

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
Université Mohamed Seddik Ben Yahia- Jijel



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Optimisation de la production des exopolysaccharides
par des souches de *Lactobacillus sp*

Membres de Jury

Présidente: D^r AIT MEDDOUR A.

Examineur: D^r BOUBZARI MT.

Encadreur: M^r KHENNOUF T.

Présenté par

KRID Amel

REKIMA Rania

LEFOUILI Zeyneb

Année Universitaire 2018-2019

Numéro D'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Avant tout, Nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Tout d'abord, nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à notre encadreur Monsieur KHENNOUF TAREK,

au département de MASA de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Mohammed Soddik Ben Yahia-Jijel.

Nous remercions très chaleureusement pour votre esprit critique et aussi pour votre présence et vos conseils scientifiques.

Notre gratitude s'adresse également aux membres de jury: Mm Ait Meddour A. et Mr Boubezari M.

Nous tenons également à adresser nos remerciements à tous nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant nos études universitaires.

Finalement, Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude aux Ingénieurs de Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'université de Jijel pour leur aide.



Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce travail :

A mon père :

*Qui m'a toujours encouragé et soutenu, qui m'a guidé et orienté
et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

A ma très chère mère :

*Qui m'a soutenu et encouragée durant mes années d'étude que
Dieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie.*

A mon très chère frère Wassim et ma belle sœur Amira.

*Mes chers amis et camarades du laboratoire et de la promotion
de 2018-2019.*

*A ma camarade et ami Rania que dieu vous donne la santé,
bonheur, courage et surtout la réussite.*

Amel

Merci A tous ...

Dédicaces

Tout d'abord « Dieu » merci, de m'avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A ma famille; mon cher père, ma chère mère qui m'ont tant donné sans rien à prendre et mes sœurs pour leur patience et leur encouragement.

Je n'oublie pas m'affable tante Kheiria et son mari Nassim, qui m'ont accompagnaient durant les cinq ans, que Dieu vous protège.

A mes amies intimes Khawla et Meriem, qui m'ont soutenu moralement tout le temps ; je les souhaite une vie pleine de succès.

En fin je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Zeyneb

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes parents : Aucune dévotion ne peut exprimer mon respect, mon amour éternel et mon appréciation des sacrifices que tu as fait pour mon éducation et mon bien-être. Merci pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez donnés depuis mon enfance et j'espère que vos invitations m'accompagneront toujours.

Ce travail peut être le fruit de vos innombrables sacrifices. Dieu vous donne la santé, le bonheur et une longue vie.

À mon cher frère et sœurs : à mon frères raouf et mes petites sœurs (Zineb, Doua, Hanin et Marya) et Ceux qui ont partagé avec moi tous mes moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Is m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout le long de mon parcours, A ma famille.

À Amel : bien sûr ma sœur ma chère et ma belle Amel qui m'a accompagné tous ces jours et les jours à venir, si dieu le veut. Amel qui m'a toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.



Sommaire

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

1 Polysaccharides.....	2
1.1 Définition.....	2
1.2 Classification des polysaccharides	2
1.3 Exopolysaccharides	3
1.3.1 Définition.....	3
1.3.2 Structure des exopolysaccharides	3
1.3.3 EPS microbiens.....	3
1.3.4 EPS des bactéries lactiques	4
1.3.5 Classification des EPS des bactéries lactiques	4
1.3.5.1 Homopolysaccharides.....	5
1.3.5.2 Hétéropolysaccharides	8
1.3.6 Rôle des EPS dans la cellule procaryote.....	8
1.3.7 Application des EPS des bactéries lactiques	8
1.3.8 Condition de production	9
1.3.9 Biosynthèse des EPS.....	10

Partie expérimentale

2 Souches bactérienne.....	11
2.1 Milieux de culture.....	11
2.2 Extraction des EPS	11
2.3 Quantification des EPS par la méthode du phénol-sulfurique.....	11
3 Température	13
4 Effet du pH	14
5 Source d'azote.....	15
6 Source de carbone	17
Conclusion.....	22
Référence bibliographique.....	23

Annexe

Résumé

Liste des abréviations

Aw: Activity of water

Da: Dalton

EPS: Exopolysaccharide

GRAS: Generally Recognized as Safe

H₂SO₄:acide sulfurique.

Lb:*Lactobacillus*

Ln:*Leuconostoc*

MRS: Man, Rogosa et Sharp

S:*Streptococcus*

TCA : Tri-Chloroacétate

UDP : Uridine diphosphate glucose

Liste des figures

Figure 1 Homo et hétéropolysaccharides	5
Figure 2 Représentation schématique des unités répétitives de: dextran, mutan, alternan, glucan et reuteran.....	6
Figure 3 Représentation schématique des unités répétitives de β -(1,3-1,2)-D-glucan of <i>P. parvulus</i>	6
Figure 4 Classification des homopolysaccharides produits par <i>Lactobacillus</i> sp.....	7
Figure 5 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes température.....	13
Figure 6 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différents pH.....	14
Figure 7 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes concentrations de peptone.....	15
Figure 8 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes concentrations d'extrait de levure à pH 6.2.	16
Figure 9 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes concentrations d'extrait de viande à pH 6.2.....	17
Figure 10 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes concentrations de glucose à pH6.2.....	18
Figure 11 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes concentrations de saccharose à pH 6.2	18
Figure 12 Quantité des exopolysaccharides produite par <i>Lb. plantarum</i> (S10 et BCX1) à différentes concentrations de glucose et saccharose à pH 6.2	19

Liste des tableaux

Tableau 1 Homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques	7
---	---

La demande accrue de polymères naturels pour diverses applications industrielles au cours des dernières années a conduit à un intérêt pour la production d'exopolysaccharides par les microorganismes. De nombreux microorganismes ont une capacité de synthétiser des polysaccharides extracellulaires et les excréter en dehors de la cellule sous forme de polymères solubles ou insolubles (**Suresh Kumar et al., 2007**).

La capacité à produire des polysaccharides extracellulaires est répandue dans le monde microbien, chez certaines algues, champignons, levures et procaryotes. Cependant, plusieurs biopolymères sont produits par les bactéries, Gram positif et Gram négatif, sont actuellement bien étudiés et caractérisés en raison de leurs utilisations industrielles, médicales et biotechnologiques, ainsi que leur rôle écologique puisque ces biopolymères sont impliqués dans la protection des cellules contre la dessiccation, les composés toxiques, les bactériophages, stress osmotique, et pour permettre l'adhésion sur des surfaces solides et la formation de biofilms. (**Hongpattarakere et al., 2012**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes d'importance industrielle dans le développement de produits alimentaires fonctionnels et sont utilisées comme cultures de départ pour développer des aliments fermentés. La production de exopolysaccharides (EPS) par les bactéries lactiques est très variable en termes de composition chimique, de quantité, de taille moléculaire, de charge, de présence de chaînes latérales et de rigidité des molécules (**Mishra et Jha, 2013**).

La composition du milieu (sources de carbone et d'azote, vitamines, minéraux, etc.), et les conditions de croissance (température, agitation, temps d'incubation, pH, tension d'oxygène, etc.) sont des facteurs importants pour le rendement total des EPS produits par les bactéries lactiques (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

Notre travail a pour objectif d'effectuer une étude sur l'influence de la composition du milieu de cultures (source d'azote, source de carbone) ainsi que les conditions de culture (pH et température) sur la production des exopolysaccharides par deux souches de *Lactobacillus plantarum* isolées du rumen et du lait de chèvre.

1 Polysaccharides

1.1 Définition

Les polysaccharides ou polyosides sont des hydrates de carbone, plus ou moins polymérisés, très répandus dans la nature puisqu'ils représentent la majeure partie des glucides chez les êtres vivants. Les polysaccharides sont constitués de nombreuses sous-unités qui sont, soit des sucres simples, soit leurs dérivés. Ils peuvent former des chaînes linéaires, ramifiées ou non, et présentent une hydrophilie importante, ce qui permet de les utiliser pour modifier les propriétés des systèmes aqueux, comme par exemple une viscosité élevée à faibles concentrations, des propriétés gélifiantes, une bonne solubilité dans l'eau et des propriétés adhésives permettant aux bactéries qui les synthétisent de se lier fortement à des différents supports (Sanin et al., 2003).

1.2 Classification des polysaccharides

Plusieurs types de polysaccharides provenant de sources diverses peuvent être employés selon le produit visé et l'effet recherché. Ils peuvent être d'origine végétale (cellulose, pectine, amidon), d'origine algale (agar-agar, alginate, carraghénine), ou d'origine fongique ou d'origine bactérienne (gomme gellan, gomme xanthane, alginate) (Duboc et Mollet, 2001). Les microorganismes peuvent synthétiser les polysaccharides qui peuvent être classés en trois groupes selon leur localisation dans la cellule :

- Le premier groupe rassemble les polysaccharides intracellulaires (du cytosol) appelé polysaccharides de stockage tels que le glycogène qui sont situés dans le cytoplasme.
- Le second groupe concernant les polysaccharides structuraux de la paroi cellulaire comme le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques des bactéries à Gram positif, et les lipopolysaccharides ancrés dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (figure 01) (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).
- Le troisième groupe réunit les polysaccharides extracellulaires, certaines bactéries peuvent sécréter une couche de polysaccharide sur leur surface, qui, avec quelques glycoprotéines, sont regroupées dans le cadre général sous le terme «glycocalyx», ce dernier groupe se présente sous deux formes de base, soit sous forme de capsule intimement associée à la surface de la cellule, soit des exopolysaccharides (EPS) au sens strict du terme qui sont excrétés dans le milieu extérieur en entourant parfois les cellules dans une gangue muqueuse (Cerning, 1990).

1.3 Exopolysaccharides

1.3.1 Définition

Les exopolysaccharides (EPS) : sont des macromolécules organiques à chaîne longue linéaires ou ramifiés composés d'unités de sucre dans différents rapports qui comprennent principalement le glucose, le galactose, le rhamnose, etc. synthétisées par divers microbes à l'aide de différentes sources de carbone au cours du processus de fermentation (Paulo et al., 2012). Les EPS sont des composés de métabolites secondaires produits lorsque certains microorganismes ne sont pas dans des conditions favorables à leur prolifération (Shailesh et al., 2016). Au lieu de se fixer en permanence à la surface, ces polysaccharides sont sécrétés dans leur environnement. Cette caractéristique différencie les exopolysaccharides des polysaccharides capsulaires (Chen et Narbad, 2018; Shailesh et al., 2016).

1.3.2 Structure des exopolysaccharides

Les EPS consistent principalement en un nombre limité de types de monosaccharides différents ou de leurs dérivés et présentent une grande diversité grâce à diverses combinaisons d'unités de monosaccharides disposées en configurations linéaires ou ramifiées reliés entre eux par des liens glycosidiques (Nicolaus et al., 2010). Le nombre de structures chimiques différentes des EPS bactériens est très élevé et il s'agit en général d'hétéropolysaccharides possédant trois mais aussi quatre monomères différents organisés en groupes d'un ensemble de 10 ou moins pour donner les unités répétitives. Les monosaccharides créant les exopolysaccharides peuvent être des pentoses, des hexoses, des acides aminés ou des acides uroniques (Suresh Kumar et al., 2007).

Les liaisons de squelette les plus courantes des séquences non saccharidiques sont les liaisons β -1,4 ou β -1,3, qui présentent une rigidité structurelle caractéristique, comme dans le squelette cellulosique du xanthane de *Xanthomonas campestris*, tandis que d'autres liaisons telles que les liaisons α -1,2 ou α -1,6 sont considérées comme des structures flexibles, telles que les liaisons trouvées dans de nombreux dextrans (Nicolaus et al., 2010).

La possibilité de liaisons différentes dans les polysaccharides ainsi que la variation des arrangements de monomères ont entraîné une large gamme de formes et de structures (Suresh Kumar et al., 2007).

1.3.3 EPS microbiens

Les polysaccharides microbiens sont produits par une grande variété de microorganismes eucaryotes et procaryotes, mais les bactéries produisent la plus grande diversité de molécules et produisent plus souvent des quantités supérieures à 10 g/l. Les microorganismes producteurs n'utilisent pas les EPS bactériens comme sources d'énergie, les EPS microbiens se situent entre les

composés les plus multifonctionnels et industriellement intéressants(Sanlibaba et Çakmak, 2016). Plusieurs microorganismes isolés dans des environnements extrêmes, tels que les sources hydrothermales profondes, les écosystèmes antarctiques, les lacs salins et les sources géothermales ont commencé à être étudiés en tant que sources potentielles de biopolymères précieux, notamment les EPS,les polysaccharides microbiens sont susceptibles à la biodégradation dans la nature et sont moins nocifs pour l'environnement que les polymères synthétiques, cela contribue à leur respect de l'environnement dans les applications industrielles, ainsi que dans l'élimination des eaux usées ou dans l'environnement(Shailesh et al., 2016).(Tableau 1, annexe III).

1.3.4 EPS des bactéries lactiques

Parmi les différentes bactéries productrices d'EPS, les bactéries lactiques ont acquis une attention particulière. Les bactéries lactiques sont généralement reconnue comme microorganismes sans danger (GRAS) ainsi que leurs capacités à produire les EPS ont une grande diversité de structures sans risque pour la santé(Sanlibaba et Çakmak, 2016).

Les bactéries lactiques sont des procaryotes, Gram-positif, hétérotrophes et chimio-organotrophes, elles sont le plus souvent immobiles, non sporulées (Wright et Axelsson, 2012). Elles sont encore appelées bactéries de l'acide lactique et sont caractérisées par leur aptitude à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique, lorsque l'acide lactique est le seul produit formé sont dites homofermentaires par contre lorsque d'autres composés comme l'éthanol et le CO₂ sont produits en même temps sont, dites hétérofermentaires(Savadogo et Traore, 2011).

1.3.5 Classification des EPS des bactéries lactiques

Fondamentalement, en fonction de la composition des unités répétitives et voie de biosynthèse, les EPS peuvent être classés en deux classes(Mishra et Jha, 2013).

Ces classes sont des homopolysaccharides ou des hétéropolysaccharides (figure 2). La masse moléculaire des hétéropolysaccharides varie de 10⁴ à 10⁶ Da, généralement inférieure à la masse moléculaire moyenne de homopolysaccharides (jusqu'à environ 10⁷ Da)(Sanlibaba et Çakmak, 2016).

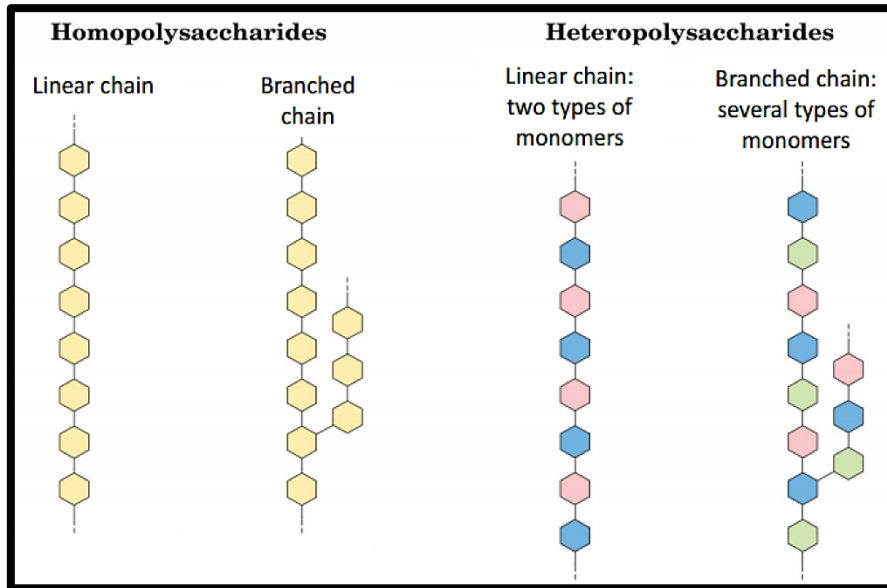


Figure 1 représentatif des homo et hétéropolysaccharides(Sanlibaba et Çakmak, 2016).

Les homopolysaccharides et hétéropolysaccharides respectivement diffèrent également par le nombre des enzymes et l'organisation des gènes impliqués dans leur synthèse. Enfin, en fonction des substituants présents dans les unités répétitives d'hétéropolysaccharides, il y a des polymères chargés ou neutres, ce dernier est appelée « zwitterionique». Les EPS se caractérisent d'avoir à la fois des radicaux chargés positivement (par exemple amine libre) ou chargés négativement (par exemple, des phosphates ou des carboxylates) dans leurs unités répétitives(Hidalgo-Cantabrana et al., 2012).

1.3.5.1 Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides contiennent un seul type de monosaccharide synthétisé par conversion de substrats extracellulaires par des enzymes sécrétées, par exemple, la dextransucrase, la lévansucrase (Jolly et al., 2002) composé de quatre sous-groupes différents (α -D-Glucans, β -D-glucanes, fructanes et autres)(figure 5)(tableau 2).

- Les α -D-glucanes sont plus répandus chez les bactéries lactiques et sont produits par des souches appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*(Werning et al., 2012). Selon les liaisons de la chaîne principale, les α -glucanes sont subdivisés en dextrans (α -1,6) sont principalement constitués de monomères de glucose liés en α -1,6 avec diverses chaînes ramifiées en position 3, mais parfois en positions 2 et 4 avec une probabilité relativement plus faible tels que les EPS de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* et *dextranicum*(Hongpattarakere et al., 2012), mutan (α -1,3), glucanes (α -1,2), reutérans (α -1,4) et alternans (α -1,3 et α -1,6) (figure 3)(Werning et al., 2012).

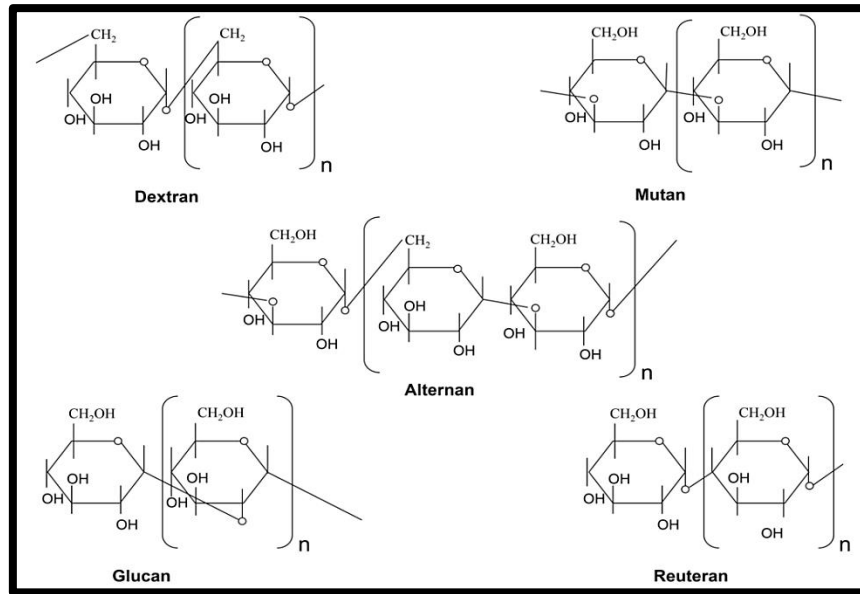


Figure 2 Représentation schématique des unités répétitives de: dextran, mutan, alternan, glucan et reuteran(Werning et al., 2012).

- β -D-glucanes constitués de monomères de glucose liés en β -1,3 avec des chaînes ramifiées en β -1,2, tels que les EPS de *Pediococcus spp.* et *Streptococcus spp.*(figure 4)(Hongpattarakere et al., 2012).

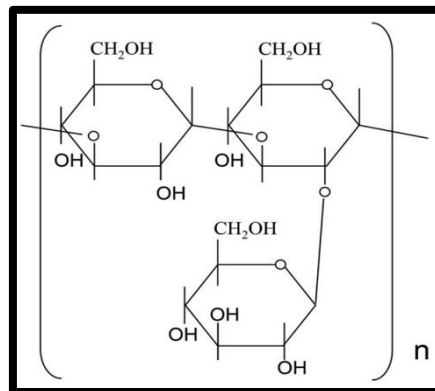


Figure 3 Représentation schématique des unités répétitives de β -(1,3-1,2)-D-glucan of *P. parvulus*(Werning et al., 2012).

- Les fructane peuvent être classées en : type levane : β -D-Fructose(2,6), le type Inuline : β -D-Fructose (2 ,1)toutes deux synthétisées par différentes espèces des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Weissella*.(Sanlibaba et Çakmak, 2016; Werning et al., 2012).D'autre comme le polygalactane :Galactose produit par des souche *Lb. lactis*(Badel et al., 2011).

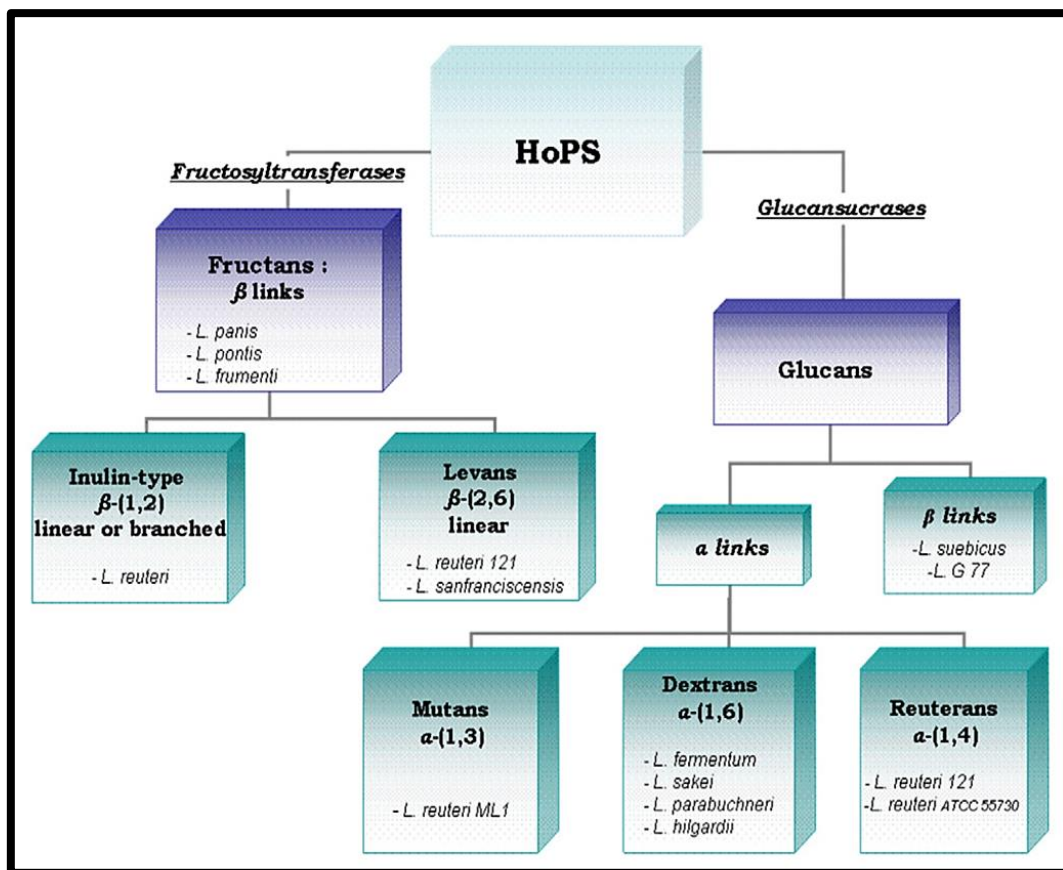


Figure 4 Classification des homopolysaccharides produits par *Lactobacillus* sp (Badel et al., 2011).

Tableau 1 Homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques (Sanlibaba et Çakmak, 2016).

EPS		Souches
α-D-glucans	Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
	Mutan	<i>Streptococcus mutans</i>
		<i>Streptococcus sobrinus</i>
	Alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Reuteran	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
β-glucans		<i>Pediococcus</i> spp.
		<i>Streptococcus</i> spp.
Fructans	Levans	<i>Streptococcus salivarius</i>
	Inulin-type	<i>Streptococcus mutans</i>
		<i>Leuconostoc citreum</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
Polygalactan		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> H414
		<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (CRL 406 and 142)

1.3.5.2 Hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides comprennent des unités répétitives de différents monosaccharides dont le nombre d'unités varie entre tri et octasaccharides (**Hongpattarakere et al., 2012**). Leur composition, beaucoup plus diversifiée que celle des homopolysaccharides, inclue des oses neutres (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose), acides (acide glucuronique, acide galacturonique, etc.) ou encore des amines (N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-galactosamine). Ils sont par ailleurs fréquemment sujets à des additions de substituants organiques (Exemples : acides aminés, pyruvate) ou inorganiques (Exemples : sulfate, phosphate) qui leur confèrent des propriétés physiques et biologiques supplémentaires et augmentent leur diversité (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

1.3.6 Rôle des EPS dans la cellule procaryote

Les EPS sont une composante importante des systèmes biologiques, bénéfiques pour les organismes qui les produisent, car ils remplissent diverses fonctions :

- Les EPS protègent les microorganismes en tant que barrière physique, leur production est une réponse directe aux pressions environnementales sélectives, y compris le stress osmotique, la température, pH, pression et intensité lumineuse. En cas d'espèces acidophiles ou de thermophiles et des Archaea, les EPS aident à l'adaptation aux conditions extrêmes (**Kambourova et al., 2015**). La capacité d'un microorganisme à s'entourer d'une couche exopolysaccharidique hautement hydratée peut lui fournir une protection contre la dessiccation et ceci menant à la survie dans les régions déficientes en eau (**Kambourova et al., 2015; Suresh Kumar et al., 2007**).

Le glycocalyx est principalement composé d'EPS, est essentiel pour la formation d'un biofilm. la formation de biofilms occupe une place importante dans l'adaptation des bactéries aux conditions physico-chimiques de l'environnement et favorise l'association de différentes espèces microbiennes, comme dans le cas de la muqueuse intestinale de plus une fois associé au biofilm, les produits métaboliques d'une espèce peuvent servir de substrats pour processus métaboliques d'une autre espèce. Ce biofilm confère une protection contre les forces mécaniques, les antibiotiques et les composés antimicrobiens (notamment lors du nettoyage) et la prédation par protozoaires (**Badel et al., 2011; Caggianiello et al., 2016; Donot et al., 2012**). Un autre avantage est indirect, en effet, les polysaccharides facilitent la communication entre les cellules, car ils agrègent les bactéries et réduisent les distances entre les cellules (**Badel et al., 2011**).

1.3.7 Application des EPS des bactéries lactiques

L'utilisation des EPS des bactéries lactiques à travers le monde inclure l'amélioration de la conservation, les caractéristiques organoleptiques, et les valeurs nutritionnelles d'une grande variété

des produits alimentaires comme le lait, la viande et légumes (Sanlibaba et Çakmak, 2016; Zannini et al., 2016). Les EPS produits par les bactéries lactiques sont capables de modifier les propriétés rhéologiques, la texture et la sensation en bouche des produits alimentaires; ainsi, ils trouveraient une application dans l'industrie alimentaire en tant que viscosifiant, stabilisant, émulsifiant ou gélifiant (Caggianiello et al., 2016).

Les EPS des bactéries lactiques sont particulièrement essentiels dans les produits laitiers fermentés tels que le yaourt, le yaourt à boire, le fromage, la crème fermentée et desserts à base de lait (Madhuri et Prabhakar, 2014). L'utilisation des starters dans le yaourt comme *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* produisant des EPS qui sont neutres en goût et qui ont la capacité de se lier à l'eau, d'interagir avec les protéines et d'augmenter la viscosité de la phase sérique du lait ce qui permet d'améliorer la texture, d'éviter la synérèse (Sanlibaba et Çakmak, 2016; Zannini et al., 2016). En outre une souche de *S. thermophilus* productrice d'hétéropolysaccharide est également responsable d'une augmentation du taux d'humidité dans la mozzarella à faible teneur en matière grasse (Madhuri et Prabhakar, 2014).

1.3.8 Condition de production

Environ 30 espèces de lactobacilles sont décrites comme productrices d'EPS. Parmi ceux-ci, les plus connus sont *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. johnsonii*, etc... (Badel et al., 2011). La production d'EPS est réalisée par fermentation, qui est une technologie très polyvalente pour la production des produits à valeur ajoutée (Kambourova et al., 2015). Les conditions de fermentation (température, temps d'incubation et pH), la composition du milieu (sources de carbone et d'azote), ainsi que les souches de bactéries lactiques influencent le rendement et la composition en monosaccharides du polymère synthétisé (Frengova et al., 2000). Les espèces sont cultivées principalement entre 30°C et 37°C sur des milieux riches tels que Man, Rogosa et Sharp, (MRS) ou sur milieu à base du lait ou dérivés de lait. La culture est généralement conduite sans agitation à cause de leur statut aéro-anaérobie (Castellane et al., 2014). Le glucose et le saccharose sont les sources de carbone les plus couramment utilisés ainsi que les ressources renouvelables, comme les déchets industriels, sous-produits tels que le glycérol, le lactosérum, la mélasse, les résidus d'hydrocarbures et le CO₂ peuvent être utilisés comme substrats carbonés (Kambourova et al., 2015). Les bactéries lactiques produisant des petites quantités d'EPS, qui varie entre 25 à 500 mg/l, les plus hauts niveaux de production rapportés jusqu'à présent ont été obtenus pour les souches mésophiles (Sanlibaba et Çakmak, 2016). L'optimisation de l'environnement de croissance est importante pour atteindre une production maximale d'EPS par les souches de bactéries lactiques (Zajšek et al., 2013).

1.3.9 Biosynthèse des EPS

La biosynthèse des EPS bactériens est un processus complexe impliquant de grand nombre d'enzymes et de protéines régulatrices(Sanlibaba et Çakmak, 2016). Le site de la synthèse des EPS et la nature des précurseurs permettent de distinguer deux principaux types de biosynthèse par les bactéries lactiques : la synthèse en dehors de la cellule (produisant des homopolysaccharides) ou celle à la membrane cellulaire (produisant des hétéropolysaccharides).

Les homopolysaccharides sont synthétisés en dehors de la cellule grâce à des enzymes excrétés par la bactérie, dans la production du dextrane, par exemple, seulement une enzyme est utilisée, la dextransucrase, cet enzyme est spécifique pour le saccharose et l'énergie pour la polymérisation vient de son hydrolyse(Cerning, 1990).

La synthèse des hétéropolysaccharides, par contre, a lieu à la membrane cytoplasmique. L'EPS est construit par polymérisation des unités répétitives formées dans le cytoplasme(Cerning, 1990; Degeest et De Vuyst, 1999).L'unité répétitive est assemblée à la membrane cytoplasmique par addition successive d'unités glucosyle au polysaccharide naissant qui est probablement ancré sur un transporteur lipidique probablement le phosphate d'ondécaprényle ou l'isoprénoïde phosphate, la sécrétion du polysaccharide de la membrane cellulaire dans l'environnement extracellulaire et polymérisée à l'extérieur de la cellule pour former l'hétéropolysaccharide, avec un poids moléculaire finale élevé d'environ 1×10^6 Da, la synthèse des hétéropolysaccharides par les bactéries lactiques implique donc un grand nombre d'enzymes différentes comme, par exemple, l'UDP-glucose déshydrogénase, la glucosyl-transférase et la galactosyl-transférase(Donot et al., 2012; Cerning, 1990).

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohamed Sadiq Ben Yahia de Jijel, durant la période Mai-juin 2019.

2 Souches bactérienne

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux souches de bactéries lactiques productrices des EPS fournies par M^r Khennouf, *Lactobacillus plantarum* codé S10 et BCX1: *Lactobacillus plantarum* S10 a été isolé du rumen de chèvre et *Lactobacillus plantarum* BCX1 a été isolé du lait de chèvre, qui sont génétiquement identifiées par le séquençage du gène d'ARNr 16S. Les souches de *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) ont été maintenues sous forme de stocks congelées (-20°C) dans le bouillon MRS additionné de 20% de glycérol. La revivification des souches de *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) a été réalisée par repiquages dans du bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24h (memmert).

2.1 Milieux de culture

Un seul milieu de culture a été utilisé, c'est le bouillon MRS « Man, Rogosa, Sharpe » sous forme standard et modifié (MRS avec différent pH, la modification de la source de carbone, la modification de la source d'azote) (composition en annexe I).

2.2 Extraction des EPS

Le milieu de culture est ensemencé avec 10% d'une culture jeune incubée à température appropriée (25°C, 30°C ou 37°C) pendant 24 heures. L'acide trichloroacétique (TCA) est additionné aux milieux de culture pour donner une concentration finale de 4% et laissé reposer pendant 30 min pour précipiter la masse cellulaire et les protéines. Après l'incubation, une centrifugation à 10000×g pendant 20 min (Hettich, ZENTRIFUGEN) est réalisée pour récupérer le surnageant. Les EPS sont précipités par l'éthanol à 96 % avec un rapport volumique : un volume de surnageant / un volume d'éthanol était maintenue à 4°C pendant 24h. Une deuxième centrifugation à 10000×g pendant 20 min était nécessaire pour la récupération de la totalité des EPS. Le culot a été dissous dans de l'eau distillée (Lai et al., 2014).

2.3 Quantification des EPS par la méthode du phénol-sulfurique

La quantification des glucides peut se faire par des méthodes colorimétriques dont souvent on utilise la méthode du phénol-acide sulfurique. Dans des tubes à essai, 40 µl de phénol (80%) et 2 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) sont additionnés à 800 µl d'échantillon (solution d'EPS). Les tubes sont maintenus en obscurité pendant une demi-heure à la température ambiante, après 30 minutes la densité optique est mesurée à 490 nm (analytikjena, SPECORD 50plus) contre un blanc dans lequel

800 µl d'eau distillée remplace la solution d'EPS (**Dubois et al., 1956**). La quantité des EPS est mesurée dans différentes conditions de culture : températures (25°C, 30°C et 37°C), pH (pH 3, 4, 5, 6,2 et 8), peptone de caséine (1%, 2,5%, 5%,7,5%,10%), extrait de levure (0,5%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%) extrait de viande (1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%) glucose (2%, 3%, 4 %, 5%), saccharose (2%, 3%, 4 %, 5%), glucose 2% plus saccharose (2%, 3%, 4 %, 5%).

3 Température

La figure 6 représente la quantité des exopolysaccharides à 25°C, à 30°C et à 37°C, produite par les souches de *Lb. plantarum* S10 et *Lb. plantarum* BCX1, on remarque qu'à 25°C, après 24 h d'incubation, la souche de *Lb. plantarum* S10 produit une quantité d'EPS de 16.45 ± 0.21 mg/l, légèrement inférieures à celles de la souche de *Lb. plantarum* BCX1 avec une quantité de 16.78 ± 0.34 mg/l. À 30°C, la production est presque similaire pour les deux souches S10 et BCX1 qui atteint 16.64 ± 0.48 mg/l et 16.64 ± 0.19 mg/l respectivement. À 37°C, la production est légèrement faible pour les deux souches et qui atteint: 16.29 ± 0.21 mg/l et 16.56 ± 0.29 mg/l respectivement. Les résultats obtenus montrent que les souches BCX1 et S10 présentent une meilleure production à 25°C et 30°C respectivement.

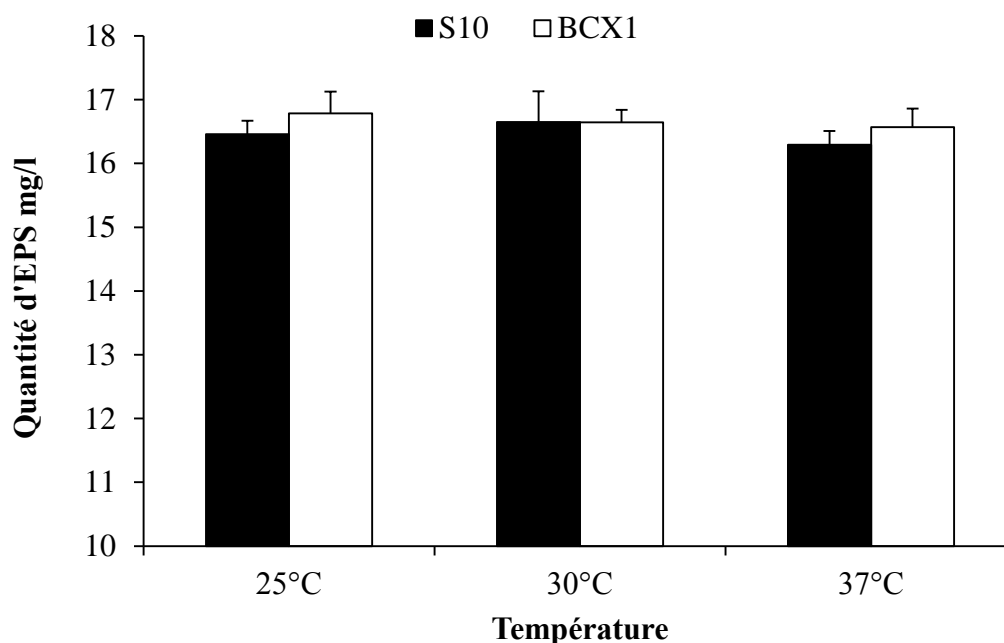


Figure 5 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) à différentes températures.

Nos résultats se concordent avec ceux de **Cerning et al. (1994)** et **Degeest et al. (2001)** qui ont rapporté que les bactéries mésophiles ont une production importante d'EPS à des températures inférieures ou égales à 30°C. En effet de nombreux chercheurs décrivent une relation directe entre la production d'EPS et la température de croissance des souches de bactéries lactiques (**Degeest et De Vuyst, 1999; Chen et al., 2006; Kim et al., 2008; Aslim et al., 2005**). L'augmentation de la production des EPS à basse température semble être un phénomène courant chez les bactéries lactiques mésophiles productrices d'EPS, dans lesquelles les conditions de croissance sousoptimales entraînent une amélioration de la production d'EPS (**Degeest et al., 2001**).

Sutherland (1972) suggère que, lorsque la croissance des cellules bactériennes est ralentie (à température basse ou élevée), la synthèse de polymères est stimulée, la production d'EPS implique un grand nombre d'enzymes dont des glucosyls-transférases et des polymérase, le premier rôle de ces enzymes se trouve dans la synthèse de la paroi bactérienne (peptidoglycanes) ainsi que de certains constituants cellulaires (acides téichoïques), ces enzymes ne sont donc pas toutes spécifiques à la synthèse des polysaccharides capsulaires ou exocellulaires, donc, dans des conditions de croissance optimales qui stimulent la production de lipopolysaccharides ou de peptidoglycanes, la synthèse d'EPS est réduite en raison de la moins disponibilité des enzymes.

4 Effet du pH

L'effet du pH sur la production des EPS a été examiné à 25°C pour *Lb. plantarum* BCX1 et à 30°C pour *Lb. plantarum* S10 pendant 24h d'incubation (Figure 7). Les quantités d'EPS les plus élevées sont de 16.61 ± 0.16 mg/l et de 16.67 ± 0.20 mg/l obtenus à pH 3.0 pour les deux souches respectivement.

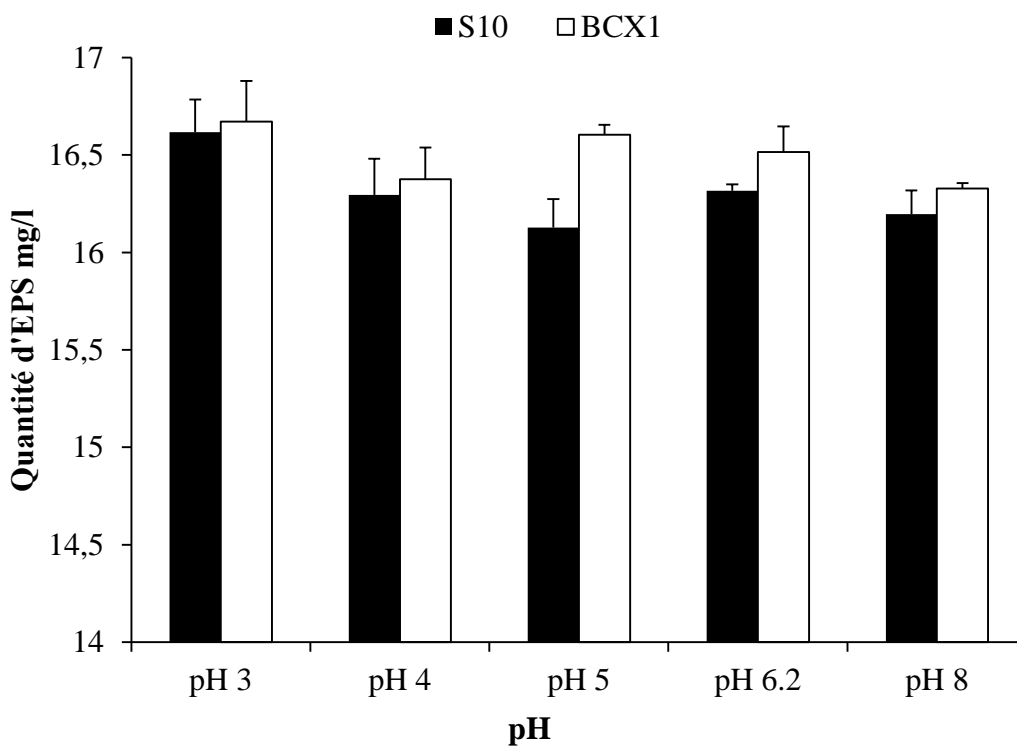


Figure 6 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) à différents pH.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Vaningelgem et al. (2004)** qui ont montrés qu'une acidité élevée du milieu provoque un stress acide dans les cellules conduisant à la suppression de la croissance bactérienne et à la production d'EPS. **Van den Berg et al. (1995)**, **Cheirsilp et al. (2001)** et **El-Waseif et al. (2013)** révèlent que le niveau maximum d'EPS produit par *Lactobacillus plantarum* a été atteint à pH 6,2. Des études des facteurs influençant la production de

polysaccharides par les bactéries lactiques ont permis de déterminer que, en général, un pH entre 6.0 et 6.5 (légèrement acide) est favorable à la production d'EPS (Mozzi et al., 1994; Gassem et al., 1997; Kimmel et al., 1998). L'effet du pH sur la production des EPS dépend des conditions expérimentales et des souches utilisées, néanmoins, il a été observé que les conditions à pH contrôlé présentent l'avantage d'augmenter considérablement le rendement en EPS, par exemple, la quantité d'EPS était plus de trois fois dans les fermentations avec contrôle du pH que dans celles sans contrôle du pH (Aslim et al., 2005; Petry et al., 2000). Selon (Gassem et al., 1997), un pH stable permet d'allonger la phase logarithmique et la phase stationnaire de croissance de la bactérie, ce qui provoque un ralentissement de la synthèse des peptidoglycanes et des acides tichoïques favorisant la production de polymères exocellulaires.

5 Source d'azote

L'effet des peptones sur la production des EPS est représenté dans la figure 8, on remarque que les quantités d'EPS sont quasi proportionnelles avec la concentration de peptone de caséine dans le milieu et qui sont comprises entre 16.15 ± 0.05 mg/l et 16.32 ± 0.10 mg/l pour la souche *Lb.plantarum* S10. Alors que pour la souche *Lb.plantarum* BCX1 la concentration d'EPS est élevée à des concentrations de peptone : 1 %, 2,5% et 5% qui atteint 15.71 ± 0.08 mg/l, 15.62 ± 0.09 mg/l et 15.95 ± 0.04 mg/l respectivement. Et atteint le maximal à 10% (16.37 ± 0.10 mg/l). Donc les concentrations de la peptone (7.5-10 %) ont une influence sur la production de EPS par S10 et BCX1 avec un rendement plus élevé de $16,32 \pm 0.10$ mg /l et de 16.37 ± 0.10 mg/l respectivement.

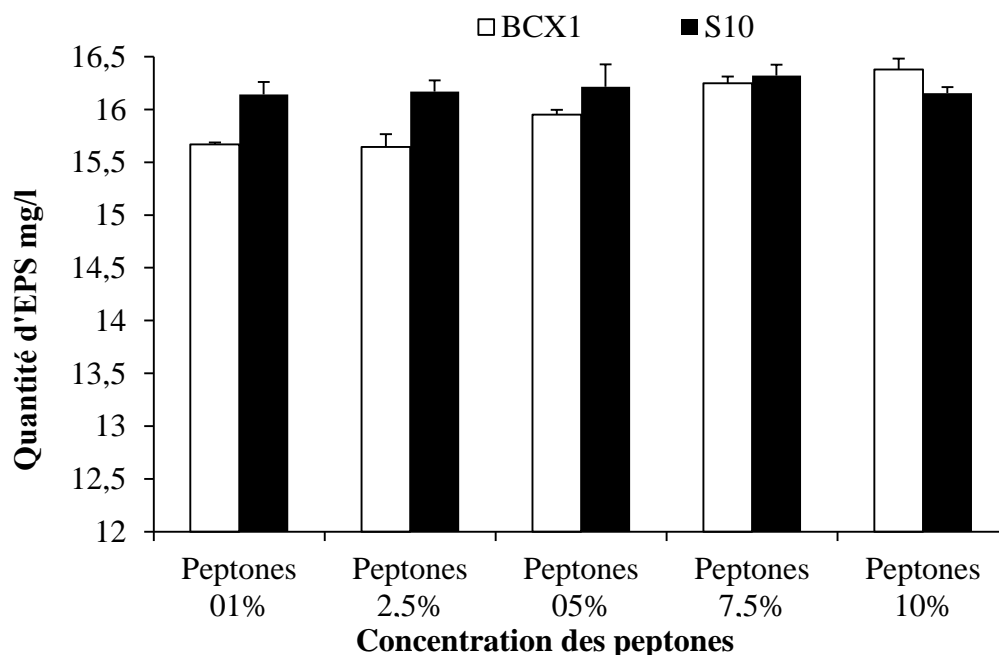


Figure 7 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum*(S10 et BCX1) à différentes concentrations de peptone.

La figure 9 montre quela quantité des EPS produit en présence de différentes concentrations d'extrait de levure. Les quantités d'EPS produites par *Lb. plantarum* BCX1 sont proportionnelles à la concentration d'extrait de levure. La quantité maximale (17.85 ± 0.07 mg/l) étant obtenue en présence de 10% d'extrait de levure. Alors que la quantité d'EPS produit par *Lb. plantarum* S10 est maximale avec 5% d'extrait de levure (17.40 ± 0.13 mg/l), élevé pour 2.5% (16.69 ± 0.27 mg/l), et 7.5% (16.63 ± 0.18 mg/l) et faible à la concentration 0.5% (15.60 ± 0.14 mg/l).

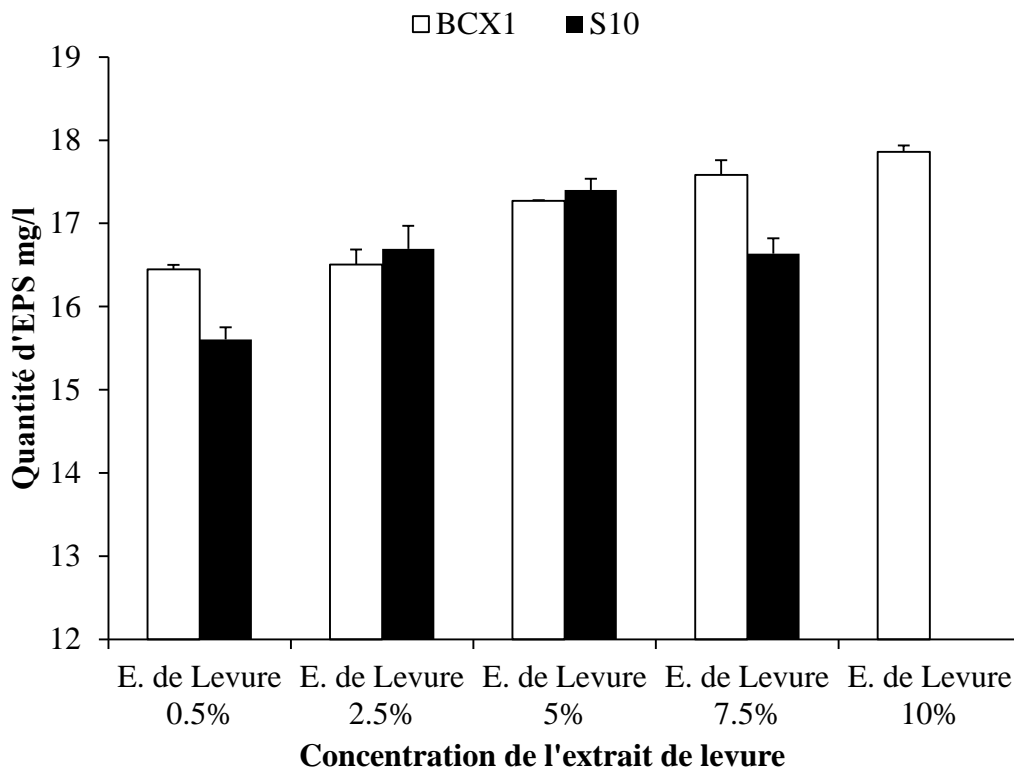


Figure 8 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum*(S10 et BCX1)à différentes concentrations d'extrait de levure à pH 6,2.

D'après la figure10,la quantité des EPS produit par *Lb.plantarum* BCX1 est maximal avec deux concentrations 7.5% (16.88 ± 0.28 mg/l) et 10% (16.88 ± 0.19 mg/l). Alors que *Lb. plantarum* S10 montre une meilleure production d'EPS à une concentration en extrait de viande 5% (15.03 ± 0.57 mg/l).Donc la production des EPS est influencée par la concentration d'extrait de viande et peptones de caséine comme source d'azote et l'augmentation des concentrations de ces constituants peut améliorer le rendement des souches bactériennes.

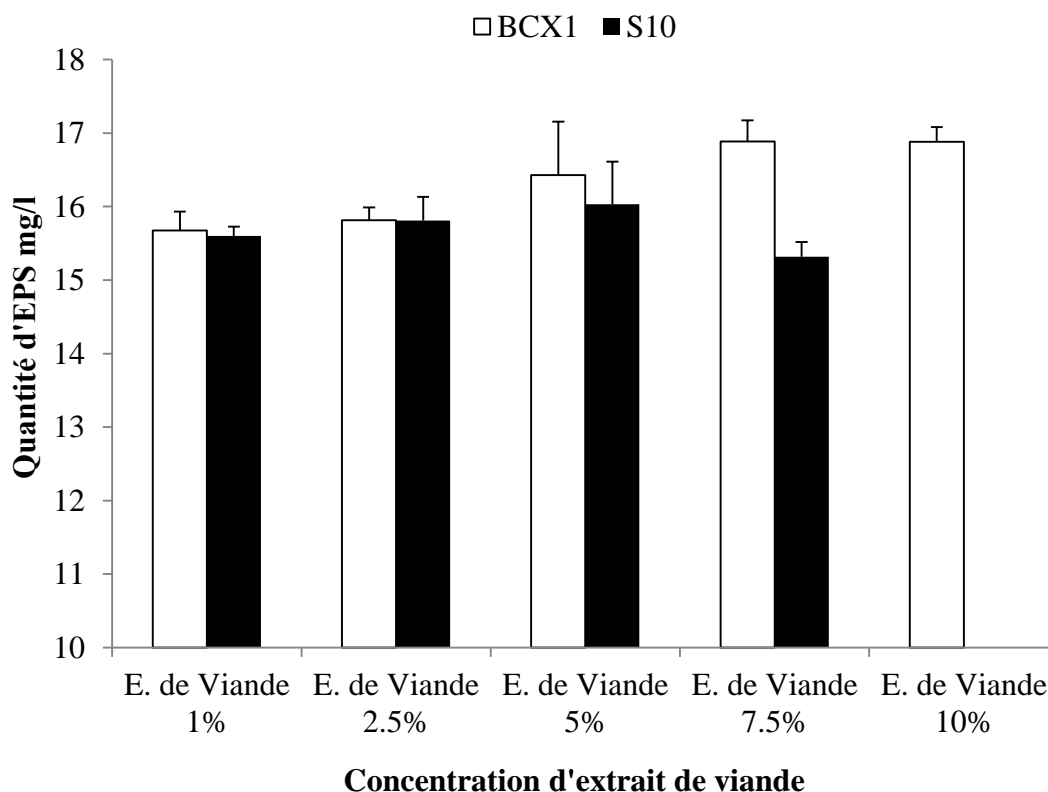


Figure 9 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentrations d'extrait de viande à pH6,2.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Imran et al. (2016)**, qui ont trouvé que l'effet de l'extrait de levure sur la production des EPS est plus efficace que les autres sources d'azote testées. Cela peut être dû à la présence de plus grandes quantités d'acides aminés libres, de peptides courts et de plus de facteurs de croissance dans l'extrait de levure.

Ainsi que **Macedo et al. (2002)** ont indiqués que l'ajout d'extrait de levure au milieu de production augmente à la fois la croissance cellulaire et les taux des EPS chez *Lb. rhamnosus*. Selon **Grobben et al., (1998)** l'extrait de levure est une source essentielle de sels de Mn^{2+} de Mg^{2+} pour les lactobacilles, et les ions ont favorisé le rendement en EPS par croissance accrue.

6 Source de carbone

La figure 11 représente la quantité des EPS produits par *Lb. plantarum* S10 en présence de différentes concentrations du glucose, ces quantités sont proportionnelles à la concentration de glucose dans le milieu. La quantité maximale des EPS (16.18 ± 0.24 mg/l) étant obtenue en présence de 5% de glucose. Alors que, pour *Lb. plantarum* BCX1 la production est maximale avec la concentration 3% (16.66 ± 0.05 mg/l).

De même la figure 12 montre les quantités d'EPS produit par *Lb. plantarum* S10 en présence de

différentes concentrations du saccharose, et comme avec le glucose les quantités d'EPS sont proportionnelles avec la concentration du saccharose dont la valeur maximale est 17.14 ± 0.09 mg/l pour une concentration 5% en saccharose. Par contre, la production est maximale avec la concentration 4% (16.98 ± 0.04 mg/l) pour *Lb.plantarum* BCX1.

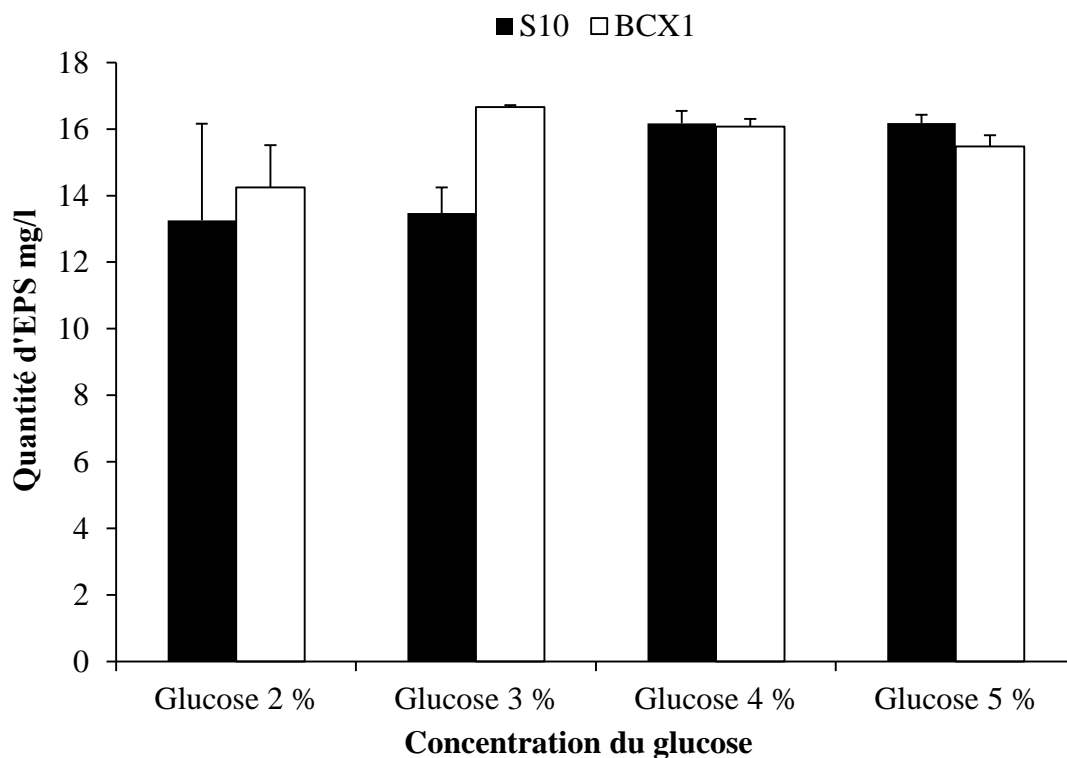


Figure 10 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum*(S10 et BCX1) à différentes concentrations de glucose à pH6.2

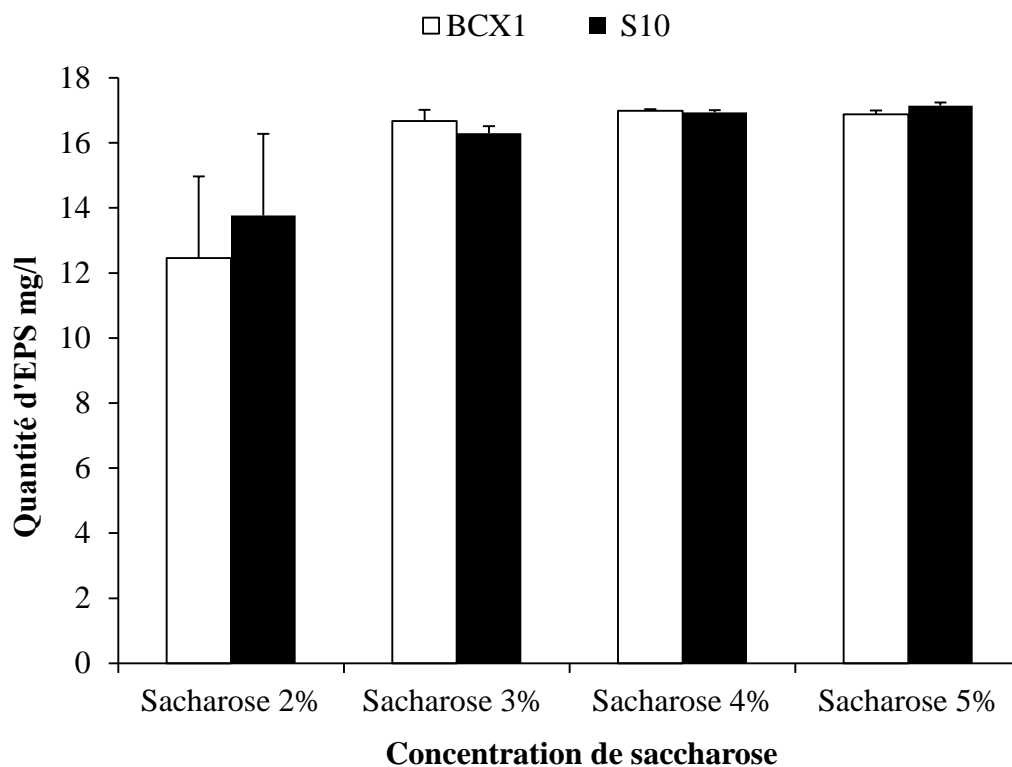


Figure 11 Quantité des exopolysaccharides produits par *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration de saccharose à pH6.2

La Figure 13 montre la production d'EPS en présence d'une source de carbone mixte glucose 2% avec une concentration variables du saccharose (2%, 3%, 4% et 5%) la quantité maximale d'EPS est obtenue ($17,32 \pm 0,30$ mg/l) dans une concentration de 2% de glucose et 3% de saccharose pour la souche *Lb.plantarum* S10. Alors que, pour *Lb.plantarum* BCX1 la quantité maximale est obtenu avec la concentration 2% de glucose 4% de saccharose ($17,25 \pm 0,29$ mg/l).

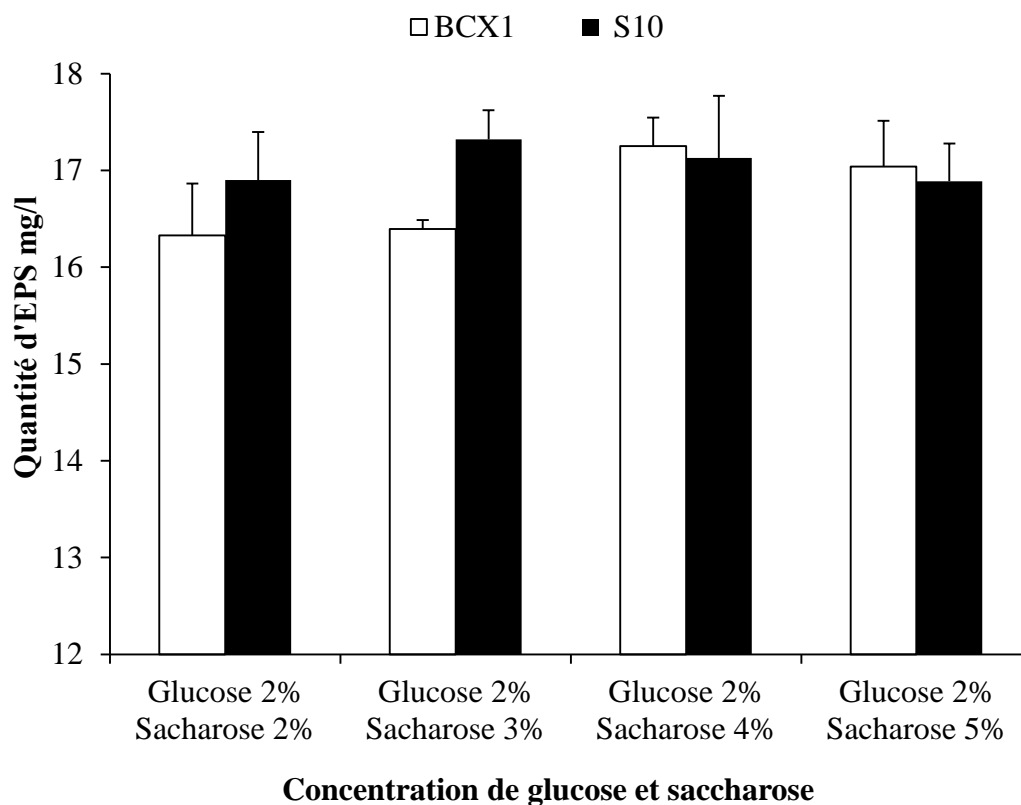


Figure 12 Quantité des exopolysaccharides produite par *Lb. plantarum*(S10 et BCX1) à différentes concentrations de glucose et saccharose à pH6.2

Les résultats obtenus montrent d'une part que le rendement des deux souches est meilleur en utilisant la mixture du glucose et saccharose que d'utiliser les sucres séparément. Le taux maximal de production des EPS est obtenu en présence de mixture de 2% de glucose et 3% de saccharose. D'autre part l'utilisation de saccharose comme source de carbone donne une meilleure production par rapport à l'utilisation du glucose.

Le carbone est une exigence essentielle pour la production d'EPS. Les sucres fournissent essentiellement de l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire et à la production d'EPS (Degeest et De Vuyst, 2000). D'après Cerning *et al.* (1994), le rendement total de production des EPS par les bactéries lactiques dépend de la composition du milieu et des conditions dans lesquelles elles se développent. Ainsi, les études réalisées par Habimana *et al.* (2009) et Xu *et al.* (2010), montre que la nature de la source de carbone a un effet significatif sur la croissance et la production des EPS par les bactéries lactiques. Grobben *et al.* (1998) ont rapporté que le type de la source de carbone a une grande influence sur la productivité en EPS et peut également affecter la composition de ce dernier.

Nos résultats sont en accord avec ceux du (Kojic *et al.*, 1992) et Toba *et al.* (1987), qui ont constaté que la production d'EPS était le plus intensive en présence de saccharose dans la culture de

Lactobacillus casei. De même **Fan et al. (2007)** montre que les disaccharides étaient en général meilleurs que les monosaccharides pour la production d'EPS, probablement due à l'assouplissement relatif de polymérisation.

En outre **Kaci (2006)** a clairement rapporté que le stress osmotique ne constitue pas la seule contrainte engendrée par de fortes concentrations en glucides, en effet et d'après l'auteur, le saccharose permet de diminuer l'activité de l'eau (A_w) limitant ainsi considérablement l'eau libre dans le milieu de culture, il s'agit donc d'un stress hydrique qui permet aussi d'augmenter la synthèse des EPS.

Yuksekdag et Aslim (2008) ont montré que la production des EPS par *Lb. delbrückii*, *Ssp. bulgaricus* et *S. thermophilus* dépend de la source de carbone et de sa concentration dans le milieu.

D'autres auteurs n'évoquent que le glucose comme meilleure source de carbone pour la production des EPS par les souches lactiques par rapport au fructose, saccharose et lactose, de plus une concentration plus élevée en glucose a eu un effet positif sur la formation d'EPS. (**Walling et al., 2005; Velasco et al., 2006**). **Xu et al. (2010)** démontre que la source de carbone avait une influence marquée sur la croissance et la production des EPS par *Lb. Paracasei* HCT et que le glucose fut la meilleure source de carbone pour la synthèse des EPS. Il a été démontré également avec *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* (**Vanhaverbeke et al., 1998**) que la présence de sucre en excès dans le milieu (à des concentrations comprises entre 10 et 20 g/l) avait un effet stimulant sur la production d'EPS, bien que la croissance ait apparemment été réduite.

En conclusion nous pouvons dire que la nature et la concentration de la source de carbone dans le milieu peut affecter la production des EPS par les bactéries lactiques.

Dans cette étude, nous avons essayé de démontrer que la température, le pH, la source de carbone et la source d'azote sont les facteurs qui affectent la production des EPS par les deux souches de *Lactobacillus plantarum* (S10 et BCX1).

Pour la souche S10, les résultats relatifs à l'effet de sucre et de sa concentration sur la production des EPS nous a permis de montrer que la mixture glucose et saccharose était la meilleure pour donner plus d'EPS. La plus grande quantité d'EPS synthétisée a été obtenue à une concentration de 2% de glucose et de 3% de saccharose. Ainsi l'extrait de levure donne la meilleure production à une concentration de 5 % à 30°C et pH 3 pendant 24 h d'incubation.

Nous avons également observé, d'une part, pour la souche BCX1 que la production est plus importante à 25°C et à pH 3 est que 10% d'extrait de levure donne la plus grande quantité d'EPS avec également le milieu qui contient 2% de glucose et 4% de saccharose. Nos résultats prouvent que la production des exopolysaccharides des bactéries lactiques peut être améliorée de manière significative en contrôlant les conditions de culture et modifiant la composition du milieu.

D'autres études approfondies sont nécessaires pour connaître vraiment les meilleures conditions de production des EPS pour ces deux souches de *Lactobacillus*.

- Abid Y, Casillo A, Gharsallah H, Joulak I, Lanzetta R, Corsaro MM, Attia H and Azabou S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* **108**: 719-728.
- Aslim B, Yüksekdag ZN, Beyatli Y and Mercan N. (2005). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21** (5): 673-677.
- Badel S, Bernardi T and Michaud P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* **29** (1): 54-66.
- Caggianiello G, Kleerebezem M and Spano G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100** (9): 3877-3886.
- Castellane TCL, Lemos MVF and Lemos EGdM. (2014). Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. *Carbohydrate Polymers* **111**: 191-197.
- Cerning J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **87** (1): 113-130.
- Cerning J, Renard CM, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M and Topisirovic L. (1994). Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (11): 3914-3919.
- Cheirsilp B, Shimizu H and Shioya S. (2001). Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57** (5): 639-646.
- Chen H and Narbad A. (2018) Proteins and Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria. In: Wei C and Arjan N (eds) *Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction: Physiology to Practice*. Singapore: Springer Singapore, 51-85.
- Chen Y, Sun L, Zeng Y, Wang L and An L. (2006). The production-influencing factors of extracellular polysaccharide (EPS) from a strain of lactic acid bacteria and EPS extraction. *Frontiers of Biology in China* **1** (3): 236-240.
- Degeest B and De Vuyst L. (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of

- the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology***65** (7): 2863-2870.
- Degeest B and De Vuyst L. (2000). Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology***66** (8): 3519-3527.
- Degeest B, Vaningelgem F and De Vuyst L. (2001). Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal***11** (9): 747-757.
- Donot F, Fontana A, Baccou JC and Schorr-Galindo S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers***87** (2): 951-962.
- Duboc P and Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal***11** (9): 759-768.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reberes PA and Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry***28** (3): 350-356.
- El-Waseif A, M Haroun B, A El-Menoufy H and A Amin H. (2013). Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* under different growth conditions. *Journal of Applied Sciences Research***9** (2): 1256-1265.
- Fan L, Soccol AT, Pandey A and Soccol CR. (2007). Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT-Food Science and Technology***40** (1): 30-35.
- Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM and Simov ZI. (2000). Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Canadian journal of microbiology***46** (12): 1123-1127.
- Gassem M, Schmidt K and Frank J. (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Journal of food science***62** (1): 171-173.
- Grobben G, Chin-Joe I, Kitzen V, Boels I, Boer F, Sikkema J, Smith M and De Bont J. (1998). Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology***64** (4): 1333-1337.

- Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S and Briandet R. (2009). Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (24): 7814-7821.
- Hidalgo-Cantabrana C, López P, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Suárez A, Margolles A and Ruas-Madiedo P. (2012). Immune Modulation Capability of Exopolysaccharides Synthesised by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **4** (4): 227-237.
- Hongpattarakere T, Cherntong N, Wichienchot S, Kolida S and Rastall RA. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* **87** (1): 846-852.
- Imran MYM, Reehana N, Jayaraj KA, Ahamed AAP, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Alharbi NS and Muralitharan G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules* **93**: 731-745.
- Jolly L, Vincent SJF, Duboc P and Neeser J-R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82** (1): 367-374.
- Kaci Y. (2006). Les bactéries productrices de polysaccharides dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*) : effet sur l'agrégation du sol. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène, Alger, 201.
- Kambourova M, Oner ET and Poli A. (2015) Chapter 15 - Exopolysaccharides from Prokaryotic Microorganisms—Promising Sources for White Biotechnology Processes. In: Pandey A, Höfer R, Taherzadeh M, Nampoothiri KM and Larroche C (eds) *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 523-554.
- Kim Y, Ji UK, Oh S, Young JK, Kim M and Sae HK. (2008). Technical optimization of culture conditions for the production of exopolysaccharide (EPS) by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. *Food Science and Biotechnology* **17** (3): 587-593.
- Kimmel SA, Roberts RF and Ziegler GR. (1998). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (2): 659-664.
- Kojic M, Vujcic M, Banina A, Cocconcelli P, Cerning J and Topisirovic L. (1992). Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (12): 4086-4088.

- Lai Y-J, Tsai S-H and Lee M-Y. (2014). Isolation of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* strains from sorghum distillery residues pickled cabbage and their antioxidant properties. *Food Science and Biotechnology***23** (4): 1231-1236.
- Macedo M, Lacroix C, Gardner N and Champagne C. (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal***12** (5): 419-426.
- Madhuri KV and Prabhakar KV. (2014). Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. *Oriental Journal Of Chemistry***30** (3): 1401-1410.
- Mishra A and Jha B. (2013) Microbial Exopolysaccharides. In: Rosenberg E, De Long EF, Lory S, Stackebrandt E and Thompson F (eds) *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 179-192.
- Mozzi F, De Giori GS, Oliver G and De Valdez GF. (1994). Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft***49** (12): 667-669.
- Nicolaus B, Kambourova M and Oner ET. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental technology***31** (10): 1145-1158.
- Paulo EM, Boffo EF, Branco A, Valente ÂMMP, Melo IS, Ferreira AG, Roque MRA and Assis SAd. (2012). Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências***84**: 495-508.
- Petry S, Furlan S, Crepeau MJ, Cerning J and Desmazeaud M. (200). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology***66** (8): 3427–3431.
- Ruas-Madiedo P and de los Reyes-Gavilán CG. (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science***88** (3): 843-856.
- Sanin SL, Sanin FD and Bryers JD. (2003). Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry***38** (6): 909-914.
- Sanlibaba P and Çakmak GA. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access***2** (2): 1000115.
- Savadogo A and Traore AS. (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés *International Journal of Biological and Chemical Sciences***5** (5): 2057-2075.

- Shailesh RD, Avni MV, Upadhyay KH and Devayani RT. (2016). Microbial exopolysaccharide - an inevitable product for living beings and environment. Mini Review. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*2 (4): 109-111.
- Suresh Kumar A, Mody K and Jha B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*47 (2): 103-117.
- Sutherland IW. (1972). Microbial polysaccharides-potential *Process Biochemistry*7: 27-30.
- Toba T, Abe S and Adachi S. (1987). Modification of KPL medium for polysaccharide production by *Lactobacillus* sp. isolated from kefir grain [conglomeration of various fungi]. *Japanese Journal of Zootechnical Science*58 (11): 987-990.
- van den Berg D, Robijn GW, Janssen AC, Giuseppin M, Vreeker R, Kamerling JP, Vliegthart J, Ledebouer AM and Verrips CT. (1995). Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*61 (8): 2840-2844.
- Vanhaverbeke C, Bosso C, Colin-Morel P, Gey C, Gamar-Nourani L, Blondeau K, Simonet J-M and Heyraud A. (1998). Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Carbohydrate research*314 (3-4): 211-220.
- Vaningelgem F, Zamfir M, Adriany T and De Vuyst L. (2004). Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. *Journal of applied microbiology*97 (6): 1257-1273.
- Velasco S, Årsköld E, Paese M, Grage H, Irastorza A, Rådström P and Van Niel E. (2006). Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International journal of food microbiology*111 (3): 252-258.
- Walling E, Dols-Lafargue M and Lonvaud-Funel A. (2005). Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by ropy *Pediococcus damnosus* IOEB8801. *Food microbiology*22 (1): 71-78.
- Werning ML, Notararigo S, Nácher M, Aznar PFDPR and López P. (2012) Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. In: El-Samragy Y (ed) *Food Additive*. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia: InTech, 83-114.
- Wright AV and Axelsson L. (2012) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S and Wright AV (eds) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Fourth Edition ed. Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 1-16.

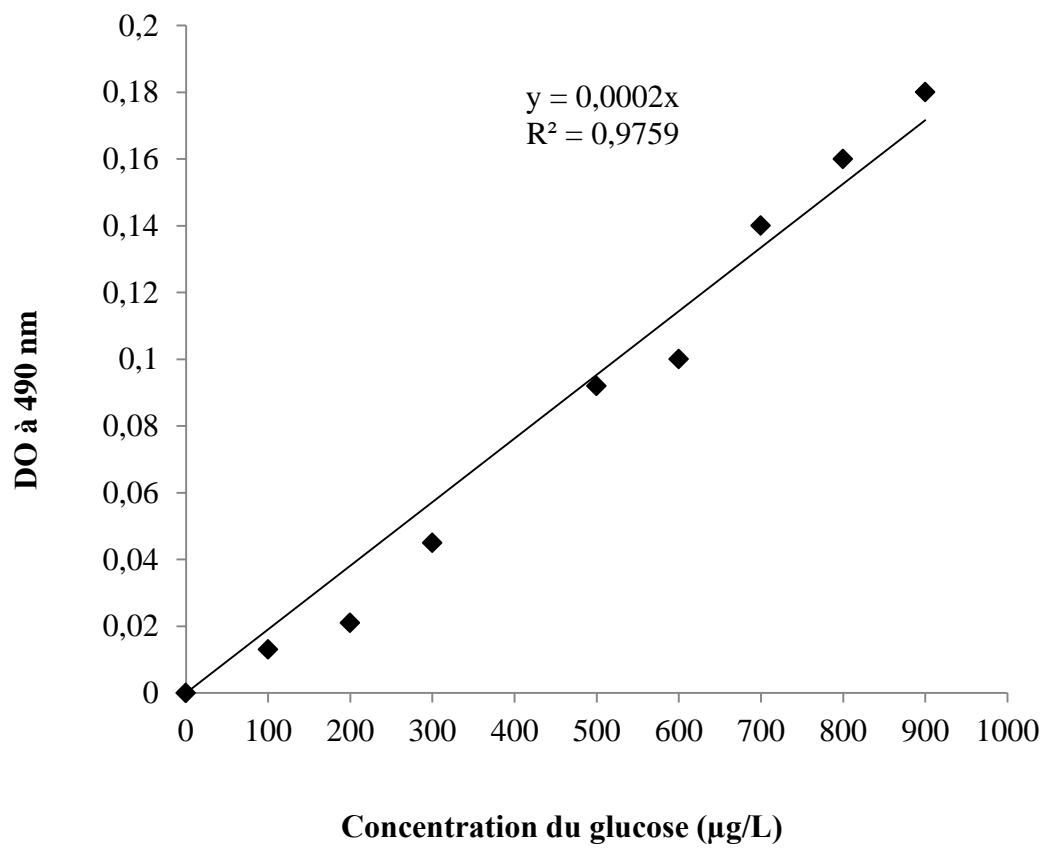
- Xu R, Ma S, Wang Y, Liu L and Li P. (2010). Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research*4 (9): 783-795.
- Yuksekdag ZN and Aslim B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian archives of Biology and Technology*51 (3): 581-585.
- Zajšek K, Goršek A and Kolar M. (2013). Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*139 (1): 970-977.
- Zannini E, Waters DM, Coffey A and Arendt EK. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*100 (3): 1121-1135.

Annexe I: compositions de milieux de culture**MRS (Man, Rogosa et Sharpe)**

Peptone.....	10.0 g/l
Extrait de viande.....	10.0g/l
Extrait de levure.....	5.0g/l
Glucose.....	20g/l
Citrate de tri-ammonium.....	2.0g/l
Acétate de sodium.....	5.0g/l
Sulfate de magnésium.....	0.2g/l
Sulfate de manganèse.....	0.05g/l
Phosphate di-potassique.....	2.0g/l
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	6.2 ±0.2

Annexe II : la courbe d'étalonnage et les tableaux

La courbe d'étalonnage de glucose A490 = f ([glucose])



Annexe III : Les tableaux des résultats

Tableau 01 Les principaux exopolysaccharides produits par les microorganismes procaryotes (Donot et al., 2012)

Microorganisms	Exopolysaccharides	Microbial strains	Substrates	EPS concentrations (g L ⁻¹)	Growing conditions	
Bacteria	Cellulose	<i>Acetobacter xylinum</i>	Fructose/glucose	7–23.6	pH= 4–5; 30 °C; 40 h	
		<i>Acinetobacter sp.</i>	Ethanol/diesel	4.7	pH= 7; 30 °C; 1 bar	
	Alginate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Xylose	0.4	30–37 °C; 1 bar; 72 h ^a	
		<i>Azobacter sp.</i>	Glucose/fructose	1.1–7.5	pH= 7; 35 °C; 1 bar; 72 h	
	Dextran and derivatives Curdlan	<i>Leucomostoc sp.</i>	Sucrose	8.17	pH= 5.5; 35 °C; 1 bar	
		<i>Agrobactérium</i>	Glucose/sucrose	5.02–76	pH= 7.5; 30 °C; 5 d ^b	
	Gellan	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glucose	30–72	pH= 7; 30 °C; 120 h	
		<i>Shingomonas</i>	Starch	13.2–35.7	pH= 7–7.5; 30–32 °C	
	Hyaluronic acid	<i>Streptococcus sp.</i>	Glucose	5.0–10.0	pH= 7; 37 °C	
	Xanthan	<i>Xanthomonas campestris</i>	Molasse	53	pH= 7; 28 °C; 1 bar; 24 h	
	Levan	<i>Erwinia sp.</i>	Sucrose	15	pH= 5.6–5.8; 37 °C; 1 bar; 3 d	
		<i>Bacillus spp.</i>	Glucose/sucrose	0.32–86.3		
			<i>Zymonas mobilis</i>	Sucrose	22–50	30 °C; 120 h
	Other EPS		<i>Enterobacter sp.</i>	Glycerol/glucose	6–18	pH= 7; 30 °C, 4 d
			<i>Edwardsiella tarda</i>		0.2	28 °C; 3–7 h
		<i>Vibrio diabolicus sp. nov.</i>	Glucose	2.5	pH= 7–8; 30–45 °C; 48 h	
		<i>Geobacillus sp.</i>	Sucrose/maltose	0.114	pH= 6.8–9.8; 54–87 °C	
		<i>Halomonas sp.</i>	Sucrose/glucose	1.6–4.5	pH= 7; 32–37 °C	
		<i>Nigrospora oryzae var. glucanicum</i>	Sodium acetate	4.5 and 5.3		
(Cyanobacteria)			<i>Synechocystis sp.</i>	CO ₂	0.35–0.55	pH= 6.8; 25 °C; 20 d

Tableau 02: Quantité d'EPS (mg/l) produits par les souches *Lb. plantarum* (S10, BCX1) à différentes températures.

Souche Température	Moyenne ± écart type	
	S10	BCX1
25°C	16.45 ± 0,21	16.78 ± 0,34
30°C	16.64 ± 0,48	16.64 ± 0,19
37°C	16.29 ± 0,21	16.56 ± 0,29

Tableau 03: Quantité d'EPS (mg/l) produits par les souches *Lb. plantarum* (S10, BCX1) à différent pH

Souche pH	Moyenne ± écart type	
	S10	BCX1
pH 3	16.61 ± 0,16	16.67 ± 0,20
pH 4	16.29 ± 0,18	16.37 ± 0,16
pH 5	16.12 ± 0,14	16.60 ± 0,05
pH 6.2	16.31 ± 0,03	16.51 ± 0,13
pH 8	16.19 ± 0,12	16.32 ± 0,27

Tableau 04 :Quantité d'EPS (mg/l) produits par *Lb. Plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration de peptone.

Souche Peptone	Moyenne ± écart type	
	S10	BCX1
1%	16.14 ± 0,11	15.66 ± 0,01
2,5%	16.17 ± 0,10	15.64 ± 0,12
5%	16.21 ± 0,21	15.95 ± 0,04
7,5%	16.32 ± 0,10	16.24 ± 0,06
10%	16.15 ± 0,05	16.37 ± 0,10

Tableau 05 : Quantité d'EPS (mg/l) produits par *Lb. Plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration d'extrait de levure à pH 6.2

Souche E. de Levure	Moyenne ± écart type	
	BCX1	S10
0.5%	16,44 ± 0,05	15,60 ± 0,14
2.5%	16,50 ± 0,17	16,69 ± 0,13
5%	17,27 ± 0,007	17,40 ± 0,18
7.5%	17,58 ± 0,17	16,63 ± 0,07
10%	17,85 ± 0,07	

Tableau 06 :Quantité d'EPS (mg/l) produits par *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration d'extrait de viande à pH 6.2

Souche E. de Viande	Moyenne ± Ecart type	
	BCX1	S10
1%	15,67 ± 0,25	15,59 ± 0,12
2.5%	15,81 ± 0,17	15,80 ± 0,32
5%	16,42 ± 0,72	16,03 ± 0,57
7.5%	16,88 ± 0,28	15,31 ± 0,19
10%	16,88 ± 0,19	

Tableau 07 : Quantité d'EPS (mg/l) produits par *Lb. Plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration de glucose à pH 6.2

Souche Glucose	Moyenne ± Ecart type	
	S10	BCX1
2 %	13,25 ± 2.90	14,24 ± 1.26
3 %	13,47 ± 0.77	16,66 ± 0.05
4 %	16,16 ± 0.37	16,07 ± 0.22
5 %	16,18 ± 0.24	15,47 ± 0.33

Tableau 08 :Quantité d'EPS (mg/l) produits par *Lb. plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration de saccharose à pH 6.2

Souche Saccharose	Moyenne ± Ecart type	
	S10	BCX1
2%	13.77 ± 2.50	12.45 ± 2.50
3%	16.29 ± 0.21	16.66 ± 0.35
4%	16.93 ± 0.06	16.98 ± 0.04
5%	17.14 ± 0.09	16.87 ± 0.12

Tableau 09 :Quantité d'EPS (mg/l) produits par *Lb. Plantarum* (S10 et BCX1) à différentes concentration de glucose et saccharose à pH6.2

Souche Glucose et Saccharose	Moyenne \pm Ecart type	
	BCX1	S10
Glucose 2% Saccharose 2%	16,32 \pm 0.53	16,90 \pm 0.49
Glucose 2% Saccharose 3%	16,39 \pm 0.92	17,32 \pm 0.30
Glucose 2% Saccharose 4%	17,25 \pm 0.29	17,12 \pm 0.64
Glucose 2% Saccharose 5%	17,04 \pm 0.47	16,88 \pm 0.38

Jury :**Présidente:** D^r AIT MEDDOUR A.**Examineur:** D^r BOUBZARI MT.**Encadreur:** M^r KHENNOUF T.**Présenté par :**

KRID Amel

REKIMA Rania

LEFOUILI Zeyneb

Thème :**Optimisation de la production des exopolysaccharides par des souches de *Lactobacillus sp*****Résumé**

Les bactéries lactiques sont des productrices d'une grande variété d'EPS qui ont reçu une attention particulière en tant que composés précieux, en raison de leurs applications potentielles et leurs effets bénéfiques pour la santé. Notre travail a pour objectif d'effectuer une étude sur l'influence des milieux de cultures (source d'azote et source de carbone) ainsi les conditions de culture (pH et température) sur la production des exopolysaccharides par deux souches de *Lactobacillus plantarum* (S10 et BCX1) isolées du rumen et du lait de la chèvre. Il a été démontré que la production des EPS par la souche S10 donne un meilleur rendement à (T°=30 °C, pH 3, MRS modifié à 2% de glucose et 3% de saccharose: 17,32 mg/l, 5% d'extrait de levure: 17,40 mg/l). Alors que, la souche BCX1 donne une meilleure production à T°=25°C, pH 3, MRS modifié à 2% de glucose et 4% de saccharose: 17,25 mg/l, 10% d'extrait de levure: 17,85 mg/l).

Mots clés : bactéries lactiques, exopolysaccharide, *Lactobacillus plantarum*.

Abstract

Lactic acid bacteria are producers of a wide variety of EPS that have taken a special attention as valuable compounds, due to their potential applications and their beneficial effect on health. Our work aims to carry out a study on the influence of culture media (nitrogen source, carbon source) and culture conditions (pH and temperature) on the production of exopolysaccharides by two strains of *Lactobacillus plantarum* (S10 and BCX1) isolated from the rumen and goat's milk. It has been shown that the production of EPS by the strain S10 gives the best yield at (T ° = 30°C, pH 3, modified MRS at 2% glucose and 3% sucrose: 17.32 mg / l, 5% yeast extract: 17, 40 mg / l). While, strain BCX1 gives a better production at T ° = 25 ° C, pH 3, modified MRS at 2% of glucose and 4% of sucrose: 17.25 mg / l, 10% of yeast extract: 17.85 mg / l).

Keywords: Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, *Lactobacillus plantarum*.

ملخص

البكتيريا اللبنية من اهم الكائنات الدقيقة المنتجة لمجموعة واسعة من السكريات الخارجية التي حظيت باهتمام خاص كمركونات ذات قيمة ، بسبب تطبيقاتها المحتملة وتأثيرها المفيد على الصحة. يهدف عملنا إلى دراسة تأثير مكونات الوسائط الغذائية (مصدر النيتروجين، مصدر الكربون) وظروف الزراعة و الحضان (درجة الحموضة ودرجة الحرارة) على إنتاج السكريات الخارجية عن طريق سلالتين من (S10) *Lactobacillus plantarum* (BCX1) معزولة من الكرش و حليب الماعز. النتائج أثبتت ان سلالة S10 اعطت أفضل عائد عند درجة حرارة 30 درجة مئوية ، درجة الحموضة 3 ، و كذا عند نسبة 2 % الجلوكوز و 3 % سكروز: 17.32 ملغم / لتر ، 5% مستخلص الخميرة: 17.40 ملغم / لتر، بينما اعطت السلالة BCX1 إنتاجاً أفضل عند درجة حرارة 25 درجة مئوية ، درجة الحموضة 3 , 2% من الجلوكوز و 4% من سكروز: 17.25 ملغم / لتر، 10% من مستخلص الخميرة: 17,85 ملغم / ل.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللين، السكريات الخارجية، *Lactobacillus plantarum*