

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences biologiques



**Mémoire de Fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

**Présenté par : BOUCHAALA Hinda
REZZAG HABLA EL Hadj abd Razzak**

Thème

**Production d'un exopolysaccharide (EPS)
à partir des souches *Leuconoctoc* isolées à
partir du lait de chèvre cru**

Soutenu publiquement Le : 28/06/2021

Devant le jury :

- | | | |
|---------------------------------------|--------------|----------------------------|
| * Président : HENNI Abd Allah | M.C.A | Univ. K. M. Ouargla |
| * Encadrant : BOURICHA M'hamed | M.A.A | Univ. K. M. Ouargla |
| * Examineur : BELDI Nadia | M.C.B | Univ. K. M. Ouargla |

Année Universitaire: 2020/2021

Remerciements

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

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

Nous remercions les membres de notre jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, et plus particulièrement Mr. HENNI Abd Allah M.C.A à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla ainsi que Mme BELDI Nadia M.C.B. à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

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

Nous adressons notre sincères remerciements à tous les professeurs intervenants en particulier Mr. BOUKHALFA Hakim de CRAP C, et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à nous rencontrer et répondre à mes questions durant notre recherches.

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

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



Dédicaces

En avant, à Dieu qui m'a réconcilié à accomplir ce travail

A mes chers parents

*Vous m'avez appris que la vie était remplie de petites batailles,
Vainqueurs, vaincus, la guerre continue jusqu'à ce qu'on devienne très vieux.*

Les études sont mes exercices d'entraînement,

Les diplômes seront mes armes de combat,

La persévérance et l'assiduité seront le secret de mon couronnement,

L'amour et l'amitié seront le répit du soldat.

Grâce à vous, vos enfants ont accompli beaucoup de succès

Je vous aime.

Qu'Allah puisse vous accorde la santé ,le bonheur ,la longévité.

A mes chères sœurs et frères

Fatima ,Mohamed laid, Nacer,

*Zahia,Amira,Aicha,Halima,Youcef,Massouda,Ammar et Imane A ceux qui ont paris une
partie dans mon coeur :Slimane, Hinda ,Feriel et Fayza .*

A mes proches amies : Ayman , Saad ,Djamel Eddine ,Yacin et Slimane.....

Je vous remercie de tout ce que vous m'avez appris et donné,

Pour votre optimiste, votre dynamisme, vos aides et soutiens précieux,

Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite du monde

*Aucun mot, aucun dédicace ne serait exprimer l'amour, le respect et la reconnaissance
que j'éprouve pour vous.*

AYOUB...

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de Dieu tout puissant

A mes parents .

Vous m'avez éduqué et enseigné le sens de l'honneur ,de la dignité et de probale morale et le respect de soi.

Votre soutien et conseils m'ont beaucoup aidé et je crois avoir atteint en partie vos objectifs .

Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi jusqu'à cet instant.

Qu'Allah puisse vous accorde la santé ,le bonheur ,la longévité.

A mes frères : Farid ,Tidjani , Abd djabar, Ahmed , Djamel et Salim .

A mes soeurs : Soumia et Meriem Merci pour votre encouragement.

A toute ma famille.

A ceux qui ont paris une partie dans mon coeur : Feriel , Fayza et Ayoub.

A mes proches amies :Hayat , Rokia ,Chaima ,Hafsa ,Djamila et Nossaïba .

Je remercie particulièrement mon frère, mon binôme Ayoub pour son amitié ,sa vivacité d'esprit ses précieux conseils et les moments passé ensemble .

Et á son adorable famille, que dieu les protège

Hinda.

Liste des abréviations

A : Absorbance

ADH : arginine déshydrolyse

H₂SO₂ : Acide sulfurique

KMK : Kempler Mac Kay

L : *Lactococcus*

LAB : Bactérie lactique

Ln : *Leuconostoc*

MRS : Man Rogosa et Sharpe

MRS BCP : Man Rogosa Sharp additionné de pourpre de bromocrésol

MRSs : Man *Rogosa Sharp* + saccharose

MSE : Mayeux Sandine et Elikar

MSR_v : Man Rogosa et Sharpe supplémenté de la vancomycine

DO : densité optique

Liste des tableaux

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>page</i>
Tableau 01:	Condition d'optimisation de production de dextrane .	15
Tableau 02:	La date des collections, le nombre et la provenance des échantillons prélevés.	17
Tableau 03:	les cas de optimisation de différent concentration(glucose , Extrait de levure , saccharose).	25
Tableau 04:	Résultats des tests physiologiques et biochimiques de l'identification des souches isolées á partir du lait de chèvre cru.	34
Tableau 05:	Représente des valeurs d'A490 nm obtenues par la méthode phénol acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.(annexe)	63

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 01:	Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> .	04
Figure 02:	Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de <i>Leuconostoc</i> selon leur séquence de l'ARNr 16s.	07
Figure 03:	Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de <i>Leuconostocmesenteroides</i> . 1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 a acétolactate synthase, 6 a-acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase 10 phosphotransa cétylase, 11 alcool déshydrogénase .	10
Figure 04:	Représentation schématique de la structure générale du dextrane synthétisé à l'aide de la bactérie <i>Leuconostoc méésentéroïdes</i> et constitué d'un enchaînement d'unités α -D-glucopyranose lié par des liaisons chimiques en α -(1 \rightarrow 6) et d'une ramification en α -(1 \rightarrow 3).	13
Figure 05:	Courbe d'étalonnage des oses totaux (glucose).	23
Figure 06:	Photo d'aspect macroscopique des cultures bactériennes des souches de <i>Leuconostoc</i> ensemencées en profonde sur milieu MRS.V	26
Figure 07:	Représentation schématique de la répartition totale des souches isolées à partir des échantillons.	27
Figure 08:	Photo de l'aspect des souches pures des <i>Leuconostoc</i> sur milieu MRS solide	27
Figure 09:	Photo d'aspect de trouble d'une souche de <i>Leuconostoc</i> sur bouillon MRS après 18 h de croissance.	28
Figure 10:	Photo d'observations microscopiques des souches (<i>Ln. Mesentroides subsp. mesentroides</i>) de bactéries lactiques après une coloration de Gram à grossissement x100.	28
Figure 11:	Photo de résultat du test de catalase (test négatif)	29
Figure 12:	Photo de type fermentaire des souches isolées (<i>Leuconostoc</i>) sur bouillon MRS	31

Figure 13:	Photo de résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine)	32
Figure 14:	Photo de résultat de l'Hydrolyse de l'esculine / le noir : esculine +	33
Figure 15:	Photo de révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK des espèces <i>Ln. carnosum</i> , <i>Ln. fallax</i> , <i>Ln. Mesenteroide</i> .	36
Figure 16:	Photo de morphologies des colonies productrices de dextrane par les souches de <i>Leuconostoc</i> sur milieu MSE.	37
Figure 17:	Répartition finale des espèces selon les résultats des différents tests effectués	37
Figure 18:	Histogramme de production des EPS (dextrane) par La souche <i>Leuconostoc</i> dans le milieu MRSs.	38
Figure 19:	Histogramme de comparaison entre les concentrations de dextrane produit par les isolats dans le milieu MRSs et le MSE.	39
Figure 20:	Histogramme d'effet de différent concentrations des substrats dans la concentration de dextrane produite par la souche LnLC1.	40

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction.....1

Partie synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les *Leuconostoc*

I.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....3

I.1.1. Historique.....3

I.1.2. Définition.....3

I.1.3. Classification des bactéries lactiques.....3

I.2. Genre *Leuconostoc*.....5

I.2.1. Historique.....5

I.2.2. Définition.....6

I.2.3. Taxonomie des *Leuconostoc*.....6

I.2.4. Caractères généraux.....8

I.2.4.1. Caractères morphologiques et culturels.....8

I.2.4.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques.....8

A. Fermentation des sucres.....8

B. Fermentation de citrate.....9

I.2.4.3. Caractères biotechnologiques.....10

A. Production de substance aromatique.....11

B. Production des substances antimicrobiennes.....11

C. Production d'exopolysaccharides (EPS)11

I.2.5. Utilisations du genre	11
------------------------------------	----

Chapitre II : Caractérisation de dextrane

II. Caractérisation de dextrane.....	13
II.1. Définition de dextrene.....	13
II.2. Production de dextrane.....	13
II.3. Conditions de la production de dextrane.....	14
II.4. Applications du dextrane.....	15

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I. Matériel et Méthodes.....	17
I.1. Lieu d'étude.....	17
I.2. Provenance des échantillons.....	17
I.3. Isolement.....	18
I.3.1. Préparation des dilutions.....	18
I.3.2. Ensemencement.....	18
I.3.3. Purification.....	18
I.4. Pré-identification des isolats.....	18
I.4.1. Coloration de Gram.....	18
I.4.2. Recherche de la catalase.....	18
I.5. Conservation des isolats.....	19
I.6. Identification et caractérisation des isolats.....	19
I.6.1. Test morphologique.....	19
I.6.1.1. Examen macroscopique.....	19
I.6.2. Tests physiologique.....	20
I.6.2.1. Croissance à différentes températures.....	20
I.6.2.2. Croissance à différents pH	20
I.6.2.3. Résistance à la salinité.....	20

I.6.3. Tests biochimiques.....	20
I.6.3.1. Recherche de type fermentaire.....	20
I.6.3.2. Recherche de l'Arginine déshydrogénase (ADH).....	20
I.6.3.3. Test de dégradation des sucres.....	21
I.6.3.4. Hydrolyse l'esculine.....	21
I.7.4. Tests biotechnologiques.....	22
I.7.4.1. Production des substances aromatiques.....	22
I.7.4.2. Production des exopolysaccharides.....	22
I.8. Production de dextrane et optimisation des conditions nutritionnelles de production:..	22
I.8.1. Production et Quantification de dextrane.....	22
I.8.2. Le Principe de Méthode.....	23
I.8.3. Optimisation de la production de dextrane.....	24

Chapitre II : Résultats et discussion

II. Résultats et discussions.....	26
II.1. Isolement et purification.....	26
II.2. Tests morphologiques.....	27
II.2.1. Aspect macroscopique.....	27
II.3. Pré-identification.....	28
II.3.1. Coloration de Gram.....	28
II.3.2. Test de recherche de la catalase.....	29
II.4. caractéristiques physiologiques et biochimiques.....	29
II. 4.1. Tests physiologiques.....	29
II.4.1.1. Croissance à différentes températures.....	29
II.4.1.2. Thermorésistant.....	30
II.4.1.3. Croissance à différents pH.....	30
II.4.1.4. Résistance à la salinité.....	30
II.5. Tests biochimiques.....	30
II.5.1. Recherche de type fermentaire.....	30

II.5.2. Hydrolyse de l'arginine (ADH)	31
II.5.3. Test de dégradation des sucres	32
II.5.4. Hydrolyse de l'esculine	32
II.6. Tests biotechnologiques	35
II.6.1. Production des substances aromatiques	35
II.6.2. Production de dextane	36
II.7. Étude de production de dextrane	38
II.7.1. Production de dextrane sur MRSs	38
II.7.2. Optimisation de la production de dextrane	39
II.7.2.1. Comparaison entre les concentrations de dextrane produit par les isolats dans le MRSs et le MSE	39
II.7.2.2. Effet de différent concentration des substrats dans la concentration de dextrane produise par le souche LnLC1	40
Conclusion	44
Références bibliographiques	46
Annexe	60

Introduction

Introduction

Le lait de chèvre joue un rôle essentiel dans la vie des communautés ruraux, que ce soit sous sa forme crue ou transformée (Raïb, Lben «laits fermentés traditionnelles locales» et Jben «fromage frais traditionnel local»). Dans ces produits, la fermentation est spontanée obtenue par la flore lactique naturelle (**BADIS et al., 2004; ZAROOUR et al., 2013**).

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité sanitaire alimentaire. (**BOUYGUES, 2017**). Cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu. (**ALI JUMMA et al., 2021**). Les techniques de biologie moléculaires ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente de treize genres : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* (**CARINE et al., 2009; LAHTINEN et al., 2012**).

Les EPS microbiens sont des polymères biosynthétiques ou biopolymères définis par **GEESEY (1982)** comme étant des « substances polymériques extracellulaires d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens ». D'autres auteurs tels que **CHARACKLIS et WILDERER (1989)** vont plus loin définissant les EPS comme des « polymères organiques qui sont souvent responsables dans les biofilms de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur des substrats » (**GEESEY, 1982; CHARACKLIS et WILDERER, 1989; GARRIDO et al., 2002; DU et al., 2018**).

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone. Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort (**KIHAL et al., 2009; BOUYGUES, 2017**).

Certaines espèces de *Leuconostoc*, en particulier *Ln. mesenteroides* est utilisée pour la production d'un polymère de glucose biodégradable connu sous le nom de

dextrane qui a plusieurs applications technologique ciblées des industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et de forage pétrolier (**SUTHERLAND *et al.*, 1996; ALAHADAD *et al.*, 2010**).

Le dextrane est produit au niveau industriel par la fermentation de milieux riches en saccharose. Plusieurs chercheurs ont optimisé les conditions de fermentation pour une production maximale de dextrane. le poids moléculaire et le rendement de la production de dextrane dépendaient de variables du processus telles que la température, le saccharose et la concentration d'accepteur (**PEREIRA *et al.*, 1998; FANG FENG *et al.*, 2019**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des souches *Leuconostoc* productrice de dextrane. La première partie de ce mémoire consistera une étude bibliographique composé de deux chapitres ; le premier représentant des généralités sur les bactéries lactiques ainsi les *Leuconostoc* et leur rôle technologique. Le deuxième représentant la structure chimique et l'intérêt du dextrane produit par les espèces *Leuconostoc*.

La deuxième partie, consiste à une étude expérimentale où nous allons isoler des souches *Leuconostoc* suivi d'une identification phénotypique. L'étude de production de dextrane à partir des isolat et l'optimisation des condition nutritionnelle de cette production.

Partie synthèse bibliographique

Chapitre I
Généralités sur les
Leuconostoc

I.1. Généralités sur les bactéries lactiques

I.1.1. Historique

Les bactéries lactiques sont très anciennes, apparues avant les cyanobactéries, il ya près de 3 milliards d'années. Elles ont été utilisées par les producteurs de lait depuis 65 millions d'années (**DRIDER et PREVOST, 2009**). En 1856, Pasteur découvre des microorganismes contaminants, responsables d'un accident de fermentation de jus de betteraves dans une distillerie du Nord de la France. Il vient de découvrir les bactéries lactiques, une classe de microorganismes étroitement liés à l'activité humaine, et qui aujourd'hui encore ne cesse pas de s'élargir (**MATAMOROS, 2008**). La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par LISTER en 1873 (**GUIRAUD, 2003; LIMSOWTIN et al., 2004; BELARBI et DEMIR, 2020**).

I.1.2. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacille (**BADIS et al., 2005; ZAROOUR et al., 2013**).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme, Elles possèdent catalase négative, nitrate réductase négative, oxydase négative (**KASSAS, 2017**).

I.1.3. Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène et ceci non seulement de côté métabolique mais aussi de côté morphologique, d'habitat ..., cette propriété d'hétérogénéité est conférée à ce genre des bactéries une diversité permettant de dresser une taxonomie (**HANSAL, 2015**). La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla Jensen** qui est basée sur plusieurs caractères (morphologiques, physiologiques et biochimiques) (**BELARBI, 2011**). En général, les genres qui composent le LAB sont *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

Lactobacillus, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (SALMINEN *et al.*, 2012).

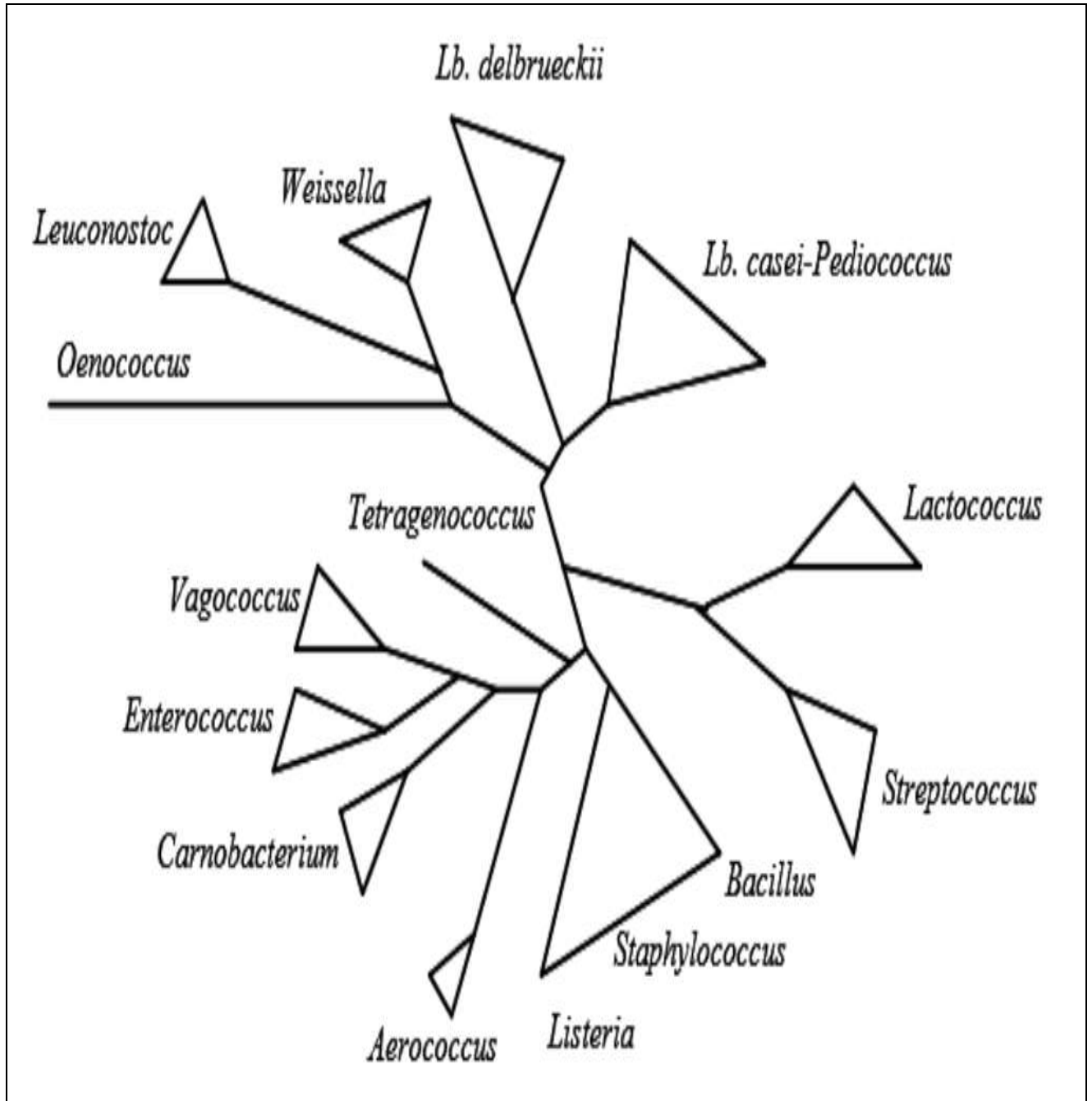


Figure 01: Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après (AXELSSON, 2004; SALMINEN, 2004).

I.2. Genre *Leuconostoc*

I.2.1. Historique

Ce terme scientifique dérivé du mot grec **Nostoc** qui est une algue bleue mucilagineuse et de **leukos** qui veut dire blanc et claire (**HANSAL, 2015;in BEN GUEHZA et MOUKNINE, 2019**).En **1878**, *Leuconostoc* a été défini pour la première fois par VAN THIEGHEM. Ces bactéries lactiques sont apparues à l'examen microscopique sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les *Leuconostoc* responsables de ces accidents produisent des dextrans en milieu saccharosé (ces chaînes sont entourées d'une gaine bien distincte qui rappelle celle des *Nostoc*) (**BRAHIMI, 2015**).

En **1912**, **BEIJERINCK** a isolé, à partir du beurre et d'autres produits laitiers, des microorganismes identiques aux *Leuconostoc* antérieurement décrits, ces microorganismes produisaient de la gomme à partir du saccharose et ils ont pris le nom de *Lactococcus dextranicus* (**DEVOYOD et FRANCOISE, 1988**).En **1918**, **EVAN** trouva que les *Leuconostoc* ont le caractère hétérofermentaire, donc ils sont capables de produire de CO₂ à partir du glucose, et celui-ci a été confirmé par **HUCKER** en **1928** (**RAHMANI, 2014**).

En **1919**, **ORLA-JENSEN**, dans son étude sur les bactéries lactiques, a séparé le genre *Betacoccus* du genre *Streptococcus*. Et leur nom vient de la betterave (*Beta communis*) d'où ils ont été trouvés. **ORLA-JENSEN** ensuite a trouvé pour la première fois, d'après leur résultat, qu'il y a une relation entre les *Leuconostoc* produisant du dextrane (*Betacoccus*) et certains streptocoques producteurs de l'acide lactique trouvé dans les produits laitiers. Le genre *betacoccusa* été séparé ensuite en deux espèces par **ORLA-JENSEN**, il y aura *B. arabinosaceus* et *B. bovis* d'après leur capacité de fermenter l'arabinose. (**DEVOYOD et FRANCOISE, 1988**).

En **1920**, **HAMMER**, en étudiant les streptocoques des levains, a isolé deux espèces qu'il dénomma *Streptococcus citrovorus* et *S. paracitrovorus*, qu'ils sont reconnus comme responsables de l'arôme du beurre. Ces microorganismes furent, quelques années plus tard, assimilés au genre *Betacoccus* et *S. citrovorus* devint *B. cremoris*. (**DEVOYOD et FRANCOISE, 1988**).

Se sont des bactéries lactiques qui prend la forme de cocci et se trouvent en paire ou en chaînette (**DEVOYOD et al., 1988**), ils sont hétérofermentaire qui produisent de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO₂. (**MECHAI, 2009**).

I.2.2. Définition

Les *Leuconostoc* sont des Gram+, aéroanaérobies facultatives, asporulées, immobiles, chimioorganotrophes qui ne se multiplient pas que dans un milieu additionné à des facteurs de croissances et des acides aminés avec la présence d'un sucre fermentescible (BRAHIMI, 2015)

I.2.3. Taxonomie des *Leuconostoc*

Les analyses génétiques ont montrées que le groupe des *Leuconostoc* comprend trois lignées: «*Leuconostoc sensu stricto*», «*Leuconostoc paramesenteroides*», «*Leuconostoc ænos*».

Depuis la première classification du genre *Leuconostoc*, la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Au fur et a mesure que les connaissances progressent, leur classification est changée pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Le genre *Leuconostoc* renferme 12 espèces (*mesenteroides*, *lactis*, *pseudomesenteroides*, *carosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, *inaha*, *holzapfelii* et *palmae*). L'espèce *Ln.mesenteroides* est la plus employée en industrie agro-alimentaire, cet espèce comprend trois sous-espèces (*subsp.mesenteroides*, *subsp.dextranicum* et *subsp.cremoris*) (HOLZAPFEL et WOOD, 2014).

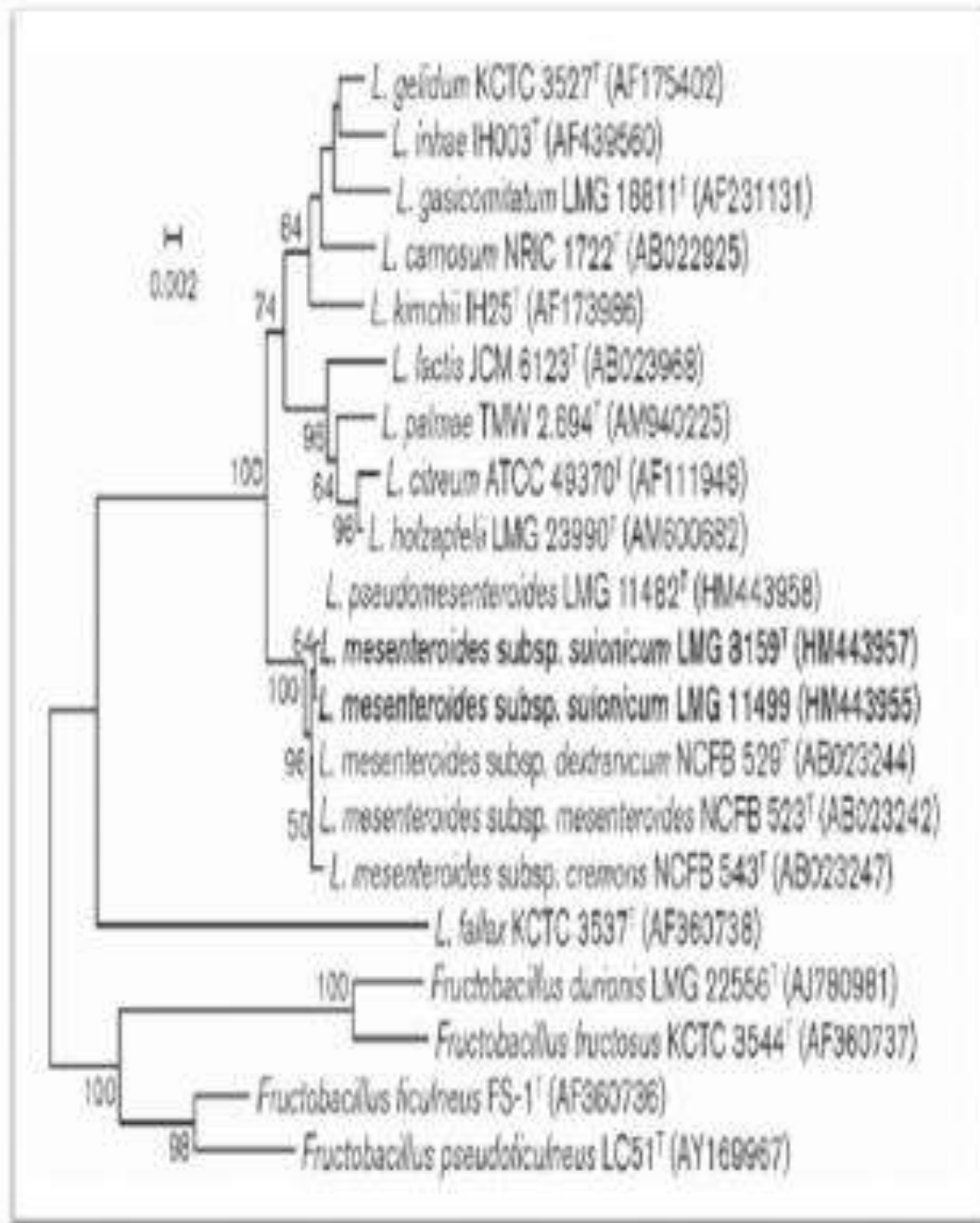


Figure 02: Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de *Leuconostoc* selon leur séquence de l'ARNr 16s (HANSAL, 2015).

I.2.4. Caractères généraux

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

I.2.4.1. Caractères morphologiques et cultureux

Les *Leuconostoc* sont exigeantes sur le plan nutritionnel et nécessitent une source d'acides aminés et de vitamines ainsi qu'un glucide fermentable pour leur donner de l'énergie. Habituellement, elles poussent bien dans les bouillons de Man, Rogosa et Sharpe, mais mal dans le lait, nécessitant souvent des suppléments de vitamines B, de minéraux et d'acides aminés pour la croissance. Les acides aminés spécifiques dont ils ont besoins à l'aspartate, le glutamate, la valine, la leucine, l'isoleucine et en fonction de la souche, l'histidine, la méthionine, tryptophane, arginine et cystéine. Mg²⁺ et Mn²⁺ stimulent leur croissance. Les *Leuconostoc* sont incapables de métaboliser l'arginine(LIU, 2016). Certaines espèces telles que *Leuconostoc mesenteroides* ne peuvent pas croître en absence d'ions minéraux, ce qui indique l'exigence absolue pour ces éléments (FOUCAUD *et al.*, 1997).

I.2.4.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques

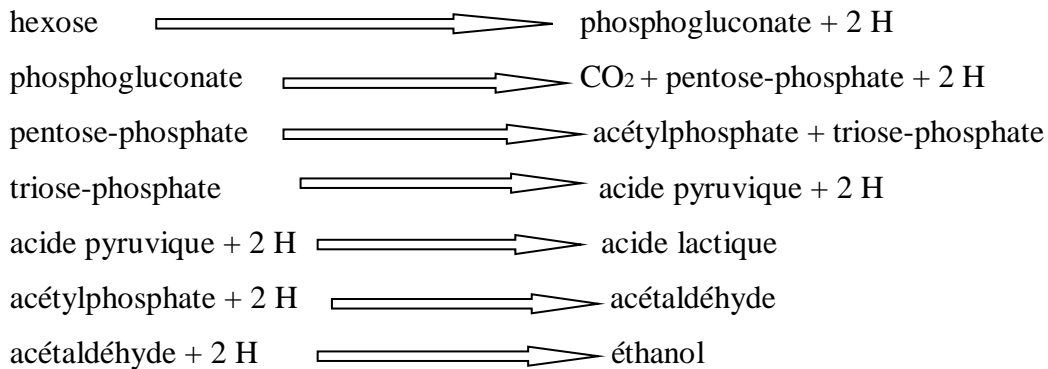
Les espèces de *Leuconostoc* sont des bactéries mésophile, leurs température optimum de croissance est de 18- 30°C, leur température minimale est de 5°C et la maximale est de 40°C (RAHMANI, 2014). Et leur pH optimale de croissance ne se fait que à un pH voisin au celui du lait et ne se développent plus à un pH acide (CHAKOU et BESSADIK, 2018).

Permis les caractères biochimiques les plus importants, nous pouvant citer: la fermentation des sucre, la fermentation de citrate, la production de dextrane (RAHMANI, 2014).

a. Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose (LEES et JAGO, 1976;in BEN GUEHZA et MOUKNINE, 2019). Trois

voies principales existent pour la synthèse de l'acétaldéhyde à partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'EtnerDoudoroff et la voie des hexoses monophosphates (**DEVOYOD et FRANCOISE, 1988**). Compte tenu des études effectuées sur *Ln. mesenteroides* ou *Ln. dextranicum*, il est possible de donner le schéma simplifié suivant de la fermentation des hexoses par les *Leuconostoc*:



Soit : **hexose** CO_2 + **éthanol** + **acide lactique** (**DEVOYOD et FRANCOISE, 1988**).

l'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de *Leuconostoc* par voie oxydative (**ITO et al., 1983**).

b. Fermentation de citrate

L'acide lactique est utilisée par nombreuse espèces de genre *Leuconostoc*, cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et une source d'azote. (**LEUVEAU et BOIUX, 1993**). Le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par un citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par un citrate lyase (**Figure 03**) (**GERALD et al., 2001**). L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO_2 par une oxaloacétate décarboxilase (**GERALD et al., 2001**).

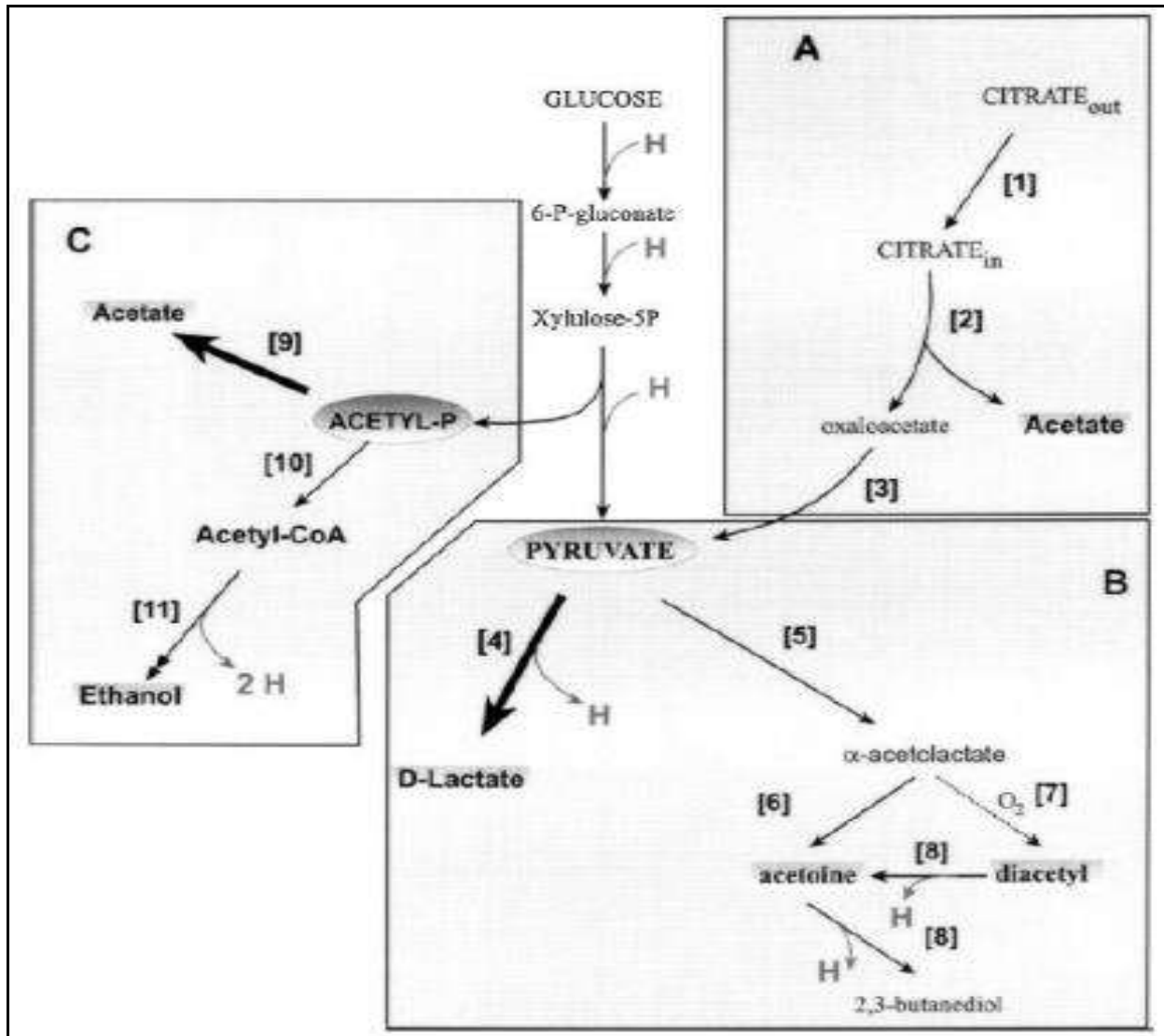


Figure 03: Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides*. 1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 a acéto lactate synthase, 6 a-acéto lactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase 10phospho transa cétylase, 11 alcool déshydrogénase (GERALD *et al.*, 2001).

I.2.4.3. Caractères biotechnologiques

Les *Leuconostoc* représentent le troisième groupe important de bactéries lactiques puisqu'ils ont une grande importance et jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentations industrielles **OGIER *et al* (2008)** comme celui des saucisses fermentées, des légumes et des produits fermentés à base de céréales et des produits laitiers (tels que le beurre, crème, lait frais et crus, fromages) (**GUIRAUD, 2003; OGIER *et al.*, 2008**).

a. Production de substance aromatique

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (TAMIME, 1990).

Certaines espèces de *Leuconostoc* utilisées dans l'industrie laitière sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol (RAYNAUD *et al.*, 2003 ; LEROY et DEVUYST, 2004).

b. Production des substances antimicrobiennes

Les BL sont très connus par la production d'une variété de composés antimicrobiennes tel que: l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide propénoïque, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la réutérine et dioxyde de carbone et diverses substances inhibitrices. Cette propriété est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la bio conservation, en utilisant une microflore naturelle contrôlée et/ou leurs produits antimicrobiens. (DORTU et THONART, 2009 ; PAPAGIANNI, 2012; BEN ATTALLAH *et al.*, 2017).

c. Production d'exopolysaccharides (EPS) ,

Les souches de *Leuconostoc* peuvent produire des exopolysaccharides, tels que le dextrane, un homopolysaccharide qui a diverses utilisations dans les industries alimentaire, pharmaceutique, médicale ou de forage pétrolier (AMAN *et al.*, 2012). Dans l'industrie alimentaire, il est ajouté aux produits de boulangerie et à la confiserie pour améliorer la rétention d'humidité et l'augmentation de la viscosité, de la rhéologie et de la texture (PEREZ-RAMOS *et al.*, 2015).

I.2.5. Utilisations du genre

Les *Leuconostoc* jouent un rôle central en plusieurs secteurs tel que l'industrie alimentaire, pharmaceutiques, l'agriculture, et la biotechnologie. Tandis que leur utilisation en industrie alimentaire constitue l'application majeure de ces bactéries (KASSAS, 2017). Les exopolysaccharides produits par *Leuconostoc* ont un rôle d'agents épaississants, des stabilisants, des émulsifiants, des agents gélifiants et/ou viscosifiants dans

l'industrie médicale, pharmaceutiques et même dans la fabrication des cosmétiques (SANLIBABA et ÇAKMAK, 2016). Sa présence dans les aliments améliore les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers) dont ils ont plusieurs usages : contrôlent la viscosité et modifient le flux, améliorent la texture, sensation de bouche et la stabilité de congélation-décongélation, épaississants, agents de suspension, produits alimentaires de faibles calories, fibres alimentaires, films et agents de revêtement, glaçage des aliments congelés, et agents hydratants (BAJPAI *et al.*, 2015).

Les EPS peuvent également être utilisées comme source d'oligosaccharides et de monomères de sucre. (PATEL *et al.*, 2012). Les Leuconostocques sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort par la production de CO₂. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roquefortis* (DEVOYOD *et al.*, 1988).

Chapitre II

Caractérisation de dextrane

II. Caractérisation de dextrane

II.1. Définition de dextrene

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

Ce produit est utilisé pour des applications cliniques présente au minimum 50% des liaisons α -(1,6) dans sa chaîne principale et différents types de ramifications, principalement α -(1,3), mais aussi α -(1,2) ou α -(1,4) en fonction de la souche productrice (**MONSAN et al., 2001**).

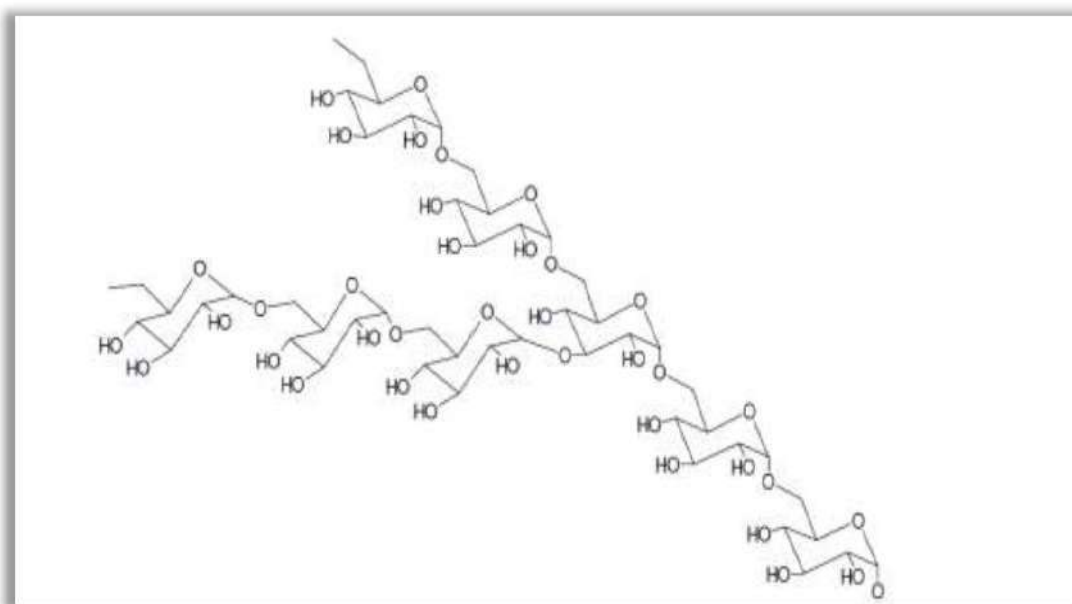


Figure 04: Représentation schématique de la structure générale du dextrane synthétisé à l'aide de la bactérie *Leuconostoc méésentéroïdes* et constitué d'un enchaînement d'unités α -D-glucopyranose lié par des liaisons chimiques en α -(1 \rightarrow 6) et d'une ramification en α -(1 \rightarrow 3) (**COVIS, 2011; CONTIERO et al, 2012**).

II.2. Production de dextrane

Le dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* est catalysé la synthèse de dextrane, polymère de glucose à partir du saccharose (DOLS, 1996; in AYADI et DJEBBAS, 2019).

BROOKER (1977) a montré que la paroi cellulaire de *Ln. Mesenteroides* qui présente la structure classique à trois couches des bactéries Gram-positives lorsque ce microorganisme est cultivé en bouillon MRS est modifiée en présence de saccharose .

BROOKER (1976) A mentionné que la couche extérieure dérive du dextrane globulaire de la capsule selon un processus de dispersion. Cette couche superficielle des cellules croissant en présence de saccharose, représente un complexe dextrane fixé à la cellule.

Selon **DEVOYOD et POUILLAIN (1988)** deux types de colonies ont été observées sur le milieu au saccharose de (**MAYEUX, SANDINE et ELLIKER, 1962; DEVOYOD et POUILLAIN, 1988**).

a) de grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge.

b) de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.

COT et ROBYT, 1983; NISHA et al (2017) ont montré qu'il est possible pour *Ln. Mesenteroides* de produire des dextrans de structure et de composition très différentes d'autant qu'il existe une relation biosynthétique entre les dextrans solubles et les dextrans insolubles produits par une même souche de *Ln. Mesenteroides* et que la dextrane sucrase de ce microorganisme peut prendre des formes multiples (**COT et ROBYT, 1983; NISHA et al ., 2017**).

II.3. Conditions de la production de dextrane

la production d'un EPS est dépend d'abord de la souche étudiée et peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien, même si la majorité des bactéries mucoïdes peuvent produire des EPS dans n'importe quel milieu, la production peut être optimisée sous

certaines conditions dans certains milieux définis, ces conditions sont résumés dans le tableau suivant:

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

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

II.4. Applications du dextrane

Ce polymère incroyable a trouvé des applications dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et chimique et clinique. Dans le domaine médical, le dextrane est utilisé pour son effet anti thrombotique, son activité anticoagulante (le sulfate de dextrane) et antiviral, son usage dans les fluides intraveineux, son rôle dans la cryopréservation pour stocker les organes pour la transplantation et comme porteurs dans des vaccins. En plus, le fer-dextrane est utilisé pour lutter contre l'anémie ferriprive (MAURAY *et al.*, 1998; FANG FENG *et al.*, 2019).

En industrie chimique et pharmaceutique, le dextrane joue un rôle d'un tamis moléculaire. Il a été utilisé la première fois en 1959 par Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suède), révolutionnant la purification et la séparation des macromolécules (protéines, acides nucléiques et polysaccharides). Commercialement ils sont connus comme Sephadex (SEparation Pharmacia DEXtran). En industrie photographique, les fractions de dextrane hautement purifiées sont largement utilisées comme un amplificateur des techniques et la qualité d'imagerie. Dans le domaine de production de cosmétique, le dextrane est aussi impliqué dans la production des crèmes et des produits de soins de la peau comme un agent hydratant et épaississant (BHAVANI et NISHA, 2010).

En industrie alimentaire, l'incorporation de dextrane dans les produits de boulangerie améliore la texture et le volume de pain. Les dextrans ont également été utilisés comme additifs dans des plusieurs produits tels que les bonbons et des glaces (**VETTORI et al., 2012**). Il a été utilisé comme stabilisant pour la confiserie où sa présence empêche la cristallisation, améliore la rétention d'humidité, augmente la viscosité et maintient la saveur. Son utilisation est également proposée dans les boissons gazeuses, les boissons à base de lait et les compositions de glaçage. Comme substance comestible non toxique, le dextrane est considéré comme ayant de nombreux avantages par rapport aux autres stabilisateurs de crème glacée. Des essais effectués sur des mélanges de crème glacée contenant de 2 % à 4 % de dextrane ont indiqué qu'ils conféraient des propriétés bénéfiques à la viscosité. Les propriétés favorables du dextrane pour la stabilisation des aliments lyophilisés ou congelés comme les poissons, la viande, les légumes et le fromage. La protection des surfaces avec un film de dextrane pourrait protéger les aliments de l'oxydation et d'autres changements chimiques et aussi aider à préserver la texture et la saveur (**BHAYANI et NISHA, 2010**).

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I. Matériel et Méthodes

I.1. Lieu d'étude

Ce travail a été effectué au niveau du centre de recherche CRAPC, c'est un Terrain Technique des analyses physico-chimiques situé au nouveau pôle universitaire de Kasdi Merbah Ouargla, et les laboratoires de Biochimie appliquée et de Microbiologie appliquée situées à l'ITAS. Au niveau de ces laboratoires nous avons effectué certaines manipulations microbiologiques et analyses physicochimiques. Ce stage a débuté le 18 Janvier, jusqu'à 30 mai 2021.

I.2. Provenance des échantillons

Pour effectuer l'isolement des bactéries genre *Leuconostoc*, trois échantillons du lait du chèvre proviennent de trois différentes fermes, la daïra de Temacine de la wilaya de Touggourt, Hassi ben Abdullah de la wilaya d'Ouargla de Sud de l'Algérie et le troisième échantillon provient de la daïra de Taibet de la wilaya de Touggourt (**Tableau 02**).

Avant la collecte des échantillons du lait, les mamelles des deux animaux sont lavées à l'eau savonneuse, rincé avec l'eau de javel puis séché avec un coton hydrophile stérile (**GHOZLANE, 2012**). Il est très important d'éliminer le premier jet de lait pour réduire le nombre des micro-organismes dans le canal mamelle (**PIERRE, 2004**), tandis que le deuxième jet de lait a été directement recueilli dans des flacons stériles de 250 ml qui ont été par la suite placés dans une glacière, afin d'assurer une température de 4°C au cours du transport jusqu'au laboratoire.

Tableau 02 : date des collections, le nombre et la provenance des échantillons prélevés.

Echantillon	Date de collection	Provenance	Nombre
lait de chèvre	15/01/2021	Touggourt	1
	03/02/2021	Hassi ben Abdullah	1
	13/02/2021	Taibet	1

I.3. Isolement

I.3.1. Préparation des dilutions

Agiter pendant dix secondes le flacon contenant l'échantillon du lait ; prélever aseptiquement à l'aide d'une micropipette stérile 1ml de lait et l'introduire dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique, agiter bien puis transférer 1ml de ce premier tube dans le deuxième, de la même façon des dilution décimales successives sont effectuées (jusqu'à 10^{-3}) (GHOZLANE, 2012).

I.3.2. Ensemencement

Après la réalisation des dilutions, on a ensemencé les souches sur Milieu MRS gélosé à pH 6,8 additionné à un antibiotique la vancomycine (30mg/ml) et incuber les boites à 30°C jusqu'à croissance (GHOZLANE, 2012).

I.3.3. Purification

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

I.4. Pré-identification des isolats

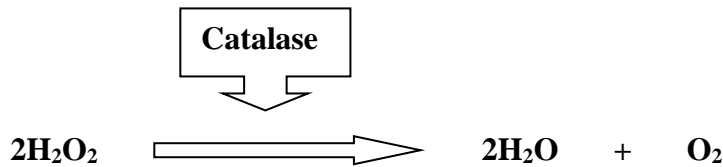
I.4.1. Coloration de Gram

La coloration de gram est considérée comme une coloration classique dans le domaine de Microbiologie. Elle consiste à distinguer entre deux types différents des bactéries par rapport leurs constituants de la paroi bactérienne, plus précisément, par rapport à l'épaisseur du peptidoglycane, parmi ceci il y a des bactéries Gram positif et d'autre bactéries Gram négatif.

C'est une étape très importante dans l'identification du genre (BADIS *et al* .2004), elle est effectuée sur des colonies ont des caractères morphologiques des souches rechercher, elle permet de déterminer le type de ces bactéries et la morphologie cellules (LARPENT, 1990).

I.4.2. Recherche de la catalase

L'objectif de ce test est de faciliter la distinction entre les bactéries lactiques à catalase négative des autres souches non lactiques. La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



La recherche de la catalase se fait par la mise en contact d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygénée (sur une lame). La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz et le contraire est négatif (MARCHAL *et al.*, 1991). Seules les bactéries à catalase négative sont retenues. Ensuite, pour assurer une bonne continuité du travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates.

I.5. Conservation des isolats

La conservation d'une souche pure a comme but de maintenir ces souches pures à conserver viable, Les souches présumées comme LAB (Gram positif et catalase négative) sont conservées à court terme (courte durée) sur la gélose MRS ou M17 inclinée ; après ensemencement et croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines sur bouillon MRS. Les bactéries sont conservées à long terme (longue durée) dans un bouillon MRS contenant 20% (v/v) de glycérol et sont maintenues à -20°C (GUESSAS et KIHAL., 2004).

I.6. Identification et caractérisation des isolats

I.6.1. Test morphologique

I.6.1.1. Examen macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la forme, la taille, la couleur, le contour, et la position des colonies sur milieu MRS solide (en profondeur, en milieu ou à la surface) BADIS *et al.*, (2004) et le trouble dans le milieu liquide. En effet, les colonies des *Leuconostokes* rependent généralement au critère morphologique suivant : Un diamètre compris entre 0.5 et 1 mm, lisses, d'une forme circulaire, blanche, grisâtre (HOLZAPFEL *et al.*, 2009 ; SÄDE, 2011) et a contour régulier (BADIS *et al.*, 2005; BADIS *et al.*, 2004)

I.6.2. Tests physiologiques**I.6.2.1. Croissance à différentes températures**

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4 °C, 10 °C, 37 °C et 44 °C et 63 °C (**GUESSAS et KIHAL, 2004**). Alors que la thermorésistance des bactéries a été testée au bain marie à 63°C/30 minutes puis on a incubé à 30°C/24h à 48h (**GUIRAUD, 1998**). Ces tests nous aident à distinguer les souches mésophiles des thermophiles ainsi que les thermorésistantes.

I.6.2.2. Croissance à différents pH

Après avoir une culture jeune des isolats (culture de 24h à 30°C), ces derniers ont été ensemencés dans un milieu MRS liquide à: pH 3.6, pH 9.6 et incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours (**GUESSAS et KIHAL, 2004**).

I.6.2.3. Résistance à la salinité

Après la réalisation de la culture jeune des isolats, ces derniers ont été ensemencés dans un milieu MRS liquide à contenant 3%, 6% et 9% de chlorure de sodium et incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours (**GUESSAS et KIHAL, 2004 ; BADIS et al., 2004**). La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes.

I.6.3. Tests biochimiques**I.6.3.1. Recherche de type fermentaire**

L'objectif de ce test est de connaître le type de métabolisme (hétérofermentaire ou homofermentaire) par lequel une transformation de substrat carboné est faite, aussi pour savoir la production du gaz à cause d'une dégradation du glucose (**HANSAL., 2015**). Deux bouillons d'MRS différents ont été préparés, l'un contient le lactose comme sucre et l'autre contient le glucose. Dans des tubes et avec une cloche de Durham, le milieu a été inoculé avec la souche à étudier et incubé à 30°C pendant 24h. L'apparition du gaz dans la cloche montre que le métabolisme est hétérofermentaire (**HARIRI et al., 2009**).

I.6.3.2. Recherche de l'Arginine déshydrogénase (ADH)

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

I.6.3.3. Test de dégradation des sucres

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

Des solutions sucrées ont été préparées de 1g de chaque sucre avec 10ml de l'eau distillé stérile, le tout a été homogénéisé puis stérilisé à 100°C pendant 15 min au bain marie. Deux cultures jeunes de chaque souche ont été préparées, puis une centrifugation de chaque culture a été effectuée à 4000 tours pendant 10 min. Le culot a été récupéré et additionné à l'eau distillée stérile puis une autre centrifugation a été réalisée pour éliminer les restes de milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur ; ce rinçage est réalisé deux fois consécutives, et après, 01 ml de bouillon MRS.BCP a été ajouté sur le culot récupéré de dernière centrifugation et bien homogénéisé (HANSAL, 2015). L'ensemencement a été réalisé dans des microplaquettes contenant des puits, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différentes souches, chaque puits contient 200 µl de MRS.BCP avec 100µl de solution sucré et 100µl de suspension bactérienne, le tout a été recouvert par une couche d'huile de paraffine (BADIS *et al.*, 2005). Les microplaquettes ont été incubées à 30°C pendant 72h et vérifiées chaque 24h (GUESSAS, 2006; BADIS *et al.*, 2005). Le résultat après, nous distinguons le virage de milieu de vert au jaune et cela indique que la souche lactique a pu fermenter cette source de carbones lors de croissance (BAUER *et al.*, 2005).

I.6.3.4. Hydrolyse de l'esculine

L'esculine est un hétéroside (molécule composée d'un ose associé à une structure non osidique). L'hydrolyse de l'esculine est faite par l'enzyme d'esculinase, est

un des critères usuels utilisé dans l'identification différentielle au sein de nombreux genres bactériens (GUIRAUDE, 1998). Les produit de dégradation de l'esculine est glucose et esculénite formé peut réagir avec les ions de fer pour donner un précipité noir dans le milieu situé autour les colonies (HANSAL, 2015). On prélève une goutte d'un tube incubé pendant 24H et en l'ensemencé sur gélose a l'esculine, l'incubation de ces boites va de 2 à 5 jour à 30°C (LELLIOT et STEAD, 1987).

I.7.4. Tests biotechnologiques

I.7.4.1. Production des substances aromatiques.

La production des substances arômatisques est une propriété spécifique aux bactéries lactiques dont laquelle le lactose, le citrate, les acides aminés ou les matières grasses sont utilisés comme substrat. (DHOUIB, 2017).

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

I.7.4.2. Production des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides comme le dextrane sont des substances d'intérêt technologique et pharmaceutique jouent un rôle très important en industrie Agroalimentaire (MAYEUX *et al.*, 1962; ALAHADAD *et al.*, 2010). Leur production est mise en évidence sur milieu MSE gélosé contenant une concentration adéquate de saccharose et une source d'azote (peptone), du phosphate des oligo-minéraux et des facteurs de croissance. Les souches de culture jeune à testé ont été ensemencées en stries sur la gélose qui est déjà coulée et solidifier. Après incubation à 30C° pendant 48h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges, visqueuse et gluantes (LEVEAU *et al.*, 1991 ; THIYAGARAJAN *et al.*, 2017).

I.8. Production de dextrane et optimisation des conditions nutritionnelles de production:

I.8.1. Production et Quantification de dextrane

Les EPS ont été produits en cultivant les souches sur milieu MRSs additionné à 10% du saccharose, Après élimination des cellules par centrifugation à 4000 trs /mn pendant 10

min à 4 °C, Les EPS présents dans un volume de surnageant de 1 ml ont été précipités avec 3 ml d'éthanol absolu à 4°C pendant une nuit. Les EPS précipités ont été récupérés par centrifugation à 12000 x g pendant 20 min à 4 °C, lavés deux fois avec de l'acétone absolu froid et centrifugés à nouveau pendant 12000 x g pendant 20 min à 4 °C (NISHA, 2017).

Les EPS ont été ensuite séchés à l'air libre, remis en suspension dans de l'eau distillée stérile et chauffés pendant 10 min à 30 °C pour faciliter la solubilisation. La quantification des EPS par la méthode de dosage des sucres totaux, (DUBOIS *et al.*, 1956). en utilisant la courbe d'étalonnage de glucose. A 0,5 ml de la solution des EPS, 0.5 ml de phénol à 5% et 2,5 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés séquentiellement (NACHER-VAZQUEZ *et al.*, 2015).

Immédiatement, les échantillons ont été incubés à 100 °C pendant 5 min dans un bain marie. La réaction a été stoppée en plaçant les échantillons dans la glace. Pour effectuer la quantification, l'absorption a été mesurée à 490 nm (A_{490nm}) et les valeurs obtenues sont comparées avec celles de la courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues de D-glucose (Figure 05).

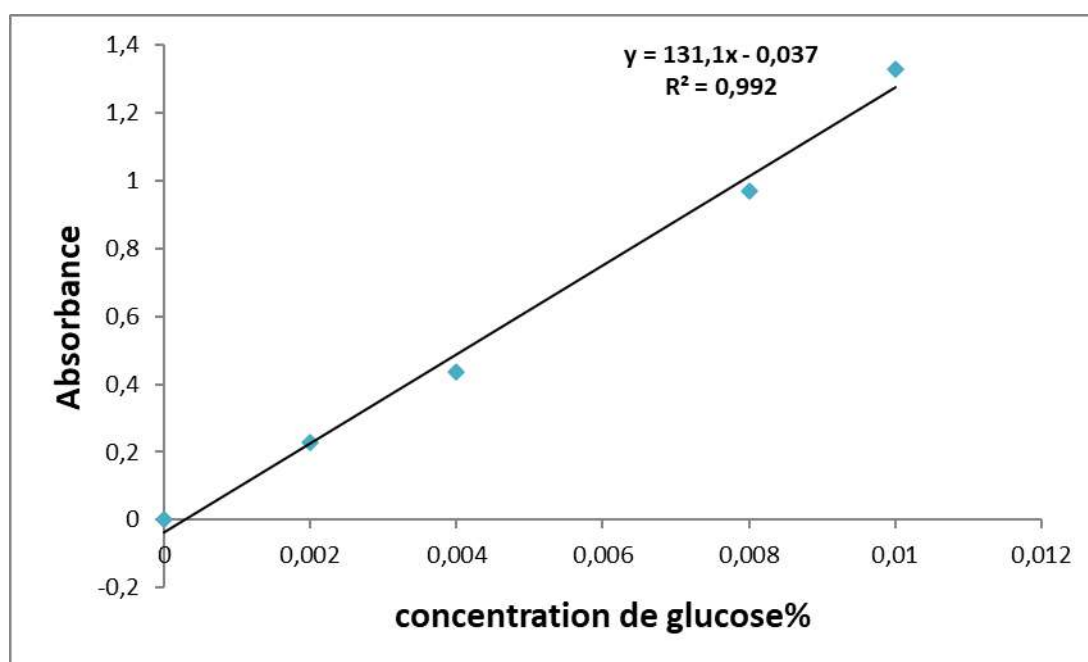


Figure 05: Courbe d'étalonnage des oses totaux D glucose

I.8.2. Le Principe de 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 (dosage colorimétrique) et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable dont de petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées.

I.8.3. Optimisation de la production de dextrane

Pour mieux étudier la production des EPS, une optimisation est réalisée en utilisant différents milieux, pour cela on a choisi seulement une souche *Leuconostoc* qui a donné un bon rendement sur milieu MRSs. Premièrement on a étudié la production sur milieu MSE liquide, ensuite la production est étudiée sur milieu MRSs avec différentes concentrations de trois substrats (glucose, extrait de levure et saccharose) selon le (**Tableau 03**). La précipitation et la quantification des EPS est réalisée en suivant les étapes mentionnées précédemment (**I.7.1.**).

Tableau 03: Les différentes concentrations des trois substrats (glucose , Extrait de levure , saccharose)

N°	Saccharose g/l	Glucose g/l	Ex de lev g/l
<u>1</u>	10	1	3
<u>2</u>	100	1	3
<u>3</u>	10	5	3
<u>4</u>	100	5	3
<u>5</u>	10	3	1
<u>6</u>	100	3	1
<u>7</u>	10	3	5
<u>8</u>	100	3	5
<u>9</u>	50	1	1
<u>10</u>	50	1	3
<u>11</u>	50	1	5
<u>12</u>	50	5	5
<u>13</u>	50	3	3
<u>14</u>	50	3	5
<u>15</u>	50	3	1
<u>16</u>	10	1	1
<u>17</u>	10	15	1
<u>18</u>	10	20	1
<u>19</u>	10	10	3
<u>20</u>	10	15	3
<u>21</u>	10	20	3

<u>Cas</u>	Saccharose g/l	Glucose g/l	Ex de lev g/l
<u>22</u>	10	10	5
<u>23</u>	10	15	5
<u>24</u>	10	20	5
<u>25</u>	50	10	1
<u>26</u>	50	15	1
<u>27</u>	50	20	1
<u>28</u>	50	10	3
<u>29</u>	50	15	3
<u>30</u>	50	20	3
<u>31</u>	50	10	5
<u>32</u>	50	15	5
<u>33</u>	50	20	5
<u>34</u>	100	10	1
<u>35</u>	100	15	1
<u>36</u>	100	20	1
<u>37</u>	100	10	3
<u>38</u>	100	15	3
<u>39</u>	100	20	3
<u>40</u>	100	10	5
<u>41</u>	100	15	5
<u>42</u>	100	20	5

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

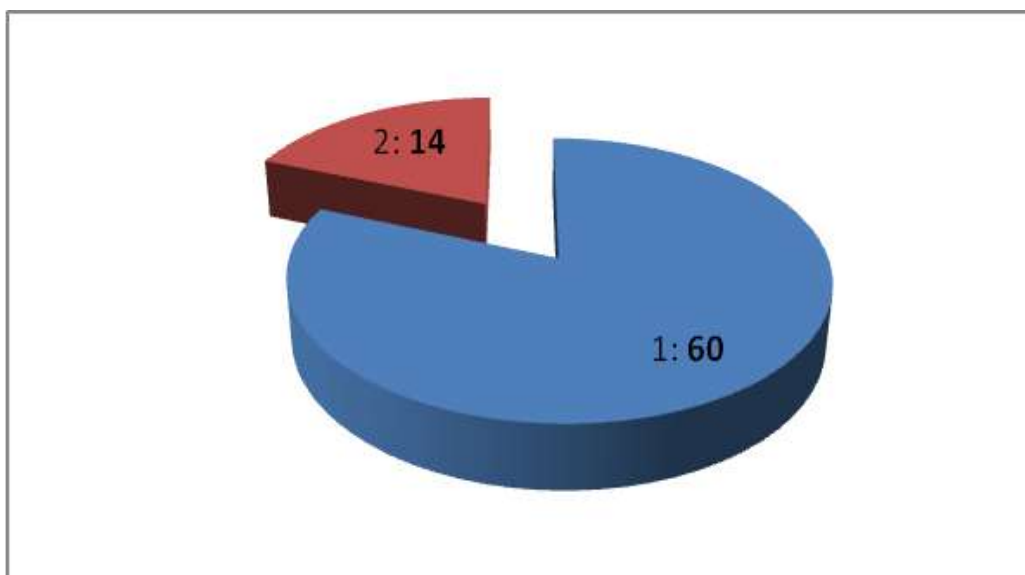
II.1. Isolement et purification

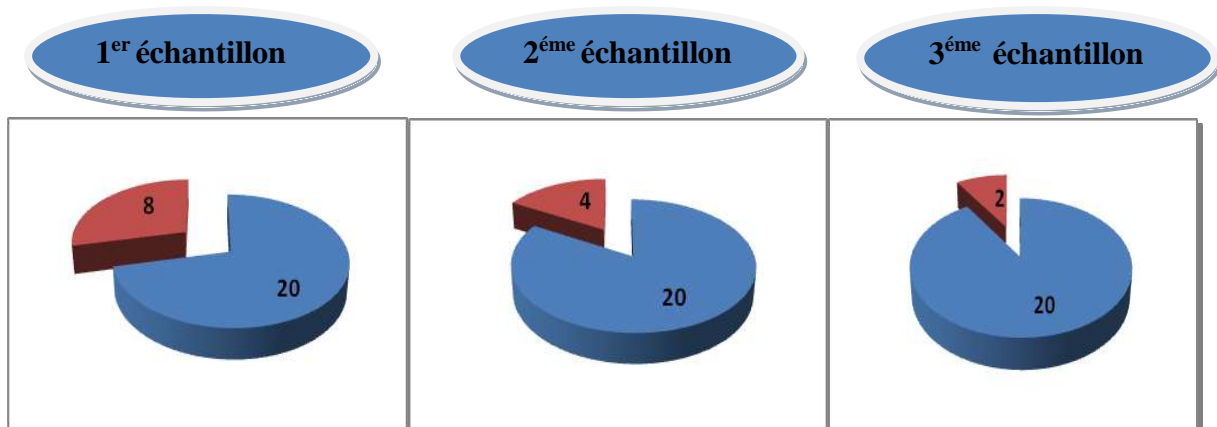
L'isolement des souches *Leuconostoc* est réalisée sur milieu sélectif MRSv à partir du lait de chèvre des trois différentes régions, nous a permet de sélectionner 60 souches (20 souches de chaque échantillon), ayant l'aspect des colonies recherchées (colonies de forme lenticulaire ou circulaire de petite taille de couleur blanchâtre (MATHOT et *al.*, 1994) (Figure 06).



Figure 06 : Photo d'aspect macroscopique des cultures bactériennes des souches de *Leuconostoc* ensemencées en masse sur milieu MRSv.

Après la réalisation de quelque tests phénotypiques (Gram, Catalase , ADH, production de CO₂), nous avons remarqué que les 60 isolats font partie principalement à deux genres des bactéries lactiques sont connus par leur résistance à la vancomycine, "*Leuconostoc*" et "*Lactobacillus*".





1: le nombre totale des souches isolées

2: le nombre des souches sélectionnées

Figure 07: Représentation schématique de la répartition totale des souches *Leuconostoc* isolées à partir des échantillons.

II.2. Tests morphologiques

II.2.1. Aspect macroscopique

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

***Sur milieu MRS solide :** après 24h d'incubation, l'aspect macroscopique des colonies des souches *Leuconostoc* purifiées sur milieu MRS solide se traduit par l'homogénéité des colonies qui sont de petites tailles, rondes, lenticulaires et de couleur blanchâtre (**Figure 08**).

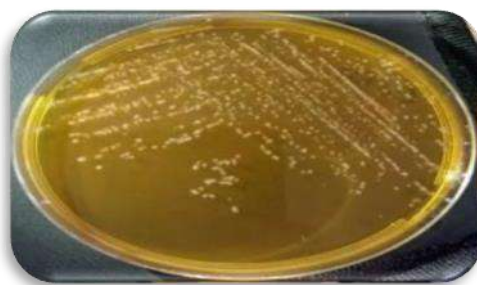


Figure 08 : Photo d'aspect des souches pures des *Leuconostoc* sur milieu MRS solide.

***Sur Milieu liquide :** après 24h d'incubation, la croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble concentrée au fond du tube pour la recherche des conditions anaérobiques. (KIHAL, 1996; CARR *et al.*, 2002). (**Figure 09**).

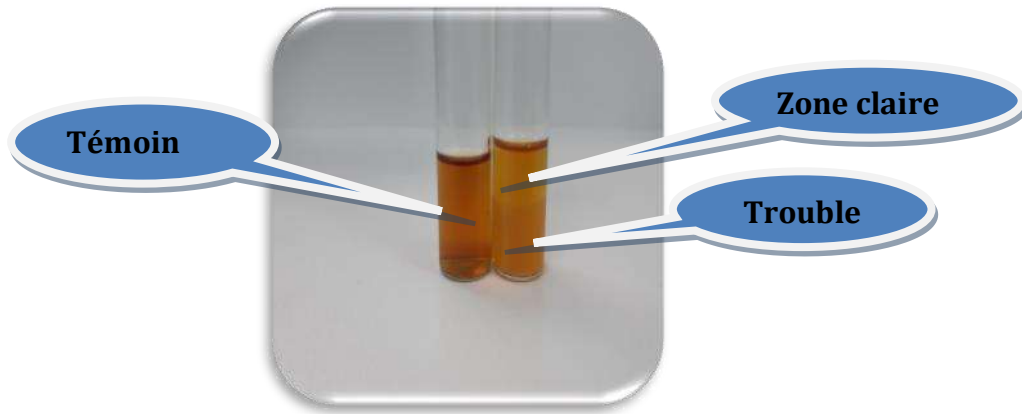


Figure 09: Photo d'aspect de trouble d'une souche de *Leuconostoc* sur bouillon MRS après 18 h de croissance

II.3. Pré-identification

II.3.1. Coloration de Gram

L'aspect microscopique après une coloration de Gram a révélé que la plupart des cellules se présentent sous forme de cocci à l'exception de quelques souches de forme coccobacille.

Dans notre étude, on a éliminé toutes les espèces apparaissent comme Gram négative et les forme de bacille ; et comme une pré-identification en garde juste les souches apparaissent comme gram positive sous forme ovoïde ou coccobacille avec des structures en paire ou en chaînette (**Figure 10**).

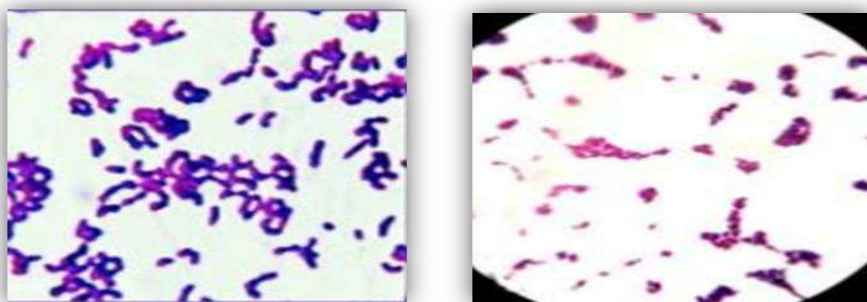


Figure 10: Photo d'observations microscopiques des souches (*Ln. Mesentroides subsp. mesentroides*) de bactéries lactiques après une coloration de Gram à grossissement **x100**.

II.3.2. Test de recherche de la catalase

Le test catalase a révélé l'absence de l'enzyme ce qui reflète l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène. La recherche de la catalase se fait par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10V. Le dégagement gazeux traduit l'activité positive de cette enzyme (MARCHAL *et al.*, 2001) (Figure 11).

Nous avons éliminé toutes les souches catalase positives et on a gardé juste Les souches qui ont une catalase négative car selon les résultats trouvés par (CARR *et al.*, 2002) après le dépôt de l'eau oxygénée sur les colonies des bactéries lactique, on n'a pas le dégagement des bulles d'air (CARR *et al.*, 2002).

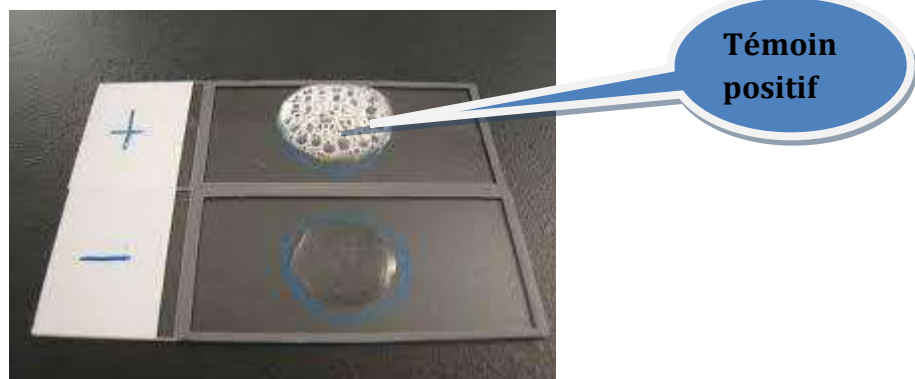


Figure 11: Photo de résultat du test de catalase (test négatif)

Sur 60 isolats purifiés et examinés, on a sélectionné 35 à Gram positifs et catalase négative ont été retenues qui présumées comme bactéries lactiques.

II.4. caractéristiques physiologiques et biochimiques

Tous les isolas présentent une activité catalasique négative, capables de produire du gaz à partir du glucose (Hétérofermentaire), incapable de dégrader l'arginine (ADH-) ; ces isolas sont considérés du genre de *Leuconostoc* (GARVIE, 1984 ; BADIS *et al.*, 2005 ; OGIER *et al.*, 2008 ; GHAZI *et al.*, 2009). On a sélectionné 14 souches de ce genre isolées de lait de chèvres (LC1, LC2, LC10, LC12, LC13, LC15, LC16, LC18, LC21, LC23, LC34, LC39, LC41, LC43).

II. 4.1. Tests physiologiques

Les résultats des tests physiologiques (Croissance à différentes températures et pH et tests de Résistance à la salinité) réalisé sur les souches de *Leuconostoc* isolées.

II.4.1.1. Croissance à différentes températures

Dans la majorité des souches qui ont été testées, il existe une croissance sous une température de 10°C et de 37°C ceci montre que ces bactéries sont des bactéries mésophiles. Par contre il existe un nombre négligeable des souches qui ont poussées sous la température 4°C et 44°C (**Tableau 04**).

II.4.1.2. Thermorésistant

Il y a aucune souche qui a été poussée à 63°C. Donc on peut dire qu'il n'y avait pas des bactéries thermorésistantes dans nos souches (**Tableau 04**). Nos résultats semblent à ceux trouvés par (**GARVIE, 1984 ; DELAGLIO et al., 1994**). Les *Leuconostokes* sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 -30°C.

II.4.1.3. Croissance à différents pH

Toutes les souches qui ont été testées pour savoir leur résistance aux différentes pH ont été poussées à pH 3.6. Par contre il existe un nombre négligeable des souches qui ont poussées à pH 9.6 (**Tableau 04**) ce qui a confirmé aux résultats de (**MC DONALD et al., 1990**) qui a montré que les *Leuconostokes* laitiers se développent le mieux à un pH proche à celui de lait et sont inhibé en milieu acide.

II.4.1.4. Résistance de à la salinité

Toutes les souches qui ont été testées pour savoir leur résistance aux différentes concentrations de sel ont été résistés à 3% de NaCl mais la majorité de ces souches n'ont pas été poussées à 6% et 9%. (**Tableau 04**).

II.5. Tests biochimiques

II.5.1. Recherche de type fermentaire

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

Il faut se rappeler que les *Leuconostokes* sont tous productrices de CO₂ (hétéroférmentaires). Après une incubation à 30°C, les résultats montrent qu'il y a l'apparition d'un trouble au fond des tubesensemencés avec un dégagement de gaz de CO₂ lors de fermentation du glucose (bouillon MRS glucosé) au niveau de la cloche de Durham et

flottement de cette dernière dans le milieu, ce qu' indique que 40 des isolats choisis ont révélés un métabolisme hétérofermentaire (**Figure 12**) ce qui caractérise le genre de *Leuconostoc* mais cette probabilité a été confirmée par le test de l'ADH qui est négatif chez les *Leuconostoc* ce qui les différencie des lactobacilles hétérofermentaires (**MATHOT et al., 1994; BADIS et al., 2005**).

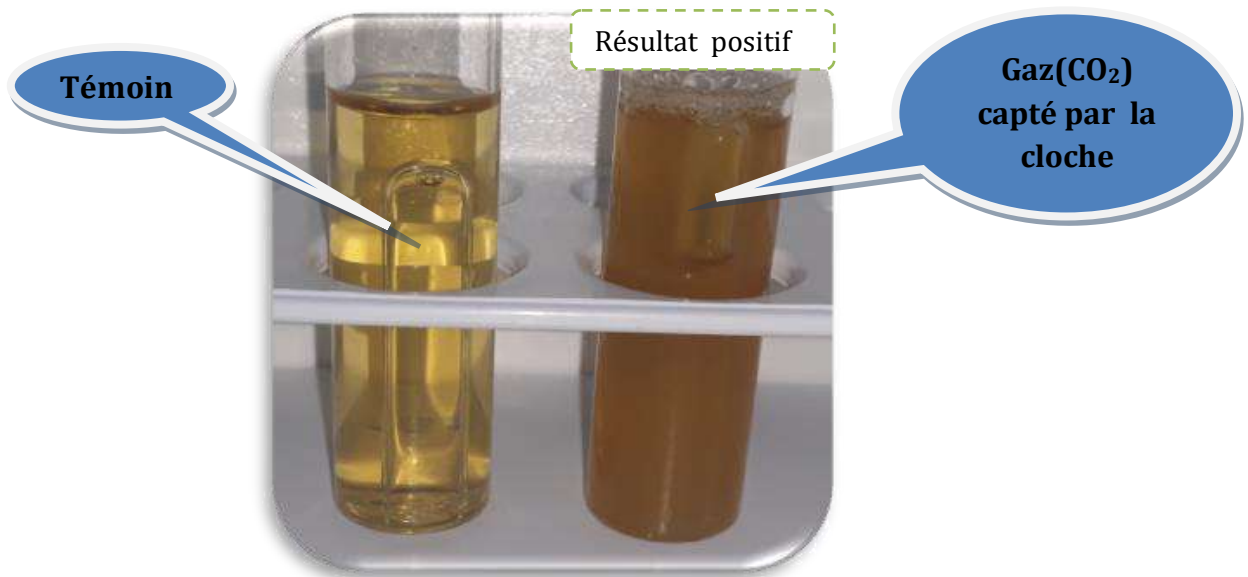


Figure 12: Photo de type fermentaire des souches isolées (*Leuconostoc*) sur bouillon MRS

II.5.2. Hydrolyse de l'arginine (ADH)

La production de l'acide lactique acidifie le milieu de culture (M16 BCP), qui contient un indicateur de pH, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune. Les bactéries possédant l'ADH vont alcaliniser le milieu et sa couleur reviendra bleu, les souches qui ne possèdent pas cette enzyme leur milieu va rester jaune. (**KHEDDID et al., 2006**).

Après 48h d'incubation sur gélose M16.BCP à 30°C, on a observé l'apparition d'une coloration jaune, dans quelques souches, à cause de l'acidification du milieu donc ces souches n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine (ADH-). Dans notre étude, seules les souches qui n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine ont été gardées parce que les *Leuconostoc* sont ADH-. Les résultats sont résumés dans le (**Tableau 04**).

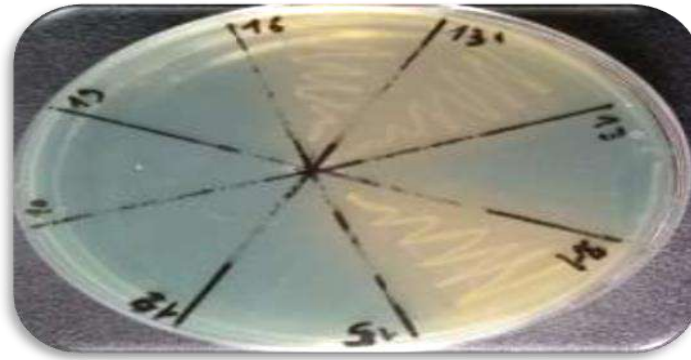


Figure 13 : Photo de résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine)

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

II.5.3. Test de dégradation des sucres

L'identification de l'espèce bactérienne des souches isolées a été réalisée par l'étude du profil de dégradation de 9 sucres (Mannose, Xylose, Arabinose, Manitole, Lactose, Fructose, Saccharose, Galactose, Glucose) sur milieu MRS-BCP sans extrait de viande et dépourvu du sucre et contient le bleu de bromothymol comme un indicateur de pH (**BADIS *et al.*, 2005**).

Le résultat positif révèle par la dégradation de sucre qui provoque une acidification de milieu, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune (**HANSAL, 2015**).

Les résultats obtenus montrent la présence de virage de couleur de milieu vers le jaune sauf quelques exceptions. Donc les souches qui ont été isolées ont la capacité de se développer à partir différents source de carbone. Les résultats obtenus sont résumés dans le (**Tableau 04**).

D'après les critères phénotypiques apportées par différents auteurs (**CARR *et al.*, 2002**; **BADIS *et al.*, 2005**; **HAMMES et HERTEL, 2006**; **KHEDID *et al.*, 2006**), nous avons pu conclure que les Leuconostoques sont capables d'utilisés plusieurs sucres, le virage de couleur bleu de bromothymol contenant dans le milieu MRS BCP confirme que les souches (**LC1 , LC2, LC10, LC12, LC13, LC15, LC16, LC18, LC21, LC23, LC39, LC43**) ont dégradés la plupart des sucres additionnés dans le milieu ce qui laisse ce dernier (acide) à l'exception de 2 souches (**LC34, LC41**).

II.5.4. Hydrolyse de l'esculine

Les résultats obtenus montrent que quelques souches (**LC1, LC2, LC10, LC16, LC18, LC23, LC41, LC43**) sont capables de dégrader l'esculine par contre les autres souches est incapable du dégradé. Après 5 jours d'incubation sur gélose MRS d'esculine à 30°C, on a observé l'apparition d'un précipité noir dans le milieu situé autour les colonies (**Figure 14**).

Ce précipité est le résultat de la réaction formé entre les ions de fer qui sont dans le milieu et entre esculinite qui est le résultat de la dégradation de l'esculine par l'enzyme d'esculinase. (**GUIRAUDE, 1998**).

Donc le précipité noir est un indice pour la dégradation de l'esculine par la bactérie et ce caractère est un des critères usuels utilisé dans l'identification différentielle au sein de nombreux genres bactériens comme les *Leuconostoc* (**GUIRAUDE, 1998**).



Figure 14 :Photo de résultat de l'Hydrolyse de l'esculine / le noir : esculine +

Les résultats totaux des tests physiologiques et biochimiques de l'identification des souches isolées à partir du lait de chèvre cru sont représentés dans le tableau ci-après.

Tableau 04: Résultats des tests physiologiques et biochimiques de l'identification des souches isolées à partir du lait de chèvre cru.

Les souches	Pré-identification		Tests physiologiques										Tests biochimiques											
	Gram	Catalase	Croissance à différents T°					Croissance à différents pH		Croissance à différentes [NaCl] (%)			ADH	Production de CO ₂	Test du sucre									
			4 °C	10 °C	37°C	44 °C	63 °C	3.6	9.6	3 %	6 %	9 %			Mannose	Xylose	Arabinose	Lactose	Fructose	Saccharo	Galactose	Glucose	Mannitol	Esculine
LC1	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
LC2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
LC10	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+			
LC12	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
LC13	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-		
LC15	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-		
LC16	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+		
LC18	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+		
LC21	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-		
LC23	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+		
LC34	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-		
LC39	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-		
LC41	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+		
LC43	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+		

Présence (+)

Absence (-)

II.6. Tests biotechnologiques

II.6.1. Production des substances aromatiques

Le métabolite de citrate permet aux bactéries lactiques d'utiliser d'autre source de carbone pour sa croissance, de résister à des conditions acides et de libérer des composés organiques connus par leur participation dans la qualité organoleptique des produits laitiers comme le fromage en fournissant des saveurs (**GEMELAS *et al.*, 2014**).

Les Leuconostokes sont utilisés dans l'industrie laitière pour leur capacité à produire du CO₂ et des composés d'arôme tel que le diacétyl et cela grâce au co-métabolisme sucre/citrate (**BOURELET *et al.*, 2001 ; HEMME et FOUCAUD-SCEUNEMANN, 2004**).

Après 48h d'incubation, Les isolats qui ont étéensemencées sur gélose KMK présentent un caractère variable vis-à-vis de l'utilisation de citrate, dont 14 souches sont capables de comptabiliser le citrate avec le glucose, ces résultats ont montrés quel transport de citrate à travers la membrane est effectuée par le citrate perméase P (**CitP**), pour l'échange de la forme dianionique du citrate et des anions de lactate, aussi que l'existence de citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ionferrique et le potassium ferricyanide de cette façon résulte la formation des colonies bleues . Ces résultats sont semblables à celles de(**BOUREL *et al.*, 2001 ; GHAZI *et al.*,2009**). Les six (6) souches restantes (**LC12, LC13, LC15, LC18, LC21 et LC41**) isolées du lait de chèvre ne dégradent pas le citrate. Cette variabilité peut être due à la perte de plasmide codant les gènes responsables de la dégradation de citrate (**KIHAL *et al.*, 1996 ; GUIRAUD, 1998**).

Les Leuconostokes jouent un rôle dans la production d'arômes par la production des composés ou des précurseurs, qui va participent dans l'amélioration des propriétés organoleptiques des aliments en provoquant des changements de textures et d'arôme, résulte de plusieurs voies comme l'utilisation du citrate (**HEMME *et al.*, 2004**).

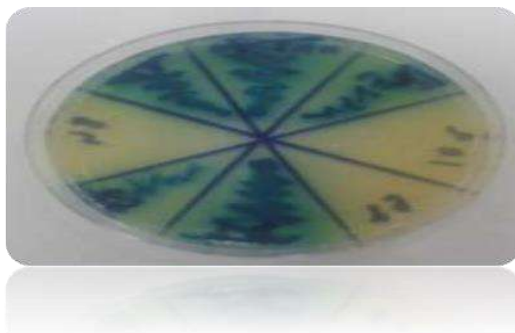


Figure 15: Photo de révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK des espèces *Ln. carnosum*, *Ln. fallax*, *Ln. Mesenteroide*.

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

II.6.2. Production de dextane

Le milieu MSE est un milieu sélectif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés. La production de dextrane a été vérifiée sur milieu MSE dont lequel ce genre de bactéries utilisent le saccharose de milieu pour synthétiser des EPS (dextrane) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux (HANSAL, 2015). Nous avons obtenu après 48h d'incubation des colonies larges, visqueuses, gluantes et transparentes sous deux formes: (**Figure 16**).

- **De grosses colonies gluantes**, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge; Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*.
- **De petites colonies** (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose. Reflètent l'aspect macroscopique de *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*. Ce caractère important nous a permis de différencier entre les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leurs appartenance à une des deux espèces productrices de dextrane: *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, ce qui a été montré par (MAYEUX et ELLIKER, 1962; GARVIE, 1984; CARR *et al.* , 2002; BADIS *et al.* , 2005).

On peut dire que la production de dextrane à partir de dégradation de saccharose a été observée chez la plupart des souches isolées de lait de chèvre, qui indique **11** isolats sont

capables de produire les exopolysaccharides à l'exception de 3 isolats, LC21, LC39, LC43 qui sont incapable de produire le dextrane .

La capacité de production de dextrane rend ce genre très utilisable dans l'industrie alimentaire grâce à ces propriétés technologiques (épaississantes, stabilisantes, émulsifiantes et texturants) aussi l'amélioration des caractères organoleptique des produits fermentés.

(HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004).



Figure 16 : Photo de morphologies des colonies productrices de dextrane par les souches de *Leuconostoc* sur milieu MSE

D'après les résultats obtenus des tests physiologiques et biochimiques effectués, nous avons identifier les 14 souches isolées comme suivant:

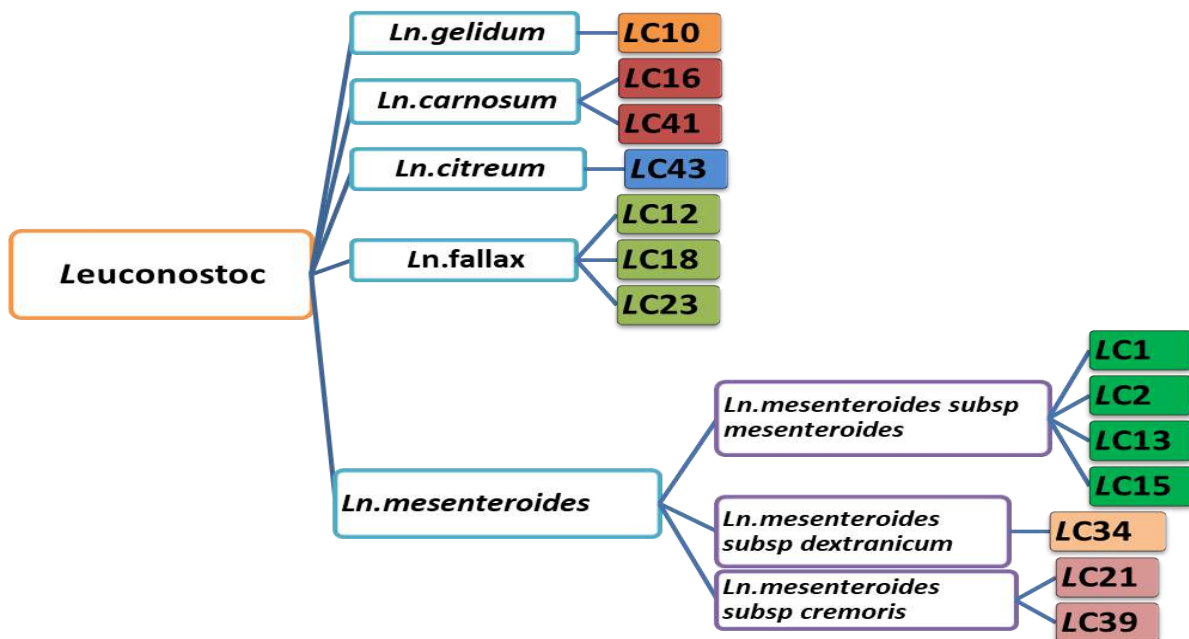


Figure 17: Répartition finale des espèces selon les résultats des différents tests effectués

II.7. Étude de production de dextrane .

II.7.1. Production de dextrane sur MRSs

Les résultats de quantification de dextrane produit par les isolats en utilisant la méthode de dosage des sucre totaux sont représentés dans la figure suivante :

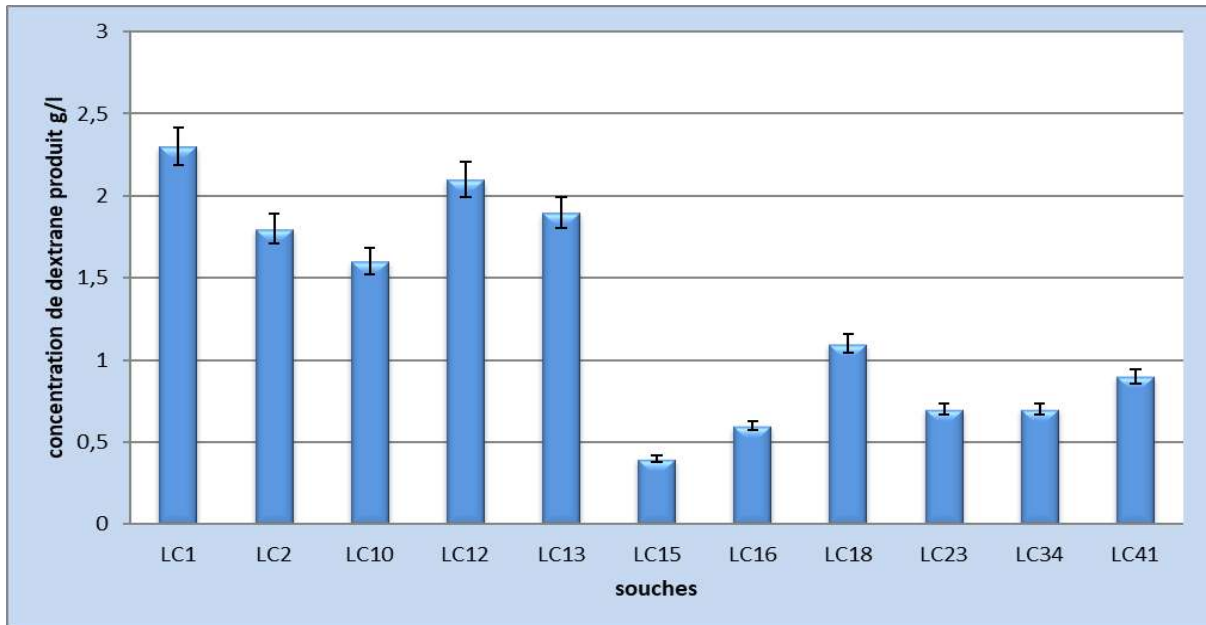


Figure 18: Histogramme de la production des EPS (dextrane) par la souche *Leuconostoc* dans le milieu MRSs

Cet histogramme représente la production des EPS (dextrane) par *Leuconostoc* sur milieu MRSs. On observe que la valeur maximale de concentration de dextrane est 2,25 g/l par la souche *Ln.mesenteroides* susp *mesenteroides* , *Ln.fallax* et la valeur moyenne est 1,7g/l par la souche *Ln.mesenteroides* susp *mesenteroides* , *Ln.gelidum* et *Ln.fallax* . et la valeur minimale est 0,4 par la souche *Ln.mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *Ln.carnosum*, *Ln.citreum* et *Ln.fallax* . Cette différence est dépend de la souche et leur phase de croissance.

On a Comparé entre les résultats de (AYADI et DJEBBAS., 2019), On remarque que la valeur maximale de production de dextrane est 3,23g/l par la souche *Ln mesenteroides* , la valeur moyenne est 2,3g/l par la souche *Ln fallax* et la valeur minimale est 1,3g/l par *Ln gelidum*.

Après la comparaison avec les résultats de (ZAROOUR, 2018) selon la quantité des EPS produit en présence de 2% de saccharose on trouve que:

(a) Espèces fortement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 2 et 3 g L⁻¹ : *Ln mesenteroides subsp mesenteroides* et *Ln.mesenteroides subsp dextransicum* .

(b) Espèces moyennement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 1 et 2 g L⁻¹ : *Ln mesenteroides subsp mesenteroides* et *Ln.mesenteroides subsp dextransicum*

(c) Espèces faiblement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 0,5 et 1 g L⁻¹ : *Ln mesenteroides subsp mesenteroides* et *Ln.mesenteroides subsp dextransicum*

(d) Espèces non productrices pour celles présentant des niveaux quasi nuls : *Ln.mesenteroides subsp dextransicum* .

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

II.7.2. Optimisation de la production de dextrane .

II.7.2.1 . Comparaison entre les concentrations de dextrane produit par les isolats dans le milieu MRSs et le MSE

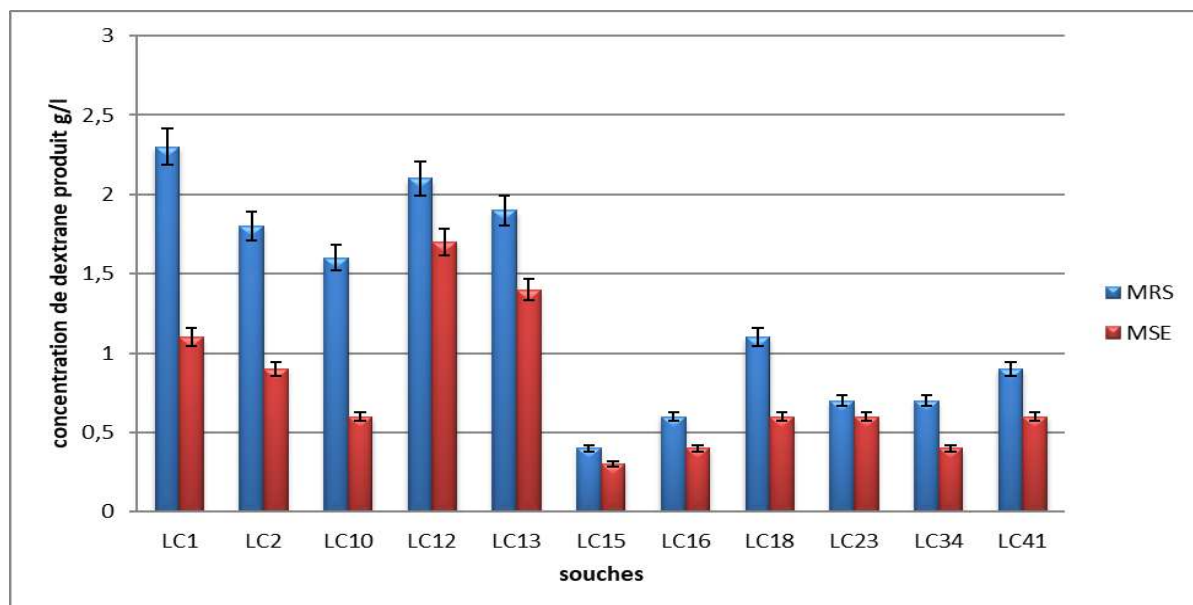


Figure 19: Histogramme de comparaison entre les concentrations de dextrane produit par les isolats dans le MRSs et le MSE

On remarque dans la comparaison entre les concentrations de dextrane produit par les isolats dans le MRSs et le MSE. que la concentration de dextrane produite sur milieu MRS est plus élevée par rapport sur milieu MSE. La valeur maximale de la concentration de dextrane sur milieu MRS est 2.25g/l par la souche **LC1** et sur MSE est 1.7g/l. Dans les deux milieux, la valeur minimale est 0.4g/l sur MRS et 0.3g/l sur MSE par la souche **LC15**.

Cette différence est grâce à la richesse du milieu MRS par les oligoéléments dans le milieu MRS ex : Mg et Mn qui sont considérés comme des cofacteurs contribuent à l'assimilation de métabolisme des protéines ,glucides et lipides , la dégradation des enzymes pour produire l'énergie.

II.7.2.2. Effet de différentes concentrations des substrats dans la concentration de dextrane produise par la souche LnLC1 :

Les résultats précédents nous ont permis de sélectionner la souche qui a donné la quantité la plus élevé, pour étudier l'optimisation de production. La souche choisi est LC1.

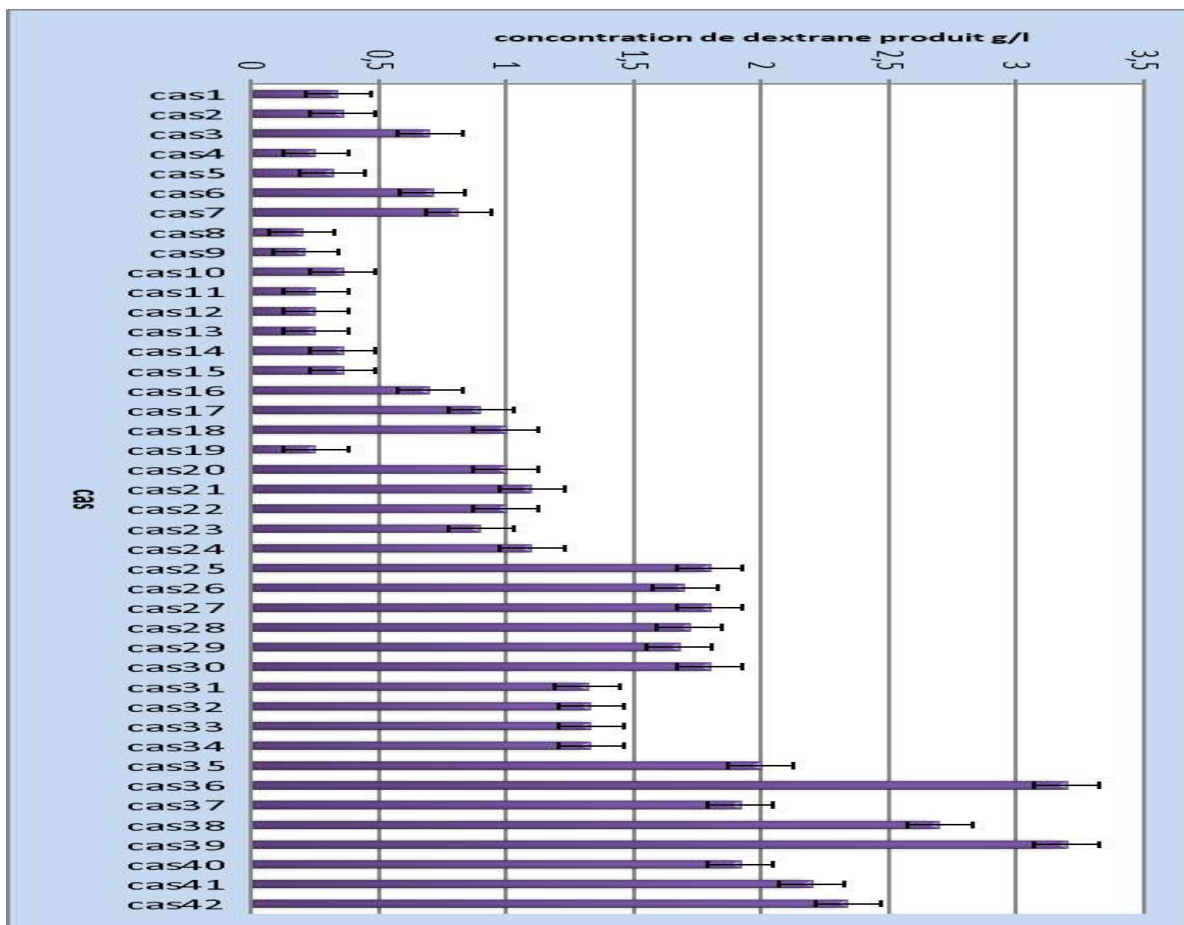


Figure 20: Histogramme d'effet de différent concentration des substrats dans la concentration de dextrane produise par le souche LnLC1.

On remarque que la concentration de dextrane produite par Ln LC1 est plus élevée quand la concentration de saccharose et le glucose est élevée (10% sac et 2% glu) donc la valeur maximale est 3,25g/l , une production moyenne de dextrane est 1.3g/l dans les concentrations (5% sac et 1% et 1.5% glu) et une production faible quand la concentration de saccharose et le glucose est faible (1% sac et 0.1% ,0.3%, 0.5% glu) prend une valeur minimale de 0.2g/l . Car, le saccharose est dégradé en polymère de dextrane (glucose) qui est une source de carbone essentiel pour la production de dextrane.

L'effet de la concentration en source de carbone et précisément la présence des glucides assimilables a été vérifié en utilisant différentes concentrations de glucose dans le milieu MRSs, **1g, 3g, 5g, 10g, 15g, et 20g/l**. la meilleur production des **EPS** a été obtenu à **20g/l** de glucose avec un niveau de production élevée.

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

En effet, les résultats rapportés par **VAMANU et al (2010)** ont indiqués que la production des EPS et la croissance ont été stimulées par la concentration élevée en glucose (**30g/l**) et ceux de **GAMAR et al (1997)** ont plutôt mis en évidence en plus du type de sucre (glucose, galactose, lactose etc.) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production. A l'instar de nos résultats obtenus avec le milieu MSE de concentration 20g de glucose. (**VAMANU et al., 2010; GAMAR et al., 1997**)

Dans notre étude, la production de dextrane dans un milieu contenant de concentration **20g** de glucose a été plus élevée qu'avec **15g, 10g, 5g, 3g, et 1g** de glucose, c'est-à-dire la concentration optimale de glucose dans milieu MRS pour une production maximale de dextrane est de l'ordre de **20g** sous les conditions de l'étude, température de 30 °C, durée de 72h et un pH non contrôlé (pH initial de 6,5). **LOOIJESTEIJN et al (2001)** ont rapportés qu'au sein d'une même espèce de bactéries lactiques, les résultats peuvent être différents (**LOOIJESTEIJN et al., 2001**)

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

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 MRS, à savoir **1g, 3g et 5g** et comme l'azote n'est requis que pour la croissance de l'organisme, **0,3%** 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.

Les travaux du **WELMAN et MADDOX (2003)** ont également montrés que la plupart des espèces de *Leuconostoc* sont auxotrophes, car elles sont incapables de produire des acides aminés et des vitamines. C'est pour ce là les différents milieux de culture ont été employés à l'étude de la production qualitative et quantitative de dextrane et de déterminer l'influence des nutriments sur la croissance des souches productrices et sur la biosynthèse et la génétique des dextrans. (**ZAROOUR et al., 2013; WELMAN et MADDOX, 2003**). Ont conclu que la croissance de *Leuconostoc* est influencée par l'addition d'extrait de levure dont leur développement est stimulé par l'addition de ce facteur de croissance, car la principale propriété recherchée chez les bactéries lactiques, utilisées en tant que levains en industrie alimentaire, est leur capacité à acidifier le lait et à se développer de façon régulière. Dans le lait, elles doivent trouver un certain nombre de nutriments nécessaires à leur croissance et en particulier, les acides aminés et les vitamines qui peuvent être fournis par l'extrait de levure. ces résultats sont conformes avec les travaux rapportés par (**GARAULT et al., 2001 ;KIHAL et al., 2006**).

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

Des souches de *Ln* en concentration différent de saccharose (1%, 5% et 10%), la bonne production maximale de dextrane été obtenu à 10% de saccharose qui a atteint 2,25 g/l chez **LC1**.

Selon **De BELDER (1990)**, la concentration initiale en saccharose, est l'un des principaux facteurs influençant la sécrétion de dextran-sucrase et la biosynthèse du dextrane. Nos résultats sont en cohérents avec les travaux de (**THIYAGARAJAN et al.,**

2017), ils trouvent que l'activité enzymatique maximale a été observée à une concentration de saccharose de 10%, , montrant la production maximale de dextrane, Et qui montre que *Ln. mesenteroides* a produit le maximum de dextrane après 20 heures d'incubation à 30°C à concentration de 15% de saccharose. **FARWA et al (2008)** dans leurs travaux remarquent que lorsque la concentration de saccharose est plus de 20% (25%) y avait une diminution du pourcentage de conversion du saccharose en dextrane, ce qui finit par affecter le rendement. Peut-être une concentration plus élevée de saccharose dans le milieu de fermentation a-t-elle un effet inhibiteur, appelé effet inhibiteur de substrat, qui diminue la production de dextrane (**MARTINEZ-ESPINDOLA et al., 1985; De BELDER, 1990; FARWA et al., 2008**).

Conclusion

Conclusion

Le dextrane est un exopolysaccharide produit par les bactéries lactiques spécifiquement les *Leuconostoc* sp appliqué en industrie agroalimentaire et pharmaceutique à cause de ces caractères texturales et antioxydantes.

Ce travail nous a permis d'isoler et d'identifier **14** souches de *Leuconostoc* à partir du lait de chèvre, qui ont été sélectionnées de 60 isolats en se basant sur les tests phénotypiques (microbiologiques et biochimiques); où on a réalisé des tests morphologiques (examen macroscopique, examen microscopique et test de catalase), tests physiologiques (croissance à différentes températures, thermorésistant, croissance à différentes concentrations de NaCl et croissance à différents pH) et des tests biochimiques (recherche de type fermentaire, hydrolyse de l'arginine, test de dégradation des sucres et hydrolyse de l'esculine).

L'identification phénotypique des **14** souches a montré qu'elles appartiennent aux espèces suivantes:

- ❖ *Ln. gelidum*: LC10.
- ❖ *Ln. citreum*: LC43.
- ❖ *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*: LC1, LC2, LC13 et LC15 .
- ❖ *Ln. mesenteroides subsp dextranicum*: LC34.
- ❖ *Ln. mesenteroides subsp cremoris*: LC21 et LC39.
- * *Ln. carnosum*: LC16 et LC4,.
- * *Ln. fallax*: LC12, LC18 et LC23.

La production des exopolysaccharides mise en évidence sur milieu MSE nous a permis de sélectionner **11** souches productrices de dextrane. Pour mieux caractériser le dextrane une quantification est réalisée sur milieu MRSs liquide où nous avons trouvés une différence entre les souches la quantité maximale été par la souche **LC1** (2.25g/l), la plus faible quantité de dextrane produite par la souche **LC15** (0.4g/l). En comparant cette production sur milieu MSE liquide, nous avons observés que chez la totalité des souches une diminution de production de dextrane.

L'étude de l'optimisation de production de dextrane sur milieu MRSs liquide avec changement de concentration des substrats nutritionnelles glucose (0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%, 1.5% et 2%), l'extrait de levure (0,1%, 0,3%, 0,5%), et saccharose (1%, 5% et 10%), pour la souche **LC1**, a montré que la concentration optimale de glucose pour la production de dextrane est 2% et la concentration optimale d'extrait de levure est 0,3%, et 10% pour le

saccharose. Cette étude nous a permis d'optimiser un milieu de culture favorisant une production optimale de dextrane.

Perspectives

- ✓ L'isolement des souches étudiées doit être fait à partir d'un nombre plus étendu des échantillons. Pour déterminer mieux ces isolats, il est nécessaire de faire une identification moléculaire.
- ✓ La comparaison des résultats de l'optimisation de production de dextrane de ces espèces avec d'autres espèces d'autres genres productrices.
- ✓ Essai d'application biologique de dextrane (activité antimicrobienne et anticoagulante...etc).
- ✓ Cette étude soit reprise en utilisant les conditions optimales obtenues avec d'autres conditions comme le pH et la température (cinétique de croissance).

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- **ALAHADAD. Z , MARZIEH , MOOSAVI – NASA et NAZEMI . S . H., 2010 . "** Characterization of the dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* from date fruit extract ." Iran Agricultural Research 27 . no . 1.2 . 79 – 88 .
- **ALI JUMM .K, JEHAN .A.S et SALMAN., 2021. "** Antibacterial and Antivirulence factors of Purified Dextran from *Lactobacillus gasseri* against *Pseudomonas aeruginosa* " Jordan Journal of Biological Sciences 14.1.
- **AMAN. A, SIDDIQUI. N. N, et QADER. S. A. U., 2012.** Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), PP 910-915.
- **AXELSSON .L., 2004.** Classification and Physiology in Lactic Acid Bacteria and Functional Aspects. 3e Ed, Marcel Dekker. 633p.
- **AYADI. H, DJEBBAS. A., 2019.** Caractérisation du dextrans produit par des souches de *Leuconostoc* isolées des produits laitiers. Mémoire de master en Microbiologie Appliqué, Université Kasdi Merbah Ouargla.103p.

B

- **BADIS. A, GUETARNI. D, MOUSSA BOUDJEMAA. B, HENNI. D.E et KIHAL. M., 2004.** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21, PP 579–588.
- **BADIS. A, LAOUBDIA-SELLAMI N, GUETARNI. D, KIHAL. M et OUZROUT R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". *Sciences et technologie*. 23p, 30-37.
- **BAJPAI. V, RATHER. I, MAJUMDER. R, SHUKLA. S, AERON. A, KIM. K, KANG. S, DUBEY. R, MAHESHWARI. D, LIM. J, PARK. Y., 2015.** Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11p, 1-23.
- **BAUER. R, et DICKS. L. M., 2005.** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* 101: 201-216.

- **BEN ATTALLAH. S, BOUKHEIRA. R., 2017.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches indigènes de leuconostoc. Mémoire de master en Microbiologie Appliqué, Université Kasdi Merbah Ouargla.102p.
- **BEAL. C, MARIN. M, FONTAINE. E, FONSECA. F, OBERT. J., 2008.** Production etconservation des ferments lactiques et probiotiques.
- **BEKHOUCHE. F., 2006.** *Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase.* These de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie. Universite de Mentouri Constantine, P 22.
- **BELARBI. F., 2011.** Isolement et sélection des souches bactéries lactiques des métabolites antibactériennes: présentation générale, Microbiologie alimentaire et industriel. Mémoire de magistère, Université d'Oran. 129p.
- **BELARBI. S, DEMIR. I., 2020.** Isolement et identification des bactéries lactiques à partir des fruits et légumes frais. Mémoire de master en Microbiologie Appliqué, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem 112p
- **BEN GUEHZA. A, MOUKNINE. H., 2019.** Intérêt technologique des souches de leuconostoc isolées à partir de différents produits laitiers. Mémoire de master en MicrobiologieAppliqué, Université Kasdi Merbah Ouargla.74p.
- **BHAVANI. A. L, & NISHA. J., 2010.** Dextran - the polysaccharide with versatile uses. International Journal of Pharmacology & Biotechnological Sciences, 1(4), 569-573.
- **BIGRET. M., 1994.** Lactic acid bacteria and organoleptic properties of foods. Presses Universitaires de Caen, France. 25p.
- **BJÖRKROTH. J, et HOLZAPFEL. W., 2006.** Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria.* Springer New York. 4, PP 267-319.
- **BOUREL. G, HENINI. S, KRANTAR .K, ORABY. M, DIYIES. C, GARMYN D., 2001.** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. Université d'Oran.81p, 75-82.
- **BOUMEDIENE. K., 2013.** *Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes.* Memoire en vue de

l'obtention du diplôme de *Magister en Biologie*. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, PP 30-38.

- **BRAHIMI. S., 2015.** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives "AMOREDJ" fermentés, Biodiversité des micro-organismes. 203p
- **BOUYGUES. P., 2017.** Les fermentation des micro-organismes des industrie laitière.p24.
- **BOUZAR.F, CEMING. J et DESMAZEAUD. M., 1997.** Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *J. Dairy Sci.* 80, PP 2310-2317.

C

- **CARR F.J, HILL. D, MAID N., 2002.** The lactic acid bacteria: A literature survey.*Crit. Rev. Microbiol.* 28, PP 281-370.
- **CHAKOU. R et BESSEDIK. K., 2018.** *Etude de quelques caractères technologiques des souches de Leuconostoc isolées à partir du lait de chèvre et de chamelle.* Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique en microbiologie appliquée. Uni Kasdi Merbah- Ouargla P16.
- **CHERRD. Z, TAZEGOURET. I., 2020.** Isolement, identification et diversité génétique par les marqueurs moléculaire des bactéries lactiques qui présentent l'activité protéolytiques isolées du lait de Chèvre. Mémoire de master en Microbiologie Appliqué, Université Larbi Ben M'hidi oum el-Bouaghi. 104p
- **COTE G.L et ROBYT J.F., 1983.** The formation of α -D-(1 ~ 3) branch linkages by an exocellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742. *Carbohydr.Res.*, 119, PP 141-156.
- **COVIS. R., 2011.** *Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses.* Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine Spécialité : Génie des procédés et des produits P36.

D

- **DELLAGLIA . F, ROISSART H, TORRIANI S, CURK M C, JANSSENS D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques. Ed. H Roissart et F M. Luquet Paris, Lavoisier. 25p.
- **DEGEEST, B, VANINGELGEM. F., LAWS. A.P, DE VUYST. L.,2001a.**UDP-Nacetylglucosamine 4-epimerase activity indicates the presence of N-acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains. *Appl Environ Microbiol* 67; PP 3976-3984.
- **DEVOYOD. J-J, POUILLAIN F., 1988.** Les Propriétés de *Leuconostoc*: leur rôle en technologie laitière. Laboratoire de Microbiologie laitière. Intra Editions. Jouyen-Josas, France. 253p.
- **De VUYST. L, DEGEEST.B., 1999.** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23, PP 153-177.
- **DHOUB. A., 2017.** *Mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique par quelques bactéries lactiques isolées de lait de brebis.* Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de master académique en Analyses Biologiques et Biochimiques, P 30.
- **DORTU. C, THONART P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie, Agronomie, Société and Environnement. 13p, 143-154.
- **DOLS. M., 1996.** *Etude de la dextrane-saccharase de Leuconostoc mesenteroides NRRL B- 1299 production et application à la synthèse d'oligosides.* Thèse de doctorat en Biologie et génétique moléculaires et cellulaires. Biotechnologie, Toulouse, INSA P1.
- **DORTU. C, THONART. P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie, Agronomie, Société and Environnement. 13p, 143-154.
- **DRIDER. D et PREVOST. H., 2009.** Bactéries lactiques. Edition : *Economica. Paris*, PP 73- 97.
- **DU , FANGKUN . Z , LEI PAN ,QIAOZHI. S , QINGQING. Z , RENPENG, YEHAN , YU WANG , XIAOXIA . Q ,et ZHIJIANG .Z ., 2018 .** " Purification , characterization and antioxidant activity of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* from homemade wine " *Carbohydrate polymers* 198 . 529 – 536

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

F

- **FANG FENG , FANGKUN . Z , QINGQING .Z , RENPENG . D , YANG .Y , YE HAN et ZHIJIANG .Z ., 2019 .** "Isolation , purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc Citreum* N21 from dried milk cake." *Transactions of Tianjin University* 25 , no . 2 . 161 – 168.
- **FARWA. S, SHAH. A. Q, AFSHEEN. A. et NUZHAT. A., 2008.** Production et Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.*, 4, PP 379-386.
- **FOUCAUD. C., FRANCOIS. A et RICHARD. J., 1997.** Development of a chemically defined medium for the growth of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), PP 301-304.
- **FREITAS. F, ALVES.V. D, & REIS. M, A., 2011.** Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388-398.

G

- **GARAULT. P, LETORT. C, JUILLARD. V et MONNET. V., 2001.** La biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée et des purines : deux voies essentielles pour une croissance optimale de *Streptococcus thermophilus* dans le lait. *Lait* 81, PP 83-90
- **GARRIDO. F, MICHEL. C, et MORIN. D., 2002.** Les exopolymères bactériens. *Edition: BRGM. France*, PP 20-40.
- **GARVIE. E.I., 1984.** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.*, 16, PP 147-178.
- **GARVIE. E.I., 1986.** Gram positive cocci- Genus *Leuconostoc*. *In: Bergey's Manual, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore*, PP 1071-1075.

- **GEMELAS. L, DEGRAEVE P, DEMARIGNY. Y., 2014.** The citrate anabolism in homo and hytirofermentative lab: A selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems. *Food and Nutrition Sciences*. 5p, 953-969.
- **GHAZI. F, HENNI D, BENMECHERNENE. Z, KIHAL. M., 2009.** Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominants lactic acid bacteria isolated from algerian raw milk. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 4p, 78-87.
- **GHOZLANE. D., 2011** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle). Mémoire de magister en Agronomie, Ecole nationale supérieur d'Agronomie El-Harrach Alger.
- **GUESSAS. B, et KIHAL, M., 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone: raw goats'milk. *African Journal of biotechnology*. 3(6), PP 339-342.
- **GUESSAS. B., 2006.** *Potentialité métabolique des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrol des Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat d'Etat, Université d'Oran Algérie.
- **GUIRAUD. J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod Paris, P652..
- **GUIRAUD. J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire. *Dunod-RIA*. P 696.
- **GURTLER. V, et MAYALL. B.C., 2001.** Genomic approaches to typing taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51, PP 3-16.
-

H

- **HANNACH. S-S., 2008.** *Inhibition des bacteries indésirables par l'activité antimicrobienne des espèces de Leuconostoc isolées du lait cru de chèvre*. Mémoire de magister en microbiologie fondamental et appliquée. Uni. Oran-Es-Sénia. P 7.
- **HANSAL. N., 2015.** Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre et de chamelle. Mémoire de magister en Microbiologie Fondamentale et Appliqué, Université d'Oran 1. 154p.

- **HARIRI. A, OUIS. N, SAHNOUNI. F, BOUHADI. D., 2009.** Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de carbone. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*
- **HAMMES. W.P et HERTEL.C., 2006.** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* in Prokaryotes. *4th edition.*
- **HEMME. D et FOUCAUD-SCHEUNEMANN. C., 2004.** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, International Dairy Journal* 14, PP 467–494.
- **HOLZAPFEL. WH , BJORKROTH. J et DICKS. LM., 2009.** Genus I. *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198 emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66AL. In: De Vos P., Garrity GD., Jones NR., Krieg W., Ludwig FA., Rainey K., Schleifer WB.. *Whitman (Eds)*
- **HOLZAPFEL. W H, et WOOD B J B., 2014.** Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy. *John Wiley & Sons, Ltd* , PP 395-400.
- **HOLLAND R. LIU S. Q, CROW V. L, DELABRE M. L, LUBBERS M, BENNANDT M, NORRIS G., 2005.** Esterase of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal.* 15p, 711-718.
- **HOLLAND R.LIU, Q. S., 2011.** *Leuconostoc sp.* lactic acid bacteria. Elsevier.138p.

I

- **ITO .S, KOBAYASHIE. T, OHTA. Y, AKIYAMA. Y., 1983.** Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Ferment. Technology.* 6p, 353-358.

K

- **KASSAS. Z., 2017.** Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba. 59p.

- **KATINA. K , MAINA. N. H, JUVONEN. R, FLANDER. L., JOHANSSON.L, VIRKKI. L, TENKANEN. M & LAITILA. A., 2009.** In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26(7), 734-743.
- **KEMPLER. G. M. et MCKAY.,L.L., 1980.** Improved medium for dandection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacandylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), PP 926-927.
- **KHEDID. K, FAID. M, MOKHTARIE. A, SOULAYMANI. A, ZINDINE. A., 2006.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbioloy. Es.* 10p, 10-16.
- **KIHAL. M, HENNI. D.E, PREVOST. E et DIVIÈS.C., 2006.** A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a case of *Leuconostoc mesenteroides*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (4), PP 378-383.
- **KIHAL. M., 1996.** *Etude de la production du dioxyde de carbone par Leuconostoc mesenteroides, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu.* Thèse de Doctorat d'Etat. *Université d'Oran Algérie.*
- **KIHAL. M , PREVOST. H, HENNI. D.E, BENMECHERNENE. Z et DIVIES. C., 2009.** Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroïdes* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *Scientific Research and Essay* Vol. 4 (11), PP 1348-1353.
- **KIM. D, ROBYT. JF, LEE. SY, LEE. JH, KIM. YM., 2003.** Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH and temperatureof reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B512FMCM dextransucrase. *Carbohydr Res*; 338, PP 1183-1189.
- **KORAKI. M & VOGEL. R. F., 2006.** Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 71(6), 790-803.

L

- **LAHTINENS, OUWEHAND. A.C, SALMINEN. S, AND WRIGHT A.V., 2012 :** *Lactic Acid Bacteria Microbiological ans functional aspects* Fourth edition Taylor&Francis Group. Boca Raton London New York.
- **LARPENT. J. P. et LLARPENT, MG., 1990.** *Memento technique de microbiologie . Second Ed. Technique et Documentaire Lavoisier.* P 417 .

- **LAW. J, HAANDRIKMAN A., 1997.** Proteolysis enzymes of lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 7p, 1-11.
- **LEES .G.J, JAGO G.R., 1976.** Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. J. Dairy Res.
- **LEROY F. VUYST L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry, Trends in Food Science and Technology. 67-78.
- **LEVEAU. J.Y, BOIUX. M et De ROISSART. H.B., 1991.** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. *2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 3: 2-40.
- **LIMSOWTIN.G.K.Y., BROOME, M.C. et POWELL, I.B., 2004.** Lactic acide bacteria, taxonomy. In Encyclopedia of Dairy Sciences. Roginski H. *Oxford, Elsevier,* PP 1470-1478.
- **LIU. S-Q., 2016.** Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc spp. Reference Module in Food Sciences.* National University of Singapore, Singapore. *Elsevier Inc.* PP 1-6
- **LOOIJESTEIJN. P.J, TRAPET. L, DE .VRIES.E, ABEE. T, HUGENHOLTZ. J. 2001.** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. Int J Food Microbiol 64: 71-80.
- **LUCEY. C.A, CONDON. S., 1986.** Active role of oxygen and NADH oxydase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. J. Gen. Microbiology. 132p, 1789-1796.

M

- **MAHAUT. M, JEANTEL. R, BRULE. G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. 194p.
- **MARCHAL. N, BOURDON. J. L et RICHARD. C., 1991.** Les milieux de culture: pour l'isolement and l'identification biochimique des bactéries. *Lavoisier. Paris.*
- **MARTINEZ-ESPINDOLA. JP, LOPEZ-MUNGUIA. CA., 1985.** La cinétique de la synthèse de la dextransucrase et du dextrane dans des réacteurs discontinus. *Biotechnol Lett.*; 7 PP 483–486.
- **MATAMOROS. S., 2008.** *Caractérisation de bacteries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Etude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid.* Thèse de doctorat en Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment Université de NANTES. P1.

- **MATHOT. A.G, KIHAL. M, PREVOST. H et DIVIES. C., 1994.** Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *Int. J. Dairy*, 4 PP 459-469.
- **MAURAY.S, DE. RAUCOURT. E, CHAUBAND. F, MAÏGA-REVEL. O, STERBERG. C, & FISCHER A. M., 1998.** Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 9(4), 373-387.
- **MAYEUX. J, SANDINE. W, ELLIKER. P., 1962.** A selective medium for addicting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*. 45p, 655-656.
- **MECHAI. A., 2009** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques, Diplôme de Doctorat, Biochimie appliqué.
- **MCDONALD. L, FLEMING. H, HANSEN. H., 1990.** Acid tolerance of *leuconostoc mesenteroides* and *lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiology*. 56p, 2120-2124.
- **MISAKI. A, TORII. M, SAWAI. T., & GOLDSTEIN. I. J., 1980.** Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydrate Research*, 84(2), 273-285.
- **MONNET. C, LATRILLE. E, BÉAL, C et CORRIEU. G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques *In* Corrieu, G. et Luquet, F.M., bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc, Lavoisier*. PP 511, 593.
- **MONSAN. P, BOZONNAND. S, ALBENNE. C, JOUCLA. G, WILLEMOT. R.-M & REMAUD-SIMEON. M 2001.** Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.

N

- **NAESSENS. M, CERDOBBEL. A, SOANDAERT. W & VANDAMME. E. J. 2005.** *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(8), 845-860.
- **NACHER-VAZQUEZ. M, BALLESTEROS. N, CANALES. A, RODRIGUEZ SAINT-JEAN. S, PEREZ-PRIANDO.S. I, PRIANDO. A, AZNAR. R & LOPEZ, P. (2015).** Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers*, 125, 292-301.

- **NISHA . J . C , PERIYASAMY , THANGASAMY . S , THIRUMALAISAMY . R et THIYAGARAJAN . 2017 .** " OPTIMIZATION OF DEXTRAN PRODUCTION FROM CABBAGE WASTE USING *Leuconostoc mesenteroides* . no. 4 . 24 – 31 .

O

- **OGIER. J, SERROR. P., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126p, 291-301

P

- **PAPAGINNI. M., 2012.** Food fermentation and production of bio preservatives. In: Hui, Y. H., Ozgul, E. E., *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*. 2éme Edition CRC Press. US. 6p, 109-124.
- **PATEL. S, MAJUMDER. A, GOYAL. A., 2012.** Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*. 52p, 3-12.
- **PATEL. A & PRAJAPATI..J. B., 2013.** Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advance in Dairy Research*, 1(2), 107.
- **PEREIRA. AM, COSTA FAA , RODRIGUES. MI, et MAUGERI. F., 1998.** In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett.*; 20, PP 397-401.
- **PÉREZ-RAMOS. A, NÁCHER-VÁZQUEZ. M, NOTARARIGO. S, LÓPEZ, P. et MOHEDANO. M. L., 2015.** Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides In V. R. P. a. R. R. Watson (Ed.), *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics (Elsevier Oxford ed.)*. UK.22, PP 329-344.
- **PETRY. S, FURLAN. S, CREPEAU. MJ, CEMING. J. et DESMAZEAUD.M., 2000.** Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbial*. 66, PP 3427-3431.

R

- **RAHMANI. KH., 2014.** Etude de cinétique d'acidification en Ph et en acide des bactéries lactique du genre leuconostoc. Mémoire de master, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

- **ROBYT. J.F., WALSETH.T.F., 1978.** The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. *Carbohydr. Res.*, 61, PP 433-445.
- **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.
- **ROUDJ. S, BELKHEIR. K, ZADI-KARAM. H, KARAM. N., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *Européen. J.Sci. Res.* 34p, 218-227.

S

- **SÄDE. E., 2011.** *Leuconostoc spoilage of refrigerated, packaged foods.* Thèse de Doctorat. University of Helsinki. Faculty of Veterinary Medicine. Finland, P57.
- **ATTE, Von . W , SALMINEN, et SEPPO ., 2004.** Eds . *Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects . no . 139 CRC Press .*
- **SALMINEN. S, LAHTINEN, S, OUWEHAND,.A.C. et WRIGHT. A.V., 2012.** *Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects. CRC Press Taylor & Francis Group. 579.37-dc23, P 3.*
- **SANLIBAB. P, ÇAKMAK. A., 2016.** Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Open Access.* 2p. 10115.
- **SCHLEIFER. K. H., 2015.** *Leuconostocaceae fam. nov. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: John Wiley & Sons, Ltd. UK.*
- **SUTHERLAND. I. W, REH. H. J, REED. G, PUHLER.A, et STADLER. P., 1996.** *Biotechnology (2nd ed.). New York: VCH. ISBN: 3-527r-r28310-2.*

T

- **TAMIME. A., 1990.** *Microbiology of starter cultures.* In: Robinson, R. K. Ed, *Dairy Microbiology, Elsevier, London. Vol (2), 131- 201p.*
- **THIERRY. A, POGACIC. T, WEBER. M, LORTAL. S., 2016.** *Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods.* In: Mozzi, F, Raya, R, Vignolo, G. M. Ed, *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.16p, 314-340.*

- **THIYAGARAJAN. P, THIRUMALAISAMY. R , THANGASAMY. S, CHINNAPPAN. S, SENGOTTAIYAN. A, PALANISAMY. S, PRIYA. G. et NISHA.,JC., 2017.** Optimization of dextran production from cabbage waste using *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Advances in Interdisciplinary Research Vol. 4*, PP 24-31.
- **TOLDRA. F, SANZ. Y, FLORES. M., 2001.** Meat fermentation technology. In: Hui Y, Nip W, Owen A. Ed, Meat science and applications. Marcel Dekker, New York. 23p, 537-561.
- **TORINO. M.I, SESMA. F, FONT De VALDEZ. G., 2000.** Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification. *Milchwissen 35*, PP 314-316.

U

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

V

- **VAMANU. E, PELNESCU. D, VAMANU. A, VASSU. T et CAMPEANU. G., 2010.** The identification and the influence of different glucides on the production of exopolysaccharides at the strains *Lactobacillus sp. IL2 and Lactobacillus sp. IL3*. *Romanian Biotechnological Letters. 15(3)*, P 7.
- **VETTORI. M, BLANCO. K-C, CORTEZI. M, LIMA. C-J, CONTIERO. J., 2012** Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent application, *Diálogos & Ciência*, 31, 171-186.

W

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

Y

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

Z

- **ZALACAIN. I, ZAPELENA. M, ASTIASARAN.I, BELLO. J., 1996.** Addition of lipase from *candida cylindracea* to a traditional formulation of a dry fermented sausage. *Meat science*. 42p 155-163.
- **ZAROOUR. K, BENMECHERNENE. Z, HADADJI. M, MOUSSA-BOUDJEMAA. B, BENHENNI. J-E et KIHAL. K., 2013.** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 08 PP 39 - 47
- **ZAROOUR. K., 2018.** *Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de Leuconostoc isolées localement*. Thèse de doctorat en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Uni. D'Oran P16-112.

Annexe

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

Extrait de levure.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Polypeptone.....	10g
citrate de sodium.....	2g
acétate de sodium.....	5g
Glucose.....	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.25g
MnSO ₄	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH 6.8	
Autoclavage 120°C/ 20 minutes	

02. Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	5g
Peptone.....	10g
Acide ascorbique.....	0.5g
Lactose.....	2g
L-arginine.....	4g
Bleu de bromothymol.....	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH 6.8 / Autoclavage 120°C/20minutes	

03. Milieu M17

Tryptone.....	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure.....	2,5g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Agar-agar.....	15g
pH 7	
Autoclavage 120°C/ 20 minutes	

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

Tryptone.....	20g
Gélatine.....	2.5g
Extrait de levure.....	5g
Saccharose.....	100g
Glucose.....	5g

Citrate de sodium.....1g
Azide de sodium.....0.075g
Agar-agar.....15g
Eau distillée.....1000ml
pH 6.8
Autoclavage 120°C/20minutes

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

Extrait de levure.....3g
Biopolytone.....2.5g
Glucose.....5g
Agar-agar.....15g
Eau distillée.....1000ml
pH 6.8
Autoclavage 121°C/15minutes

06. Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre.....1000ml
Bleu de bromothymol.....0.025ml
pH 7
Autoclavage 120°C/20minutes

07. Eau Physiologique

Chlorure de sodium.....8.5g
Peptone.....0.5g
Eau distillée.....1000ml
pH 7
Autoclavage 120°C/20 min

Annexe 02: Matériels utilisé

- *Agitateur magnétique à plaque chauffante
- *Anse de platine
- *Autoclave
- *Bain marie
- *Barreaux magnétique
- *Bec benzen
- *Balance
- *Boîtes de pétri
- *Centrifugeuse
- *Éprouvette
- *Erlenmayer
- *Etuve
- *Four pasteur

- *Micropipette
- *Microplaquettes
- *Mortier
- *pH mètre
- *Pipettes pasteurs
- *Réfrigérateur
- *Spectrophotomètre
- *Tubes à essai
- *Tubes eppendorf
- *Tubes sec en verre
- *Vortex électrique

Annexe 02: Coloration de Gram

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

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

Technique de coloration:

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette pasteur stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.
- La deuxième étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 s.
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90° (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries «Gram-», et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.
- En fin, quelques gouttes de fuchsine sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1min. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

Annexe 03: Les tableaux

Tableau 05: Tableau représente des valeurs de $A_{490 \text{ nm}}$ obtenues par la méthode phénolacide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.

[Glucose](g/l)	DO
0	0
0,002	0,22
0,004	0,43
0,006	0,74
0,008	0,96
0,01	1,32

Résumé

Le dextrane, un exopolysaccharide qui est fabriqué industriellement proviennent principalement des souches de espèces *Leuconostoc (Ln) mesenteroides* à l'aide des paramètres optimisés comme suit : un milieu de culture contenant une concentration adéquate de saccharose et de glucose, une source d'azote (par exemple extrait de levure), du phosphate et des oligo-minéraux. L'objectif de cette étude est d'optimiser un milieu de culture favorise une production maximale de dextrane. Quatorze souches de *Leuconostoc* sont isolées à partir du lait cru de chèvre, en utilisant le milieu MRS(**Man Rogosa et Sharpe**) additionner à la vancomycine. Des tests physiologique et biochimiques classiques sont appliqué pour identifier les isolats. qui appartiennent à 5 espèces: *Ln. gelidium*, *Ln. croum* , *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. mesenteroides* inclue les trois sous espèces (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides subsp dextransicum* et *Ln. mesenteroides subsp cremoris*).

La production d'EPS est observée sur milieu MSE, 11 souches productrices de dextrane ont été sélectionnée comme souches productrices de dextrane. La quantification d'EPS sur milieu MRSs liquide à montrer une différence entre les espèces isolées, avec une production maximale de l'ordre.

L'étude d'optimisation de production d'EPS par les souches par la quantification de dextrane produit sur milieu MSE liquide et MRSs, a montré que la meilleur prodtion est remarquée sur milieu MRSs pour la totalité des souches isolées.

Selon les conditions de croissance, avec différentes concentrations de substrat nutritionnel, le glucose (0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%, 1.5%, et 2%) , l'extrait de levure (0.1%, 0.3% et 0.5%), et le saccharose (10, 50 et 100 g/L), la quantification de production d'exopolysaccharides a montré que la meilleur production de la souche choisis LC1(*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*) est dans une concentration de 2% glucose, 0.3% d'extrait de levure et 10% de saccharose. pour une production maximale de dextrane.

Mots clés: *Leuconostoc*, caractères phénotypique, Dextrane, , Exopolysaccharides.

Abstract

Dextran, an industrially produced exopolysaccharide comes mainly from strains of *Leuconostoc (Ln) mesenteroides species* using the optimized parameters as follows: a culture medium containing an adequate concentration of sucrose and glucose, a nitrogen source (eg yeast extract), phosphate and trace minerals. The objective of this study is to optimize a culture medium that promotes maximum dextran production. Fourteen strains of *Leuconostoc* are isolated from raw goat's milk, using MRS medium added to vancomycin. Classical physiological and biochemical tests are applied to identify the isolates, which belong to **5** species: *Ln. gelidium*, *Ln. croum*, *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. mesenteroides* includes all three subspecies (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* and *Ln. mesenteroides subsp cremoris*).

The production of EPS is observed on MSE medium, **11** dextran-producing strains were selected as dextran-producing strains. The quantification of EPS on liquid MRSs medium showed a difference between the isolated species, with maximum production of the order.

The study of optimizing the production of EPS by the strains by quantifying the dextran produced on liquid MSE medium and MRSs, showed that the best production was observed on MRS medium for all of the strains isolated.

Depending on the growth conditions, with different concentrations of nutritional substrate, glucose (1g, 3g, 5g, 10g, 15g, and 20g / l), yeast extract (1g, 3g and 5g / l), and sucrose (10, 50 and 100 g / L), the quantification of production of exopolysaccharides showed that the best production of the strain selected LC1 (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*) is in a concentration of 2% glucose, 0.3% yeast extract and 10% sucrose . for maximum dextran production.

Key words: *Leuconostoc*, phenotypic characters, Dextran, Exopolysaccharides.

المخلص

الديكستران ، هو عبارة عن مجموعة السكريات الخارجية المنتجة صناعيًا ، يأتي أساسًا من سلالات من أنواع *Ln. mesenteroides* باستخدام شروط محددة و ظروف مثلى (وسط زرع يحتوي على تركيز مناسب من السكر والجلوكوز ، ومصدر النيتروجين (مثل مستخلص الخميرة) ، والفوسفات والمعادن النادرة). الهدف من هذه الدراسة هو تحسين وسط استزراع يعزز الحد الأقصى من إنتاج الديكستران.

تم عزل 14 سلالة من *Leuconostoc* من حليب الماعز الخام باستخدام وسط MRS المضاف إلى فانكومايسين. يتم تطبيق الاختبارات الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية الكلاسيكية لتحديد العزلات التي تنتمي إلى 5 أنواع: *Ln. الجليديوم* ، *Ln. كروم* ، *Ln. الستريوم* ، *Ln. Fallax* ، *Ln. mesenteroides* يشمل جميع الأنواع الفرعية الثلاثة (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* ، *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* و *Ln. mesenteroides subsp cremoris*).

لوحظ إنتاج EPS على وسط MSE ، وعلى هذا الأساس تم اختيار 11 سلالة منتجة للديكستران كسلالات منتجة للديكستران. أظهر القياس الكمي لـ EPS على وسط MRSSs السائل فرقًا بين الأنواع المعزولة ، مع أقصى إنتاج للترتيب .

أظهرت الدراسة التي أجريت لتحسين إنتاج EPS بواسطة السلالات عن طريق تحديد كمية الديكستران المنتج على وسط MSE السائل و MRSSs ، أنه تمت ملاحظة أفضل إنتاج على وسط MRS لجميع السلالات المعزولة. اعتمادًا على ظروف النمو ، مع تركيزات مختلفة من الركيزة الغذائية ، الجلوكوز (1 غرام ، 3 غرام ، 5 غرام ، 10 غرام ، 15 غرام ، 20 غرام / لتر) ، مستخلص الخميرة (1 غرام ، 3 غرام و 5 غرام / لتر) ، والسكر (10 ، 50 و 100 جم / لتر) ، أظهر القياس الكمي لإنتاج عديدات السكاريد الخارجية أن أفضل إنتاج للسلالة المختارة LC1 (*Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*) هو بتركيز 2 % جلوكوز و 0.3 % مستخلص خميرة و 10 % سكروز. لأقصى إنتاج من الديكستران.

الكلمات الرئيسية: *Leuconostoc* ، الأحرف المظهرية ، الديكستران ، السكريات الخارجية