

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADIMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie appliqué

Présenté par : AYADI Hana

DJEBBAS Assia

Thème

**Caractérisation du dextrane produit par des
souches de *Leuconostoc* isolées des produits
laitiers**

Devant le jury :

M^{me} . HAMMOUDI R.

M.C. B Présidente

UKM Ouargla

M^{lle} .DJELLOUL D S.

M.A.A Examinatrice

UKM Ouargla

Mr .BOURICHA M.

M.A.A Encadreur

UKM Ouargla

Année universitaire: 2018/2019

A decorative border surrounds the page, featuring a row of pearls at the top and a vertical line of pearls on the right side. The background is adorned with several white roses and a single red rose on the left side.

Remerciements

Nous premier remerciement va ALLAH le tout puissant de nous avoir aidés à surmonter toute les difficultés lors de nous études et de nous avoir donnée le pouvoir, la santé et la volonté afin de finaliser ce travail.

Tout d'abord nous tenons à exprimer toute nous reconnaissance à notre encadreur Mr BOURICHA M'hamed, M.A.(A) à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla , nous la remercie de nous encadrés, orientés, aidés et conseillés.

Nous remercions les membres de notre jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, et plus particulièrement M^{me} HAMMOUDI Roukia, M.C (B) à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla ainsi que M^{lle} DJELLOUL DAOUADJI Soumia, M.A.(A) à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette mémoire.

Nous adressons nous sincères remerciements à tous les professeurs du département des sciences biologique de l'université Kasdi Merbah.

Nous adressons notre sincères remerciements à tous les professeurs intervenants en particulier Mr EDDOUD Amar, M. A. (A) à l'Université de Kasdi Merbah-Ouargla, et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant notre recherches.

Nous remercions la technicienne de laboratoire de bactériologie M^{me}BSERNI Chahrazad pour leur soutien technique et leur bonne humeur.

En fin nous remercions nous famille: nous parents qui ont toujours été là pour nous, ainsi nous grandes parents, nous frères, sœurs, oncles, tantes . Et tous notre Amies pour leurs soutien affectif et moral

A tous ces intervenants, nous présentons nous remerciements, notre respect et nous gratitude

A decorative border of pearls and roses surrounds the text. The pearls are arranged in a grid-like pattern, and the roses are scattered throughout, with a large white rose in the bottom right corner.

Dédicace

*Aux êtres les plus chers à mon cœur dans ce monde, mes
parents*

*A celle qui m'a toujours soutenu et était ma "force motrice"
pour travailler avec plus de courage et persévérance, à qui
j'ai éprouvé un profond respect*

Ma chère mère Que dieu la protège

*A mon amour, celui qui a sacrifié tout ce qu'il a de cher
pour me prodiguer une éducation, un soutien, une assistance
et un encouragement pour enfin devenir ce que je suis
maintenant.*

Mon adorable père Que dieu pitié de son âme

Merci beaucoup mes parents je vous aime beaucoup

A mes chères sœurs: Hayet, Salima, Zineb, Soumia, Chifa

A mes frères: Mohammed Taher, Khalid, Yassine

*A tous ma famille AYADI sans exception du petit au
grand Que dieu les gardes*

*A ma sœur et ma très chère binôme ASSIA, je tiens à te
remercier pour ta confiance en moi.*

*Tous ceux qui me sont chères et qui tiennent une grande place
dans mon cœur et qui se reconnaîtront surtout mes amis.*

HANA



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

*A mes très chère parents pour leurs patiences et pour tous
sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation :Messaouda et*

Tayeb

A mes grandes parents

A tous mes oncles et tantes

A ma chère sœur Basmat errabia

A mes frères: Adnan; Abdelmoumen, Mohammed yazid, Ahmed

Djemoi

*A ma sœur et ma très chère binôme HANA, je tiens à te
remercier pour ta confiance en moi.*

A tous mes amies surtout:

Amína, Hadjer, Ibtíssam, Chaíma, Amína, Ilham, Menyara

ASSIA

Liste des abréviations

°C	degré Celsius
µl	Microlitre
A	Absorbance
ADH	arginine déshydrogénase
BBT	Bleu de bromothymol
BCP	pourpre de bromocrésol
CO ₂	Dioxyde de carbone
DO	Densité Optique
EPS	Exopolysaccharides
Fe ³⁺	ion de fer
g	gramme
GC %	pourcentage guanine + cytosine
Glu	Glucose
h	Heure
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HePS	Heteropolysaccharides
HoPS	Homopolysaccharides
KMK	Kempler Mac Kay
<i>L</i>	<i>Lactococcus</i>
LAB	Bactérie lactique
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Ln</i>	<i>Leuconostoc</i>
mg	Milligramme
Mg ²⁺	ion de magnésium
mL	Millilitre
Mn ²⁺	ion de manganèse
MRS	Man Rogosa et Sharpe
MRS BCP	Man Rogosa Sharp additionné de pourpre de bromocrésol
MRS-BCP-EV	Man Rogosa et Sharpe- pourpre de bromocrésol - Extrait de levure
MRS-EV	Man Rogosa et Sharpe-Extrait de levure
MRSs	Man <i>Rogosa Sharp</i> + saccharose
MSE	Mayeux Sandine et Elikar
MSRV	Man Rogosa et Sharpe supplémenté de la vancomycine
NaCl	chlorure de sodium
NSLAB	Bactérie lactique non starter
pH	potentiel d'hydrogène
S	Saccharose
T°	Température
trs	Tours
U	Unité
V/V	Volume /Volume

Liste des figures

Figure1: Représentation schématique de la structure générale du dextrane synthétisé à l'aide de la bactérie <i>Leuconostoc méésentéroïdes</i> et constitué d'un enchaînement d'unité α -D-glucopyranose lié par des liaisons chimiques en α -(1 \rightarrow 6) et d'une ramification en α -(1 \rightarrow 3).....	13
Figure 02: schéma représentatif du protocole de cette étude	20
Figure 03: schéma résumé la méthode utilisée pour l'isolement et la purification des souches	23
Figure 04: protocole de test de fermentation des sucres.....	26
Figure 05: Protocole de l'optimisation de la production d'exopolysaccharide.....	29
Figure 06: schéma de l'extraction et la quantification des EPS produit par <i>Leuconostoc</i> dans un milieu synthétique.....	30
Figure (07): Courbe d'étalonnage de D-glucose représente des valeurs de A490 nm obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.....	32
Figure (08): Isolement des souches à partir de lait de chèvreensemencées en masse sur MRSv.....	33
Figure(09): Aspect de trouble d'une souche de <i>Leuconostoc</i> sur bouillon MRS après 18 h de croissance.....	35
Figure(10): Aspect macroscopique de souche C13 pure de <i>Leuconostoc</i> sur gélose MRS.....	36
Figure(11) : Observations microscopiques des souches (C1, C2, F55) isolées respectivement après une coloration de Gram à grossissement x100.....	36
Figure(12): Résultat du test de catalase (test négatif).....	37
Figure (13): Type fermentaire des souches C1 et C2 isolées sur bouillon MRS.....	40
Figure(14): Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine).....	40
Figure(15): Profil fermentaire des isolats effectué sur plaque d'ELIZA.....	42
Figure 16: La révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK des souches C16, F55, F70, V67.....	44
Figure17 : morphologies des colonies productrices de dextrane par les souches de <i>Leuconostoc</i> sur milieu MSE.....	46
Figure (18): la répartition finale des espèces selon les résultats des différents tests effectués.....	48

Figure 19: la production de dextrane par <i>Leuconostoc</i> à différentes concentrations du glucose sur milieu MSE.....	49
Figure 20: la production de dextrane par <i>Leuconostoc</i> à différentes concentrations d'extrait de levure sur milieu MSE.....	50
Figure (21): la production de dextrane par <i>Leuconostoc</i> à différentes concentrations de saccharose sur milieu MRSs.....	53
Figure (22): l'aspect visqueuse de milieu liquide MRSs après production EPS par souche C2.....	54
Figure (23): Aspect de dextrane produit par <i>Leucounostoc</i> après extraction à partir de milieu MRSs.....	54
Figure (24): variation de taux de production de dextrane par les souches de <i>Leuconostoc</i> en fonction des différents concentrations de saccharose et de taille de l'inoculum.....	55

Liste des tableaux

Tableau 01: Condition d'optimisation de production de dextrane.....	16
Tableau 02: la provenance de divers échantillons collectés.....	18
Tableau 03: la flore lactique présente dans les différents échantillons isolés sur milieu MRSv	34
Tableau 04: Tableau représente les résultats des tests physiologiques.....	38
Tableau 05: Les caractères biochimiques et morphologiques des isolats.....	41
Tableau 06: Les résultats du profil fermentaire des souches isolées.....	43
Tableau 07: la croissance des souches de <i>Leuconostoc</i> dans le milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure.....	50
Tableau 08: la production d'EPS par des souches de <i>Leuconostoc</i> dans le milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure.....	51

Liste des tableaux de l'annexe

Tableau 09: Résumé de l'identification physiologiques, biochimiques et biotechnologiques des souches <i>Leuconostoc</i> isolées á partir de différents produits laitiers	
Tableau 10: Tableau représente des valeurs d'A _{490 nm} obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.	
Tableau 11: Tableau représente la variation de taux de production de dextrane par les souches de <i>Leuconostoc</i> en fonction des différentes concentrations de saccharose et de taille d'inoculum.	

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Partie 01: Synthèse bibliographique

Introduction.....1

Chapitre I: Etude bibliographique sur le genre *Leuconostoc*

I.1. Généralité sur les bactéries lactiques	3
I.1.1. Historique.....	3
I.1.2. Définition.....	3
I.1.3. Classification.....	4
I.2. Genre <i>Leuconostoc</i>	4
I.2.1. Historique.....	4
I.2.2. Définition.....	5
I.2.3. Caractères généraux.....	6
A. Caractères morphologiques et culturels.....	6
B. Caractère biochimique et physiologique.....	7
I.2.4. Métabolisme des <i>Leuconostoc</i>	7
I.2.5. Taxonomie des <i>Leuconostoc</i>	8
I.2.6. Rôle de <i>Leuconostoc</i>	9
I.2.6.1. Rôle dans la technologie laitière.....	9
A. Amélioration de la structure du fromage par la production de CO ₂	9
B. Utilisation des <i>Leuconostoc</i> comme levains d'arome.....	9
C. Utilisation des <i>Leuconostoc</i> pour éliminer certains défaut de gout.....	10
I.2.6.2. Rôle des <i>Leuconostoc</i> dans les aliments.....	10
A. Utilisation de comme probiotique.....	10
B. Production de mannitol.....	10
C. Production de vitamine.....	11
D. Production des substances antimicrobiennes.....	11
E. Production d'exopolysaccharides (EPS).....	11

Chapitre II: Caractérisation de dextrane

II.1. Définition de Dextrane.....12

II.2. Dextrane sucrase	13
II.3. Production de dextrane.....	14
II.4. Conditions de la production de dextrane.....	16
II.5. Application de dextrane	17

Partie 02: Pratiques

Chapitre I: Matériel et Méthodes

I.1. Lieu d'étude	18
I.2. Provenance des échantillons.....	18
I.2.1. Prélèvement de lait.....	19
I.3. Préparation des échantillons.....	21
I.3.1. Lait.....	21
I.3.2. Fromage, Dhan et Klila.....	21
I.4. Isolement et purification.....	21
I.4.1. Isolement.....	21
I.4.2. Purification	21
I.5. Pré-identification des isolats.....	21
I.5.1. Coloration de Gram.....	21
I.5.2. Recherche de la catalase	22
I.6. Conservation des isolats.....	22
I.6.1. Conservation court terme (courte durée).....	22
I.6.2. Conservation longue terme (longue durée).....	22
I.7. Identification et caractérisation des isolats.....	24
I.7.1. Tests morphologiques	24
I.7.1.1. Examen macroscopique.....	24
I.7.2. Tests physiologiques.....	24
I.7.2.1. Croissance à différentes températures.....	24
I.7.2.2. Croissance à différents pH.....	24
I.7.2.3. Résistance à la salinité.....	24
I.7.3. Tests biochimiques.....	24
I.7.3.1. Recherche de type fermentaire.....	24
I.7.3.2. Test de dégradation des sucres.....	25
I.7.4. Tests biotechnologiques.....	27
I.7.4.1. Recherche de l'Arginine déshydrolyase (ADH).....	27
I.7.4.2. Production des substances aromatiques.....	27
I.7.4.3. Production de dextrane.....	27

I.8. Caractérisation de dextrane.....	27
I.8.1. Optimisation de la production d'exopolysaccharide.....	27
I.8.2. Extraction et Quantification de dextrane.....	28
I.8.2.1. Extraction.....	28
I.8.2.2. Dosage des EPS	31
I.8.2.2.1. Principe de la méthode.....	31
I.8.2.2.2. Méthode de dosage	31

Chapitre II: Résultats et discussions

II.1. Isolement et purification.....	33
II.2. Tests morphologiques.....	35
II.2.1. Aspect macroscopique.....	35
II.3. Pré-identification	36
II.3.1. Coloration de Gram.....	36
II.3.2. Test de recherche de la catalase.....	37
II.4. Tests physiologiques.....	37
II.4.1. Croissance à différentes températures	38
II.4.2. Résistance à la salinité.....	39
II.4.3. Croissance à différents pH	39
II.5. Tests biochimiques.....	39
II.5.1. Recherche de type fermentaire.....	39
II.5.2. Recherche de l'Arginine déshydrolyase (ADH).....	40
II.5.3. Test de dégradation des sucres.....	41
II.6. Tests biotechnologiques.....	44
II.6.1. Utilisation du citrate.....	44
II.6.2. Production de dextane.....	45
II.7. Caractérisation de dextrane.....	48
II.7.1. Optimisation de la production d'exopolysaccharide.....	48
II.7.1.1. L'effet de différentes concentrations de substrat sur la production de dextrane.....	48
A. Différentes concentrations du glucose.....	48
B. Différentes concentrations d'extrait de levure.....	49
C. Différentes concentrations de saccharose.....	52
C.1. Extraction et Quantification de dextrane.....	53
Discussion générale de l'optimisation.....	54
1- Effet de Glucose.....	55

2- Effet de L'extrait de levure.....	56
3- Effet de saccharose et volume d'inoculum.....	57
Conclusion.....	60
Références bibliographiques.....	62
Annexes	

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe hétérogène de bactéries gram-positives unies par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques (SALMINEN *et al.*, 2012). Les LAB occupent une place importante dans l'alimentation. Elles sont responsables de la fermentation de produits alimentaires, qu'ils soient d'origine carnée, laitière ou végétale (GARRY, 1999). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (ROMEO *et al.*, 2001).

Plusieurs bactéries lactiques synthétisent et excrètent des polysaccharides qui peuvent être utilisés comme bio-ingrédients fonctionnels permettant de remplacer d'autres agents polysaccharidiques tels que les carraghénanes, les alginates ou la gélatine. Ainsi, à l'aide de ces bactéries, 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 additives (DIRK, 2002).

Les EPS microbiens sont des polymères biosynthétiques ou biopolymères définis par GEESEY (1982) comme étant des « substances polymériques extracellulaires d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens ». D'autres auteurs tels que CHARACKLIS et WILDERER (1989) vont plus loin définissant les EPS comme des « polymères organiques qui sont souvent responsables dans les biofilms de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur des substrats » (GARRIDO *et al.*, 2002).

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone. Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort (PINCHON, 1989; KIHAL, 1996; KIHAL *et al.*, 1996; KIHAL *et al.*, 2009).

En technologie laitière, l'importance de *Leuconostoc* est largement reconnue, même si leur physiologie et la génétique est moins développée que celle de *Lactococcus*. Elles sont souvent présentes dans les ferments lactiques et dans l'environnement laitier

et pourraient donc être considérées comme des bactéries lactiques non starter (NSLAB) au même titre que les lactobacilles mésophiles. (COGAN, 2002).

Certains espèces de *Leuconostoc*, en particulier *Ln. mesenteroides* est utilisé pour la production d'un polymère de glucose biodégradable connu sous le nom de dextrane qui a plusieurs applications industrielles ciblées des industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et de forage pétrolier (KIM et DAY, 1994; LEATHERE et al., 1995; SHAMALA et PRASAD, 1995; SUTHERLAND et al., 1996).

Le dextrane est produit au niveau industriel par la fermentation de milieux riches en saccharose. Plusieurs chercheurs ont optimisé les conditions de fermentation pour une production maximale de dextrane. Il a été signalé précédemment que le poids moléculaire et le rendement de la production de dextrane dépendaient de variables du processus telles que la température, le saccharose et la concentration d'accepteur (SANTOS, 1996; PEREIRA et al., 1998).

L'objectif de ce travail est l'optimisation de production d'EPS produit par des souches de *Leuconostoc* isolées à partir de diverse produits laitiers traditionnelles Algérienne, et la quantification de dextrane produit par les souches performante. Dans ce cadre nous organisons cette étude comme le suivant:

- Chapitre I: rappelle sur les bactéries lactiques et plus précisément le genre *Leuconostoc*, l'intérêt de ce genre y compris la production de dextrane.
- Chapitre II: s'intéresse aux approches méthodologiques et description des techniques qui ont servi la concrétisation de notre travail.
- Chapitre III: reflète les résultats obtenus de différents tests d'identification, ainsi que l'optimisation et la quantification d'EPS avec la discussion de tous ces résultats et leur comparaison avec les différents travaux réalisés traitant ce genre.

Chapitre I

Chapitre I

Généralité sur le
genre Leuconostoc

I. Etude bibliographique sur le genre *Leuconostoc*

I.1. Généralité sur les bactéries lactiques

I.1.1. Historique

Les bactéries lactiques sont très anciennes, apparues avant les cyanobactéries, il ya près de 3 milliards d'années. Elles sont utilisées par les producteurs de lait depuis 65 millions d'années (**DRIDER et PREVOST, 2009**).

En 1856, pasteur découvre des microorganismes contaminants, responsables d'un accident de fermentation de jus de betteraves dans une distillerie du nord de la France. Il vient de découvrir les bactéries lactiques, une classe de microorganismes étroitement liés à l'activité humaine, et qui aujourd'hui encore ne cesse pas de s'élargir (**MATAMOROS, 2008**). La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par LISTER en 1873(**GUIRAUD, 2003; LIMSOWTIN et al., 2004**).

I.1.2. Définition

Le terme des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen ,en 1919, et réunit plusieurs genres, qui ont la faculté à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique à partir de l'hydrolyse du lactose, et de la fermentation du glucose et/ou du galactose.(**KLEIN et al, 1998**). Ce sont des cocci ou des bâtonnets à Grams positive, immobiles, asporulées, non pigmentées, aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles, auxotrophes (**DRIDER et PREVOST, 2009**), elles ont exigeante en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases pyriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (**NOVEL, 1993**), elles sont chimio-organotrophes, ne possédant ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase, à l'exception de quelque souche qui possèdent une pseudo catalase et peuvent apparaître catalase positives.(**GUIRAUD, 1998**).

Elles ne produisent pas d'indole, ni de sulfure d'hydrogène et ne liquéfiant pas la gélatine, seulement quelques espèces sont faiblement caséolytiques.(**DeROISSART et LUQUET, 1994**). Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (**MATAMOROS, 2008**).

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4 - 4,5 et certaines sont encore actives à pH 3,2 ou à pH 9,6. Elles ont des tolérances très

variables vis-à-vis du sel. Elles possèdent une faible activité protéolytique et lipolytiques (BALIARDA, 2003).

I.1.3. Classification

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles:

- Classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (D'AMBROSINI *et al.*, 1996), incluant la nature des acides gras (GILAROVA *et al.*, 1994).
- Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes par Orla-Jensen:

Le groupe I : renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.

Le groupe II: inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.

Le groupe III: regroupe quant à lui quelque espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et groupe II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales (MCLEOD *et al.*, 1995).

En général, les genres qui composent le LAB sont *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (SALMINEN *et al.*, 2012).

I.2 Genre *Leuconostoc*

I.2.1. Historique

Leuconostoc est un genre de bactéries lactiques. Leur première description a été proposée en 1878, par Van Tieghem (GARVIE, 1986), l'isolement des premières souches de *Leuconostoc* produisant du dextrane à partir de saccharose présenté dans le milieu provient des accidents apparus dans les sucreries.

En 1918, EVAN trouva que les espèces du genre *Leuconostoc* ont le caractère hétérofémentaire, donc ils sont capables de produire de CO₂ à partir du glucose, et celui-ci a été confirmé par HUCKER en 1928 (DEVOYOD et POUILLAIN, 1988).

En 1919, une étude sur les bactéries lactiques a été réalisée par ORLA-JENSEN dans laquelle le genre *Betacoccus* a été séparé du genre *Streptococcus* et leur nom vient des betteraves (*Beta communis*) d'où ils ont été trouvés. Puis, ORLA-JENSEN a trouvé pour la première fois et à partir de leurs résultats qu'il y a une relation entre les Leuconostokes produisant du dextrane (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs de l'acide lactique trouvé dans les produits laitiers. Ce genre a été séparé ensuite en deux espèces par ORLA-JENSEN, il y aura *B. arabinosaceus* et *B. bovis* (DEVOYOD et POUILLAIN, 1988).

I.2.2. Définition

Se sont des bactéries lactiques qui prend la forme de coccobacilles et se trouvent en paire ou en chaînette (DEVOYOD et POUILLAIN, 1988), ils sont hétérofermentaires produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30°C, et leurs contenus G+C sont assez voisins (37à 45%) (GARVIE, 1986). Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait de diacétyle et parfois par la synthèse de dextrans et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose (NOVEL, 1993).

Les Leuconostokes peuvent être isolés à partir plusieurs denrées alimentaire tels que le lait et leurs produits, les légumes et essentiellement la betterave, les fruits et d'autres aliments fermentés (BEKHOUCHE, 2006).

En général les Leuconostokes sont utiles dans différents types de fromages ou ils facilitent l'ouverture par la production de CO₂. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln. mesenteroides ssp.cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (olives, choucroute, ets) (HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004).

I.2.3. Caractères généraux

L'identification des caractéristiques spécifiques aux *Leuconostoc* a été basée sur des caractères phénotypiques et ceci est pour isoler ces bactéries, ainsi pour établir une distinction entre les espèces ou les sous-espèces (HANNACHI, 2008). Parmi ces caractères il existe: la tolérance à l'oxygène, la résistance à la salinité dans des différentes concentrations, la capacité de produire du CO₂ et des substances aromatiques, le pouvoir fermentatif et la production des exopolysaccharides (GURTLER et MAYALL, 2001).

A. Caractère morphologique et culturaux

Les leuconostokes sont des cocci mésophiles, à Gram positif, à catalase négative, non mobiles, aérotolérantes, obligatoirement hétérofermentatives, souvent ellipsoïdaux (BJÖRKROTH et HOLZAPFEL, 2006).

Elles sont exigeantes sur le plan nutritionnel et nécessitent une source d'acides aminés et de vitamines ainsi qu'un glucide fermentable pour leur donner de l'énergie. Habituellement, elles poussent bien dans les bouillons de Man, Rogosa et Sharpe, mais mal dans le lait, nécessitant souvent des suppléments de vitamines B, de minéraux et d'acides aminés pour la croissance. Les acides aminés spécifiques dont ils ont besoin sont l'aspartate, le glutamate, la valine, la leucine, l'isoleucine et en fonction de la souche, l'histidine, la méthionine, tryptophane, arginine et cystéine. Mg²⁺ et Mn²⁺ stimulent leur croissance. Les leuconostokes sont incapables de métaboliser l'arginine (LIU, 2016). Certaines espèces telles que *Leuconostoc mesenteroides* ne peuvent pas croître en absence d'ions minéraux, ce qui indique l'exigence absolue pour ces éléments (FOUCAUD et al., 1997). Le magnésium est le principal cation divalent des cellules vivantes. C'est un activateur des différentes réactions métaboliques : division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique (DESMAZEAUD, 1992). Le manganèse est essentiel pour la croissance. En plus de son rôle de cofacteur de réactions enzymatiques, il permet chez certaines espèces de mieux tolérer l'oxygène par l'élimination de l'ion superoxyde (MONNET et al., 2008).

Les leuconostokes se développent généralement en association avec les lactocoques dans le lait, bien que des souches de *Ln. lactis* peut se développer indépendamment et produire acide dans le lait. Ainsi, une relation de coopération semble exister entre les deux groupes de bactéries lactiques, bien que la nature de l'association n'a pas été élucidée, ce qui serait lié à l'activité protéolytique du lactocoque, libérant des acides aminés de protéolyse. Il peut également y avoir des associations physiques entre les lactocoques et les leuconostokes producteurs d'exopolysaccharides (par exemple, *Leuconostoc mesenteroides* sous-espèce *mesenteroides* et sous-espèce *dextranicum*) sous l'égide d'exopolysaccharides (LIU, 2016).

Ln. lactis a une résistance thermique supérieure à celle des autres leuconostokes et peut survivre à un traitement à 60 °C pendant 30 min. Des milieux sélectifs en gélose contenant de la vancomycine ou de la tétracycline sont couramment utilisés pour isoler et énumérer les leuconostokes à partir de produits laitiers fermentés

et de cultures de levain à souches mixtes (LIU, 2016). Les colonies se développent habituellement seulement après 3 à 5 jours, elles sont lisses, rondes, blanche, grisâtre et moins de 1 mm de diamètre (HOLZAPFEL et al., 2009; SÄDE, 2011). Cependant, certains lactobacilles sont également résistants à la vancomycine. En présence de lactobacilles et/ou de levures, un milieu plus complexe contenant de la vancomycine, de la tétracycline, de l'azoture de sodium et de l'acide sorbique peut être utilisé pour isoler et dénombrer les leuconostokes (LIU, 2016).

B. Caractère biochimique et physiologique

La croissance des *Leuconostoc* laitiers ne se fait qu'à un pH voisin au celui du lait et ne se développent plus à un pH acide (MC DONALD et al., 1990). Elles n'ont plus des cytochromes, ni catalase et ne dégradent pas de l'arginine, elles n'ont pas la capacité de réduire le nitrate (BRAHIMI, 2015). Ils sont chimio-organotrophes, anaérobies facultatifs, non protéolytique, et le lait n'est généralement ni acidifié ni caillé. Bien que la croissance peut se produire à un pH de 4,5 les espèces sont non acidophiles et préfèrent un pH moyen initial de 6,5, les leuconostokes sont considérés comme des mésophiles psychrotrophes avec un optimale de croissance entre 14-30°C. Les limites de température pour la croissance varient selon les espèces et les souches allant de 1 à 10 °C et de 30 à 40 °C (HOLZAPFEL et al., 2009 ; SÄDE, 2011).

I.2.4. Métabolisme des *Leuconostoc*

Les Leuconostokes peuvent fermentés le glucose en donnant de l'éthanol (LEES et JAGO, 1976) et n'ont pas la capacité de métaboliser le citrate comme seule source d'énergie, elles ont besoin d'un sucre fermentescible (KEMPLER et McKAY, 1980). Elles ont le pouvoir de produire des exopolysaccharides tel que le dextrane qui est un homopolysaccharide produits par les Leuconostokes en utilisant le saccharose comme substrat spécifique et en absence de ce sucre ces bactéries continuent de croître mais perdent leur capacité à fabriquer des polysaccharides (ROBYT et WALSETH, 1978). Cette propriété de production de dextrane à partir du saccharose est un caractère spécifique pour différencier l'espèce de *Leuconostoc* (GARVIE, 1984).

I.2.5. Taxonomie des *Leuconostoc*

Les analyses génétiques ont montré que le groupe des *Leuconostoc* comprend trois lignées: «*Leuconostoc sensu stricto*», «*Leuconostoc paramesenteroides*», «*Leuconostoc ænos*». La découverte de ces lignées était la principale raison de deux propositions de reclassements: le genre *Weissella* a été associé à *Ln.paramesenteroides* et le genre *ænococcus* a été associé à *Ln.ænos*. Les anciennes espèces aussi *Ln.cremoris*

et *Ln.dextranicum* ont été classées comme des sous-espèces appartiennent à l'espèce *Ln.mesenteroides* avec l'ajout d'une troisième sous-espèce *mesenteroides* (BJORKROTH et HOLZAPFEL, 2006).

Le genre *Leuconostoc* a été classé dans la famille *Streptococaceae* jusqu'à l'année 2005 ou une nouvelle famille *Leuconostocaceae* a été proposé dans BERGY's Manual of Systematic Bacteriology. Cette nomenclature ne pouvait pas être validement publiée car aucune description de la famille n'était proposée, jusqu'à 2009, dans la deuxième édition du BERGY's Manual of Systematic Bacteriology (SCHLEIFER, 2015). Le genre *Fructobacillus* a été validement publié en septembre 2008. Leurs espèces, qui étaient classés dans le genre *Leuconostoc*, fermentent le glucose sans produire d'éthanol, contrairement aux autres genres de la famille (ENDO et OKADA, 2008). Depuis la première classification du genre *Leuconostoc*, la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Au fur et à mesure que les connaissances progressent, leur classification change pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Le genre *Leuconostoc* renferme 12 espèces (*mesenteroides*, *lactis*, *pseudomesenteroides*, *carinosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, , *inahae*, *holzapfelii* et *palmae*). L'espèce *Ln.mesenteroides* est la plus employée en industrie agro-alimentaire, cet espèce comprend trois sous-espèces (*subsp.mesenteroides*, *subsp dextranicum* et *subsp.cremoris*) (HOLZAPFEL et WOOD, 2014).

I.2.6. Rôle de *Leuconostoc*

I.2.6.1. Rôle dans la technologie laitière

A. Amélioration de la structure du fromage par la production de CO₂

Les bactéries du genre *Leuconostoc* sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort, due à la production de dioxyde de carbone qui se forme à partir de deux substrats distincts : le lactose et l'acide citrique. La stabilité de ces ouvertures dépend de la cinétique de la production de CO₂ par les *Leuconostoc*. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* (PINCHON, 1989; KIHAL, 1996; KIHAL et al., 1996; KIHAL et al., 2009).

B. Utilisation des *Leuconostoc* comme levains d'arôme

Les composés principaux liés à l'utilisation du *Leuconostoc* dans l'industrie laitière sont le diacétyl, l'acétate et l'éthanol contribuant également à la formation d'arôme.

La culture pure de *Leuconostoc* utilisent le citrate très rapidement, par contre elle ne produisent du diacétyle et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu suffisamment acide(**HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004**), c'est pourquoi les *Leuconostoc* sont toujours utilisés dans des levains mixtes en association avec des bactéries lactiques acidifiantes, notamment des *Lactococcus* (**ANDRE et JEAN-CLAUDE, 2006**).

Les *leuconostoc* rentrent dans la composition de la flore bactérienne des levains lactiques mésophiles subdivisent les levains mixtes en quatre groupes selon leur composition en bactéries d'arôme:

- Les levains du type B (B comme *Betacoccus*) contiennent des *Leuconostoc* producteurs d'arôme tels que *Ln.cremoris*, *Ln.dextranicum* et/ou *Ln.lactis*;
- Les levains du type D contiennent *S.lactis subsp. diacetylactis* comme producteur d'arôme;
- Les levains du type BD contiennent à la fois des *Leuconostoc* et *S.lactis subsp. diacetylactis* comme producteurs d'arôme;
- Les levains du type N ou O ne contiennent pas de bactéries aromatiques. (**LIU, 2016**).

Parmi les différentes espèces de *Leuconostoc*, La sous-espèce *Ln. mesenteroides* est probablement la plus utilisée dans le secteur des produits laitiers. Ceci est dû à sa large utilisation en tant que producteur d'arômes dans l'industrie laitière pour différents types de lait fermenté (**ZAROOUR et al., 2018**).

C. Utilisation des *Leuconostoc* pour éliminer certains défaut de goût

Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme, par contre un excès ou une surproduction de ce composé, qui peut être produit par les ferments dans le beurre et les laits fermentés, par rapport au diacétyle provoque un défaut dit de « vert » ou d'« acre ». Il est possible d'éliminer le défaut de « vert » d'une culture de BL en utilisant les *leuconostoc*; mais pour cela il est nécessaire d'en ajouter une grande quantité dont l'activité est maximale pour *Ln.mesenteroides subsp. cremoris* (**HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004**). Les *leuconostoc* peuvent utiliser l'acétaldéhyde comme accepteur d'électrons, en le réduisant en éthanol (**HOLLET et LIU, 2011**).

I.2.6.2. Rôle des *Leuconostoc* dans les aliments**A. Utilisation de *Leuconostoc* comme probiotique**

les souches de *Leuconostoc* ne colonisent pas le tractus intestinal mais peuvent survivre pendant le temps limité de transit. On s'attend donc à ce que leur effet sur l'hôte par des actions bactériennes soit faible, sauf lorsqu'elles seront ingérées à des concentrations cellulaires élevées. Des études de la lutte contre la diarrhée chez les enfants par l'ingestion des laits fermentés a révélé que le yaourt Indien contenant 108 de *Lc. lactis* et *Ln. mesenteroides* réduit la durée moyenne de la diarrhée de 3 jour **(HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004)**.

B. Production de mannitol

Le mannitol est un sucre à faible teneur en calories, qui peut remplacer le saccharose, lactose, glucose ou fructose dans les produits alimentaires, il est métabolisé indépendamment de l'insuline et il est également présent dans les produits alimentaires destinés aux diabétiques. *Ln.pseudomesenteroides* et *Ln.mesenteroides* sont connus par leur capacité de produire la mannitol à partir de la fermentation de fructose **(HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN., 2004)**. Le mannitol est bien connu aussi pour sa capacité à augmenter le passage du potassium et du saccharose du sang vers le cerveau **(SIL et al., 2016)**.

C. Production de vitamine

Les souches de *Ln.mesenteroides* productrices des quantités importantes de ménaquinones (vitamine K2) ont été utilisées comme des starters dans les produits alimentaires notamment, les produits laitiers ou comme des suppléments diététiques afin de prévenir et lutter contre les maladies de carence en vitamine K. actuellement, la production de folate (vitamine B9) a été rapporté dans *Ln.lactis* et *W.paramesenteroides* **(HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004)**.

D. Production des substances antimicrobiennes

Les BL sont très connus par la production d'une variété de composés antimicrobiennes tel que: l'acides lactique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide propionique, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, la réutérine et dioxyde de carbone et diverses substances inhibitrices. Cette propriété est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la bioconservation, en utilisant une microflore naturelle contrôlée et/ou leurs produits antimicrobiens. **(DORTU et THONART, 2009 ; PAPAGIANNI, 2012a)**. Plusieurs études ont montré que les espèces appartenant au genre *Leuconostoc*, principalement *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides*, peuvent

inhiber la croissance de plusieurs bactéries pathogènes vu leur capacité à produire les acides organiques, le diacétyle et les bactériocines comme dont la plus connue est la mesenterocine Y105 produite par *Ln. mesenteroides* (HOLLET et LIU, 2011).

E. Production d'exopolysaccharides (EPS)

Les souches de *Leuconostoc* peuvent produire des exopolysaccharides, tels que le dextrane, un homopolysaccharide qui a diverses utilisations dans les industries alimentaire, pharmaceutique, médicale ou de forage pétrolier (AMAN et al., 2012). Dans l'industrie alimentaire, il est ajouté aux produits de boulangerie et à la confiserie pour améliorer la rétention d'humidité et l'augmentation de la viscosité, de la rhéologie et de la texture (PEREZ-RAMOS et al., 2015). Bien qu'ils n'aient pas de goût propre, les EPS de LAB augmentent le temps de séjour des produits laitiers dans la bouche et confèrent ainsi une perception améliorée du goût (VIJAYENDRA et al., 2008). L'augmentation de la viscosité des aliments contenant des PSE peut augmenter le temps de séjour des laits fermentés ingérés dans le tractus gastro-intestinal et sont donc bénéfiques pour la colonisation transitoire par une bactérie probiotique (HEMME, 2012).

Chapitre II

Caractérisation de dextrane

II. Caractérisation de dextrane

II.1. Définition de Dextrane

Le mot dextrane a été utilisé pour la première fois en 1874 par SCHEIBLER et cela pour étudier la nature du composé responsable de l'apparition d'une certaine viscosité dans les jus de betterave sucrés (SCHEIBLER, 1874), le comportement que Pasteur en 1861 (PASTEUR, 1861) l'avait déjà attribué à l'action des microorganismes. Plus tard, en 1878, Van Tieghem a isolé le microorganisme responsable de la gélification et l'a nommé *Betacoccus mesenteroides*. Hestrin, Averini-Shapiro et Aschner (1943) ont nommé l'enzyme extracellulaire correspondant à la production du dextrane comme dextrane-saccharase (VANDTORI et al., 2012).

Le dextrane est un HoPS d'une masse moléculaire élevée (VANDTORI et al., 2012), formé d'unités de glucose dont l'allongement des chaînes est catalysé par la dextrane-sucrase. La biosynthèse du dextrane a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries, notamment chez les *Streptococcus mutans*, chez les *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* et chez les *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* (Office européen des brevets, 1998), *Lactobacillus* et *Weissella*. Parmi tous les micro-organismes producteurs de DS, le plus étudié et utilisé est *Leuconostoc* (FLÓREZ GUZMAN et al, 2018). Les *Leuconostokes* produisent l'enzyme, la dextrane-sucrase, et la sécrètent dans le milieu de culture en présence de saccharose (Office européen des brevets,1998). *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc dextranicum* produisent des dextrans avec un pourcentage élevé (95%) de liaisons α -(1,6) dans sa chaîne principale et différents types de ramifications, principalement α -(1,3), mais aussi α -(1,2) ou α -(1,4) faible pourcentage (5%) (SAVADOGO, 2004), la fréquence et le type de liaison dépendent de la nature de l'enzyme et du type de microorganisme. La production de dextrane et d'enzymes est concomitante à la fermentation en présence de saccharose, formant un complexe enzyme-dextrane conduisant à des viscosités élevées et à des agrégats de polymères, rendant plus difficile la purification et la caractérisation du produit (FLÓREZ GUZMAN et al., 2018). Le dextrane synthétisé par *L. mesenteroides NRRL B-512F* a été l'un des premiers biopolymères fabriqués industriellement par diverses applications en biotechnologie et en médecine contenant 95% des liaisons α -(1,6) et 5% des ramifications α -(1,3) (KORAKLI et VOGEL, 2006).

Les gènes d'enzymes responsables de la formation d'homopolysaccharides ne font pas partie d'opérons. Ces enzymes sont extracellulaires ou localisées sur la face externe de la membrane cytoplasmique (SAVADOGO, 2004).

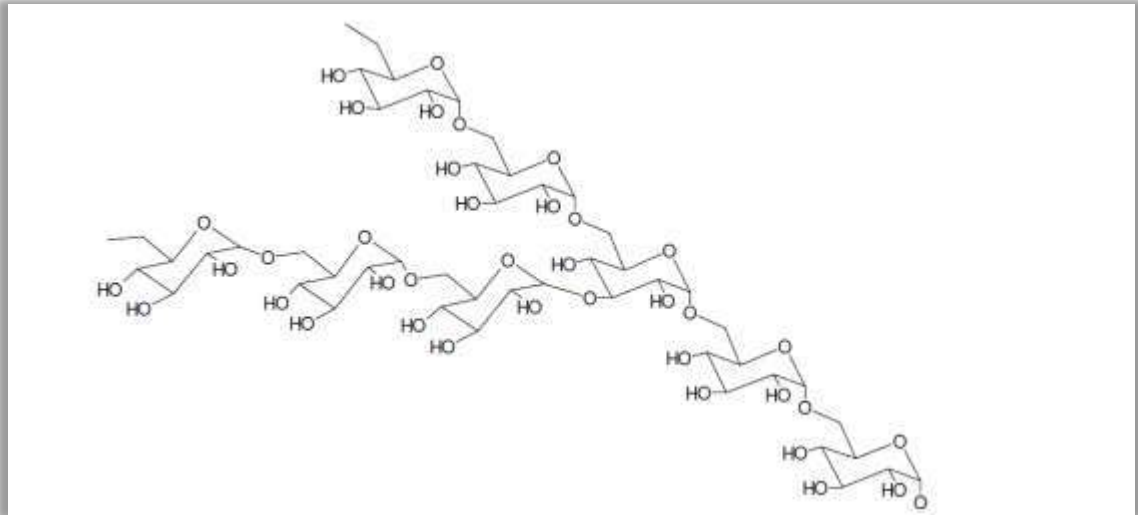


Figure1: Représentation schématique de la structure générale du dextrane synthétisé à l'aide de la bactérie *Leuconostoc méésentéroïdes* et constitué d'un enchaînement d'unité α-D-glucopyranose lié par des liaisons chimiques en α-(1 → 6) et d'une ramification en α-(1 → 3) (COVIS, 2011).

II.2. Dextrane sucrose:

En ce qui concerne la biosynthèse HoPS, ces polymères sont principalement synthétisés de manière extracellulaire à partir d'une molécule de saccharose existante, qui agit en tant que donneur du monosaccharide correspondant et transfère la molécule sur le réducteur du glucane ou du fructane par action d'un seul type d'enzyme extracellulaire soit désirée glycosyl hydrolase (GH). Ainsi, les α-glucanes et les β-fructanes sont formés par les glucanes sucrares (GS; GH family70) et fructan sucrares (FS; GH family68), respectivement (TORINO *et al.*, 2015).

Les dextrane-saccharases (EC 2.4.1.5) (DS) sont GS qui appartiennent à la famille GH70 (NAESSENS *et al.*, 2005). Dextran sucrose (saccharose: 1,6-α-D-glucane 6-α-glucosyltransférase EC(2.4.1.5) est une enzyme qui catalyse le transfert de l'α-D-glucopyranose résidus de saccharose (S) à des accepteurs de faible poids moléculaire formant des oligos et des polysaccharides. Le principal produit de réaction du DS est le dextrane, ainsi que la libération de fructose (F) sous forme de déchet (FLÓREZ GUZMAN *et al.*, 2018). dans la réaction chimique suivante (VANDTORI *et al.*, 2012):

$$\text{Saccharose}_n \rightarrow \text{D-fructose} + \text{dextrane (D-glucose)}_{n+1}$$

La DS est produite principalement par quatre genres de bactéries lactiques (LAB) *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* et *Lactobacillus*. La plupart de ces microorganismes sont induits par le saccharose pour la production de DS, à l'exception de *Streptococcus* où l'enzyme est habituellement constitutive (FLÓREZ GUZMAN et al., 2018). Ces enzymes peuvent être sécrétées dans le milieu ou restent attachées à la surface cellulaire (VETTORI et al., 2012).

Les dextrans ne peuvent pas être synthétisés par les dextrane-saccharases en utilisant un autre substrat naturel que le saccharose. D'autres carbohydrates tels que le glucose, le fructose, le mannose et le lactose, conduisent à la croissance microbienne, mais pas la production de la dextrane-saccharase chez les espèces de *Leuconostoc* (ROBYT, 1985). L'énergie entre la liaison joignant les molécules de glucose et de fructose (16,7 à 20,9 kJ mol⁻¹) est utilisée pour la synthèse de dextrane sans aucune nécessité à des molécules d'ATP ou d'autres co-facteurs. En présence d'un accepteur efficace, tel que le maltose et isomaltose, les dextrane saccharases synthétisent les oligosaccharides (RUIZ-MATUTE et al., 2011). Par exemple, *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 en présence du maltose synthèse des oligosaccharides liés avec des liaisons α - (1,2), qui sont très résistantes à l'attaque par les enzymes digestives et ils ont aussi utilisés comme des prébiotiques (REMAUD-SIMEON et al., 2000). Lorsque des taux élevés de saccharose sont utilisés pour la production de dextrane, la viscosité de la culture affecte la croissance cellulaire et, par conséquent, la production d'enzymes et la séparation des cellules bactériennes sont entravées. Les études ont montré que le saccharose à 2% (p/v) était la concentration adéquate pour une production optimale de la dextrane-saccharase (VETTORI et al., 2012).

II.3. Production de dextrane

Le dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* catalyse la synthèse de dextrane, polymère de glucose à partir du saccharose (DOLS, 1996) au microscope électronique BROOKER (1977) a montré que la paroi cellulaire de *Ln. mesenteroides* qui présente la structure classique à trois couches des bactéries Gram-positives lorsque ce microorganisme est cultivé en bouillon MRS est modifiée en présence de saccharose. Après deux heures de contact, il se forme une couche uniforme à la surface de la paroi cellulaire (110 à 130 nm d'épaisseur). Pour 85 à 90 % des cellules maintenues en présence de saccharose aucun changement apparent n'est notable, par contre les autres cellules commencent à accumuler des dextrans capsulaires insolubles à la surface de cette couche uniforme. Après 18 heures, ces cellules produisent une

capsule (diamètre maximum 6 μm) composée principalement d'un ample réticulum de filaments fins. Pour BROOKER (1976) la couche extérieure dérive du dextrane globulaire de la capsule selon un processus de dispersion. Cette couche superficielle des cellules croissant en présence de saccharose, représente un complexe dextrane fixé à la cellule. Les cellules ne présentant pas cette capsule produisent du dextrane relativement soluble ce qui avait été déjà noté par SMITH (1970) (DEVOYOD et POUILLAIN., 1988).

D'après GARVIE (1984), *Ln. mesenteroides* se développe bien sur milieu contenant du saccharose et forme de grandes quantités de dextrane, tandis que *Ln. dextranicum* est moins actif et forme seulement de petites quantités de dextrane. Selon DEVOYOD et POUILLAIN (1988) deux types de colonies été observées sur le milieu au saccharose de MAYEUX, SANDINE et ELLIKER (1962):

- a) de grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge ;
- b) de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.

COT et ROBYT (1983) ont montré qu'il est possible pour *Ln. mesenteroides* de produire des dextranses de structure et de composition très différentes d'autant qu'il existe une relation biosynthétique entre les dextranses solubles et les dextranses insolubles produits par une même souche de *Ln. mesenteroides* et que la dextransucrase de ce microorganisme peut prendre des formes multiples. La production de dextrane à partir de saccharose est un caractère important de différenciation des espèces de *Leuconostoc*. Pederson et Albury (1955) ont montré que des souches de *Ln. mesenteroides* non productrices de dextranses, souches isolées de choucroute, retrouvaient ce caractère après plusieurs repiquages en milieux acides contenant soit du jus de tomate, soit du jus d'orange. Inversement, des souches productrices de dextrane perdaient ce caractère après plusieurs repiquages successifs dans des milieux de concentration croissante en chlorure de sodium (les dextransucrases de *Leuconostocs* sont inductibles) (DEVOYOD et POUILLAIN., 1988).

II.4. Conditions de la production de dextrane

Il est important de se rappeler que la production d'un EPS dépend d'abord de la souche étudiée et peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien, même si la majorité des bactéries mucoïdes peuvent produire des EPS dans n'importe quel

milieu, la production peut être optimisée sous certaines conditions dans certains milieux définis, ces conditions sont résumés dans le tableau suivante:

Tableau 01: Condition d'optimisation de production de dextrane (**ZAROOUR, 2018; VETTORI et al., 2012**)

Condition de culture	Production de dextrane
Milieu de culture	Concentration adéquate en saccharose
	Source d'azote (peptone)
	Phosphate
	Oligo-minéraux
	Facteurs de croissance
pH	6,7 – 7,2
Température	25 ° – 30 °C

II.5. Application de dextrane

Dextrane a diverses applications dans les industries pharmaceutique, chimique et alimentaire (**FLÓREZ GUZMAN et al., 2018**) en raison de leurs propriétés physicochimiques exceptionnelles. Il est notamment utilisé en biochimie comme support pour la chromatographie par filtration sur gel du type Sephadex. De plus, dans le domaine thérapeutique, il est utilisé comme succédané du plasma sanguin (**OFFICE EUROPEEN DES BREVETS,1998**), Sa présence dans les aliments améliore les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers) dont ils ont plusieurs usages. Les dextrans ont également été utilisés comme additifs dans des produits tels que les bonbons et les crèmes glacées. L'incorporation de dextrane dans les produits de boulangerie améliore la douceur, la texture des miettes et le volume du pain. Les niveaux d'utilisation ne dépasseront pas 5% sur la base du produit final (**EUROPEAN COMMISSION, 2000**) Il a été utilisé comme stabilisant pour la confiserie où sa présence empêche la cristallisation, améliore la rétention d'humidité, augmente la viscosité et maintient la saveur. Son utilisation est également proposée dans les boissons gazeuses, les boissons à base de lait et les compositions de glaçage. Comme substance comestible non toxique, le dextrane est considéré comme ayant de nombreux avantages par rapport aux autres stabilisateurs de crème glacée. Des essais effectués sur des mélanges de crème glacée contenant de 2 % à 4 % de dextrane ont indiqué qu'ils conféraient des propriétés bénéfiques à la viscosité. Les propriétés

favorables du dextrane pour la stabilisation des aliments lyophilisés ou congelés comme les poissons, la viande, les légumes et le fromage. La protection des surfaces avec un film de dextrane pourrait protéger les aliments de l'oxydation et d'autres changements chimiques et aussi aider à préserver la texture et la saveur **(BHAVANI et NISHA, 2010)**, et utilisé aussi comme un prébiotique, entre autres **(FLÓREZ GUZMAN et al., 2018)**.

Dans le domaine médical, le dextrane est utilisé pour son effet antithrombotique, son activité anticoagulante (le sulfate de dextrane) et antiviral, son usage dans les fluides intraveineux, son rôle dans la cryopréservation pour stocker les organes pour la transplantation et comme porteurs dans des vaccins. En plus, le fer-dextrane est utilisée pour lutter contre l'anémie ferriprive **(MAURAY et al., 1998)**. En industrie photographique, les fractions de dextrane hautement purifiées sont largement utilisées comme un amplificateur des techniques et la qualité d'imagerie. Dans le domaine de production de cosmétique, le dextrane est aussi impliqué dans la production des crèmes et des produits de soins de la peau comme un agent hydratant et épaississant **(BHAVANI et NISHA, 2010)**.



Chapitre III
Chapitre III

Matériel et méthodes
Matériel et méthodes

I. Matériel et Méthodes

I.1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie appliqué de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Kasdi Merbah - Ouargla. Il consiste d'une part à l'isolement et l'identification des souches *Leuconostoc* à partir différents produits laitier, et d'autre part la caractérisation des EPS (dextrane) produit par quelques souches productrice sélectionnée, cette expérience a été effectuée durant la période du 10 Février jusqu'à 09 Mai 2019.

I.2. Provenance des échantillons

Notre étude est basée sur l'isolement des bactéries du genre *Leuconostoc* à partir de plusieurs échantillons des différents produits laitiers, ces échantillons proviennent de la région d'Ouargla à l'exception du lait de vache qui a été collecté de la région de Batna. La date des collections, le nombre, le type et la provenance des échantillons est citée dans le tableau suivant:

Tableau 02: la provenance de divers échantillons collectés

Echantillon	Date de collection	Provenance	Nombre
lait de chamelle	11-20 /02/2019	Ouargla (acheté)	2
lait de chèvre	9-11-15-16- 18 /02/2019	Taibet, Touggourt, Elbour Ouargla	5
lait de vache	15/02/2019	Batna (ferme)	1
lait de brebis	11/02/2019	Ouargla	1
Dhan	16/02/2019	Taibet Elbour	2
Klila	15/02/2019	Touggourt (acheté)	1
J'ben	16-18/02/2019	Ouargla (acheté)	2

I.2.1. Prélèvement de lait

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d'éviter tout risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique et ceci par la réalisation du prélèvement en enfilant des gants et lavant les trayons avec une serviette propre, tirer

quelques jets de lait pour réduire le nombre de bactéries dans le canal du trayon(LÉVESQUE , 2004), ensuite désinfecter tout le trayon avec l'eau savonneuse, rincé avec l'eau de javel puis séché avec un coton hydrophile stérile (BENAZZOUZ, 2012). Prélever du lait dans des flacons en verre de 250 ml stérile puis mettez les flacons dans la glace au font d'une glacière pour conserver le lait au cours de transport au laboratoire dans un température 4C°(LÉVESQUE , 2004) .

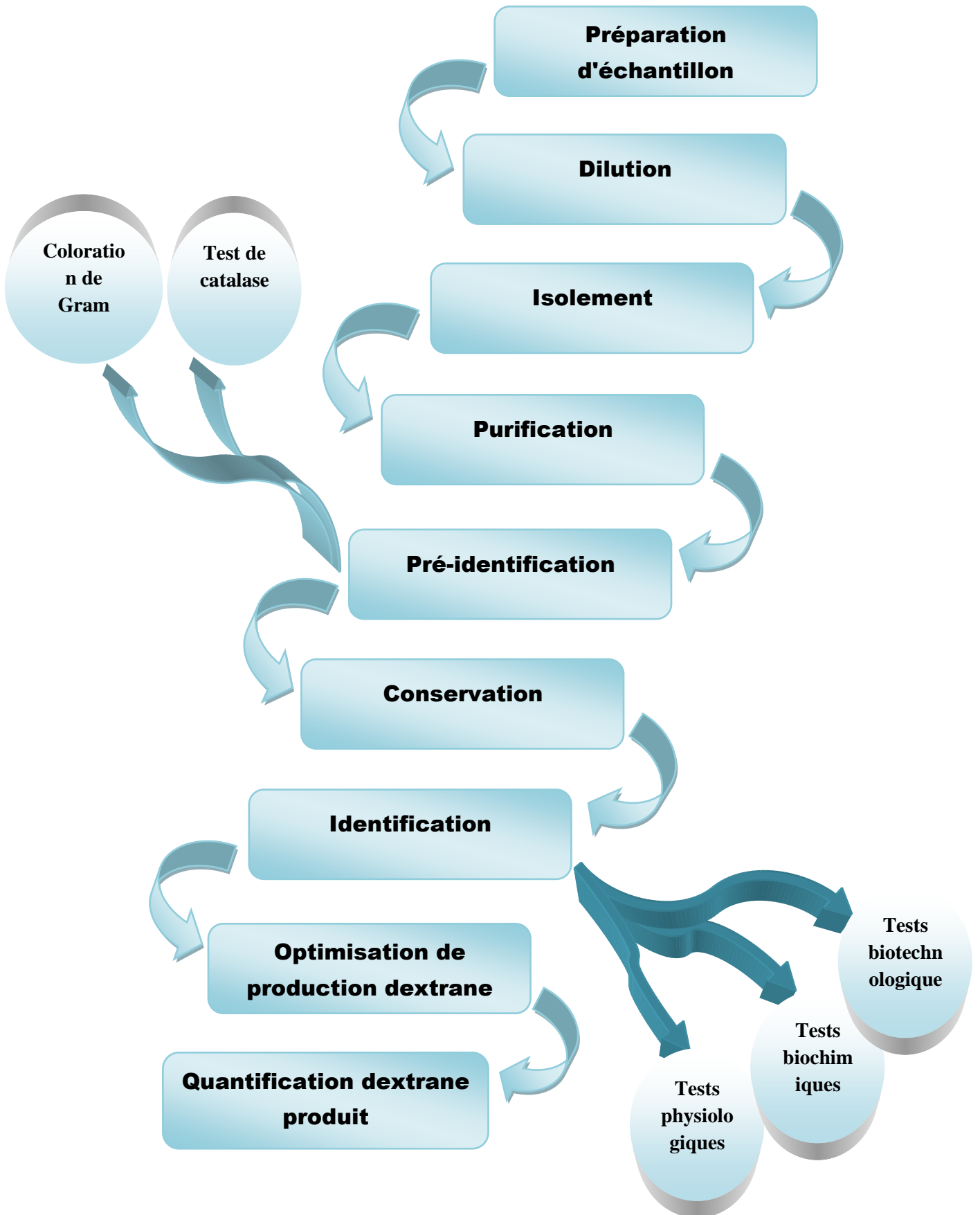


Figure 02: Schéma représentatif du protocole de cette étude

I.3. Préparation des échantillons

I.3.1. Lait

Après homogénéisation d'échantillon du lait (agitation pendant 10 secondes). Prélever aseptiquement 1ml de lait à l'aide d'une pipette graduée ou micropipette stérile et introduit dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologique peptonée, agiter puis transférer 1ml de cette première dilution dans le deuxième tube. De même façon on effectue des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} (**BENAZZOUZ, 2012**).

I.3.2. Fromage, Dhan et Klila

Une quantité de 5g de chaque échantillon est broyée avec 45ml d'eau physiologique peptonée stérile. Après agitation au mortier ou vortex jusqu'à l'homogénéité, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} sont réalisées 1ml des trois dernières dilutions est prélevé et ensemencé en profondeur dans le milieu MRSv (**BADIS et al., 2005**). Toutes les boîtes sont incubées en anaérobioses à 30°C pendant 48h à 72 h (**MATHOT et al., 1994; KHEDID et al., 2006**).

I.4. Isolement et purification

I.4.1. Isolement

Pour l'isolement des souches *Leuconostoc* nous avons utilisé un milieu sélectif, le milieu MRS avec l'addition d'un antibiotique la vancomycine (2mg/ml) pour inhiber et ralentir la croissance des autres genres des bactéries Gram positif (la plupart des bactéries lactiques sont sensibles à cette dose (**BADIS et al., 2005**), on fait un ensemencement en masse à partir des dilutions (1ml de chaque dilution), en fin toutes les boîtes sont incubées à 30°C jusqu'à la croissance. Les techniques d'isolement sont basées sur l'obtention d'un clone, c'est-à-dire une culture issue d'une seule cellule (**BENAZZOUZ, 2012**).

I.4.2. Purification

Elle consiste à effectuer des repiquages successifs sur milieu MRS liquide et MRS solide utilisés alternativement jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes (**ZAROOUR et al., 2013**), la purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries (**BADIS et al., 2005**).

I.5. Pré-identification des isolats

I.5.1. Coloration de Gram

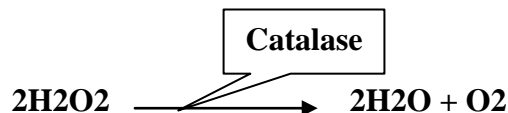
C'est une étape très importante dans l'identification de genre (**BADIS et al., 2004**), elle est effectuée sur des colonies ont des caractères morphologiques des souches

rechercher, elle permet de déterminer le type de ces bactéries et la morphologie des cellules (LARPENT, 1990).

I.5.2. Recherche de la catalase

L'objectif de ce test est de faciliter la distinction entre les bactéries lactiques à catalase négative des autres souches non lactiques.

La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène:



La recherche de la catalase se fait par la mise en contacte d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygéné (sur une lame). La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz et le contraire est négatif (MARCHAL et al., 1991). Seules les bactéries à catalase négatif sont retenues.

Ensuite, pour assurer une bonne continuité du travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates.

I.6. Conservation des isolats

La conservation d'une souche pure a comme but de maintenir ces souches pures à conserver viable, dans cette étude, deux types de conservation ont été réalisés:

I.6.1. Conservation court terme (courte durée)

Dont laquelle un ensemencement a été effectué sur gélose MRS incliné et incubé à 30°C, après l'apparition des colonies les cultures ont été maintenues sous une température de 4°C.

I.6.2. Conservation longue terme (longue durée)

Elle a été faite à partir des cultures sur milieu liquide et après une centrifugation à 8000 tours pendant 10 min les cellules ont été récupérées, un rinçage par l'eau distillé stérile a été fait avec une autre centrifugation. Le surnagent a été éliminé et un milieu de culture de conservation (03 ml de glycérol avec 06 ml de bouillon MRS) a été ajouté sur le culot, cette conservation a été effectuée en tubes eppendorf à une température de -20°C (BADIS et al., 2005).

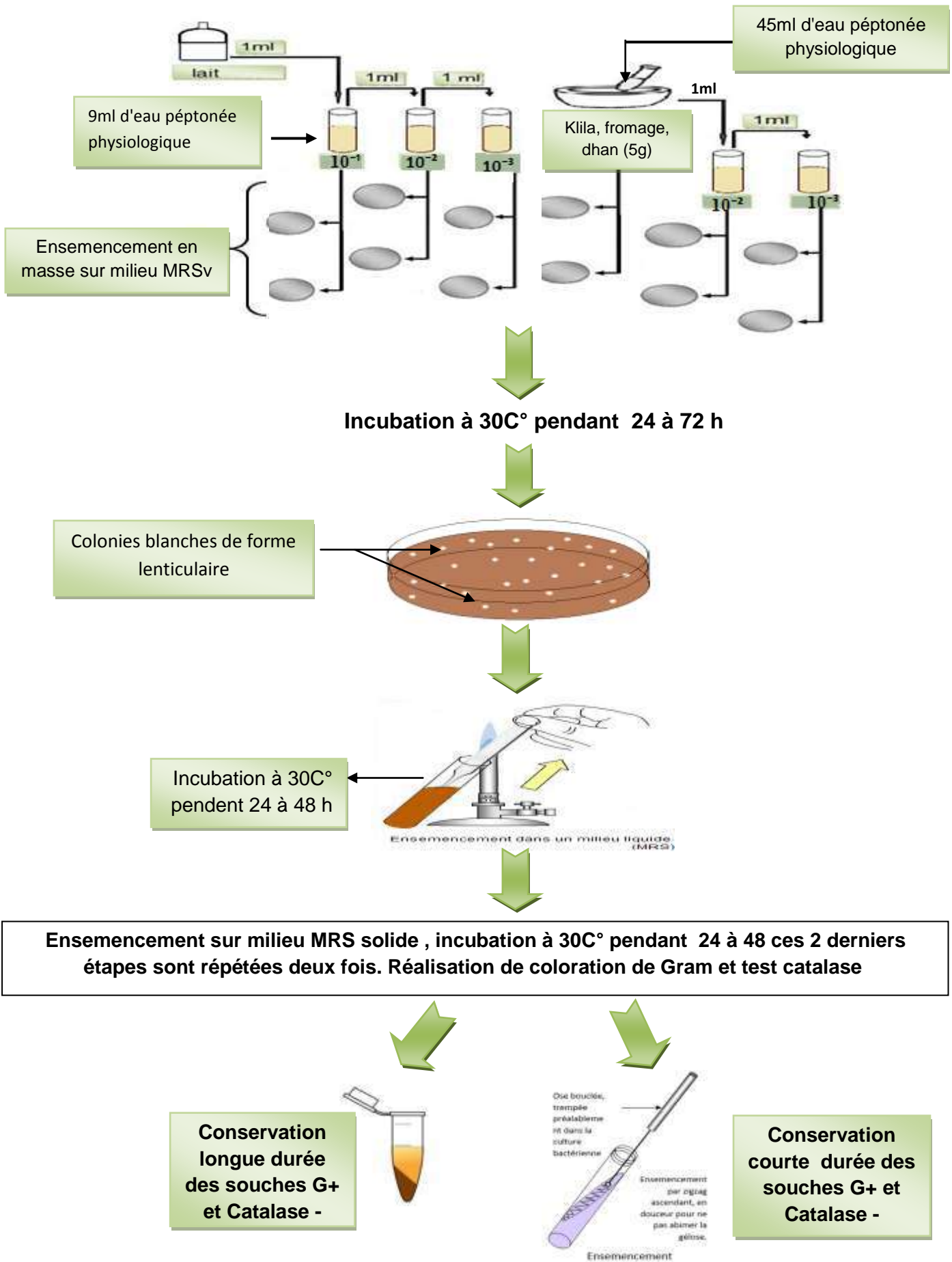


Figure 03: schéma résumé la méthode utilisée pour l'isolement et la purification des souches

I.7. Identification et caractérisation des isolats**I.7.1. Tests morphologiques****I.7.1.1. Examen macroscopique**

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide; pour caractériser la forme, la taille, la couleur, le contour, et la position des colonies sur milieu MRS solide (en profondeur, en milieu ou à la surface) (BADIS *et al.*, 2004). Et la trouble dans le milieu liquide.

En effet les colonies des leuconostoques rependent généralement au critère morphologique suivant:

Un diamètre compris entre 0.5 et 1 mm, lisses, d'une forme circulaire, blanche, grisâtre (HOLZAPFEL *et al.*, 2009; SÄDE, 2011) et a contour régulier (BADIS *et al.*, 2005)

I.7.2. Tests physiologiques**I.7.2.1. Croissance à différentes températures**

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4 °C, 10 °C, 37 °C et 42 °C (GUESSAS et KIHAL, 2004).

Alors que la thermorésistante des bactéries a été tester au bain marie à 63°C/30 minutes puis on a incubé a 30°C/24h à 48h (GUIRAUD, 1998).

Ces testes vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles ainsi que thermorésistantes.

I.7.2.2. Croissance à différents pH

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 24h à 30C°), ces derniers ont étéensemencées dans un milieu MRS liquide à: pH 4.8, pH 6.5, pH 9.4 et incubé à 30C° pendant 2 à 3 jours (GUESSAS et KIHAL, 2004).

I.7.2.3. Résistance à la salinité

L'habilité de croitre dans un milieu MRS liquide à contenant 3% et 6.5% de chlorure de sodium et incubé à 30C° avec un témoin MRS liquide sans sel pendant 2 à 3 jours .(GUESSAS et KIHAL, 2004; BADIS *et al.*, 2004).

La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes (LEVEAU et BOUIX, 1980).

I.7.3. Tests biochimiques**I.7.3.1. Recherche de type fermentaire**

Ce test permet de s'avoir le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par le quel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz

à partir de la dégradation du glucose (HANSAL, 2015). Les souches isolées sont ensemencés dans un bouillon MRS contenant les cloches des Durhams, puis incubés à 30°C pendant 24h. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire (BOUMEDIENE, 2013). Le type fermentaire de *Leuconostoc* est hétérofermentaire (le métabolisme de glucose produit des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂ (HANSAL, 2015).

I.7.3.2. Test de dégradation des sucres

La dégradation de différents sucres permet de différencier entre les espèces et sous espèces de *Leuconostoc*. La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS sans extrait de viande, sans sucre et additionné au bleu de bromothymole (BBT) comme indicateur de pH qui remplace le poupre de bromocrésol BCP (MRSBCP-EV). La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant : glucose, saccharose, lactose, maltose, fructose, galactose, esculine, mannitol, rhamnose, xylose, Arabinose et sorbitol (BADIS *et al.*, 2004).

Des solutions sucrés ont été préparés de 1g de chaque sucre avec 10ml de l'eau distillé stérile, le tout a été homogénéisé puis stérilisé à 100°C pendant 15 min au bain marie.

Deux cultures jeunes de chaque souche ont été préparées, puis une centrifugation de chaque culture dans un tube d'ependorf a été effectuée à 8000 tours pendant 10 min. Le culot a été récupéré et additionnée à l'eau distillée stérile puis une autre centrifugation a été réalisée pour éliminer les restes de milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur; ce rinçage est réalisé deux fois consécutives, et après, 01 ml de bouillon MRS.BCP a été ajouté sur le culot récupéré de dernière centrifugation et bien homogénéisé (HANSAL, 2015).

L'ensemencement a été réalisé dans des microplaquettes contenant des puits, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différentes souches, chaque puits contient 200 µl de MRS.BCP avec 100µl de solution sucré et 100µl de suspension bactérienne, le tout a été recouvrir par une couche de huile de paraffine (BADIS *et al.*, 2005)

Les microplaquettes ont été incubées à 30°C pendant 72h et vérifié chaque 24h (GUESSAS, 2006). Le résultat après, nous distinguons le virage de milieu de vert au jaune et cela indique que la souche lactique a put fermenter cette source de carbones lors de croissance (BAUER *et al.*, 2005).

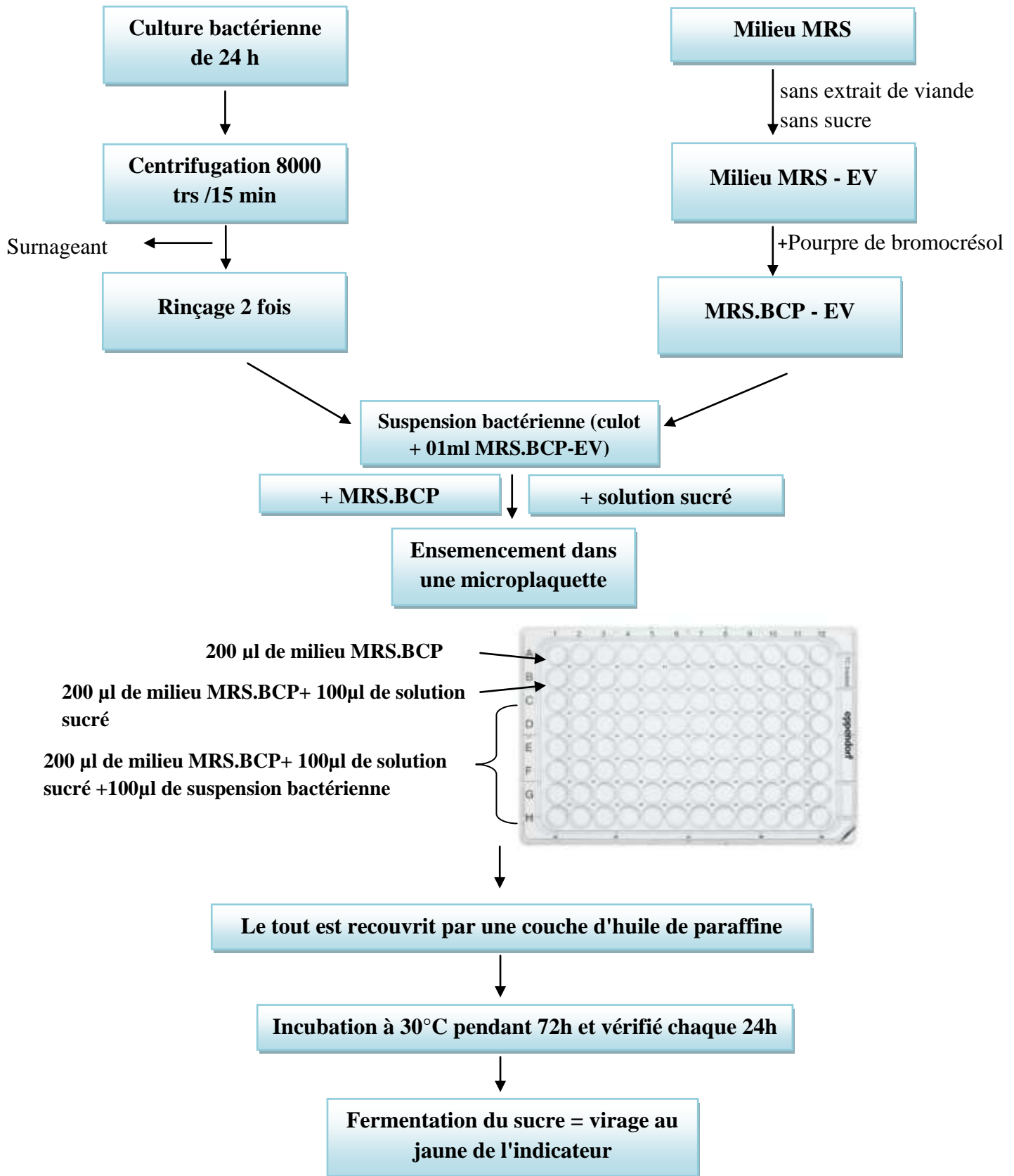


Figure 04: Protocole de test de fermentation des sucres

I.7.4. Tests biotechnologiques

I.7.4.1. Recherche de l'Arginine déshydrolyse (ADH)

L'arginine déshydrolyse (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en ammoniac, et des amines (composés basiques) (HANSAL, 2015) mis en évidence par l'ensemencement des souches sur milieu M16 BCP après incubation à 30°C/ 24h en anaérobiose. Le virage de milieu de vert au jaune (car on a utilisé l'indicateur coloré le bleu de bromothymol) indique qu'il n'y a pas d'hydrolyse de l'arginine. Par contre les colonies de couleur blanches hydrolysent l'arginine (BOUMEDIENE, 2013).

I.7.4.2. Production des substances aromatiques

La production des substances aromatiques est une propriété spécifique aux bactéries lactiques dont laquelle le lactose, le citrate, les acides aminés ou les matières grasses sont utilisés comme substrat. Cette capacité de produire l'arôme est très importante lors de la fermentation des laits ou l'élaboration des fromages frais, crèmes et beurre (DHOUIB, 2017).

L'étude de ce caractère a été réalisée sur gélose KMK (KEMPLER et McKAY, 1980) dont la seule source de carbone est le citrate qui va alcaliniser le milieu après leur utilisation par les bactéries. L'ensemencement est effectué par stries sur la surface à partir d'un milieu solide et incubé à 30°C durant 24h (GUIRAUD, 1998).

I.7.4.3. Production de dextrane

Le dextrane est un exopolysaccharide produit par quelques espèces du genre *Leuconostoc* ainsi que d'autres genres bactériens. La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (MAYEUX et al., 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses, gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'identification permettant d'identifier les souches du *Leuconostoc* productrices et non de EPS. On a réalisé des ensemencements sur milieu MSE par des précultures de 18h et incubé à 30°C pendant 24h à 48h (SANCHEZ et al, 2006).

I.8. Caractérisation de dextrane

I.8.1. Optimisation de la production d'exopolysaccharide:

Le premier objectif de notre travail est de sélectionner des souches *Leuconostoc* sur la base d'une production abondante des EPS et pour ce là nous étudions tous d'abord l'influence des conditions culturaux sur la production et on fait la quantification par deux méthodes: **1-** l'observation de la taille des colonies, **2-** degré de viscosité et le dosage par méthode phénol-sulfurique.

A partir des cultures jeunes des isolats (culture de 18h à 30C°), on les ensemence dans un milieu MSE solide à différentes concentration de glucose et dans un autre milieu avec différentes concentration d'extrait de levure (5g/l, 3g/l, 1g/l), les boites ensemencées sont incubées à 30C° pendant 48h. Aussi on les ensemence dans un milieu MRSs liquide à différentes concentration de saccharose 50 et 100 g/L, et on les incube à 30C° pendant 72h.

I.8.2. Extraction et Quantification de dextrane

I.8.2.1. Extraction

La quantification est réalisé en trois étapes: culture dans milieu MRSs liquide, précipitation par l'éthanol ou méthanol finalement la quantification

A partir des cultures jeunes de 18h sur milieu MRS des cinq souches qui ont montré une bonne croissance et production d'EPS (C2, C10, C12, C13, V67), on ensemence 3 ml et 100µl dans des tubes contient 10 ml du milieu MRSs de différent concentration de saccharose 50 et 100 g/L (pour chaque concentration 02 tube, ensemencer avec un volume de 100µl et l'autre avec 3ml d'inoculum), ensuite incuber les tubes à 30 C° pendant 72h, pour déterminer l'influence de différent concentration de saccharose et le volume de l'inoculum sur le rendement en EPS.

Après élimination des cellules par centrifugation 4000 trs pendant 20 min, les EPS présent dans le surnageant sont précipités dans trois volume d'éthanol ou de méthanol froid à 95% (v/v) et en incubant les échantillons à 4C° pendant une nuit.

Une deuxièmes centrifugation été effectué 12000 trs/ 10 min à froid 4C°, rincé deux fois par l'acétone et centrifugé à nouveau à 12000 trs/ 10 min à froid 4C°. EPS ensuite séché à l'air libre, en fin pesé la quantité dextrane produite (**MOOSAVI-NASAB.et al., 2008; ZAROOUR, 2018; GUANGBIN et al., 2019 (modifié)**).

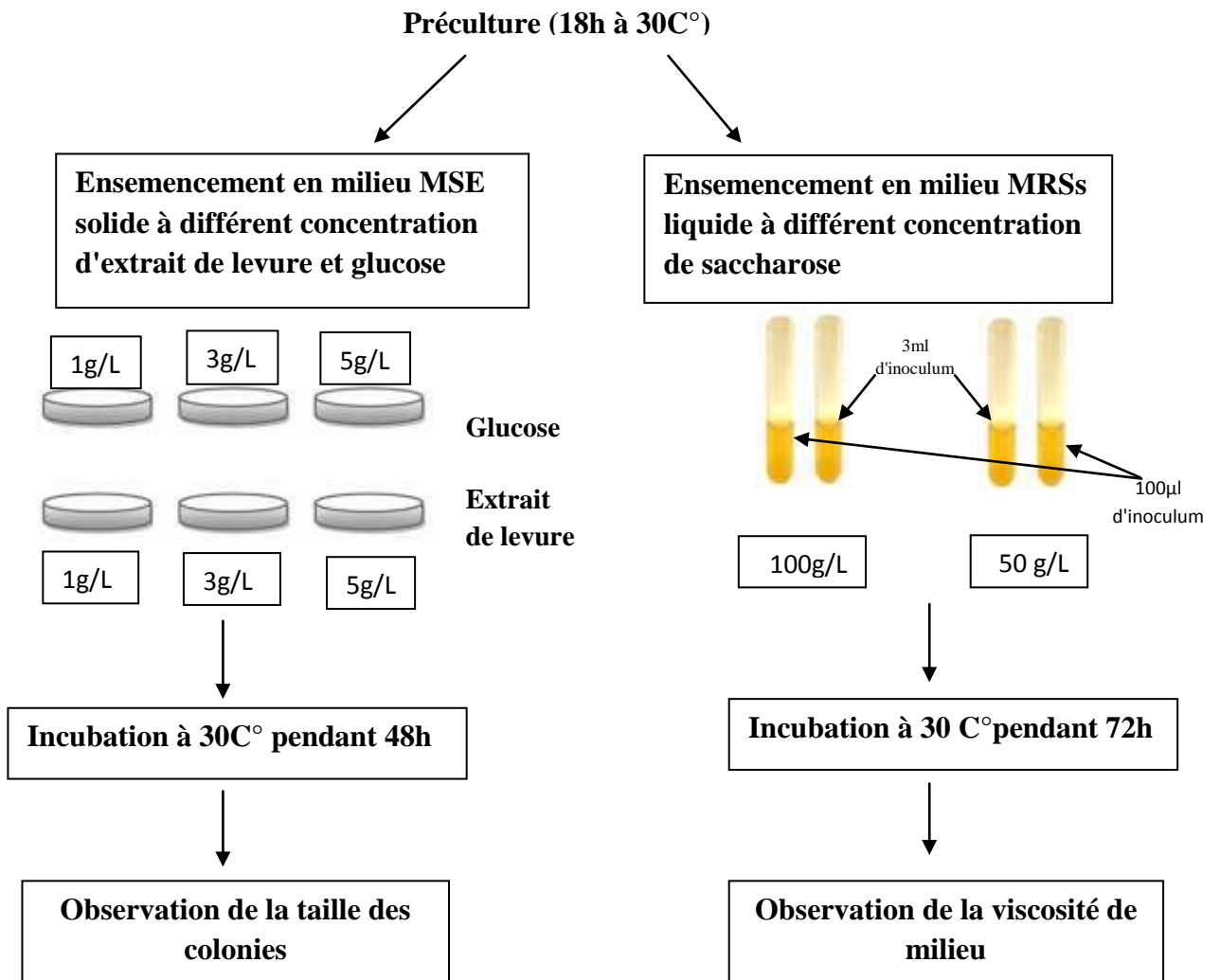
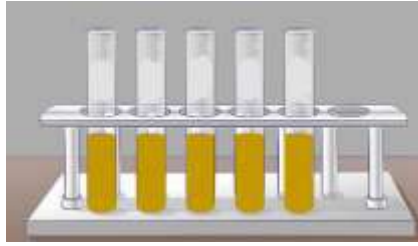


Figure 05: Protocole de l'optimisation de la production d'exopolysaccharide

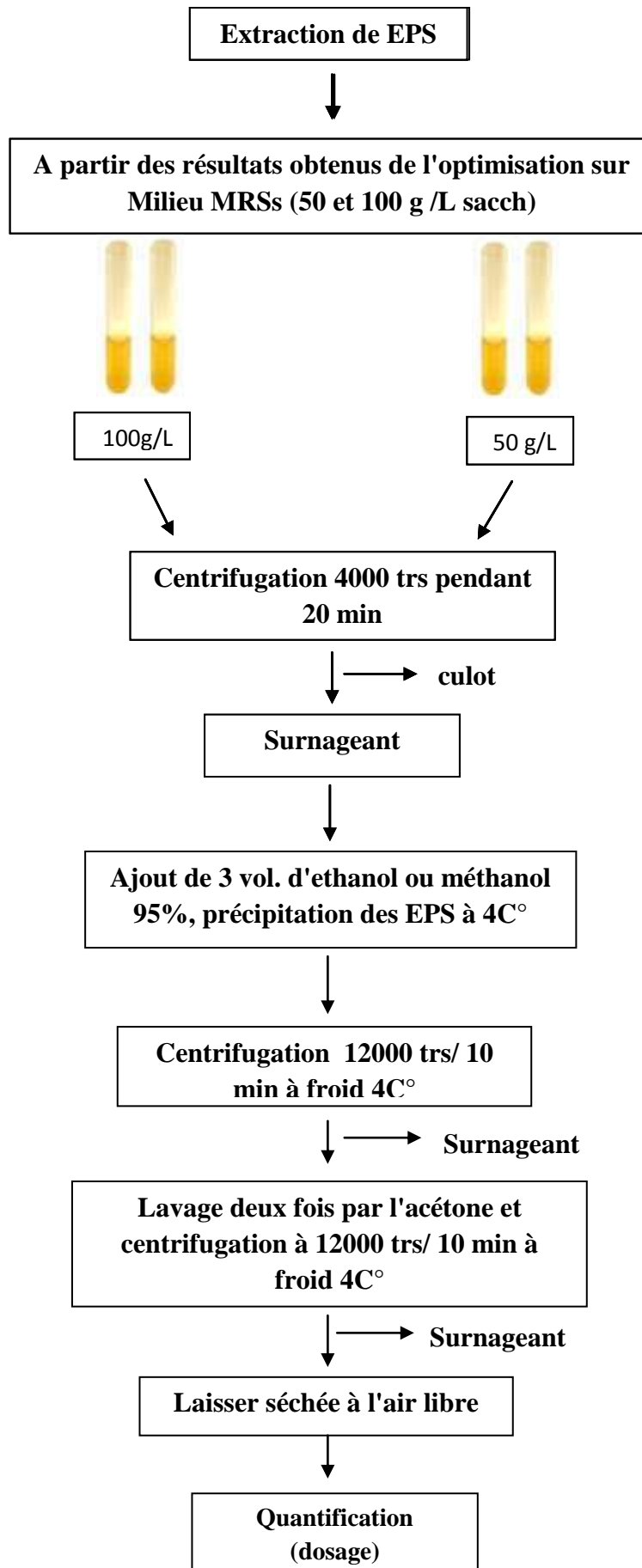


Figure 06: Schéma de l'extraction et la quantification des EPS produit par *Leuconostoc* dans un milieu synthétique

I.8.2.2. Dosage des EPS**I.8.2.2.1. Principe**

Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'ajout d'acide sulfurique provoque l'hydrolyse des polysaccharides. Les glucides en milieu acide sulfurique et à chaud sont déshydratés en dérivés du furfural, ces derniers se combinent facilement avec le phénol en donnant une coloration orangée. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité de sucre présent (dosage colorimétrique) et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable dont de petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées (**ZAROOR, 2018**).

I.8.2.2.2. Méthode de dosage

Les EPS sédiments remis en suspension dans de l'eau distillée stérile et chauffés pendant 10 min à 30°C pour faciliter la solubilisation. La teneur totale en sucres a été déterminée par la méthode phénol-sulfurique (**DUBOIS et al., 1956**). 1 ml des solutions des EPS, 1 ml de phénol à 6% et 2,5 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré sont ajoutés séquentiellement dans chaque tube (**NACHER-VAZQUEZ et al., 2015**). Les tubes sont mis au bain marie à 100°C pendant 15 min puis mis à l'obscurité durant 15 min (**XU et al., 2010**).

Pour effectuer la quantification, l'absorption a été mesurée à 490 nm (A_{490nm}) et les valeurs obtenues sont comparées avec celles de la courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues de D-glucose ci-dessous:

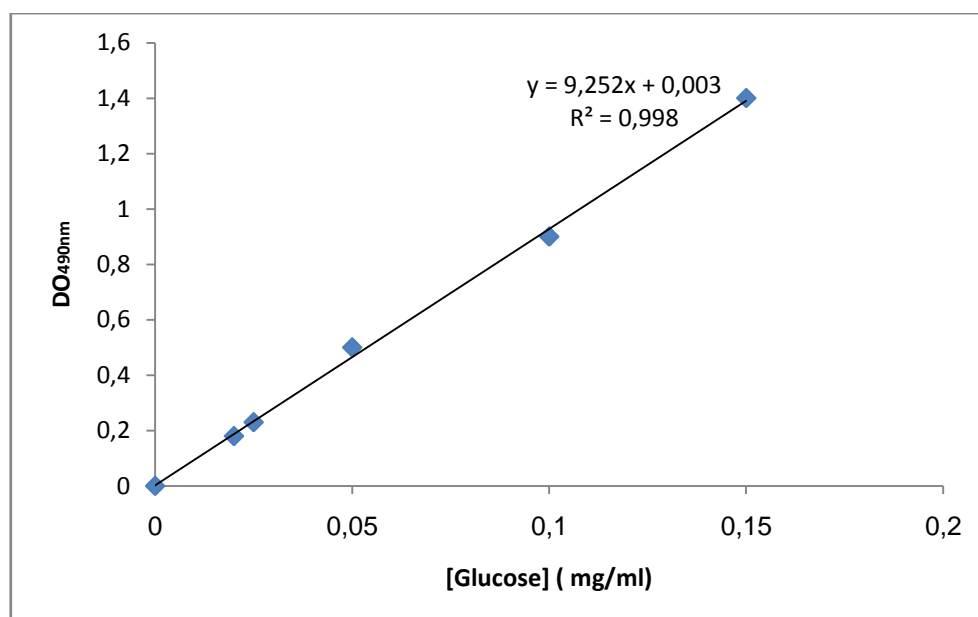


Figure (07): Courbe d'étalonnage de D-glucose représente des valeurs de A_{490 nm} obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.

A close-up photograph of a clear glass being poured into another clear glass. The liquid is captured mid-pour, creating a thin stream that falls into the receiving glass. The background is a blurred grid pattern, likely a window or a wall. The text is overlaid on the image in a green, serif font.

Chapitre II
Chapitre II

Résultats et discussions

II. Résultats et discussions

II.1. Isolement et purification

L'isolement de *Leuconostoc* réalisé sur milieu sélectif MRSv à partir différents produit laitiers (lait de chèvre, lait de chamelle, lait de Brebis, lait de vache, Dhan, J'ben et klila), nous a permet de selectionner 155 souches ayant l'aspect des colonies recherchées (colonies de forme lenticulaire ou circulaire de petite taille de couleur blanchatre (MATHOT *et al.*, 1994)) (**Figure 08**).



Figure (08): Isolement des souches à partir de lait de chèvre ensemencées en masse sur MRSv

après la réalisation de quelque tests phénotypique, on a remarqué que les 155 isolats font partie principalement à deux genres des bacteries lactiques sont connus par leur résistance à la vancomycine, "*Leuconostoc*" et "*Lactobacillus*". Le tableau en dessous montre la répartition des isolats selon le produit primaires où on remarque l'absence totale des leuconostoques dans le lait de chamelle, Klila et le lait de brebis.

Source	Genre		
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	autre genre des bactéries lactiques
lait de chèvre	+	+	-
lait de chamelle	-	+	+
lait de vache	+	+	+
lait de brebis	-	-	-
Dhan	-	+	+
J'ben	+	+	+
Klila	-	-	-

Tableau (03): Flore lactique présente dans les différents échantillons isolés sur milieu MRS_v

(+) Présence

(-) Absenc

Ces résultats sont incompatibles avec les résultats décrits dans les travaux des (CHAKOU et BESSEDIK, 2018; ZAROOUR, 2018; RAMDANI et LADJILAT, 2017; HANSAL, 2015; ZADI-KARAM et KARAM, 2006) qui trouver *Ln* dans le lait de chamelle, (ZAROOUR, 2018; BOUMEDIENE, 2013; MAHI, 2010) aussi isoler *Ln* à partir de lait de brebis. Le résultat d'isolement à partir du Dhan est similaire au résultat de TANTAOUI-ELARAKI et El MARRAKCHIT, (1987) qui marquer l'absence de *Ln* et la présence de *Lb* et autre germe.

D'après CNAOL, (2011), la croissance des micro-organismes dans le lait peut être influencée par divers facteurs du milieu ou de l'environnement, comme le pH, la température, la quantité d'eau libre, la concentration en nutriments ou la composition de lait qui est affectée par plusieurs facteurs, comme l'âge de l'animal, stades de lactations, l'alimentation, la race (Ueli Wyss, 2014), la présence de substances antimicrobiennes et

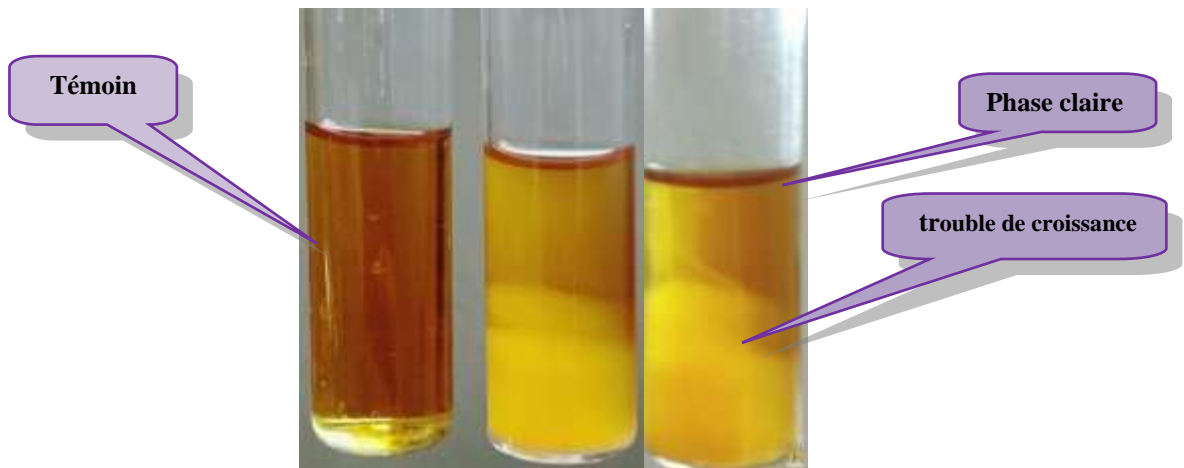
les interactions entre micro-organismes. Ce qui explique l'absence de *Leuconostoc* dans certaines produits et leur présence dans autre.

II.2. Tests morphologiques

II.2.1. Aspect macroscopique

Après la purification des souches sur le milieu spécifique MRS(solide et liquide alternativement) à partir des colonies isolés des milieux MRS nous avons obtenus:

- ✓ **Sur Milieu liquide:** après 24h d'incubation, la croissance des bactéries apparait sous forme de trouble , cette trouble est concentrée au fon du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries. (KIHAL,1996; CARR et al., 2002). par agitation on constate le dégagement du CO₂. (Figure09)



Figure(09): Aspect de trouble d'une souche de *Leuconostoc* sur bouillon MRS après 18 h de croissance

- **Sur Milieu solide:** l'étude de l'aspect macroscopique des souches sur milieu MRS solide après 24h d'incubation nous a permis de distinguer des colonies de couleur blanchâtre, forme lenticulaire ou ciculaire. Ces colonies sont environ 0.5 à 1 mm de diamètre. (KIHAL,1996; CARR et al., 2002) (Figure10)

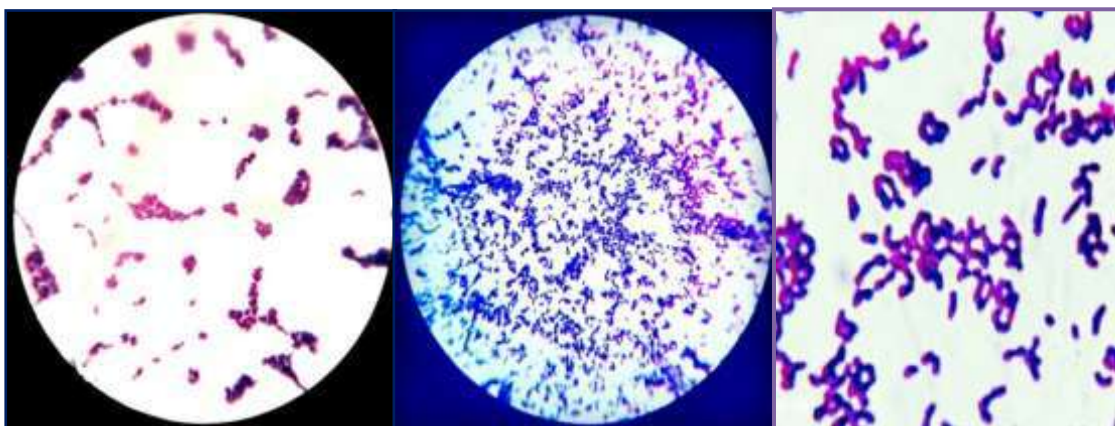


Figure(10): Aspect macroscopique de souche *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* sur gélose MRS

II.3. Pré-identification

II.3.1. Coloration de Gram

L'observation microscopique des isolats purs après coloration de Gram a révélé que ses souches ont une coloration positive avec de forme variées: de petites coques, coccobacille et ovoïde, dont le mode d'association est toujours en paires ou en chaînes, incurvées de nombre paires (KIHAL,1996; CARR et al., 2002) cela donne une pré-identification du genre souhaité: *Leuconostoc* (Figure11).

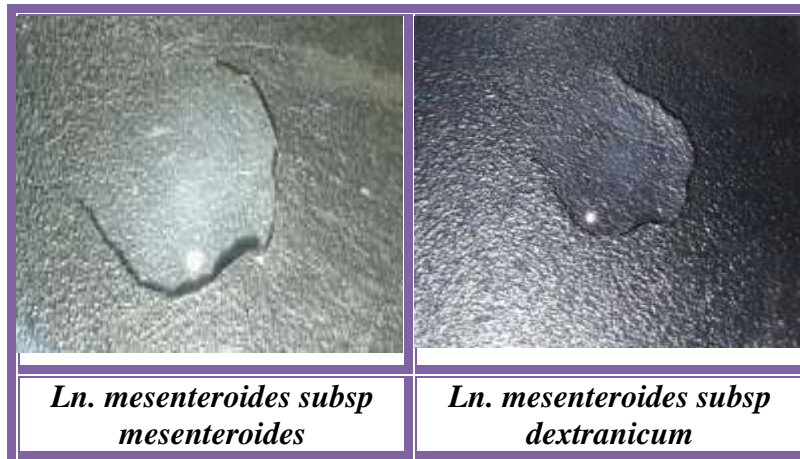


Figure(11) : Observations microscopiques des espèces *Ln. mesenteroides*, *Ln. fallax* respectivement après une coloration de Gram à grossissement x100

Après l'observation microscopique, toutes les souches qui ont été Gram positif sous forme ovoïde ou cocobacille ont été gardé (HANSAL, 2015) et on éliminer les contaminants à Gram négatif n'appartenant pas aux BL .

II.3.2. Test de recherche de la catalase

Le test catalase a révélé l'absence de l'enzyme ce qui reflète l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène.



Figure(12): Résultat du test de catalase (test négatif)

Sur 155 isolats purifiés et examinés, on a sélectionné 78 à Gram positifs et catalase négative ont été retenues qui présumées comme bactéries lactiques.

II.4. Tests physiologiques

Les résultats des tests physiologiques qui ont été réalisés sur les isolats dans des conditions hostiles sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau (04): Tableau représente les résultats des tests physiologiques.

Source	Souches	Croissance à différentes T°					Croissance à différentes [NaCl] (%)		Croissance à différents pH		
		4°C	10°C	37°C	42°C	63°C/30min	3%	6.5%	4.8	6.8	9.6
Lait de chèvre	C1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	C2	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	C10	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	C12	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	C13	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	C15	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	C16	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	C18	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	C21	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
	C23	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	C34	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	C39	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	C41	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
	C43	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Fromage	F49	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	F55	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	F63	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	F64	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	F65	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	F69	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
	F70	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
	F71	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Lait de vache	V67	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+

(+) résultat positif ou croissance

(-) résultat négatif ou pas de croissance

II.4.1. Croissance à différentes températures

Ces examens physiologiques nous indiquent que la plupart des bactéries peuvent pousser entre 10 °C et 37°C ceci montre que ces bactéries sont des mésophile, et n'ont

peuvent pas pousser ni à 4 °C ni à 42°C sauf quelques souches qui sont positif dans le tableau (04). Tout les souches ne sont pas thermorésistantes, où nous observons qu'il n'ya pas de croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63°C (**BADIS et al., 2005**).

Nos résultats identique à ceux trouvés par **GARIVE (1984)** et **DELLAGLIO et al. (1994)** les leuconostokes sont généralement mésophiles avec une température optimale de croissance de 25 à 30°C.

II.4.2. Résistance à la salinité

Les souches qui ont été testées pour savoir leur résistance aux différentes concentrations de sel on été résistante à 03% de NaCl mais elles n'ont été pas poussées à 6.5% de NaCl à l'exception de 5 souches (**C1, C2, C21, F70, F71**) ont été résisté une concentration de 6.5% de NaCl.

II.4.3. Croissance à différents pH

Après une incubation à 30°C, les résultats qui ont été obtenus montrent que toute les souches supportent le pH 6.8 et plus de la moitié des isolats ont montré une croissance sur milieu MRS à pH 9.6 et la plupart d'elles qu'il n'y ont pas se croitre dans un milieu MRS à pH 4.8 à l'exception de 3 souches (**C43, F49, V67**).

II.5. Tests biochimiques

II.5.1. Recherche de type fermentaire

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des bactéries lactiques leur objectif est de faire différencier entre les souches hétérofermentaire et les souches homofermentaire (**HANSAL, 2015**).

Il faut se rappeler que les leuconostokes sont tous productrice de CO₂ (hétérofermentaire). Après une incubation à 30°C, les résultats montre qu'il y a l'apparition d'un trouble au fond des tubesensemencés avec un dégagement de gaz de CO₂ lors de fermentation du glucose (bouillon MRS glucosé) au niveau de la cloche de durham et flottement de cette dernière dans le milieu, ce qu' indique que 52 des isolats choisis ont révélé un métabolisme hétérofermentaire (**Figure 13**) ce qui caractérise le genre de *Leuconostoc* mais cette probabilité à été confirmé par le test de l'ADH qui est négatif chez les leuconostokes ce qui les différenciées des lactobacilles hétérofermentaires (**MATHOT et al., 1994; BADIS et al., 2005**).

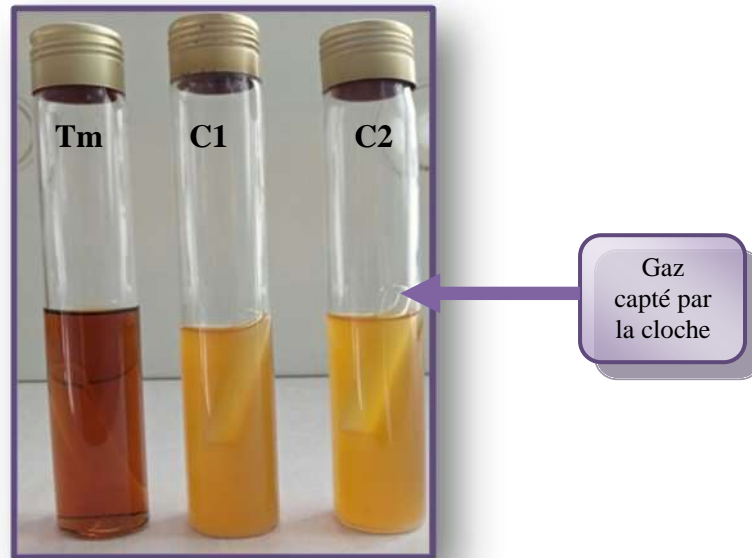
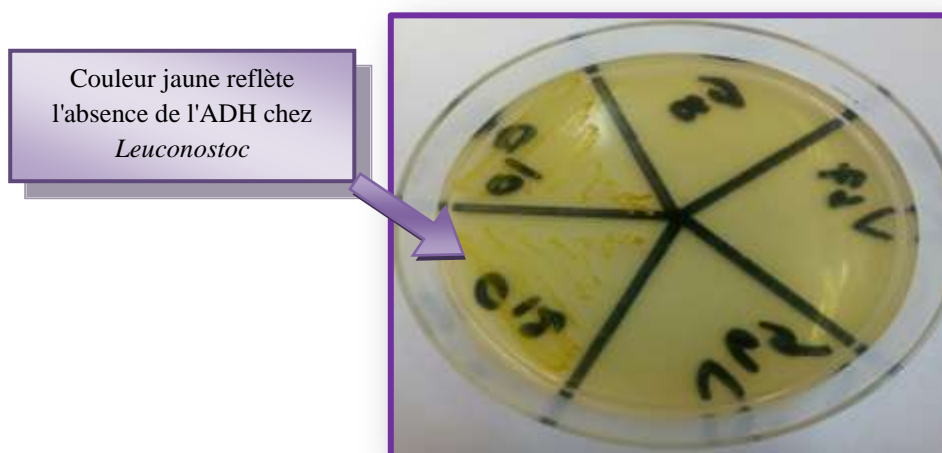


Figure (13):Type fermentaire des souches *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* isolées sur bouillon MRS

II.5.2. Recherche de l'Arginine déshydrogénase (ADH)

Après 48h d'incubation sur gélose M16.BCP à 30°C, 23 souches isolées métabolisent le lactose en produisant de l'acide lactique, ce dernier va diminuer le pH en changeant la couleur de l'indicateur de pH du vert au jaune, mais elles sont incapables d'hydrolyser l'arginine contenu dans le milieu M16 BCP, car les *Leuconostokes* ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase) donc ADH(-) (**KHEDID et al., 2006**). Ce caractère est recherché dans l'industrie alimentaire, elle empêche l'émergence d'un goût amer due à l'ammoniac lors de la fermentation du lait.

Les résultats obtenus sont représentés dans le (**Tableau (05)**).



Figure(14):Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine)

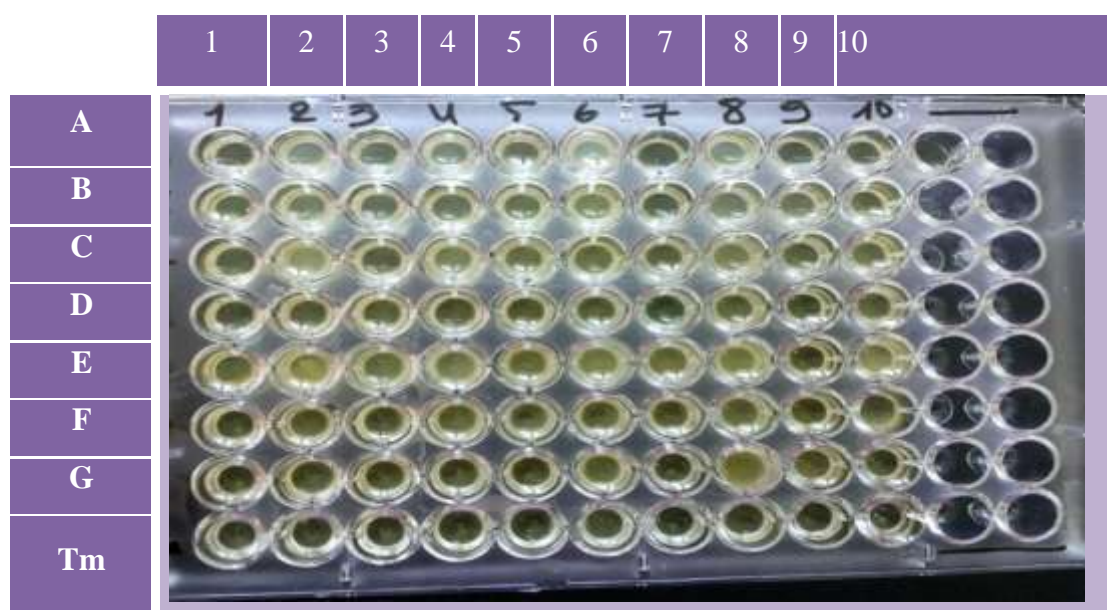
Colonie de couleur jaune: ADH(-) (pas de dégradation de l'arginine).

Tableau (05): Caractères biochimiques et morphologiques des isolats

Souches													Gram	Catalase	Production de CO2	ADH	
Lait de chèvre																	
C1	C2	C10	C12	C13	C15	C16	C18	C21	C23	C34	C39	C41	C43	+	-	+	-
Fromage																	
F49	F55	F63	F64	F65	F69	F70	F71							+	-	+	-
Lait de vache																	
V67													+	-	+	-	

II.5.3. Test de dégradation des sucres

Pour mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce ou de la sous espèce on a établi leur profil fermentaire d'onze sucres par vingt- trois souches isolées. On utilisant le milieu MRS BCP qui contient le bromothymol qui est un indicateur de pH , le virage au jaune révèle la fermentation des carbohydate qui provoque une acidification du milieu. Le sucre arabinose c'est le sucre clé pour différencier entre les espèces du genre *Leuconostoc*. L'utilisation de ce critères phénotypique permet de conclure la pré-identification et de mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce. Les résultats obtenus sont représentés sur le **Tableau (06), Figure (15)**.



Figure(15): Profil fermentaire des isolats effectué sur plaque d'ELIZA

- ◆ **(Tm):** Témoin milieu MRS BCP
- ◆ **Souches:** A,B, C,D,E,F,G
- ◆ **Sucre:** 1-arabinose, 2-glucose,3-galactose,4-lactose,5-fructose,6-saccharose,7-manitol,8-maltose,9-xylose,10-mannose,11-esculine.
- ◆ **Jaune :** fermentation du sucre résultat (+)
- ◆ **Vert :** pas fermentations du sucre résultat (-).

Tableau(06): Résultats du profil fermentaire des souches isolées

Source	Souches	Arabinose	Glucose	Galactose	Lactose	Fructose	Saccharose	Mannitol	Maltose	Xylose	Mannose	Esculine
Lait de chèvre	C1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	C2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	C10	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+/-
	C12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	C13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	C15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	C16	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+/-
	C18	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+/-
	C21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	C23	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
	C34	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	C39	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	C41	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
	C43	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+/-
Fromage	F49	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	F55	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	F63	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	F64	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	F65	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
	F69	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
	F70	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
F71	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	
Lait de vache	V67	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

(+) Dégradation du sucre

(-) Pas de dégradation

D'après les critères phénotypique apportées par différents auteurs (CARR *et al.*, 2002;BADIS *et al.* , 2005; HAMMES *et HERTEL*, 2006; KHEDID *et al.*, 2006), nous avons pu conclure que les leuconostokes sont capable d'utilisés plusieurs sucres, le virage de couleur bleu de bromothymol contenant dans le milieu MRS BCP confirme

que les souches ont dégradés la pluparts des sucres additionnés dans le milieu ce qui laisse ce dernier (acide) à l'exception de 3 souches (C34, C41, F55).

L'identification microbiologique a révélé que 4 souches (C1, C2, C13 et C15) isolées de lait de chèvre et 3 souches (F65, F70 et F71) isolées du fromage, appartiennent à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* tandis que une souche (C34) isolées de lait de chèvre, 2 souches (F49, F69) isolées de fromage et un souche V67 isolée de lait de vache appartiennent à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*.

II.6. Tests biotechnologiques

II.6.1. Utilisation du citrate

Le milieu KMK différencié entre les bactéries qui utilisent le citrate pour donner des produits aromatiques et les bactéries qui n'utilisent pas le citrate. Dans le premier cas les résultats se manifestent par des colonies de couleur bleu contrairement les résultats négatif donnent des colonies de couleur blanche **Figure(16)**

Les *Leuconostoc* sont utilisées dans l'industrie laitières pour leur capacité à produire le CO₂ et des substances aromatiques tel que le diacétyle et cela grâce au Co-métabolisme sucre/citrate (BOUREL et al., 2001), cette propriété augmente leur taux de croissance et leur rendement dans des conditions acides. (HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004).

Le **tableau(07)** montre que la plupart des souches utilisent le citrate et d'autres sont incapables. Cette perte de la capacité d'utiliser le citrate, peut être due à une perte de plasmide codant pour la citrate perméase (KIHAL et al ., 1996). L'utilisation du citrate est un facteur indispensable de la production des composés aromatiques chez les espèces aromatisante de *Leuconostoc* dans les produits laitiers (SANCHEZ et al ., 2006). Ce caractère peut être variable même chez les souches appartiennent à la même espèce (KHEDID et al., 2006).



la couleur bleu reflète
l'utilisation de citrate(+)

Figure 16: Révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK des espèces *Ln. carnosum*, *Ln. fallax*, *Ln. mesenteroide*

- ◆ **Colonie de couleur blanche** : résultat négatif
- ◆ **Colonie de couleur bleu** : résultat positif

II.6.2. Production de dextrane

L'incorporation de dextrane dans les produits de boulangeries en industrie alimentaire améliore la texture et le volume de pain et il est aussi utilisé comme un additif dans des plusieurs produits (VETTORI et al., 2012).

Sur milieu MSE qui est un milieu sélectif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés. La production de dextrane a été vérifiée sur milieu MSE dont lequel ce genre de bactéries utilisent le saccharose de milieu pour synthétiser des exopolysaccharides (dextrane) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux (HANSAL, 2015).

On a obtenue après 48h d'incubation des colonies larges, visqueuses, gluantes et transparentes sous deux forme: (Figure 17)

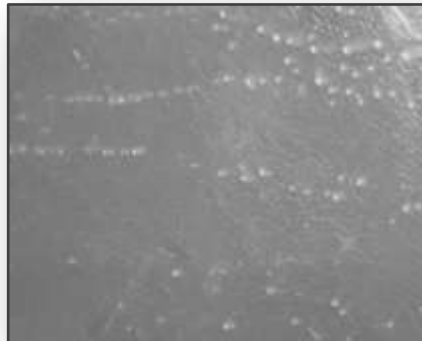
- **De grosses colonies gluantes**, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge; Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*.
- **De petites colonies** (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose. Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum*.

Ce caractère important nous a permis de différencier entre les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leurs appartenance à une des deux espèces productrices de dextrane: *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum*, ce qui a été montré par (MAYEUX et ELLIKER, 1962; GARVIE, 1984; CARR et al ., 2002; BADIS et al ., 2005).

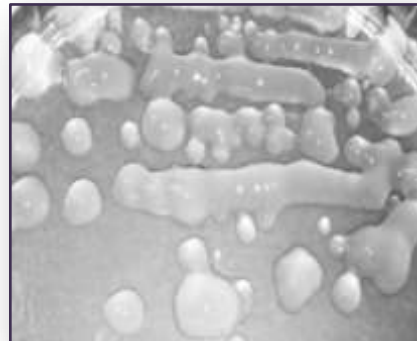
On peut dire que la production de dextrane à partir de dégradation de saccharose a été observée chez la plupart des souches isolées de lait de chèvre, lait de vache et du fromage, les résultats sont représentés dans le **Tableau (07)** qui indique **20** isolats sont capable de produire les exopolysaccharide à l'exception de **3** isolats, **C21**, **C39**, **C43** qui sont incapable de produire le dextrane ce qui nous permet de les classer en deux espèces qui sont: *Ln. mesenteroides subsp cremoris* (**C21**, **C39**), et *Ln. citreum* (**C43**).

La capacité de production de dextrane rend ce genre très utilisable dans l'industrie alimentaire grâce à ces propriétés technologiques (épaississantes,

stabilisantes, émulsifiantes et texturantes) aussi l'amélioration des caractères organoleptique des produits fermentés.(**HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN., 2004**).



Petites colonies



Grosses colonies

Figure17 : Morphologies des colonies productrices de dextrane par les souches de *Leuconostoc* sur milieu MSE

On voudrait souligner que dans ce travail, l'analyse et l'étude fonctionnelle de dextrane synthétisé par la bactérie renforce la probabilité d'intégrer nos isolats d'intérêt biotechnologique dans le domaine Agro-alimentaire.

D'après les résultats obtenus des tests physiologiques et biochimiques effectués, on a pu donc identifier les vingt trois souches isolées comme suivant:

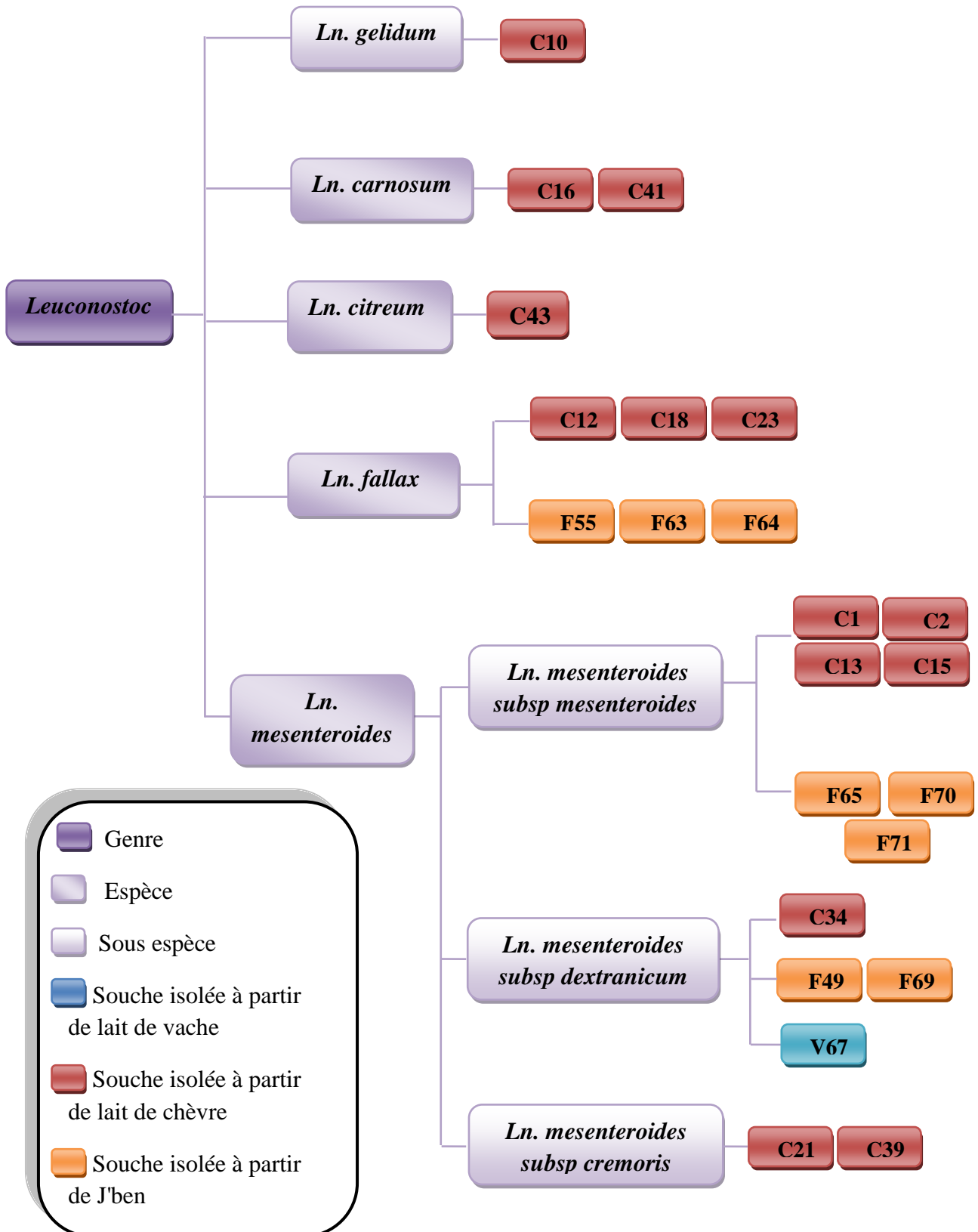


Figure 18: Répartition finale des espèces selon les résultats des différents tests effectués

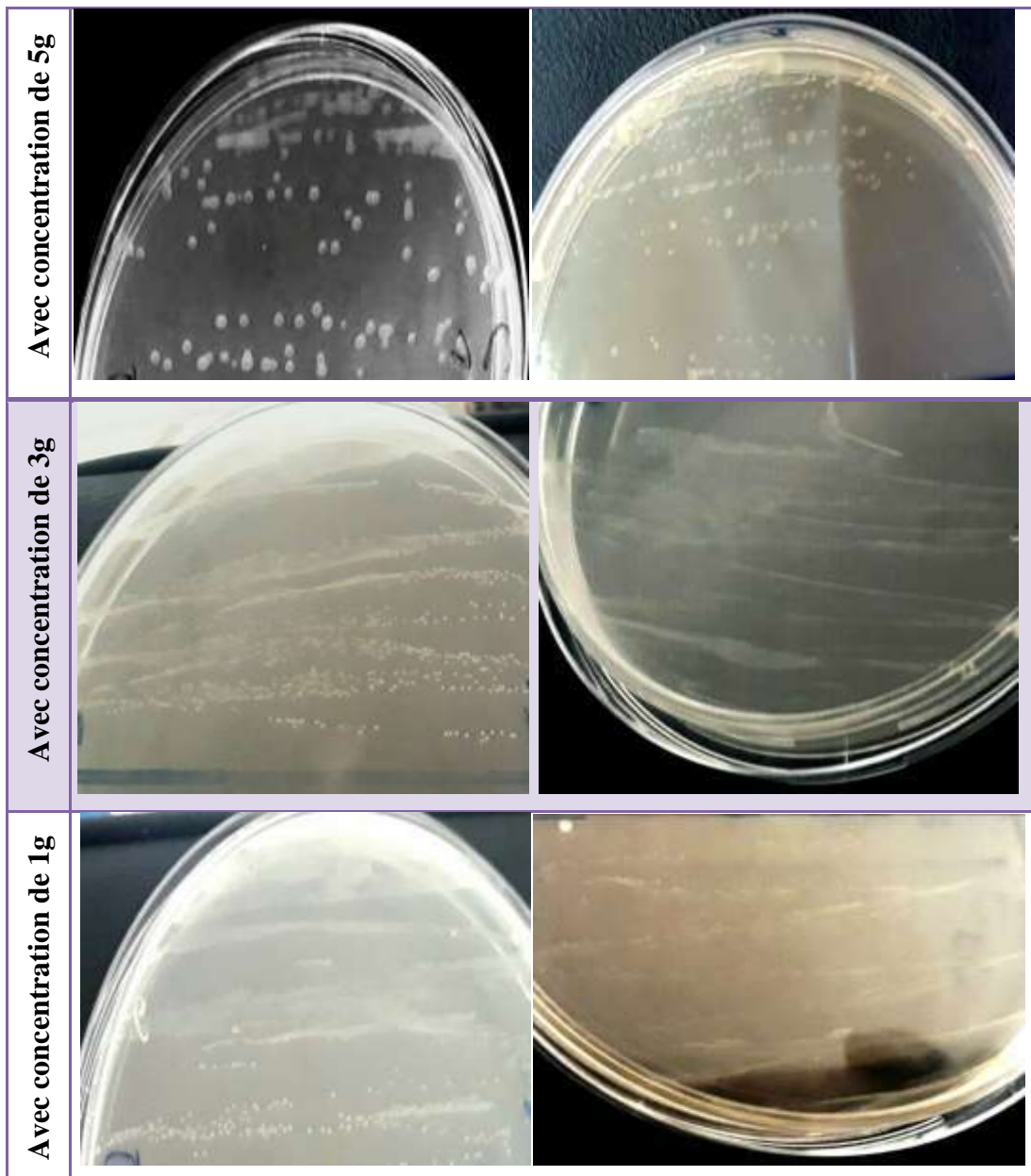
II.7. Caractérisation de dextrane

II.7.1. Optimisation de la production d'exopolysaccharide

Après 48h d'incubation à 30C°, dans le milieu MSE et MSE à différentes concentration de glucose et d'extrait de levure. Des variations de croissance et de production de dextrane est présentée dans les tableaux et les **figures 19-20** suivants:

II.7.1.1. Effet de différentes concentrations de substrat sur la production de dextrane

A. Différentes concentrations du glucose



Souche C2	Souche C13
-----------	------------

Figure 20: Production de dextrane par l'espèce *Ln. mesenteroides*

à différentes concentrations du glucose sur milieu MSE

B. Différentes concentrations d'extrait de levure

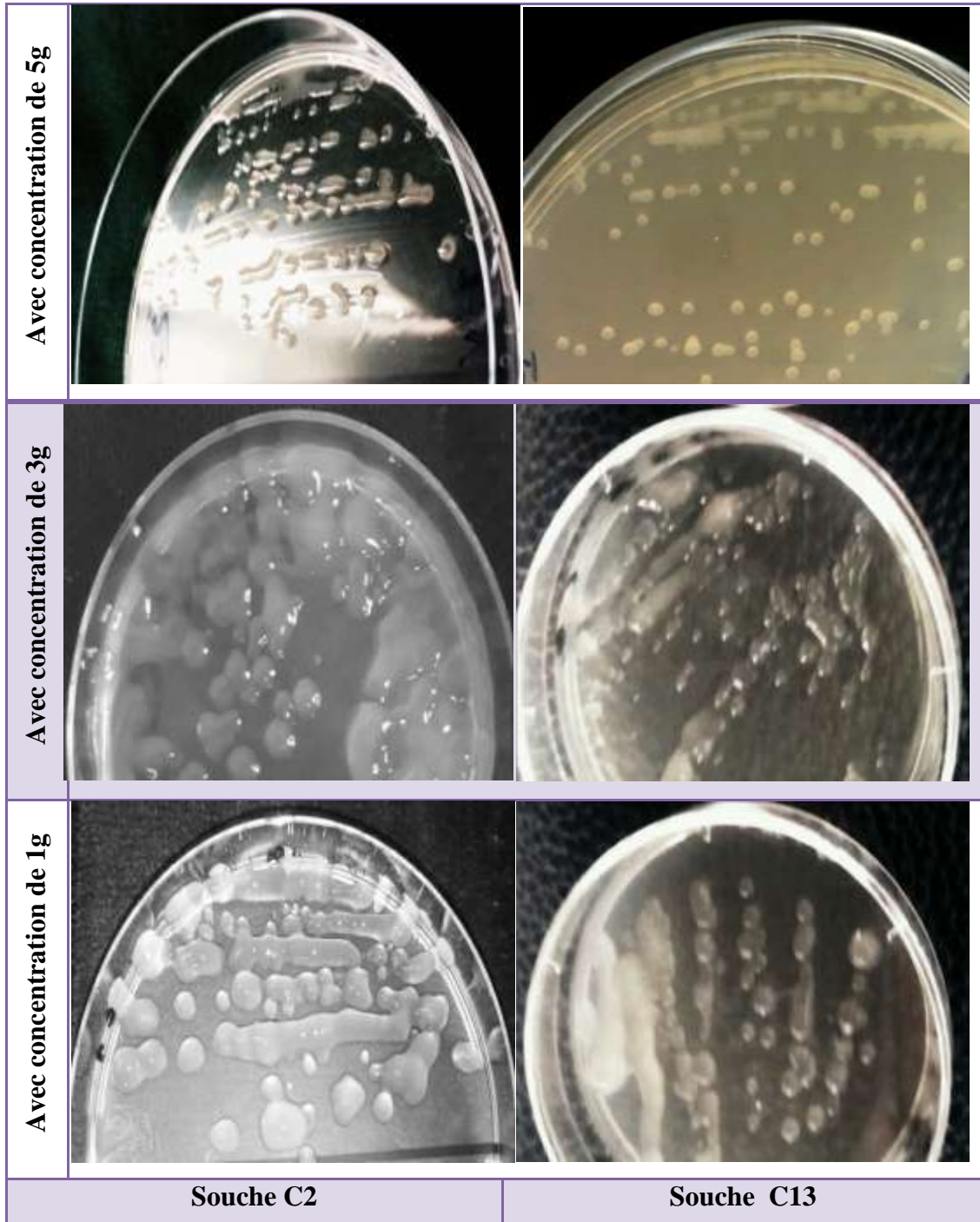


Figure 20: Production de dextrane par l'espèce *Ln. mesenteroides* à différentes concentrations d'extrait de levure sur milieu MSE

Tableau (07): Croissance des souches de *Leuconostoc* dans le milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure.

Source	Code	Milieu référentielle MSE	Glucose		Extrait de levure	
			1g	3g	1g	3g
lait de chèvre	C1	+	-	-	+	+
	C2	+	+	+	+	+
	C10	+	-	-	+	+
	C12	+	-	-	-	-
	C13	+	+	+	+	+
	C15	-	-	-	+	-
	C16	-	-	-	+	+
	C18	-	-	-	+	+
	C21	+	-	-	+	+
	C23	+	-	-	+	+
	C34	+	-	-	+	+
	C39	+	+	+	+	+
	C41	+	+	+	+	+
	C43	+	+	+	+	+
J'ben	F49	+	-	-	+	-
	F55	+	+	+	+	+
	F63	+	-	-	+	-
	F64	+	-	-	+	-
	F65	+	-	+	-	-
	F69	+	-	-	+	-
	F70	+	+	+	+	+
	F71	+	+	+	+	+
Lait de vache	V67	+	+	+	+	+

(+) résultat positif ou croissance

(-) résultat négatif ou pas de croissance

Le tableau montre que la plupart des souches ont pu se développer dans le milieu MSE et MSE à différentes concentrations d'extrait de levure, et ne peuvent pas de se croître dans le milieu MSE à différentes concentrations en glucose (1 et 3 g/l) à l'exception de neuf souches qui semblaient positif dans le tableau(07).

Tableau (08): Production d'EPS par des souches de *Leuconostoc* dans le milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure.

Source	Code	Milieu référentielle MSE	Glucose		Extrait de levure	
			1g	3g	1g	3g
lait de chèvre	C1	+	-	-	+	+
	C2	+	-	-	+	+
	C10	+	-	-	+	+
	C12	+	-	-	-	-
	C13	+	-	-	+	+
	C15	-	-	-	+	-
	C16	-	-	-	+	+
	C18	-	-	-	+	+
	C21	-	-	-	-	-
	C23	-	-	-	+	+
	C34	-	-	-	+	+
	C39	-	-	-	-	-
	C41	-	-	-	+	+
	C43	-	-	-	-	-
	J'ben	F49	-	-	-	+
F55		-	-	-	+	-
F63		-	-	-	+	-
F64		+	-	-	+	-
F65		+	-	+	-	-
F69		-	-	-	+	-
F70		-	-	-	+	+
F71		-	-	-	+	+
Lait de vache	V67	-	-	-	+	+

- ◆ (+) Fortement productrices, possédant des colonies grandes, gélatineuses d'aspect liquide.
- ◆ (+) Production moyenne, possédant des colonies gluantes de forme moyenne et d'aspect rigide liées fortement à l'agar.
- ◆ (+) Basse production, petites colonies 2 mm environ de diamètre, bombées et adhérent fortement à la surface de la gélose.
- ◆ (-) Non productrice, possédant des colonies blanches, petites et lenticulaires, ou pas de croissance du tout.

Selon les résultats obtenu, des niveaux de production variables avec des forme différentes ont été détectés:

- ◆ Les souches fortement productrice, possédant des colonies grandes, gélatineuses d'aspect liquide, dans le milieu MSE 1g El: **C2, C13, C23, V67**
- ◆ Les souches à Production moyenne, possédant des colonies gluantes de forme moyenne et d'aspect rigide liées fortement à l'agar, sur milieu MSE 4 souches; 4 souches sur MSE 1g El et 6 sur milieu MSE 3g El.
- ◆ Des souche à basse production, petites colonies 2 mm environ de diamètre, bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.Ce niveau de production est observé chez 07 souches (**C15, C41, F49, F55, F63, F69 et F70**) dans tous les milieux avec souche différentes
- ◆ Les souches non productrice, possédant des colonies blanches, petites et lenticulaires, ou pas de croissance du tout, les trois souches Mentionné précédemment (**C21, C39, C43**), et certains dans le milieu MSE et tous les souches dans le milieu MSE 1et 3 g de Glu à l'exception de souches F65 qui produit le dextrane sur MSE à 3g Glu.

Ces résultats nous ont permet de sélectionner parmi toutes les souches de *Leuconostoc* étudiées, les cinq souches (**C2, C10, C12, C13, V67**) pour la suite de notre travail. Le choix de ces souches est justifié par leur bonne aptitude à produire les EPS sur milieu MSE comme montré dans le tableau (08).

C. Différents concentrations de saccharose

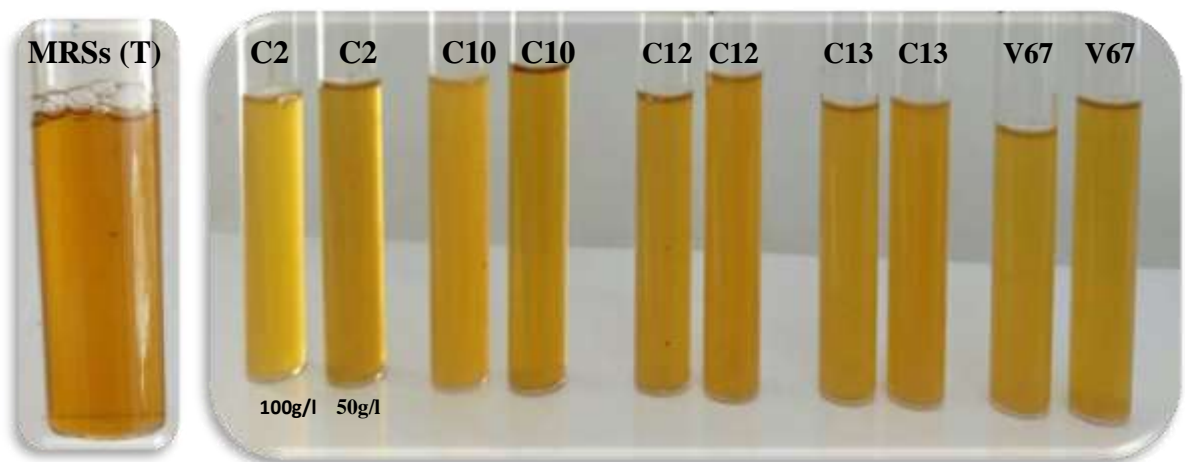


Figure (21): Production de dextrane par *Leuconostoc* à différentes concentrations de saccharose sur milieu MRSs



Figure (22): Aspect visqueuse de milieu liquide MRSs après production EPS par souche *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*

Après 72h d'incubation à 30°C sur milieu MRS additionnée des différents concentrations de saccharose 50 et 100 g/l. on observe un changement de couleur et de viscosité de milieu qui retourne à la production d'EPS (dextrane) par les souchesensemencées.

C.1. Extraction et Quantification de dextrane

Après cette étude qualitative de la production d'EPS sur différent milieux, un dosage des EPS produits par nos souches sur milieu liquide a été réalisé afin de quantifier la quantité d'EPS produite.



Figure (23): Aspect de dextrane produit par *Leucouostoc* après l'extraction à partir de milieu MRSs

Après précipitation à l'éthanol, le dextrane a été obtenu sous deux formes. L'un a été obtenu sous une forme gélatineuse de couleur jaune blanchâtre. C'était plutôt collant et avait une grande élasticité. L'autre a été obtenu sous forme de poudre ou amorphe, ne présentant propriété viscoélastique. C'était blanc pur. Et pour déterminer la quantité exacte de cette extrait nous passons vers une étape de dosage, qui donne les résultats suivants (**Figure (24)**)

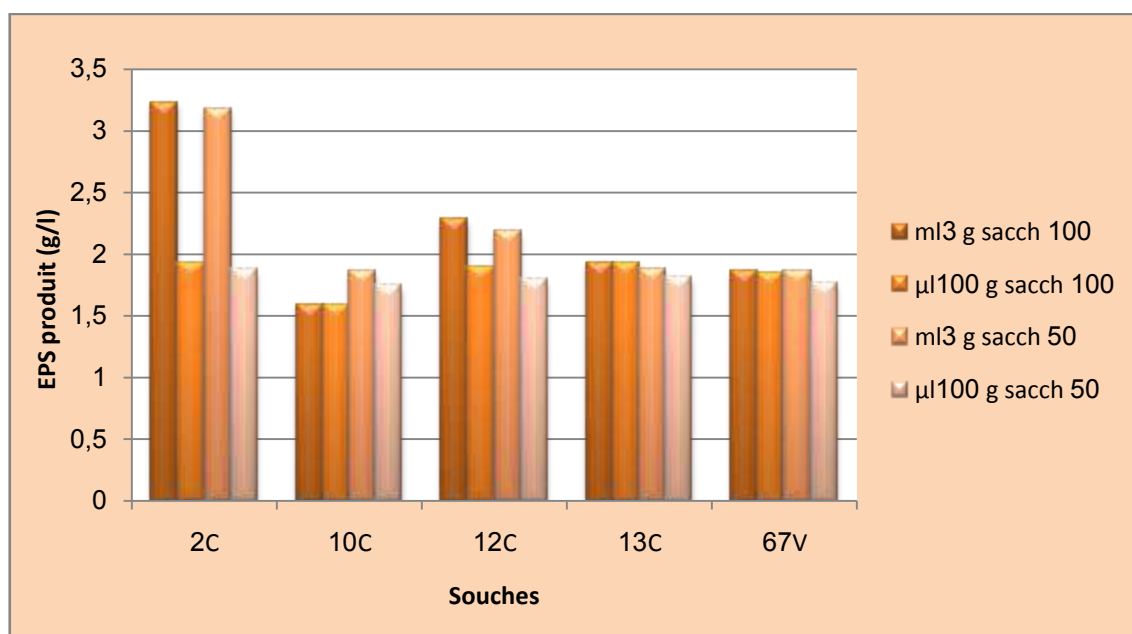


Figure (24): variation de taux de production de dextrane par les souches de *Leuconostc* en fonction des différentes concentrations de saccharose et de volume d'inoculum.

En utilisant diverses concentrations de saccharose, la production maximale a été observée à une concentration de saccharose de 10% et un volume d'inoculum de 3ml pour tous les souches sauf C10 qui montrer une production maximale dans la concentration 5%. La différence entre les quantités de EPS produit dans les deux concentration est presque égale (la différence est environ 0,05 à 0,1) chez la plupart des souches testées.

Discussion générale de l'optimisation:

Les EPS provenant de micro-organismes de qualité alimentaire tels que LAB ont un potentiel en tant qu'ingrédients alimentaires ou en tant que molécule produite in situ, avec une fonctionnalité pour la santé et des avantages économiques. La production

d'EPS par les souches productrices varie énormément et dépend de la phase de croissance et des conditions de culture des bactéries, de la composition du milieu (source de carbone et d'azote), du pH et de la température (**De VUYST et DEGEEST 1999; PETRY et al., 2000**). la production d'EPS peut être optimisée sous certaines conditions 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**).

1- Effet de Glucose

L'effet de la concentration en glucides a été vérifiés en utilisant différentes concentrations de glucose dans le milieu MSE, à savoir **1g, 3g et 5g/l**. la production des EPS a été obtenu à **5g/l** de glucose avec un niveau de production moyenne se traduit par des colonies gluantes de forme moyenne.

Selon **ESCALANTE et al., (1998); De VUYST et DEGEEST, (1999); BOELS et al., (2001); LEVANDER et al., (2002)**, la biosynthèse des EPS étant liée au métabolisme primaire des glucides des cellules productrices, la production devrait avoir lieu au cours de consommation active de sucre, car nécessite un grand nombre de sucres nucléotidiques activés, de l'énergie nécessaire à la construction des unités récurrentes, à la polymérisation et à la translocation transmembranaire.

Il a été démontré que la production de EPS était liée à la croissance. Plusieurs facteurs influencent sur la croissance et production d'EPS, en particulier composition moyenne (**De VUYST et DEGEEST 1999; DUBOC et MOLLET, 2001**): présence d'hydrolysolat de caséine (**CEMING et al. 1986**), co-cultures (**CEMING et al. 1990**) et quantité de glucose (**CEMING et al, 1994**).

La quantité d'EPS produite peut varier considérablement d'une souche de bactérie lactique à l'autre (**BOUZAR et al., 1997**). Les travaux du **YUKSEKDAG et ASLIM (2008); SANCHEZ et al., (2006)** ont également montré que la production des EPS par *Leuconostoc* dépend de la source de carbone et de sa concentration dans le milieu. Le glucose a été démontré la meilleure source de carbone pour la production des EPS par les souches étudiées, puis vient le lactose par rapport au fructose pour des densités égales en cellules.

En effet, les résultats rapportés par **YUKSEKDAG et ASLIM (2008); VAMANU et al., (2010)** ont indiqué que la production des EPS et la croissance ont été stimulées par la concentration élevée en glucose (**30g/l**) et ceux de **CEMING et al., (1994)** et **GAMAR et al., (1997)** ont plutôt mis en évidence en plus du type de sucre (

glucose, galactose, lactose etc.) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production. A l'instar de nos résultats obtenus avec le milieu MES de concentration 5g de glucose.

Ensuite, nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **HENNANE et KARI (2012)** ont montré que la plus grande quantité d'EPS synthétisés a été de l'ordre de **959 mg/l** obtenue à une concentration le plus élevée de Glu (**20%**), et par **BENASLA en (2012)** une maximum production d'EPS (**157.5 mg/l**) est obtenue toujours avec la concentration croissante de glu (**40%**) qui stimule la bonne production d'EPS.

Dans cette notre étude, la production de dextrane avec le milieu contenant de concentration **5g** de glucose a été plus élevée qu'avec **3 g** et **1g** de glucose, c'est-à-dire la concentration optimale de glucose dans milieu MSE pour une production maximale de dextrane est de l'ordre de **5g** sous les conditions de l'étude à savoir milieu **MSE**, température de 30 °C, durée de 48h et un pH non contrôlé (pH initial de 6,5) .

LOOIJESTEIJN et al., (2001) ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactéries lactiques, les résultats peuvent être différents. On a pu identifier des souches productrices d'EPS (voire très fortement) et des souches non productrices sans que ce caractère n'engendre des disparités de croissance, ce qui explique les résultats obtenus dans les concentrations **1g** et **3g** de Glu , il n'ya pas de croissance et de production pour la plupart des souches ou un mal croissance sans production des EPS chez les souches (**C2, C39, C41,C43, F55, F65, F70, F71, V67**). **NANCI et al., (2005)** ils ont été montré que l'utilisation de chaque sucre est directement liée au mécanisme de transport du sucre correspondant .Le fructose est principalement utilisé dans la production de la biomasse et le métabolisme énergétique tandis que le glucose est plutôt orienté vers le métabolisme énergétique ou la synthèse d'EPS (**DRIDER et PREVOST, 2009**).

2- Effet de L'extrait de levure

les composants des milieux complexes, comme le peptone ou l'extrait de boeuf ou de levure, permettent une bonne croissance des LAB et souvent même une bonne production d'EPS (**KIMMEL et ROBERTS, 1998; TORINO et al. 2000**).

L'effet de la source d'azote et de vitamine a été étudié par l'utilisation de différentes concentration d'extrait de levure dans le milieu MSE, à savoir **1g, 3g et 5g** et comme l'azote n'est requis que pour la croissance de l'organisme, **0,1%** d'extrait de levure s'est avéré adéquat pour la production d'EPS chez la plupart des souches avec des niveaux de production variable ont été détectés par des formes différentes, à

l'exception la souche **F65** qui ne produisent que dans un concentration de **5g** avec un niveau de production bas.

Les travaux du **CERNING et al.,(1990)**; **LAWS et al., (2001)**; **WELMAN et MADDOX,(2003)** ont également montré que la plupart des espèces de *Leuconostoc* sont auxotrophes, car elles sont incapables de produire des acides aminés et des vitamines. C'est pour celà les différents milieux de culture ont été employés à l'étude de la production qualitative et quantitative de dextrane et de déterminer l'influence des nutriments sur la croissance des souches productrices et sur la biosynthèse et la génétique des dextrans.

ZAROOUR et al.,(2013) Ont conclu que la croissance de *Leuconostoc* est influencée par l'addition d'extrait de levure dont leur développement est stimulé par l'addition de ce facteur de croissance, car la principale propriété recherchée chez les bactéries lactiques, utilisées en tant que levains en industrie alimentaire, est leur capacité à acidifier le lait et à se développer de façon régulière. Dans le lait, elles doivent trouver un certain nombre de nutriments nécessaires à leur croissance et en particulier, les acides aminés et les vitamines qui peuvent être fournis par l'extrait de levure. ces résultats sont conformes avec les travaux rapportés par **ACCOLAS et al., (1980)** ; **DESMAZAUD, (1983)** ; **KIHAL, (1996)** ; **GARAULT et al., (2001)** ; **KIHAL et al., (2006)**.

Pour les LAB mésophiles, des conditions de culture comme la température, le pH ou la composition du milieu peuvent permettre de découpler la croissance cellulaire de la production d'EPS (**LOOIJESTEIJN et HUGENHOLTZ, 1999**). La production d'EPS peut être augmentée en appliquant les conditions environnementales stimulant la biosynthèse d'EPS une fois qu'assez de biomasse est formée (**DEGEEST et al. 2001a**) et d'après **CERNING et al., (1994)**, le rendement total de production des EPS par *Leuconostoc* dépend de la composition du milieu et des conditions dans lesquelles elle se développe. En effet, **KOJIC et al ., (1992)** ont montré que le maximale quantité des dextrans a été produises par *Leuconostoc* mésophile sous des conditions sub-optimales. De **VUYST et al., (2001)** on soutient que, le taux de production de dextrane est indépendant de la croissance bactérienne. De même, **De VUYST et DEGEEST (1999b)** pour *Leuconostoc*, il semble plutôt qu'un équilibre optimal entre la source de carbone et d'azote soit nécessaire pour obtenir des productions élevées d'EPS.

3- Effet de saccharose et volume d'inoculum

Le dextrane est un glucane bien connu, produit par les souches *Leuconostoc*. Il n'est produit que lorsqu'ils sont cultivé dans un milieu contenant du saccharose, car le saccharose est le seul inducteur connu de l'enzyme impliquée (MISAKI *et al*, 1980; ROBYT, 1992).

Pour étudier l'effet de se dernier avec le volume d'inoculum sur la production de EPS on ensemencé déverse volume d'inoculum (3ml et 100µl), des souches de *Ln* en concentration différent de saccharose (5% et 10%), la bonne production de dextrane à été obtenu à 10% de saccharose ensemencée par 3ml qui a atteint 3,23 g/l chez C2, 2,28 g/l pour C12, 1,92 g/l chez C13 et 1,86 g/l pour V67. A l'exception de C10 qui donne une production maximale (1,86 g/l), en concentration de 5% de saccharose.

Selon De BELDER (1990), la concentration initiale en saccharose, est l'un des principaux facteurs influençant la sécrétion de dextran-sucrase et la biosynthèse du dextrane.

Nos résultat sont en cohérents avec les travaux de THIYAGARAJAN *et al.*, (2017), ils trouvent que l'activité enzymatique maximale a été observée à une concentration de saccharose de 20%, soit 4,4 DSU / ml / h, et le milieu apparaissait très visqueux, montrant la production maximale de dextrane. Et FARWA *et al.*, (2008), qui montre que *Ln. mesenteroides* CMG713 a produit le maximum de dextrane après 20 heures d'incubation à 30 ° C à concentration de 15% de saccharose.

FARWA *et al.*, (2008) dans leurs travaux remarquent que lorsque la concentration de saccharose est plus de 20% (25%) y avait une diminution du pourcentage de conversion du saccharose en dextrane, ce qui finit par affecter le rendement. Peut-être une concentration plus élevée de saccharose dans le milieu de fermentation a-t-elle un effet inhibiteur, appelé effet inhibiteur de substrat, qui diminue la production de dextrane (MARTINEZ-ESPINDOLA *et al.*, 1985), ce qui explique les résultat par la souche C10 ou la production en 10% de saccharose et moins que 5%. Des observations similaires ont également été rapportées par KIM *et al.*, (2003). Ils ont étudié les effets de la concentration en saccharose, du pH et de la température sur le rendement en dextrane par une souche mutante de *Ln. mesenteroides* B512 FMCM. L'augmentation de la concentration en saccharose (0,5 à 5,0%) a entraîné une augmentation du rendement en dextrane (HEHRE et SUGG, 1942) Plusieurs études détaillées sur les effets d'une concentration élevée de saccharose ont révélé que des rendements plus élevés en dextrane de haut poids moléculaire étaient obtenus à des concentrations élevées en saccharose (TSUCHIYA *et al.*, 1995; ALSOP, 1983).

Concernant l'effet de volume d'inoculum **SIDDHARTH et al.,(2017)** dans leurs étude sur les EPS trouvent que le rendement en EPS a augmenté progressivement avec l'augmentation de volume de l'inoculum.

Dans notre étude, le taux maximal de production des EPS est obtenu sur le milieu MSE à **1g** d'extrait de levure et plus précisément chez les souches (**C2, C13, C23, V67**), et sur milieu MRS à **0,1%** d'extrait de levure, **10%** de saccharose, inoculer de **3 ml** de pré-culture qui atteint **3,23 g/l** de souche **C2** appartient à l'espèce *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*.

Conclusión

Conclusion

Les bactéries lactiques est un groupe de bactérie non pathogène, utilisé dans l'industrie agroalimentaire de puis très longue temps à cause de leur caractères technologiques tel que le pouvoir acidifiant, la production de substance inhibitrices, les substances aromatiques et le pouvoir d'améliorer les caractères organoleptique du produit final par la production de dextrane.

Parmi les bactéries lactiques on cite le genre *Leuconostoc*, qui regroupe des espèces hétérofermentaire dont la capacité de produire des bactériocines qui cible les bactéries pathogènes tel que *Listeria*.

Ainsi le pouvoir acidifiant et la production de CO₂ à partir la dégradation des sucres, qui a le rôle de former des trous dans quelques types de fromage.

La plupart des espèces de genre *Leuconostoc* ont le pouvoir de produire le dextrane à partir du saccharose en présence de glucose.

Ce travail nous a permet d'isoler et identifier 23 souches de *Leuconostoc* à partir différents produits laitiers (lait de chèvre, lait de vache et J'ben), qui ont été sélectionnées de 155 isolats.

L'identification phénotypique des 23 souches a montré qu'elles appartiennent aux espèces suivantes:

- ✚ *Ln. gelidum*: C10 isolé de lait de chèvre.
- ✚ *Ln. carnosum*: C16 et C41, isolé de lait de chèvre.
- ✚ *Ln. citreum*: C43, isolé de lait de chèvre.
- ✚ *Ln. fallax*: C12, C18 et C23, isolé de lait de chèvre.
- ✚ *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*: C1, C2, C13 et C15 isoler de lait de chèvre et F65, F70, F71 isoler de J'ben
- ✚ *Ln. mesenteroides subsp dextranicum*: C34, isoler de lait de chèvre, F49, F69, isoler de J'ben et V67 isoler de lait de vache.
- ✚ *Ln. mesenteroides subsp cremoris*: C21 et C39, isolé de lait de chèvre.

20 souches ont la capacité de produire le dextrane à partir de saccharose. La caractérisation du dextrane en utilisant différentes concentrations de glucose et de l'extrait de levure (0,1%, 0,3%, 0,5%), à montré que la concentration optimale de glucose pour la production dextrane est 0,5% et la concentration optimal d'extrait de levure est 0,1% pour la plupart des isolats, qui nous a permet d'optimisé un milieu de culture favorise une production optimale de dextrane.

La quantification de dextrane pour 5 souches sélectionnés (C2, C10, C12, C13, V67) sur le milieu optimal en changeant la concentration de saccharose (5%, 10%) et volume d'inoculum de 3ml a montré que la plus grande quantité de dextrane synthétisés a été de l'ordre de 3,23g/l par la souches C2 d'espèces *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, isoler à partir de lait de chèvre obtenu en concentration 0,1% de EL, 0,5% de Glu, 10% de Saccharose, sous les condition d'étude à savoir milieu MRS, température de 30°C, durée 72h et un pH non contrôlé (pH initial de 6,5).

Nous avons également observé, d'une part, que la production est plus importante sous des conditions de croissance sub-optimales (0,1% EL). En effet, la synthèse des EPS est indépendante de la croissance cellulaire et une compétition entre la production de biomasse cellulaire et la production d'EPS est notable.

Perspectives :

- ✓ L'isolement des souches étudiée doit être fait à partir d'un nombre plus d'échantillon et pour déterminer mieux ces isolats il est nécessaire de faire une Identification moléculaire;
- ✓ La comparaison des résultats de l'optimisation de production de dextrane de ces espèces avec d'autres espèces productrices;
- ✓ Cette étude soit reprise en utilisant les conditions optimales obtenues avec autre conditions comme le pH et la température;
- ✓ Utiliser des techniques plus raffinées dans la purification telles que la Chromatographie sur gel avec une colonne de Sephadex G-100 et l'application de dextrane produit dans la production de certains aliments comme le pain, yaourt et aussi la coagulation de plasma.

Références bibliographiques

A

ACCOLAS, J.P., Veaux, M. et AUCLAIR, J., 1980 : Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pate cuite. *Le lait*. 51, PP 249- 272.

ALSOP RM., 1983. Progress in Industrial Microbiology. Vol 18.Royaume-Uni. Elsevier; PP 1–43.

AMAN, A., SIDDIQUI, N. N., et QADER, S. A. U., 2012. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), PP 910-915.

ANDRE, E et JEAN-CLAUDE, G., 2006. Le fromage, de la science à l'assurance-qualité. *TEC et DOC, Lavoisier*. Chap.10 « les phénomènes microbiens par C. choisy, Desmazeaud, Gueguen, Lenoir, Schmidt, Tourneur».

B

BADIS, A., GUETARNI, D., KIHAL, M. et OUZROUT, R., 2005.Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, 23, PP 30-37.

BADIS, A., GUETARNIB, D., MOUSSA BOUDJEMAA, B., HENNI, D.E., et KIHAL, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21, PP 579–588.

BALIARDA, A., 2003. *Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres Pediococcus et Tetragenococcus approches physiologiques et génétiques*. Thèse doctorat. Université Bordeaux 1. P 394.

BAUER, R. et DICKS, L. M., (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* 101: 201-216.

BEKHOUCHE, F., 2006. *Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase*. These de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie. Université de Mentouri Constantine, P 22.

BENASLA ,A., 2012. *Production d'exopolysaccharides Par Des Souches De Lactobacilles.* Thèse de doctorat en Biotechnologie. Uni. d'Oran, P16-80.

BENAZZOUZ, D., 2012. *Isolement et caractérisation des bacteries lactiques productrices d'arômes (diacétyle).* Ecole nationale supérieure d'Agronomie EL-Harrach Alger P13.

BHAVANI, A. L., et NISHA, J.,2010. Dextran - the polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharmacology & Biotechnological Sciences, 1(4)*, PP 569-573.

BJÖRKROTH, J. et HOLZAPFEL, W., 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria.* Springer New York. 4, PP 267-319.

BOELS, IC., Van KRANENBURG, R., HUGENHOLTZ, J., KLEEREBEZEM, M. et De VOS WM., 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J. 11*, PP 723-732.

BOUMEDIENE, K., 2013. *Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes.* Memoire en vue de l'obtention du diplôme de *Magister en Biologie.* Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, PP 30-38.

BOUREL, G., HENNI, S., KRANTAR, K., ORABY, M., DIVIES, C., GARMYN, D., 2001. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Le lait 81*; PP 75-82.

BOUZAR, F., CEMING, J. et DESMAZEAUD, M., 1997. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *J. Dairy Sci. 80*, PP 2310-2317.

C

CARR F.J., HILL D., MAID N., 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol. 28*, PP 281-370.

CEMING, J., BOUILLANNE, C., DESMAZEAUD MJ. et LANDON M., 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett. 8*, PP 625-628.

CEMING, J., BOUILLANNE, C., LANDON, M. et DESMAZEAUD, MJ., 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic acid bacteria. *Science des Aliments 10*, PP 443-451.

CEMING, J., RENARD, CMGC., THIBAUT, JF., BOUILLANNE, C., LANDON, M., DESMAZEAUD, MJ. et TOPISIROVIC L., 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG 11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, PP 3914-3919.

CHAKOU, R. et BESSEDIK, K., 2018. *Etude de quelques caractères technologiques des souches de Leuconostoc isolées à partir du lait de chèvre et de chamelle.* Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique en microbiologie appliquée. Uni Kasdi Merbah- Ouargla P30.

COGAN, T. M., 2002. Improving Cheddar cheese flavour by microbiological way. *26th International Dairy Congress, Paris, France.*

Conseil National des Appellations d'Origine laitières, 2011. Microflore du lait cru Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. *Ouvrage collectif réalisé dans le cadre du RMT « Filières fromagères valorisant leur terroir »* P19.

COTE G.L. et ROBYT J.F., 1983. The formation of α -D-(1 ~ 3) branch linkages by an exocellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742. *Carbohydr. Res.*, 119, PP 141-156.

COVIS, R., 2011. *Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses.* Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine Spécialité : Génie des procédés et des produits P36.

D

De AMBROSINI, V.M., GONZALEZ, S., PERDIGON, G., De RUIZ HOLGADO, A.P. et OLIVER, G., 1996. Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem pharm Bull* 44, PP 2263-2267.

De BELDER, AN., 1990. Dextran. *Pharmacia LEO Therapeutics, Uppsala, Sweden.*

De ROISSARD, H.B. et LUQUET, 1994. F.M. Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. VOL. bactéries lactiques (tome 1), *Ed. Iorica. France* PP 25-204.

- De VUYST, L. et DEGEEST, B., 1999.** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbial. Rev.* 23, PP 153-177.
- De VUYST, L., De YIN, F., VANINGELGEM, F. et DEGEEST, B., 2001.** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, PP 687-707.
- De VUYST, L., DEGEEST, B., 1999b.** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23, PP 153-177.
- DEGEEST, B., VANINGELGEM, F., LAWS, A.P., DE VUYST, L., 2001a.** UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase activity indicates the presence of N-acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains. *Appl Environ Microbiol* 67; PP 3976-3984.
- DELLAGLIO, FE., DE ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M-C., JANSSENS, D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans : H. de Lcoissart & F. M. Luquet. Eds. *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques, vol 1*, PP 25-116.
- DESMAZAUD, M.J., 1983.** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait.* 63, PP 267-316.
- DESMAZEAUD, M., 1992.** Les bactéries lactiques in Hernier, J., Lenoir, J. et Webert , Les groupes microbiens d'intérêt laitier. *Lavoisier.* PP 9-57.
- DEVOYOD, J.J. et POULLAIN, F ., 1988 .** Les *Leuconostocs* Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68 (3), PP 249-279.
- DHOUB, A., 2017.** Mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique par quelques bactéries lactiques isolées de lait de brebis. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de master académique en Analyses Biologiques et Biochimiques, P 30.
- DIRK, B., 2002.** Production d'exopolysaccharides par Fermentation avec des cellules Immobilisées de *lb. Rhamnosus rw-9595m* d'un milieu à base de perméat de Lactosérum. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.). Faculté des études supérieures de l'Université Laval.
- DOLS, M., 1996.** Etude de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B- 1299 production et application à la synthèse d'oligosides. Thèse de doctorat en Biologie et génétique moléculaires et cellulaires. *Biotechnologie, Toulouse, INSA P1.*

DORTU, C. et THONART, P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques and interest pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société and Environnement*, 13(1), PP 143-154.

DRIDER, D. et PREVOST, H., 2009. Bactéries lactiques. Edition : *Economica. Paris*, PP 73- 97.

DUBOC, P. et MOLLET, B., 2001. Applications of exopolysaccharides inthe dairy industry. *Int. Dairy J.* 11, PP 759-768.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., et SMITH, F., 1956. Colorimandric mandhods for dandermination of sugars and related substances. *Analytical. Chemistry.*, 28(3), PP 350-356.

E

ENDO, A., et OKADA, S., 2008. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2195-2205.

ESCALANTE, A., WACHER-RODARTE, C., GARCIA-GARIBAY, M. et FARRES, A., 1998. Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbial.* 84, PP 108-114.

EUROPEAN COMMISSION, 2000. Opinion of the scientific committee on food on a dextran preparation, produced using *Leuconostoc mesenteroides*, *saccharomyces cerevisiae* and *lactobacillus* spp, as a novel food ingredient in bakery products. P2.

F

FARWA, S., SHAH, A Q., AFSHEEN, A. et NUZHAT, A., 2008. Production et Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.*, 4, PP 379-386.

FLOREZ GUZMAN, G Y., HURTADO, G B. et AMPARO OSPINA, S., 2018. New dextransucrase purification process of the enzyme produced by *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2.98 based on binding product and dextransase hydrolysis. *Journal of Biotechnology* 265, PP 8–14.

FOUCAUD, C., FRANCOIS, A., et RICHARD, J., 1997. Development of a chemically defined medium for the growth of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), PP 301-304.

G

GAMAR, L., BLONDEAU, K., SIMONET, J. M., 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*. 83, PP 281-287.

GARAULT, P., LETORT, C., JUILLARD, V. et MONNET, V., 2001. La biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée et des purines : deux voies essentielles pour une croissance optimale de *Streptococcus thermophilus* dans le lait. *Lait* 81, PP 83-90

GARRIDO, F., MICHEL, C. et MORIN, D., 2002. Les exopolymères bactériens. *Edition: BRGM. France*, PP 20-40.

GARRY P., 1999. Les bactéries lactiques. *Bull. liaison CTSCCV*, 9, N°6, PP 426-430.

GARVIE, E.I., 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.*, 16, PP 147-178.

GARVIE, E.I., 1986. Gram positive cocci- Genus *Leuconostoc*. *In: Bergey's Manual, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore*, PP 1071-1075.

GILAROVA, R., VOLDRICH, M., DEMNEROVA, K., CEROVSKY, M., GOLDBERG, M., FESSENDEN, J.M. et RACKER, E., 1994. Phosphoketolase. *Method Enzymol.*,9, PP 515-520.

GUANGBIN Ye, GENLIANG Li, CHANGLI W, Bo LING, RUIRUI Y et SUOYI H, 2019. Extraction and characterization of dextran from *Leuconostoc pseudomesenteroides* YB-2 isolated from mango juice. *Carbohydrate Polymers* 207, PP 218–223.

GUESSAS, B. et KIHAL, M., 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone: raw goats'milk. *African Journal of biotechnology*. 3(6), PP 339-342.

GUESSAS, B., 2006. *Potentialité métabolique des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrol des Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat d'Etat, Université d'Oran Algérie.

GUIRAUD, J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod Paris, P652.

GUIRAUD, J.P., 2003. Microbiologie alimentaire. Dunod-RIA. P 696.

GURTLER, V. et MAYALL, B.C., 2001. Genomic approaches to typing taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51, PP 3-16.

H

HAMMES, W.P. et HERTEL, C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* in Prokaryotes. 4th edition.

HANNACHI, S-S., 2008. *Inhibition des bacteries indésirables par l'activité antimicrobienne des espèces de Leuconostoc isolées du lait cru de chèvre.* Mémoire de magister en microbiologie fondamental et appliquée. Uni. Oran-Es-Sénia. P 7.

HANSAL, N., 2015. *Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de Leuconostoc mesenteroides isolé à partir du lait cru de chèvre.* Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme magister en microbiologie fondamentale et appliquée Université d'Oran, P17, 108.

HEHRE, E.J. et SUGG, JY., 1942. Serologically reactive polysaccharides produced through the action of bacterial enzymes: Dextran of *Leuconostoc mesenteroides* from sucrose. *J Exp Med.*, 75, PP 339-353.

HEMME, D et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C., 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, International Dairy Journal* 14, PP 467–494.

HEMME, D., 2012. *Leuconostoc* and its use in dairy technology. In Y. H. Hui & E. Ö. Evranuz (Eds.), *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*, Second Edition *CRC Press*. PP 73-108.

HENNANE, M. et KARI, L., 2013. *Optimisation de la production des exopolysaccharides (EPS) par Lactococcus lactis ssp.lactis DZ en fonction de la source de carbone.* Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Alimentaire et Sanitaire. uni de Béjaia.

HOLL, R. et LIU, Q-S., 2011. *Leuconostoc sp*, Lactic acid bacteria. *Elsevier*, PP 138-142.

HOLZAPFEL W H. et WOOD B J B., 2014. Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy. *John Wiley & Sons, Ltd* , PP 395-400.

HOLZAPFEL, WH., BJORKROTH, J. et DICKS, LM., 2009. Genus I. *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198 emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66AL. In: De Vos P., Garrity GD., Jones NR., Krieg W., Ludwig FA., Rainey K., Schleifer WB. *Whitman (Eds)*.

K

KEMPLER, G. M. et McKAY, L.L., 1980. Improved medium for dandection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacandylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), PP 926-927.

KHEDID, K., FAID, M., MOKHTARI, A., SOULAYMANI, A. et ZINEDINE, A., 2006. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbial.Res.10*, PP 10-16.

KIHAL, M., 1996. *Etude de la production du dioxyde de carbone par Leuconostoc mesenteroides, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu.* Thèse de Doctorat d'Etat. *Université d'Oran Algérie*.

KIHAL, M., HENNI, D.E., PREVOST, E. et DIVIÈS, C., 2006. A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a case of *Leuconostoc mesenteroides*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (4), PP 378-383.

KIHAL, M., PREVOST, H., HENNI, D.E., BENMECHERNENE, Z. et DIVIES, C., 2009. Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroïdes* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *Scientific Research and Essay* Vol. 4 (11), PP 1348-1353.

KIHAL, M., PREVOST, H., LHOTTE, M.E., HUANG, D.Q. et DIVIES, C., 1996. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22, PP 219–223.

KIM, D. et DAY, D. F., 1994. A new process for the production of clinical dextran by mixed culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, PP 844–848.

KIM, D., ROBYT, JF., LEE, SY., LEE, JH., KIM, YM., 2003. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B512FMCM dextransucrase. *Carbohydr Res*; 338, PP 1183-1189.

KIMMEL, S.A. et ROBERTS, R.F., 1998. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR.

Int. J. Food Microbiol. 40, PP 87–92.

KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C. et REUTER, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria International. *Journal of food Microbiologie*, 41, PP 103-125.

KOJIC, M., VUJCIC, M., BANINA, A., COCCINCELLI, P., CEMING, J., TOPISIROVIC, L., 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(12), PP 4086-4088.

KORAKLI, M. et VOGEL, R. F., 2006. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*., 71(6), PP 790-803.

L

LARPENT, J. P. et LLARPENT, MG., 1990. Memento technique de microbiologie . *Second Ed. Technique et Documentaire Lavoisier*. P 417 .

LAWS, A.P., MARSHALL, V.M., (2001). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with rropy strains of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11: 709-721.

LEATHER, T. D., HAYMAN, G. T. et COTE, G. L., 1995. Rapid screening of *Leuconostoc mesenteroides* mutants for elevated proportions of alternan to dextran. *Current Microbiology*, 31, PP 19–22.

LEES, G.J. et JAGO, G.R., 1976. Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*, 43, 63-73.

LEVANDER, F., SVENSSON, M. et RADSTROM, P., 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, PP 784-790.

LEVEAU, J.Y. et BOUIX, M., 1980. "LA FLORE LACTIQUE", dans "technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaire" .Bourgeois C M, Leveau JY., *A.p r i a. Paris*. PP 3-106.

LEVESQUE, P., 2004. Technique d'échantillonnage du lait pour l'analyse bactériologique. *Institut de technologie agroalimentaire, Fédération des producteurs de lait du Québec*, Association des médecins vétérinaires praticiens du Québec.

LIMSOWTIN, G.K.Y., BROOME, M.C. et POWELL, I.B., 2004. Lactic acid bacteria, taxonomy. In Encyclopedia of Dairy Sciences. Roginski H. *Oxford, Elsevier*, PP 1470-1478.

LIU, S-Q., 2016. Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc spp.* Reference Module in Food Sciences. National University of Singapore, Singapore. *Elsevier Inc.* PP 1-6

LOOIJESTEIJN, P.J., HUGENHOLTZ, J., 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *J Biosci Bioengin* 88, PP 178-182.

LOOIJESTEIJN, P.J., TRAPET, L., DE VRIES, E., ABEE, T., HUGENHOLTZ, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64: 71-80.

M

MAHI, M., 2010. *Etude technologique des bacteries lactiques isolées à partir du lait de brebis*. Mémoire de Magister en microbiologie alimentaire. Uni. d'Oran. P68

MARCHAL, N., BOURDON, J. L. et RICHARD, C., 1991. Les milieux de culture: pour l'isolement and l'identification biochimique des bactéries. *Lavoisier. Paris*.

MARTINEZ-ESPINDOLA, JP., LOPEZ-MUNGUIA, CA., 1985. La cinétique de la synthèse de la dextransucrase et du dextrane dans des réacteurs discontinus. *Biotechnol Lett.*; 7 PP 483-486.

MATAMOROS, S., 2008. *Caractérisation de bacteries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Etude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid.* Thèse de doctorat en Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment Université de NANTES. P1.

MATHOT, A.G., KIHAL, M., PREVOST, H ET DIVIES, C., 1994. Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *Int. J. Dairy*, 4 PP 459-469.

MAURAY, S., De RAUCOURT, E., CHAUBAND, F., MAÏGA-REVEL, O., STERNBERG, C., et FISCHER, A. M., 1998. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 9(4), PP 373-387.

MAYEUX, J.V., SANDINE, W.W.E. et ELLIKER, P.R., 1962 "A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures", *J. Dairy. Sci.*, 45, PP. 655-656.

MC DONALD, L. C., FLEMMING, H. P. et HANSSEN, H. M., 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* P56.

MCLEOD, A., NYQUIST, O. L., SNIPEN, L., NATERSTAD, K. et MEHAIA, M. A., 1995. The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwisenschat*, 50, PP 260-263.

MISAKI, A., TORII, M., SAVAI, T., GOLDSTEIN II., 1980. Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydr Res* 84, PP 273-285.

MONNET, C., LATRILLE, E., BÉAL, C. et CORRIEU, G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques *In* Corrieu, G. et Luquet, F.M., bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc, Lavoisier*. PP 511, 593.

MOOSAVI-NASAB M., ALAHDAD Z. et NAZEMI SH., 2008. Characterization of the Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* from Date Fruit Extract. *Iran Agricultural Research*, No. 1-2, Vol. 27, PP80-85.

N

Nacher-Vazquez, M., Ballesteros, N., Canales, A., Rodriguez Saint-Jean, S., Perez-Priando, S. I., Priando, A., Aznar, R. et Lopez, P., 2015. Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers*, 125, PP292-301.

NAESSENS, M., CERDOBBEL, A., SOANDAERT, W. et VANDAMME, E. J., 2005. *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(8), PP 845-860.

NANCI, B. A., NANCIB, N., MEZIANE-CHERIF, D., BOUBENDIR, A., FICK, M. et BOUDRANT J., 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 96, PP 63–67.

NOVEL, G., 1993. Les bactéries lactiques in "microbiologie industrielle" les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau G.V et Bouix M. *Techniques et documentation Lavoisier. Paris* . PP 171-215.

O

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS, 1998. Demande de brevet européen. Printed by *Xerox (UK) Business Services*.

P

PAPAGIANNI, M., 2012a. Food fermentation and production of biopreservatives. In: Hui, Y. H., & Ozgul, E. E., Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, 2^{ème} Edition CRC Press. US. 6, PP 109-124.

PASTEUR, L., 1861. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bullandin de la Société Chimique de Paris*, 11, PP 30-31.

PEREIRA, AM., COSTA FAA., RODRIGUES, MI. et MAUGERI, F., 1998. In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett.*; 20, PP 397-401.

PÉREZ-RAMOS, A., NÁCHER-VÁZQUEZ, M., NOTARARIGO, S., LÓPEZ, P. et MOHEDANO, M. L., 2015. Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides In V. R. P. a. R. R. Watson (Ed.), *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics (Elsevier Oxford ed.)*. UK.22, PP 329-344.

PETRY, S., FURLAN, S., CREPEAU, MJ., CEMING, J. et DESMAZEAUD, M., 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, PP 3427-3431.

PINCHON, J., 1989. Le fromage de Roquefort. *Options Méditerranéennes*, 6, PP 199-204.

R

RAMDANI, A. et LADJILAT, Z., 2017. *Production et caractérisation du dextrane produit par la souche Leuconostoc mesenteroides isolées à partir des laits de chèvre et de chamelle.* Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme master en microbiologie appliquée. Uni. Kasdi Merbah Ouargla, P45.

REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R.-M., SARÇABAL, P., POTOCKI de MONTALK, G., et MONSAN, P., 2000. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), PP117-128.

ROBYT, J. F., 1985. Dextran. Encyclopedia of Polymer Science. *Wiley-VCH. New York*. 4, PP 753-767.

ROBYT, J.F., WALSETH, T.F., 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. *Carbohyd. Res.*, 61, PP 433-445.

ROBYT, JF., 1992. Structure, biosynthesis, and uses of nonstarch polysaccharides. dextran, alternan, pullulan, and alginate. Tn. Alexander RJ and Zobel HF (eds)

Developments in carbohydrate chemistry. *St Paul, Minnesota, The American Association of Cereal Chemists*. PP 261-292

ROMEO, Y., BOUVIER, J., et GUTIERRE, Z., 2001. La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *lactococcus lactis* et *lactobacillus plantum*. *Lait*. 81, 49-55.

RUIZ-MATUTE, A. I., BROKL, M., SANZ, M. L., SORIA, A. C., CÔTÉ, G. L., COLLINS, M. E., et RASTALL, R. A., 2011. Effect of dextransucrase cellobiose acceptor products on the growth of human gut bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), PP 3693-3700.

S

SÄDE, E., 2011. *Leuconostoc spoilage of refrigerated, packaged foods*. Thèse de Doctorat. University of Helsinki. Faculty of Veterinary Medicine. Finland, P57.

SALMINEN, S., LAHTINEN, S., OUWEHAND, A.C. et WRIGHT, A.V., 2012. Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects. *CRC Press Taylor & Francis Group*. 579.37-dc23, P 3.

SANCHEZ, J.I., 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. *App. Environm. Micro. Vol. 72, N° 12*. P 7495–7502.

SANTOS, VM., 1996. Estudo das condicoes de hidolise acida para obtencao de clinica, cominos. *FEA-Uni CAMP*.

SAVADOGO, A., 2004. *Caractérisation biochimique et :Moléculaire des bactéries Lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina faso*. Doctorat en sciences biologique appliquée spécialité biochimie et biotechnologie P 26.

SCHEIBLER, C., 1874. Investigation on the nature of the gelatinous excrendion (so-called frog's spawn) which is observed in production of beand-sugar juices. *Zeitschrift Fur Versuch-Wesen Deutsche Zucker-Industrie*, 24, PP309–335.

SCHLEIFER, K. H., 2015. Leuconostocaceae fam. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: John Wiley & Sons, Ltd. UK*.

SHAMALA, T. R. et PRASAD, M. S., 1995. Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc spp.* *Process Biochemistry*, 30, PP 237–241.

SIDDHARTH, D., PRADNYA, K., RAMA, B., 2017. Production and characterization of exopolysaccharide from marine moderately Halophilic bacterium *halomonas smyrnensis* svd III. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 9, Issue 10, PP 146-151.

SIL, S., GHOSH, A., et GHOSH, T., 2016. Impairment of blood brain barrier is related with the neuroinflammation induced peripheral immune status in intracerebroventricular colchicines injected rats: An experimental study with mannitol. *Brain Research*, 1646, PP 278-286.

SUTHERLAND, I. W., REH, H. J., REED, G., PUHLER, A. et STADLER, P., 1996. Biotechnology (2nd ed.). *New York: VCH. ISBN: 3-527r-r28310-2.*

SUTHERLAND, I.W., 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* 23 PP 79–150.

T

TANTAOUI-ELARAKI, A. et El MARRAKCHIT, A., 1987. Study of Moroccan dairy products: Iben and smen. *MIRCEN Journal*, 3: 211-220.

THIYAGARAJAN, P., THIRUMALAISAMY, R., THANGASAMY, S., CHINNAPPAN, S., SENGOTTAIYAN, A., PALANISAMY, S., PRIYA, G. et NISHA, JC., 2017. Optimization of dextran production from cabbage waste using *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Advances in Interdisciplinary Research Vol. 4*, PP 24-31.

TORINO, M., VALDEZ, G F. et MOZZI, F., 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology* Volume 6 PP 2-5

TORINO, M.I., SESMA, F., 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. *Milchwissen* 35, PP 314-316.

TSUCHIYA, HM., HELLMAN, NN., KOEPESELL, HJ., CARMAN, J., STRAINGER, CS., ROGOVIN, SP., BAGARD, MO., BRYANT, G., FEGER, VH., HOFFNAN, CA., SENTI FR. et JACKSON, RW., 1995. Facteurs affectant le poids moléculaire du dextran synthétisé enzymatique. *J Amer Chem Soc.*, 77 PP 2412-2419.

U

Ueli Wyss, 2014. Qualité du lait, Du lait, avec plus d'herbe et moins de concentrés. *Institut des sciences production animale. Département fédéral de l'économie, de la formation et de la recherche DEFR Agroscope P3.*

V

VAMANU, E., PELNESCU, D., VAMANU, A., VASSU, T. et CAMPEANU, G., 2010. The identification and the influence of different glucides on the production of exopolysaccharides at the strains *Lactobacillus sp. IL2* and *Lactobacillus sp. IL3*. *Romanian Biotechnological Letters*.15(3), P 7.

VANDTORI, M. H. P. B., BLANCO, K. C., CORTEZI, M., De LIMA, C. J. B. et Contiero, J., 2012. Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. *Diálogos & Ciência*, 31, PP 171-186.

VETTORI, M.H.P.B., FRANCHETTI, S. M. M. et CONTIERO, J., 2012. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextransucrase. *Carbohydrate Polymers* 88 1440–1444.

VIJAYENDRA S.V.N., PALANIVEL G., MAHADEVAMMA S. et THARANATHAN R.N., 2008. Physico-chemical 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, PP 300–307.

W

WELMAN, A. D. et MADDOX, I. S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21, PP 269-274.

X

XU, R., MA, S., WANG, Y., LIU, L. et LI, P., 2010. Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research*. 4(9), PP 783-795.

Y

YUKSEKDAG, ZN. et ASLIM, B., 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (b3, g12) and *Streptococcus thermophilus* (w22). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51 (3), PP 581-585.

Z

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. *Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Uni. d'Oran-Sénia, 31000, Oran, Algérie.* PP 153-156.

ZAROUR, K, BENMECHERNENE, Z, HADADJI, M, MOUSSA-BOUDJEMAA, B., BENHENNI, J-E et KIHAL, K., 2013. Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Revue « Nature & Technologie ».* B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 08 PP 39 - 47

ZAROUR, K., 2018. *Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de Leuconostoc isolées localement.* Thèse de doctorat en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Uni. d'Oran P16-112.

ZAROUR, K., PRIETO, A., PÉREZ- RAMOS, A., KIHAL, M. et LÓPEZ, P., 2018. Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L.mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products. *Journal of Functional Foods* P34.

Annex 01: Milieu de culture**01. Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Polypeptone.....	10g
citrate de sodium.....	2g
acétate de sodium.....	5g
Glucose.....	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.25g
MnSO ₄	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 6.8

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

02. Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	5g
Peptone.....	10g
Acide ascorbique.....	0.5g
Lactose.....	2g
L-arginine.....	4g
Bleu de bromothymol.....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 6.8 / Autoclavage 120°C/20minutes

03. Milieu M17

Tryptone.....	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure.....	2,5g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g

Acide ascorbique0,5g

Agar-agar.....15g

pH 7

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

04. Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone.....20g

Gélatine.....2.5g

Extrait de levure.....5g

Saccharose.....100g

Glucose.....5g

Citrate de sodium.....1g

Azide de sodium.....0.075g

Agar-agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

pH 6.8

Autoclavage 120°C/20minutes

05. Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure.....3g

Biopolytone.....2.5g

Glucose.....5g

Agar-agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

pH 6.8

Autoclavage 121°C/15minutes

06. Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre.....1000ml

Bleu de bromothymol.....0.025ml

pH 7

Autoclavage 120°C/20minutes

07. Eau Physiologique

Chlorure de sodium.....8.5g

Peptone.....0.5g

Eau distillée.....1000ml

pH 7

Autoclavage 120°C/20 min

Annex 02: Matériels utilisé

- Agitateur magnétique à plaque chauffante
- Anse de platine
- Autoclave
- Bain marie
- Barreaux magnétique
- Bec benzen
- Blance
- Boites de pétri
- Centrifugeuse
- Éprouvette
- Erlenmayer
- Etuve
- Four pasteur
- Micropipette
- Microplaquettes
- Mortier
- pH mètre
- Pipettes pasteurs
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre
- Tubes à essai
- Tubes eppendorf
- Tubes sec en plastique
- Tubes sec en verre
- Vortex électrique

Annex 02: Coloration de Gram

But : Permet de distinguer les bactéries Gram+ et Gram- en fonction de la teneur en lipides de la paroi.

Principe : Basé sur la composition chimique de la paroi des bactéries. Le Gram différencie les bactéries selon qu'elles aient conservé le violet de gentiane après le traitement à l'alcool ou non.

Préparation du frottis :

À partir d'un bouillon : Mettre 2 gouttes de suspension bactérienne préalablement émulsionnée au centre d'une lame. Étaler en couche mince au centre de la lame. Faire sécher complètement et fixer à la flamme 3 fois.

À partir d'une gélose :

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- Frotter la colonie dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

Technique de coloration:

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé. laisser agir 1 minute. *Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.*
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de Lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.
- Laisser agir 1 minute et rincer brièvement à l'H₂O comme précédemment décrit
- Décolorer en faisant couler l'*alcool* sur la lame, laisser 10 secondes et Rincer à l'H₂O.
- Contre-colorer en déposant la solution de fushine (rose) pendant 1 minute. Rincer à l'H₂O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement x40 ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement x100).

Annex 03: Les tableaux

Tableau 09: Résumé de l'identification physiologique, biochimique et biotechnologique des souches *Leuconostokes* isolées à partir de différents produits laitiers:

Souches	Tests physiologiques										Tests biochimiques										Tests biotechnologiques							
	Croissance à différentes T°					Croissance à différentes [NaCl] (%)		Croissance à différents pH			Production de CO2	ADH	Test du sucre										Production de substance aromatique	Productrices de dextrane				
	4 °C	10°C	37°C	42°C	63°C/30 min	3%	6.5%	4.8	6.8	9.6			Arabinose	Glucose	Galactose	Lactose	Fructose	Saccharose	Mannitol	Maltose	Xylose	Mannose			Esculine			
C1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
C2	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C10	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	+	+
C12	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
C13	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
C15	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
C16	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+/	+	+	+
C18	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+/	-	-	+
C21	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
C23	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
C34	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C39	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
C41	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
C43	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+/	+	-	-	-
F49	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
F55	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
F63	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
F64	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
F65	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
F69	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
F70	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
F71	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
V67	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) résultat positif

(-) résultat négatif

Tableau 10: Tableau représente des valeurs de A_{490 nm} obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.

[Glucose](mg)	DO
0	0
0,02	0,18
0,025	0,23
0,05	0,5
0,1	0,9
0,15	1,4

Tableau 11: Tableau représente la variation de taux de production de dextrane par les souches de *Leuconostc* en fonction des différentes concentrations de saccharose et volume d'inoculum.

Code de souche	Poids sec (g)		Dosage (g/l)		Poids sec (g)		Dosage (g/l)	
	100g S		100g S		50g S		50g S	
	3ml	100µl	3ml	100µl	3ml	100µl	3ml	100µl
C2	0.54	0.15	3,23	1,92	0.99	0.42	3,18	1,87
C10	0.06	0.06	1,59	1,59	0.65	0.19	1,86	1,74
C12	0.30	0.08	2,28	1,89	0.15	0.04	2,18	1,79
C13	0.21	0.22	1,93	1,92	0.28	0.16	1,88	1,81
V67	0.27	0.16	1,86	1,85	0.21	0.10	1,86	1,77

Résumé

Ce travail nous a permis d'aboutir à isoler 23 souches de *Leuco nostoc* à partir de différents produits laitiers (Lait de chèvre, Lait de vache, J'ben), en utilisant le milieu MRS additionné à la vancomycine. En se basant sur les méthodes microbiologiques et biochimiques classiques (phénotypique) on a identifié les 23 isolats qui appartiennent à 5 espèces: *Ln. gelidium*, *Ln. croum*, *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. mesenteroides* inclue les trois sous espèces (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* et *Ln. mesenteroides subsp cremoris*).

A partir de 23 souches on a obtenu 20 souches productrices de dextrane, qui a été mis en évidence sur milieu MSE. Selon les conditions de croissance, avec différentes concentrations de substrat nutritionnel tel que le glucose et l'extrait de levure (5g, 3g et 1g), et de saccharose (50 et 100 g/L), la caractérisation de production d'exopolysaccharides a montré que la meilleure production chez la plupart des souches dans une concentration de 0.5% glucose, 0.1% d'extrait de levure et 10% de saccharose. La quantification d'EPS nous a permis de sélectionner une souche C2 isolée du lait de chèvre qui a montré une bonne production de dextrane en quantité de 3,23 g/l appartient à l'espèce *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*.

En outre, les résultats ont clairement montré que la production d'EPS et la production de biomasse sont très influencées par la concentration de substrat carboné mais que ces deux phénomènes sont souvent indépendants l'un de l'autre.

Mots clés: *Leuconostoc*, phénotypique, Dextrane, substrat nutritionnelle, Exopolysaccharides.

Abstract

This work allowed us to isolate 23 strains of *Leuconostoc* from different dairy products (goat's milk, cow's milk, J'ben), using MRSv medium add to vancomycin. Based on classical microbiological and biochemical (phenotypic) methods, the 23 isolates belonging to 5 species were identified : *Ln. gelidium*, *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. mesenteroides* includes three subspecies (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* et *Ln. mesenteroides subsp cremoris*)

From 23 strains 20 dextran producing strains were obtained, which was highlighted on MSE. According to the growth conditions, with different concentrations of nutritional substrate such as glucose and yeast extract (5g, 3g and 1g), and sucrose (50 and 100 g / L), The production characterisation of exopolysaccharides showed that the best production in most strains in a concentration of 0.5% glucose, 0.1% yeast extract and 10% sucrose. The quantification of EPS allowed us to select a strain C2 isolated from goat milk which showed a good production of dextran in an amount of 3.23 g / l belongs to the species *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*.

In addition, the results clearly showed that EPS production and biomass production are strongly influenced by carbon substrate concentration but that these two phenomena are often independent of each other.

Key words: *Leuconostoc*, phenotypic, Dextran, nutritional substrate, Exopolysaccharides.

ملخص

سمح لنا هذا العمل بعزل 23 سلالة من *Leuconostoc* من منتجات الألبان المختلفة (حليب الماعز، حليب البقر، الجبن)، باستخدام وسط الزرع MRSv إضافة إلى الفانكوميسين بالاعتماد على الأساليب الميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية (النمط الظاهري)، تم تحديد الـ 23 سلالة التي تنتمي إلى 5 أنواع:

Ln. gelidium, *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. Mesenteroides*

بأنواعها الفرعية الثلاثة (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* et *Ln. mesenteroides subsp cremoris*)

انطلاقاً من 23 سلالة تم الحصول على 20 سلالة منتجة لدكستران، والتي تم تسليط الضوء عليها من خلال وسط الزرع MSE. وفقاً لظروف النمو، مع تراكيز مختلفة من الركيزة الغذائية مثل الجلوكوز وخالصة الخميرة (5 غ، 3 غ و 1 غ)، والسكروز (50 و 100 غ/ل)، أظهر توصيف إنتاج السكريات الخارجة أن أفضل إنتاج في معظم السلالات بتركيز 0.5% من الجلوكوز و 0.1% مستخلص الخميرة و 10% سكروز.

سمح لنا تقدير كمية متعدد السكر EPS باختيار سلالة C2 معزولة من حليب الماعز والتي أظهرت إنتاجاً جيداً للدكستران بكمية 3.23 غ / ل تنتمي إلى النوع *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت النتائج بوضوح أن إنتاج EPS وإنتاج الكتلة الحيوية يتأثران بشدة بتركيز الركيزة الكربونية ولكن هاتين الظاهرتين غالباً ما تكونان مستقلتين عن بعضهما البعض.

الكلمات المفتاحية: *Leuconostoc*، النمط الظاهري، ديكستران، الركيزة الغذائية، السكريات الخارجة.