et Suarez, J.E.** (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*. **81**: 565-570.
- Ho, T.N.T.** (2008). Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du Sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de doctorat. Université Bordeaux1, France.
- Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A. et Caubet, R.** (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Biotechnology Progress*. **28**: 134-142.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. et Schillinger, U.** (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. **73**: 365S-373S.
- Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, C. et Han, Y.** (2009). Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control*. **20**: 99-104.
- Hugas, M. et Monfort, J.M.** (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry Mediterranean Aspects of Meat Quality as Related to Muscle Biochemistry*. **59**: 547-554.
- Huggins, M.L.** (1942). The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. *Journal of the American Chemical Society*. **64**: 2716-2718.

- Idoui, T. et Karam, N.E.** (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*. **59**: 361-367.
- Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E. et Karam, N.E.** (2009). Bactéries lactiques isolées de lait de vache, de brebis et de chèvre de l'ouest Algérien. *Rencontre des Recherches sur les Ruminants*. **9**: 375.
- Ignacio-Sanchez, J., Martínéz, B. et Rodriguez, A.** (2005). Rational selection of *Leuconostoc* strains from mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. **105**: 377-387.
- Ismail, B. et Nampoothiri, K.M.** (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*. **192**: 1049-1057.
- Iwański, R.Z., Wianecki, M., Dmytrów, I. et Krzysztof, K.** (2012). Effect of fermentation reactions on rheological properties of foods: Fermentation, effects on food properties. Bhavbhuti, M. M., Kamal-Eldin, A. et Iwański, R.Z. Eds CRC press: Taylor and Francis group. Boca Raton, Florida, USA. 90-109.
- Jeanes, A.** (1966). Dextran. Vol 4. Mark, H.F. Eds Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York, USA. 805-824.
- Jeanes, A., Haynes, W.C. et Wilham, C.A.** (1956). Characterization of dextrans from four types of *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*. **71**(2):167-173.
- Jolly, L. et Stingle F.** (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**(9): 733-745.
- Joshi, S.R. et Koijam, K.** (2014). Exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis*, isolated from ethnically fermented Beverage. *National Academy Science Letters*. **37**: 59-64.
- Kacem, M., Zadi-Karam, H. et Karam, N.E.** (2002). Bactéries lactiques isolées de lait de vaches, de brebis et de chèvre de l'Ouest Algérien. *Rencontre des Recherches sur les Ruminants*. **9**: 375.
- Kacem, M., Zadi-Karam, H. et Karam, N.E.** (2004). Isolation of Lactic acid bacteria from its possible use in the fermentation of Algerian green olive. *Grasas y Aceites*. **55**: 385-393.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J. et Partanen, P.** (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **106**: 17193-17198.
- Karam, N.E.** (1995). Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologiques : Etude biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat. Université d'Oran1, Algérie.
- Kempler, G.M. et McKay, L.L.** (1980). Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **39**: 926-933.
- Kersani, I.** (2013). Production d'exopolysaccharides par deux souches de lactobacilles. Mémoire de master. Université d'Oran1, Algérie.
- Khalid, N.M. et Marth, E.H.** (1990). Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Reviews of the progress of dairy science*. **73**: 158-167.

- Khuntia, A. et Chaudhary, L.C.** (2002). Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences Microbiology*. **15**: 188-194.
- Kim, C.S., Lee, S.Y., Cho, S.H., Ko, Y.M., Kim, B.H., Kim, H.J., Park, J.C., Kim, D.K., Ahn, H., Kim, B.O., Lim, S.H., Chun, HS. et Kim, D.K.** (2008). Cordyceps militaris induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN-gamma production. *Journal of Ethnopharmacology*. **120**: 366-371.
- Kimmel, S.A. et Roberts, R.F.** (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*. **40**: 87-92.
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F. et Ziegler, G.R.** (1998). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* RR grown in a semi-defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 659-664.
- Kitazawa, T., Masuo, M. et Somlyo, A.P.** (1991). G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **88**: 9307-9310.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolton, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawwkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguim, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. et Siezem, R.** (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*. **82**: 29-58.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M. et Siezen, R.J.** (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **100**: 1990-1995.
- Kleerebezem, M., van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I. C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J. et de Vos, W. M.** (1999). Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**: 357-365.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. et Budde, B.B.** (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. **105**: 419-431.
- Koepsell, H., Tsuchiya, H., Hellman, N., Kazenko, A., Hoffman, C., Sharpe, E. et Jackson, R.** (1953). Enzymatic synthesis of dextran acceptor specificity and chain initiation. *Journal of Biological Chemistry*. **200**: 793-801.
- Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. et Topisirovic, L.** (1992). Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 4086-4088.
- Korakli, M. et Vogel, R. F.** (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **71**: 790-803.

- Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Leer, R.J., Faber, E.J., van der Maarel, M.J. et Dijkhuizen, L.** (2002). Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1-->4) and alpha-(1-->6) glucosidic bonds. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 4283-4291.
- Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K. et Seesuriyachan, P.** (2010). Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *Maejo International Journal of Science and Technology*. **4**(02): 318-330.
- Labadie, J.** (1999). Consequences of packaging on bacterial growth: Meat is an ecological niche. *Meat Science*. **52**: 299-305.
- Lahtinem, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. et Wright, A.V.** (2012). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Eds Taylor and Francis group. Boca Raton London New York, USA.
- Lamothe, G.T.** (2000). Molecular characterization of exopolysaccharides biosynthesis by *Lactobacillus delbueckii* subsp. *bulgaricus*. Thèse de doctorat. Université de Lausanne, Suisse.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R., et de las Rivas, B.** (2013). Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*. **95**(2): 272-280.
- Laneuville, S.I. et Turgeon, S.L.** (2014). Microstructure and stability of skim milk acid gels containing an anionic bacterial exopolysaccharide and commercial polysaccharides. *International Dairy Journal*. **37**: 5-15.
- Langella, P., Sebastien, N., Commisaire, J., Bolotine, A., Gruss, A. et Le Loir, Y.** (2001) Caractérisation des facteurs d'hôtes affectant la sécrétion des protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis*. *Lait*. **81**: 19-28.
- Larpent, J.P.** (1989). Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. *In*: Microbiologie alimentaire. Bourgeois, C.M. et Larpent, J.P. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 3-15.
- Larpent, J.P., Copin, M.P., Germonville, A., Jaquet, M. et Thétas, J.L.** (1997). Microbiologie du lait et des produits laitiers. *In* : Microbiologie alimentaire, Techniques de laboratoire. Larpent, J.P. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 704-805.
- Laws, A., Gu, Y. et Marshall, V.** (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. **19**: 597-625.
- Laws, A.P. et Marshall, V.M.** (2001). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**(9): 709-721.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J, Verhoeven, T.L.A., Fadda, A.A., Marchal, K. et Vanderleyden, J.** (2007b). Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. **189**: 860-871.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Perea Vêlez, M., Vanderleyden, J. et De Keersmaecker, S.C. J.** (2007a). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the



- probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied Environmental Microbiology*. **73**: 6768-6775.
- Leclerc, H., Gaillard, F.L. et Simonet, M.** (1994). Les grands groupes de bactéries. In: Microbiologie générale: La bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris, France. 445.
- Lee, S.S., Lahey, B.B., Owens, E.B. et Hinshaw, S.P.** (2008). Few preschool boys and girls with ADHD are well-adjusted during adolescence. *Journal of Abnormal Child Psychology*. **36**: 373-383.
- Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszeski, J.M., Strecker, G., Favre, N. et Neeser, J.R.** (1997). Structural characterization of exocellular polysaccharides to rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **1**: 709-721.
- Leveau JY, Bouix M, De Roissart H.** (1991). La flore lactique. In : Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. Bourgeois, C.M. et Larpent, J.P. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 152-186.
- Lin, T.Y. et Chien M.F.C.** (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*. **100**: 1419-1423.
- Liu, C.F., Tseng, K.C., Chiang, S.S., Lee, B.H, Hsu, W.H. et Pan, T.M.** (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **91**: 2284-2291.
- Liu, Q., Huang, X., Yang, D., Si, T., Pan, S. et Yang, F.** (2016). Yield improvement of exopolysaccharides by screening of the *lactobacillus acidophilus* ATCC and optimization of the fermentation and extraction conditions. *Excli Journal*. **15**:119-133.
- Llaubères, R.M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdiou, D. et Fournet B.** (1990). Structure of an exocellular b-D-glucan from *Pediococcus* sp. a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*. **203**: 103-107.
- Lloret, J., Wullf, B.H, Rubio, J.M., Dowine, J.A, Bonilla, I. et Rivila R.** (1998). Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**:1024-1028.
- Lonvaud-Funel, A., Guilloux, Y. et Joyeux, A.** (1993). Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *Journal of Applied Bacteriology*. **74**: 41-47.
- Looijesteijn, P. J. et Hugenholtz. J.** (1999). Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **88**: 178-182.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., Devries, E., Abee, T. et Hugenholtz, J.** (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 71-80.
- Looijesteijn, P.J., van Casteren, W.H.M., Tuinier, R., Doeswijk-Voragen, C.H.L. et Hugenholtz, J.** (2000). Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *Journal of Applied Microbiology*. **89**(1): 116-122.
- Ludbrook, K.A., Russell, C.M. et Greig, R.I.** (1997). Exopolysaccharide production from lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *Journal of Food Science*. **62**:597-600.

- Lule, V.K., Singh, R., Pophaly, S.D. et Tomar, S.K.** (2016). Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of *Leuconostoc mesenteroides* BA08 in Whey. *International Journal of Dairy Technology*. **69**: 520-531.
- Lule, V., Singh, R., Behare, P. et Kumar, T.S.** (2015). Comparaison of exopolysaccharides production by indigenous *Leuconostoc mesenteroides* strains in whey medium. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. **34**: 8-12.
- Ma, L. et Barbosa-Canovas, G.V.** (1995). Instrumentation for the rheological characterization of foods. *Food Science and Technology International*. **1**(1): 3-17.
- Macedo, M.G., Lacroix, C. et Champagne C.P.** (2002a). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. *Biotechnology Progress*. **18**: 167-173.
- Macedo, M.G., Lacroix, C., Gardner, N.J. et Champagne, C.P.** (2002b). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*. **12**: 419-426.
- Macura, D. et Townsley, P.M.** (1984). Scandinavian ropy milk-identification and characterisation of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science*. **67**: 735-744.
- Majumder, A., Singh, A. et Goyal, A.** (2009). Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. *Carbohydrate Polymers*. **75**: 150-156.
- 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., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñiz, 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. et Mills, D.** (2006). Comparative genomic of lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **103**:15611-15616.
- Maloumbi, M.G., Héron, S. et Tchaplal, A.** (2006). Analyse chromatographique des triglycérides pourquoi et comment? Partie II : Apport des chromatographies en phases liquide et supercritique. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. **22**: 1-12.
- Manresa, A., Espuny, M. J., Guinea, J. et Comelles, F.** (1987). Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **26**: 347-351.
- Marshall, V.M., Dunn, H., Elvin, M., McLay, N., Gu, Y., et Laws, A.P.** (2001). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. *Carbohydrates Ressources*. **331**: 413-422.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K. et Holzapfel, W.H.** (2004). Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*. **94**: 269-278.
- Mathot, K., Kihal, M., Prévost, H. et Diviés, C.** (1994). Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *International Journal of Dairy*. **4**: 459-469.

- Mayeux, J.V., Sandine, W.E. et Elliker, P.R.** (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*. **45**: 655-656.
- Mende, S., Peter, M., Bartels, K., Rohm, H. et Jaros, D.** (2013). Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels. *Food Hydrocolloids*. **3**: 178-185.
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J.M., Mercier, G., Ehrlich, D. et Renault, P.** (2007). Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *Journal of Bacteriology*. **189**:1351-1357.
- Monnet, C., Latrille, E., Béal, C. et Corrieu G.** (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques, de la Génétique aux Ferments. Corrieu, G. et Luquet, F.M. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 511-611.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M. et Renaud-Siméon, M.** (2011). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**: 673-683.
- Moosavi-nasab, M., Gavahian, M., Yousefi, A.R. et Askari, H.** (2010). Fermentative production of dextran using food industry wastes. *World Academy of Science Engineering and Technology*. **44**: 1231-1233.
- Mora, D., Fortina, M.G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G. et Manachini, P.L.** (2002). Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. **93**: 278-287.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. et Yura, T.** (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthesis pathways. *Journal of Bacteriology*. **48**(1): 64-71.
- Morita, T., Itakura, S., Saito, D.N., Nakashita, S., Harada, T., Kochiyama, T. et Sadato N.** (2008). The role of the right prefrontal cortex in self-evaluation of the face: A functional magnetic resonance imaging study. *Journal of Cognitive Neuroscience*. **20**(2): 342-355.
- Morrison, I.M. et Stewart, D.** (1998). Plant cell wall fragments released on solubilisation in trifluoroacetic acid. *Phytochemistry*. **49**(6): 1555-1563.
- Mozzi, F., De Giori, S.G., Olivier, G. et De Valdez, F.G.** (1994). Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*. **49**: 667-670.
- Mozzi, F., De Giori, S.G., Olivier, G. et De Valdez, F.G.** (1996). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under pH control. *Biotechnology Letters*. **18** (4): 435-439.
- Nguyen, T.H.K et Nguyen, H.N.** (2013). Exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* Pn04 after co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* Vtcc-B-643. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **3**: 014-017.
- Nichols, C., Guezennec, J. et Bowman, J.P.** (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice and deep-sea hydrothermal vents. *Marine Biotechnology*. **7**: 253-271.
- Nicklin, J., Paget, T., Graeme-Cook, R. et Killington, R.** (1999). La structure et la fonction des bactéries: L'essentiel en Microbiologie. Eds Berti. France. 210-216.

- Nierop-Groot, M.N. et Kleerebezem, M.** (2007). Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB. *Journal of Applied Microbiology*. **103(6)**: 2645-2656.
- Nieto-Arribas, P., Sesena, S., Poveda, J.M., Llans, P. et Cabezas, L.** (2010). Genetic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*. **27**: 85-93.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.C. et Hardisson De La Torre, A.** (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science*. **62**: 237-243.
- Novel, G.** (1993). Les bactéries lactiques. In: Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y. et Bouix, M. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 170-374.
- Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M. et Tsuchiya, F.** (1983). Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agricultural and biological chemistry*. **47**: 1623-1625.
- Ogier, J.C., Casalta, E., Farrokh, C. et Saïhi, A.** (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*. **126**: 286-290.
- Onilude, A.A., Olaoye, O., Fadahuisi, I.F., Owoseni, A., Garuba, E.O. et Atoyebi, T.** (2013). Effects of culture conditions on dextran production by *Leuconostoc* sp. *International Food Research Journal*. **20**: 1645-1651.
- Orla-Jensen, S.** (1919). The Lactic Acid Bacteria. Orla-Jensen, S. Eds Host and Son. Copenhagen, Denmark. 1-196.
- Paci Kora, E.** (2004). Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé: Quels impacts respectifs sur la perception et de la texture de la flaveur. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique. Paris-Grignon, France.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopouloutzanetaki, E. et Kotzekidou, P.** (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. **65**: 859-867.
- Parche, S., Beleut, M., Rezzonico, E., Jacobs, D., Arigoni, F., Titgemeyer, F. et Jankovic, I.** (2006). Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: g/cP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. *Journal of Bacteriology*. **188**:1260-1265.
- Patil, P., Wadehra, A., Munjal, K. et Behare, P.** (2015). Isolation of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from dairy products. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. **34(4)**: 280-284.
- Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K. A., Dougherty, B. A. et Fraser. C. M.** (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. **299**: 2071-2074.

- Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. et Roy, D.** (2005) Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strain of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology*. **151**: 1839-1851.
- Pérez, G., Cardell, E. et Zárata V.** (2000). Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait*. **80**(6): 589-600.
- Petry S., Furlan S., Crepeau M.J., Cerning J., Desmazeaud M.** (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 3427-3431.
- Petry, S., Furlana, S., Waghornec, E., Saulnier, L., Cerning, J. et Maguin, E.** (2003). Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiology Letters*. **221**: 285-291.
- Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. et Cerning, J.** (2000) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 2302-2310.
- Pilet, M.F., Magras, C. et Federighi, M.** (2005). Bactéries lactiques. In: Bactériologie alimentaire. Federighi, M. Eds Economica. Paris, France. 219-240.
- Pluvinet, A., Charron-Bourgoin, F., Morel, C. et Decaris, B.** (2004). Polymorphism of *eps loci* in *Streptococcus thermophilus*: sequence replacement by putative horizontal transfer in *S. thermophilus* IP6757. *International Dairy Journal*. **14**: 627-634.
- Pointurier, H.** (2003). La gestion matière dans l'industrie laitière. Eds Techniques et documentation, Lavoisier. Paris, France. 64-388.
- Poli, A., Anzelmo, G. et Nicolaus, B.** (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*. **8**: 1779-1802.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A.** (1999). Isolation of pure bacterial cultures from specimens: Microbiology International. Eds Brown. New York, USA. 714-796.
- Provencher, C., Lapointe, G., Sirois, S., Van Catseren, M.R. et Roy, D.** (2003) Consensus degenerate hybrid nucleotide primers for amplification of priming glucosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3299-3307.
- Purwandari, U., Shah, N.P. et Vasiljevic, T.** (2007). Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*. **17**: 1344-1352.
- Qader, S.A.U., Iqbal, L., Aman, A., Shireen, E. et Azhar, A.** (2005). Production of dextran by newly isolated strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. *Turkish Journal of Biochemistry*. **31**: 21-26.
- Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., Cao, L. et Ling, W.** (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. **90**(3): 485-492.

- Racine, M.** (1991). Production de polysaccharides microbiens sur des milieux glucidiques en surplus au Québec. Rapport final d'un projet de recherche, ACER. Saint Hyacinthe, Québec, Canada.
- Ramos, A., Boeals, I.C., De Vos, W.M. et Santos, H.** (2001). Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 33-41.
- Ricciardi, A. et Clementi, F.** (2000) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science*. **12**: 22-45.
- Roberts, C., Fett, W., Osman, S., Wijey, C., O'Connor, J. et Hoover, D.** (1995). Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**:463-471.
- Robijn, G.W., van den Berg, D.J.C., Haas, H., Kamerling, J.P. et Vliegthart, J.F.G.** (1995). Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1, *Carbohydrate Research*. **276**(1): 117-136.
- Robijn, G.W., Wienk, H.L.J., van den Berg, D.J.C., Haas, H., Kamerling, J.P. et Vliegthart, J.F.G.** (1996). Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydrate Research*. **285**: 129-139.
- Rodriguez, A., Gonzalez, C., Diaz, V., Vecchionacce, H. et Hurtado, E.** (2003). Effect of lipids and zeolite incorporation on total apparent digestibility of diets with sweet potato (*Ipomoea batatas* l.) foliage in pigs. *Cuban Journal of Agricultural Science*. **37**: 421-424.
- Rodriguez-Calleja, J.M., García-López, M., Santos, J.A. et Otero, A.** (2005). Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. *Meat Science*. **70**: 389-394.
- Romain, H.** (2011). Caractérisation des régulateurs transcriptionnels Rgg et étude du rôle de la protéase Rgg0182 de *Streptococcus thermophilus*. Thèse de doctorat. Université Henri-Poincaré, France.
- Rosset, R., Caude, M. et Jardy, A.** (1991). Chromatographie en phase liquide supercritique. Eds Elsevier Masson, Lavoisier. France. 936.
- Ruas-Madiedo, P. et de los Reyes-Gavilan, C.G.** (2005). Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **88**(3):843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Hernández-Barranco, A., Margolles, A. et de los Reyes-Gavilán, C.G.** (2005). A bile salt-resistant derivative of *Bifidobacterium animalis* has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(11): 6564-6570.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. et Zoon P.** (2002a). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **12**: 163-171.
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M. et Zoon, P.** (2002b). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*. **12**(8): 689-695.
- Ruiz, G.** (2005). Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat. Université de Limoges, France.

- Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Benito, M.J., Nevado, F.P. et Córdoba, M.G.** (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential use in Iberian dry fermented sausages. *Meat science*. **80**: 715-721.
- Salawu, M.B., Warren, E.H. et Adesogan, A.T.** (2001). Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-corps forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **81**: 1263-1268.
- Salminen, S., Gorbach, S., Yuan-Kum, L. et Benno, Y.** (2004). Human studies on probiotics: what is scientifically proven today? *In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects*. Salminen, S., von Wright, A. et Ouwerhand, A. Eds Marcel Dekker. New York, USA. 515-530.
- Salvetti, E., Torriani, S. et Felis, G.E.** (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrobial Proteins*. **4**(4): 217-226.
- Samarzija, D., Lukac Havranek, J., Antunac, N. et Sikora, S.** (2001). Characteristics and role of mesophilic lactic cultures. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. **66**: 113-120.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. et Metaxopoulos, J.** (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*. **23**: 179-196.
- Sanchez, B., Noriega, L., Ruas-Maldiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C.G. et Margolles, A.** (2004). Acquired resistance to bile increases fructose-6- phosphate phosphoketolase activity in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*. **235**: 35-41.
- Sanchez, J.I., Martinez, B. et Rodriguez, A.** (2005). Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **105**: 377-387.
- Sanchez, J.L., Martinez, B., Guillen, R., Jimenez, D.R. et Rodriguez, A.** (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 7495-7502.
- Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J. et Guyot, J.P.** (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*. **72**: 53-62.
- Santos, M., Rodrigues, A. et Teixeira, J.A.** (2005). Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*. **25**: 1-6.
- Sarwat, F., Qader, S.A.U., Aman, A. et Ahmed, N.** (2008). Production and characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*. **4**: 379-386.
- Savado, A.** (2004). Caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso. Thèse de doctorat. Université d'Ouagadougou, Burkina Faso.
- Schillinger, U. et Lücke, F.K.** (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*. **4**: 199-208.
- Schleifer, K. H. et Stackebrandt, E.** (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*. **37**:143-87.

- Schleifer, K.H.** (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **46**: 201-203.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Klipper-Bälz, R., Collins, M.D. et Fischer, W.** (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. **6**: 183-195.
- Sebastiani H., Zelger G.** (1998). Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*. **53**: 15-20.
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Chaiyaso, T. et Leksawasdi, N.** (2012). Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confuses* in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **76**(5): 912-917.
- Settanni, L., et Corsetti, A.** (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. **121**: 123-138.
- Shene, C., Canquil, N., Bravo, S. et Rubilar, M.** (2008). Production of the exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity. *International Journal of Food Microbiology*. **124** (3): 279-284.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M. et Cescutti, P.** (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: Isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology*. **51**(2-3): 105-111.
- Stiles, M.E. et Holzappel, W.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. **36**(1): 1-29.
- Stingle, F., Neeser, J.R. et Mollet B.** (1996). Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*. **178**:1680-1690.
- Stingle, F., Newell, W.J. et Neeser J.R.** (1999a). Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*. **181**: 6354-6360.
- Stingle, F., Vincent S. J., Faber E.J., Newell J.W., Kamerling J.P. et Neeser J.R.** (1999b). Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis*. MG1363: Production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular Microbiology*. **32**: 1287-1295.
- Streit, F., Corrieu, G. et Béal, C.** (2007). Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *Journal of Biotechnology*. **128**: 659-667.
- Sutherland, I.W.** (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*. **8**: 143-213.
- Sutherland, I.W.** (1982). Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*. **23**: 79-150.
- Sutherland, I.W.** (1990). Physiology and industrial production. *In: Biotechnology of microbial exopolysaccharides: Cambridge studies in biotechnology*. Vol 9. Baddiley, J., Higgins, N.H. et Potter, W.G. Eds Cambridge University Press. Cambridge. 70-88.
- Sutherland, I.W.** (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* **16**: 41-47.

- Suzuki, T., Walter, J.A., LeBlanc, P., Mackinnon, S., Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Beuzenberg, V., Mackenzie, A.L., Jensen, D.L., Cooney, J.M. et Quilliam, M. A.** (2006). Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chemical Research in Toxicology*, in press.
- Säwen, E., Huttunen, E., Zhang, X., Yang, Z. et Widmalm, G.** (2010). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST111 solely by NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*. **47**: 125-134.
- Tamime, A.Y.** (2002). Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook. Robinson, R.K. Eds John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 261-366.
- Teggatz, A.Y. et Morris, H.A.** (1990). Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Structure*. **9**: 133-138.
- Terzaghi, B.E. et Sandine, W.E.** (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. **29**: 807-813.
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J, Donati, C., Medini, D., Ward, N.L., Angiuoli, S.V., Crabtree, J., Jones, A.L., Durkin, A.S, Deboy, R.T., Davidsen, T.M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit, y., Ros, I., Peterson, J.D, Hauser, C.R., Sundaram, J.P., Nelson, W.C., Madupu, R., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Daugherty, S.C., Haft, D.H., Selengut, J., Gwinn, M.L, Zhou, L., Zafar, N., Khouri, H., Radune, D., Dimitrov, G., Watkins, K., O'Connor, K.J., Smith, S., Utterback, T.R., White, O., Rubens, C.E., Grandi, G., Madoff, L.C., Kasper, D.L., Telford, J.L., Wessels, M.R., Rappuoli, R. Fraser, C.M.** (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **102**: 13950-13955.
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J., Donatic, C et Medini, D.** (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae* implications for the microbial 'pan-genome'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **39**: 13950-13955.
- Teuber, M. et Geis, A.** (2006). The genus *lactococcus*. *Prokaryotes*. **4**: 205-228.
- Thakur, M., Weng, A., Fuch, H., Sharma, V., Bhargava, C.S., Chauhan, N.S., Dixit V.K. et Bhargava, S.** (2012). Rasayana properties of Ayurvedic herbs: Are polysaccharides a major contributor. *Carbohydrate Polymers*. **87**: 13-15.
- Tidona, F., Zago, M., Locci, F., Contarini, G., Giraffa, G., Carminati, D. et Corredig, M.** (2016). Selection of *Streptococcus thermophilus* strains able to produce exopolysaccharides in milk. *International Journal of Dairy Technology*. **69**(4): 569-575.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G. et Vogel, R.F.** (2003). *In situ* production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 945-952.
- Todorov, S.D., Koep, K.S.C., Van Reenen, C.A., Hoffman, L.C., Slinde, E. et Dicks, L.M.T.** (2007). Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and Springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. *Meat Science*. **77**: 405-412.

- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. et Lozo, J.** (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **112**: 230-235.
- Torino, M.I., Sesma, F. et Font de Valdez, G.** (2000). Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification. *Milchwissenschaft*. **35**: 314-316.
- Torres, C. A., Marques, R., Ferreira, A. R., Antunes, S., Grandfils, C., Freitas, F., et Reis, M. A.** (2014). Impact of glycerol and nitrogen concentration on *Enterobacter* A47 growth and exopolysaccharide production. *International Journal of Biological Macromolecules*. **71**:81-86.
- Touati, A., Achour, W., Abbassi, M.S. et Ben Hassen, A.** (2007). Detection of ica genes and slime production in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from catheter-related infections in neutropenic patients. *Pathologie Biologie (Paris)*. **55**(6): 277-282.
- Trachoo, N.** (2002). Yogurt: the fermented milk. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. **24**: 727-737.
- Tuinier, R., van Casteren, W.H.M., Looijesteijn, P.J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. et Zoon, P.** (2001). Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers*. **59**(3): 160-166.
- Tuinier, R., Zoon, P., Olieman, C., Cohen-Stuart, M.A. Fleeer, G.J. et De Kruif, C.G.** (1999). Isolation and physical characterization of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers*. **49**: 1-9.
- Turgeon, S.L. et Plesca, V.** (2009). Study of interactions between exopolysaccharides produced by strain *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M and milk proteins. Dans: 5th International Symposium on Food Rheology and Structure. Proceeding ISFRS 2009. Zurich, Suisse. 416-419.
- Tyvaert, G.** (2005). Etude structurale et fonctionnelle du cluster *eps* de *Streptococcus thermophilus* IP6756 : Spécificités et hypothèses nouvelles. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences - UFR Sciences et Techniques Biologiques.
- Van Calsteren, M.R., Pau-Roblot, A. et Roy, D.** (2002). Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Biochemical Journal*. **363**: 7-17.
- van den Berg, D.J.C., Robijn, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebouer, A.M. et Verrips, C.T.** (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(8): 2840-2844.
- van den Berg, J.C., Smits, A., Pot, B., Ledebouer, A.M., Kersters, K., Verbakel, J.M.A. et Verrips, C.T.** (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentations processes and culture collections. *Food Biotechnology*. **7**: 189-205.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., de Valdez, G.F. et De Vuyst, L.** (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*. **118**(3): 250-258.

- van Geel-Schutten, G. H., Flesch F., Ten Brink B., Smith M. R. et Dijkhuizen L.** (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **50**: 697-703.
- van Kranenburg, R. et de Vos, W.M.** (1998). Characterization of multiple regions involved in replication and mobilization of plasmid pNZ4000 coding for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. **180**: 5285-5290.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M. et de Vos, W.M.** (2000). Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000. *Plasmid*. **43**: 130-136.
- van Kranenburg, R., Marugg, J. D., van, S., Willem, J. et de Vos, W. M.** (1997). Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. **24**: 387-397.
- Van Marle, M.E. et Zoon, P.** (1995). Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim milk gels. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. **49**: 47-65.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, B., de Vos, P., Kersters, K. et Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. **60**: 407-438.
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J. et De Vuyst, L.** (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 900-912.
- Vedamuthu, E.R. et Neville, J.M.** (1986). Involvement of ropiness (mucoïdness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**: 677-682.
- Velasco, S.E., Yebra, M.J., Monedero, V., Ibarburu, I., Dueñas, M.T. et Irastorza, A.** (2007). Influence of the carbohydrate source on β -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*. **115**: 325-334.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V. et Debevere, J.** (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 33-42.
- Vescovo, M., Scolari, G. L. et Bottazzi, V.** (1989). Plasmid-encoded ropiness in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnology Letters*. **2**: 709-712.
- Videira, P.A., Garcia, A.P. et Sá-Correia, I.** (2005). Functional and topological analysis of the *Burkholderia cenocepacia* priming glucosyltransferase BceB, involved in the biosynthesis of the cepacian exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*. **187(14)**: 5013-5018.
- Vijayenda, S.V.N et Sarath Babu, R.S.** (2008). Optimization of new heteropolysaccharide produced by a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181. *Letters in Applied Microbiology*. **46**: 643-648.
- Vijayenda, S.V.N., Palanivel, G., Mahadevamma, S. et Tharanathan, R.N.** (2008). Physicochemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR-2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic fermented milk product. *Carbohydrate Polymers*. **72**: 300-307.
- Vinderla, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E. et Matar, V.** (2006). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*. **211**: 149-156.

- Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P. et Panya, A.** (2006). Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculums levels of *Lactobacillus curvatus*. *LWT-Food Science and Technology*. **39**: 814-826.
- Wacher-Rodarte, C., Galvan, M.V., Farrés, A., Gallardo, F., Marshall, V.M. et Garcia-Garibay, M.** (1993). Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. *Journal of Dairy Research*. **60**: 247- 254.
- Walling, E., Gindreau, E. et Lonvaud-Funel, A.** (2005). A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology*. **98**: 53-62.
- Wang, Q. et Fang, Y.** (2004). Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography b*. **812**: 309-324.
- Wang, W.** (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. **203**: 1-60.
- Weinberg, Z.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., Chen, Y et Gamburg, M.** (2004). Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **118**: 1-9.
- Welman, A.D. et Maddox, I.S.** (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*. **21**: 269-274.
- Welman, A.D., Maddox, I.S. et Archer, R.H.** (2003). Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology* . **95**: 1200-1206.
- Whistler, R.L. et BeMiller, J.N.** (1997). Polysaccharides. In: Carbohydrate chemistry for food scientists. Eds AACC Chemist. St-Paul, Minnesota, USA. 63-89.
- Whitfield, C.** (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*. **34**: 415-420.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. et Kim, S.K.** (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*. **84**: 14-21.
- Wilkinson, J.F.** (1958). The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriological Reviews*. **22**: 46-73.
- Williams, A.G. et Wimpenny, J.W.T.** (1977). Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *Journal of General Microbiology*. **102**(1): 13-21.
- Wolcott, R., Costerton, J.W., Raoult, D. et Cutler, S.J.** (2013). The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*. **19**: 107-112.
- Xue, Z., Hessler, C.M., Panmanee, W., Hassett, D.J. et Seo, Y.** (2013). *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiology Ecology*. **83**: 101-111.
- Yang, L. et Zhang, L.M.** (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*. **76**: 349-361.
- Zadi-Karam, H.** (1998). Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : Etude microbiologique et biochimique. Caractérisations technologiques, élaboration de ferments

lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de doctorat. Université de Constantine, Algérie.

Zadi-Karam, H. et Karam, N.E. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: Mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*. 24(3): 153-156.

Zajsek, K., Gorsek, A. et Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on Kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria. *Food chemistry*. **139**: 970-977.

Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z. et Li, S. (2013). Antioxydant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*. 54: 270-275.

Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y. et Yang, Z. (2001). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Brazilian Journal of Microbiology*. **42**(4): 1470-1478.

Zisu, B. et Shah, N.P. (2003). Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*. **86**: 3405-3415.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. et Boccio J. (2001). Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*. **21**: 569-579.

<http://www.directindustry.fr/prod/thermo-scientific-scientific-instruments-and-aut/product/7217-797323.ht>



Annexe

Milieux de culture

Milieu LM17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Extrait de levure	2.5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0.25g
Acide ascorbique	0.5g
Lactose	5g

pH=7.3

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu M17HS

C'est le milieu M17 comme décrit ci-dessus sauf que les 5g de lactose sont remplacés par 50g de saccharose.

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Saccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de sodium	1g
Gélatine	2.5g
Azide de sodium	0.0075g
Eau distillée qsp	1000ml
Agar	15g

pH=7.0

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Lait écrémé «Candia Silhouette»

Lait écrémé	100ml
Extrait de levure	0.05g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 10 minutes.

Milieu BMM (Morishita, Deguchi, Yajima, Sakurai et Yura, 1981)

Acides aminés

L-Tyrosine	0.1g
L-Arginine	0.1g
L- Acide aspartique	0.2g
L-Cysteine	0.2g
L- Acide glutamique	0.2g
L-Isoleucine	0.1g
L-Leucine	0.1g
L-Lysine	0.1g
L-Methionine	0.1g
L-Phénylalanine	0.1g
L-Serine	0.1g
L-Thréonine	0.1g
L-Tryptophane	0.1g
L-Valine	0.1g

Sels

MnSO ₄ -7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.02g
Acétate de sodium	6g
Citrate d'ammonium	1g
KH ₂ PO ₄	3g
K ₂ HP0 ₄	3g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5g

Solution de vitamines

Acide folique	0.01g
Acide nicotinique	0.1g
Acide pantothénique	0.1g
Pyridoxal	0.2g
Riboflavine	0.1g

<u>Tween 80</u>	1ml
<u>Glucose</u>	20g
Eau distillée qsp	1000ml

pH=6.0

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 10 minutes.

Milieu BMMHS

C'est le milieu BMM comme décrit ci-dessus avec remplacement des 20g de glucose par 50g de saccharose.

Milieu BMM modifié

Saccharose	100g
MnSO ₄ -7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.02g
Acétate de sodium	0.02g
KH ₂ PO ₄	3g
K ₂ HPO ₄	3g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5g
NH ₄ Cl	1g
Acide folique	0.01g
Acide nicotinique	0.1g
Pyridoxal	0.2g
Riboflavine	0.1g

Eau distillée qsp 1000ml

pH=5.8

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 10 minutes.

Milieu GMRS (de Man, Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	1g
Glucose	20g
K ₂ HPO ₄	2g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.1g
MnSO ₄ -7H ₂ O	0.05g
Tween80	1 ml
Agar	15g

Eau distillée qsp 1000ml

pH=6.5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu MRSHS

C'est le milieu MRS dont les 20g de glucose sont remplacés par 50g de saccharose.

Milieu à l'esculine

Peptone	20g
Citrate de fer ammoniacal	2g
Esculine	2g
Eau distillée qsp	1000ml

pH =7.4

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu Falkow (Falkow, 1958)

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Arginine	5g
Pyridoxal	0.005g
Pourpre de Bromocrésol	0.016g
Glucose	1g
Eau distillée qsp	1000ml

pH=7.3

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Lait Bleu de Sherman

Lait écrémé	100ml
Bleu de méthylène à 1% tyndallisé	1ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 10 minutes.

Gélose Columbia

Polypeptone	17g
Peptone de cœur	3g
Extrait de levure	3g
Amidon de maïs	1g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH=7.3

Après l'autoclavage, 10% de sang de mouton est additionné au milieu

Milieu KMK (Kempfer et McKay, 1980)

Peptone	2.5g
Extrait de levure	3g
Glucose	5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml
pH=6.6	

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 10 minutes.

Solutions ajoutées:

- ✓ 1ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium à 10%.
- ✓ 1ml de la solution de citrate ferrique et de citrate de sodium à 1%.

Milieu Clark et Lubs

Peptone	10g
Glucose	5g
KH ₂ PO ₄	2g
Eau distillée qsp	1000ml
pH=7.5	

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu 50 CHSp

Cystine	0.5g
Peptone	20g
Sodium chlorure	5g
Rouge de phénol	0.17g
Eau distillée qsp	1000ml
pH=7.8	

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Gélose au lait citaté

Lait écrémé stérile	10%
Citrate de sodium	10%
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000 ml

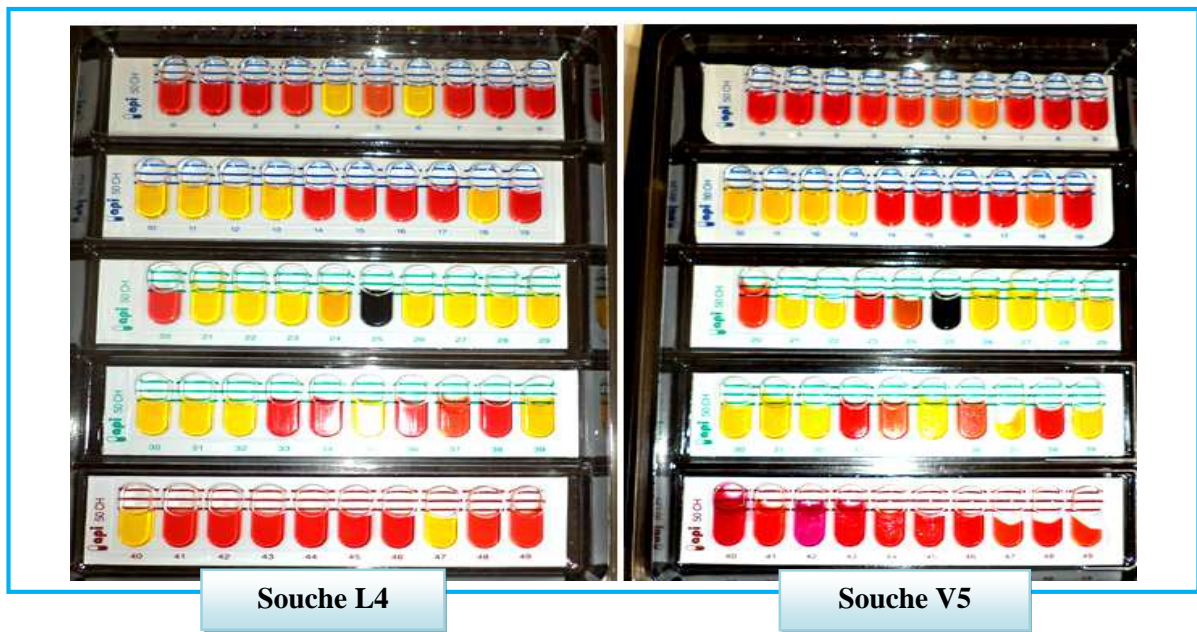
Ajouter 0.5ml de citrate de sodium (10%) à 10.5ml de lait stérile (10%) et 4ml de gélose blanche à 1.5%

Réactif

Réactif de Bradford

- ✓ Bleu de Coomassie G250 (Merk) 100mg
 - ✓ Ethanol 95% 50ml
 - ✓ Acide phosphorique 95% 100ml
 - ✓ Eau distillée qsp 1000ml
- pH=6.4

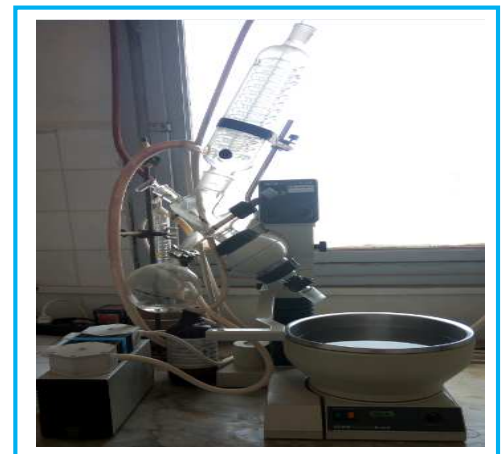
Exemples de profils fermentaires (galeries API 50 CH)



Appareillages



Lyophilisateur CHRIST.



Rotavapor BÜCHI Water bath B-480.



HPLC AGILENT 1100 Zorbax
carbohydrates.

Résumé

La recherche des souches lactiques productrices d'EPS a été réalisée sur 12 coques provenant de lait de chamelle, de viande rouge et de la collection du LBMB. 7 souches (L4, L5, L6, V1, V2, V3 et V4) étaient identifiées par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques comme étant *Ln. mesenteroides* et les 5 restantes (VO18, VO17, VO12, VO4 et V5) comme étant *Lactococcus* sp.

La production d'EPS par ces souches a été détectée qualitativement sur milieux gélosés hypersaccharosés et sur lait écrémé additionné de rouge de ruthénium, révélant la présence du caractère mucoïde. La mesure quantitative de la viscosité et des oses totaux a montré la présence du phénotype filant sur bouillon BMMHS et un rendement élevé en EPS obtenus par lyophilisation, allant de 19 à 658mg/l selon la souche considérée. 5 coques étaient sélectionnés comme meilleurs producteurs de ces biopolymères.

L'optimisation de cette production a montré que le pH et la température dépendent de la souche testée, le milieu M17HS est plus favorable pour ces souches, les meilleures sources de carbone, d'azote et de phosphate sont le saccharose à 80 et 100g/l, le NH_4Cl à 1g/l, le K_2HPO_4 à 6g/l et le KH_2PO_4 à 4g/l respectivement.

Les cinétiques de croissance et de production d'EPS ont montré que cette production est maximale à 100 heures et n'est pas liée à la croissance. L'évolution du pH et de l'acidité ont révélé que les souches sont faiblement acidifiantes.

L'identification des monosaccharides par des techniques chromatographiques montre que les EPS des leuconostocs sont majoritairement composés de glucanes, et d'arabinose pour la souche V5. L'activité rhéologique a confirmé le pouvoir épaississant et gélifiant de ces EPS dans le lait écrémé.

Mots clés : Bactéries lactiques d'Algérie - *Leuconostoc* - *Lactococcus* - EPS - viscosité - composition - activité rhéologique.

Abstract

The search for lactic acid producing EPS was carried out on 12 lactic acid bacteria strains from camel milk, red meat and the LBMB collection. Seven strains (L4, L5, L6, V1, V2, V3 and V4) were identified by morphological, physiological and biochemical tests as *Ln. mesenteroides* and the remaining 5 (VO18, VO17, VO12, VO4 and V5) as *Lactococcus* sp.

The production of EPS by these strains was detected qualitatively on hypersaccharosed agar media and on skimmed milk supplemented with ruthenium red, revealing the presence of the mucoïd character. The quantitative measurement of the viscosity and total oses showed the presence of the spinning phenotype on BMMHS broth and a high yield of EPS obtained by lyophilization, ranging from 19 to 658mg/l according to the strain under consideration. Five strains were selected as the best producers of these biopolymers.

The optimization of this production has shown that the pH and the temperature depend on the strain tested, the M17HS medium is more favorable for these strains, the best sources of carbon, nitrogen and phosphate are sucrose at 80 and 100g/l, NH_4Cl at 1g/l, K_2HPO_4 at 6g/l and KH_2PO_4 at 4g/l respectively.

The growth and production kinetics of EPS have shown that this production is maximum at 100 hours and is not linked to growth. Changes in pH and acidity have shown that the strains are weakly acidifying.

The identification of monosaccharides by chromatographic techniques shows that the EPS of the leuconostocs are predominantly composed of glucans, and arabinose for the V5 strain. The rheological activity confirmed the thickening and gelling power of these EPS in skimmed milk.

Key words: Lactic acid bacteria of Algeria - *Leuconostoc* - *Lactococcus* - EPS - viscosity - composition - rheological activity.

ملخص

البحث عن السلالات اللبنية المنتجة للـ EPS تم على 12 مكورة لبنية إستخلصت من حليب الإبل، اللحم الأحمر ومجموعة LBLM. من بينها 7 سلالات (*L4*, *L5*, *L6*, *V1*, *V2*, *V3* و *V4*) صنفت إلى *Ln. mesenteroides* و 5 المتبقية (*VO18*, *VO17*, *VO12*, *VO4* و *V5*) إلى *Lactococcus* sp. وهذا بالإعتمادا على الاختبارات المورفولوجية، الفيزيولوجية والكيميائية.

الإنتاج النوعي للـ EPS من طرف هذه السلالات، تم على وسائط مغذية هلامية hypersaccharosés وعلى الحليب منزوع الدسم مضاف إليه rouge de ruthénium، أظهر وجود الخاصية mucoïde. في حين أن القياس الكمي للزوجة و السكريات الإجمالية، أشار إلى وجود النمط الظاهري filant في الوسط BMMHS وأن العائد العالي للـ EPS حصل عليه بإستعمال lyophilisation الذي يتراوح بين 19 إلى 658 ملغ/ل. وعليه 5 مكورات أختيرت كأفضل سلالات منتجة لهذه البوليمرات.

أظهرت الشروط المثلى لهذا الإنتاج أن درجة pH ودرجة الحرارة تعتمد على السلالة المدروسة، أن الوسط M17HS هو الأكثر تفضيلا لدى هذه السلالات، وأن أفضل مصادر للكربون، للأزوت والفوسفات هم السكروز عند 80 و 100 غ/ل، NH_4Cl عند 1 غ/ل، K_2HPO_4 عند 6 غ/ل و KH_2PO_4 عند 4 غ/ل.

أظهرت حركية النمو والإنتاج للـ EPS، أن الإنتاج الأعظمي حدث في الزمن 100 ساعة وأنه غير مرتبط بالزمن. بينت تطورات pH و الحموضة أن السلالات ذات حموضة ضعيفة.

أشار تحديد السكريات الأحادية بواسطة تقنيات chromatographiques أن EPS الـ leuconostocs مكون مجملا من glucanes ومن arabinose بالنسبة لـ V5. أكد النشاط rhéologie على سماكة وهلامية الـ EPS في الحليب منزوع الدسم.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبن الجزائر - *Leuconostoc* - *Lactococcus* - EPS - لزوجة - تركيب - النشاط rhéologie.

Résumé

La recherche des souches lactiques productrices d'EPS a été réalisée sur 12 coques provenant de lait de chamelle, de viande rouge et de la collection du LBMB. 7 souches (L4, L5, L6, V1, V2, V3 et V4) étaient identifiées par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques comme étant *Ln. mesenteroides* et les 5 restantes (VO18, VO17, VO12, VO4 et V5) comme étant *Lactococcus* sp. La production d'EPS par ces souches a été détectée qualitativement sur milieux gélosés hypersaccharosés et sur lait écrémé additionné de rouge de ruthénium, révélant la présence du caractère mucoïde. La mesure quantitative de la viscosité et des oses totaux a montré la présence du phénotype filant sur bouillon BMMHS et un rendement élevé en EPS obtenus par lyophilisation, allant de 19 à 658mg/l selon la souche considérée. 5 coques étaient sélectionnés comme meilleurs producteurs de ces biopolymères. L'optimisation de cette production a montré que le pH et la température dépendent de la souche testée, le milieu M17HS est plus favorable pour ces souches, les meilleures sources de carbone, d'azote et de phosphate sont le saccharose à 80 et 100g/l, le NH₄Cl à 1g/l, le K₂HPO₄ à 6g/l et le KH₂PO₄ à 4g/l respectivement. Les cinétiques de croissance et de production d'EPS ont montré que cette production est maximale à 100 heures et n'est pas liée à la croissance. L'évolution du pH et de l'acidité ont révélé que les souches sont faiblement acidifiantes. L'identification des monosaccharides par des techniques chromatographiques montre que les EPS des leuconostocs sont majoritairement composés de glucanes, et d'arabinose pour la souche V5. L'activité rhéologique a confirmé le pouvoir épaississant et gélifiant de ces EPS dans le lait écrémé.

Mots clés :

Bactéries lactiques d'Algérie; *Leuconostoc*; *Lactococcus*; EPS; BMMHS; Rouge de ruthénium; Viscosité; M17HS; Composition; Activité rhéologique.