

**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 appliquée**

**Présent par : Abdelali Lina**

**Thème**

**Etude d'un exopolysaccharide produits par  
des souches *Leuconostoc* autochtone**

**Devant le jury :**

<b>M<sup>eme</sup>.BEN AISSA A.</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Présidente</b>	<b>UKM Ouargla</b>
<b>Mr.MOSBAH S.</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Examinateur</b>	<b>UKM Ouargla</b>
<b>Mr .BOURICHA M.</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Encadreur</b>	<b>UKM Ouargla</b>
<b>M<sup>elle</sup> .HAMMOUDI R.</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Co-Encadreur</b>	<b>UKM Ouargla</b>

**Annéuniversitaire : 2019/2020**

# *Remerciements*

En premier lieu, je remercie " **DIEU** " le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la volonté et la lumière, la santé et la persistance pour l'accomplissement de cette mémoire.

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon encadreur **Mr. BOURICHA M'hamed** Maître assistant au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour ses conseils judicieux, qui ont contribué à alimenter ma réflexion et surtout le temps qu'il m'a consacré.

Ma reconnaissance à **M<sup>elle</sup> HAMMOUDI Roukia**, mon Co-encadreur, Maître de conférences A au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla pour sa précieuse assistance et ses orientations à la réalisation de mon mémoire.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en jugeant ce travail :

**M<sup>eme</sup> BEN AISSA Atika** et **Mr. MOSBAH Said**

Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla.

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

Un remerciement très particulier à notre la technicienne de laboratoire **M<sup>elle</sup> Fatima** pour son soutien et son infinie gentillesse.

Je remercie mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande importance.

Enfin, je remercie mes amis et toute ma famille pour leurs encouragements et leurs compréhensions.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à :*

**A** mes chers **parents** pour tout leur sacrifice, leur amour, leur tendresse, soutien et leurs prières tout au long de ma vie scolaire et universitaire.

**A** ma chère mère **Dalila**, qui a été l'origine de ma position actuelle, grâce à ces conseils, ses invocations tout au long de mon cursus universitaire.

**A** mon vaillant père **Saïd** qui m'a soutenu, guidé et aidé. Vous êtes le pilier solide et incontournable en ma personne et à mon parcours, que Dieu lui donne la santé et la vie.

**A** mes chers frères **Fars, Ayoub et Loay**, pour leur encouragement et leur appui permanent.

**A** ma belle sœur **Manal**, pour leur aide et leur soutien indéfectible.

**A** mes chers amis **Safa, Marwa, Romissa, Merieum, Rayane, Noussa** pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

**A** mes **Enseignants** (es) et ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon étude.

**A** tous ceux que j'estime fortement.

**A** virus **Covid-19 (Corona)**, qui change beaucoup des choses dans ma vie.

*«La chance, pour un  
chercheur, est de trouver  
des faits qui ressemblent  
à ce qui le passionne»*

**(Jean Rostand)**

# *Liste des abréviations*

<b>A</b>	Absorbance
<b>ARNr 16S</b>	Sous-unité 16S de l'ARN ribosomique
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>BL</b>	Bactéries Lactique
<b>Da</b>	Daltone
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>ESP</b>	Exopolysaccharides
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GC%</b>	Pourcentage (Guanine et Cytosine)
<b>GRAS</b>	Généralement reconnu comme étant sécurisé
<b>HePS</b>	Hétéropolysaccharides
<b>HoPS</b>	Homopolysaccharides
<b>KDa</b>	kilo dalton
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<b>MRS</b>	Man Rogosa Sharpe
<b>MRSG</b>	ManRogosa Sharpe + Glucose
<b>MRSs</b>	ManRogosa Sharpe + saccharose
<b>MSE</b>	Mayeux, Sandine et Elliker
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>PH</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>PTS</b>	Système phosphotransférase
<b>RAPD-PCR</b>	Random Amplified Polymorphic Réaction en chaîne par polymérase
<b>S</b>	Saccharose

**Tr** Tours

**U** Unité

**UFC** Unité formant colonie

**V/V** Volume/ Volume

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Arbre de jonction de voisinage phylogénétique.....	10
<b>Figure 2 :</b> Morphologies de <i>L. citreum</i> KACC 91348P.....	11
<b>Figure 3 :</b> Métabolisme général de <i>Leuconostoc</i> .....	14
<b>Figure 4 :</b> Métabolisme du lactose chez <i>L. mesenteroides</i> .....	15
<b>Figure 5 :</b> Principales étapes du métabolisme du citrate et production des substances responsables d'arôme chez <i>Leuconostoc</i> . .....	17
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries á Gram positif .....	26
<b>Figure 7 :</b> Propriétés général du dextrane utilisé dans l'industrie .....	28
<b>Figure 8 :</b> Mécanisme à double déplacement de la réaction de dextransucrase.....	31
<b>Figure 9 :</b> Stratégie générale de l'analyse des polysaccharides extracellulaires produits par les BL.....	45
<b>Figure 10 :</b> Schéma représentatif résumé la méthode utilisée pour la revivification et la purification des souches.....	52
<b>Figure 11 :</b> Schéma d'extraction et quantification d'EPS .....	55
<b>Figure 12 :</b> Courbe d'étalonnage de D-glucose représente des valeurs obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations de D-glucose. ....	57
<b>Figure 13 :</b> Protocole expérimentale d'optimisation de la production d'exopolysaccharide .	59
<b>Figure 14 :</b> Trouble apparent sur bouillon MRS après 18heures d'incubation à 30°C. ....	61
<b>Figure 15 :</b> Aspect macroscopique des souches lactiques purifiées sur gélose MRS après 24 heures d'incubation à 30°C. ....	62
<b>Figure 16 :</b> Observation microscopique de la souche <i>Ln. fallax</i> identifier après coloration de Gram a grossissement X100 .....	62
<b>Figure 17 :</b> Catalase négative de la souche revivifié <i>Ln. mesenteroides subsp dextranicum</i> ...	63
<b>Figure 18 :</b> Production du gaz à partir du glucose par la souche <i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> .....	64
<b>Figure 19 :</b> Aspect des colonies des souches <i>Leuconostoc</i> produit le dextrane sur milieu MSE après 48 h.....	67
<b>Figure 20 :</b> Aspect des colonies des souches <i>Leuconostoc</i> produit le dextrane sur milieu MRSs après 24h .....	67
<b>Figure 21 :</b> Morphologie des colonies de la souche C2, cultivée sur milieu solide MSE .....	67
<b>Figure 22 :</b> Production de dextrane par l'espèce <i>Ln. Mesenteroides</i> .....	70

<b>Figure 23:</b> Production de dextrane par l'espèce <i>Ln. mesenteroides</i> à différentes concentrations d'extrait de levure sur milieu MSE .....	71
<b>Figure 24:</b> Production de dextrane par <i>Leuconostoc</i> à différentes concentrations de saccharose sur milieu MRSs .....	74
<b>Figure 25:</b> Aspect visqueuse de milieu liquide MRSs après production EPSpar souche <i>Ln.mesenteroides subsp mesenteroides</i> .....	75
<b>Figure 26:</b> Aspect de dextrane produit par <i>Leucounostoc</i> après l'extraction à partir de milieu liquide MRSs.....	76
<b>Figure 27:</b> Variation de taux de production de dextrane par les souches de <i>Leuconostc</i> en fonction des différentes concentrations de saccharose et de volume d'inoculum ....	76

## ***Liste des Tableaux***

<b>Tableau 1:</b> Classification des groupes de <i>Leuconostoc</i> (Devoyod et Poullain, 1988) .....	6
<b>Tableau 2:</b> Progression et l'évolution de la classification de genre <i>Leuconostoc</i> et leur nomenclature.....	9
<b>Tableau 3 :</b> Caractéristiques générale du genre <i>Leuconostoc</i> .....	12
<b>Tableau 4 :</b> Caractéristique biochimique des <i>Leuconostoc</i> .....	18
<b>Tableau 5 :</b> <i>Leuconostoc</i> dans les aliments fermentés .....	21
<b>Tableau 6 :</b> Bactériocines de classe IIa identifiées les souches de <i>Leuconostocs</i> productrices et leurs origines. ....	22
<b>Tableau 7 :</b> Identification et origine des souches des bactéries lactiques isolées du lait d'chèvre, vache et J'ben. ....	49
<b>Tableau 8 :</b> Concentrations des substrats optimisés donne par logiciel Minitab.16 .....	58
<b>Tableau 9:</b> souches produits l'EPS de caractères mucoïde et gluant .....	65
<b>Tableau 10:</b> Croissance des souches de <i>Leuconostoc</i> dans le milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure. ....	72
<b>Tableau 11:</b> Production d'EPSpar des souches de <i>Leuconostoc</i> dans le milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure .....	73



## ***Liste des Annexes***

<b>Annexe 1:</b> Milieux de cultures et solutions .....	98
<b>Annexe 1:</b> Coloration de Gram.....	100
<b>Annexe 3 :</b> Identification phénotypique des souches.....	101

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERAL .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE GENRE <i>LEUCONOSTOC</i> .....</b>	<b>4</b>
I.1.Généralité sur <i>Leuconostoc</i> .....	4
I.1.1. Historique et mis en évidence .....	4
I.1.2.Ecologie des <i>Leuconostocs</i> .....	5
I.1.3.Taxonomie et classification de <i>Leuconostoc</i> .....	6
I.1.4.Morphologie et caractérisation.....	10
I.1.5. Physiologie et voies métaboliques centrales de <i>Leuconostoc</i> .....	12
I.1.6.Métabolisme de citrate.....	16
I.1.7.Résistance des <i>Leuconostoc</i> au stress :.....	19
I.1.8.Rôle et application de <i>Leuconostoc</i> .....	19
I.1.8.1.Amélioration de la structure du fromage par la production du CO <sub>2</sub> .....	20
I.1.8.2.Utilisation des <i>Leuconostocs</i> comme des levains d'arôme .....	20
I.1.8.3.Utilisation comme probiotique et dans la production des vitamines .....	21
I.1.8.4.production des bactériocines .....	22
I.1.8.5.Production des exopolysaccharides (EPS) .....	23
<b>II. CARACTERISATION DE L'EPS DEXTRANE .....</b>	<b>25</b>
II.1.Généralité sur l'exopolysaccharide (EPS) bactérienne .....	25
II.2. Définition de dextrane .....	26
II.2.1.Caractérisation du dextrane .....	27
II.2.2.Source et la production de dextrane .....	29
II.3.Action de Dextransucrase .....	30
II.4.Application de dextrane .....	31
II.5.Effets secondaires du dextrane .....	33
<b>III. ETUDES TECHNOLOGIQUES ET APPLICATION .....</b>	<b>36</b>
III.1. Etudes générale .....	36
III.1.1. Dominance de <i>Leuconostoc</i> dans la production de dextrane .....	36
III.2.Dextrane clinique .....	38
III.3.Dextrane dans l'industrie comercial.....	39

III.4. Etudes spécifiques .....	42
III.4.1.Types de dextrane synthétisés par la dextransucrase .....	42
III.5.Recommandations sur EPS microbienne d'après Ates (2015) .....	43
<b>IV. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>48</b>
IV.1.Cadre de l'étude .....	48
IV.2.Matériel biologique .....	48
IV.2.1. Origine des souches utilisées .....	48
IV.3. Revivification des souches .....	50
IV.3.1.Repiquage et Purification.....	50
IV.4.Vérification de l'identité des souches.....	50
IV.4.1.Coloration de Gram .....	50
IV.4.2. Recherche de la catalase .....	50
IV.4.3. Type fermentaire .....	51
IV.4.4.Conservation des souches revivifiées .....	51
IV.4.4.1.Conservation court durée.....	51
IV.4.4.2.Conservation longue durée .....	51
IV.5.1.Production d'Exopolysaccharide (dextrane) .....	53
IV.5.1.1.Etude qualitative .....	53
IV.5.1.2.Etude quantitative de la production d'EPS .....	53
IV.5.1.2.1.Mesure de la densité optique (DO).....	53
IV.6.Caractères et aptitudes de dextrane.....	54
IV.6.1.Extraction et quantifications de dextrane.....	54
IV.6.1.1.Dosage des EPS .....	56
IV.6.1.1.1.Dosage des sucres totaux .....	56
IV.6.1.1.2.Le principe de la méthode .....	56
IV.6.1.1.3.Méthode de dosage .....	56
IV.6.2.Optimisation de la production d'Exopolysaccharide.....	57
<b>V. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>61</b>
V.1. Revivification et purification des souches lactiques .....	61
V.1.1. Observation macroscopique .....	61
V.2.Observation microscopique .....	62
V.2.1.Coloration de Gram.....	62
V.3.Test de la catalase.....	63

V.4. Recherche de type fermentaire.....	63
V.5. Production d'exopolysaccharide (dextrane) .....	64
V.5.1. Détection des EPS au niveau macroscopique.....	64
V.5.1.1.Etude qualitative.....	64
V. 5.1.1.2.Caractérisation des aptitudes de dextrane .....	69
V. 5.1.1.2.1.Optimisation de la production d'exopolysaccharide .....	69
V.5.1.1.2.2. Effet de différentes concentrations de substrat sur la production de dextrane.....	70
V.5.1.2.Etude quantitative.....	74
V.5.1.2.1.Extraction et Quantification de dextrane.....	75
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>85</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>98</b>



# ***Introduction***

Les bactéries lactiques sont de très anciens microorganismes dont les ancêtres auraient pu voir le jour il ya trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques, ont pour habitat de nombreux milieux naturel.Ellessont desubiquitaires colonisent de nombreux produits alimentaires en générale des milieux riches en sucres et en protéines comme les produits laitiers, la viande, les fruits, les légumes et les céréales (**Carr et al., 2002 ; Drider et Prévost, 2009**).

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. Elles interviennent aussi directement et indirectement dans la phase d'affinage des fromages et la qualité sanitaire des aliments. Certains utilisateurs les emploient comme levain pour améliorer la qualité de leurs produits (beurre, pate fraiche, fromage à pate persillée), vu qu'elles sont capables de développer dans nombreux produit naturelle simple d'origine végétale ou animale. Elle est incriminée dans le groupe des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides (EPS), pendant la fermentation, est une alternative de choix. A l'aide de ces bactéries bénéficiant d'un statut GRAS (Generally Recognized As Safe), il est possible de fabriquer des produits laitiers fermentés (**Bekhouche, 2006 ; Guiraud, 2012 ; Drider et Prévost, 2009 ; Kersani, 2018**).

Les exopolysaccharides bactériens sont des macromolécules hautement diversifiées, dont par une biomasse microbienne exigent, traditionnelle ou moderne dans les bioréacteurs industriels. Parmi ces EPS dont le dextrane, un polymère de simple structure gélifiaient et texturant, produise principalement par les *Leuconostocs*, industriellement par une fermentation induite pratiquement dans des milieux hypersaccharosée. Elle présente un candidat compétant par leurs bienfaits, joue un rôle primordial ciblé l'industrie pharmaceutique, forages pétroliers, cosmétique et alimentaire(**Drider et Prévost, 2009**).

La diversité des structures d'EPS représente donc une riche source de polymères possède des propriétés fonctionnelles variées qui peuvent servir dans une multitude d'application industrielle. Dans un souci croissant des consommateurs envers la qualité des produits alimentaires disponibles sur le marché, des exigences de plus en plus rigoureuses sont recommandées quant à la qualité des ingrédients utilisés et augmentation des efforts améliorants une alimentation confiante dans le sens sensoriel et sain, et ont été enregistrées (**Agence canadienne d'inspection des aliments, 2014 in Arfaoui, 2014**).

Le présent travail consiste à sélectionner des souches lactiques productrices d'EPS et évaluer leur condition de biosynthèse ainsi qu'à valoriser leur caractère mucoïde et gluant, offrant l'avantage de moduler les propriétés rhéologiques des produits fermentés, surtout laitiers, en tant qu'agents visqueux et gélifiants. Pour cela, notre travail cherche le maximum de la production d'EPS bactérienne par une optimisation de différents substrats incluse dans sa production, élargie par une quantification, par des souches plus performant, à fin d'obtention un rendement d'EPS bien défini pour une quantité et qualité dont une activation biologique et économique dans l'industrie utile.

Ce manuscrit comprend comme suit :

- En premier lieu, une revue bibliographique portant sur le genre des *Leuconostocs*, et une généralité sur l'exopolysaccharide plus précisément, sur les facteurs prépondérants dans la biosynthèse de ces biopolymères de dextrane.
- En deuxième lieu, une étude expérimentale qui décrit les principales techniques appliquées en vue de mettre en évidence la production d'EPS, afin de repérer les meilleures souches productrices d'EPS. Et l'optimisation de la production de ces biopolymères par l'effet des différents facteurs nutritionnelle qui agissent sur cette biosynthèse.
- Une troisième partie est réservée aux résultats obtenus au cours de ce travail, leur discussion. Finalement, une conclusion, qui récapitule les principaux résultats obtenus et les perspectives que nous souhaitons envisager pour cette thématique de recherche.

# ***Chapitre J***

## ***Généralité sur le genre Leuconostoc***



## I. Etude bibliographique sur le genre *Leuconostoc*

### I.1. Généralité sur *Leuconostoc*

La diversité des bactéries lactiques largement suffisantes pour spécifier chaque genre qui sont bien connu, et les propriétés de ces genres devinent un candidat indispensable dans leur domaine d'utilisation, particulièrement leur concurrence à l'alimentation d'humanité. Donc leur champ d'action est très vaste. 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 (**Zarour et al., 2012**).

#### I.1.1. Historique et mis en évidence

Depuis 1878 le genre *Leuconostoc* a été défini par **Van Thieghhe**. Le premier isolement de ces souches était fait accidentellement apparus dans des sucreries. Or les *Leuconostocs* responsables de la production des dextrans en milieu contenant le saccharose. Des microorganismes identiques aux *Leuconostocs* antérieurement décrits, ces microorganismes produisaient de la gomme à partir du saccharose: il les appela *Lactococcus dextranicus* sont isolées en 1912 par **Beijerinck** du beurre et d'autres produits laitiers (**Devoyod et Poullain, 1988 ; Zarour, 2018**).

L'étude d'**Orla-Jensen (1919)**, sur les bactéries lactiques a permis de séparer le genre *Betacoccus* du genre *Streptococcus*. Il choisit de donner le nom de *Betacoccus* à ces bactéries produisant de l'acide lactique D(-) parce que ces bactéries se trouvaient sur les betteraves (*Beta communis*) et autres produits végétaux. **Orla-Jensen** dit qu'il existe une relation possible entre les *Leuconostocs* produisant des dextrans (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs d'acide lactique. Les streptocoques sont trouvés dans des écosystèmes laitiers et des végétaux fermentés. Grâce a la capacité de fermentation d'arabinose divisait le genre *Betacoccus* en deux espèces *B. arabinosaceus* et *B. bovis* (**Devoyod et Poullain, 1988**).

D'après **Devoyod et Poullain en(1988)** la mise en évidence en 1918 par **Evans** de la production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose par les *Leuconostoc*, distingue le caractère hétérofermentaire, confirmé par **Hucker en (1928)**.

Une propriété importante caractérisant les *Leuconostocs* est leur capacité de former des colonies mucilagineuses après synthèse d'exopolysaccharides. Cette propriété est d'ailleurs à l'origine du termenostoc qui veut dire algue bleue mucilagineuse (cyanobactéries) (**Zarour, 2018**).

### I.1.2. Ecologie des *Leuconostocs*

Les *Leuconostocs* colonisant des divers écosystèmes leur présence évaluer comme une espèce abondante et reconnue dans la nature (**Devoyod et Poullain, 1988**). La présence de *Leuconostoc* dans les différents écosystèmes ne change pas que les végétaux constituent leur habitat écologique normal (**Sanchez et al., 2005**). A partir de cet habitat facilement se propage dans les niches contenant les matières et les composant végétale tels que les légumes et les ensilages (**Ennahar et al., 2000**). Des souches de *Leuconostoc* été isolées de sirop de sucre de mélasse ou de bagasse. La plus souvent on trouve dans les plantes sucrées et végétaux fermentées particulièrement la betterave (**Devoyod et Poullain, 1988**). Trois souches isolées par **Mati (1980)** à partir d'une saumure. Tandis que, **Ryhanen et al (1996)** ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus*, *Ln. Citreum* et *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté. Seule l'espèce *Leuconostoc oenos* est isolée du vin (**Bekhouche, 2006**).

Dans l'industrie laitière, *Leuconostoc* fait partie de la microflore de la plupart des aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés. Elles entrent couramment dans la composition de levains utilisés pour la fabrication de nombreux produits laitiers, tels le fromage de Roquefort (**Devoyod et Poullain, 1988**).

**Zarour et al (2012)** identifié des souches de *Leuconostoc* isolées à partir le lait cru de chèvre, de chamelle et du fromage Roquefort. Leur présence régulièrement dans des nombres variés des fromages, sans addition comme un ferment de starters particulièrement dans le fromage du lait cru. **Boubekri et Yoshiyuki (1995)** ont isolé deux souches de *Leuconostoc* sp. À partir de fromage traditionnel El-Klila fabriqué à Batna (Algérie).

Parmi les premiers genres des bactéries lactiques les *Leuconostocs* étudiés pour leur rôle causatif dans les pertes commerciales dans l'industrie des sucres et sont aussi incriminés dans la détérioration des poissons et les produits carnés (**Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Hamasaki et al., 2003 ; Day ,1992 ; Guiraud, 2012**). Autre étude été motionnée que les

bactéries du genre *Leuconostoc* ont été isolées à partir de déchets humains et des échantillons du lait de mammite (Dall Ballo et al., 2003).

### I.1.3. Taxonomie et classification de *Leuconostoc*

Les caractères phénotypiques sont utilisés depuis longtemps pour isoler et caractériser les souches de *Leuconostoc* et, parfois pour différencier les espèces ou les sous-espèces.

Comme il est difficile à identifier sans équivoque les espèces ou les sous-espèces en utilisant des méthodes nouvelles. Les nouvelles techniques moléculaires ont été développées et permettant une identification cohérente en plus des méthodes traditionnelles (microscopie, plaque comptage, etc.). Plusieurs techniques modernes comme Random Amplified Polymorphic Réaction en chaîne par polymérase (RAPD-PCR), PCR spécifique à une espèce, PCR multiplexe, Séquençage de l'ARNr 16S, électrophorèse sur gel à gradient, longueur du fragment de restriction polymorphisme et analyse en grappes de l'électrophorèse à gradient de température temporel sont utilisés pour caractériser et identifier *Leuconostoc spp* (Shin et Han, 2015).

Après l'isolement accidentel des souches *Leuconostoc* cité par Devoyod et Poullain, (1988), la première classification exhaustive du genre *Leuconostoc* associée à l'étude de Hucker et Pederson (1931) sur 80 souches d'origines très diverses (sirop de sucre, légumes en fermentation, y compris de choucroute, fenouils marinés, haricots verts, betteraves, blettes, produits fermentés à base de tomate ainsi que de lait et de produits laitiers). Ils ont classé le genre *Leuconostoc* en trois groupes (Tableau.1).

**Tableau 1:** Classification des groupes de *Leuconostoc* (Devoyod et Poullain, 1988)

Groupe <i>Leuconostoc</i>	Espèce
Groupe I fermentant pas le saccharose	<i>Leuconostoc citrovorus</i>
Groupe II fermentant le saccharose et les pentoses	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Groupe III fermentant le saccharose mais non les pentoses	<i>Leuconostoc dextranicus</i>

L'emploi de ces méthodes classiques a l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité réduite d'information sur l'espèce et la sous-espèce de plus le choix des critères considérés

comme des critères de base se diffèrent d'un auteur à un autre ce qui est une source potentielle d'instabilité, dans les dernières décennies (**Bekhouche, 2006**).

La classification des espèces basée sur le GC% a permis de distinguer trois espèces : *Ln. mesenteroides* (et ses trois sous espèces : *subsp. mesenteroides*, *subsp. dextranicum* et *subsp. Cremoris*), *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides* et *Ln. enos* (**Bekhouche, 2006**).

Les analyses génétiques ont montré que le groupe des *Leuconostocs* comprend trois lignées : « *Leuconostoc sensu stricto* », « *Leuconostoc paramesenteroides* », « *Leuconostoc oenos* ». La découverte de ces lignées était la principale raison de deux propositions de reclassement : le genre « *Weissella* » a été associé à « *L. paramesenteroides* » et le genre « *Oenococcus* » a été associé à « *L. oenos* ». Les anciennes espèces aussi *L. cremoris* et *L. dextranicum* ont été classées comme des sous-espèces appartiennent à l'espèce *L. mesenteroides* avec l'ajoute d'une troisième sous-espèce *mesenteroides* (**Björkroth et Holzappel, 2006**). La taxonomie moléculaire a différencié *Leuconostoc oenos* en un nouveau genre bactérien : *Oenococcus oeni* (Figure.1) (**Bekhouche, 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 *Bergey'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 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (**Schleifer, 2015**). Le genre *Fructobacillus* a été validement publié en septembre 2008. Leurs espèces, qui étaient classées 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* par **Vantieghem (1878)**. La taxonomie de *Leuconostoc* n'a pas cessé de dévaluer. Au fur et à mesure que les connaissances progressent. Leur classification change pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques.

Classification récente selon **Bergey's Manual (2009)**

Règne : *Bacteria*,

Division : *Firmicutes*,

Classe : *Bacilli*,

Ordre : *Lactobacillales*,

Famille : *Leuconostocaceae*,

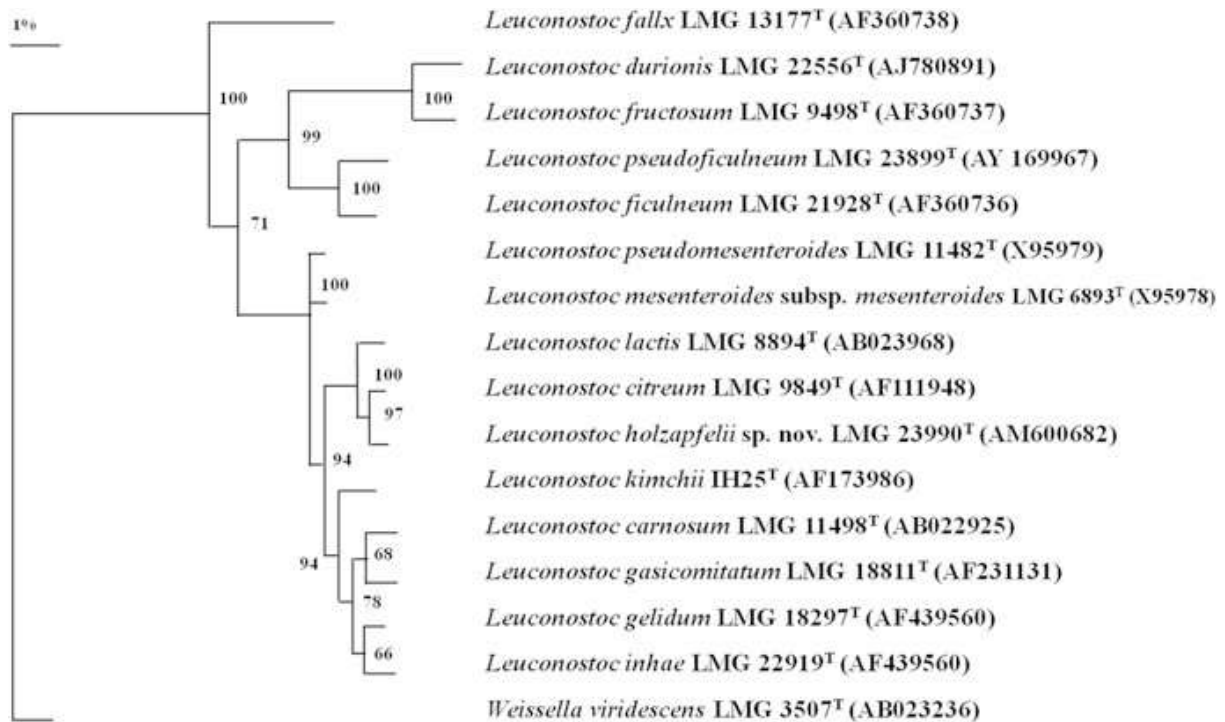
Genre : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*.

**Alegria et al., (2013)** dit que le genre *Leuconostoc* comprend 13 espèces, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* (avec quatre sous-espèces, *cremoris*, *dextranicum*, *mesenteroides* et *suionicum*), *Leuconostoc miyukkimchii*, *Leuconostoc palmae* et *Leuconostoc pseudomesenteroides* Parmi ceux-ci, *Leuc.mesenteroides subsp. cremoris* et *Leuc. Lactis* sont inclus comme composants de certains démarreurs commerciaux mésophiles (Tableau.2).

Selon **Hui et Evranuz (2016)** le genre *Leuconostoc* renferme 14 espèces (*mesenteroides*, *lactis*, *pseudomesenteroides*, *carnosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, *garlicum*, *inaha*, *holzapfelii*, *palmae* et *miyukkimchii*). L'espèce *L. mesenteroides* est la plus employée en industrie agro-alimentaire, cette espèce renferme quatre sous-espèces (*subsp. mesenteroides*, *subsp dextranicum*, *subsp. cremoris* et *subsp. suionicum* qui a été ajouté par **Guo et al., (2012)**).

**Tableau 2:** Progression et l'évolution de la classification de genre *Leuconostoc* et leur nomenclature (Euzéby, 2010 ; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Espèces	Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
<i>Ln.mesenteroides</i>	<i>Ln.mesenteroides</i>	
<i>Subsp.cremoris</i>	<i>Ln.cremoris</i>	
<i>Subsp.dextranicum</i>	<i>Ln. dextranicum</i>	
<i>Subsp.mesenteroides</i>		
<i>Ln.citreum</i>	<i>Ln.amelibiosum</i>	
<i>Ln.canosum</i>		
<i>Ln.durionis</i>		<i>Fructobacillus durionis</i>
<i>Ln.fallax</i>		
<i>Ln.ficuleneum</i>		<i>Fructobacillus ficuleneum</i>
<i>Ln.pseudoficulneum</i>		<i>Fructobacillus pseudoficulneum</i>
<i>Ln.fructosum</i>	<i>Lactobacillus fructosum</i>	<i>Fructobacillus fructosum</i>
<i>Ln.gelidum</i>		
<i>Ln.inhae</i>		
<i>Ln.gasicomitatum</i>		
<i>Ln.kimchii</i>		
<i>Ln.lactis</i>		
<i>Ln.paramesenteroides</i>		<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Ln.holzpfelii</i>		
<i>Ln.oenos</i>		<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Ln.palmae</i>		
<i>Ln.pseudomesenteroides</i>		
<i>Ln.argentinum</i>		<i>Ln.lactis</i>



**Figure 1:** Arbre de jonction de voisinage phylogénétique basé sur les séquences du gène d'ARNr 16S montrant la relation des espèces *Leuconostoc*. *Weissella viridescens* LMG 3507<sup>T</sup> a été utilisé comme groupe externe. Les nombres aux points de branchement indiquent des valeurs de pourcentage d'amorçage (> 50) basées sur 500 arbres Réplifications (Shin et Han, 2015).

#### I.1.4. Morphologie et caractérisation

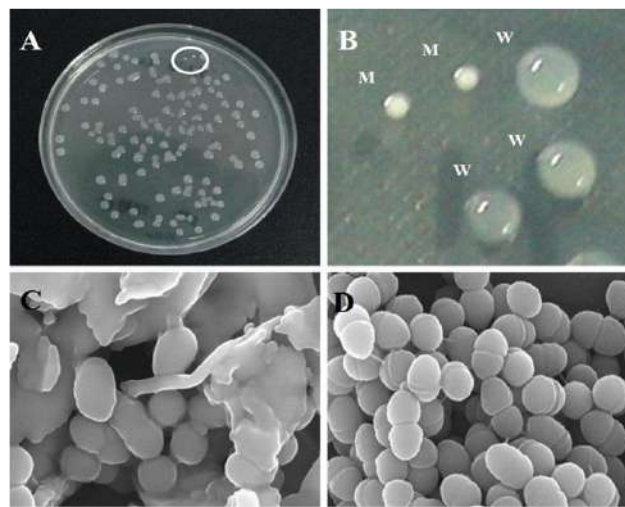
L'examen microscopique, c'est-à-dire la morphologie indique que la plupart des souches de *Leuconostoc* présentent une morphologie coccidie, qui varie en fonction de la condition de croissance. Les cellules peuvent être présentes individuellement ou par paires, et chaînes de longueur moyenne d'aspect mucilagineux, non pigmentés, souvent ellipsoïdale ou un peu sphérique (cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu). Les cellules de *Leuconostoc* peuvent prendre une forme un peu étirée semblable à celle des lactobacilles. Sont gram-positives, asporulées et non mobiles (Tableau.3) (Devoyod et Poullain, 1988; Guiraud, 2012 ; Shin et Han, 2015; Belhier, 2017).

Les espèces de *Leuconostoc* sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel. Souvent les *Leuconostocs* sont liés à une croissance lente nécessitant

parfois 3 à 4 jours dans les conditions optimales de PH (6.5) et de température entre 20 et 30°C pas à 45°C pour l'apparition des premières colonies sur milieu solide (Belkhier, 2017).

Leurs métabolismes fermentaires hétérolactiques qui donnent l'acide organique (acide lactique) ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Elles entraînent dans la fermentation malolactique (Guiraud, 2012).

En présence du saccharose, plusieurs souches de *Leuconostoc* ont produit de la dextrane extracellulaire qui forme une couche dense sur la surface cellulaire au moyen de la dextransucrase (Shin et Han, 2015).



**Figure 2 :** Morphologies de *L. citreum* KACC 91348P (a) Colonies sur gélose au saccharose moyen. (b) Blanc encerclant en (a): W, souche de type sauvage produisant du dextrane; M, souche mutant produisant pas de dextrane. (c) Morphologie de la souche produisant du dextrane observée par SEM (d) Morphologie de la souche ne produisant pas de dextrane observée par SEM (Shin et Han, 2015).



**Tableau 3** : Caractéristiques générale du genre *Leuconostoc* (Shin et Han, 2015).

Caractères	Genre <i>Leuconostoc</i>
<b>Gram</b>	Coccus à Gram positif
<b>Forme cellulaire</b>	Cellules sphériques, souvent lenticulaires sur gélose
<b>Mobilité</b>	Non mobile
<b>Catalase</b>	Catalase négative
<b>Hémolyse</b>	Non hémolytique
<b>Sporulation</b>	Asporogène
<b>Type respiratoire</b>	Anaérobies facultatives
<b>Cytochromes</b>	Cytochromes absents
<b>Arginine</b>	Arginine non hydrolysée
<b>Protéolytique</b>	Non protéolytique
<b>Indole</b>	Indoles non formés
<b>Nitrates</b>	Nitrates non réduits
<b>Résistant à ATB</b>	Résistant à la vancomycine
<b>Pathogène</b>	Généralement considéré comme non pathogène
<b>Température optimale</b>	20–30° C
<b>Culture</b>	Chimio-organotrophes (nécessitent des milieux riches et complexes)
<b>Regroupement</b>	Se produisent généralement en paires et en chaînes

### I.1.5. Physiologie et voies métaboliques centrales de *Leuconostoc*

Les bactéries lactiques (BL) y compris le genre majeur *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, sont hétérotrophes et nécessitent donc pour leur croissance l'apport de certaines substances organiques exogènes. Elles se caractérisent par des besoins nutritionnels particulièrement complexes car en plus d'un sucre fermentescible, elles nécessitent la présence de plusieurs acides aminés essentiels pour assurer leur métabolisme (Figure.3). Ces acides aminés se trouvent soit sous forme libre ou complexe, sous forme de peptide ou de protéines comme la caséine, cette dernière nécessite un système protéolytique actif pour obtenir les acides aminés désirés. Depuis plusieurs dizaines d'années dans le domaine de la nutrition et du comportement des BL afin d'assurer une véritable maîtrise industrielle des ferments lactiques.

La technologie laitière a connu des améliorations importantes, grâce aux connaissances accumulées pour que les bactéries présentent des exigences nutritionnelles importantes qui varient beaucoup d'un groupe bactérien à un autre ce qui reflète leur utilisation (Zarour, 2018).

### A. Transport des sucres

La pénétration des glucides chez les *Leuconostocs* par l'intermédiaire de l'enzyme perméase qui permet l'entrée des sucres dans la cellule sans modification (pas de phosphorylation comme dans le système PTS) (Dridier et Prévost, 2009).

### B. Utilisation des carbohydrates

Le genre *Leuconostoc* ne possède pas de aldolase FBA, ni de triose-phosphate isomérase (TPI), et est également dépourvu d'un système PTS. Elles empruntent une voie hétérofermentaire qui conduit à la production d'un lactate, d'un éthanol, d'un CO<sub>2</sub> et d'un ATP par mole de glucose (Dridier et Prévost, 2009).

### C. Voie générale de catabolisme

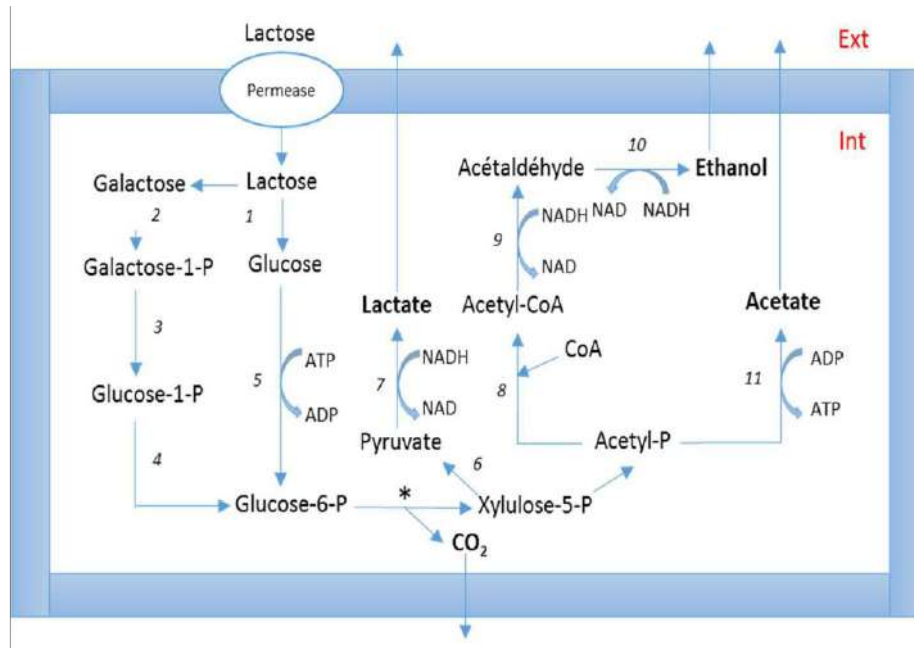
Après le transport et la pénétration des sucres à travers l'enveloppe cellulaire. Trouve en présence du glucose, lactose, galactose ou d'autres carbohydrates libres.

#### C.1. Métabolisme de glucose

Le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase. Le glucose-6-phosphate emprunte la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. La D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique de la voie hétérofermentaire, catalyse la dissociation du xylulose-5-phosphate en acétyl-p et glycéraldéhyde-3-phosphate. L'acétyl-p est converti en éthanol ou acétate selon les besoins en ATP ou en NAD<sup>+</sup>, et le glycéraldéhyde-3-phosphate rejoint la glycolyse pour être converti en acide lactique (Dridier et Prévost, 2009).



la synthèse du précurseur du peptidoglycane ce qui permet à ces bactéries la résistance à la vancomycine (Drider et Prévost, 2009 ; Zarrou, 2018).



**Figure 4 :** Métabolisme du lactose chez *L. mesenteroides*

1,  $\beta$ -galactosidase ; 2, galactokinase ; 3, Galactose-1-phosphate uridylyltransférase ; 4, phosphoglucomutase ; 5, glucokinase ; 6, Phosphoketolase ; 7, lactate déhydrogénase ; 8, phosphotranscétyle ; 9, CoA dépendante aldéhyde déhydrogénase ; 10, alcool déhydrogénase ; 11, acétate kinase ; CoA, coenzyme A ; de plusieurs réactions enzymatiques (Harutoshi, 2013).

### C.3. Métabolisme du saccharose

Pendant la croissance et en présence du saccharose, une grande partie de ce sucre est converti par les espèces des *Leuconostocs*, en dehors de la cellule, en homopolysaccharides du type dextrane, alternane ou levane, respectivement, par l'enzyme dextransucrase, alternansucrase ou levansucrase. Le saccharose non converti va pénétrer dans la cellule où il va être phosphorylé par l'enzyme sucrose phosphorylase inducible et converti en glucose-6-P par le biais de l'enzyme constitutive phosphoglucomutase pour rejoindre la voie des pentoses phosphates (Zarrou, 2018).

### C.4. Métabolisme des autres carbohydrates

Les autres sucres rejoignent la glycolyse, après transport et phosphorylation, au niveau du glucose-6-p, du fructose-6p ou bien du fructose-1.6 bisphosphate. Dans certaines souches, une déviation du glucose-6p vers la production de polysaccharides (agent texturant des produits laitiers) ou du fructose-6p vers la production de mannitol peut être observée. Cependant, certains sucres, comme le galactose, le lactose ou les pentoses, requièrent le fonctionnement de voies métaboliques spécifiques (**Dridier et Prévost, 2009**).

Plusieurs sucres chez les *Leuconostocs* qui sont classés comme des sources de carbone essentiels dans l'identification phénotypique, comme arabinose qui est utilisée comme sucre clé pour différencier entre *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* et *L. mesenteroides subsp. dextranicum*, cette dernière est incapable de le métaboliser (**Björkroth et Holzapfel, 2006**).

L'utilisation de la raffinose par les *Leuconostocs* est un caractère variable (**Hemme et Foucaud- Scheunemann, 2004**).

L'utilisation des sucres aboutit non pas à un, mais à deux produits intermédiaires importants :

L'acétyl-P et le pyruvate, qui est issu aussi du métabolisme du citrate (**Zarour, 2018**).

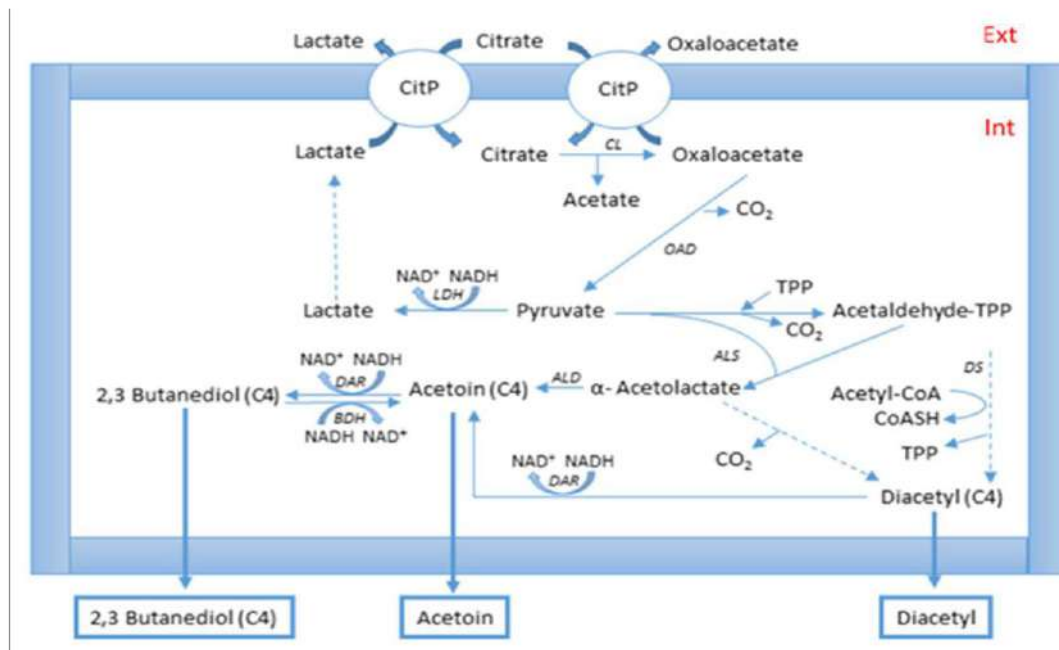
### **I.1.6.Métabolisme de citrate**

Le genre *Leuconostoc* et *Lactococcus* n'utilisent le citrate qu'en présence d'un sucre fermentescibles. Le co-métabolisme citrate-sucres stimule fortement la croissance de *Leuconostoc* et favorise la voie de synthèse du diacétyle. Les études physiologiques ont permis d'identifier des facteurs biologiques tels que le PH, la concentration en sucre, la concentration en citrate et en oxygène comme paramètres directeurs importants pour l'expression aromatique (**Zarour, 2018** ).

Le citrate est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à un citrate perméase active à pH inférieur à 6, puis scindé en acétate et oxalaoacétate grâce à un citrate lyase. L'oxalaoacétate est décarboxylé par la suite en pyruvate et CO<sub>2</sub> via une oxaloacétate décarboxylase. Finalement, les deux produits communs entre la voie des pentoses phosphates et le métabolisme du citrate chez les *Leuconostocs* (Figure.5).Le taux de pyruvate disponible dépend de l'activité des enzymes impliquées dans la bioconversion du citrate (**Dridier et Prévost, 2009**).

La synthèse des composés en C4 (acétoine, diacétyle, 2,3 butanediol) est ainsi favorisée. En effet, la formation des composés aromatiques est observée essentiellement en conditions de limitation en glucose chez *Leuconostoc* (Dridier et Prévost, 2009).

La fermentation des citrates est un phénomène important chez *L. cremoris* (ex *L. citrovorum*) et *L. lactis* puisqu'elle est en relation très étroite avec l'activité aromatique de ces microorganismes (Dridier et Prévost, 2009 ; Zarour, 2018 ; Devoyod et Poullain, 1988).



**Figure 5:** Principales étapes du métabolisme du citrate et production des substances responsables d'arôme chez *Leuconostoc*.

CitP, citrate perméase P ; CL, citrate lyase ; OAD, oxaloacétate décarboxylase ; LDH, lactate déshydrogénase ; ALS,  $\alpha$ -acétolactate synthase ; ALD,  $\alpha$ -acétolactate decarbonylase ; DAR, diacétyle/acétoine réductase ; BDH, 2,3- Butanediol déshydrogénase ; TPP, pyrophosphate de thiamine; CoA: coenzyme A (Bourel et al., 2001).

Tableau 4 : Caractéristique biochimique des *Leuconostoc*(Guiraud, 2012).

	Culture a 37°C	Résistance min a 55°C	15 P. d'acétone (citrate)	S	A	T	F	P.de dextrane	Esculine	Arginine	Groupe selon Garvie
<i>L.lactis</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>L.mesenteroides</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Subsp cremoris</i>											
<i>L.mesenteroides</i>	+	V	-	+	-	+	+	+	V	-	4
<i>Subsp dextranicm</i>											
<i>L.mesenteroides</i>	V	V	-	+	+	+	+	+	V	-	5/6
<i>Subsp mesenteroides</i>											
<i>L.paramesenteroides</i>	V	V	-	+	V	+	+	-	V	-	3
<i>L.oenos</i>	V	V	-	-	V	+	+	-	+	-	.
					V						
<i>Autres Leuconostoc</i>	V	V	-	-	+	+		V	V	V	.

V : variable ; P : production ; S : saccharose ; A : arabinose ; T : tréhalose ; F : fructose

### I.1.7. Résistance des *Leuconostoc* au stress :

Les propriétés de genre *Leuconostoc* ne limiter pas par la fermentation et les produits de métabolisme comme critère principal pour le choix et l'utilisation dans l'industrie technologique, mais aussi par rapport condition changée dans l'environnement lié à sa résistance. **Devoyod et Poullain (1988)**, dit que selon **Garvie (1984)**, les bactéries qui se développent lentement et ne sont pas susceptibles de donner de fortes populations, parmi ces les *Leuconostocs* appartiennent à ce type de bactéries qui ne sont pas sensibles aux attaques phagiques.

Onze souches de *Leuconostoc* sauvages isolées du fromage artisanal Afuega'l Pitu, un produit artisanal coagulé à l'acide fromage au lait cru des Asturies (nord de l'Espagne). Une activité métabolique, production de composés aromatiques, résistance au NaCl, à l'acide, à la nisine et au gel (**Sanchez et al, 2005**). **Garbay et Lonvaud-Funel (1996)**, dans leur étude changent les conditions de culture de *Leuconostoc oenos* pour voir leur résistance à certains facteurs d'inhibition (acidité, éthanol, température.etc). Les résultats suggèrent que cellules *Leuconostoc oenos* peuvent augmenter leur adaptation aux conditions sévères, cependant la réponse aux stress chimique et physique par une régulation assuré des protéines appelé les protéines de stress rencontrés lors de la vinification.

*Leuconostoc oenos* a plusieurs mécanismes inconnus pour faire face aux conditions environnementales. Il pousse à la limite de la tolérance des facteurs inhibiteurs. L'homéostasie du PH interne est essentielle pour la croissance et la survie de tous les microorganismes y compris les *Leuconostocs* mais la croissance bactérienne est un processus d'autoinhibition par l'acidification du milieu externe et l'accumulation d'acide (**Bouricha, 2011**). **Zarour et al (2012)** isolée des espèces de *Leuconostoc mesenteroïdes* montré une résistance à 42,4% des antibiotiques utilisés.

### I.1.8. Rôle et application de *Leuconostoc*

*Leuconostoc spp.* Sont des micro-organismes industriellement importants qui sont utilisés dans le monde entier dans une variété de fermentations alimentaires industrielles (tableau.5). La source de flore microbienne peut soit être la matière première, comme c'est le cas pour les fromages au lait, le kimchi, et certaines des saucisses fermentées ou une production commerciale de culture de démarrage. Mais ils sont principalement utilisés pour leurs diverses propriétés métaboliques importantes en combinaison avec des souches pures ou mixtes de



*Lc.lactis subsp. lactis* (ferments acidifiants mésophiles) dans la fabrication d'un certain nombre de produits laitiers fermentés, principalement les fromages (Shin et Han, 2015).

### I.1.8.1. Amélioration de la structure du fromage par la production du CO<sub>2</sub>

Les bactéries hétérofermentaires 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 CO<sub>2</sub> par les *Leuconostoc*. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* (Zarour et al, 2012).

Une densité de  $6 \times 10^6$  unité formant colonie (UFC) par ml de *Leuconostocs* est suffisante pour obtenir des ouvertures dans la pâte de fromage du Roquefort. Les résultats des travaux effectués ont prouvé que le citrate stimule la croissance des *Leuconostocs* et augmente l'émission de CO<sub>2</sub> qui semble être faiblement produit chez *L. mesenteroides subsp. Cremoris* (Zarour, 2018).

### I.1.8.2. Utilisation des *Leuconostocs* comme des levains d'arôme

Les *Leuconostocs* jouent un rôle dans la production d'arômes qui pourrait être direct par la production de composés ou de précurseurs ou indirects en influençant le développement des autres microorganismes possédant cette propriété. Cette production amélioré la qualité organoleptique et sensorielle (Zarour, 2018).

*Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar diacetylactis et *Leuconostoc mesenteroides* sont considérés comme les principaux producteurs d'arômes de fromages du type néerlandais (Oscar et al., 2019).

Le diacétyl provenant de l'utilisation du citrate constitue le composé aromatique principal recherché dans les produits laitiers frais (beurre, fromage frais, crème fraîche). D'autres composés tels que l'acétate et l'éthanol contribuent à la texture à la flaveur de ces produits laitiers (Dridier et Prévost, 2009).

*Leuconostoc* est également capable de réduire l'acétaldéhyde en éthanol, est à l'origine d'un défaut de flaveur, appelé gout d'herbe (Dridier et Prévost, 2009).

**Palmira et al., 2019** ont été sélectionnés des souches bactériennes adaptées à la production d'un pain «sans levure». *L. citreum* C2.27 sélectionnée utilisée comme des levains (et son application selon une procédure développée) a permis de produire du pain sans levure de boulangerie, avec bonnes caractéristiques sensorielles et d'aspect similaire au pain traditionnel. *Leuconostoc mesenteroides* identifié phénotypiquement en Italie et Espagne et Maroc comme des levains de blé (**Dridier et Prévost, 2009**).

**Tableau 5 :** *Leuconostoc* dans les aliments fermentés (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**)

Produits	Produit alimentaire	Matière première	Microorganismes
<b>Laitière</b>	Beurre et crème	Lait	BL
	Fromage		levures, moisissures
<b>Viande</b>	Saucisses	Viande	levures, moisissures
	Salami		BL
<b>Poisson</b>	Aliments en sauce (balacham, chinchaluk, etc.)	Poissons, crevettes	BL
<b>Céréale</b>	Boissons (bière)	Malt, maïs, maïs, riz,	BL levures, moisissures
<b>Légume et fruits</b>	Choucroute	Chou	BL
	Kimchii, Tempoyak	Légumes et fruits divers	

### I.1.8.3. Utilisation comme probiotique et dans la production des vitamines

Chine, Japon, et certains pays africains promeuvent l'idée de produire à base de produits non laitiers. En raison de la tendance croissante du végétarisme et d'une incidence croissante de l'intolérance au lactose dans de nombreuses populations (**Dridier et Prévost, 2009**).

Probiotiques dans d'autres produits tels que les céréales, les fruits et les légumes, en raison du lactose l'intolérance, la teneur en cholestérol et les allergies aux produits laitiers Le

genre *Leuconostoc* est considéré comme un probiotique potentiel pour les aliments fermentés non laitiers (Granato et al., 2010; Shin et Han, 2015).

La vitamine K est présente sous forme de ménaquinone (vitamine K2) qui est produite par certaines bactéries intestinales, comme BL en particulier par des souches des genres *Leuconostoc*. L'état clinique de l'ostéoporose chez les nourrissons est causé par une intracrânienne hémorragie due à une carence en vitamine K. Les souches de *L. lactis*, *L. mesenteroides subsp. cremoris* et *L. mesenteroides subsp. dextranicum* produisant des quantités importantes de ménaquinones (vitamine K2) ont été caractérisées et l'utilisation de ces souches serait bénéfique pour la prévention de la des maladies dues à une carence en vitamine K. De plus, la production de folate (vitamine B9) a été signalée chez *L. lactis* et *L. paramesenteroides* (Shin et Han, 2015).

#### I.1.8.4. production des bactériocines

Au jour d'hui les substances antimicrobiennes présentes une importance industrielle et économique, les bactériocines reconnues par les BL comme des majeurs groupent de production et d'utilisation particulièrement les souches de *Leuconostoc* présentent une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* par des leucocines spécifiques à ce genre (voir tableau.6) est la mesenterocine Y105 produite par *L. mesenteroides* (Drider et Prévost, 2009 ; Zarour, 2018).

**Tableau 6 :** Bactériocines de classe IIa identifiées les souches de *Leuconostocs* productrices et leurs origines. (Drider et Prévost, 2009).

Bactériocine	Souche productrice	Origine
leucocine A	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187	Viande transformée emballée sous vide (Canada)
=leucocine A- UAL187	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187	Viande transformée emballée sous vide (Canada)
= leucocine A-TA33a	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a	
= leucocine B-TA11a	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a	

#### **I.1.8.5. Production des exopolysaccharides (EPS)**

Le genre de *Leuconostoc* très reconnue par la production des EPS de type homopolysaccharides qui confèrent une importance d'utilisation et des avantages technologiques en industrie agro-alimentaire en industrie pharmaceutique et médicale (Voir chapitre II) (Zarour, 2018).

# ***Chapitre JJ***

## ***Caractérisation de***

### ***l'EPS dextrane***

## II. Caractérisation de l'EPS dextrane

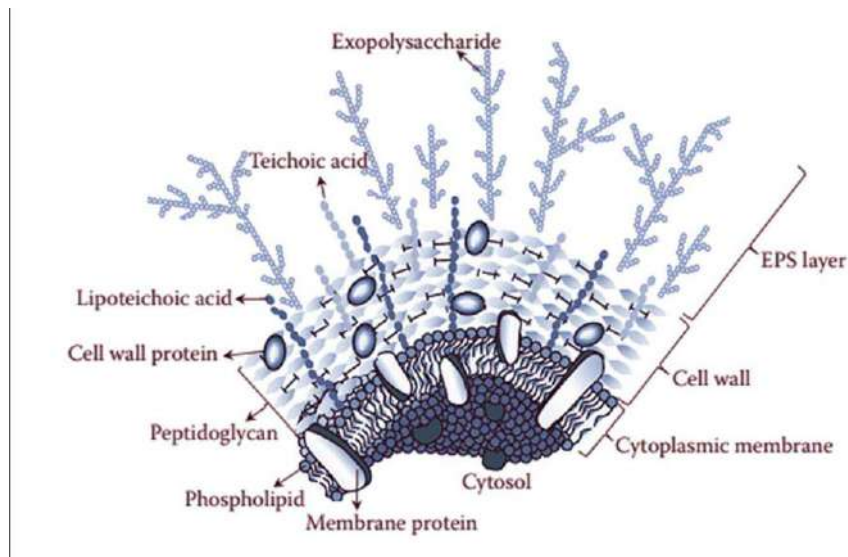
### II.1. Généralité sur l'exopolysaccharide (EPS) bactérienne

Les polysaccharides bactériens sont des macromolécules hautement diversifiées dont les propriétés fonctionnelles sont exploitées dans plusieurs domaines industriels. Ces polymères peuvent être localisés à l'intérieur de la cellule, dans la paroi, ou à la surface bactérienne, avec ou sans attachement, qui sont dit les exopolysaccharides EPS sont supposées avoir un rôle dans la protection des cellules bactériennes contre les conditions physiques, chimiques et biologiques de leur environnement. Elle présente chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. En particulier, la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée d'une bicouche phospholipide, dans laquelle certaines protéines sont incorporées, entourées d'une épaisse couche de peptidoglycane, qui est un polysaccharide structurel (Figure.6)(Zarour, 2018).

Les polysaccharides microbiens peuvent généralement être classés par leurs fonctions biologiques provenant de leur localisation, il existe trois groupes : des polysaccharides de stockage intracellulaire (glycogène), des polysaccharides capsulaires qui sont étroitement liés à la surface cellulaire et polysaccharides bactériens extracellulaires (comme le xanthane et le dextrane, etc.) Qui sont importants pour la pathogénicité et la formation des biofilms (Dridier et Prevost, 2009).

Les EPS sont produits par *Proteobacteria* comme *Halomonas ventosae* par les bactéries à Gram négatif tel que *Xanthomonas campestris* et les BL comme *Pediococcus parvulus* et *L. mesenteroides* ; par les champignons et les levures comme *Schizophyllum commune*, *Cryptococcus laurentii* et les microalgues comme *Porphyridium cruentum* (Dridier et Prevost, 2009).

Les BL produisent des variétés des ESP qui ne sont pas toutes jour homogène selon leur composition sont classée en deux groupes: des homopolysaccharides (HoPS), constituée d'un seul type de monosaccharide et hétéropolysaccharides (HePS) formée par deux ou plusieurs types des monosaccharides. Cette diversité des structures d'EPS représente donc une riche source de polymères possédant des propriétés fonctionnelles variées qui peuvent servir dans une multitude d'applications industrielles (Dridier et Prevost, 2009 ; Zarour, 2018).



**Figure 6 :** Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif (Ruas-Madiedo *et al.*, 2012).

## II.2. Définition de dextrane

D'après Scheilber en (1874) étudié le mot dextrane pour le premier foie par l'apparition d'une certaine viscosité dans les jus de canne et betterave sucrée. Le comportement que Pasteur en (1861) l'avait déjà attribué à l'action des microorganismes. Plus tard, en 1878, Van Tieghem a isolé et nommé le microorganisme responsable de la gélification et l'a nommé *Betacoccus mesenteroides*. (Naessens *et al.*, 2005). L'enzyme extracellulaire responsable à la production de dextrane dite comme dextrane-saccharase nommée par Hestrin, Averini-Shapiro et Aschner (1943).

Le dextrane est un polysaccharide microbien extracellulaire produit par les bactéries lactiques d'une masse moléculaire élevée, son hydrolyse chimique contrôlée permet la production de fractions ayant une masse moléculaire moyenne de 70 KDa, et ils possèdent généralement des chaînes de D-glucose en liaison  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 6) avec différentes ramifications ( $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 2),  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 3) ou  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 4) (D'iaz-Montes *et al.*, 2019 ; Vandtori *et al.*, 2012).

Le dextran est un HoPS produit par des souches de *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Acetobacter*. Des études antérieures ont rapporté la formation de dextrane à partir de

différentes souches de bactéries qui étaient principalement des souches de *Leuconostoc*. Il a également été constaté que des espèces de bactéries d'autres genres produisent du dextrane, alors que la spécificité de la synthèse des liaisons dans le dextrane dépend de la souche et donc le type spécifique de dextransucrase impliquée (Naessens et al., 2005).

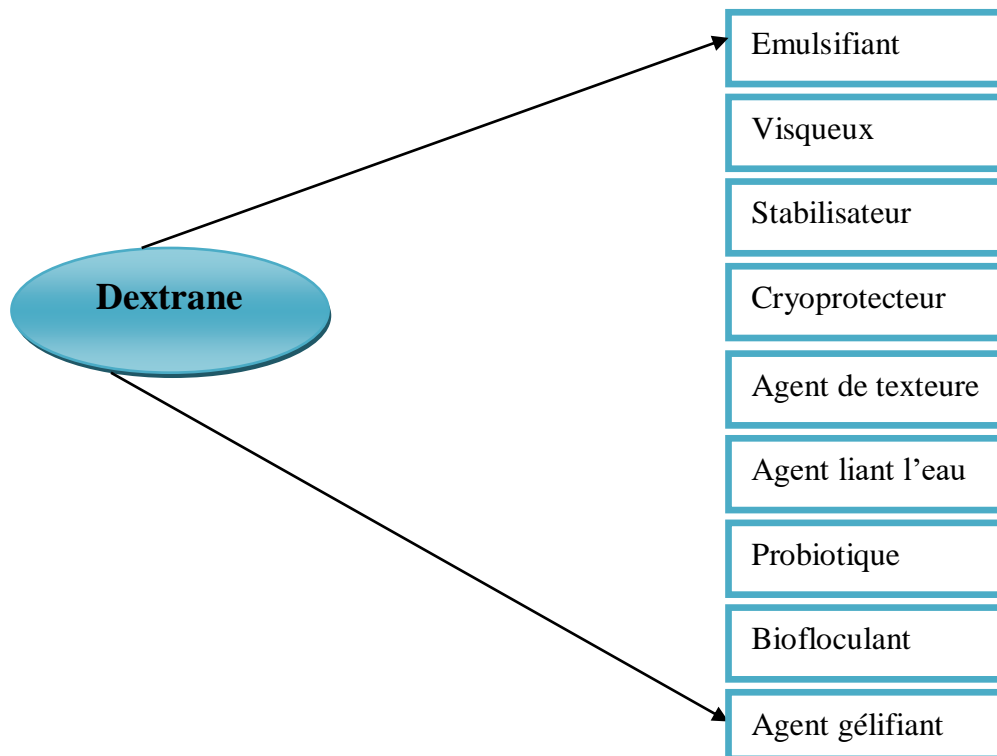
Parmi les nombreuses espèces productrices de dextrane *L. mesenteroides* NRRL B512F et *L. mesenteroides* NRRL B1299 ont été bien caractérisés et classés. Le dextran de *L. mesenteroides* B512F contient 95% des liaisons  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  6) et 5% des liaisons ramifiées  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  3); alors que le dextrane insoluble de *L. mesenteroides* 1299 contient 63%  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  6), 27%  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  2) et 8% de liens  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  3) (Thiyagarajan et al., 2017 ; Sarwat et al., 2008).

Le dextrane (HoPS) produise par les BL n'est pas entièrement compris et il semble pour varier entre les genres, les espèces et même les souches. L'utilisation de dextrane comme réserve de source de carbone pour les bactéries n'est pas clairement démontrée, mais il a été rapporté que *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* peuvent dégrader le dextrane en produisant dextransases. En plus, les dextrans semblent jouer un rôle dans la réponse bactérienne à différents soulignes. *Lc. mesenteroides* BD3749 a produit une grande quantité d'EPS insoluble après exposition au stress oxydant en plus au Saccharose. *Leuconostoc gelidium* et *Leuconostoc gasicomitatum* pris en charge forte formation de vase après 2–3 semaines de stockage à 0–6 C° (Besrou-Aouam et al., 2019).

### II.2.1. Caractérisation du dextrane

La caractérisation structurelle du dextrane est un facteur important pour son utilisation. Et les propriétés bénéfiques, ainsi stimulait un intérêt pour la découverte de nouveaux EPS bioactifs. Une stratégie générale pour la caractérisation du dextrane est représentée sur la (Figure.7) (Kothari et al., 2014 ; Feng et al., 2018).





**Figure 7:** Propriétés général du dextrane utilisé dans l'industrie (Kothari et al., 2014).

À l'heure actuelle, les souches productrices de glucane sont principalement des *Streptocoques*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus*. Parmi elles, les espèces *Leuconostoc* sont les principaux producteurs de dextrane qui a une variété de structure et de propriétés physicochimiques et peuvent être utilisées comme nutraceutiques. En donnant des exemples, la caractéristique du dextrane synthétisé par *Leu.citreum* S5 grandement dépend de la concentration de saccharose et le produit peut être utilisé comme les ingrédients alimentaires ayant des propriétés fonctionnelles et rhéologiques; le dextrane à ramification fortement  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  2) est généralement utilisé comme prébiotique; le dextrane bien connu produit par *Leu.mensenteroides* B-512F est largement utilisé comme substitut du plasma sanguin en raison de la faible antigénicité, solubilité dans l'eau élevée et stabilité biologique élevée dans la circulation sanguine chez l'homme (Feng et al., 2018).

### II.2.2.Source et la production de dextrane

Le dextrane est naturellement présent en petites quantités dans les aliments, comme le sucre cristallisé raffiné, le sirop d'érable, le jus de choucroute et le miel, ainsi que comme composant de la plaque dentaire. Le dextrane est synthétisé par l'action de l'enzyme bactérienne, la dextransucrase, sur le saccharose. La dextransucrase est la seule enzyme industrielle utilisée dans la production commerciale de dextrane (**Kothari et al., 2014**).

Traditionnellement, le dextrane est produit en une seule étape processus. Dans les années 40, la synthèse du dextrane à partir de dextransucrase sans cellules a été réalisée pour la première fois. Par la suite, différentes compositions moyennes et conditions de fermentation ont été utilisées plusieurs méthodes de fermentation: batch, fedbatch et la culture continue, ainsi que les différents des critères d'aération ont été employés. La méthode d'immobilisation pour la production a également été étudiée (**Michelena et al., 2003**).

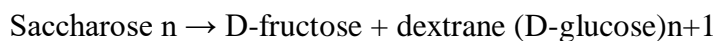
Le dextrane est produit au niveau industriel par la fermentation de milieux riches en saccharose. Plusieurs chercheurs ont optimisé et les travailleurs ont optimisé les conditions de fermentation pour une production maximale de dextrane. Il a été rapporté plus tôt que le poids moléculaire et le rendement de la production de dextrane dépendent des variables du procédé tels que la température entre 25° et 30C° et un PH neutre (6,7-7,2), le saccharose et la concentration de l'accepteur. Il a également été mentionné que le milieu contenant une source d'azote et tension d'oxygène et période d'incubation, additionnée de différents sels augmentait la production de dextrane donnant des dextrans solubles et insolubles sont produits et les poids moléculaires varient de  $1,5 \times 10^4$  à  $2 \times 10^7$  et plus (**Thiyagarajan et al., 2017 ; Vandtori et al., 2012 ; Besrou-Aouam et al., 2019**).

**Zarour et al (2017)** détecté la présence de ESP dextrane phénotypiquement par culture sur MRSs (saccharose) agar et incubé pendant le temps. La localisation d'EPSdétérmine par la microscopie électronique à transmission (MET).

**Devoyod et Poullain(1988)** montrent qu'il existe deux types de colonies observées sur le milieu au saccharose de Mayeux, Sandine et Elliker (1962) : de grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge ; et de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.

### II.3.Action de Dextransucrase

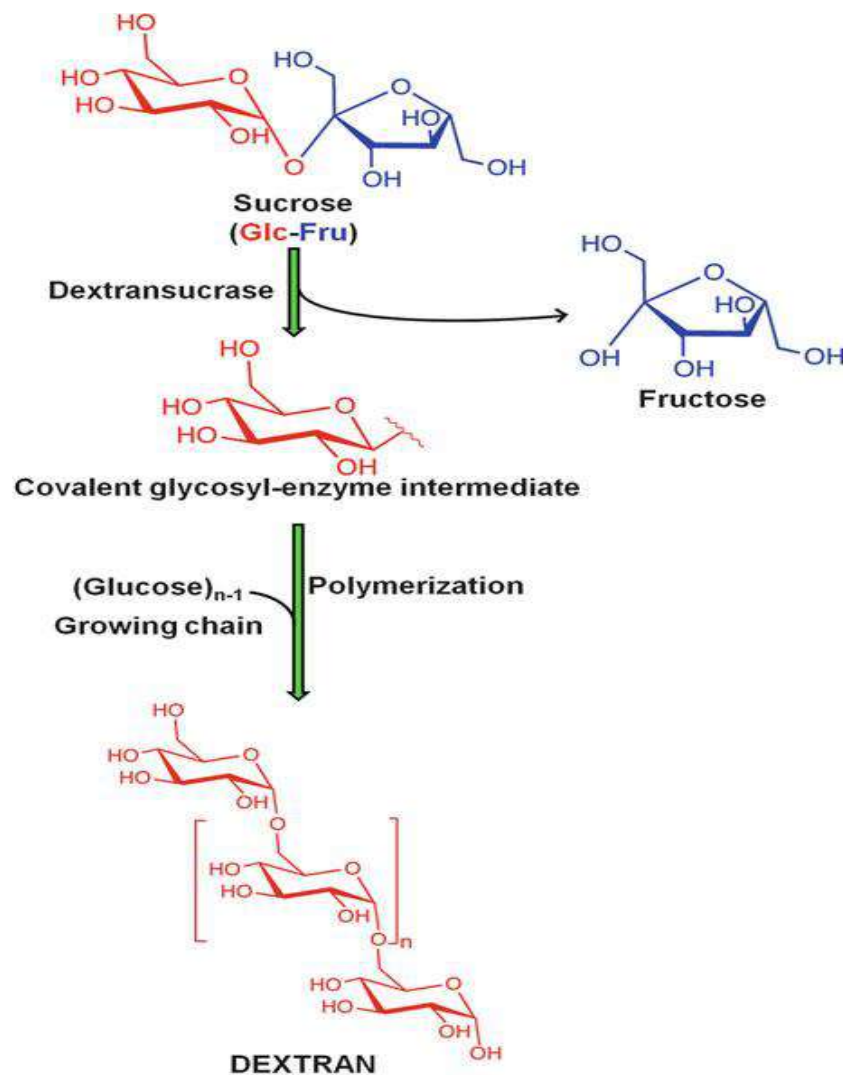
La dextransucrase (saccharose: 1, 6-a-D-glucane 6-a-glucosyltransférase (GTF), (EC 2.4.1.5) est une enzyme extracellulaire produite par diverses espèces des genres *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* impliquées dans la réaction de synthèse du dextrane à partir du saccharose. Particulièrement catalyse le transfert de glucosyle unités de saccharose en molécules accepteurs. Il en résulte la synthèse de glucooligosaccharides et la libération de fructose dans le bouillon (Figure.8) (Dols et al., 1997 ; Michelena et al., 2003). Selon la réaction chimique suivante (Abdelfattah et al., 2012).



La synthèse de dextrane implique une seule dextransucrase extracellulaire (Dsr), enzyme codée par le gène Dsr. Dextransucrases sont membres de la famille GH70 selon le CAZy (Carbohydrate-Active Enzyme) qui est basée sur la similarité de séquence (<http://www.cazy.org>), classification1 et ils synthétisent le dextrane en utilisant un substrat de sucres. Ils catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidique de saccharose et utilisent l'énergie libérée pour catalyser le transfert des résidus D-glucopyranosyle à la culture polymère, avec une libération concomitante de fructose (Besrou-Aouam et al., 2019).

Naessens et al (2005) dit que le dextrane ne peut pas être produit par la dextransucrase à partir de glucose, mélanges de glucose et de fructose ou tout autre autres sucres naturels; le saccharose est absolument obligatoire (Naessens et al., 2005).

Les études les plus récentes rapportent la production de dextransucrase par fermentation de glucoses en utilisant des mutants constitutifs de *L. mesenteroides* NRRL B-512F. D'un autre côté, il y a eu très peu de rapport traitant de la production de dextransucrase par *L. mesenteroides* NRRL B-1299. L'activité la plus élevée signalée est 4,0 U.ml<sup>-1</sup>. La dextransucrase est produite sous deux formes : forme soluble et insoluble. La forme insoluble rend compte 60 à 95% de l'activité totale produite et est récupéré après centrifugation dans la couche cellulaire (Dols et al, 1997).



**Figure 8 :** Mécanisme à double déplacement de la réaction de dextranase (Kothari et al.,2014).

#### II.4.Application de dextrane

Le dextrane (un α-D-glucan à 95% liaison glycosidique linéaire α-1,6 avec 5% de α-1,3 ramifications glycosidiques aux positions O-2, O-3 ou O-4 biodégradable) est un biopolymère le plus utilisé dans le monde entier. Sa diversité dans le degré de la ramification et la longueur de chaîne lui confère plusieurs propriétés, qui définissent son application (Besrou-Aouam et al.,2019 ; Zarour et al.,2017).

Les dextrans ont diverses utilisations dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et industries de forage pétrolier. Ce large spectre des applications est dû aux différences physico-chimiques telles que leur masse moléculaire, qui influence la viscosité et propriétés rhéologiques de la solution de polymère. Dextrans de haute la masse

moléculaire est utilisée pour la récupération du pétrole; ceux de moyenne les masses moléculaires sont employées dans l'industrie chimique ; tandis que les dextrans de faible masse moléculaire trouvent des applications dans l'industrie pharmaceutique dermatocologique pour microbiote cutané, applications cliniques et dans les industries photographiques. En cosmétique, ils sont utilisés comme hydratants et épaississants et dans les aliments l'industrie, ils sont ajoutés aux produits de boulangerie par l'incorporation de dextrane dans le pain pour l'amélioration des propriétés rhéologiques et de la qualité est susciter de l'intérêt. La connaissance croissante du levain la fermentation génère de nouvelles opportunités pour son utilisation dans le domaine de la boulangerie. La production de dextrane *in situ* par *Weissella sp.* et *Leuconostoc mesenteroides* ont amélioré la fraîcheur, la sensation en bouche, la texture, le volume du pain, douceur et durée de conservation du pain de blé au levain (Zarour et al.,2017 ; Kothari et al.,2014).

Aux confiseries, le dextrane améliore la douceur ou la rétention d'humidité, pour éviter et inhiber la cristallisation du sucre. Il gélifiant les gommages et les bonbons gélifiés dans les confiseries. Il est également utilisé en soft boissons, extrait d'arôme, boissons lactées et glaça, augmenter la viscosité, la rhéologie, la texture et le volume. Dans les produits laitiers, le dextrane améliore la liaison à l'eau, la sensation en bouche et onctuosité des préparations faibles en gras, la texture du yogourt. EPS produit par BL, en particulier le dextrane, a eu un effet positif sur les propriétés rhéologiques des gels de lait acidifiés avec une viscosité, une onctuosité et une synérèse réduites en raison de sa capacité de liaison à l'eau (Kotharia et al., 2014).

De plus, la demande croissante des consommateurs pour les produits sans gluten et les aliments faibles en gras ont une potentialisé à l'isolement de la production de dextrane par les BL de divers aliments. Le dextrane est un bon candidat pour faire du fromage allégé pour plusieurs raisons. La réduction de la graisse dans le fromage entraîne de nombreux défauts de texture et de fonctionnalité. La teneur élevée en caséine en fromage à faible teneur en matière grasse confère un corps et une texture ferme et caoutchouteuse. Et également utilisé comme cryoprotecteur dans la crème glacée (Naessens et al., 2005).

Le dextran est non toxique et considéré comme ayant de nombreux avantages par rapport aux autres glaces stabilisatrices. Les mélanges de crème glacée contenant 2 à 4% de dextrane ont conféré des propriétés bénéfiques à la viscosité (Besrou-Aouam et al.,2019 ;Kotharia et al.,2014.).

Ces HoPS jouent également un rôle important dans la stabilisation des aliments surgelés et peut être utilisé comme films, pour préserver la surface de poisson, de viande, de légumes ou de fromage provenant de l'oxydation par des microorganismes indésirable et d'autres changements chimiques . Dans le domaine médical, les dextrans sont largement utilisés comme substituts, expanseurs du plasma sanguin et comme héparine substituts, pour la thérapie anticoagulante. Ils peuvent également produire dextrans de fer, qui sont utilisés en solution pour le traitement de l'homme et carence anémique vétérinaire. De plus, le sulfate de dextrane a également montré un effet antiviral contre l'immunodéficience humaine, et nous avons récemment démontré que les dextrans synthétisés par BL ont le potentiel comme antiviraux et agents immunomodulateurs chez la truite. Ainsi, les dextrans peuvent être utilisés à l'avenir pour la fabrication d'aliments et aliments fonctionnels (**Zarour et al.,2017 ;Kothari et al.,2014**).

Egalement le dextrane peu conjugués avec autre polymère pour améliorer certains caractères par exemple une conjugaison avec les protéines quisont largement utilisées dans les produits alimentaires tels que les boissons, le yogourt, la mayonnaise et les glaces. Les propriétés fonctionnelles des protéines peuvent être améliorées conjugaison de protéines et de polysaccharides par réaction de Maillard,réaction chimique impliquant l'interaction entre les amines et les composés carbonylés. La réaction de Maillard ajoute à l'arôme, au goût et à la couleur de café et de fèves de cacao, de pain, de gâteaux, de céréales et de viande. L'amélioration des propriétés fonctionnelles de différentes protéines, telles que l'ovalbumine, le lysozyme. Autre conjugaison réalisée par **Eléonore** en (**2016**) dans leur étude, un copolymère à base de dextrane et de poly (méthacrylate de butyle) (PBMA) est utilisé comme revêtement de sentes et pour améliorer l'adhérence à la surface en formant des liens covalents avec la surface. Pour ce faire, cela nécessitait l'activation de la partie dextrane du copolymère afin de pouvoir le greffer à la surface aminée, propriétés élastiques et anti-adhérentes présentées par les films de copolymères CMD-Co-PBMA (Carboxyméthyl-dextrane-Co-poly (méthacrylate de butyle). les rendent particulièrement intéressants pour des applications comme revêtements de cathéters à fin d'améliorer des propriétés biologiques.

## **II.5.Effets secondaires du dextrane**

Le dextrane a acquis le statut GRAS auprès de la FDA américaine, qui a été renouvelé en 2013.Cependant, plusieurs effets secondaires sont également associés au ce polymère (**Kotharia et al., 2014**).

Le dextrane est impliqué dans le processus de caries dentaires. Les bactéries pathogènes du genre *Streptococcus* produisent du dextrane insoluble, qui favorise l'adhésion des bactéries sur les dents et provoque la formation de plaque dentaire. L'oral le dextrane ingéré se transforme rapidement en glucose et, par conséquent, il est nocif pour les patients diabétiques (**Kotharia et al., 2014**).

Le gonflement ou l'effet osmotique du dextrane est également associé à une insuffisance rénale aiguë chez les patients. Il a également été signalé que le dextrane de haut poids moléculaire induit des anticorps anti-dextrane, conduisant à réactions anaphylactoïdes chez certains patients. La production de dextrane est reconnue comme une nuisance pour l'industrie sucrière depuis des décennies. La formation de dextrane crée des problèmes de transformation dans les opérations des usines de sucre brut et conduit à une baisse de la récupération du sucre, se traduisant par une perte économique. Le dextrane crée également des difficultés de traitement en augmentant la viscosité du jus de fruit et sirops modification indésirable, une mauvaise clarification et l'allongement des cristaux. De plus, le dextrane a un impact significatif sur le marché résultant sur le produit final transformé. Dans certains cas, le dextrane est également responsable de la détérioration des aliments dans l'industrie du rhum et des produits de viande salée (**Kotharia et al., 2014 ; Ait-Abdelouahab, 2008**).

***Chapitre III***  
***Les études***  
***Technologiques et***  
***Application***



### III. Etudes technologiques et application

D'après **Bergmaier** en (2002) le terme "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire" a été proposé par **Sutherland (1972) et Cerning (1994)** comme appellation générale, pour le groupe des BL. Les EPS produits semblent jouer un rôle dans leur capacité pour les interactions bactéries-bactéries et cellules eucaryotes-bactéries ou la reconnaissance ainsi que dans la protection des microbes cellules contre plusieurs facteurs environnementaux et microbiens (dessiccation, pH, stress osmotique, bactériophage, antibiotiques, Lysozyme). Ce qui rend un matériau biologique important qui a été découvert et étudié à ce jour, dont le dextrane, qui a été découvert dans les années quatre-vingt produise principalement par *Leuconostoc*. Se EPS présente dans la recherche scientifique est pende une debout en tant que matériau renouvelable et productif, cela confirme leur importance. Nous allons sélectionner quelques études qui ont été faites précédemment sur se EPS microbienne (dextrane) et nous verrons l'étendue de son étude et utilisation dans plusieurs domaines au cours des années (**Besrou-Aouam et al., 2019**).

#### III.1. Etudes générale

##### III.1.1.Dominance de *Leuconostoc* dans la production de dextrane

D'après l'étude de **Devoyod et Poullain** en (1988) sur les souches de *Leuconostocs* et leur rôle, Huckler et Pederson sont classés les groupes II et III des producteurs de dextrane, or bien que *Leuconostoc citrovorus* ne produise pas de dextrane, les propriétés de production de gomme par des organismes faibles producteurs d'acide isolés de levains montrent, qu'ils sont identiques aux organismes dextranes positifs isolés des végétaux et des sirops de sucre.

La bactérie *Leuconostoc mesenteroides* est utilisée industriellement pour produire des dextranes et est l'espèce la plus commune isolée des aliments fermentés et des produits alimentaires. De plus, ses propriétés antagonistes ou synergiques reconnues dans les populations de microflore mixtes ont conduit à des études sur son importance dans certaines cultures de démarrage (**Thiyagarajan et al., 2017**). **Zarour et al (2012)** isolent dix-huit souches de *Leuconostoc* pour une utilisation technologique. Leur étude motionnée que la cinétique de croissance, l'évolution de l'acidification et la production de dioxyde de carbone de *L. mesenteroides subsp. dextranicum* dans du lait écrémé à 30°C ont été légèrement supérieur à *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*. Ajout d'extrait de levure au lait écrémé stimule le développement de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* en augmentant sa

croissance, activité d'acidification et dégagement de CO<sub>2</sub>. **Zarour en (2018)** isolé vingt-huit souche de *Leuconostoc* a partir des niches écologique déférente tel que le lait d'chèvre, chamelle et lait d' brebis aussi l'ensilage, le miel et le fromage bleu, parmi ces vingt-huit souches trois non ne sont pas productrice d'EPS. Alors que les *Leuconostocs* ont pris peu à peu un intérêt économique potentiel et des tentatives de classification sont apparus dès les années 30 (**DevoyodetPoullain1988**).

La détection des colonies muqueuses des souches productrices d'EPS (*Leuconostoc*) a été utilisée comme teste de phénotype pour sélectionner les bactéries productrices d'EPS. De plus, nous avons précédemment détecté une production de dextrane par le BL de viande en milieu solide contenant du saccharose. Produire EPS a été analysé dans des milieux solides MRS, contenant soit saccharose ou glucose. Ont révélé que toutes les bactéries présentes des colonies visqueuses et muqueuses, lorsqu'elles sont cultivées pendant 48 h sur MRSs mais pas sur MRSG même après incubation pendant 72 h ou plus. En présence du saccharose, deux types de morphologies ont été observés, *Lc. mesenteroides* CM9 et *Lb Kg. sakei* MN1 a présenté des colonies convexes fermement adhérees à la gélose avec une gomme gélifiée persistante, même après 120 h d'incubation. En revanche, les trois autres souches de *Lc. mesenteroides* ont montré des colonies plates avec une faible adhérence à la gélose. Les *Leuconostocs* ont été générés du dextrane sur le milieu MSE et du dioxyde carbone, utilisent le citrate et résistent à 55°C pendant 15 minutes, ce qui favorise leur utilisation industrielle (**Zarour et al., 2017 ; Zarour et al., 2012**). Autre culture de *L.mesenteroides* BD1710 ce fait sur le milieu jus de tomate-saccharose était du dextrane avec un pic moléculaire poids de  $6,35 \times 10^5$  Da, un squelette linéaire composé d'unités d-glucopyranosyle liées - (1 → 6) consécutives et d'environ 6% - (1 → 3) branches cette étude peut renforcer la possibilité du milieu jus de tomate-saccharose comme méthode alternative de fabrication dextrane à grande échelle ( **Han et al.,2014**). Aussi autre culture ce fait par **Moosavi-Nasab et al (2009)** pour la production de dextrane à partir d'extrait de datte (2.8%) et saccharose comme sources de carbone par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512.

La souche *Leuconostoc mesentéroïdes*B 512-F est le microorganisme le plus employé pour la production commerciale du dextrane, notamment du dextrane clinique (**Thiyagarajan et al., 2017**).

Cette bactérie contient une enzyme, la dextrane-sucrase, qui réagit avec le saccharose pour former du fructose et un dextrane dit« natif».Ce dextrane «natif» possède une forte

masse molaire et une large distribution de taille (les masses molaires des chaînes obtenues varient de quelques centaines à plusieurs dizaines de millions de g/mol). Après hydrolyse partielle de ce dextrane « natif » en présence d'acide chlorhydrique, le mélange de dextrans obtenue est fractionné à l'aide d'un mélange eau/éthanol. Les fractions de dextrane sont constituées de macromolécules hautement linéaires. Leurs masses molaires sont variables, mais réduites par rapport à celle du dextrane « natif » et les taux de ramification sont en général inférieurs à 5%. Ces dextrans sont généralement désignés par l'intermédiaire de leur masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) sous le nom générique T  $M_w$  où la masse molaire est exprimée en kg/mol (les dextrans commerciaux les plus courants sont des dextrans (T10, T40, T70, et T110). Les indices de polymolécularité pour les dextrans T40 et T70 sont de l'ordre de 1,6-1,7. Compte-tenu du procédé de fabrication, des variations (masses molaires, indice de polymolécularité et degré de ramification) entre les lots de dextrane commerciaux sont souvent observées (Nouvel, 2002 ; Thiyagarajan et al., 2017).

### III.2.Dextrane clinique

Les dextrans ont d'abord été introduits dans la pratique clinique comme expandeurs de volume de plasma colloïdal en 1947. Aujourd'hui, Dextran40, 70 et 75, collectivement appelés dextrans cliniques, sont également largement utilisés pour la prophylaxie thromboembolique postopératoire. Comme décrit dans l'éditorial de ce numéro sur les dextrans par Dr Ljungstrom, les dextrans cliniques sont couramment utilisés à la fois la chirurgie vasculaire et en plastique et reconstructrice la chirurgie pour leur capacité à réduire l'agrégation plaquettaire et favoriser la circulation sanguine dans la microcirculation. Dextrane 70 a été approuvé pour la première fois aux États-Unis (États-Unis) en 1952 pour l'expansion du volume plasmatique dans le traitement du choc, suivie par dextrane 40 en 1967 pour l'expansion du volume de plasma et comme prophylaxie contre la thrombose veineuse et pulmonaire embolie chez les patients subissant des interventions chirurgicales à risque de complications (Zinderman et al., 2006).

L'OMS en (1991) classe le dextrane comme un médicament à des doses précises utilisés en anesthésie précisément un substituant de sang, en particulier le dextrane 70 (masse moléculaire relative 70 000) est retenu dans le compartiment vasculaire ou, comme l'albumine, il contribue au maintien de la pression oncotique du plasma. À l'inverse de cette dernière s'il est donné en grande quantité, il inhibe l'agrégation plaquettaire et facilite la fibrinolyse.

**Scheroder et al (1982)** expérimenté le dextrane T40 dans les déplacements de fluide à travers les membranes placentaires dépendent de l'osmose hydrostatique, osmotique et colloïdale. Même des changements mineurs dans l'équilibre de ses forces peuvent provoquer de grands déplacements de fluide entre la mère et le fœtus car la perméabilité placentaire est assez élevée. L'étude a été entreprise pour explorer les relations quantitatives entre les déplacements du liquide transplacentaire et l'osmose colloïde materno-fœtal différences de pression induites par le dextrane T40 (**Schroder et al.,1982**).

Le rapport des États-Unis par **FDA (1969 à 2004)** sur les dextrans cliniques 40 et 70 sont associés à des réactions anaphylactoïdes causées par des anticorps immunoglobulines G réactifs au dextrane définie le cas pour un événement anaphylaxie ou anaphylactoïde probable signe ou symptômes requis provenant d'au moins deux systèmes corporels, au moins un signe ou symptôme étant l'hypotension, Vasodilatation, ou difficulté respiratoire, et apparition dans les 60 minutes. La FDA a reçu 366 rapports cliniques d'événements indésirables liés au dextrane de 1969 à 2004, dont 90 (24,6%) anaphylaxie, événements anaphylactoïdes (**Zinderman et al., 2006**).

Le dextrane clinique n'incrimine pas dans le type (40 et 70 etc.), La séparation des composés organiques iodés de la thyroïde et du sérum a largement bénéficié depuis 15 ans de l'association de la technique du traceur isotopique et de la chromatographie sous ses différentes formes. mais récemment le dextrane comme un support de filtration (Sephadex). La filtration sur gel de dextrane (Sephadex) appliquée à l'analyse des composés iodés du sérum et de la glande thyroïde permet de recueillir avec un rendement quantitatif les acides aminés iodés contenus dans un mélange complexe (sérum, hydrolysate thyroïdien) dans un volume faible d'effluent (**Lissitzky et al, 1962**).

### III.3.Dextrane dans l'industriecomercial

La première observation sur la détérioration des aliments par *Leuconostoc* remonte probablement à 1861, les premiers jours de la bactériologie, lorsque **Louis Pasteur** découvre que la gélification dans le sirop de sucre de canne était due à de petites cellules bactériennes ressemblant à des billes. En 1878, un autre naturaliste français, **Philippe van Tieghem**, a étudié ces bactéries formant des boues et les a nommées «*Leuconostoc mesenteroides*». À ce jour, *Leuconostoc spp.* sont impliqués dans la détérioration des aliments emballés et réfrigérés, viande et produits à base de viande. Dans la plupart des cas signalés d'Altération

des aliments *Leuconostoc*, le nombre de BL dans les aliments avariés avait atteint niveaux supérieurs à  $10^7$  UFC / g.

*L. mesenteroides* est associé, en combinaison avec d'autres bactéries lactiques, avec production de choucroute. Dans outre l'acidification, *L. mesenteroides* est responsable pour les composés aromatiques mais aussi, dans certains cas, pour détérioration par la production de dextrane. Dans l'industrie du rhum, la formation de dextrane de *Leuconostoc* cause des problèmes broyage à fermentation. Dans les produits de viande salée, des souches de *Leuconostoc* formant des boues ont été identifiées parmi les décolorants, les mauvaises odeurs et le mauvai goût produire des bactéries d'acide lactique. De plus, les souches ropy ont été isolés de viande cuite emballée sous vide produits(Säde, 2011).

En raison de leur tolérance à l'acide et à l'alcool, certaines bactéries d'acide acétique peuvent se développer dans la bière et provoquer la détérioration, le seul facteur limitant leur croissance dans la bière est le manque d'oxygène. Cependant, certaines espèces peuvent gérer avec seulement une quantité minimale d'oxygène. Outre l'acétification de la bière, ces organismes peuvent provoquer un «encrassement» ou une viscosité de la bière synthèse de dextrane gélatineux. Formation du film et la turbidité causée par les bactéries d'acide acétique sont en effet formes courantes de détérioration dans la bière pression en partie fûts remplis. **Baker et al** ont été les premiers à réaliser une enquête approfondie sur les micro-organismes associés au type d'altération de la bière connu sous le nom de filage. Les organismes responsables ont été identifiés comme étant *Acetobacter viscosum* et *A. capsulatum* (maintenant réaffecté au genre *Gluconobacter*) et maintenant connu pour produire dextrane de (bière) maltodextrines avec leur dextrane activité de dextrinase. Ces souches de «spoiler de bière» et leur dextrane dextrinase enzyme sont maintenant également étudiées de manière intensive comme biocatalyseurs utiles pour produire des (oligo) dextranes à partir de maltodextrines (Naessens et al., 2005).

Le cas échéant, la manipulation de la formulation du produit peut inhiber la détérioration activités des *Leuconostocs*. Par exemple, comme le saccharose est le précurseur de production de dextrane (slime), la substitution du saccharose par un autre édulcorant comme le glucose, les alcools de sucre ou les édulcorants artificiels empêche formation de dextrane. Parfois, des ingrédients alimentaires mineurs tels que des épices, des herbes et des édulcorants peuvent stimuler la croissance des *Leuconostocs*. **Kivanç et al (1991) ont** rapporté que le cumin a stimulé la croissance de *L. mesenteroides* dans une culture en

bouillon (Zarour et al.,2012). De plus, les aliments à base de tomate (c.-à-d. Jus, pâte, extraits) contiennent du dpantothénate (également appelé «facteur de croissance du jus de tomate»), un substrat requis par *Leuconostoc spp.* En effet,des constatations sur la détérioration par *Leuconostoc* des lanières de filets de poulet grillés suggèrent que la marinade contenant des tomates et des sucres stimule la croissance de *L. gasicomitatum* et d'un gaz subséquent voluptueux dans l'emballage formation décrit par(Säde, 2011).

Bien que le dextrane soit connu depuis longtemps pour causer des problèmes lors de la transformation du sucre, peu d'industries dans le monde ont adopté des directives strictes et claires pour résoudre ce problème. La cause de loin la plus importante des niveaux élevés de dextrane dans le sucre brut est la détérioration après récolte de la canne à sucre, en particulier lorsqu'elle est récoltée mécaniquement sous forme cantonnée. L'industrie australienne, qui est passée de la récolte manuelle à la récolte mécanique dans les années 60 et 70, a rapidement reconnu les problèmes causés par l'augmentation importante des niveaux de dextrane qui a accompagné ce changement. De nouvelles directives et mesures incitatives ont été élaborées pour encourager et garantir que la canne a été livrée pour le broyage dans les heures qui suivent la combustion / la récolte (Rovno et Purchase, 2005).

La production de dextrane responsable a des pertes économiques mais a autre coté elle est indispensable dans la technologie moderne et l'usage industriel.

**Charpentier, en (1964)** dans leur étude traitée par le ferdextrane le problème de la production intensive de viande par de jeunes bovins abattus entre 10 et 18 mois pose actuellement de nombreux problèmes techniques et économiques. Les fréquentes difficultés de commercialisation de ces animaux sont imputables à la réaction défavorable de l'acheteur envers un type de viande qui ne présente pas les caractéristiques auxquels il est habitué. L'insuffisance de coloration de ces viandes semble être le plus souvent, pour l'acheteur, le principal motif de disqualification. Cette faible coloration est due essentiellement à la faible teneur en myoglobine qui caractérise d'une façon générale toutes les viandes jeunes. Lors d'une étude antérieure nous avons mis en évidence l'existence d'une liaison entre l'hématocrite à l'abattage et la teneur en pigment musculaire. Cette liaison se trouve confirmée parCharpentier dans l'expérience par utilisation de ferdextrane a l'aide d'une comparaison en présence et en absence du ferdextrane, il se trouve l'utilisation de ferdextrane une valeur élevé des hématocrites para port à cette absence alors la coloration de viande des jeunes bovins elle efficace par l'utile de ferdextrane.

### III.4. Etudes spécifiques

#### III.4.1. Types de dextrane synthétisés par la dextransucrase

Naessens *et al* (2005) mentionné qu'en 1954, Jeanes *et al.* ont déterminé approximativement la structure de plusieurs dextrans. À cette époque, cependant, la nature des liens avec les succursales, leur répartition et la longueur des chaînes de ramification n'avait pas été définitivement déterminée. Depuis lors, de nombreuses recherches sur la structure ont été effectuées sur des dextrans obtenus à partir de diverses souches de *L. mesenteroides* et *Streptococcus mutans* utilisant la méthylation, l'oxydation du périodate et la CNMR Spectroscopie. Dextrans peuvent être divisés en trois classes en fonction des caractéristiques structurales: les dextrans de classe I contiennent une chaîne principale de glucosyle lié en  $\alpha$  (1,6) résidus consécutifs, avec ramification en position 2, 3 ou 4; les dextrans de classe II contiennent des  $\alpha$  (1,3) non consécutifs - et les liaisons  $\alpha$  (1,6) et les liaisons  $\alpha$  (1,3) ramifiées; et classe III dextrans contiennent des liaisons  $\alpha$  (1,3) consécutives et Liens  $\alpha$  (1,6) -branches. La classe I comprend la plupart des polysaccharides, généralement considérés comme des dextrans. *L. mesenteroides* B-512F dextrane est le classique dextrane (classe I) contenant un pourcentage élevé (95%) de liaisons  $\alpha$  (1,6) consécutives et un relativement faible pourcentage (5%) de liaisons  $\alpha$  (1,3) -branches. Là est une controverse sur les longueurs de la branche Chaînes. Certaines études chimiques ont indiqué que la plupart des chaînes ramifiées sont du glucose à liaison  $\alpha$  (1,3) uniques résidus. Cependant, des études physiques ont indiqué que les chaînes de ramification sont relativement longues avec 50–100 Résidus de glucose liés par  $\alpha$  (1,6). Examen du mécanisme de synthèse des liaisons de branche suggère que la structure est un mélange de chaînes ramifiées de simples résidus de glucose et longues chaînes de nombreuses liaisons  $\alpha$  (1,6) résidus de glucose la fraction L (moins soluble) de *L. mesenteroides* B- 1355 a une structure identique à celle du B-512F dextran. Une autre structure liée à celle d'un B-512F dextrane est la fraction L de *L. mesenteroides* B-742. Il contient 87% de liaisons  $\alpha$  (1,6) mais a 13% de liaisons  $\alpha$  (1,4) -branchées au lieu de  $\alpha$  (1,3) -branches liens. En raison des liaisons  $\alpha$  (1,4) -branches, cependant, le comportement de ce dextrane diffère de celui du dextrane B-512F; il est beaucoup plus résistant à l'hydrolyse de l'endodextranase que ce qui serait attendu pour une molécule n'ayant que des liaisons ramifiées  $\alpha$  (1,3). Il a été suggéré qu'une liaison  $\alpha$  (1,4) -branche confère une conformation différente de la molécule de dextrane qu'une liaison  $\alpha$  (1,3) -branche. Cette différence en conformation peut expliquer les différences de sensibilité à l'endodextranase (Naessens *et al.*, 2005).

**Cristiane Rabelo et al en (2011)** étudiée la stabilité de dextransucrase, du brut dextransucrase de *Leuconostoc citreum B-742* a été évaluée en culture synthétique et en culture de jus de pomme de cajou bouillon. Conditions de stabilité optimales pour la dextransucrase de *L. citreum B-742* étaient différents de ceux rapportés pour son enzyme parentale de souche industrielle (*L. mesenteroides B-512F*). Dextransucrase brute, de *L. citreum B-742*, produit en utilisant du jus de noix de cajou comme substrat, présenté une stabilité plus élevée que l'enzyme brute produite en utilisant milieu de culture synthétique, présentant le même comportement déjà signalé pour la dextransucrase de *L. mesenteroides B-512F*. L'enzyme brute présente une bonne stabilité dans du jus de pomme de cajou pendant 48 h à 25 C et pH 6,5.

Le dextrane synthétisé par l'enzyme de dextransucrase et dégradé par un notre enzymes quel que soit utile (synthèse des oligosaccharides) ou pour une autre purification ces enzymes appelé pratiquement les dextranaes. **Tsuchiya et al en (1952)** fait notre recherche d'enzymes hydrolysant le dextrane (les dextranases), sur des organismes cultivés sur du dextrane et capables de cliver la liaison (1,6), commencée en 1945, nous avons criblé environ 200 souches de bactéries, levures et moisissures pour leur capacité à produire de la dextranase extracellulaire. Comme **van Tieghem (1878)**, **Colin et Belval (1940)** et d'autres, nous n'avons pas pu trouver d'organismes produisant de grandes quantités d'enzyme parmi les bactéries et les levures. En outre, un micro-organisme peut produire plus d'un type d'enzyme dextran dépolymérisant, ont indiqué que les souches de *Penicillium lilacinum*, *P. funiculo* et *Spicaria* ont produit une quantité considérable quantités de dextranase extracellulaire (**Tsuchiya et al.,1952**).

### III.5.Recommandations sur EPS microbienne d'après Ates (2015)

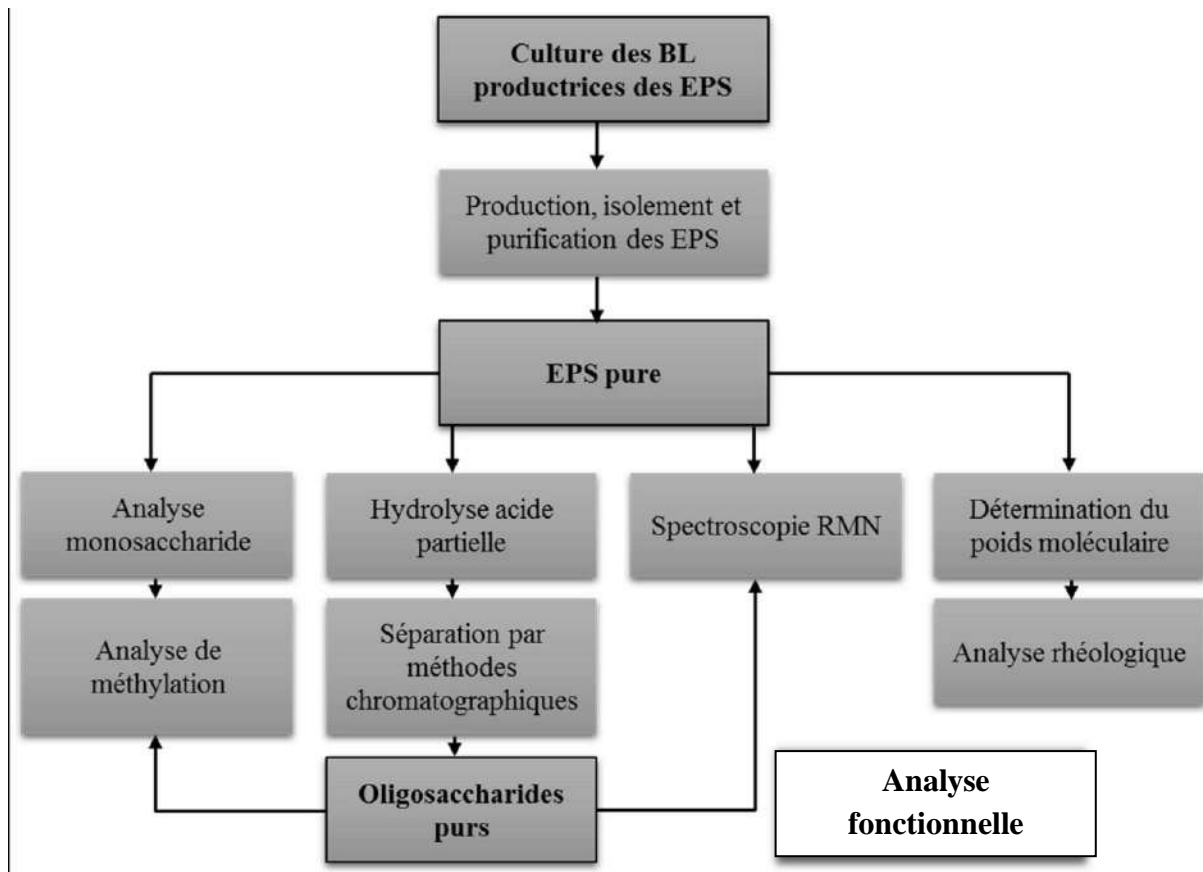
Dans la production microbienne d'EPS, une meilleure compréhension du mécanisme de biosynthèse est un enjeu important pour l'optimisation des rendements de production, l'amélioration de la qualité et des propriétés des produits, et également pour la conception de nouvelles souches. Comme la plupart des nouvelles bactéries. Les EPS aux propriétés uniques ont des coûts de production élevés et les obstacles économiques doivent être surmontés, ces informations précieuses sur la biosynthèse est également important pour réduire ces charges (**Ates,2015**).

De plus amples informations sur le génome des micro-organismes producteurs d'EPS permettront de développer des stratégies supplémentaires pour améliorer avec succès le taux



de production d'EPS et également de modifier leurs propriétés en modifiant la composition et la longueur de la chaîne. Étant donné que la reconstruction à l'échelle du génome comprend chaque réaction de l'organisme cible en intégrant l'annotation du génome et les informations biochimiques, une approche de modélisation métabolique basée sur les systèmes constitue une étape importante vers la compréhension de l'interaction entre le métabolisme et la biosynthèse des EPS. Étant donné que la biosynthèse des biopolymères microbiens est le résultat d'un système complexe de nombreux processus métaboliques, les systèmes- des approches fondées sur le contrôle sont nécessaires pour contrôler et optimiser la production afin d'améliorer les rendements précédemment rapportés. De plus, le modèle métabolique à l'échelle du génome basé sur la séquence du génome aura la capacité de prendre en compte les données d'expression génique, de métabolomique et de protéomique pour obtenir des prévisions précises dans différentes conditions environnementales (**Ates,2015**).

Ce la qui donne un stratège d'analyse bien définie pour une production et purification a fin appuyer vers une EPS recherché .L'analyse structurale des EPS, ainsi que l'étude de leur potentiel bioactif exigent l'étape de purification, cela signifie la nécessité de les séparer des contaminants (principalement protéines, ADN et ARN) (Figure.9). La purification des EPS á partir d'une culture bactérienne requiert l'élimination de bactéries productrices et le reste des composants des milieux avec les métabolites synthétisés, bien sûr, en utilisant des méthodes adéquates afin de préserver les EPS Requis (**Zarour, 2018**).



**Figure 9 :** Stratégie générale de l'analyse des polysaccharides extracellulaires produits par lesBL (Zarour, 2018).

*Partie*  
*Expérimentale*

*Chapitre IV*

*Matériel et*

*Méthodes*

## **IV. Matériel et méthodes**

### **IV.1.Cadre de l'étude**

Ce travail a été entièrement réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie appliquée de la faculté des sciences de la nature de la vie, université de Kasdi Merbeh-Ouargla. Ce travail a pour but d'étudier quelques aptitudes d'Exopolysaccharide (dextrane) produit par des souches lactiques sélectionnées, (caractérisation, production, optimisation, quantification). Cette étude a été effectuée durant la période du 11 Février jusqu'à 12 Mars 2020.

### **IV.2.Matériel biologique**

#### **IV.2.1. Origine des souches utilisées**

Pour réaliser cette étude 25 souches de bactéries lactiques ont été fournies par la collection de labo microbiologie pédagogique. Ces souches lactiques ont été préalablement isolées par les étudiants **Ayadi et Djbbass (2019), Madani et Djohuri (2015) et Zergoune (2019)**.

Les souches étudiées ont été isolées à partir de différents produits laitiers, lait d'chèvre, brebis et, J'ben région de Ouargla et lait vache région de Batna.

L'identification et l'origine des 25 souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc* sont présentées dans le tableau.7.

**Tableau 7 :** Identification et origine des souches des bactéries lactiques isolées du lait d'chèvre, vache et J'ben.

N°	Code de la souche	Identification Phénotypique	Origine
1	C1	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
2	C2	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
3	C10	<i>Ln. gelidum</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
4	C12	<i>Ln. fallax</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
5	C13	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
6	C15	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
7	C16	<i>Ln. carnosum</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
8	C18	<i>Ln. fallax</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
9	C21	<i>Ln. mesenteroides subsp cremoris</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
10	C23	<i>Ln. fallax</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
11	C34	<i>Ln. mesenteroides subsp dextranicum</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
12	C39	<i>Ln. mesenteroides subsp cremoris</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
13	C41	<i>Ln. carnosum</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
14	C43	<i>Ln. citreum</i>	Lait de Chèvre-Ouargla
15	F49	<i>Ln. mesenteroides subsp dextranicum</i>	Fromage (J'ben) -Ouargla
16	F55	<i>Ln. fallax</i>	Fromage (J'ben) -Ouargla
17	F63	<i>Ln. fallax</i>	Fromage (J'ben) -Ouargla
18	F64	<i>Ln. fallax</i>	Fromage (J'ben) -Ouargla
19	F65	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	Fromage (J'ben) -Ouargla
20	F69	<i>Ln. mesenteroides subsp dextranicum</i>	Fromage (J'ben) -Ouargla
21	F70	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	Fromage (J'ben)-Ouargla
22	V67	<i>Ln. mesenteroides subsp dextranicum</i>	Lait d'Vache-Batna
23	D36	<i>Leuconostoc sp</i>	fromage traditionnel (J'ben)-Ouargla -
24	86	<i>Leuconostoc crémoris</i>	fromage traditionnel (J'ben) à base de lait de vache et de chèvre-Algérie
25	31	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp crémoris</i>	fromage traditionnel (J'ben) à base de lait de vache et de chèvre-Algérie

### IV.3. Revivification des souches

Les souches ayant subi une longue conservation dans le glycérol de plus de 10mois ont été revivifiées en procédant comme suit :

On ensemence 100 µl d'inoculum de chaque souche conservée dans 5 ml de bouillon MRS suivie d'une incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Les résultats de revivification sont appréciés par l'apparition d'un trouble dans le milieu MRS liquide (figure.10).

#### IV.3.1.Repiquage et Purification

Les souches revivifiées ont été purifiées par des repiquages successifs sur milieu MRS liquide et ensemencement par stries sur MRS solide et incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un résultat uniforme de point de vue morphologie des bactéries, nous renseignant sur leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques concernant leur aspect (taille, forme et couleur). L'observation de la pureté sera complétée par un test de la catalase et la coloration de Gram (Zarour et al., 2012 ; Guiraud,2012).

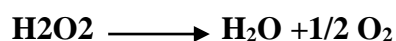
### IV.4.Vérification de l'identité des souches

#### IV.4.1.Coloration de Gram

La coloration différentielle la plus connue est celle de Gram, nécessaire pour l'observation microscopique, détermine la morphologie et la forme des bactéries isolées. Elle permet aussi de différencier les bactéries Gram positives de celles à Gram négatives (Guiraud, 2012).

#### IV.4.2. Recherche de la catalase

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation, par l'oxygène de l'air, des protons (et électrons) issus des voies d'oxydation directes.



Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée (sur lame) ; un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la

décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (catalase positive) (Guiraud, 2012).

Ensuite pour contenir pour compléments l'étude dans les laboratoires, les souches catalase positive doivent être conservées dans des conditions ce dont vous avez besoin.

#### **IV.4.3. Type fermentaire**

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des souches purifiées. Le CO<sub>2</sub> produit par la souche testée est capté par un tube contenant la cloche de Durham. Toutes les souches produisent du gaz carbonique à partir du glucose (Bouillon MRS), elles sont classifiées comme des BL hétérofermentaires (Zarour, 2018).

#### **IV.4.4. Conservation des souches revivifiées**

L'objectif de la conservation d'une souche pure est le suivant: maintenir les souches pures à conserver viable toute la durée de sa conservation, disponible et à l'identique. Dans l'absolu, conserver à l'identique, c'est conserver à l'identique le génotype. La conservation doit évidemment exclure les contaminations ; Plusieurs méthodes sont utilisables en fonction de souche et du but recherché (Guiraud, 2012).

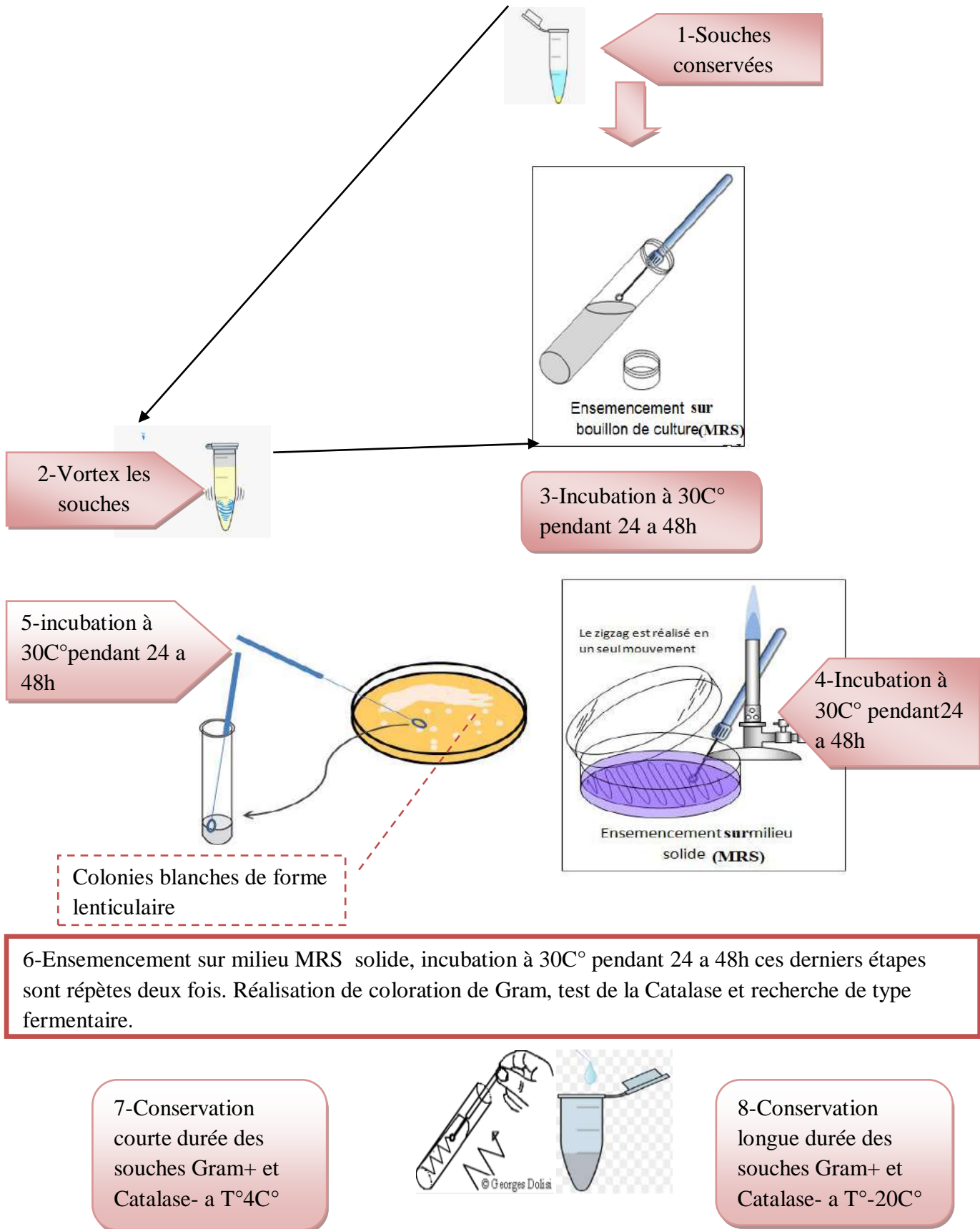
##### **IV.4.4.1. Conservation court durée**

On a effectué un ensemencement sur gélose incliné (MRS), ensuite incubé à 30°C jusqu'à l'apparition des colonies (24 à 48h), après les cultures maintenues à température de 4°C.

##### **IV.4.4.2. Conservation longue durée**

La conservation longue durée était réalisée à -20°C sur milieu MRS liquide additionné de glycérol. À partir des cultures sur milieu liquide et après une centrifugation à 8000 Tr pendant 10 min les cellules ont été récupérées, un rinçage par l'eau distillée stérile par une autre centrifugation. Après le surnageant 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 strictement dans des tubes Eppendorf à une T° de -20°C (Belkhier, 2017 ; Badis et al., 2005).





**Figure 10 :** Schéma représentatif résumé la méthode utilisée pour la revivification et la purification des souches

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

#### **IV.5.1. Production d'Exopolysaccharide (dextrane)**

##### **IV.5.1.1. Etude qualitative**

La synthèse des Exopolysaccharides a été mise en évidence sur deux milieux solides hypersaccharosé, le milieu de (Mayeux et al., 1962) MSE (Biokar diagnostics) et le milieu MRSs (additionné 100g de saccharose MRSs) (Feng et al., 2018 ; ; Drider et Prévost ,2009). Après ensemencement sur MSE et MRSs par une pré-culture de 18h sur MRS bouillon, les boîtes étaient incubées à 30°C pendant 24h à 48h. Les souches produisant des dextrans poussent en colonies larges visqueuses et gluantes mucilagineuses à un aspect mucoïde. Le diamètre des colonies était mesuré pour comparer entre les souches pour la production d'EPS, afin d'identifier les souches de *Leuconostoc* productrices ou non l'EPS (Belkhier, 2017 ; Guiraud, 2012).

##### **IV.5.1.2. Etude quantitative de la production d'EPS**

La sélection des souches *Leuconostoc* pour une production abondante d'EPS (dextrane) est le premier objectif de notre travail, pour une optimum production. On quantifie cette production par : le degré de viscosité sur milieu liquide hypersaccharose, le dosage des sucres totaux par méthode phénol-acide sulfurique.

###### **IV.5.1.2.1. Mesure de la densité optique (DO)**

Le premier paramètre testé, consiste à mesurer la densité optique (DO) des souches productrices l'EPS à 620 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis) pour estimer la croissance microbienne, dans le but de la sélection de souches présentant la bonne production pour compléter l'étude de EPS. À partir des cultures jeunes de 18 h d'incubation sur bouillon MRS, de six souches qui ont montré une production d'EPS+ (EPS produit) (C1. C2. C10. C16. C23. F65), on ensemence 1ml d'inoculum dans des tubes contenant 15ml du milieu MRSs à concentration de saccharose 100 g/l, ensuite on fait la lecture de la DO avec l'addition d'un volume d'inoculum ou la dilution par un volume de milieu MRSs pour un

intervalle de lecture entre (0.2 à 0.5), enfin on a juste le volume des tubes et on incube à 30°C pendant 24 h.

## IV.6.Caractères et aptitudes de dextrane

### IV.6.1.Extraction et quantifications de dextrane

L'étape de la quantification renseigne sur trois étapes : la culture dans le milieu liquide MRSs à concentration de 100 g/l de saccharose, ce fait après la culture et l'extraction sur milieu MRSs pour faire le choix de deux souches pour l'optimisation de production d'EPS, la précipitation par l'éthanol ou méthanol et l'étape dernière concerne la quantification de l'EPS.

Après incubation de milieu MRSs (chaque tube contient 12 ml), on élimine les cellules par centrifugation 4000 tr pendant 30 min, afin d'inactiver les enzymes capables de dégrader les polymères. Les EPS présent dans le surnagent sont précipités dans trois volumes d'éthanol ou de méthanol froid à 95% (v/v) et en incubant l'échantillon à 4°C pendant une nuit. Une deuxième centrifugation était effectuée 12000 tr/ 30 min à froid 4°C, on rince deux fois par l'acétone et centrifugé de nouveau à 12000 tr/10 min à froid 4°C (figure.11) (**Zarour, 2018 ; Esmailnejad-Moghadam, et al., 2019**).

Après la lecture de la DO et l'incubation de 18h à 30C°

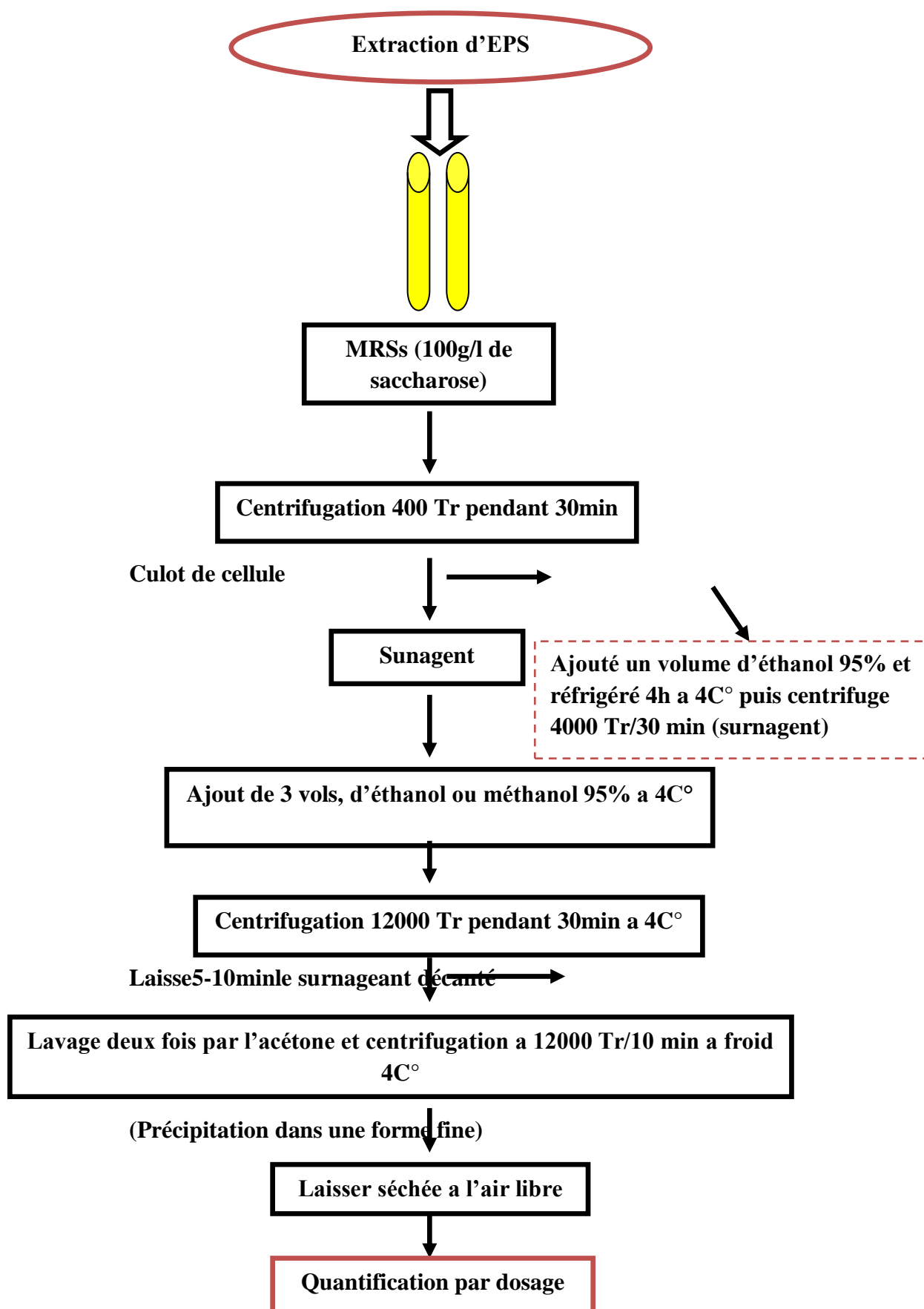


Figure 11: Schéma d'extraction et quantification d'EPS

#### IV.6.1.1. Dosage des EPS

##### IV.6.1.1.1. Dosage des sucres totaux

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

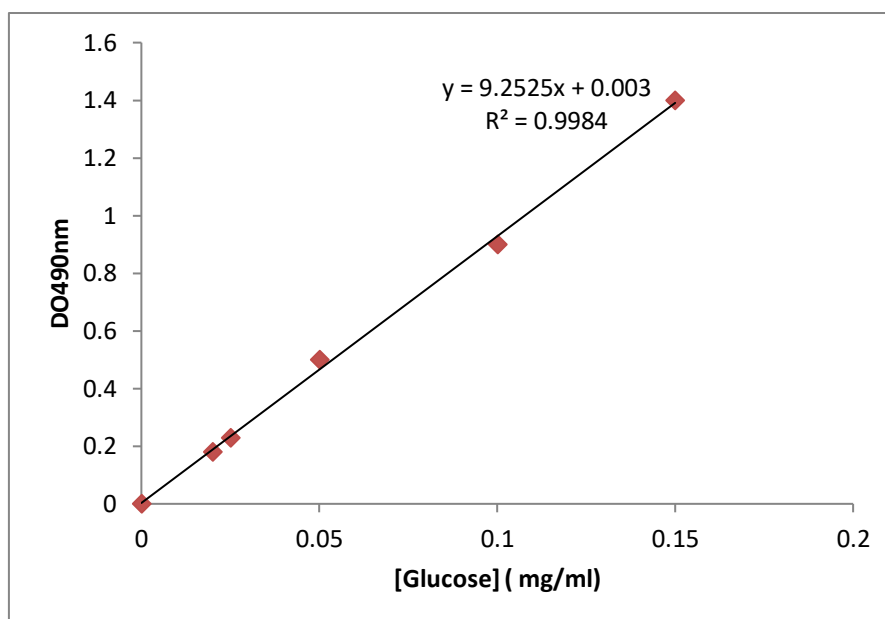
##### IV.6.1.1.2. Le Principe de la méthode

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 et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable dont des petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées (**Zarour, 2018**).

##### IV.6.1.1.3. 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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrés 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<sub>490nm</sub>) et les valeurs obtenues sont comparées avec celles de la courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues de D-glucose ci-dessous:



**Figure 12 :** Courbe d'étalonnage de D-glucose représente des valeurs d'A490 nm obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.

#### IV.6.2.Optimisation de la production d'Exopolysaccharide

Pour une production maximale d'EPS, différents facteurs ont été optimisés (saccharose, glucose et l'extrait de levure), dont nous faisons varier successivement tous ces facteurs, selon les 15 cas de probabilité on change leur concentration. L'effet de ces facteurs a été étudié sur les meilleures souches productrices de l'EPS.

A partir des cultures jeunes des souches sélectionnées (culture de 18 h à 30°C), on réalise un ensemencement dans un milieu MSE liquide à différentes concentrations de glucose, d'extrait de levure et saccharose (tableau 08). Les tubes ensemencés sont incubés à 30°C pendant 72 h.

**Tableau 8 :** Concentrations des substrats optimisés donne par logiciel Minitab.16

Concentrations de  
3 paramètres  
optimisés changée  
probablement

Cas	Sac (g/l)	Glu (g/l)	Lev (g/l)
1	10	1	2.5
2	100	1	2.5
3	10	5	2.5
4	100	5	2.5
5	10	3	0
6	100	3	0
7	10	3	5
8	100	3	5
9	55	1	0
10	55	5	0
11	55	1	5
12	55	5	5
13	55	3	2.5
14	55	3	2.5
15	55	3	2.5

**Sac** : saccharose ; **Glu** : glucose ; **Lev** : extrait de levure

Après incubation on élimine les cellules par centrifugation 4000 Tr/30 min, les EPS présents dans le surnageant sont précipités par trois volumes d'éthanol ou de méthanol froid à 95% (v/v) et on incubant l'échantillon à 4°C pendant une nuit. Une deuxième centrifugation était effectuée 12000 Tr/ 30 min à froid 4°C, on rince deux fois par l'acétone et centrifugé de nouveau à 12000 Tr/10 min à froid 4°C. La DO a été mesuré à 490 nm et les valeurs obtenues sont comparées avec des courbes d'étalonnage obtenu avec des concentrations connues des substrats optimisés (figure.13) (Zarour, 2018 ; Esmailnejad-Moghadam, et al., 2019).



Pré-culture (18h a 30C°)

1. Ensemencement sur milieu MSE liquide a différent concentration (d'extrait de levure glucose et saccharose)

(2) tube ensemencé pour chaque concentration (15 cas x2 tubes)

1 ← → 15

Souche 1

Souche 2

2. Incubation a 30C° pendant 72h

3. Observation de la croissance et la production d'EPS par l'aspect et la viscosité

4. Centrifugation 400 Tr pendant 30min

6. Ajout de 3 vols, d'éthanol ou méthanol 95% a 4C°

7. Centrifugation 12000 Tr pendant 30min a 4C°

9. DO a 490 nm

8. Lavage 2 fois par l'acétone et centrifugation a 12000 a 4C°

5. Surnagent

Figure 13 : Protocole expérimentale d'optimisation de la production d'exopolysaccharide



*Chapitre V*

*Résultats et*

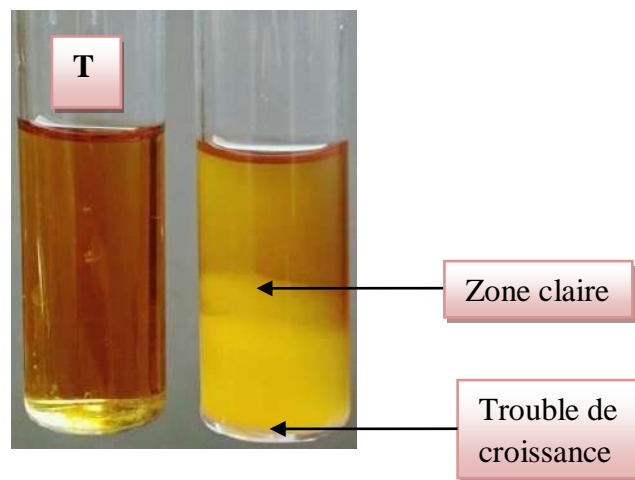
*discussion*

## V. Résultats et discussions

### V.1. Revivification et purification des souches lactiques

#### V.1.1. Observation macroscopique

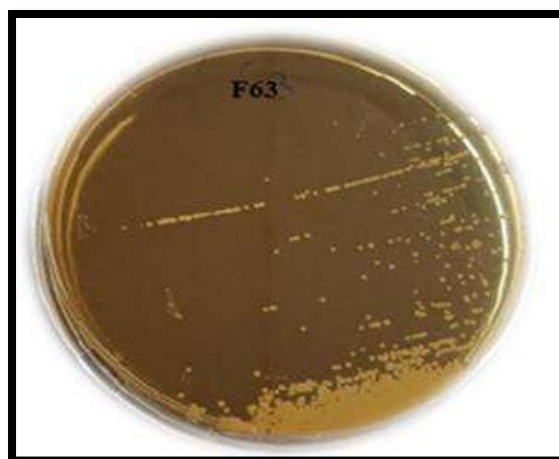
- a. **Sur milieu liquide** : après 24h d'incubation sur bouillon MRS, les souches présentent un trouble homogène (blanche), concentré au fond du tube qui caractérise le groupe des bactéries lactiques, ces résultats confirment par les travaux de **Zarour et al., (2012)** et **Guiraud (2012)**.



T : témoin

**Figure 14** : Trouble apparent sur bouillon MRS après 18 heures d'incubation à 30°C.

- b. **Sur milieu solide** : L'observation à l'œil nu des cultures sur gélose MRS après 24h a révélé des colonies purifiées visibles, sont apparues de forme lenticulaire ou ronde avec une taille variée petite et grosse, similaire et de couleur blanchâtre (figure.15). Selon **Garvie (1986)**, les corps cellulaires de *Leuconostoc* peuvent être sphériques, mais souvent lenticulaires, surtout lorsqu'ils sont cultivés sur milieu gélosé.

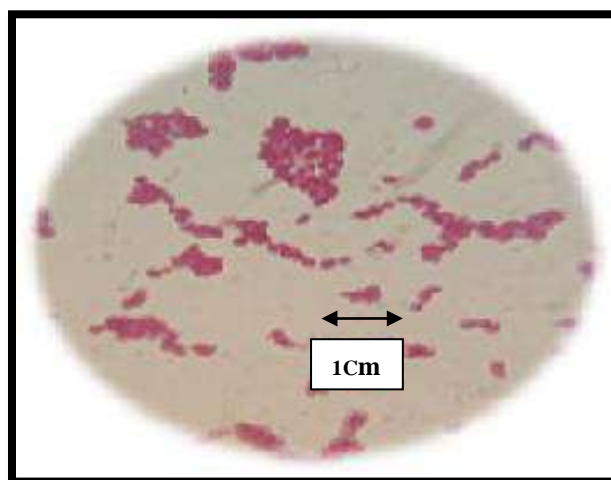


**Figure 15 :** Aspect macroscopique des souches lactiques purifiées sur gélose MRS après 24 heures d'incubation à 30°C.

## V.2.Observation microscopique

### V.2.1.Coloration de Gram

L'examen microscopique des souches après la coloration de Gram a révélé qu'elles sont toutes à Gram positive, de forme cellulaire lenticulaire ou de petites coques, coccobacille et ovoïde associées généralement en paires et en courtes chainettes ou isolées (Figure.16). Selon **Kersani (2018)** et **Zarour (2018)**, L'étude de l'aspect morphologique au microscope optique après coloration de Gram permet d'éliminer d'éventuels contaminants à Gram négatif n'appartenant pas aux BL. La forme lenticulaire observée confirme l'identité des souches au genre de *Leuconostoc*.



**Figure 16:** Observation microscopique de la souche *Ln. fallax* identifier après coloration de Gram à grossissement X100

### V.3. Test de la catalase

Le test de catalase a révélé l'absence de dégagement gazeux chez l'ensemble des bactéries étudiées montre qu'elles sont dépourvues de l'activité catalasique (l'incapacité de production de la peroxyde d'hydrogène).

L'analyse microscopique a montré aussi que toutes les souches étaient Gram positif et catalase négative (Figure.17), ces deux propriétés étaient comptées parmi les caractéristiques des bactéries lactiques. A travers ces caractères **Cardamone et al., (2011)** ont été présumées classés dans le genre *Leuconostoc*. Ces résultats sont compatibles avec les résultats décrits dans les travaux de **Zarour et al., (2012) ; Zarour, (2018) et Kersani, (2018)**.



**Figure 17 :** Catalase négative de la souche revivifié *Ln. mesenteroides subsp dextranicum*

### V.4. Recherche de type fermentaire

La production du CO<sub>2</sub> par *Leuconostoc* provient de l'hétérofermentation du lactose et de l'utilisation du citrate. Ce caractère est corrélé avec leur morphologie représente la base d'identification de ce genre (**Guiraud, 2012 ; Drider et Prévost, 2009 ; Bourel et al., 2001**).

Après l'incubation des tubes à cloche ensemencés par des pré-cultures des souches à 30°C, les résultats observés montrent qu'il y a l'apparition d'un trouble au fond des tubes avec une production des bulles de gaz CO<sub>2</sub> recueilli dans la cloche de Durham qui est observé par le soulèvement de cette dernière dans le milieu (Figure.18). Car il est libéré au fond des tubes, ce gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire, pousse lors de la fermentation du glucose composé dans le bouillon MRSG (MRS glucosé). Toutes les souches testées produisent du gaz carbonique à partir du glucose révélé un métabolisme hétérofermentaire ce qui caractérise le genre de *Leuconostoc*, à l'exception de deux souches (F63, F64) qui n'ayant pas la capacité de dégager du gaz, sont des homofermentaires, ce qui rend incompatible avec les travaux de **Ayadi et Djbbass, (2019)**. Selon **Guiraud (2012), Gibson et Abde-**

**Elmalek**, certains hétérofermentaires ne réunissent pas les trois caractéristiques tel que la production de gaz, production élevée d'acide volatil, formation d'éthanol à partir de glucose et de mannitol à partir de fructose (**Guiraud, 2012 ; Ghazi et al., 2009**).



**Figure 18** : Production du gaz à partir du glucose par la souche *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*

Les résultats obtenus confirment la pureté des souches sélectionnées et leurs appartenances au groupe des coques lactique particulièrement le genre *Leuconostoc* (**Zerour et al., 2012**).

## V.5. Production d'exopolysaccharide (dextrane)

### V.5.1. Détection des EPS au niveau macroscopique

Pour commencer l'étude approfondie de la production des EPS chez les *Leuconostocs*, une présélection des souches les plus performants a été faite, en se basant sur plusieurs critères tels que : les caractères phénotypiques, les aptitudes technologiques, la quantité et le potentiel des EPS produite et la forme, et la taille des colonies formées, en présence du saccharose.

#### V.5.1.1. Etude qualitative

Dans cette étude la détection de l'EPS a été faite sur deux milieux MRSs, (**Feng et al., 2018 ; Drider et Prévost ,2009 ; Yang et al., 2018**) et MSE qui est différent dans leur composition. Le milieu MRSs utilisé pour l'isolement et la croissance, où le saccharose est utile pour la production de EPS par contre le milieu MSE est un milieu sélectif où le

hypersaccharose utilisé principalement pour distinguer les colonies des souches qui dégradent le saccharose et produisent l'EPS (dextrane) prendre des aspects gélatineux (Guiraud, 2012).

Les souches ont été employées pour suivre l'évolution et la stabilité de la production des EPS pendant 48 h d'incubation successive à 30°C. Pour cela, une observation phénotypique vis-à-vis le niveau de production a été réalisé. Le tableau (09) illustre les résultats des souches qui présentent le caractère mucoïde et gluant par la production des EPS dans un milieu solide.

**Tableau 9:** souches produisant l'EPS de caractères mucoïde et gluant.

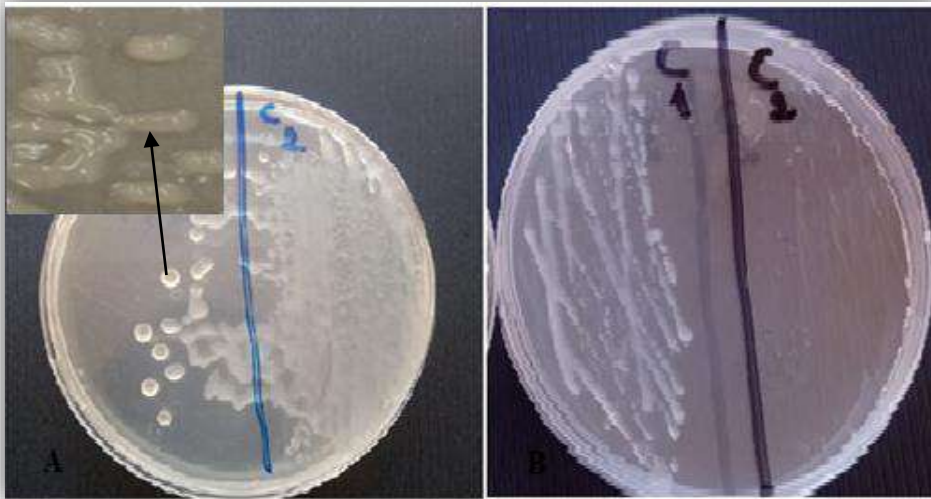
Souche	Observation des colonies	Mucoïde sur MRSs	Mucoïde sur MSE
C1	Grosses, transparentes, gluantes	+++	++
C2	Grosses, transparentes; gluantes	+++	++
C10	Grosses, transparentes, gluantes	+++	++
C12	blanches non gluantes	-	-
C13	blanches non gluantes	-	-
C15	blanches non gluantes	-	-
C16	Petites et bombés transparentes adhérent à la surface de la gélose	+	+
C18	blanches non gluantes	-	-
C21	blanches non gluantes	-	-
C23	Petites et bombés transparentes adhérent à la surface de la gélose	++	+
C34	blanches non gluantes	-	-
C39	blanches non gluantes	-	-
C41	blanches non gluantes	-	-
C43	blanches non gluantes	-	-
C49	blanches non gluantes	-	-
F49	blanches non gluantes	-	-
F55	blanches non gluantes	-	-
F63	blanches non gluantes	-	-
F64	blanches non gluantes	-	-
F65	grosses transparentes gluantes	+++	++
F69	blanches non gluantes	-	-
F70	blanches non gluantes	-	-
V67	blanches non gluantes	-	-
D36	blanches non gluantes	-	-
86	blanches non gluantes	-	-
31	blanches non gluantes	-	-

+++ : Hautement mucoïde ; ++ : Moyenne mucoïde ; + : Faible mucoïde ; - : Non mucoïde

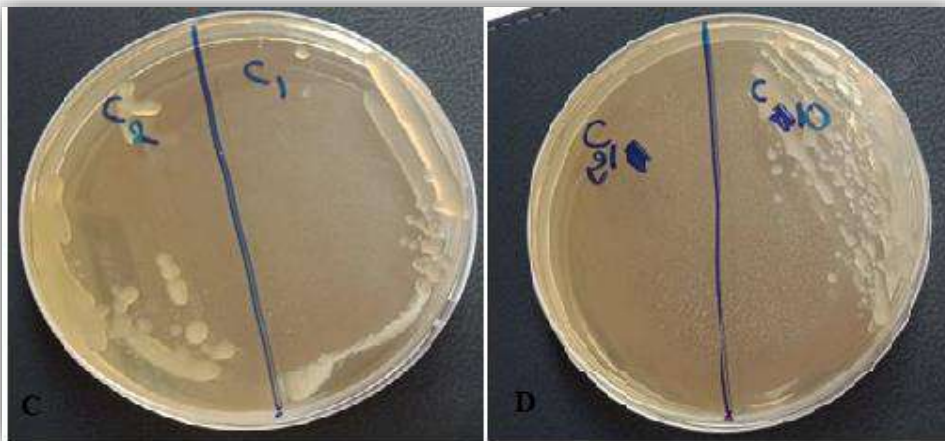
On peut dire que selon ces résultats, les niveaux de production varient avec les formes différentes détectés sur MRSs et MSE.

La production de l'EPS (dextrane) dans les milieux hypersaccharose solide a été observée chez six souches parmi les vingt-cinq souches testées. La production d'EPS est obtenue après 18 à 24h chez les souches (C1, C2, C10, F65) et après 48 h pour (C16, C23). Les souches incapables de produire l'exopolysaccharide sont dix-neuf souches (C12, C13, C15, C18, C34, C39, C41, C43, C49, F49, F55, F63, F64, F69, F70, V67, D36, 86, 31), ces bactéries sont utilisées comme une référence des bactéries non productrices. La plupart des souches avérées à la production de polymères exocellulaires ont été isolées à partir du lait d'chèvre (cinq souches dans la totalité de six productrices) C1, C2, C10, C16, C23 à l'exception d'une souche (F65) isolée de fromage frais.

Les souches productrices des EPS possèdent des colonies de tailles larges visqueuses et gélatineuses sous forme gluantes d'aspect liquide, qui varie en fonction du temps où elles deviennent plus en plus semi-liquide jusqu'à la formation des tapis des colonies presque lysées possédant ressemblent au phénotype décrit par **Dupont en (1998)**. Nos résultats révèlent que les coques tester présentent le caractère mucoïde luisant non filant. Selon **Dridier et Prévost (2009)** le caractère filant présent généralement chez les souches qui produisent les capsules polysaccharidiques *S.thermophilus* et *Lb. bulgaricus* se distinguent par la formation de fils visqueux. Aussi dans cette production, le caractère mucoïde est plus important sur le milieu MRSs gélosé que dans le milieu MSE (Figure 19 et 20). Cela est préconisé pour la détection visuelle de l'EPS produit par les souches particulièrement les *Leuconostocs*. Le MRSs s'est avéré le plus favorable à la production d'EPS pour les six souches testées **Dridier et Prévost (2009)** et **Feng et al.,(2018)** ont confirmé que le MRSs est un milieu valable pour la sélection des souches mucoïdes productrices de l'EPS. Cette production peut être variée selon la souche, les conditions de culture et la composition de milieu de culture.



**Figure 19 :** Aspect des colonies des souches *Leuconostoc* produit le dextrane sur milieu MSE après 48 h



**Figure 20 :** Aspect des colonies des souches *Leuconostoc* produit le dextrane sur milieu MRSs après 24h



**Figure 21 :** Morphologie des colonies de la souche C2, cultivée sur milieu solide MSE



Les souches étudiées sont comparées avec celles étudiées par **Ayadi et Djbbass(2019)**. On a remarqué que les dix-neuf souches ont perdu le caractère de la production des EPS. Ce que peut s'expliquer par une perte du caractère épaississant due à l'instabilité (**Dridier et Prévost, 2009**). Plusieurs auteurs ont rapporté l'instabilité de la production d'EPS (**Macura et Townsley, 1984 ; Cerning et al., 1988 ; Cerning et al., 1992 ; Degesst et De Vuyst 1999**) à la suite d'une série de repiquages d'une incubation prolongée (**Macura et Townsley, 1984 ; Cerning et al., 1990 ; Garcia-Garibay et Marshall, 1991**). De même, il peut avoir une dégradation des EPS par des glycohydrolases extracellulaires durant l'entreposage (**Macura et Townsley, 1984 ; Cerning et al., 1988 ; Degesst et De Vuyst 1999 ; Petry et al., 2003**) ou une instabilité génétique comme la perte du gène de production d'EPS décrit par (**Dridier et Prévost, 2009 ; Kersani , 2018**).

Le repiquage successif des souches induit une diminution ou la perte du caractère épaississant lorsqu'on effectue une série des repiquages subséquents ne semble pas associée à une diminution de croissance. D'après **Dridier et Prévost (2009)** la production d'EPS n'est pas strictement couplée avec la croissance chez la souche NIZO B40 de *L.cremoris*.

L'instabilité phénotypique et génétique est observée sur la culture répétée. La mutation spontanée peut donner des variants clonaux possédant une production plus faible, plus élevée, ou une composition modifiée de l'EPS produit. Lorsque les gènes codants pour la production d'EPS se retrouvent sur un plasmide, comme chez les bactéries lactiques mésophiles, il y a le risque de la perte du phénotype suite à la perte du plasmide, ex : *Leuconostoc ; Lc. Lactis*, chez les thermophiles, les gènes nécessaires sont codés par le chromosome, ex : *S. thermophilus* (**Dridier et Prévost ,2009**).

D'après **Kersani (2018)** les souches mésophiles doivent être rapportées par plusieurs auteurs qui attribuent son instabilité à la perte de plasmide codant pour l'enzyme intervenant à la biosynthèse des polysaccharides engendrant la perte de production de l'EPS (**Kojic et al., 1992 ; Lonvaud-Funel et al.,1993 ; Van Kranenburg et de vos,1998 ; Van Kranenburg et al.,2000**) décrit par (**Kersani, 2018**).

La présence des séquences d'insertion contribue grandement aux réarrangements au niveau du locus *esp*, et les éléments mobiles, les transferts génétiques intra-et inter espèce (horizontale) durant des cultures mixtes conduites à l'origine de l'arrêt de la production d'EPS chez les souches thermophiles ex : *S.thermophilus*(**Dridier et Prévost ,2009**).

L'hypothèse de **Cerninge et al (1988)** montre que le rendement de la production d'EPS est plus élevé lorsqu'on applique un traitement thermique avant l'extraction de l'EPS. Ce qui confirme l'existence des enzymes qui capable de dégrader le polysaccharide dans le lait ou les autres produits laitiers (**Kersani, 2018**). On peut dire que la production homopolysaccharidique dépende l'activité enzymatique extracellulaire, la stabilité génétique et le substrat fourrier (**Drider et Prévost ,2009**).

La production de dextrane prendre un endroit principal plus connue dans le genre des *Leuconostocs*, avec des caractères variés d'une espèce a une autre ce qui rende très utilisable dans la technologie industrielle dans le but d'amélioration de plusieurs qualités dans le secteur alimentaire, pharmaceutique et médicale (**Shin et Han, 2015**).

Au vu de ces résultats, six souches de *Leuconostoc* productrice de EPS (dextrane) confirmé leur identité, ont été retenues pour la suite de cette étude en ce basant sur leur phénotype (culture et le caractère mucoïde). Alors on peu élargie la recherche sur des méthodes nouvelle pour étudier le caractère mucoïde qui représente sa production de l'EPS par les souches lactiques pour une large intégration dans les nombres domaines industrielle.

**Ayadi et Djbbass (2019)** trouvant des souches identifient comme celles décrites dans ce travail (Annexe03).

#### **V. 5.1.1.2. Caractérisation des aptitudes de dextrane**

##### **V. 5.1.1.2.1. Optimisation de la production d'exopolysaccharide**

Après 48 h d'incubation à 30°C, dans le milieu MSE et MSE à différentes concentrations de glucose et d'extrait de levure, les variations de croissance et de production de dextrane ont été présentées dans les tableaux et les Figures (22 et 23).

V.5.1.1.2.2. Effet de différentes concentrations de substrat sur la production de dextrane

A. Différentes concentrations du glucose

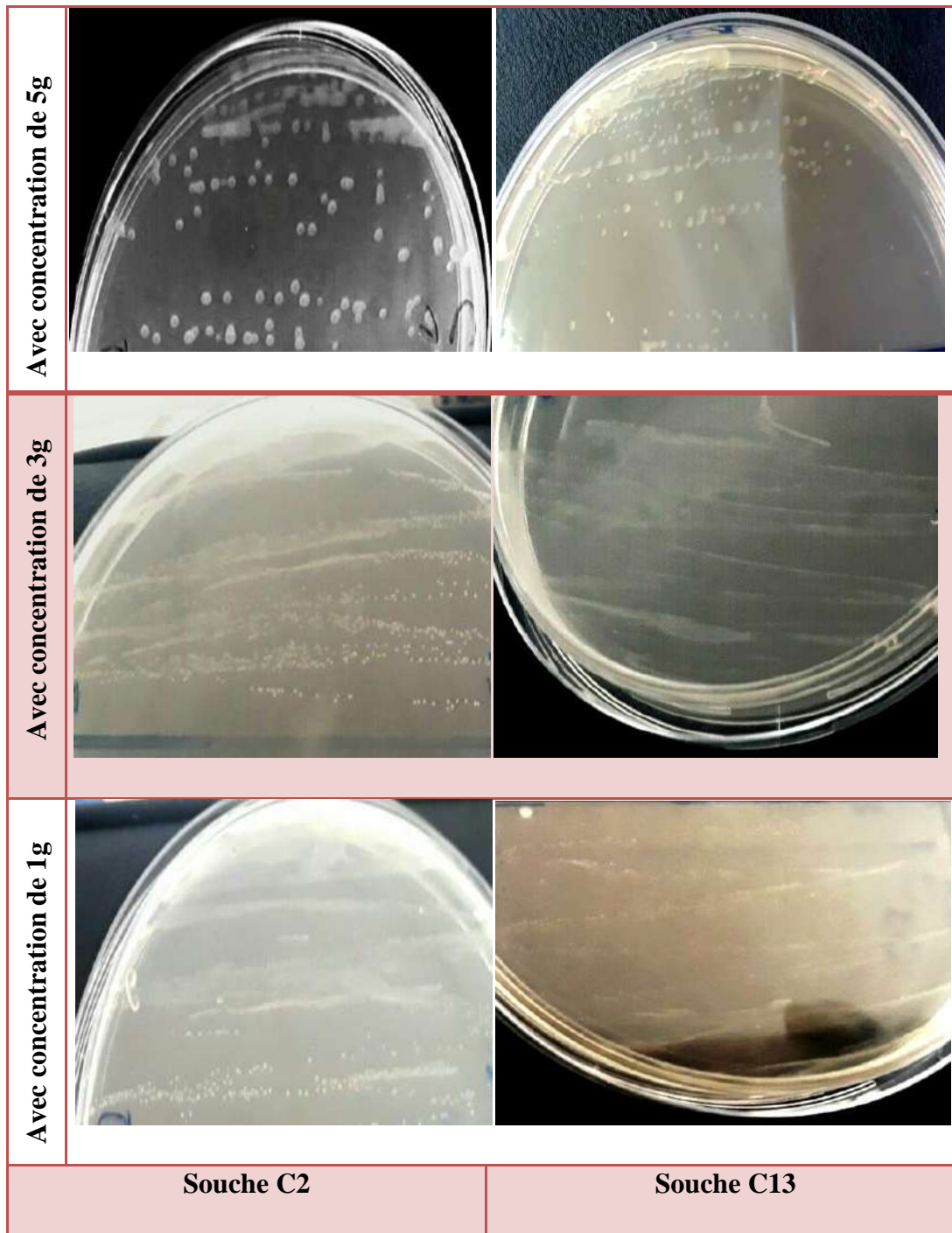
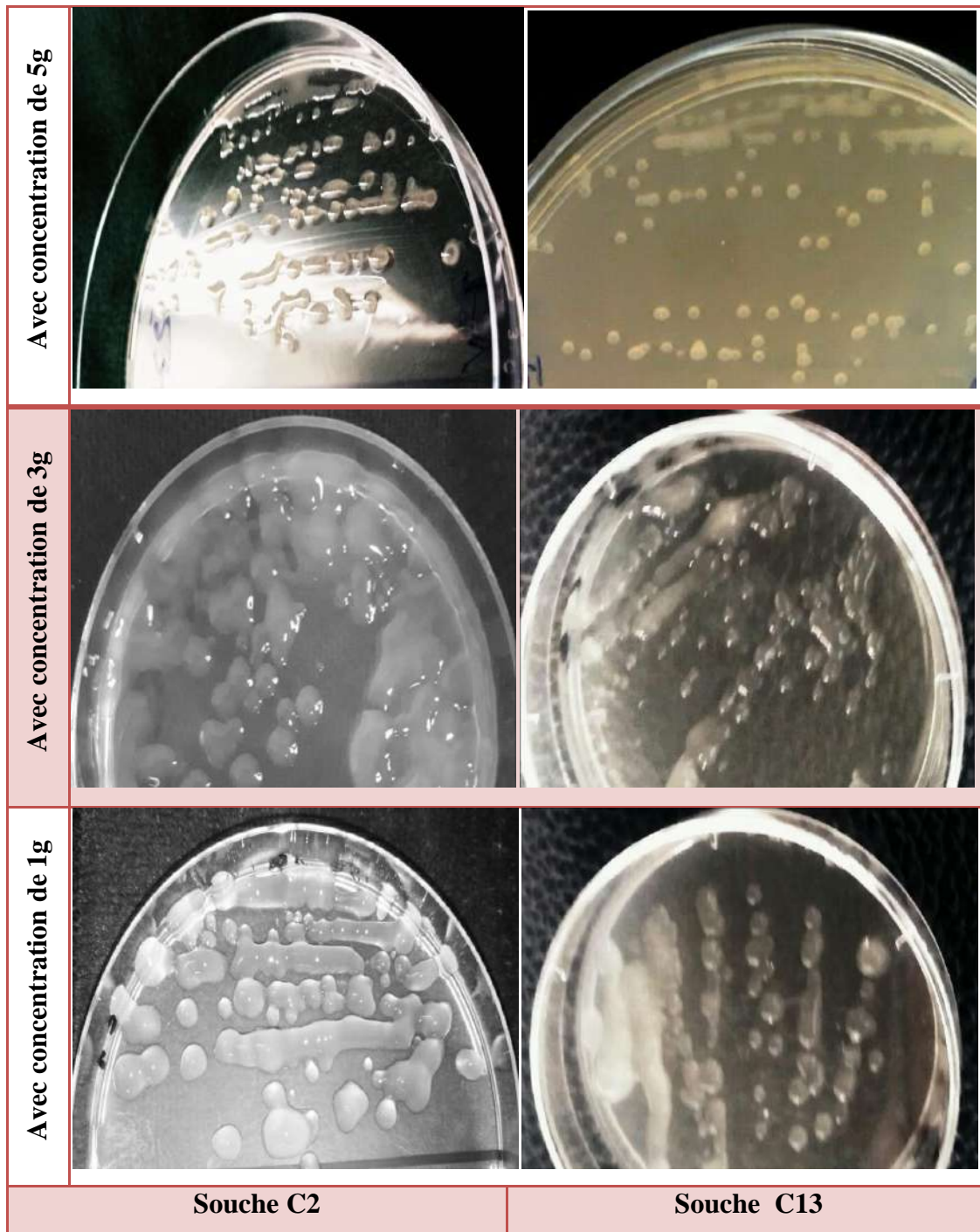


Figure 22: Production de dextrane par l'espèce *Ln. mesenteroides*

A différentes concentrations du glucose sur milieu MSE

B. Différentes concentrations d'extrait de levure



**Figure 23:** Production de dextrane par l'espèce *Ln. mesenteroides* à différentes concentrations d'extrait de levure sur milieu MSE

**Tableau 10:** 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(10).

**Tableau 11:** 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 adhérant 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 obtenus, des niveaux de production variables avec des formes différentes ont été détectés:

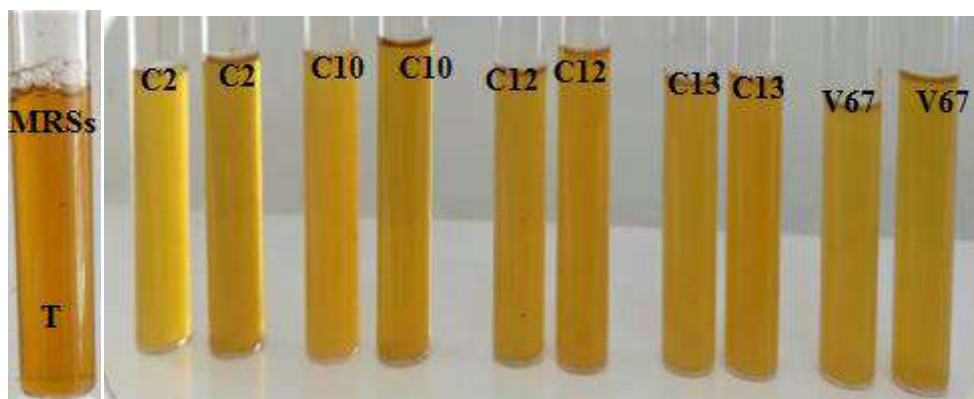
- ◆ Les souches fortement productrices, possédant des colonies grandes, gélatineuses d'aspect liquide, dans le milieu MSE 1g El: C2, C13, C23, V67

- ◆ 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 adhérent 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 souches différentes.
- ◆ Les souches non productrices, 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 produisent le dextrane sur MSE à 3g Glu.
- ◆ Touts les souches dans le milieu MSE 1et 3 g de Glu non produisant pas l'EPS à l'exception de souches F65 qui produit le dextrane sur MSE à 3g Glu.Selon **Ghazouli (2013)**, la bonne production bactérienne se traduit par un aspect visqueux des colonies, tandis qu'une faible production bactérienne montre un aspect moins visqueux.

Après l'optimisation de la production de dextrane par les souches de *Leuconostocs*, ces résultats nous ont permis de sélectionner parmi toutes les souches de *Leuconostoc* étudiées, les cinq souches(C2, C10, C12, C13, V67) plus performants pour la suite de notre travail. Le choix de ces souches est justifié par leur bonne aptitude à produire les EPS sur milieu MSE.

#### V.5.1.2.Etude quantitative

##### A. Différents concentrations de saccharose



T : témoin

**Figure 24:** Production de dextrane par *Leuconostoc* à différentes concentrations de saccharose sur milieu MRSs

Après 72 h d'incubation à 30°C sur milieu MRS additionnée de différentes 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 (Figure 24). Selon **Dupont (1998)**, certaines bactéries lactiques ne produisant pas les polymères sur milieu gélosé mais on produisant sur milieu liquide sous certaines conditions bien définies. **Béal et al (2008)**, disent que certains BL produisent l'EPS dans l'accumulation provoque la viscosité des milieux, ce que remarqué dans le bouillon MRSs inoculé par les souches étudiées, cette viscosité rend très important et cherché dans l'industrie laitière dans le but d'améliorer la texture, De plus, la viscosité intrinsèque est étroitement liée à la conformation, poids moléculaire et volume relatif de la macromolécule (**Jiang et al., 2020**).



**Figure 25:** Aspect visqueuse de milieu liquide MRSs après production EPS par souche *Ln.mesenteroides subsp mesenteroides*

#### V.5.1.2.1. Extraction et Quantification de dextrane

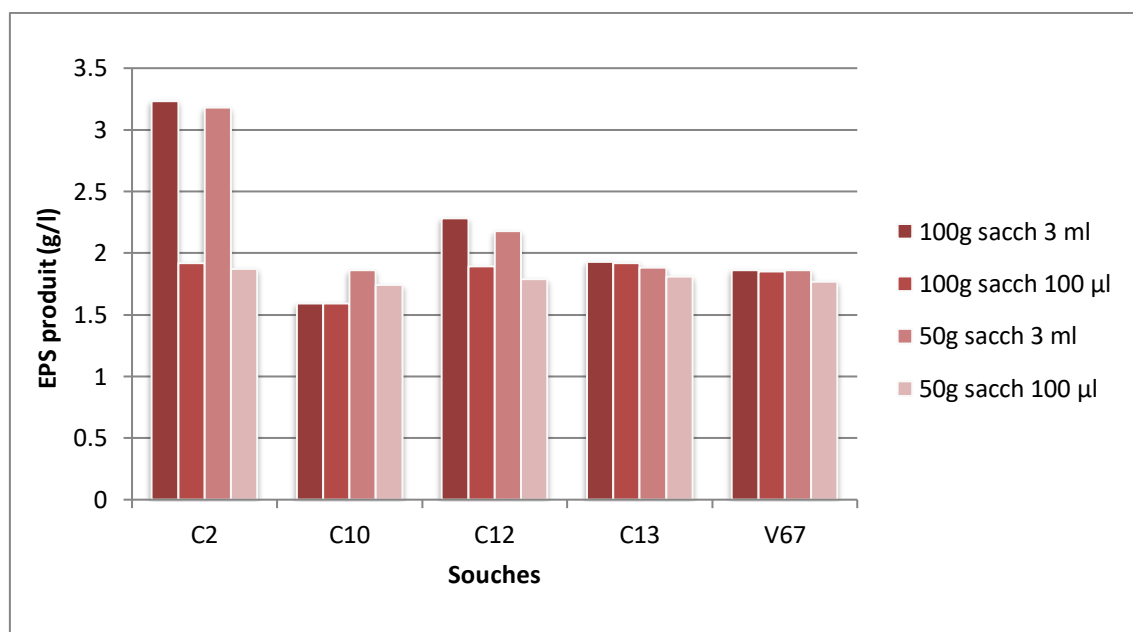
Un dosage des EPS produits par nos souches sur milieu liquide a été réalisé afin de quantifier la quantité d'EPS produite.





**Figure 26:** Aspect de dextrane produit par *Leucouostoc* après l'extraction à partir de milieu liquide 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 cet extrait nous passons vers une étape de dosage, qui donne les résultats suivants ( Figure.27)



**Figure 27:** Variation de taux de production de dextrane par les souches de *Leucouostoc* en fonction des différentes concentrations de saccharose et de volume d'inoculum (Ayadi et Djbbass, 2019)

Diverses concentrations de saccharose utilisent dans ce travail, la production maximale a été observée à une concentration de saccharose de 10% et un volume d'inoculum

de 3ml pour toutes les souches sauf C10 qui montrer une production maximale dans la concentration 5%. La différence entre les quantités de EPS produit dans les deux concentrations est presque égale (la différence est environ 0,05 à 0,1) chez la plupart des souches testées.

Les EPS microbienne ayant des propriétés fonctionnelles dans large spectre de la production industrielle, alors que la production de ce polymère par les souches productrices dépende leur croissance et les conditions de culture de ces micro-organismes, de la composition de milieu de culture tels que les substrats carbonique et azotique et les paramètres physicochimique (pH, T°) (**Dridier et Prévost ,2009**). Selon **Sutherland (1982)** généralement certain bactéries utilisent un sucre comme une source d'énergie et de carbone. la production d'EPS peut être optimisé par un sel d'ammonium et des acides aminés comme source d'azote, est des élément qui agissant comme des cofacteur les ions Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup> et Ca<sup>2+</sup> qui sont essentiel a la synthèse des polysaccharides.

#### **a.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 **Vijayendra and Sharath Babu, (2008)** et **Dridier et Prévost, (2009)**, le carbone est une exigence essentielle pour la production d'EPS, les sucres fournissent essentiellement l'énergie nécessaire pour la croissance cellulaire et la production d'EPS, la source de carbone explique leur influence à la synthèse des biopolymères, celle-ci ce liée à l'activité enzymatique impliquée dans la synthèse des EPS. L'activité de perméase, l'enzyme nécessaire à la pénétration des sucres, et l'activité é de l'UDP-glucose pyrophosphorylase, enzyme de la synthèse des sucres précurseurs l'UDP-glucose, sont influencées par la source de carbone utilisé par la bactérie. Une faible activité de l'UDP-glucose pyrophosphorylase, vas donner une faible quantité de l'UDP-glucose a la conséquence faible rendement d'EPS. Chez la souche NIZOB40 de *L.lactis*, moins d'EPS (65mg/l) est produit avec le fructose comme source de carbone qu'avec le glucose (460mg/l), en présence du glucose, l'EPS était produit majoritairement pendant la phase exponentielle, tandis qu'en présence du fructose, 60% des EPS étaient produits en phase stationnaire. La production d'EPS n'est pas strictement couplée avec la croissance chez la souche NIZOB40 de *L.cremoris* (**Dridier et Prévost, 2009**).

**Esmailnejad-Moghadam, et al (2019)** mentionnent quela présence de lactose a un effet significativement positif sur la réduction du poids moléculaire du dextrane et augmente sa solubilité. **Santos et al (2005)**, ont souligné que le lactose empêche l'augmentation des monomères de glucose dans la chaîne principale. En effet le lactose dans le milieu agit comme des molécules accepteuses qui se lient au glucosyle résidus aux molécules accepteurs au lieu de la chaîne en croissance. Cette liaison du glucose avec la molécule accepteur termine (lactose) la formation de dextrane qui se traduit par une chaîne courte ou à faible poids moléculaire. 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); Vamanuetal., (2010)** ont indiqué que la production des EPS et la croissance ont été stimulées par la concentration élevée en glucose (30g/l).

Dans cette étude, la production de dextrane avec le milieu contenant de concentration 5g de glucose a été plus élevée avec 3 g et 1g de glucose, c'est-à-dire la concentration optimale de glucose dans le 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).

#### **b. Effet de L'extrait de levure**

Selon **Guiraud (2012)**, il y a une participation directe des substrats azotés sur la croissance des bactéries et une participation indirecte sur les mécanismes de la production des EPS.

L'effet de la source d'azote et de vitamine a été étudié par l'utilisation de différentes concentrations 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 une concentration de 5g avec un niveau de production bas.

Les travaux de **Esmailnejad-Moghadamet al (2019)** et **Sebastiani et Zelger (1998)** rapporté que l'ajout de peptone au milieu augmente considérablement la production de l'EPS chez la souche *S.thermophilus.*, l'optimisé de la production de l'EPS ce fait a concentration de 15% d'El (Extrait d'levure). **Zarour et al.,(2012)** ont

rapporté que la croissance de *Leuconostoc* 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 fournies par l'extrait de levure.

### c. 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 cultivés dans un milieu contenant du saccharose (slime), car le saccharose est le seul inducteur connu de l'enzyme impliquée (**Drider et Prévost, 2009 ; Misakiet al, 1980; Robyt, 1992**).

Pour étudier l'effet de se dernier avec le volume d'inoculum sur la production de EPS elles sontensemencé dévers 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 obtenue à 10% de saccharoseensemencée par 3ml qui 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.

Ces résultats en cohérence avec les travaux de **Dimic'(2006)**, qui produise le dextrane par *L. mesenteroides* and *L. dextransicum* a concentration de 10%. **Thiyagarajan et al (2017)**,qui se trouve l'activité enzymatique maximale a été observée à une concentration de saccharose de 20% montrant 4,4 DSU / ml / h et la masse humide cellulaire était de 2,4 mg / ml. Le milieu est apparu très visqueux montrant la production maximale de dextrane. **Esmailnejad-Moghadamet al(2019)** évident que la production de dextrane par *L.mesenteroides* augmentait régulièrement avec l'augmentation de la concentration de saccharose jusqu'à 20%. **Faqiha et al (2019)** rapportent que **Sarwat et al en (2008)**, motionne la production maximale était atteinte avec 15% de saccharose après 20 heures à 30 ° C à 7 pH. La souche LB121 de *Lb.reutri* produit 10g/L de glucans et fructans dans le milieu MRS contenant 100g/L de saccharose (**Drider et Prévost, 2009**).

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

de volume de l'inoculum. La production d'EPS n'est pas liée à la croissance mais plutôt qu'il y a une compétition entre ces deux mécanismes, qui a noté l'existence d'une concurrence entre la production d'EPS et la biosynthèse du polymère de la paroi cellulaire confirmé par **Dridier et Prévost (2009)**.

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*.

D'après les travaux de **Kersani (2018)**, La croissance bactérienne peut être ralentie mais la production des EPS stimulé, ce ci revient à la grande disponibilité des enzymes et des intermédiaires lipidiques intervinrent dans la production de EPS, les *Leuconostocs* restent les plus producteurs par rapport au *Lactococcus*, alors que la quantité d'EPS produit dépende la souche lactique testée.

Bien que l'avantage du milieu de saccharose pour la production de dextrans ait été prouvé précédemment, l'idée provient de l'objectif récent de l'application de bactéries utiles dans l'industrie alimentaire fermentée avec l'efficacité maximale. Cette étude fournit la base scientifique nécessaire pour maximiser la production de dextrans par les souches de *Leuconostoc*, qui utilisent une combinaison optimale de saccharose. D'après les travaux récents, la comparaison a été effectuée entre différentes sources de carbone et les meilleurs résultats ont été reçus de l'échantillon de saccharose.



# *Conclusion et perspectives*

Les hétérofermentaires s'est imposés dans la production industrielle, sont avérées comme meilleures candidates pour l'usage et l'étude des activités commerciales grâce à leur capacité à synthétiser des métabolites tels que les EPS autant qu'agents acidifiants, texturants, gélifiants et visqueux. Ces derniers ont la possibilité d'améliorer les propriétés organoleptiques et rhéologiques des produits fermentés.

Les bactéries du genre *Leuconostoc* ont été visées dans ce travail. Leur isolement a été réalisé précédemment par d'autres travaux. Vingt-Cinq souches sont revivifiées, par la suite, elles étaient identifiées par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques qui confirment les caractères phénotypique de genre *Leuconostoc*, à l'exception de deux souches (F63, F64). Ces bactéries ont été valorisées et examinées selon leurs potentialités de produire des EPS par réalisation des études qualitatives et quantitatives. Plusieurs milieux gélosés hypersaccharosés, ont été utilisés dévoilant la présence de grosses colonies, mucilagineuses et non filantes. Ceci montre l'existence de l'aspect mucoïde sur 6 souches (C1, C2, C10, C16, C23, F65) ont la capacité de produire le dextrane à partir de saccharose.

La caractérisation du dextrane a été réalisée précédemment par les travaux de Ayadi et Djbbass (2019). Utilisant différentes concentration de glucose et d'extrait de levure (0.1, 0.3, 0.5%) sur milieu MSE pour optimiser cette production. L'impact des substrats carbonés et azotés sur cette biosynthèse a montré qu'un rendement optimal d'EPS est trouvé pour une concentration de glucose (0.5%) et la concentration optimale d'extrait de levure est de 0.1% pour la plupart des isolats.

Les cinétiques de croissance et de production de biopolymères ont indiqué que la production des EPS n'était pas étroitement liée à la croissance. La quantification de dextrane ce faite pour 5 souches sélectionnées (C2, C10, C12, C13, V67), sur le milieu optimal en changeant la concentration de saccharose (5% ,10%) et de volume d'inoculum de 0.1 ml et 3ml. La plus grande quantité de dextrane était de valeur 3.23g/l produite par la souche C2, isoler à partir du lait chèvre. Cette production est obtenue à concentration 0.1% de l'extrait de levure, 0.5% de glucose, 10% de saccharose sur milieu MRSs à 30°C, pendant 72 h et un pH initiale de 6.5. Ces résultats confirment le phénotype visqueux de cescoques.

Une meilleure compréhension de chacune des étapes de la voie de biosynthèse, de la régulation et des limitations métaboliques est donc cruciale pour le succès de l'ingénierie de la production des EPS des BL. De plus amples recherches sont nécessaires afin de comprend la relation entre la structure des polysaccharides et leurs propriétés fonctionnelles.

- ✓ Identification moléculaire des souches bactériennes

- ✓ Définir les propriétés probiotiques des souches de *L. mesenteroides* étudiées.
- ✓ L'effet de symbiose des bactéries *Leuconostocs* avec autre genre sur la production d'EPS.
- ✓ L'étude approfondie du phénotype de dextrane produit par autres espèces.
- ✓ L'étude des conditions d'optimisation de dextransacchrases et l'expression du gène dsr et la purification de l'enzyme.



***Référence***  
***Bibliographiques***

Références bibliographiques

**A**

**Abdel Fattah,A.F., Hashem,A.M. , El-Refai,M.A. ,et Gebreel,H.M.,(2012).**Production and properties of dextransucrase by free and immobilized cells of *Leuconostoc paramesenteroides*.Egyptian Pharmaceutical Journal, 11: 42–48.

**Agence canadienne d’inspection des aliments.,(2014).***In* : Arfaoui, L. (2014). Compréhension des effets des propriétés intrinsèques des exopolysaccharides produits in situ seuls ou en présence de polysaccharides commerciaux sur la microstructure et les propriétés rhéologiques du yogourt ferme. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.

**Ait-Abdelouahab,N.,(2008).**Microbiologie Alimentaire. Place centrale de Ben-Aknoun(Alger), 3éme Edition, P55.

**Alegria, Á.,Delgado,S., Mayo,B.,(2013).** Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free, Cheeses. INRA and Springer-Verlag France, Dairy Sci. & Technol.

**Ates,O.(2015).**Review:Systems Biology of Microbial exopolysaccharides Production. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol.3.

**Ayadi,H et Djebbas,A.,(2019).**Caractérisation du dextrane produit par des souches de *Leuconostoc* isolées des produits laitiers. Mémoire master en Microbiologie appliqué UniversitéKasdi Merbah,Ouargla

**B**

**Badis A., Laouabdia-sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sciences et Technologie*, 23: 30–37.

**Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. et Obert, J.P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In* : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Corrieu, G. et Luquet, F.M. Eds Tec et Doc, Lavoisier. Paris, France. 661- 765.

**Bekhouche, F., (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1.Isolement et Identification biochimiques.2.Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme. polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en Microbiologie et Enzymologie. Université Mentouri Constantine, Algérie. 21-27.

**Belkheir, K., (2017).**Caractérisation Technologique de Nouvelles Souches de Bactéries Lactiques Isolées du Lait de Chamelle D'Algérie. Réalisation de Ferments Lactiques, Thèse de doctorat en Génie Microbiologie.Université D'Oran, Algérie.

**Bergmaier, D., (2002).** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.

**Bergy's manual. (2009).** Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer.

**Besrou-Aouam,N.,LuzMohedano,M.,Fhoula,I., Zarour,K.,Najjari1,A., Aznar,R., Prieto,A., Ouzari,H.I., López,P.,(2019).**Different Modes of Regulation of the Expression of Dextranucrase in *Leuconostoc lactis* AV1n and *Lactobacillus sakei* MNI,Frontiers in Microbiology.Vol 10 : A(959).

**Björkroth, J., & 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, 267-319.

**Boubekri,K., and Yoshiyuki ,O.,(1995).**Identification of Lactic Acid Bacteria from Algerian Traditional Cheese, El-Klila.J Sci Food Agric, 70, Alegria ; 501-505

**Bourel,G.,HeniniI,S.,Krantar,K.,Oraby,M., Diviés,C., Garmyn,D.,(2001).**Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*.INRA, EDP Sciences, vol 81 : 75–82.

**Bouricha,M.,(2011).** La sélection des souches de *Leuconostoc mesenteroides* productrices de substances antimicrobiennes, mémoire de magister en Microbiologie fondamentale et appliquée, Université d'Orne, Algérie.

## C

**Cardamone, L., Quiberoni,A.,Mercanti,D.j., Fornasari,M.E., Reinheimer,J.B., Guglielmotti.D.M.,(2011).**Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters.Dairy Sci. & Technol, 91:457–470.

**Carr F.J., Chill D., et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370.

**Cerning, J., Bouillanne, C. et Desmazeaud, M.J.,(1988).** Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters*. **10**: 255-260.

**Charpentier,J.,(1964).** L'influence de L'injection de Fer-Dextrane sur la Coloration Musculaire du jeun Bovine.,avec la collaboration technique de Denise Guêne, Laboratoire de Recherches sur la viande, Vol.13(2), p165-171.

**Cristiane Rabelo ,M.,Claudia M. L. Fontes ., Sueli R.,(2011).**Stability Study of Crude Dextranucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742.Indian J Microbiol,51(2) p164–170.

## **D**

**D'iaz-Montes,E.,Y'añez-Fern´andez,J.,Castro-Muñoz,R.,(2019).**Microfiltration-mediated extraction of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* SF3,Journal Pre-proof FBP 1186.

**Dal Bello, F., Walter, J., Hammes W., Hertel, C.,(2003).** Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microbial Ecology* 45(4):455–463.

**Day, D.F., (1992).** Spoilage in the sugar industry. In B. J. B. Wood (ED), the lactic acid bacteria. *Elsevier Appl. Sci.* pp.343-362.

**Devoyod, J.J. et Poullain F., (1988).** Les *Leuconostocs* propriétés : leur rôle en Technologie laitière. *Revue Le lait*, 68 (3), pp: 249-280, Laboratoire de microbiologie laitière. INRA Editions. Jouy-en-Josas, France.

**Dimic',G.R.,(2006).**Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*strains from fresh vegetables.BIBLID: 1450–7188 (37), 3-11.

**Djoughri, k., Madani, S.,**Etude microbiologique d'un produit laitier fermenté traditionnel (J'ben) : isolement et identification des bactéries lactiques, Mémoire master en Microbiologie appliqué Université Kasdi Merbah, Ouargla ..

**Dols,M., Remaud-Simeon,M.,et Monsan,P.F.,(1997).**Dextranucrase production by

*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B412F. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:PP523-530.

**Driderd et Prevost H.,(2009).** Bactéries Lactiques physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed.Economica., Paris. 593p.

**Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A et Smith, F.,(1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:350-356.

**Dupont,I.,(1998).**Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse de doctorat. Université Laval, Canada.

## **E**

**Eléonore, M., (2016).**Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales. Thèse de doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie Uni.Laval Québec, Canada et Université Paris XIII Villetaneuse, France P4.

**Endo, A., & Okada, S.,(2008).** Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov. co+mb. 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.

**Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A., (2000).** Class Iia bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev*, 24:85-106.

**Esmailnejad Moghadam, B., Mokarram, R.R., Hejazi, M.A., Khiyabani, M.S., Keivaninahr, F.,(2019).** Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: Optimization of a new culture medium and the rheological assessments, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*(18). 2212-6198.

**Euzéby, J.P., (2010).** List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Genus Leuconostoc*.

## **F**

**Faqiha, M., Yasar, M., Nabiha, M., Iqbal, M.S., Sattar, S.,(2019).** Production and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(f) fermentation, *Life Science Journal of Pakistan*. 1(01):19-23.

**Feng, F., Zhou, Q., Yang, Y., Zhao, F., Du, R., Huazhi Xiao, Y., Zhou, Z., (2018).** Characterization of highly branched dextran produced by *Leuconostoc citreum* B-2

from pineapple fermented product. *International Journal of Biological Macromolecules* 113 : pp 45–50.

## G

**Garbay ,S ., Lonvaud-Funel, A.,(1996).** Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. Faculte d’oenologie, Universite de Bordeaux 11, Talence, France, *Journal of Applied Bacteriology* 81, pp61 9-625.

**Garvie, E.I., (1986).** Gram positive cocci- Genus *Leuconostoc*. In : Bergy’s manual of systematic bacteriology. Eds. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt J.G. et. Baltimore, M.D: The Williams and Wilkins Co. 1071-1075.

**Ghazi A. E., Kamal M. and Correia L.R., (2009).** Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology* 96(10): 1143-1152.

**Ghazouli, R., (2013).** Etude structurale et génétique des exopolysaccharides produits par l’espèce *Rhizobium sultae*. Thèse de doctorat. Université de Constantine1, Algérie.

**Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, J.A., (2010)** Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comp Rev Food Sci Food Saf* 9(3):292–302.

**Guiraud,J.P., (2012).** *Microbiologie Alimentaires*. Dunod. Paris, France.

**Guo, M., Block, A., Bryan, C. D., Becker, D. F., & Alfano, J. R., (2012).** *Pseudomonas syringae* catalases are collectively required for plant pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 5054-5064.

## H

**Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sgiyama, M. et Morita, H., (2003).** Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl. Environ. Microbial.* 69:3668-3671.

**Han,J., Hang,F., Guo,B., Liu,Z., Yo,C., Wu,Z., (2014).** Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomatojuice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers* 112 (2014) 556–562.

**Harutoshi, T., (2013).** Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health, Applications: INTECH Open Access Publisher.

**Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., (2004).***Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14, 467-494.

**Hucker, G. J and Pederson, C. S., (1931).** A study of the physiology and classification of the genus *Leuconostoc*. *Zentralbl. Bakteriologie Parasitenkunde*. II 63 :59 - 96. Abt. 85:65-114.

**Hui, Y. H., & Evranuz, E.Ö., (2016).** Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, 2<sup>ème</sup> Edition: CRC Press.

## **J**

**Jiang,J., Guo.S., Ping.W., Zhao.D., Ge.J.,(2020).**Optimization production of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* L2 and its partial characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 159, 630–639.

## **K**

**Kersani,I.,(2018).** Production d'exopolysaccharides par des bactéries lactiques. Thèse de doctorat en biotechnologie microbienne, Université d'Oran. pp161.

**Kotharia,D., Dasb,D., Patelc,S., Goyala.,A(2014).**Dextran and Food Application, Springer *International Publishing Switzerland*.

## **L**

**Lissitzky,S., Bismuth,J et Rolland,M., (1962).**Séparation des Composés Iodés de sérum et de la thyroïde par Filtration sur Gel de Dextrane (Sephadex). *Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Marseille (France)* , *Clinica Chimica Acta*, 7, 183-189.

## **M**

**Mati A.,(1980).** Constitution d'une collection de souches de ferments lactiques isolées localement ; étude de leurs aptitudes technologiques. Thèse d'ing.agronome. IN.A. Alger.

**Mayeux, J.V., Sandine, W.W.E. et Ellker, P.R., (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures, *J.Dairy.Sci.*, 45, PP.655-656.

**Michelena,G.,Martinez,A., Bell,A .,Carrera , et E .,Valencia,R.,(2003).** Scale-up of Dextranucrase Production by *Leuconostoc mesenteroides* in Fed Batch Fermentation .Brazilian Archives of Biology and Technology,Vol :46. (3).pp 455-45

**Misaki,A., Torii,M., Savai, T., Goldstein, II.,(1980).** Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydr Res* 84, PP 273-285.

**Moosavi- Nasab,M., Alahdad,Z., and Nazemi,S.H.,(2009).** Characterization of the Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* from Date Fruit Extract.Iran Agricultural Research, Iran. Vol. 27,80-88.

## N

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

**Naessens,M., Cerdobbel,A., Soetaert,W., J Vandamme,E,(2005).***Leuconostoc* dextranucrase and dextran: production, properties and applications.*Journal of Chemical Technology and Biotechnology,Review.*, 80:845–860.

**Nouvel, C.,(2002).** Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-poly lactides : de leur utilisation comme surfactifs biodégradable a la mis en ouvres de systèmes de vectorisation particuliers. Thèse de doctorat en Génie des procédés. Uni, de L'institut national polytechnique de Lorraine, Ecole national supérieure des industries chimique. P8.

## O

**OMS : Organisation mondiale de la santé.,(1991).** Fiches modèles d'information à l'usage des prescripteurs médicaments utilisés en anesthésie. Série de rapports techniques, N°770,1998, Genève, p50.

**Orla-Jensen,S.,(1919).**The lactic acid bacteria.Mem. Acad.Roy.Sei .Let, Copenhagen,Sect.Sei., 5,81-196.



**Oscar, v., Reinier, A., Tjakko, A., Eddy, J., (2019).** Aroma formation in retentostat co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Food Microbiology* 82, pp151–159.

## **P**

**Palmira,D.B., Carlo,G.R., Angelo,S., Francesca,V., Stella., L.L, Amalia,C., Valeria,L., and Paola,L.,(2019).**Use of a Selected *Leuconostoc Citreum* Strain as a Starter for Making a “Yeast-Free” Bread. *Foods* 8,70,2-22.

## **R**

**Ravno,A.Bet Purchase,B.S.,(2005).**Dealing With Dextran in The South African Sugar Industry. *South African Sugar Association, 170 Flanders Drive, Mount Edgecombe, 4300, South Africa*, *Proc S Afr Sug Technol Ass* 79, p 92.

**Robyt, JF., (1992).** Structure, biosynthesis, and uses of nonstarch polysaccharides. dextran, alternan, pullulan, and alginate. In: Alexander RJ and Zobel HF (eds) *Developments in carbohydrate chemistry. St Paul, Minnesota, The American Association of Cereal Chemists.* PP 261-292

**Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., Cantabrana, C., Margolles, A., & Laws, A., (2012).** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and Bifidobacteria. In: Hui, E Y. H., & Özgül, E., *Handbook of animal-based fermented food and beverage technology.* CRC Press. UK. 2<sup>ème</sup> Edition. 7, 125-152.

## **S**

**Säde,E., (2011).***Leuconostoc* Spoilage of Refrigerated, Packaged Foods. Thèse de doctorat in Food Hygiene and Environmental Health Faculty of Veterinary Medicine. -University of Helsinki Helsinki, Finland, pp20-22.

**Sanchez J.I. Martinez B. & Rodriguez A., (2005).** Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int.J. food Microbial.*105, 377-387.

**Sarwat,F., Ali Ul Qader,S ., Aman,A., Ahmed,N.,(2008).**Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713,International Journal of Biological Sciences 4(6):379-386.

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

**Schröder, H., Nelson, P., Power, G., (1982).**Fluid Shift Across The Placenta : I-The Effect of Dextran T40 in The Isolated Guinea –Pig Placenta.3.327-338.

**Sebastiani H., Zelger G., (1998).** Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft.* 53:15-20.

**Shin,S., Han,N.,(2015).** *Leuconostoc spp.* as Starters and Their Beneficial Roles in Fermented Foods. Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, South Korea,111-132.

**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.

**Sutherland, I.W.,(1982).** Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology.* 23: 79-150.

## **T**

**Thiyagarajan, P.,Thirumalaisamy ,R., Thangasamy ,S., Chinnappan ,S., Sengottaiyan ,A., Palanisamy ,S., Priya, G3 ., et Nisha, JC4 .,(2017).**Optimization of Dextran Production from Cabbage Waste Using *Leuconostoc mesenteroides*.International Journal of Advances in Interdisciplinary Research, Vol. 4 (4) pp24-31.

**Tsuchiya, H.M., JeanesS,A., Bricker,H.M., et Wilham,C.A.,(1952).**Dextran-Degradin Enzymes from Molds.Vol. 64, p513-519.

## **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., & Contiero, J., (2012).** Dextran: effect of process paramanders on production, purification and molecular weight and recent applications. *Diálogos & Ciência*, 31, 171-186.

**Vijayendra, S.V.N. And. Sharath Babu, R.S.,(2008).** Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc sp. CFR-2181*. Journal compilation a 2008 The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology (46) 643–648.

## 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

**Yang.Y., Feng,F., Zhou,Q., Zhao,F., Du,R., Zhou,Z.,Han,Y.,(2018).** Isolation, Purification, and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Leuconostoc Citreum* N21 from Dried Milk Cake.

**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

**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 Algérie pp174

**Zarour, K., Z. Benmechernene, M. Hadadji, B.Moussa-Boudjemaa, J.E. Henni,M.Kihal.,(2012).** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d’Algerie. *Nature & technologie Revue.*, 8 :39-49.

**Zarour K., Benmechernene Z., Hadadji M., Moussa-Boudjemaa B., Henni D. J. et Kihal M.,(2012).** Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Algerian raw camel and goat milk for technological properties useful as adjunct starters. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(13), pp. 3192-3201.

**Zarour,K., Liams,L., Prieto, A., Ruas-Madiedo,P., Teresa Dueñas,M., Fernandez de Palencia,P., Aznar,R., Kihal,M., Lopez,P .,(2017).**Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria.*Carbohydrate Polymers* 174 646–657.

**Zergoune,K. E.,(2019).**Evaluation d'une substance antimicrobienne produite par les bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier traditionnel. Mémoire master en Microbiologie appliqué Université Kasdi Merbah, Ouargla

**Zinderman, C.E, MD, MPH., Landow, L, MD, et. Wise, R.P, MPH, M.D., (2006).**Anaphylactoid reactions to Dextran 40 and 70: Reports to the United States Food and Drug

# *Annexes*

## Annexes

## Annexe 1: Milieux de cultures et solutions

## Pour 1 litre de milieu :

**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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.25g
MnSO <sub>4</sub> .....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

PH 6.8

Autoclavage 120°C/20minutes

**02. 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

**03. Milieu MRS Modifiée (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Polypeptone.....	10g
Acétate de sodium.....	7g
Glucose.....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.25g
MnSO <sub>4</sub> .....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

PH 6.8

Autoclavage 120°C/20minutes

**04. Milieu MRS Modifiée (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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.25g
MnSO <sub>4</sub> .....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
Saccharose.....	100g

PH 6.8

Autoclavage 120°C/20minutes

## Annexe 2: 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:

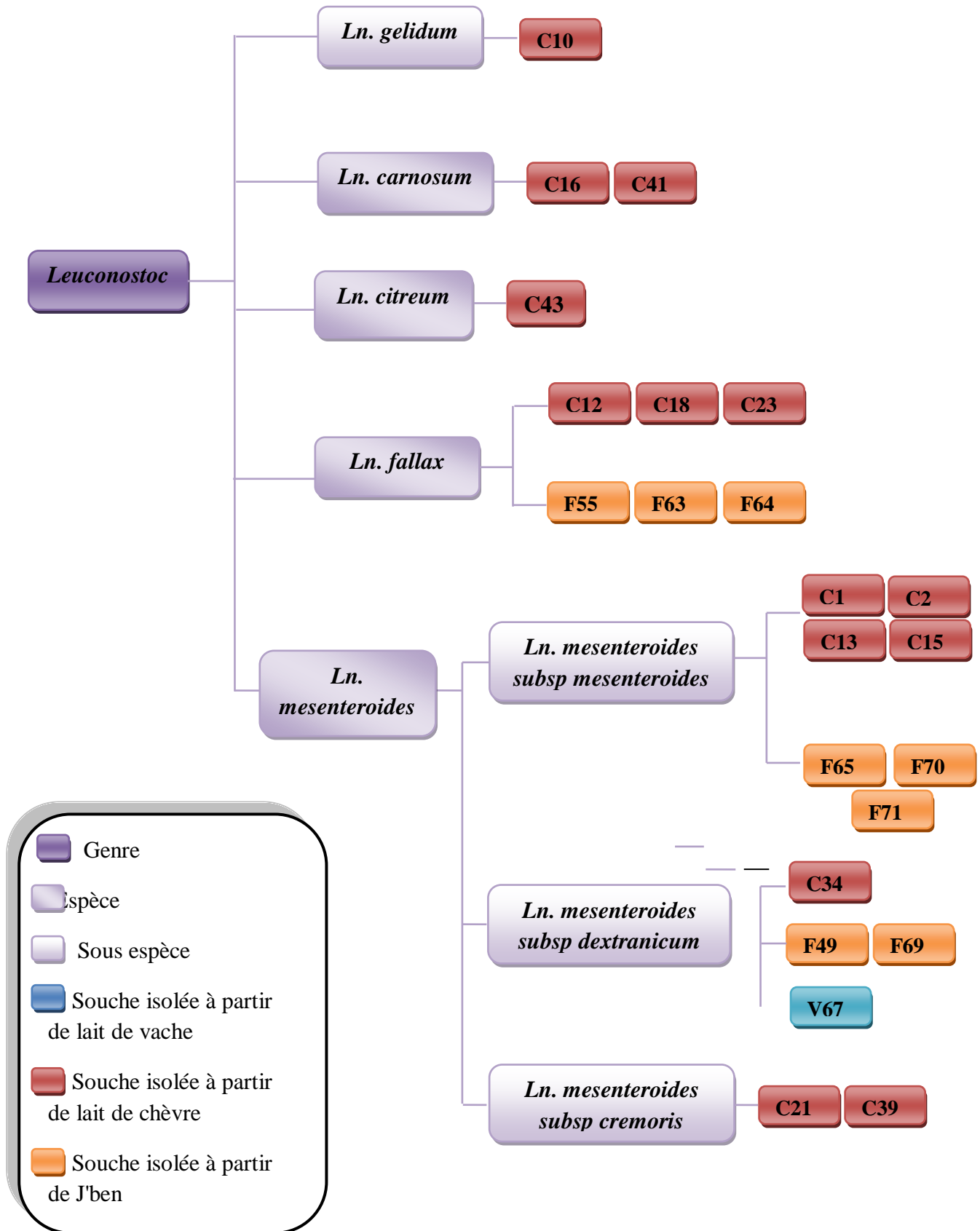
- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H<sub>2</sub>O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- Frotter la colonie dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 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'H<sub>2</sub>O 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'H<sub>2</sub>O comme précédemment décrit
- Décolorer en faisant couler l'alcool sur la lame, laisser 10 secondes et Rincer à l'H<sub>2</sub>O.
- Contre-colorer en déposant la solution de fushine (rose) pendant 1 minute. Rincer à l'H<sub>2</sub>O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement x40 ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement x100).



Annexe 3 : Identification phénotypique des souches (Ayadi et Djbbass, 2019)



## Résumé

Ce travail vise l'étude des caractérisations des aptitudes technologiques de 25 souches provenant de lait de chèvre, vache et le fromage frais, appartenant au genre de *Leuconostoc*, par la production de dextrane. Après une revivification sur le milieu MRS à une T° d'incubation de 30°C, les souches ont subi des tests classiques de confirmation d'identité. La production d'exopolysaccharide (EPS) par ces souches a été détectée qualitativement sur des milieux gélosés hypersaccharose, révélant la présence du caractère gluante et mucoïde. Les résultats de l'évaluation des aptitudes d'EPS indique que dans l'ensemble des 6 souches productrices de dextrane, et dans la totalité de ces dernières 3 souches (C10, C2, F65) ont un bon pouvoir producteur après 18 h d'incubation. Cette production diffère d'une souche à l'autre. Les 2 souches F65 et C2, étaient sélectionnées comme meilleurs producteurs de ces biopolymères traduisent par un temps de production réduite et une viscosité élevée sur milieu MRSs liquide. L'optimisation de la production d'EPS réalisée sur milieu MSE en changeant la concentration de source de carbone (glucose) et source d'azote (extrait de levure), a révélé la meilleur production chez la plus part des souches dans une concentration de 0.5% glucose et 0.1% d'extrait de levure. La quantification d'EPS réalisée sur bouillon MRSs avec différentes concentrations de saccharose, a montré que la meilleure production d'EPS était à concentration de 10% de saccharose. Cette quantification des EPS, permet de sélectionner la souche (C2) comme une bonne productrice de l'EPS dextrane en quantité 3.23g/l appartient phénotypiquement à l'espèce *Ln. mesentroides subsp mesenteroides*.

**Mot clés :** Dextrane, Exopolysaccharide, *Leuconostoc*, Optimisation, Substrat.

## Summary

This work aims to study the characterization of the technological abilities of 25 strains from goat, cow and fresh cheese, belonging to the genus of *Leuconostoc*, by the production of dextran. After a revival on the MRS medium has an incubation T° of 30°C, the strains underwent conventional tests of confirmation of identity. The production of EPS by these strains was qualitatively detected in hypersucrose agar media, revealing the presence of slimy and mucoid character. The results of the evaluation of EPS abilities indicate that in all strains 6 strains producing dextran, and in all of the latter 3 strains (C10, C2, F65) have a good ability to produce after 18 h of incubation. This production of dextran differs from strain to strain. The 2 strains F65 and C2 were selected as the best producers of these biopolymers result in a reduced production time and high viscosity on liquid MRSs medium. The optimization of the production of EPS carried out on MSE medium by changing the concentration of source of carbon (glucose) and source of nitrogen (yeast extract), revealed the best production in most strains in a concentration of 0.5% glucose, 0.1% leueur extract. The quantification of EPS achieved on broth MRSs with different sucrose concentrations, showed that the best production of EPS at 10% sucrose concentration. This quantification of EPS, allows to select a strain (C2) as a good producer of EPS dextran in quantity 3.23g/l phenotypically belongs to the species *Ln. mesentroides subsp mesenteroides*.

**Keywords:** Dextran, Exopolysaccharide, *Leuconostoc*, Optimization, Substrat.

## المخلص

يهدف هذا العمل إلى دراسة خصائص القدرات التكنولوجية لـ 25 سلالة من جبنالماعز والبقرة والجبن الطازج، المنتمية إلى جنس *Leuconostoc*، بإنتاج ديكستران. بعد إحياءها على وسط MRS درجة حرارة حضانة تبلغ 30 درجة مئوية، خضعت السلالات لاختبارات تقليدية لتأكيد الهوية. وقد تم اكتشاف إنتاج متعدد السكر (EPS) من هذه السلالات من الناحية النوعية على وسائط أجار مفرطة السكر، مما كشف عن وجود الطابع اللزج والمخاطي. وتشير نتائج تقييم كفاءات EPS إلى أنه في جميع السلالات 6 سلالات منتجة لديكستران، وفي هذه السلالات الأخيرة 3 منها (10C، 2C، 65F) لديها قدرة جيدة على الإنتاج بعد 18 ساعة من الحضانة. ويختلف إنتاج ديكستران من السلالة إلى أخرى. وقد تم اختيار السلالتين F65 و C2 كأفضل منتجي لهذه المركبات الحيوية مما يظهر انخفاض في وقت الإنتاج وارتفاع درجة اللزوجة على وسط MRSs السائل. وقد كشف تحقيق الأداء الأمثل لإنتاج EPS المنفذ على وسط MSE عن طريق تغيير تركيز مصدر الكربون (الجلوكوز) ومصدر النيتروجين (مستخلص الخميرة)، عن أفضل إنتاج في معظم السلالات بتركيز 0.5% من الجلوكوز، و0.1% من مستخلص الخميرة. وقد أظهر القياس الكمي الذي تم إجراؤه على MRSs السائل بتركيز مختلفة من السكر، أن أفضل إنتاج من EPS بتركيز بنسبة 10% السكر. هذا القياس الكمي لهذه المركبات الحيوية، يسمح باختيار سلالة (2C) كمنتج جيد لديكستران EPS بكمية 3.23 غ/ل تنتمي بشكل ظاهري إلى الأنواع *Ln. mesentroides subsp mesenteroides*.

**الكلمات المفتاحية :** ديكستران، المركبات الحيوية، *Leuconostoc*، التحسين، الركيزة