

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderahmane Mira Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

Présenté par : M^{elle} **BENMEDDOUR Zahia**

En vue de l'obtention du diplôme de Magister
en Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude de l'effet de la température sur la production de
polysaccharides par des bactéries lactiques
thermophiles.**

Soutenu le / / 2007

Devant le jury :

Président :	M ^f BENALLAOUA S.	Professeur (UAMB)
Rapporteur :	M ^{elle} LOUAILECHE H.	Professeur (UAMB)
Examineurs :	M ^{me} ZAIDI R.	Maître de conférences (UAMB)
	M ^r ATMANI D.	Maître de conférences (UAMB)
Invitée :	M ^{me} FARADJI S.	M.A.C.C. (UAMB)

Année universitaire : 2006/2007

Remerciements

*Mes remerciements s'adressent en premier à Madame le Professeur **H. LOUAILECH.**, directrice de ce mémoire, pour avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir encouragé et suivi dans mon travail, ainsi que pour la qualité de son encadrement, sa constante disponibilité, ses conseils, sa gentillesse et ses compétences scientifiques qui m'ont permis d'élargir mes connaissances. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et mon respect.*

Je remercie Monsieur le Professeur **S. BENALLAOUA**, mon enseignant de post-graduation et responsable de la post-graduation Microbiologie Appliquée pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame le Docteur **R. ZAIDI** et à Monsieur le Docteur **D. ATMANI**, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce mémoire.*

*Je tiens aussi à remercier Madame **S. FARADJI** qui a accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.*

Mes remerciements vont également à mes collègues du laboratoire de biochimie alimentaire.

Je remercie tous mes enseignants de graduation et de post-graduation pour le savoir qu'ils m'ont transmis.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de mon cher père que la clémence de Dieu soit sur lui.

A la plus merveilleuse mère, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour ses sacrifices et son soutien.

A ma grande sœur Nassima.

A mes sœurs et mes frères.

A toutes les personnes qui me sont chères...

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques 3

1. Définition 3

2. Caractères généraux de *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* et
Streptococcus thermophilus 3

 2.1. *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* 3

 2.2. *Streptococcus thermophilus* 4

3. Métabolisme des glucides 4

II. Activité métabolique d'intérêt technologique 6

1. Activité acidifiante et antimicrobienne 6

2. Activité protéolytique 6

3. Activité aromatisante 7

4. Propriété texturante 7

III. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques 7

1. Composition et structure 8

2. Biosynthèse 9

 2.1. Les homopolysaccharides 11

 2.2. Les hétéropolysaccharides 11

3. Importance des exopolysaccharides 14

3.1. Importance technologique 14

3.2. Importance physiologique.....	15
4. Facteurs influençant la production des exopolysaccharides	16
4.1. Les conditions de culture	16
4.1.1. La température	16
4.1.2. Le pH	17
4.2. La composition du milieu	17
4.2.1. Les sources de carbone et d'azote.....	17
4.2.2. Minéraux et vitamines	18
5. Instabilité du caractère	18
5.1. Les enzymes.....	18
5.2. Les plasmides.....	19

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes	20
1. Isolement et purification des bactéries lactiques thermophiles	20
1.1. Isolement.....	20
1.2. Purification	20
2. Identification.....	23
3. Cinétique de croissance	24
4. Cinétique d'acidification.....	26
4.1. Mesure du pH.....	26
4.2. Détermination de l'acidité	26
5. Production des exopolysaccharides	26
5.1. Extraction des exopolysaccharides	26
5.2. Dosage des exopolysaccharide	28
6. Détermination du pouvoir texturant.....	28
7. Etude statistique	30

II. Résultats et discussion	31
1. Identification des souches de streptocoque et lactobacilles isolées	31
2. Cinétique de croissance.....	32
3. Activité acidifiante	38
3.1. Evolution du pH	38
3.2. Evolution de l'acidité Dornic	40
4. Effet de la température sur la production des exopolysaccharides	42
4.1. Cultures pures	42
4.2. Cultures mixtes	49
5. Cinétique de production des exopolysaccharides	52
6. Effet de la température sur le pouvoir texturant	53
6.1. Cultures pures	53
6.2. Cultures mixtes	60
Conclusion	63
Références bibliographiques	65

Annexes

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Transport et catabolisme du glucose par les bactéries lactiques (De Roissart, 1986).	5
2	Structure des unités répétitives de quelques hétéropolysaccharides produits par <i>S. thermophilus</i> .	10
3	Voies métabolique impliqué dans la catabolisme du lactose/galactose et la biosynthèse des EPS (Welman et Maddox, 2003).	12
4	Observation au microscope électronique illustrant les EPS produits par <i>Lb. delbuekii ssp bulgaricus</i> dans le yaourt (Tamime et Robinson, 2000).	14
5	Isolement et purification des souches de streptocoques à partir du lait de vache ou de brebis (Devauchelle, 1981).	21
6	Isolement et purification des souches de streptocoques et de lactobacilles à partir du yaourt (Devauchelle, 1981).	22
7	Paramètres technologiques analyser.	25
8	Extraction et dosage des exopolysaccharides.	27
9	Courbes d'étlonnage des exopolysaccharides.	28
10	Viscosimètre à chute de bille.	29
11	Cinétique de croissance des souches de <i>S. thermophilus</i> isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et des souches de <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i> isolées du yaourt (d).	36

12	Evolution du pH lait fermenté par les souches de <i>S. thermophilus</i> isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et des souches de <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> isolées du yaourt (d).	39
13	Evolution de l'acidité titrable du laitensemencé par les souches de <i>S. thermophilus</i> isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et des souches de <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> isolées du yaourt (d).	41
14	Production d'exopolysaccharides par <i>S. thermophilus</i> isolé du lait de vache.	43
15	Production d'exopolysaccharides par <i>S. thermophilus</i> isolé du lait de brebis.	44
16	Production d'exopolysaccharides par <i>S. thermophilus</i> isolé du yaourt	45
17	Production d'exopolysaccharides par <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> .	47
18	Effet de la température sur la production des exopolysaccharides par les souches de <i>S. thermophilus</i> isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et les souches de <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> (d).	48
19	Production d'exopolysaccharides en cultures mixtes.	50
20	Effet de la température sur la production des exopolysaccharides en cultures mixtes.	51

21	Croissance et production des exopolysaccharides des souches SY1 et SY2.	52
22	Corrélation entre la production d'EPS et la croissance des souches SY1 et SY4.	54
23	Viscosité développée par <i>S. thermophilus</i> isolé du lait de vache.	55
24	Viscosité développée <i>S. thermophilus</i> isolé du lait de brebis.	56
25	Viscosité développée par <i>S. thermophilus</i> isolé du yaourt.	57
26	Viscosité développée par <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> isolé du yaourt.	59
27	Viscosité développée par les cultures mixtes.	61
28	Corrélation entre la viscosité développée, la production d'EPS et l'acidité élaborée par les souches SY4 et SY4.	62

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Identification des Streptocoques et des Lactobacilles.	24
II	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de souches des Streptocoques et des Lactobacilles isolées.	31
III	Identification des souches de Streptocoques.	33
IV	Profil fermentaire des souches de Streptocoques.	34
V	Identification des souches de Lactobacilles isolées du yaourt.	35

Introduction

Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans la fabrication de nombreux produits alimentaires. Ces bactéries possèdent une large gamme d'activités et de propriétés métaboliques, exploitées en industries agro-alimentaires et plus particulièrement dans l'industrie laitière. Elles sont utilisées pour leurs propriétés acidifiante, protéolytique et texturante qui confèrent aux produits laitiers fermentés leurs caractéristiques organoleptiques, rhéologiques et de conservation.

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polysaccharides. La présence de ces souches dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour l'industrie laitière. En effet, les polymères secrétés lors de la fermentation permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini tout en diminuant la synérèse. Ainsi, la présence des bactéries lactiques mucoides (productrices d'EPS) dans les produits fermentés permet de limiter l'addition de substances texturantes et stabilisantes d'origine végétale (alginates) ou microbienne (xanthanes) (Duboc et Mollet, 2001).

L'industrie des produits laitiers fermentés améliore la texture de ces produits, en faisant varier un ou plusieurs facteurs dont le traitement thermique du mélange avant la fermentation, la modification de la composition des ferments et des conditions de fermentation et l'addition de substances stabilisantes (substances gélifiantes ou épaississantes) dont l'utilisation est de plus en plus réglementée et même interdite dans certains pays. Les consommateurs recherchent des produits « naturels » ou « biologiques » sans additif (Jolly *et al.*, 2002).

L'industrie doit trouver d'autres options afin d'offrir aux consommateurs des produits de qualité.

Depuis quelques années, une attention croissante est portée sur les polysaccharides des bactéries lactiques. Certains exopolysaccharides synthétisés par ces bactéries sont doués de propriétés biologiques intéressantes pour la santé de l'homme. Ces polymères présentent des activités hypocholestérolémiante, antitumorale, immuno-modulatrices, ... (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

La production des exopolysaccharides par les bactéries lactiques est influencée par plusieurs facteurs, notamment les conditions de culture (pH, température, durée d'incubation) et la composition du milieu (sources de carbone et d'azote) (Zisu et Shah., 2003).

Le travail expérimental réalisé au cours de cette étude comprend deux parties :

- La première concerne l'isolement et l'identification de souches de bactéries lactiques thermophiles (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*) à partir des laits de vache et de brebis, et du yaourt.

- La seconde est consacrée à la caractérisation des souches isolées, sur la base de la production des exopolysaccharides et de la viscosité développée dans le lait à 35, 40, 42 et 45°C.

I. Les bactéries lactiques

1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Ce sont des bacilles ou des coques à Gram positif, catalase négative, généralement immobiles, asporulés et dépourvus de cytochrome. Elles sont anaérobies mais parfois aérotoles (Dellaglio *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très exigeants du point de vue nutritionnel ; elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les cations (Loubière *et al.*, 1996).

Le groupe de bactéries lactiques réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique comme métabolite principal (Novel, 1993).

2. Caractères généraux de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*

Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus et *Streptococcus thermophilus* sont deux bactéries lactiques thermophiles largement utilisées en technologie laitière, d'une part en fabrication fromagère, d'autre part et surtout pour la production des laits fermentés, en particulier les yaourts.

2.1. *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus appartient au genre *Lactobacillus* et fait partie du sous-genre *Thermobacterium* (lactobacilles homofermentaires stricts). C'est un bacille regroupé en diplobacilles ou en longues chaînes, de petites formes bacillaires dans les jeunes cultures et de longs filaments dans les cultures âgées (Terré, 1986).

Cette espèce métabolise un nombre limité de glucides ; elle est incapable de fermenter le galactose, les pentoses et le saccharose. Elle se développe à 45°C, mais pas à 10°C, avec une production uniquement de l'isomère D(-) de l'acide lactique ; son

peptidoglycane est de type Lys-Asp, le GC% varie de 49 à 51% (Dellaglio, 1989 ; Steele, 1997).

2.2. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus représente la seule espèce à intérêts industriels et nutritionnels du genre *Streptococcus*.

Streptococcus thermophilus se présente sous forme de cellules sphériques ou ovoïdes (0,7 à 0,9 nm de diamètre) regroupées en paires ou en longues chaînes de longueur variable, dans le cas des cultures en pleine croissance. Par contre, les cellules âgées présentent un polymorphisme accentué (ramifications). Elle possède un peptidoglycane du type L.Lys-Ala et le GC% varie de 37 à 40% (Terré, 1986).

Cette bactérie se caractérise par l'absence de tout antigène de groupe, par sa température de croissance minimale de 19-21°C et optimale de 42-43°C, par sa résistance à un chauffage à 60°C pendant 30 minutes et son aptitude à croître à 50°C (Bautista *et al.*, 1966).

Streptococcus thermophilus présente un caractère homofermentaire, avec un spectre de fermentation restreint, mais plus large que celui de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus*. Cette espèce dégrade préférentiellement le lactose et le saccharose mais fermente aussi le glucose et le fructose en produisant de l'acide lactique L (+). La croissance de cette espèce est inhibée par de fortes concentrations en lactate (Terré, 1986).

3. Métabolisme des glucides

Les glucides métabolisés par les bactéries lactiques sont fermentés en acide lactique (figure 1). Au cours de la fermentation homolactique, la voie empruntée est celle de Embden.-Meyerhof-Parnas (E.M.P) qui produit principalement de l'acide lactique (90-95%) (Rhee et Pack, 1980). Cependant, la voie empruntée par la fermentation hétérolactique est celle des pentoses-phosphocetolase, mais aussi celle du tagatose-6-phosphate et de la glycolyse. Elle aboutit à la formation des quantités équimolaires d'acide acétique, de dioxyde de carbone, et éventuellement d'éthanol (Novel, 1993).

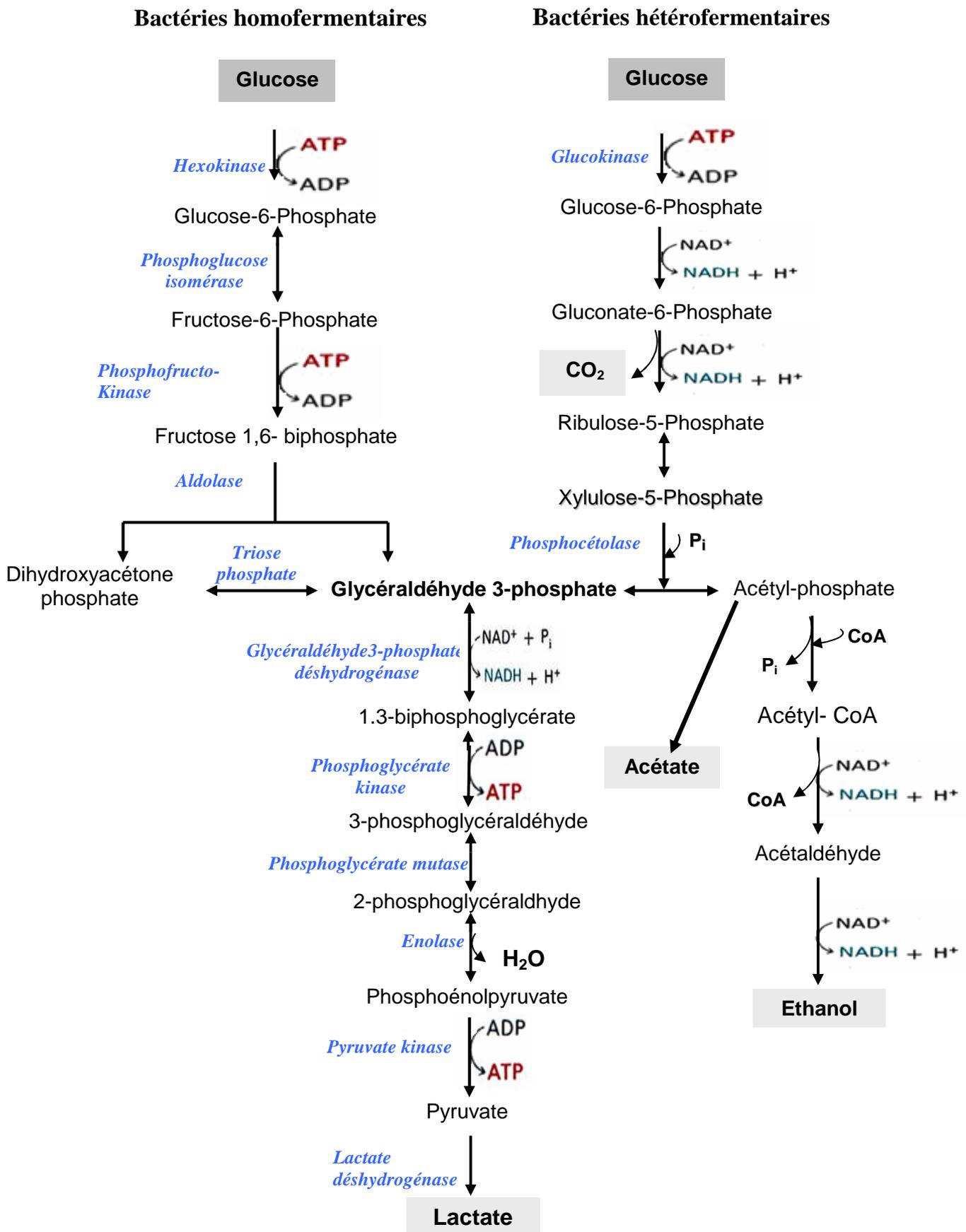


Figure 1 : Transport et catabolisme du glucose par les bactéries lactiques (De Roissart, 1986).

Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans la production de nombreux produits alimentaires, notamment les fromages, les laits fermentés, les vins et produits végétaux fermentés. Ces bactéries possèdent des propriétés telles que l'acidification, la protéolyse et la production de polysaccharides qui sont utilisées dans les industries alimentaires.

Les bactéries lactiques grâce à leurs enzymes sont capables de produire de nombreux composés organiques qui sont impliqués dans les propriétés physico-chimiques, nutritives et organoleptiques des produits laitiers fermentés.

1. Activités acidifiante et antimicrobienne

Le principal rôle des bactéries lactiques est la production de l'acide lactique par fermentation du lactose aboutissant à l'abaissement du pH du lait ; à la suite du déséquilibre ionique résultant de cette transformation, survient un déplacement des phosphates et du calcium, des micelles de caséines vers la phase aqueuse du lait. Les micelles se trouvent déstabilisées par ce déficit en ions et s'associent en polymères stables (Shaker *et al.*, 2002).

L'acide lactique joue un rôle non négligeable dans l'inhibition de la croissance de plusieurs types de bactéries nuisibles à la technologie (*Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae*), qui contaminent les produits alimentaires et de bactéries pathogènes comme *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* (Desmazeaud, 1996 ; Ayad *et al.*, 2001).

2. Activité protéolytique

Le système protéolytique des bactéries lactiques joue un rôle important dans l'industrie laitière, car il participe à la modification de la texture et au développement de la flaveur typique des fromages durant l'affinage (Bouton *et al.*, 1993 ; Fira *et al.*, 2001).

La protéolyse libère des acides aminés précurseurs de nombreux produits d'arôme. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques, la phenylalanine et la tyrosine à des composés volatils à noyau aromatique,... (Rajagopal et Sandine, 1990).

Les enzymes protéolytiques des bactéries lactiques génèrent également des fragments peptidiques biologiquement actifs par hydrolyse des protéine du lait ; ces peptides exercent un large spectre d'effets: anti-hypertensif (inhibition de l'angiotensine), hypocholestérolémiant, immuno-modulateur, antimicrobien,... (Gerdes *et al.*, 2001 ; LeBlanc *et al.*, 2002).

3. Activité aromatisante

La fermentation lactique conduit non seulement à la production d'acide lactique, mais aussi à la formation de quantités plus ou moins importantes de produits secondaires (l'acétaldéhyde, l'acétoine, l'acétone et le diacétyle), dont certains participent largement au développement des caractéristiques organoleptiques des aliments fermentés (Accolas *et al.*, 1980 ; Zourari et Desmazeaud, 1991). Le diacétyle et l'acétoine proviennent essentiellement du métabolisme du citrate.

L'acétaldéhyde est le composé aromatique caractéristique de la flaveur du yaourt ; il est principalement produit par *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*, à partir de la thréonine, par l'intervention de la thréonine aldolase (Gardini *et al.*, 1999).

4. Propriété texturante

L'action simultanée de la production de polysaccharides par les bactéries lactiques et la précipitation des caséines par l'acidification, confère au coagulum des propriétés rhéologiques particulières, différentes de celles d'un caillé obtenu par acidification (Chamba *et al.*, 1989 ; Beal *et al.*, 1999).

Certaines bactéries lactiques synthétisent des exopolysaccharides qui jouent un rôle majeur dans la technologie des produits laitiers fermentés, en particulier les yaourts liquides et les fromages. Ces polymères améliorent la texture, l'onctuosité et la stabilité du produit fini (Zourari *et al.*, 1992 ; Zeynep *et al.*, 2005).

III. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques, comme d'autres micro-organismes synthétisent des polysaccharides qui peuvent être classés en trois groupes, selon leur localisation dans la cellule:

- Le premier groupe rassemble les polysaccharides du cytosol ; ils servent de source de carbone et d'énergie à la cellule : représentés essentiellement par le glycogène bactérien.
- Le second groupe concerne les constituants de la paroi tels que les acides téichoïques et les peptidoglycanes.
- Le troisième groupe réunit les polysaccharides élaborés par la cellule et secrétés dans le milieu (exopolysaccharides ou EPS) (De Roissart, 1986).

Il existe deux types d'exopolysaccharides : les polymères rattachés (intiment liés) à la surface cellulaire sous forme de capsule dénommés polysaccharides capsulaires (CPS) ou « slime » dans la littérature anglo-saxonne et les polymères relargués (excrétés) dans le milieu extracellulaire sous forme de sécrétions mucoides (Tallon *et al.*, 2003). La distinction entre les deux types de polymères est difficile (Cerning *et al.*, 1995).

Lorsque les sites de fixation des EPS sont saturés, le surplus serait relâché dans le milieu sous forme de sécrétions mucoides (Weiner *et al.*, 1995).

1. Composition et structure

Il est important de connaître la composition et la structure tridimensionnelle des exopolysaccharides synthétisés par les bactéries lactiques pour comprendre leurs propriétés physico-chimiques.

Les différences de composition chimique et de structure des polymères reflètent la complexité de la synthèse des polysaccharides exocellulaires. Plusieurs facteurs tels que la source de carbone et la présence d'enzymes capables d'hydrolyser les polysaccharides ont une influence considérable sur le poids moléculaire et la structure de ces polymères (Robijn *et al.*, 1996 ; Frengova *et al.*, 2000).

Les exopolysaccharides sont constitués de nombreuses sous-unités qui sont, soit des sucres simples, soit leurs dérivés. Ils peuvent former des chaînes linéaires, ramifiées ou non.

Les bactéries lactiques synthétisent deux types de polysaccharides, les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides.

Les homopolysaccharides sont constitués d'un seul type d'ose ; leurs propriétés varient considérablement selon leur structure. La cellulose et le dextrane, par exemple, montrent des comportements différents concernant leur pouvoir épaississant, bien que seul le D-glucose compose leur chaîne.

Les hétéropolysaccharides sont constitués de plusieurs types d'oses et forment un groupe très hétérogène de polysaccharides élaborés par des bactéries lactiques (De Vuyst *et al.*, 1998). Ces polymères sont constitués de D-glucose, de D-galactose, de rhamnose, de mannose, du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), du *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) et de l'acide glucuronique (GlcA), en plus des substituants non glucidiques tels que le phosphate, l'acétyl, le glycérol,... (Vaningelgem *et al.*, 2004 ; Girard et Schaffer-Lequart, 2007). La figure 2 illustre la structure de quelques hétéropolysaccharides produits par *S. thermophilus*.

Le galactose est majoritaire, probablement parce qu'il n'est pas métabolisé comme le glucose et serait donc disponible pour la synthèse des polymères. Par exemple, certaines souches de *S. thermophilus* ne métabolisent pas le galactose libéré par hydrolyse du lactose. Le galactose relâché dans le milieu serait alors utilisé dans la synthèse des exopolysaccharides par cette espèce (Levander et Radstrom, 2001 ; Svensson *et al.*, 2005).

2. Biosynthèse

Les polysaccharides exocellulaires sont synthétisés au cours des différentes phases de croissance et sous diverses conditions qui dépendent de la souche bactérienne. Certains sont sécrétés pendant la phase exponentielle (Cerning, 1995), alors que d'autres sont produits durant la phase stationnaire (Bouzar *et al.*, 1996 ; Gamar *et al.*, 1997).

Le site de synthèse des EPS et la nature des précurseurs permettent de distinguer deux types de biosynthèse chez les bactéries lactiques : une synthèse extracellulaire produisant des homopolysaccharides et une synthèse intracellulaire (membrane) produisant des hétéropolysaccharides.

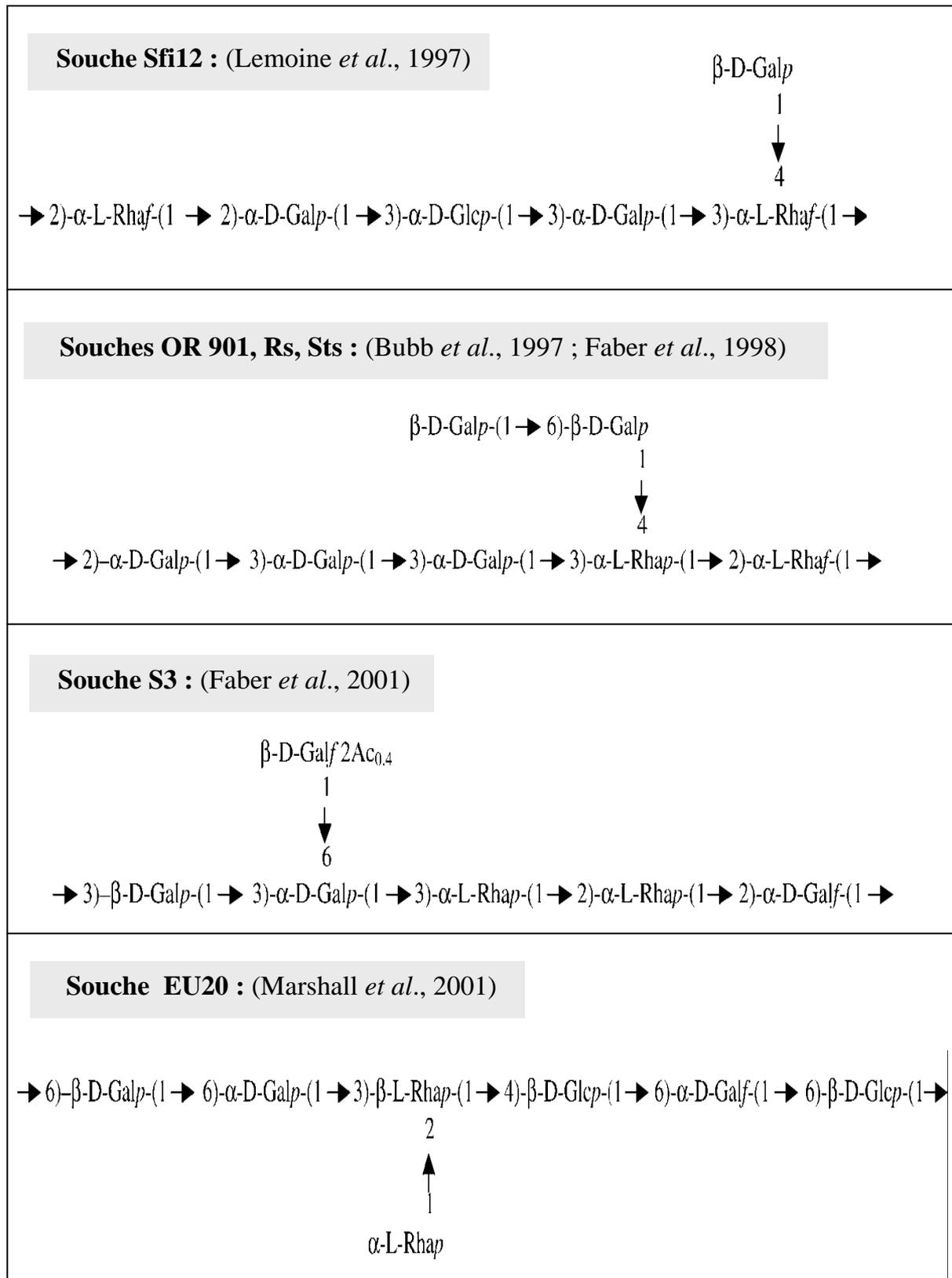


Figure 2: Structure des unités répétitives de quelques hétéropolysaccharides produits par *S. thermophilus*

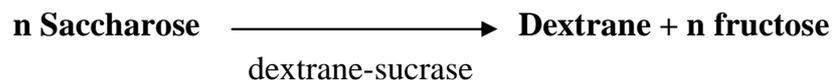
Gal : galactose ; GalNAc, :N-acetyl-D-galactosamine ; Glc : glucose ; Rha : rhamnose ; Ac : groupe *O*-acétyl ; *p* : forme pyranose et *f* : forme furanose.

Les homopolysaccharides sont principalement synthétisés par trois espèces : *Leuconostoc mesenteroides* (dextrane), *Streptococcus mutans* (mutanes) et *Streptococcus salivarius* (levanes). Les hétéropolysaccharides, par contre, sont produits par les bactéries lactiques mésophiles (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus casei*) et thermophiles (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus*) (Broadbent *et al.*, 2003).

Les voies métaboliques impliquées dans la synthèse des hétéropolysaccharides sont plus complexes que celle impliquées dans la synthèse des homopolysaccharides.

2.1. Les homopolysaccharides

La biosynthèse de ces polymères fait intervenir des enzymes sécrétées par la bactérie. Par exemple, *Ln. mesenteroides* produit le dextrane composé exclusivement de glucose à partir d'un seul substrat spécifique, le saccharose. Cette production nécessite une seule enzyme, la dextrane-sucrase qui est spécifique du saccharose ; elle catalyse le transfert d'un groupement glucosyle d'un donneur (saccharose) sur un accepteur approprié (la chaîne de dextrane en élongation) (Whitfield, 1988). Ce mécanisme correspond donc à une élongation du polymère de glucose avec libération du fructose.



2.2. Les hétéropolysaccharides

La synthèse des hétéropolysaccharides implique plusieurs enzymes. Les glucides précurseurs ou glucides activés ou glyconucléotides sont synthétisés dans le cytoplasme (Degeest *et al.*, 2001). Une molécule de glucose est d'abord phosphorylée, puis un nucléotide diphosphate y est ajouté. Cet ose précurseur (UDP-glucose) peut être incorporé directement dans l'unité répétitive (oligosaccharide) comme il peut également être transformé en un autre ose précurseur dérivé (UDP-galactose) (figure 3).

Le premier glyconucléotide est d'abord transféré à un transporteur lipidique, situé au niveau de la membrane cytoplasmique, par une enzyme la glycosyl-

transférase ancrée dans la membrane cytoplasmique. Cette enzyme reconnaît le transporteur lipidique et y transfère le premier sucre d'une unité répétitive (Jolly *et al.*, 2002).

Les transporteurs lipidiques membranaires sont des esters phosphates et des alcools isoprénoides à longue chaîne impliqués non seulement dans la synthèse des EPS, mais aussi dans la synthèse des lipopolysaccharides (LPS), du peptidoglycane et des acides téichoïques. Les intermédiaires lipidiques pourraient faciliter la formation précise et ordonnée des unités répétitives et les transporter à travers la membrane cytoplasmique (Broadbent *et al.*, 2003 ; Welman et Maddox, 2003).

Les monosaccharides activés se polymérisent au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique ou alors l'unité répétitive est transportée à travers la membrane avant la polymérisation (De Vuyst *et al.*, 2001).

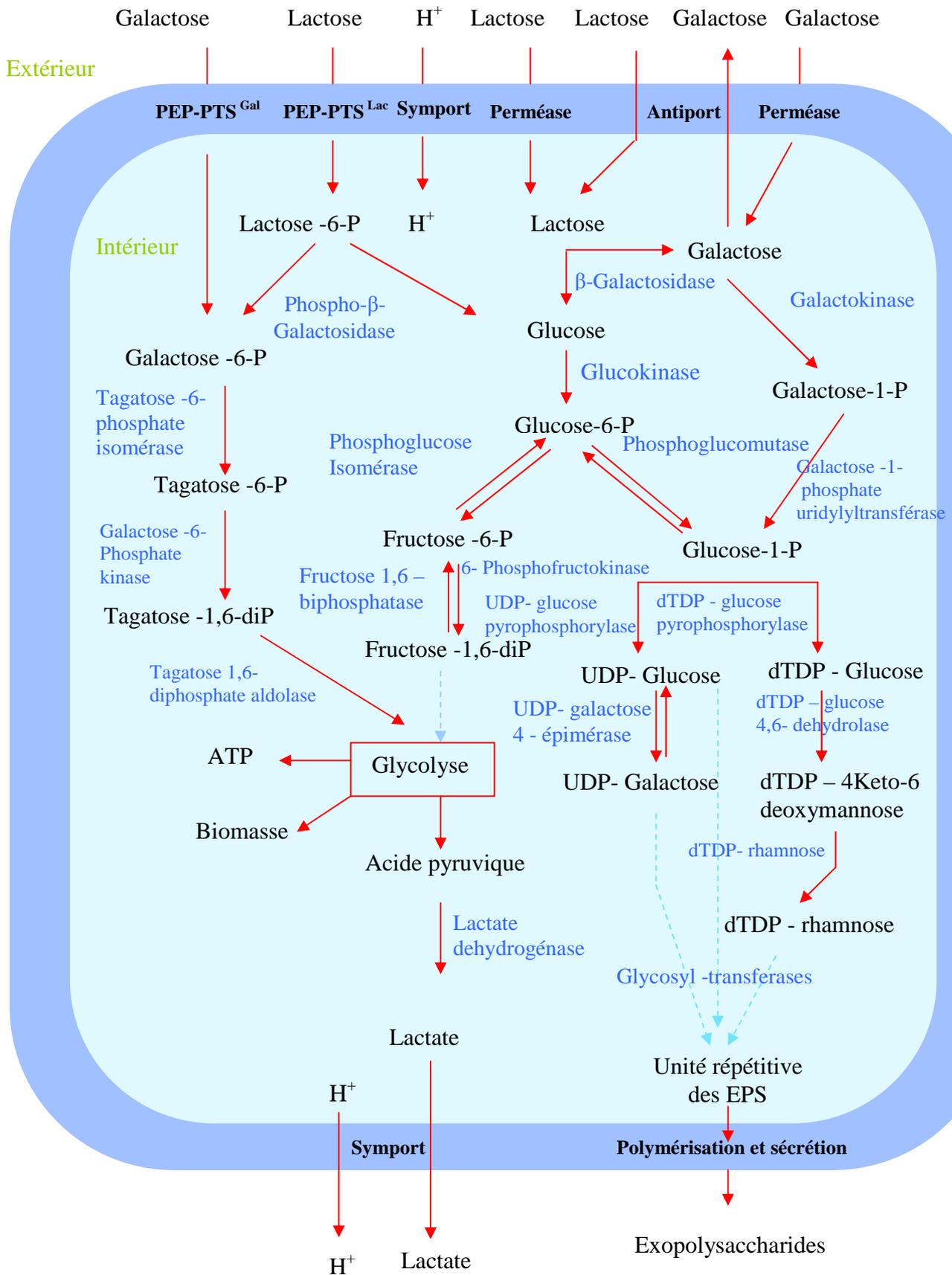


Figure 3 : Voies métaboliques impliquées dans le catabolisme du lactose/galactose et la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques (Welman et Maddox, 2003).

3. Importance des exopolysaccharides

3.1. Importance technologique

Les exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques jouent un rôle considérable dans le comportement rhéologique et la texture des laits fermentés (De Vuyst *et al.*, 2001 ; Hassan *et al.*, 2003). En effet, les polymères élaborés permettent d'augmenter la viscosité et l'onctuosité du produit et ont la capacité de retenir les molécules d'eau, diminuant ainsi la séparation du lactosérum et des caséines coagulées (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Amatayakul *et al.*, 2006). Ils assurent une texture agréable et une résistance aux traitements mécaniques des yaourts brassés (Shihata et Shah, 2002 ; Ahmed *et al.*, 2005). Les yaourts brassés perdent une partie de leur texture pendant le traitement mécanique, donc une amélioration de la viscosité est nécessaire par une augmentation de l'extrait sec total du lait standardisé, traitement thermique avant l'inoculation ou l'addition d'agent stabilisant d'origine animale ou végétale.

L'utilisation des bactéries lactiques productrices d'EPS est un moyen efficace qui remplace les polysaccharides d'autres origines (animale ou végétale), ce qui est particulièrement intéressant pour les pays interdisant l'addition de gélifiants ou d'épaississants aux laits fermentés (Torino *et al.*, 2001).

Dans les yaourts fermentés avec des souches bactériennes épaississantes, les exopolysaccharides sont présents sous forme de filaments attachés aux micelles de caséines et à la surface des bactéries. Les interactions entre les bactéries, les EPS et les caséines contribuent à former un réseau qui emprisonne l'eau dans le gel (figure 4).

Les propriétés conférées aux laits fermentés varient selon le type d'exopolysaccharides, ainsi que la souche. La sélection d'une bactérie mucoïde se fera en fonction des propriétés rhéologiques recherchées. La viscosité n'est pas seulement affectée par la quantité de polysaccharides formés, mais aussi par les interactions de ce polymère avec les autres constituants du milieu, tel que l'acide lactique (Hassan *et al.*, 1996 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

Les polysaccharides interviennent également dans la production des fromages allégés. Par exemple, l'utilisation de souches de *Lb. helveticus* productrices d'EPS a

permis de fabriquer un fromage mozzarella allégé avec des propriétés (fusion et rétention de l'humidité) améliorées (Low *et al.*, 1998).

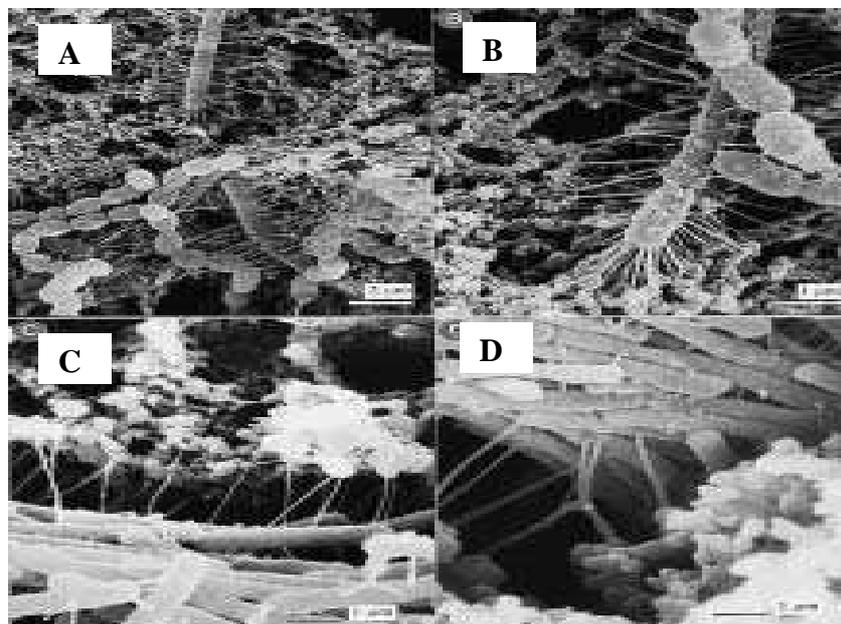


Figure 4: Observation au microscope électronique illustrant les EPS produits par *Lb.delbruekii ssp bulgaricus* dans le yaourt (Tamime et Robinson, 2000).

3.2. Importance physiologique

L'effet des bactéries lactiques productrices d'EPS sur la santé est attribuable aux activités biologiques de ces biopolymères. Ces derniers pourraient contribuer à la santé humaine comme prébiotique ou grâce à leurs propriétés, hypocholestérolémiantes, immunomodulatrices, anti-tumorales, anti-ulcéreuses, ... (De Vuyst et Degeest, 1999 ; Macedo *et al.*, 2002).

Une diminution du taux de cholestérol chez des rats ayant consommé du lait fermenté par *Lc. lactis ssp cremoris* SBT 0495 a été attribuée à l'EPS produit par cette bactérie (Nakajima *et al.*, 1992).

Chabot *et al.* (2001) ont montré, *in vitro*, que les exopolysaccharides produits par *Lb.rhamnosus* RW- 9595M ont des effets immunomodulateurs sur des cellules de souris et humaines.

De nombreuses études ont également mis en évidence l'effet anti-cancérigène des exopolysaccharides des bactéries lactiques. Kitazawa *et al.* (1998) et Ruas-Madiedo *et al.* (2002) ont rapporté que les exopolysaccharides produits par *Lc. lactis*

ssp *cremoris* KVS 20 et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* OLL 1073R-1 ont des effets anti-tumoraux.

Un effet anti-cancérogène a été observé *in vitro* et *in vivo* pour des polysaccharides capsulaires de *Bifidobacterium breve* YIT4044, 4043 et *Bifidobacterium bifidum* YIT 4007. Ces polymères se composent principalement de rhamnose. Les polysaccharides contenant plus de 60% de rhamnose sont plus efficaces pour le traitement du cancer gastro-intestinal (Nagaoka *et al.*, 1994).

Selon Duboc et Mollet (2001), la dégradation de certains polymères par la microflore colique génère des acides gras de petite taille (SCFAs : short-chain fatty acids) dotés d'activité anti-cancéreuse.

Les EPS capsulaires contribuent également à l'amélioration de l'adhésion cellulaire des probiotiques ; il est admis que l'adhérence aux surfaces des muqueuses intestinales contribue à l'efficacité des probiotiques, car cela lui confère un avantage compétitif pour son maintien dans le tractus gastro-intestinal. En outre, en bloquant les sites d'attachement, ces probiotiques préviennent l'invasion et l'implantation des bactéries pathogènes (Macedo *et al.*, 2002).

4. Facteurs influençant la production des exopolysaccharides

Comparativement à d'autres microorganismes producteurs d'EPS, la synthèse de ces polymères est faible chez les bactéries lactiques, les quantités étant exprimées en milligrammes plutôt qu'en grammes par litre de milieu (Cerning, 1995).

Les conditions optimales de croissance ne coïncident pas nécessairement avec une meilleure production d'EPS. Les quantités de polysaccharides produits dépendent d'un certain nombre de facteurs, notamment des souches, des conditions de culture (pH du milieu, température, durée d'incubation...) et de la composition du milieu (sources de carbone et d'azote, ...) (Kimmel *et al.*, 1998 ; Frengova *et al.*, 2000).

4.1. Les conditions de culture

4.1.1. La température

La température d'incubation est un paramètre ayant un impact important sur la production d'EPS, plusieurs auteurs affirment que la production des

exopolysaccharides est plus importante aux températures sub-optimales de croissance chez les bactéries lactiques mésophiles (Cerning *et al.*, 1991 ; Duboc et Mollet, 2001 ; Jolly *et al.*, 2002). Ce phénomène s'explique par l'hypothèse émise par Sutherland en 1972 qui suggère que, lorsque la croissance bactérienne est ralentie à des températures basses ou élevées, la synthèse du polymère est stimulée car la plus part des enzymes qui interviennent dans la production des polysaccharides telles que les glycosyl-transférases et les polymérases sont également responsables de la synthèse de la paroi bactérienne (peptidoglycane). Dans des conditions de croissance optimales qui stimulent la production de lipopolysaccharides ou de peptidoglycane, la synthèse d'EPS est réduite en raison de la non disponibilité des enzymes et des intermédiaires lipidiques.

Chez les bactéries lactiques thermophiles, la production d'EPS est liée à la croissance (Bouzar, 1997 ; De Vuyst *et al.*, 1998). Ceci est en partie en accord avec la théorie de Sutherland (1972) puisque la production d'EPS est plus élevée lorsque les bactéries sont en phase stationnaire.

4.1.2. Le pH

Le pH du milieu de culture affecte aussi la production d'EPS par les bactéries lactiques ; un pH voisin de la neutralité est favorable à la production d'EPS (Kimmel *et al.*, 1998 ; Jolly *et al.*, 2002). Le contrôle du pH lors de la fermentation favorise la production d'EPS. La production des EPS par *Lb. delbruekii ssp bulgaricus* est trois à quatre fois plus lorsque le pH est contrôlé (Petry *et al.*, 2000).

4.2. La composition du milieu

4.2.1. Les sources de carbone et d'azote

La source de carbone joue un rôle très important au cours de la production des exopolysaccharides ; en plus du type de glucide (glucose, lactose, galactose, etc.), la concentration peut aussi avoir un effet sur la production des EPS (Gamar *et al.*, 1997).

Cerning *et al.* (1994) et Degeest *et al.* (2001) ont étudié l'effet de différentes sources de carbone sur la production d'EPS chez *Lactobacillus casei* CG11 et *Lactobacillus sakei* 0-1 ; les souches sont capables de produire des EPS avec les

différents glucides utilisés (glucose, galactose...). Néanmoins, l'addition du glucose dans le milieu permet une meilleure production d'EPS par rapport au lactose. A une concentration de 20g/l de glucose, la production d'EPS par *Lb. casei* CG11 atteint 160 mg/l, alors que pour une même concentration de lactose, la production n'est que de 45mg/l.

L'addition d'hydrolysats de caséines au lait améliore la production d'exopolysaccharides (Cerning *et al.*, 1991).

4.2.2. Les minéraux et les vitamines

Les minéraux et les vitamines stimulent fortement la production des exopolysaccharides chez les bactéries lactiques (Cerning, 1995 ; Mozzi *et al.*, 1996). Par exemple, la production d'EPS par *Lb. casei* est deux fois plus importante en présence du manganèse.

Cependant, l'étude menée par Grobber *et al.* (1998) indique qu'une carence en vitamines, à l'exception de la riboflavine, de l'acide nicotinique et du pantothénate de calcium augmente la production d'EPS chez *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* NCFB 2772.

5. Instabilité du caractère épaississant

Le caractère épaississant est d'une extrême instabilité, ce qui est un inconvénient majeur pour l'industrie laitière. La diminution ou même la perte de cette propriétés peut survenir à la suite d'une série de repiquages ou lors d'une incubation prolongée (Pham *et al.*, 2000).

5.1. Les enzymes

L'instabilité du caractère épaississant peut résulter de la présence d'enzymes de type glycohydrolases, activées dans certaines conditions (Mozzi *et al.*, 1995 ; Vaningelgem *et al.*, 2004).

5.2. Les plasmides

Chez les bactéries lactiques le caractère mucoïde mésophile, est généralement lié à la présence de plasmides ; l'instabilité du caractère épaississant est due à la perte d'un ou de plusieurs plasmides (Cerning *et al.*, 1991 ; Gancel et Novel, 1994). Cette instabilité n'est pas toujours reliée à la présence de plasmide car chez certaines souches de bactéries lactiques thermophiles, Les gènes nécessaires à la synthèse des exopolysaccharides seraient chromosomiques et l'instabilité du caractère pourrait être causée par des éléments génétiques mobiles ou par l'instabilité génomique (délétions et réarrangements) (Stingele *et al.*, 1996).

1. Isolement et purification des bactéries lactiques thermophiles

1.1. Isolement

Les bactéries lactiques thermophiles ont été isolées à partir des laits de vache et de brebis de la région de Béjaia, et d'un lait fermenté de type yaourt brassé.

- ***Streptococcus thermophilus***

Un volume de 0,1 ml de lait ou 1ml des dilutions décimales 10^{-4} et 10^{-6} du yaourt estensemencé en masse sur milieu M17 gélosé et incubé à 45°C pendant 24 heures (figures 5 et 6). Après croissance, les colonies à coloration de Gram positive et dépourvues de catalase sont retenues.

- ***Lactobacillus***

Un volume de 1ml des dilutions décimales 10^{-4} et 10^{-6} du yaourt estensemencé en double couche sur gélose MRS ; les boîtes de Pétri sont incubées dans une jarre d'anaérobiose à 45°C pendant 24 heures (figure 6).

Les colonies grisâtres à coloration de Gram positive et dépourvues de catalase sont également retenues.

1.2. Purification

Les bactéries lactiques isolées sont purifiées sur milieux solides, M17 (Streptocoques) et MRS (Lactobacilles) par plusieurs repiquages. En moyenne 6 à 7 repiquages successifs ont été réalisés pour assurer la pureté des souches. Des examens macroscopiques (couleur, morphologie et taille des colonies), microscopiques (morphologie, mode de regroupement des cellules et coloration de Gram) et le test de catalase sont effectués.

Les souches isolées et purifiées ont été repiquées dans du lait écrémé reconstitué à 10%, à 42°C pendant 24 heures puis conservées au congélateur et au réfrigérateur.

0,1ml du lait de vache ou de brebis

Une colonie est repiquée sur bouillon M17

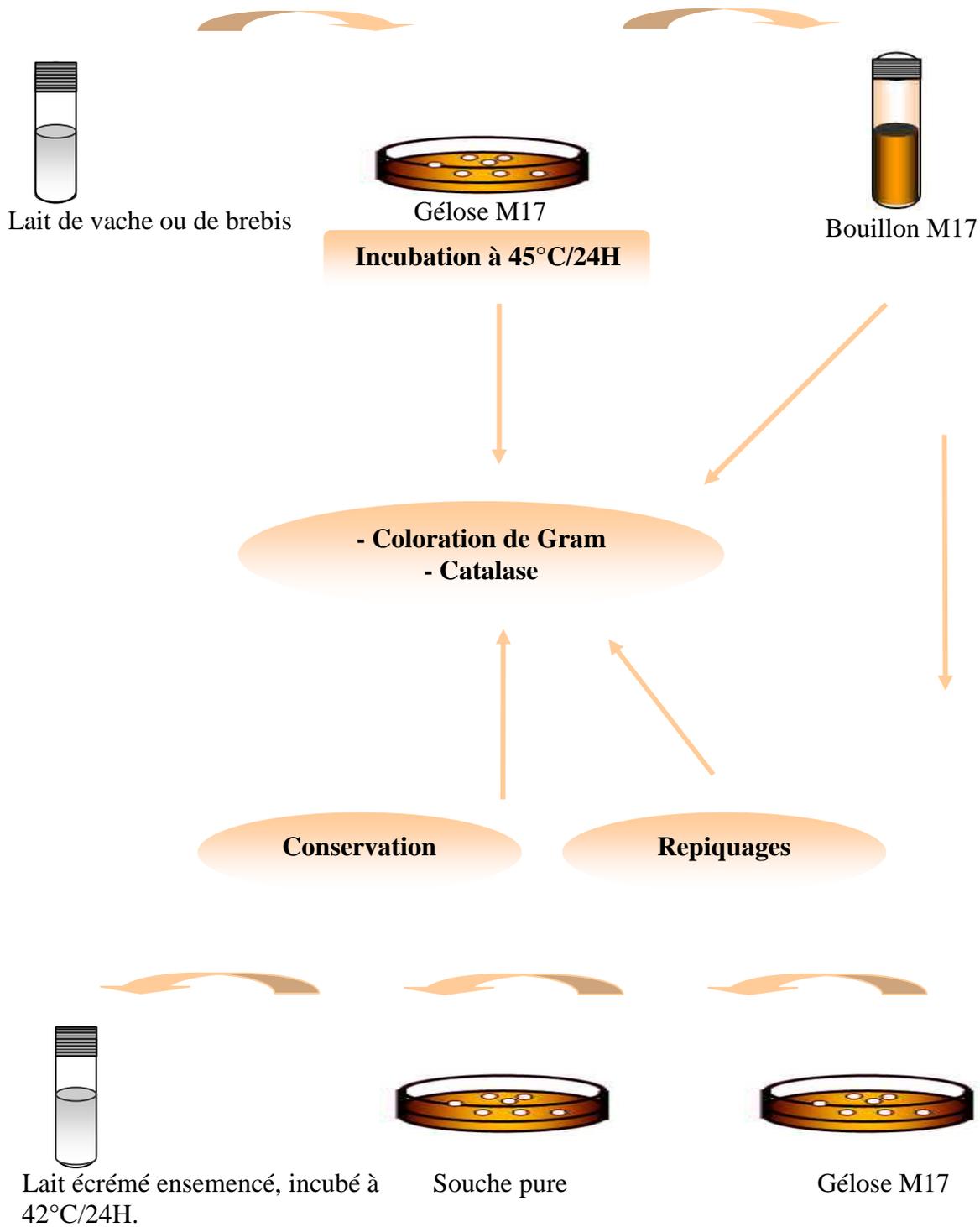


Figure 5: Isolement et purification des souches de streptocoques à partir du lait de vache ou de brebis (Devauchelle, 1981).

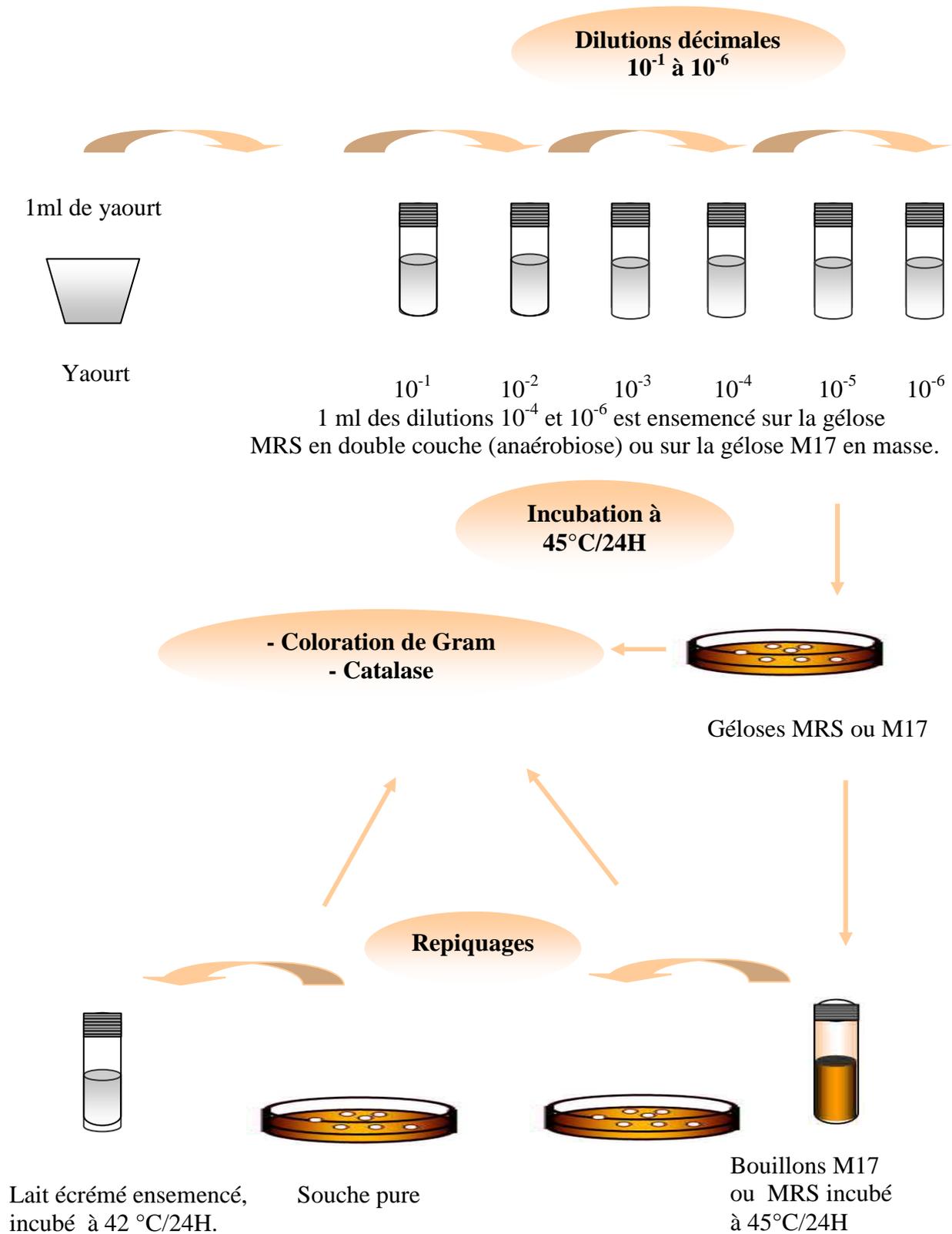


Figure 6: Isolement et purification des souches de streptocoques et de lactobacilles à partir du yaourt (Devauchelle, 1981).

2. Identification

Les souches isolées ont été décongelées à température ambiante, repiquées sur les bouillons M17 (Streptocoques) et MRS (Lactobacilles) puis incubées à 42°C pendant 18 heures. Les tests physiologiques et biochimiques utilisés pour identifier les souches sont rassemblés dans le tableau I, en se référant aux données de Giraud et Galzy (1980) et Devauchelle (1981). Une souche de référence de *Streptococcus thermophilus* fournie par le laboratoire des BioSciences de l'Aliment, université de Nancy1 est intégrée dans les tests d'identification, en parallèle avec les souches de Streptocoques isolées

Pour assurer les conditions d'anaérobie, de la paraffine stérile a été ajoutée à chaque tube après inoculation, dans le cas des lactobacilles.

- **Préparation des suspensions bactériennes pour la fermentation des glucides**

Après culture sur bouillons MRS ou M17 pendant 18 heures, les cellules sont lavées deux fois avec de l'eau physiologique stérile, par centrifugation à 5000 tours/min, pendant 5 min. Le culot obtenu est remis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

La fermentation des glucides (glucose, ribose, xylose,...) par les souches isolées est étudiée sur des milieux de fermentation de glucides, en présence d'un indicateur coloré, le rouge de chlorophénol ; le virage de la couleur du rouge au jaune indique la fermentation du glucide.

3. Cinétique de croissance

Une pré-culture de chaque souche est réalisée dans du lait écrémé reconstitué à 10%ensemencé à 3%, à partir des souches conservées au réfrigérateur, puis incubée à 42°C pendant 18 heures. Cette pré-culture sert à inoculer le lait écrémé pour :

- Suivre la croissance bactérienne et l'activité acidifiante à 42°C en cultures pures.
- Suivre la production des exopolysaccharides et la viscosité développée à 35, 40, 42 et 45°C en cultures pures et en cultures mixtes.

Des Erlen Meyer contenant 100ml de lait écrémé sont ensemencés avec la pré-culture à raison de 3% (10^9 UFC/ml) (figure 7).

Tableau I : Identification des Streptocoques et des Lactobacilles.

Test	Les streptocoques	Les lactobacilles	Réaction positive
Type fermentaire	Les bouillons M17 ou MRS (cloche de Durham) est ensemencé à 1% et incubé à 42°C/24h.		Apparition de bulles de gaz
Culture à différentes températures	Le lait écrémé ensemencé à 1% et incubé à 15°C/1-7 jours, 45°C/24h, et 50°C/24h.		Coagulation du lait
Culture à différentes concentrations de NaCl	Du bouillon MRS ou M17 à des concentrations de 2%, 4% et 6,5% NaCl et ensemencé à 1% et incubé à 42°C/24h.		Trouble du bouillon.
Culture sur lait bleu de Schermann	9 ml de lait additionné de 1 ml de bleu de méthylène à 1% sont ensemencés et incubés à 42°C/24h.	/	Réduction du bleu de méthylène.
Croissance sur lait tournesolé	Du lait tournesolé est ensemencé et incubé à 42°C/24h.	/	Réduction de la teinture de tournesol et coagulation.
Culture sur lait citraté	10,5 ml lait écrémé additionnés de 0,5 ml de citrate de sodium à 0,25% et de 4 ml de gélose sont ensemencés, et incubés à 42°C/1-7 jours.	/	Apparition de bulles de gaz dans la gélose.
Thermorésistance	Du lait écrémé ensemencé est mis au bain-marie à 60°C/30min puis incubé à 42°C /24h.	Du lait écrémé est ensemencé et mis au bain-marie à 60°C/90min et 65°C/30min puis incubé à 42°C/24h.	Coagulation du lait.
Hydrolyse de l'arginine	/	Du bouillon de culture à l'arginine (annexes) est ensemencé et incubé à 42°C/1-7 Jours.	La production d'ammoniaque est mise en évidence par le réactif de Nessler (coloration orange).
Fermentation des glucides	Le milieu de fermentation (annexes) pour les lactobacilles et les streptocoques est additionné de sucres à une concentration finale de 0,5%, ensemencé avec une suspension bactérienne et incubé à 42°C/24h.		L'indicateur coloré vire au jaune.

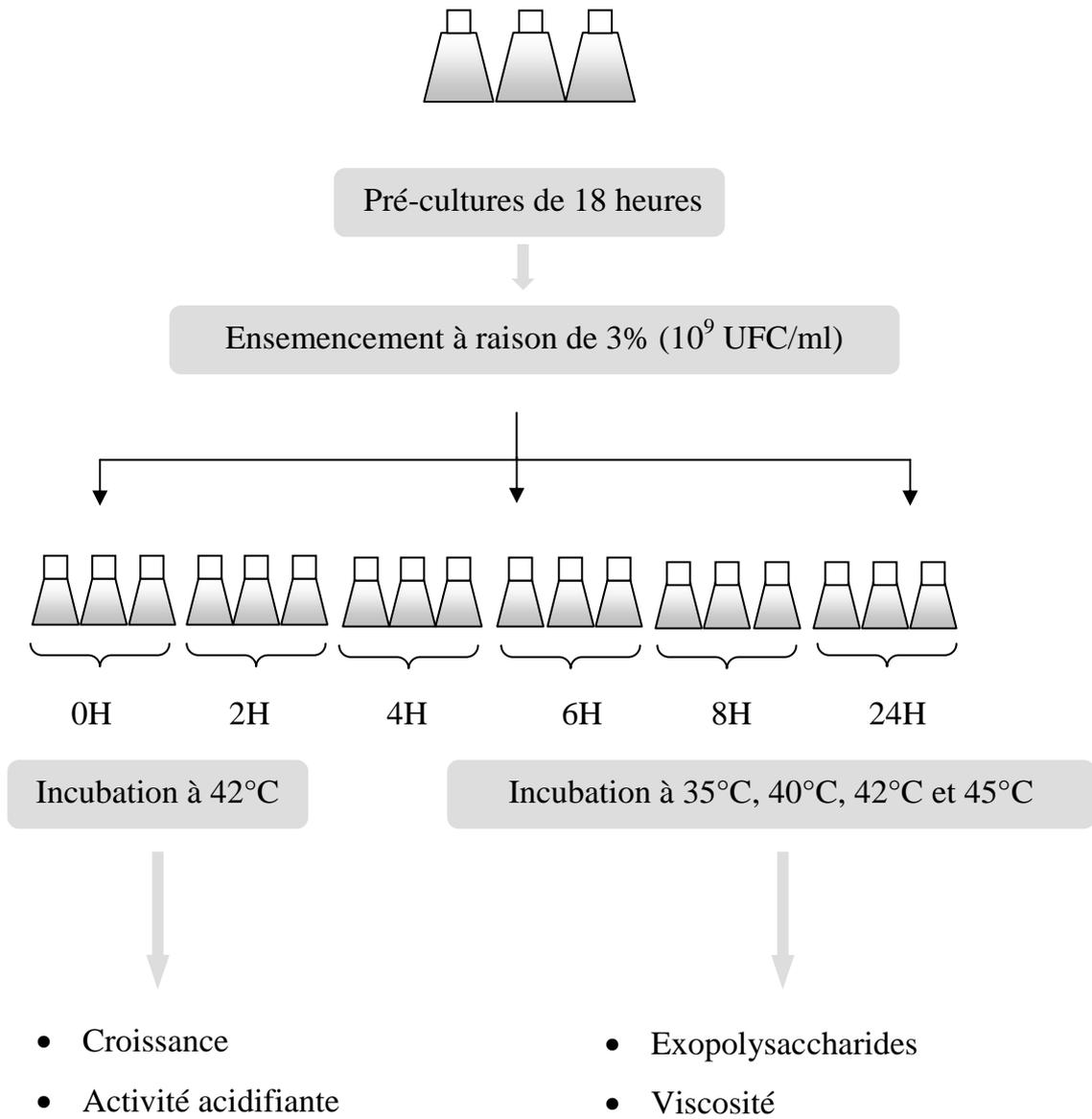


Figure 7 : Paramètres technologiques analyser

La croissance des souches de *S. thermophilus* et de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* est suivie par la méthode décrite par Meijer *et al.* (1995) ; 0,5ml de lait fermenté sont mélangés avec 4,5 ml d'acide tétracétique éthylène diamine (EDTA, 50 mM) et de tetraborate de sodium 0,5 M (pH=8). L'absorbance du mélange est mesurée à 600 nm.

4. Cinétique d'acidification

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des cultures pures au cours du temps et d'autre part, à doser simultanément l'acidité Dornic.

4.1. Mesure du pH

L'évolution du pH des cultures sur lait est déterminée à l'aide d'un pH-mètre.

4.2. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité Dornic est mesurée par la neutralisation de 10 ml de lait, par l'hydroxyde de sodium (N/9), en présence d'un indicateur de pH, la phénolphtaléine. Le mélange est titré jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle persistante au moins 10secondes. Cette acidité est exprimée en "Degré Dornic" tel que 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait, ce qui est équivalent à 0,1ml d'hydroxyde de sodium nécessaire pour assurer le virage de la couleur vers le rose.

5. Production des exopolysaccharides

5.1. Extraction des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont extraits selon le protocole de Moreira *et al.* (2003), modifié. 2ml de lait fermenté sont chauffés à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, 2ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20% sont additionnés, puis le mélange est centrifugé à 19 000 g pendant 20 min à 4°C. Un volume d'éthanol (750µl) est ajouté au même volume de surnageant obtenu ; le mélange est maintenu pendant une nuit à 4°C, puis centrifugé de nouveau à 19 000g pendant 30 min à 4°C. Le culot de polysaccharides obtenu est dissout dans 1ml d'eau distillée (figure 8).

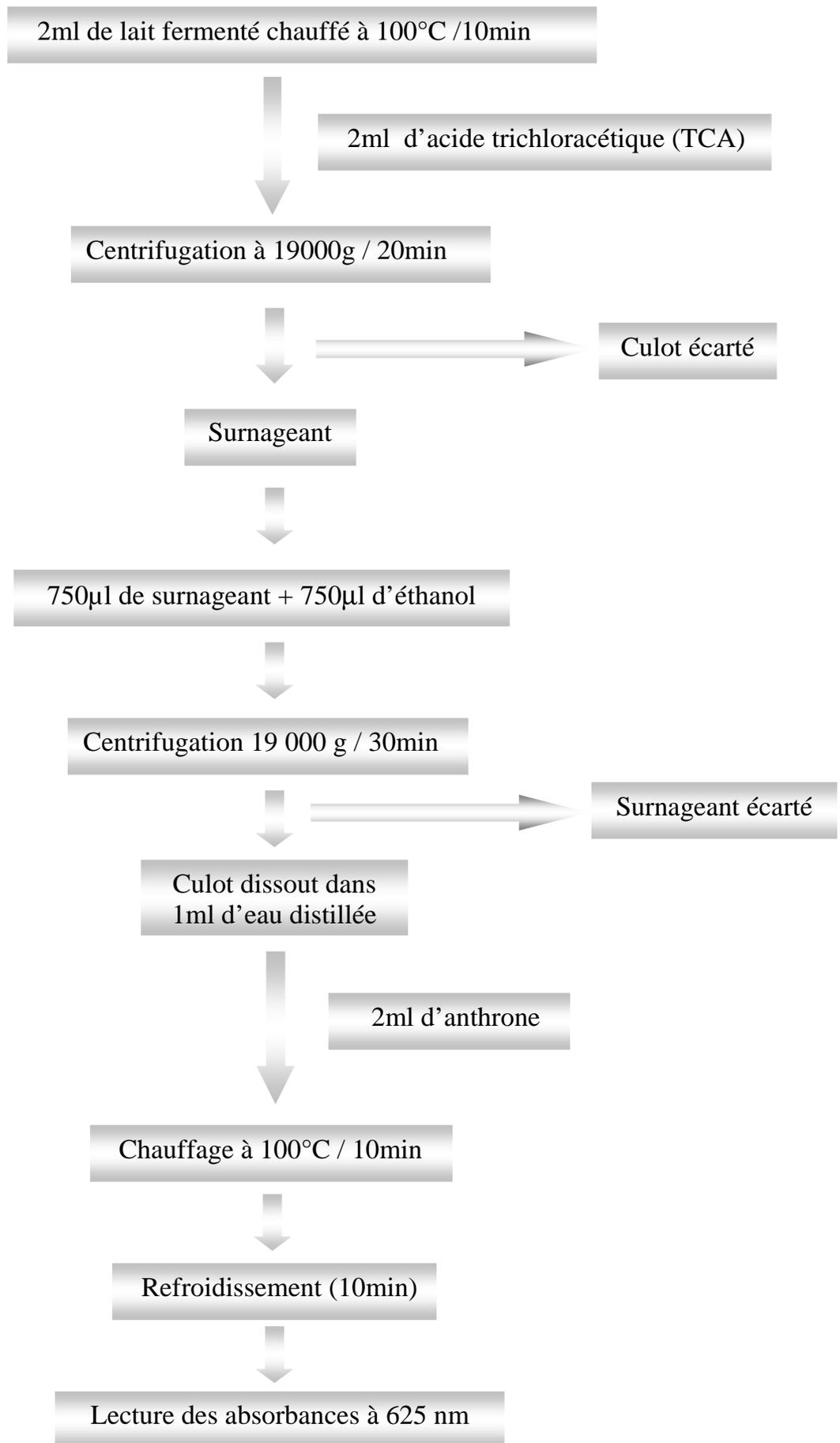


Figure 8: Extraction et dosage des exopolysaccharides.

5.2. Dosage des exopolysaccharides

Le dosage des exopolysaccharides est effectué selon la méthode rapportée par Samotus *et al.* (1995). Les dérivés furfuraliques (5-hydroxyméthyl-furfural pour les hexoses) se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés (bleu vert). 2ml d'anthrone sont ajoutés à 1ml d'échantillon (culot dissout dans l'eau) ; le mélange réactionnel est chauffé à 100°C (10min) puis refroidi (10min) et l'absorbance est mesurée à 625 nm.

Les résultats sont exprimés en µg d'EPS/ml de lait, en se référant à une courbe d'étalonnage (figure 9) réalisée avec du glucose comme standard.

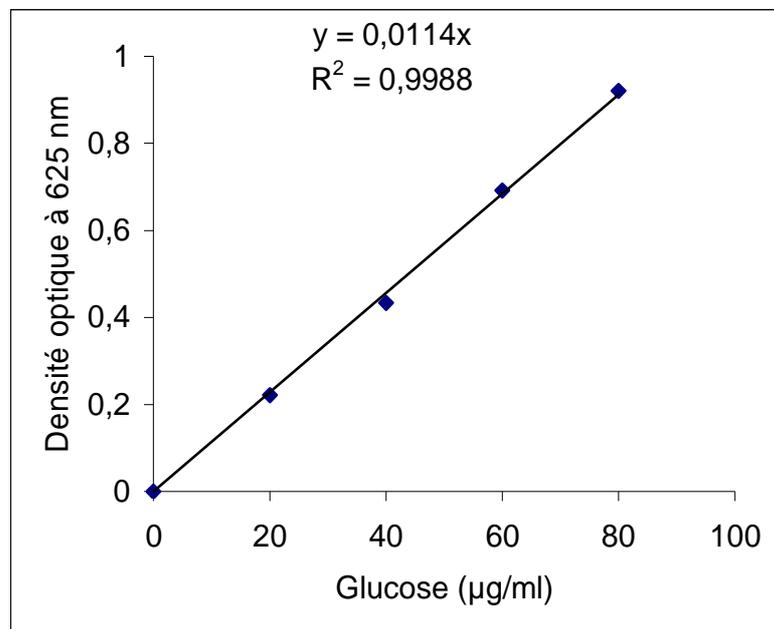


Figure 9: Courbe d'étalonnage des exopolysaccharides.

6. Détermination du pouvoir texturant

La viscosité développée dans le laitensemencé avec les différentes souches isolées est mesurée à l'aide d'un viscosimètre à chute de bille (figure 11). L'appareil est constitué d'une cuve à eau (25°C) où se trouve plongé le tube rempli du liquide à analyser.

La viscosité est déterminée par mesure du temps de chute d'une bille tout au long du tube (distance a-b).

La viscosité est obtenue en appliquant la formule suivante :

$$\eta = K (\rho_1 - \rho_2) t$$

- η = Viscosité (mPa.s).
- t = Temps de chute de bille (exprimé en secondes).
- K = Constante liée à la bille (mPa.s.cm³/g.s).
- ρ_1 = Densité de la bille (g/cm³).
- ρ_2 = Densité du lait fermenté (g/cm³).

La densité du lait est mesurée à l'aide d'un pycnomètre, selon la formule suivante :

$$\text{Densité} = [(M1 - M0) / V] / [(M2 - M0) / V]$$

- $M0$: Masse du pycnomètre à vide.
- $M1$: Masse du pycnomètre rempli de lait fermenté.
- $M2$: Masse du pycnomètre rempli d'eau distillée.
- V : Volume du pycnomètre.

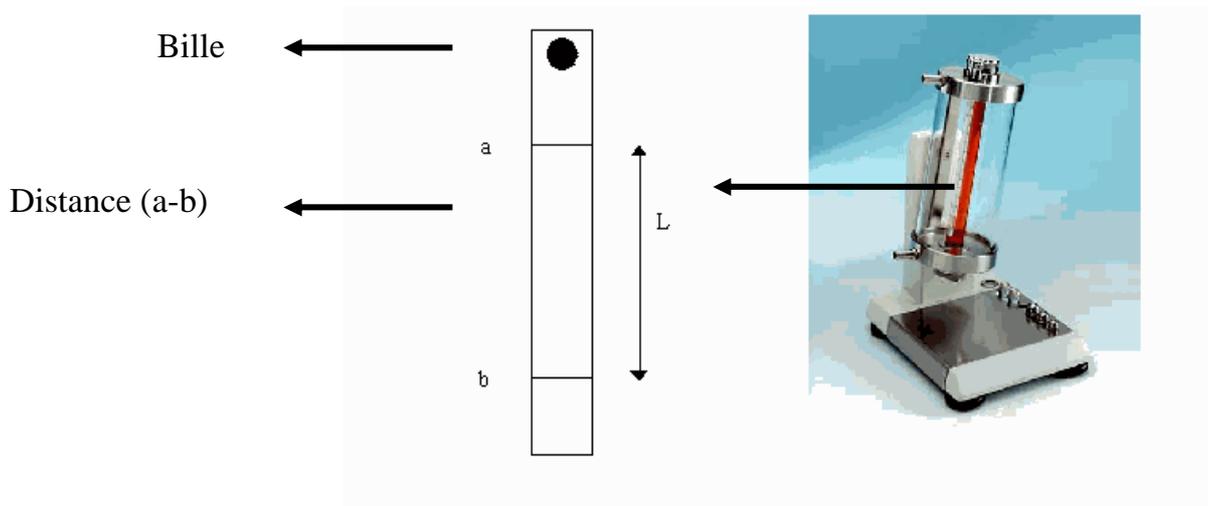


Figure 10 : Viscosimètre à chute de bille

7. Etude statistique

Toutes les données concernant les paramètres évalués (croissance, activité acidifiante, production des exopolysaccharides et la viscosité développée dans le lait écrémé) dans la présente étude représentent la moyenne de trois essais.

Une analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2003, afin de déterminer les moyennes et les écartypes.

Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur est appliquée à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5 Fr, afin de mettre en évidence les différences significatives entre les souches isolées pour les paramètres acidification et pH ; l'effet de la souche et de la température d'incubation sur la production des exopolysaccharides a été déterminé par une analyse de la variance à deux critères.

1. Identification des souches de Streptocoques et de Lactobacilles

Le tableau II indique les résultats des observations macroscopiques et microscopiques des colonies de Streptocoques et de Lactobacilles isolées, obtenues après purification. Les tests préliminaires (catalase et coloration de Gram) ainsi que les caractéristiques morphologiques des colonies et des cellules permettent de confirmer l'appartenance des souches isolées aux genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

Tableau II : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches de Streptocoques et des Lactobacilles isolées.

Souches	Colonies		Gram	Cellules	
	Couleur	Aspect		Forme	Mode de regroupement
SV1 ; SV2 SV3 ; SV4	blanchâtre	Colonies de très petite taille à contour régulier	Positif	Cocci	Isolées en, diplocoques ou en chaînettes
SB1 ; SB2 SB3 ; SB4					
SY1 ; SY2 SY3 ; SY4					
LY1 ; LY2 LY3 ; LY4	grisâtre	Colonies crémeuses à contour irrégulier		Bâtonnets « bacilles allongés »	En paires ou en chaînettes

- SV1, SV2, SV3, SV4 : Souches de Streptocoques isolées du lait de vache.
- SB1, SB2, SB3, SB4 : Souches de Streptocoques isolées du lait de brebis.
- SY1, SY2, SY3, SY4 : Souches de Streptocoques isolées du yaourt.
- LY1, LY2, LY3, LY4 : Souches de Lactobacilles isolées du yaourt.

Douze souches de Streptocoques et quatre souches de Lactobacilles purifiées ont été identifiées sur la base de critères biochimiques et physiologiques spécifiques. En se référant aux données de Giraud et Galzy (1980) et de Devauchelle (1981), les résultats rassemblés dans les tableaux III, IV et V indiquent que les souches isolées appartiennent aux espèces de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*.

Les spectres de fermentation des glucides montrent que les souches de *Lactobacillus* ont une activité fermentaire très réduite ; elles ne fermentent que le lactose, le glucose et le fructose. Les souches de *Streptococcus* ont une activité fermentaire plus large car elles fermentent en plus du glucose et du lactose, le mélibiose, le raffinose, le ribose et le saccharose, tandis que le galactose est fermenté uniquement par les souches isolées du yaourt.

2. Cinétique de croissance

La croissance des souches isolées est estimée par la mesure de l'absorbance à 600 nm, dans du lait écrémé reconstitué. L'allure des courbes de croissance (figure 11) après 48 heures d'incubation, montre 3 phases principales :

- **Une phase de latence:** qui correspond à la période nécessaire aux bactéries pour s'adapter aux conditions de culture. Elle permet la synthèse et l'activation des enzymes impliquées dans le transport et l'utilisation des substrats par les bactéries. Pour *S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*, elle permet d'une part, l'activation de la lactose perméase et d'autre part, l'induction de la synthèse de la β -galactosidase, par le lactose présent dans le milieu.
- **Une phase exponentielle :** caractérisée par une croissance bactérienne très active.
- **Une phase stationnaire:** correspond à l'arrêt de la croissance, qui est dû à l'accumulation de composés inhibiteurs, en particulier l'acide lactique et le galactose. Le galactose non fermenté s'accumule dans le milieu et provoque un ralentissement de la croissance en inhibant les enzymes intervenant dans le transport du lactose ; le galactose est un inhibiteur compétitif de la β -galactosidase et ralentit donc l'hydrolyse du lactose.

Tableau III : Identification des souches de Streptocoques.

Caractères	Lait de vache				Lait de brebis				Yaourt				SR
	SV1	SV2	SV3	SV4	SB1	SB2	SB3	SB4	SY1	SY2	SY3	SY4	
Production de gaz	-				-				-				-
Croissance à :													
15°C	-				-				-				-
45°C	+				+				+				+
50°C	+				+				+				+
Croissance à :													
2 % NaCl	+				+				+				+
4 % NaCl	-				-				-				-
6,5 % NaCl	-				-				-				-
Lait bleu de Sherman	-				-				-				-
Lait tournesolé	ACr				ACr				ACr				ACr
Lait citaté	-				-				-				-
Thermorésistance à : 60°C/30min	+				+				+				+

- - : Réaction négative ; + : Réaction positive ; ACr : Acidification, Coagulation, Réduction.
- SV1 à SV4 : souches isolées du lait de vache. SB1 à SB4 : souches isolées du lait de brebis. SY1 à SY4 : souches isolées du yaourt. SR : souche de référence (*S. thermophilus*).

Tableau IV : Profil fermentaire des souches de Streptocoques.

Fermentation des glucides	Lait de vache				Lait de brebis				Yaourt				SR
	SV1	SV2	SV3	SV4	SB1	SB2	SB3	SB4	SY1	SY2	SY3	SY4	
Adonitol		-				-				-			-
Arabinose		-				-				-			-
Galactose		-				-				+			+
Glucose		+				+				+			+
Glycerol		-				-				-			-
Glycogène		-				-				-			-
Lactose		+				+				+			+
Maltose		-				-				-			-
Mannitol		-				-				-			-
Mélibiose		+				+				+			+
Raffinose		+				+				+			+
Rhamnose		-				-				-			-
Ribose		+				+				+			+
Saccharose		+				+				+			+
Salicine		-				-				-			-
Sorbitol		-				-				-			-
Tréhalose		-				-				-			-
Xylose		-				-				-			-
Conclusion	<i>Streptococcus thermophilus</i>												

Tableau V : Identification des souches de Lactobacilles isolées du yaourt.

Caractères	Yaourt				Fermentation des glucides	Yaourt			
	LY1	LY2	LY3	LY4		LY1	LY2	LY3	LY4
Production de gaz	-				Adonitol	-			
Croissance à : 15°C 45°C 50°C					Arabinose	-			
					Fructose	+			
					Galactose	-			
					Glucose	+			
					Glycerol	-			
Croissance à : 2 % NaCl 4 % NaCl 6,5% NaCl					Glycogène	-			
					Lactose	+			
					Maltose	-			
					Mannitol	-			
					Mélibiose	-			
Thermorésistance à : 60°C/90min 65°C/30min					Raffinose	-			
					Rhamnose	-			
					Ribose	-			
					Saccharose	-			
					Salicine	-			
Hydrolyse de l'arginine					Sorbitol	-			
					Tréhalose	-			
					Xylose	-			
Conclusion	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>								

- - : Réaction négative ; + : Réaction positive.

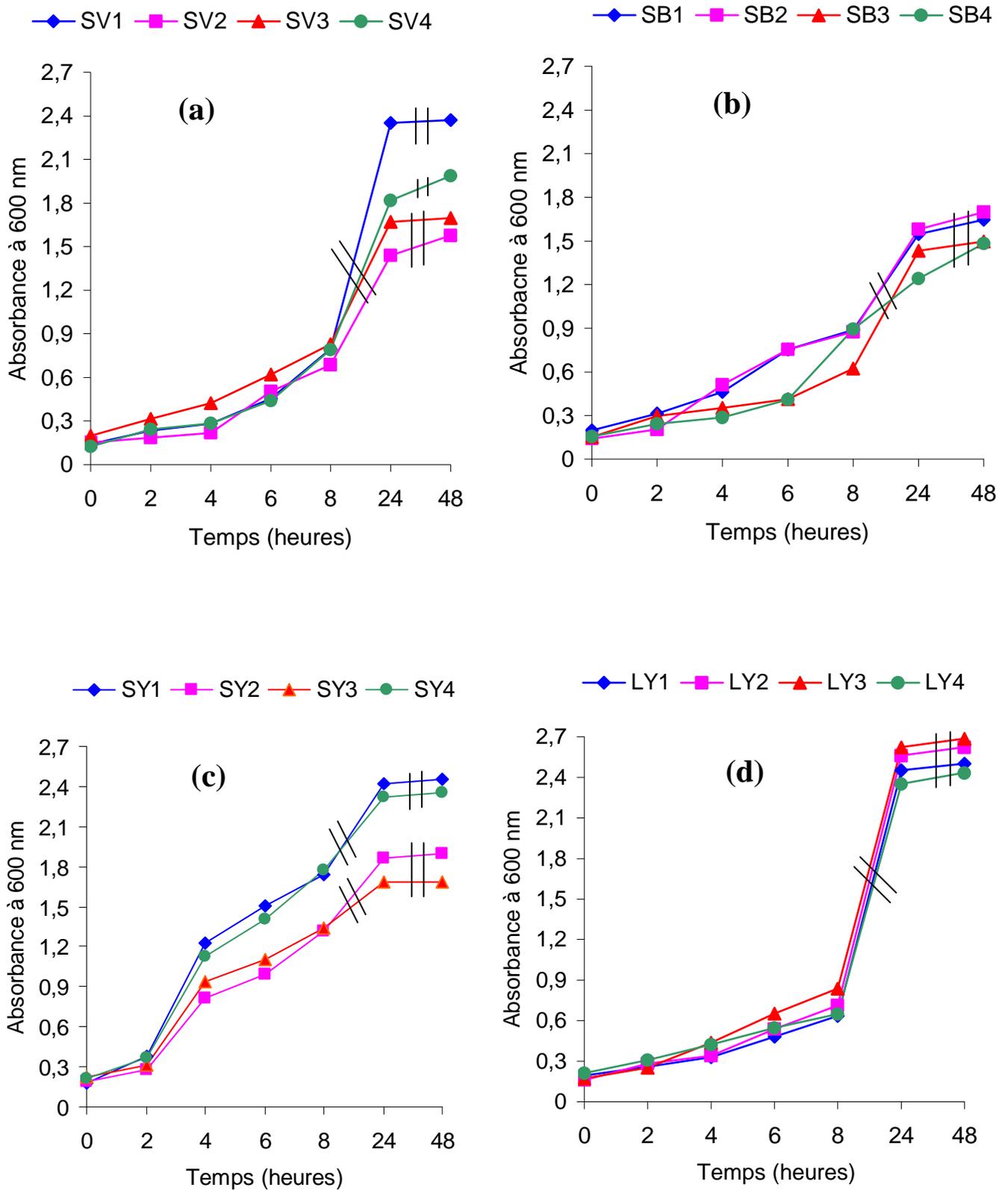


Figure 11 : Cinétique de croissance des souches de *S. thermophilus* isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et des souches de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* isolées du yaourt (d).

Température de croissance : 42 °C.

- ***Streptococcus thermophilus***

Les souches de *S. thermophilus* présentent des courbes de croissance différentes. Durant les 8 premières heures d'incubation, la croissance des souches isolées du lait de vache évolue de la même manière (figure 11a). Cependant, après 24 heures d'incubation, la souche SV1 est plus rapide que les autres et atteint une absorbance de 2,3.

Durant les 8 premières heures d'incubation, la croissance des souches isolées du lait de vache (figure 11a) est semblable à celle des souches isolées du lait de brebis (figure 11b). Après 24 heures d'incubation, leur croissance est meilleure que celle des souches isolées du lait de brebis, avec une absorbance de 2 et de 2,3 pour les souches SV4 et SV1.

Les souches isolées du yaourt évoluent plus rapidement (figure 11c) comparativement aux souches isolées du lait. Après 8 heures d'incubation, les souches SY1 et SY4 présentent une absorbance voisine de 1,7, alors que les absorbances atteintes par les souches isolées des laits de brebis et de vache pour la même durée d'incubation est voisine de 0,7.

- ***Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus***

Les souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* isolées du yaourt (figure 11d) atteignent des absorbances comprises entre 0,6 et 0,8, après 8 heures de culture. Après 24 heures, les absorbances sont beaucoup plus importantes ; elles sont comprises entre 2,4 et 2,6.

La croissance des souches de *S. thermophilus* pendant les 8 premières heures de fermentation est meilleure que celle de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* ; ceci peut s'expliquer par le fait qu'un pH initial de 6,4 est plus favorable pour les streptocoques que pour les lactobacilles. Après 8 heures d'incubation, la croissance de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* est meilleure que celle de *S. thermophilus* ; ceci est probablement dû à la disponibilité des acides aminés et des peptides issus de leur activité protéolytique.

3. Activité acidifiante

Le rôle principal des bactéries lactiques est de produire de l'acide lactique à partir des glucides. Selon les espèces et les souches, la vitesse d'acidification et/ou la production d'acide lactique varient considérablement. L'activité acidifiante (évolution du pH et production d'acide lactique) des souches isolées est évaluée à 42°C dans le lait écrémé reconstitué.

3.1 Evolution du pH

- *Streptococcus thermophilus*

La figure 12 montre l'évolution du pH des souches de *S. thermophilus* et de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*. Le pH initial du lait est d'environ 6,40. L'évolution du pH du laitensemencé avec les souches isolées des laits de brebis et de vache est lente ; après 8 heures d'incubation, le pH atteint des valeurs de 5,4 et 5,6, pour les souches SV1 et SB1.

Le pH du laitensemencé avec les souches du yaourt évolue rapidement comparativement aux autres souches pour atteindre un pH de 4,1 et de 4,2 pour les souches SY1 et SY4, après 8 heures d'incubation.

- *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*

Le pH du laitensemencé avec les souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (figure 12d) diminue lentement avec des valeurs comprises entre 5,3 (souche LY3) et 5,7 (souche LY4), après 8 heures d'incubation. Par contre après 24 heures d'incubation, le pH atteint est plus acide que celui du laitensemencé avec les streptocoques; ceci s'explique par le fait que les lactobacilles soient plus acidifiants que les streptocoques. Ces résultats concordent avec ceux de Xanthopoulos *et al.* (2001), Badis *et al.* (2004) et Ghammas *et al.* (2006).

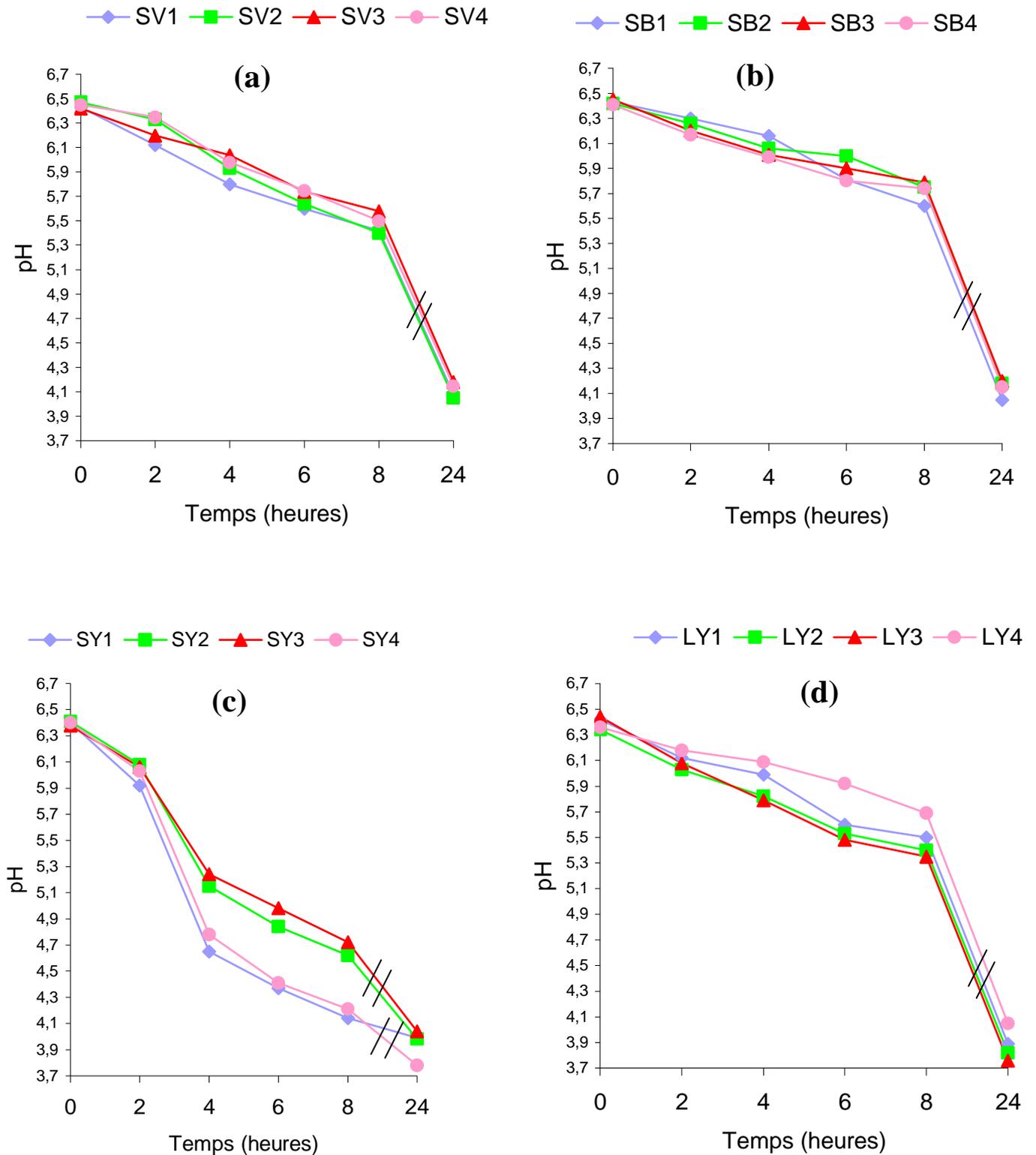


Figure 12 : Evolution du pH lait fermenté par les souches de *S. thermophilus* isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et des souches de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* isolées du yaourt (d).

Température d'incubation : 42 °C.

3.2. Evolution de l'acidité titrable

- ***Streptococcus thermophilus***

L'évolution de l'acidité titrable du laitensemencé avec les souches locales est lente ; après 8 heures d'incubation, l'acidité atteinte est voisine de 55°D pour la souche SV3 isolée du lait de vache et de 37°D pour la souche SB4 isolée du lait de brebis (figures 13a et 13b).

L'acidité titrable du lait fermenté par les souches de *S. thermophilus* présente des différences très hautement significatives ($p < 0,001$).

L'acidité développée par les souches SY1 et SY4 du yaourt est respectivement de 105°D et 95°D, après 8 heures d'incubation, alors que les souches SY2 et SY3 génèrent une acidité titrable proche de 75°D (figure 13c).

Les résultats de l'acidité révèlent que les souches isolées du yaourt présentent un meilleur pouvoir acidifiant par rapport aux souches isolées des laits de vache et de brebis.

Les souches isolées du yaourt sont dites actives ou rapides car dans les conditions utilisées, le temps mis pour atteindre 40-50°D est inférieur ou égal à 220min (Bouillanne et Desmazeaud, 1980). Les souches locales sont considérées comme étant lentes.

La faible activité acidifiante des souches locales de *S. thermophilus* s'explique par :

- La vitesse du métabolisme est lente
- L'intervention d'une activité uréasique aboutissant à l'alcalinisation du milieu par l'ammoniaque résultant de la dégradation de l'urée contenue dans le lait.

- ***Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus***

Le profil d'acidification du laitensemencé par les souches *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (figure 13d) est semblable à celui des souches locales de *S. thermophilus*.

Les résultats montrent que l'aptitude acidifiante est un caractère variable, selon l'espèce et la souche. Les lactobacilles sont plus acidifiants que les streptocoques. Ceci est expliqué par la meilleure tolérance de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* pour les pH relativement acides.

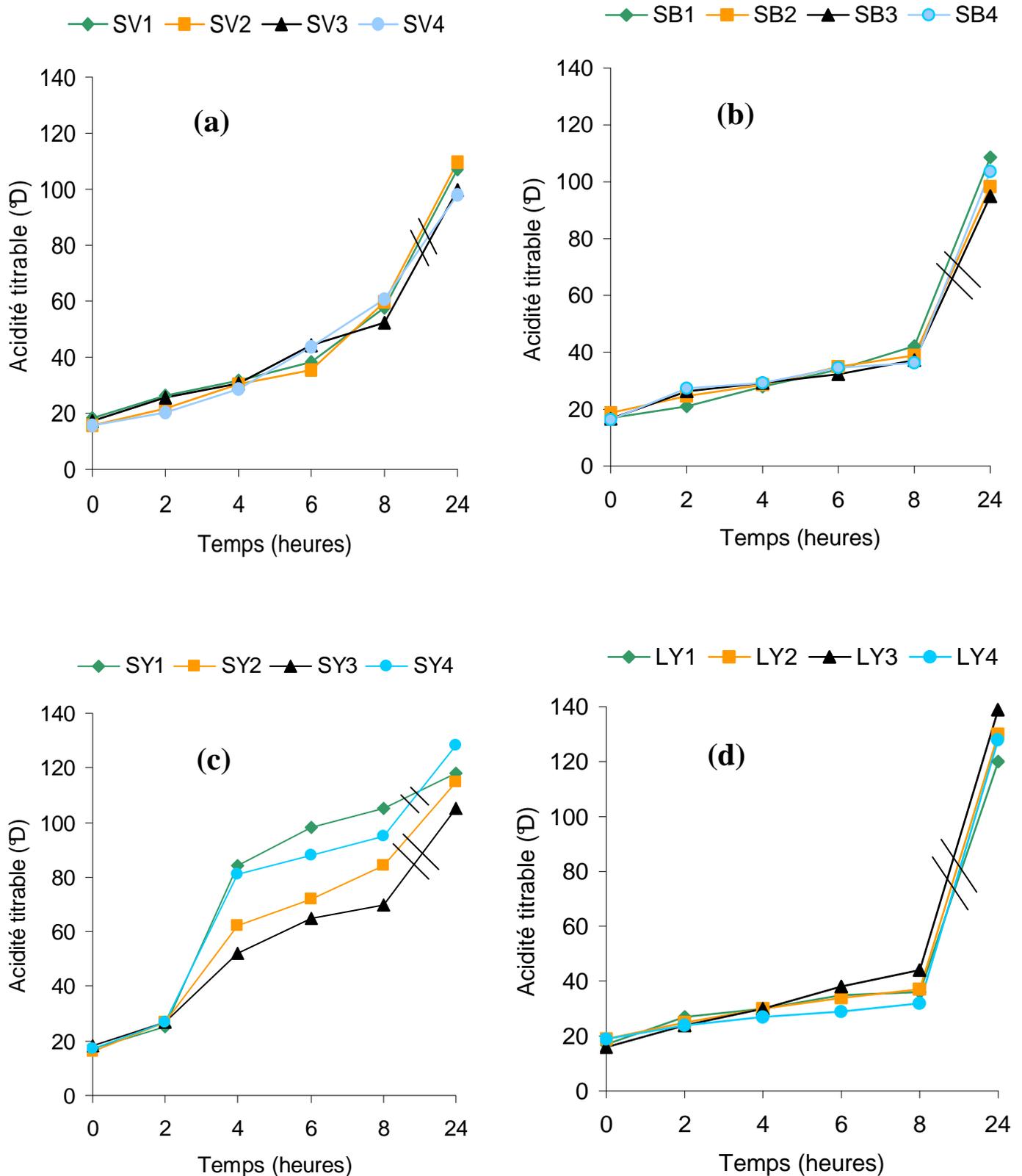


Figure 13: Evolution de l'acidité titrable du lait ensemencé par les souches de *S. thermophilus* isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et des souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* isolées du yaourt (d).

Température d'incubation : 42 °C.

L'acidité titrable élaborée par les souches de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus*, présente des différences très hautement significatives ($p < 0,001$).

Dans la présente étude, il ressort que les souches isolées présentent une grande hétérogénéité concernant leur pouvoir acidifiant. Cette diversité dans la vitesse d'acidification des souches offre un large choix pour satisfaire les différentes exigences technologiques.

4. Effet de la température sur la production des exopolysaccharides

Les quantités d'exopolysaccharides produits par les souches de *S. thermophilus* et de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* sont estimées dans du lait écrémé à 35, 40, 42 et 45°C, en cultures pures et en cultures mixtes.

4.1. Cultures pures

- *Streptococcus thermophilus*

Les résultats de la production des exopolysaccharides par les souches de *S. thermophilus*, sont indiqués dans les figures 14, 15 et 16. La quantité d'exopolysaccharides augmente avec la durée d'incubation, pour toutes les souches.

A 35°C, la quantité d'exopolysaccharides est relativement faible ; elle est comprise entre 38 (souche SV3) et 105 µg/ml (souche SY4), après 24 heures d'incubation, tandis qu'à 40°C et 42°C, la production des exopolysaccharides atteint une valeur maximale de 301µg/ml (souche SY4). A 45°C, les valeurs varient entre 85 (souche SV3) et 321 µg/ml (souche SY4), exceptée la souche SB2 qui produit 45µg/ml.

A 45°C, les souches du yaourt synthétisent des quantités allant de 144 (souche SY2) à 321 µg/ml (souche SY4), après 24 heures d'incubation ; ces concentrations sont nettement supérieures à celle des souches locales. La quantité d'exopolysaccharides synthétisée par les souches isolées du lait de vache (86 à 181µg/ml) est supérieure à celle des souches isolées du lait de brebis (45 à 95µg/ml). Zisu et Shah (2003) ont montré que la concentration en EPS, chez *S. thermophilus* est de 622µg/ml. Savadogo *et al.* (2004) ont rapporté des concentrations comprises entre 219 à 713µg/ml chez des souches de *S. thermophilus* isolées des laits fermentés du Burkina Faso.

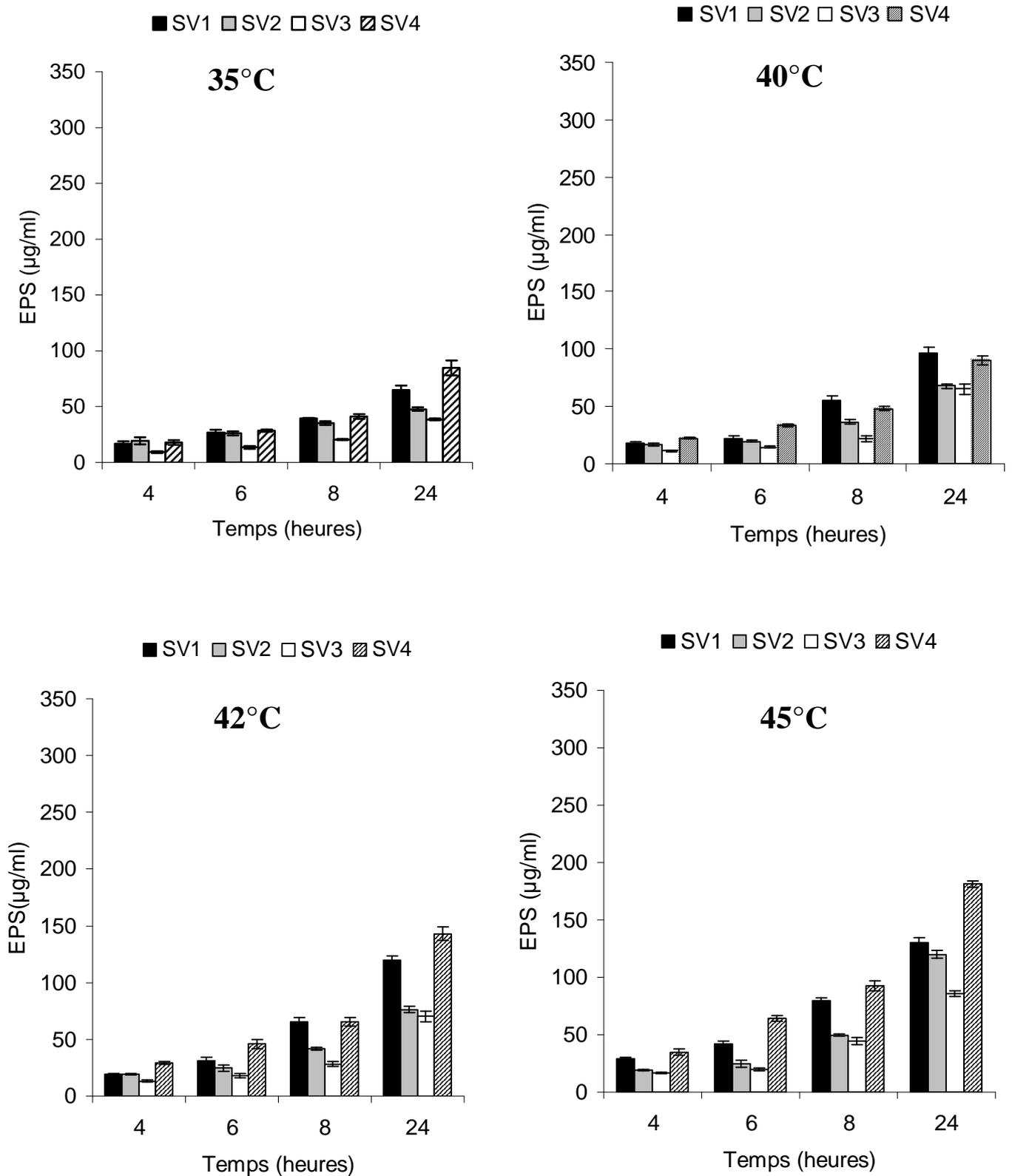


Figure 14: Production d'exopolysaccharides par *S. thermophilus* isolé du lait de vache.

Les barres verticales représentent les écarts types

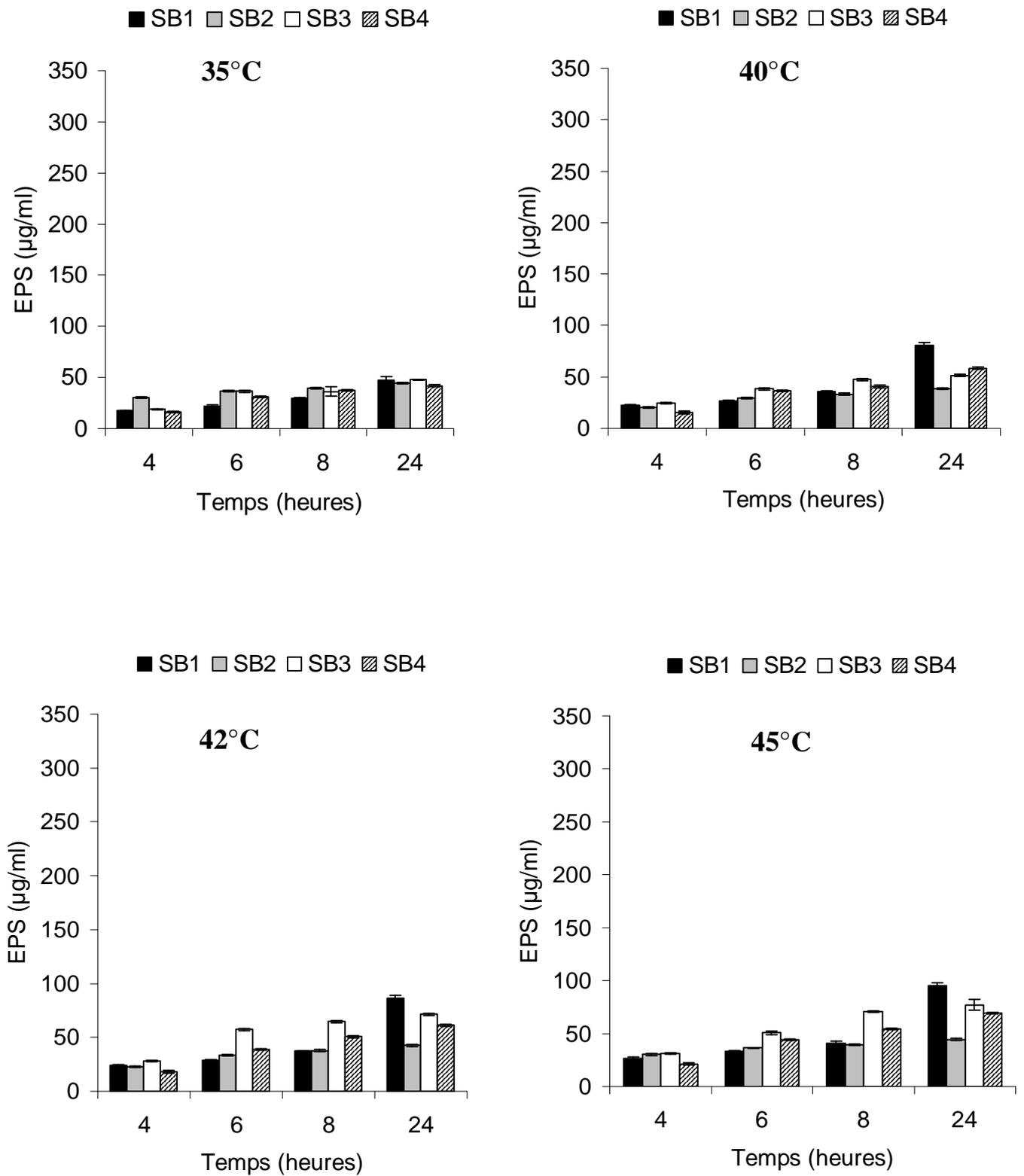


Figure 15: Production d'exopolysaccharides par *S. thermophilus* isolé du lait de brebis.

Les barres verticales représentent les écarts types.

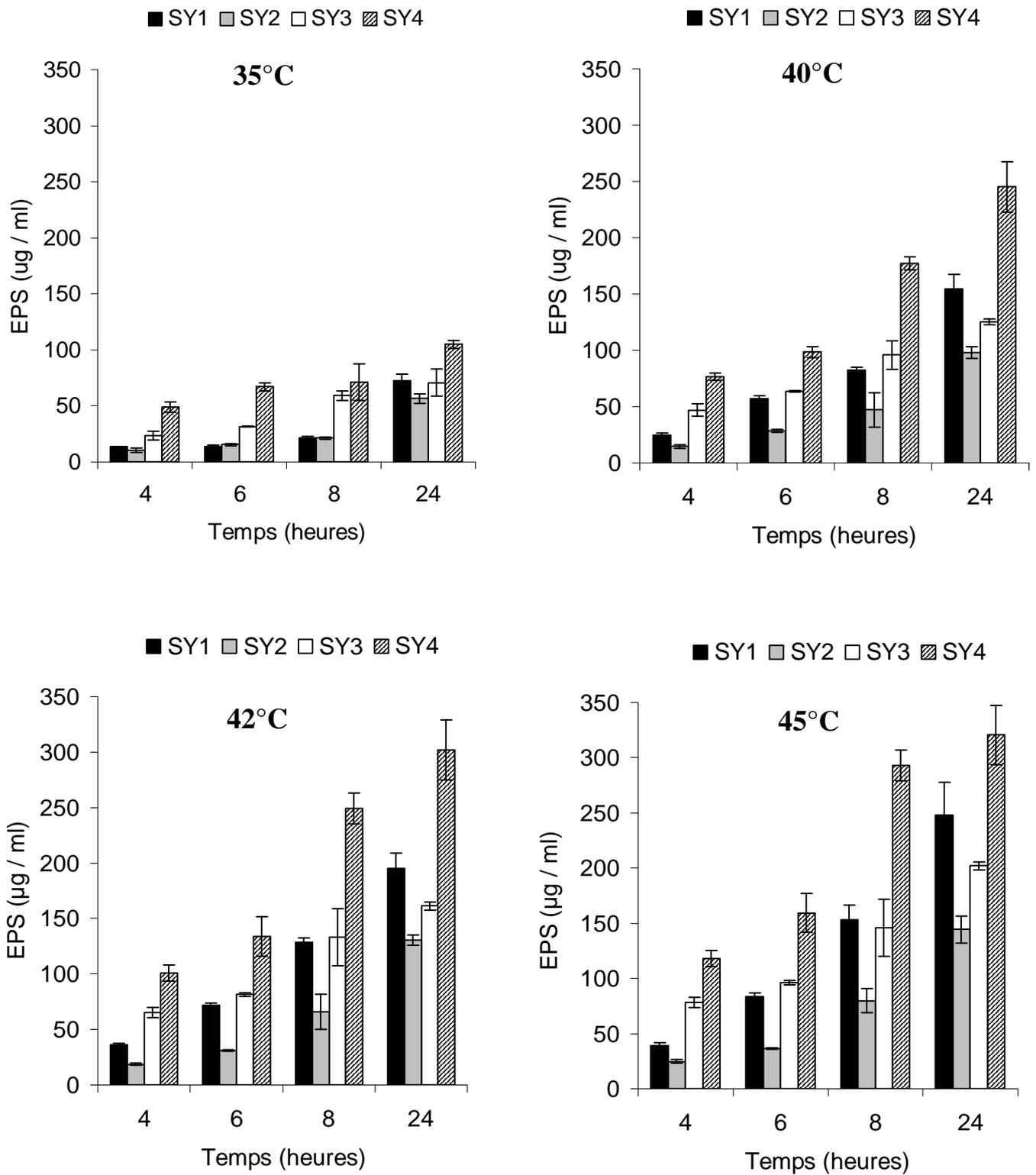


Figure 16: Production d'exopolysaccharides par *S. thermophilus* isolé du yaourt.

Les barres verticales représentent les écarts types.

La production des exopolysaccharides à 35, 40, 42 et 45°C par les souches de *S.thermophilus* présente des différences très hautement significatives ($p<0.001$).

L'activité productrice des EPS dépend non seulement de la température d'incubation mais aussi de la souche, au sein de la même espèce. L'étude de De Vuyst *et al.* (1998) a montré que la température optimale de production des EPS par *S.thermophilus* est de 42°C. Selon Zisu et Shah (2003), cette température est de 40°C. Ces résultats sont différents de ceux de la présente étude qui indique que la température optimale de production des EPS est de 45°C.

- ***Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus***

La production des exopolysaccharides à 35, 40, 42 et 45°C, par les souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* isolées du yaourt présente des différences très hautement significatives ($p<0.001$).

A 35°C, après 24 heures d'incubation, les souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* produisent des quantités d'EPS (31 à 90µg/ml) nettement inférieures à celles des souches de *S. thermophilus* isolées du yaourt, mais supérieures à celles des souches locales (figure 17).

A 40, 42 et 45 °C, la production est plus importante avec un maximum à 45°C : 120 (souche LY2) et 163µg/ml (souche LY1). Ces résultats sont similaires aux données de Kimmel *et al.* (1998).

Mozzi *et al.* (1995) ont rapporté des résultats différents de ceux de la présente étude, concernant l'effet de la température sur la production des exopolysaccharides. En effet, la culture de *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* à 30°C favorise la production des polysaccharides, avec un faible taux de croissance de la souche. Selon ces auteurs, une croissance faible induirait une plus grande quantité d'enzymes impliquées dans la synthèse des polysaccharides.

Les résultats obtenus à travers cette étude montrent que toutes les souches isolées (*S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*) présentent une meilleure production à 45°C par rapport aux autres températures analysées (figure 18).

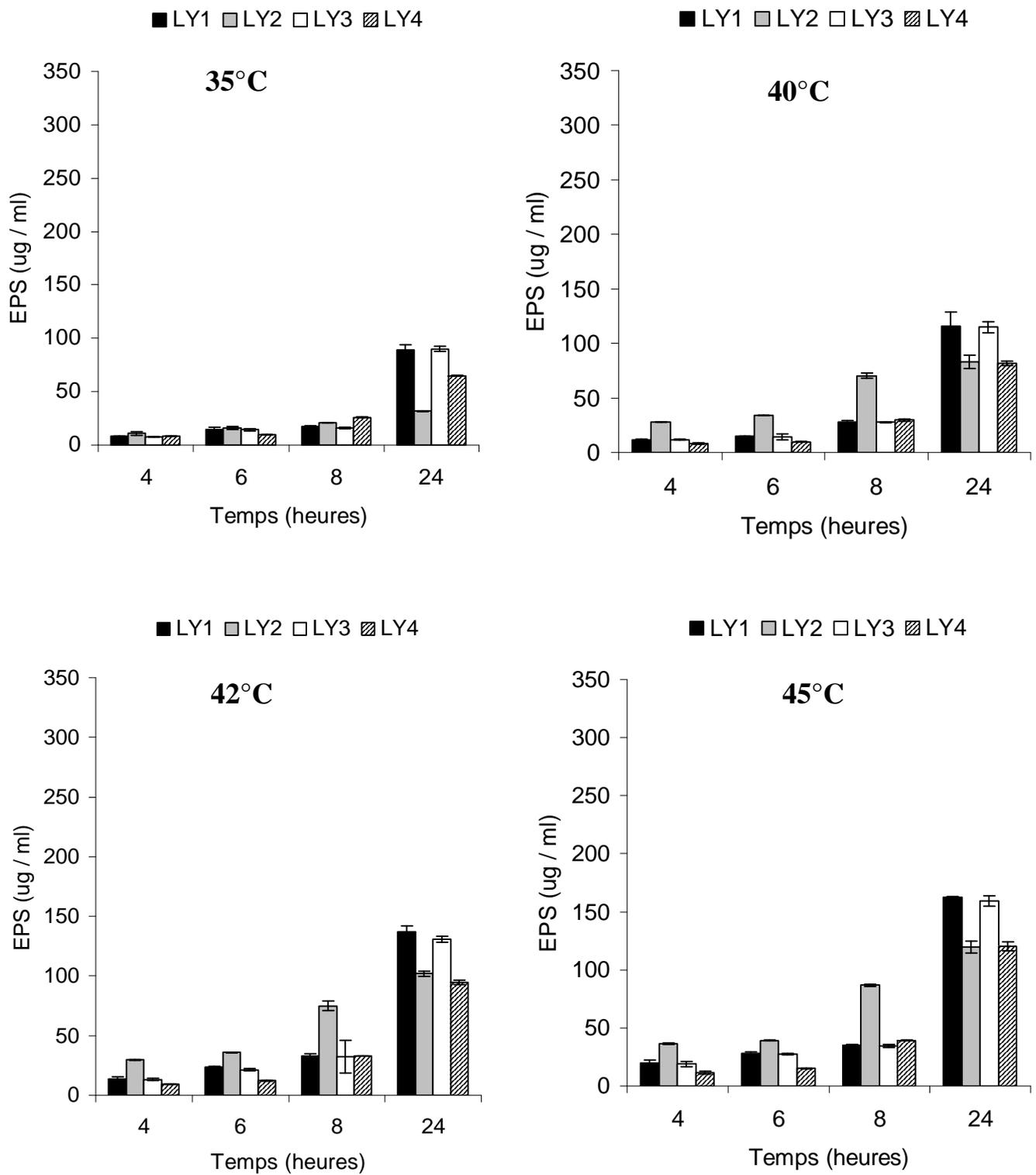


Figure 17: Production d'exopolysaccharides par *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*.

Les barres verticales représentent les écartypes.

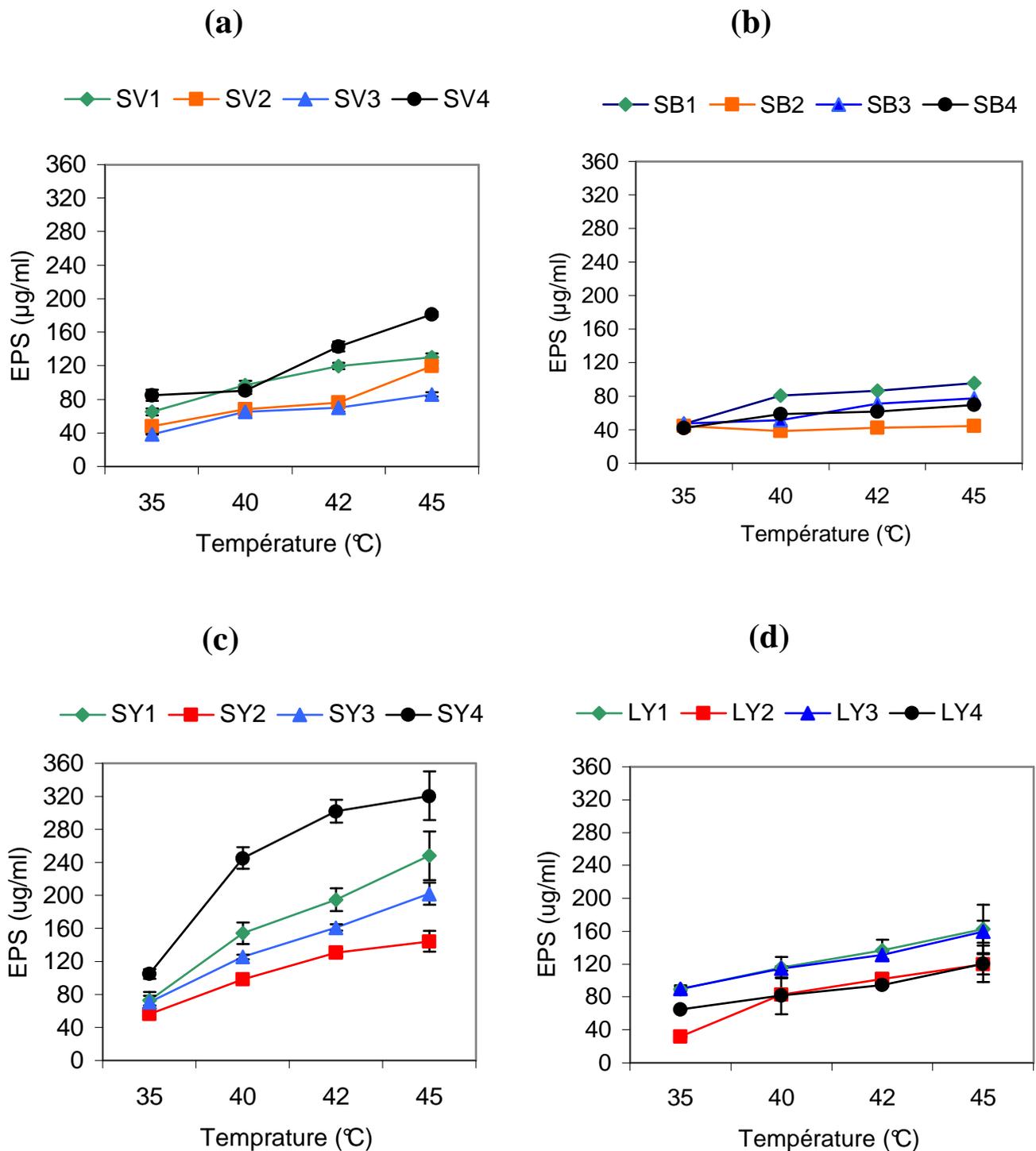


Figure 18 : Effet de la température sur la production des exopolysaccharides par les souches de *S. thermophilus* isolées des laits de vache (a) et de brebis (b), du yaourt (c) et les souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (d).

Les barres verticales représentent les écartypes.

Temps d'incubation : 24 heures.

Frengova *et al.* (2000) ont montré que les bactéries isolées du yaourt produisent des quantités qui varient entre 230 et 270 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches de *S.thermophilus* et entre 400 et 450 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches de *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus*, à 45°C. Ces données sont nettement supérieures aux résultats obtenus dans le présent travail, car les souches de *S. thermophilus* produisent entre 44 et 202 $\mu\text{g/ml}$, exceptées les souches SY1 et SY4, et celles de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* produisent 120 à 162 $\mu\text{g/ml}$, après 24 heures d'incubation.

Par ailleurs, les résultats de l'étude menée par Cerning *et al.* (1990) indiquent que les souches épaississantes de *S. thermophilus* et de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* produisent entre 50 et 340 mg/l et 60 et 425 mg/l , respectivement. Par conséquent, les souches isolées du yaourt et la majorité des souches locales peuvent être considérées comme étant épaississantes car la production est nettement supérieure à 50 $\mu\text{g/ml}$.

4.2. Cultures mixtes

Les souches SV4, SB1, SY4 (*S. thermophilus*) et LY1 (*Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*) ont été choisies pour les cultures mixtes à un rapport Streptocoques/Lactobacilles égal à 1.

A 42°C, la culture mixte LY1+SB1 produit une quantité d'exopolysaccharides légèrement plus faible (363 $\mu\text{g/ml}$) que celle des cultures LY1+SV4 et LY1+SY4, après 24 heures d'incubation (figure 19). La production des exopolysaccharides, en cultures mixtes présente des différences très hautement significatives ($p < 0.001$), selon les souches de *S. thermophilus* ainsi que la température d'incubation.

A 35, 40, 42 et 45°C, la production d'EPS en cultures mixtes, est meilleure que celle des cultures pures. En cultures mixtes, elle est plus importante à 42°C (363 à 505 $\mu\text{g/ml}$), qu'à 35, 40 et 45 °C (figure 19). L'amélioration de la production des exopolysaccharides en cultures mixtes serait due à l'existence d'une synergie entre les souches des deux espèces.

L'effet de la température sur la production des exopolysaccharides en cultures mixtes (figure 20) montre une meilleure production à 42°C, contrairement aux cultures pures dont la température optimale de production des EPS est de 45°C.

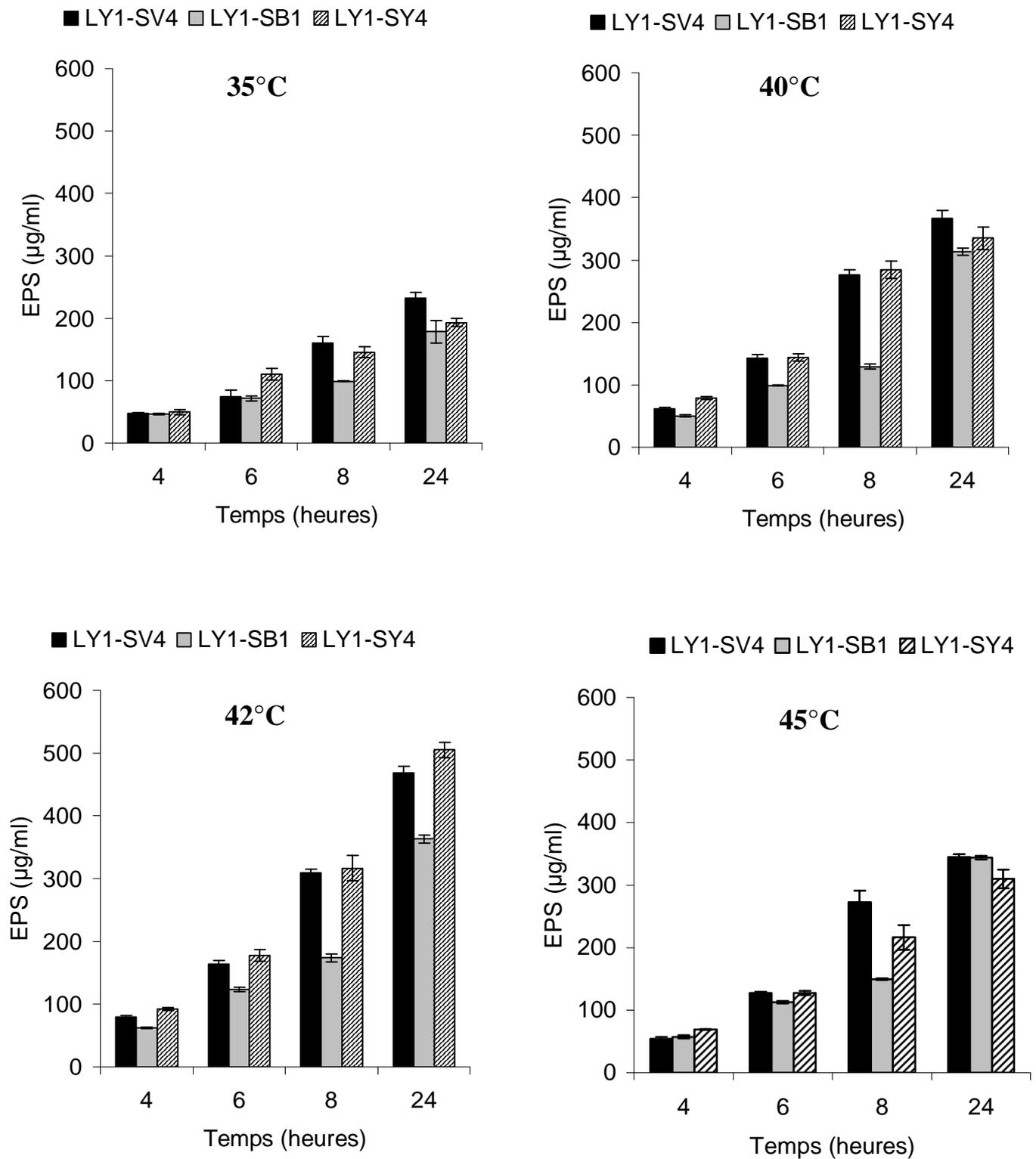


Figure 19 : Production d'exopolysaccharides en cultures mixtes.

Les barres verticales représentent les écartypes.

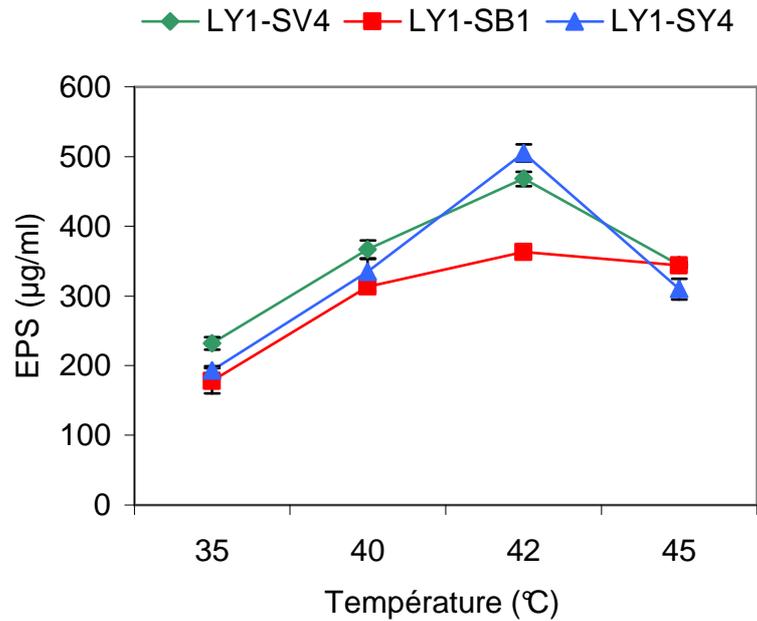


Figure 20 : Effet de la température sur la production des exopolysaccharides en cultures mixtes.

Temps d'incubation : 24 heures.

5. Cinétique de production des exopolysaccharides

La cinétique de production des polysaccharides dans le lait écrémé par les souches SY1 et SY4, à 45 °C, est présentée dans la figure 21. La production débute après 2 heures d'incubation avec une faible production, 15 et 56 µg/ml respectivement pour les souches SY1 et SY4. La concentration en EPS augmente jusqu'à 248 et 320 µg/ml après 24 heures pour ces mêmes souches. Après 48 heures d'incubation, une diminution de la quantité d'EPS est observée pour la souche SY1, probablement suite à une dégradation des polymères par des hydrolases synthétisées par la souche.

Récemment, Lin et Chang Chien (2007) ont montré que la diminution de la production des exopolysaccharides après une fermentation prolongée est due à une activité glycohydrolytique.

Les cinétiques de la production des polysaccharides et de la croissance des souches indiquent que les polymères sont synthétisés au cours de la phase exponentielle, donc selon le modèle d'un métabolite primaire. Ces résultats confirment les données de Zisu et Shah *et al.* (2003) et de Vaningelgem *et al.* (2004).

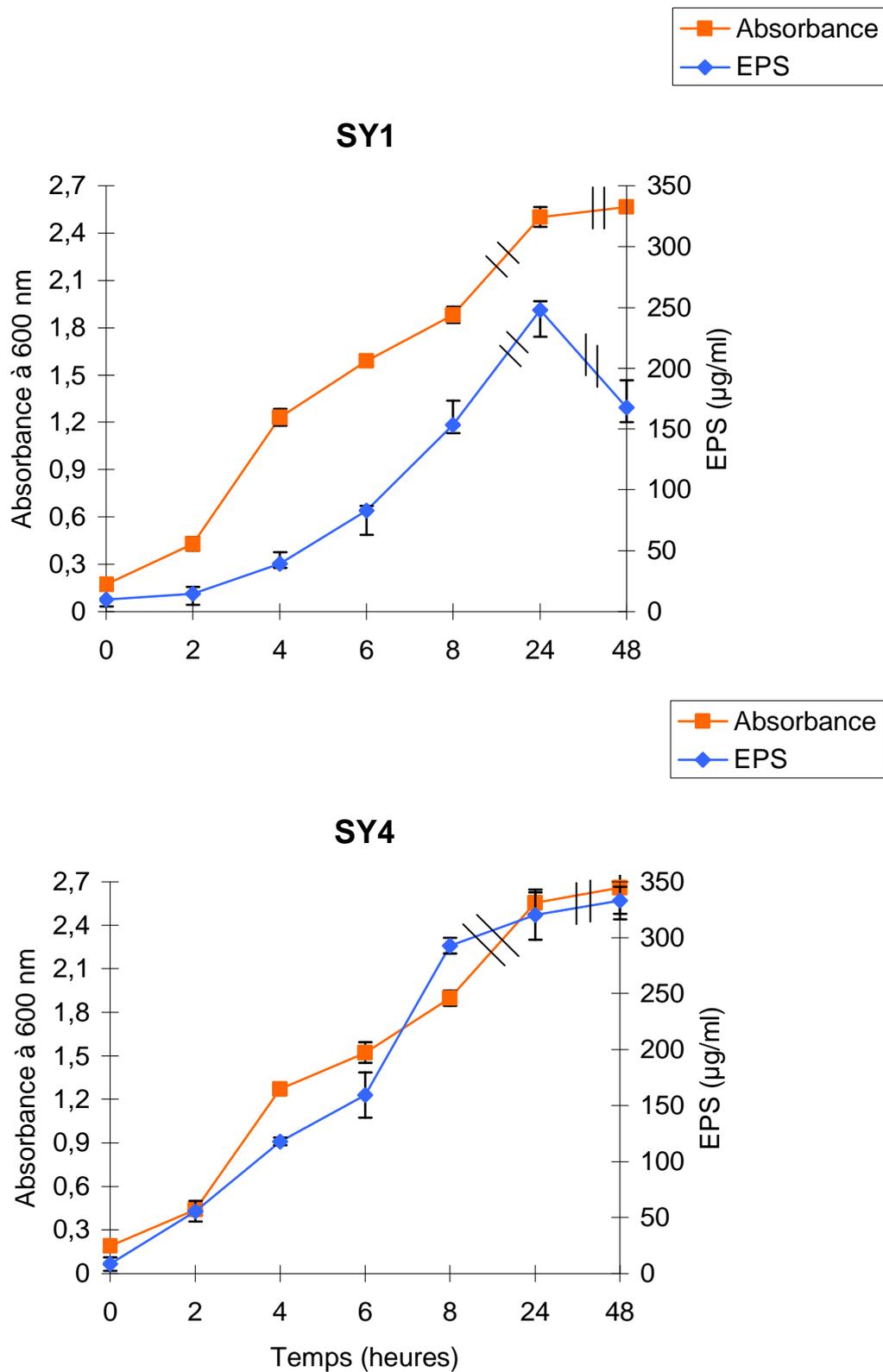


Figure 21 : Croissance et production des exopolysaccharides des souches SY1 et SY2.

Les barres verticales repentent les écartsypes.

Température d'incubation : 45°C.

Les cinétiques de la production des polysaccharides et de la croissance des souches indiquent que les polymères sont synthétisés au cours de la phase exponentielle, donc selon le modèle d'un métabolite primaire. Ces résultats confirment les données de Zisu et Shah *et al.* (2003) et de Vaningelgem *et al.* (2004).

Cependant, les bactéries lactiques peuvent élaborer des polysaccharides durant la phase stationnaire de croissance selon le modèle d'un métabolite secondaire.

A ce titre, des EPS sont produits par *Lactobacillus rhamnosus* R au début de la phase stationnaire avec un maximum de 450 mg/l. Un taux de réduction de 82 % est observé après 48 heures de fermentation (Pham *et al.*, 2000).

La figure 22 montre l'existence d'une très bonne corrélation ($r = 0,9$) entre la croissance et la production des exopolysaccharides, pour les souches SY1 et SY4.

6. Effet de la température sur le pouvoir texturant

Les polysaccharides exocellulaires élaborés au cours de la fermentation par certaines souches de bactéries lactiques peuvent agir comme agents épaississants naturels qui améliorent la viscosité et la consistance des produits laitiers fermentés. La viscosité développée dans le lait par les souches de *S. thermophilus* et de *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* est mesurée dans du lait écrémé à 35, 40, 42 et 45°C, en cultures pures et en cultures mixtes ; les résultats sont exprimés en milli-Pascal-seconde.

6.1. Cultures pures

- *Streptococcus thermophilus*

Les figures 23, 24 et 25 montrent l'évolution de la viscosité développée par les souches de *S. thermophilus*.

A 35°C, la viscosité développée est faible pour toutes les souches de *S.thermophilus*. Le pouvoir texturant des bactéries étudiées est meilleur à 45°C. A 35°C, la viscosité varie entre 36 (souche SV2) et 85 mPa.s (souche SY4), après 24 heures d'incubation. A 45 °C, la viscosité développée atteint des valeurs comprises entre 50 (souche SB4) et 159 mPa.s (souche SY4).

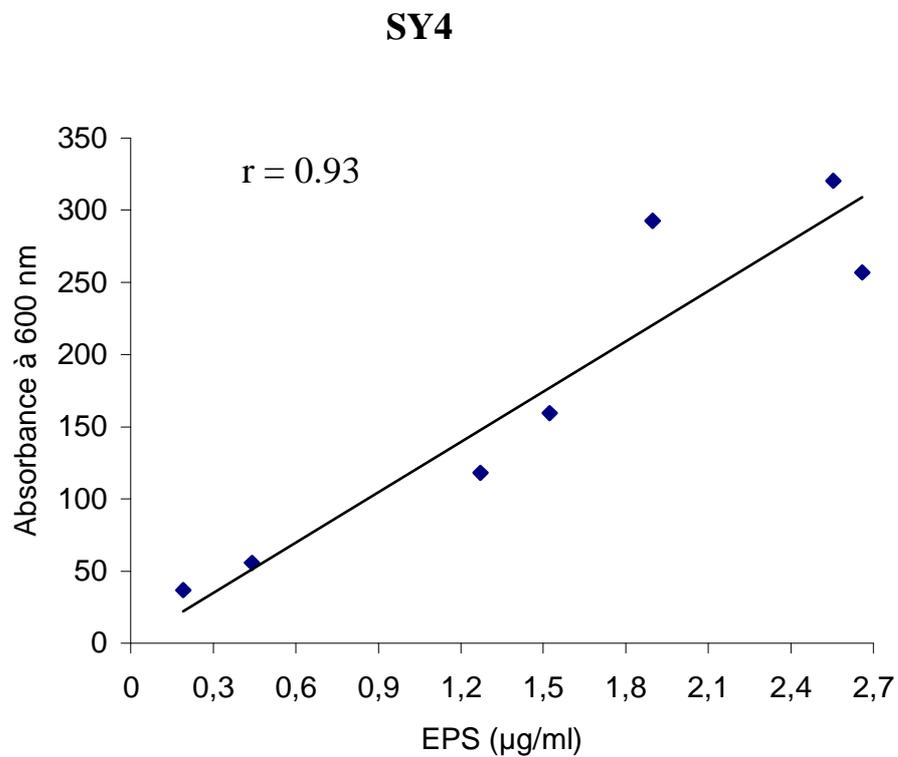
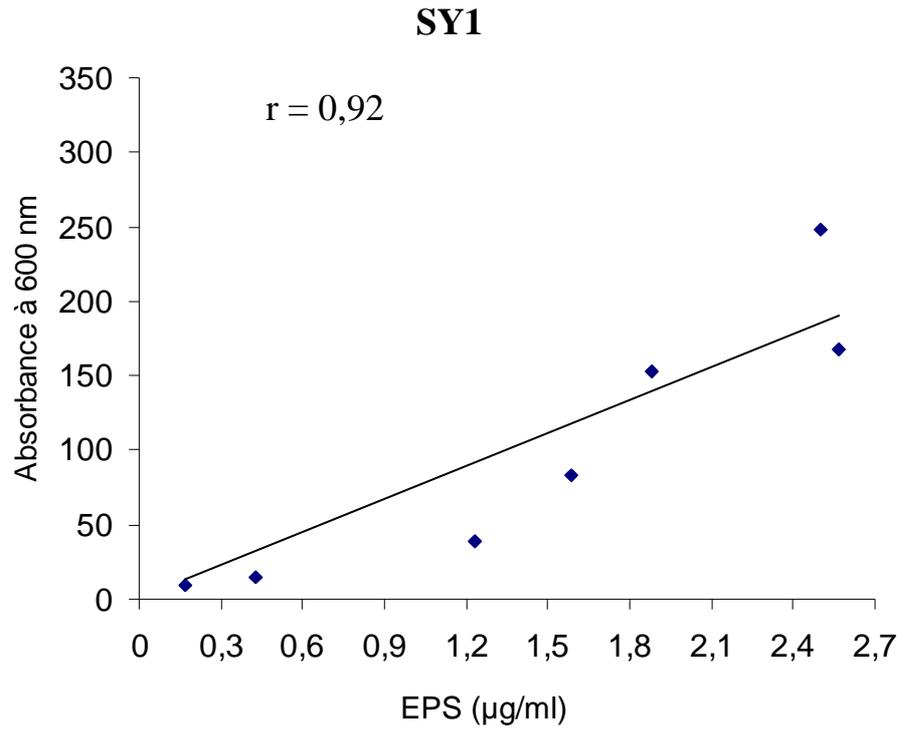


Figure 22: Corrélation entre la production d'EPS et la croissance des souches SY1 et SY4.

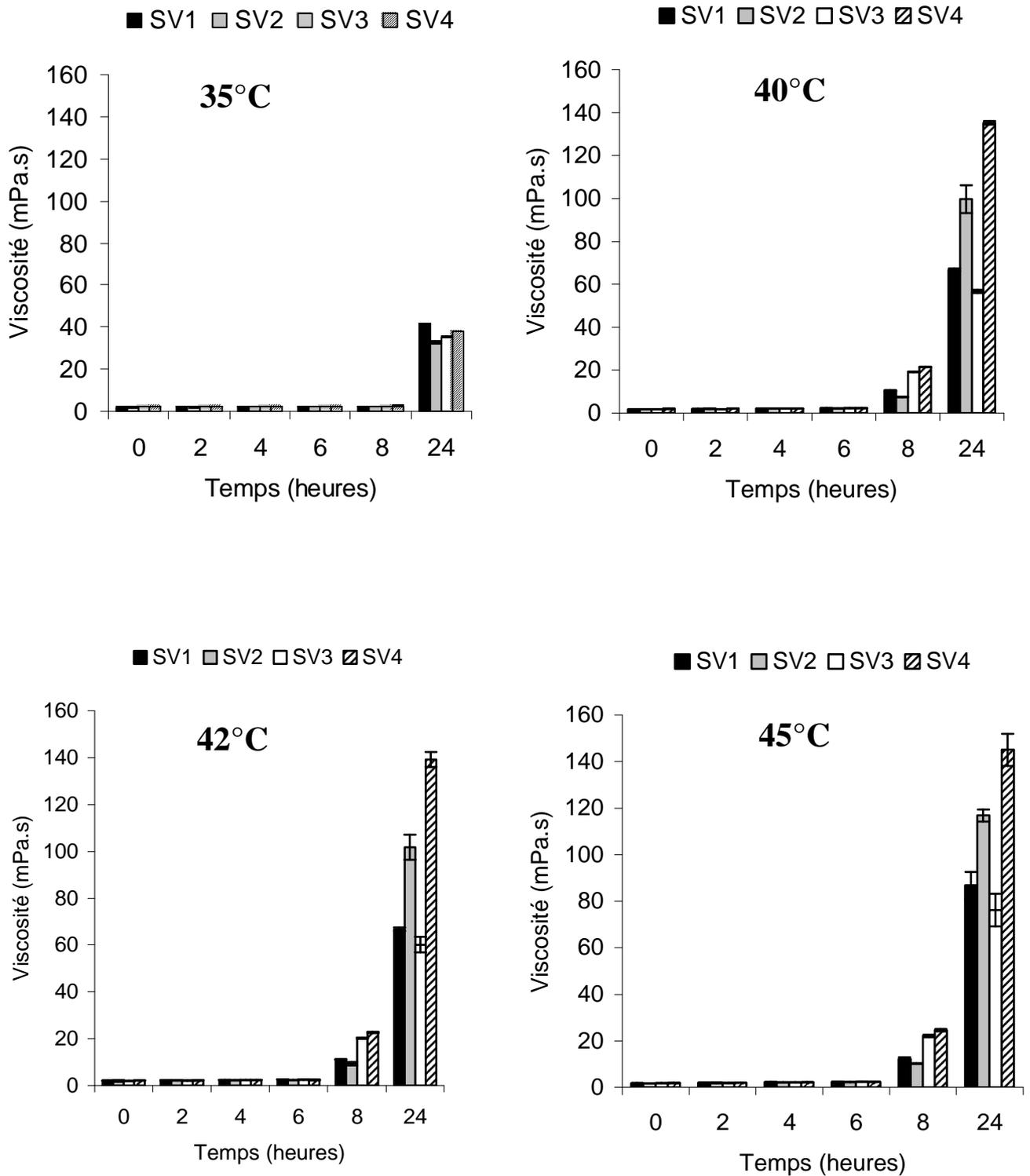


Figure 23 : Viscosité développée par *S. thermophilus* isolé du lait de vache.

Les barres verticales représentent les écartypes.

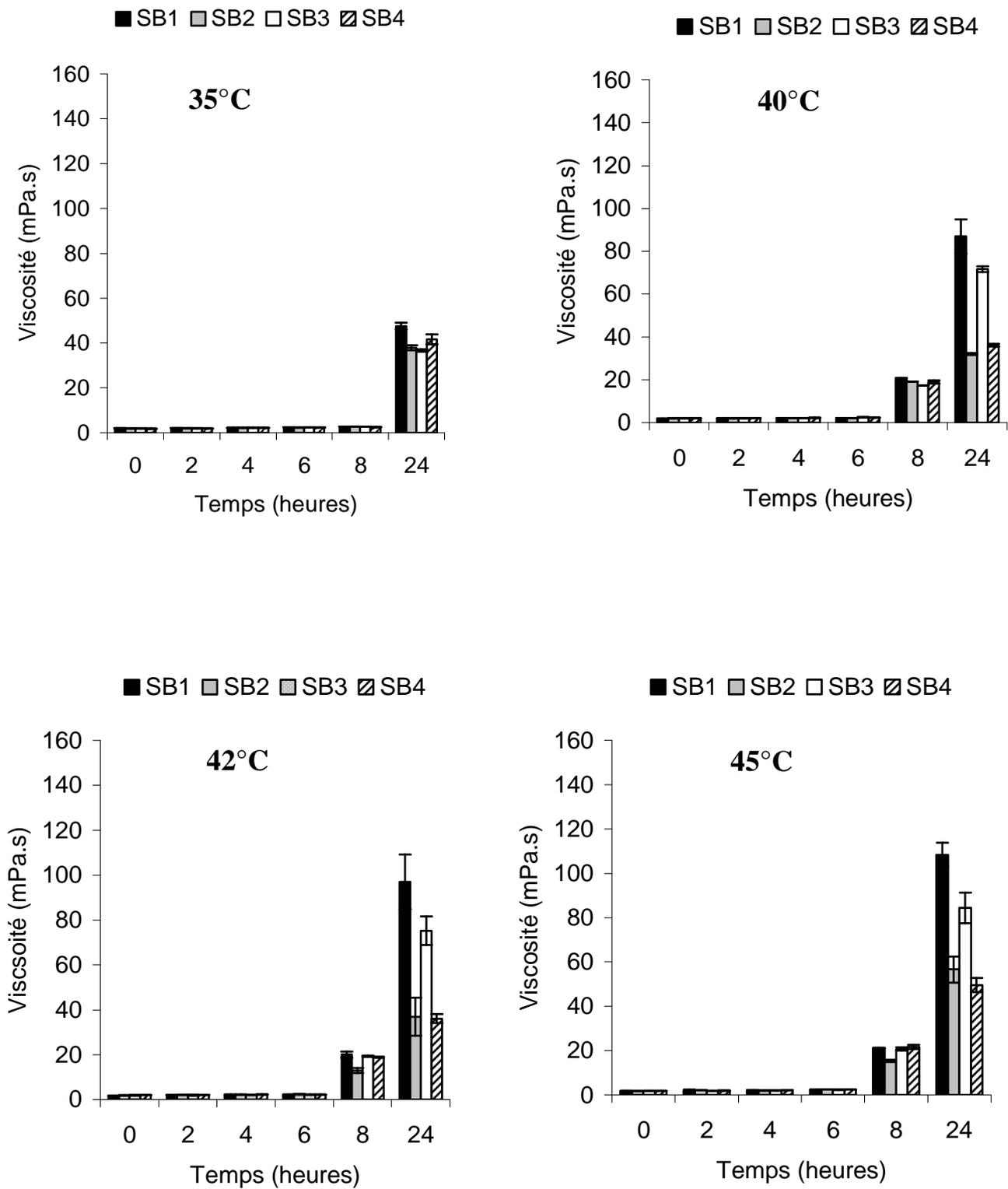


Figure 24 : Viscosité développée par *S. thermophilus* isolé du lait de brebis.

Les barres verticales représentent les écartypes.

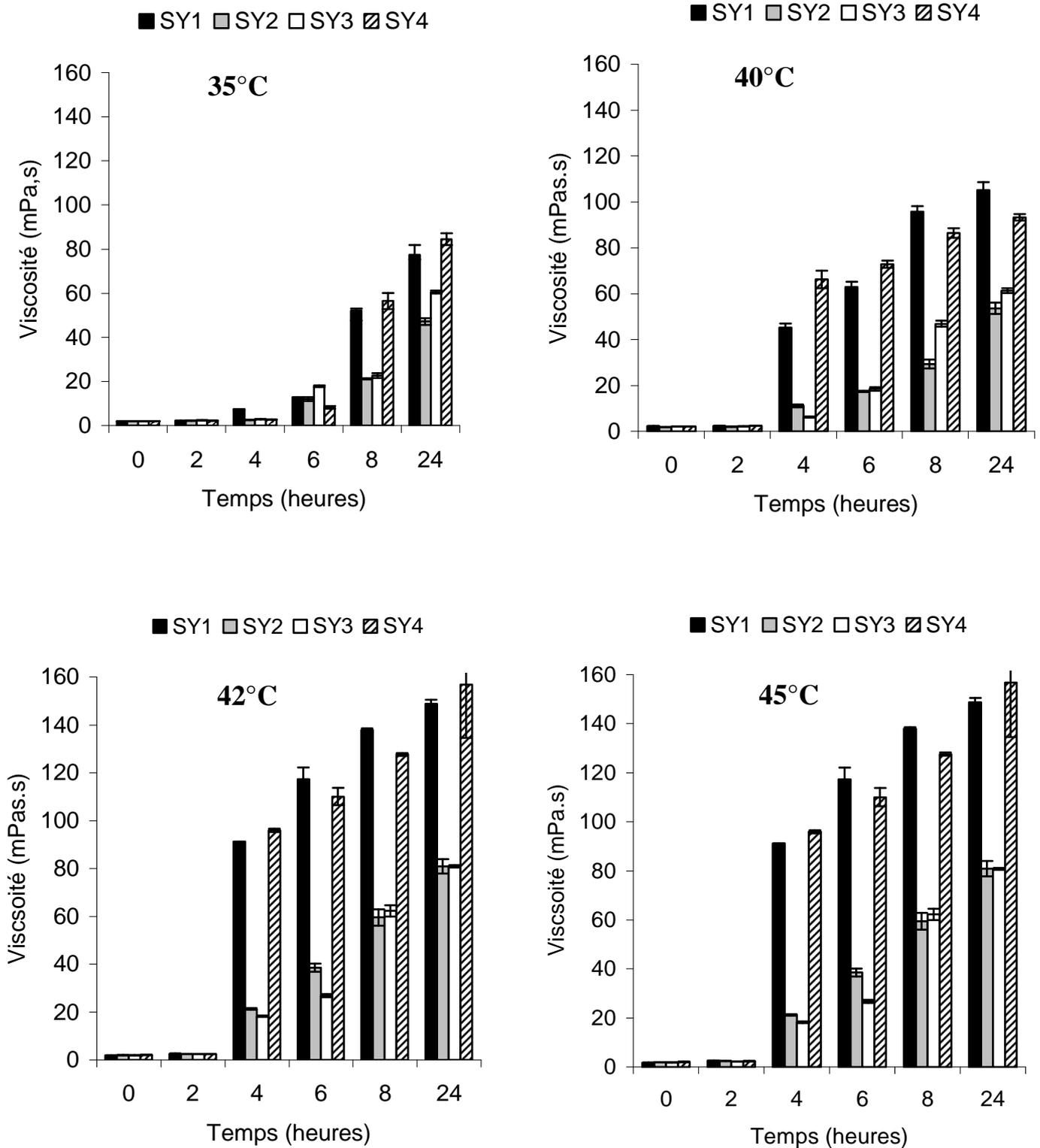


Figure 25 : Viscosité développée par *S. thermophilus* isolé du yaourt.

Les barres verticales représentent les écarts types.

La viscosité développée par les souches de *S. thermophilus* présente des différences très hautement significatives ($p < 0.001$). Les souches isolées du yaourt ont un pouvoir épaississant supérieur à celui des souches locales ; cette différence serait liée au fait que les streptocoques du yaourt produisent de grandes quantités d'exopolysaccharides (144 et 321 $\mu\text{g/ml}$) relativement aux souches locales dont la quantité d'EPS produits varie entre 44 et 108 $\mu\text{g/ml}$.

Selon Cerning *et al.* (1990), les souches épaississantes de *S. thermophilus* développent des viscosités allant de 40 et 240 mPa.s pour des quantités d'EPS comprises entre 50 et 340 $\mu\text{g/ml}$. D'après les résultats de la présente étude, les souches isolées des laits de vache et de brebis sont épaississantes exceptées les souches SB2 et SB4 ; les souches isolées du yaourt sont épaississantes dont la production varie entre 85 (souche SY2) et 159 mPa.s (souche SY4).

La viscosité développée ne dépend pas seulement de la quantité d'exopolysaccharides mais également des interactions entre les exopolysaccharides, les caséines et les bactéries, de la nature (type) des polymères produits et des produits métaboliques sécrétés dans le milieu, tel que l'acide lactique (Cerning *et al.*, 1991 ; Moreira *et al.*, 2000). C'est le cas des souches LY1 et LY3 qui produisent la même quantité d'exopolysaccharides (130 $\mu\text{g/ml}$) mais qui développent des viscosités différentes, 90 et 123 mPa.s, respectivement.

- ***Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus***

A 35°C, les souches de *Lb delbrueckii ssp bulgaricus* développent, une viscosité faible, située entre 40 (souche LY1) et 53 mPa.s (souche LY3). A 40, 42 et 45 °C, le pouvoir texturant est plus important ; il atteint une valeur de 122 mPa.s (souche LY3) à 45°C, après 24 heures d'incubation (figure 26).

La pouvoir texturant développé par les souches de *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* isolées du yaourt présente des différences très hautement significatives selon la température ($p < 0.001$).

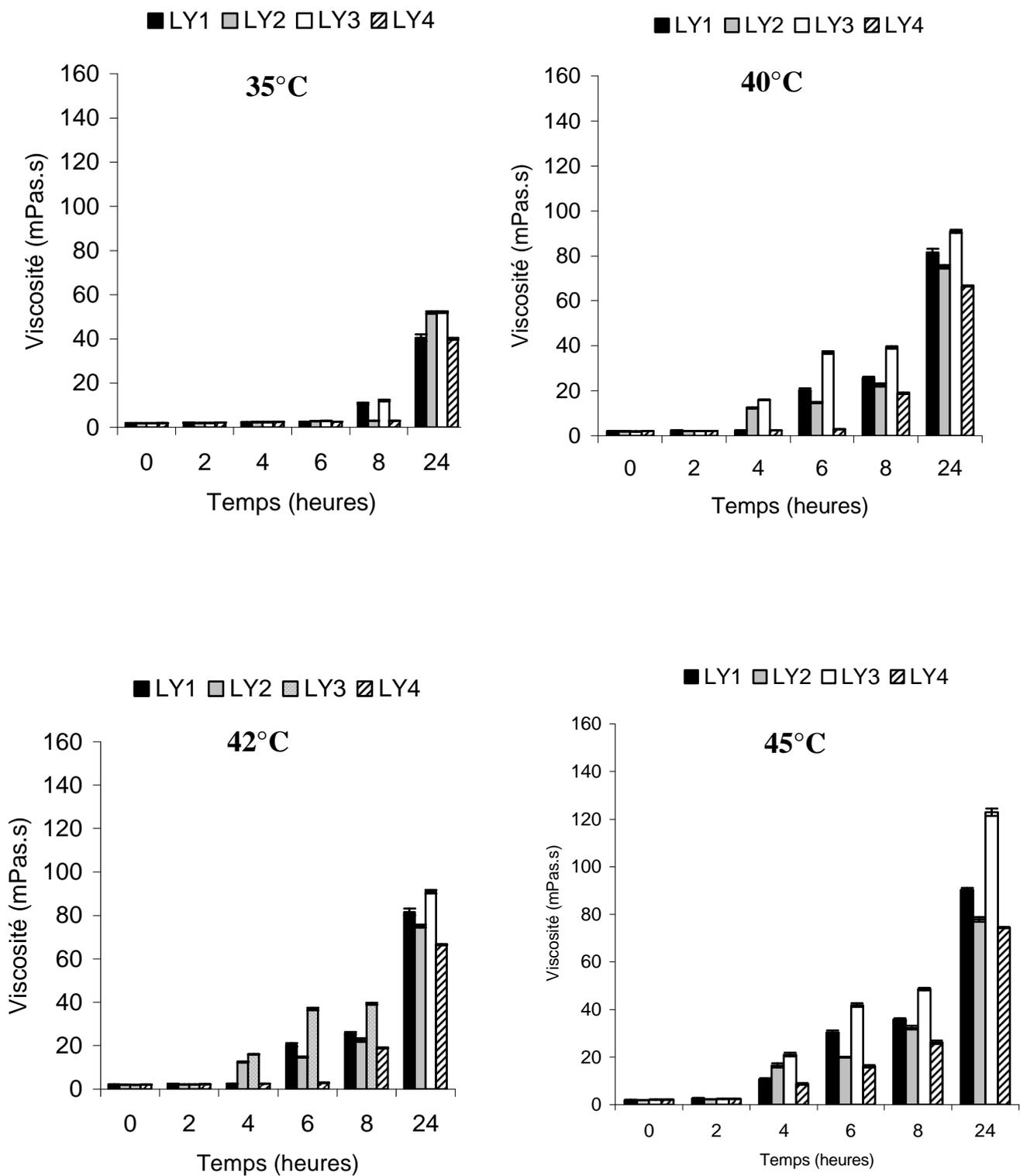


Figure 26 : Viscosité développée par *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* isolé du yaourt. Les barres verticales représentent les écartypes.

6.2. Cultures mixtes

Le pouvoir épaississant des souches de *S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* en cultures mixtes est meilleur que celui des cultures pures ; la viscosité développée pour les trois cultures mixtes est comprise entre 139 et 199 mPa.s à 35°C, après 24 heures d'incubation, tandis qu'à 40°C et 45°C, la viscosité atteint des valeurs comprises entre 283 et 401 mPa.s. La viscosité développée à 42°C est plus importante ; elle est de 423 et 452 mPa.s pour les cultures LB1/SV4 et LB1/SY4, respectivement (figure 27).

La viscosité est trois fois plus élevée dans les cultures mixtes que dans les cultures pures. La viscosité développée par la culture mixte LY1/SY4 est de 460 mPa.s. En culture pure les souches LY1 et SY4 développent des viscosités de 85 et 159 mPa.s, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Moreira *et al.* (2000).

Le coefficient de corrélation entre la viscosité développée et la quantité d'exopolysaccharides produits est élevé ($r = 0,9$) ; ce coefficient est également important pour la viscosité et l'acidité développée ($r = 0,92 - 0,99$) (figures 28 et 29). La viscosité dépend de plusieurs facteurs dont l'acidité, la quantité d'exopolysaccharides produits,...

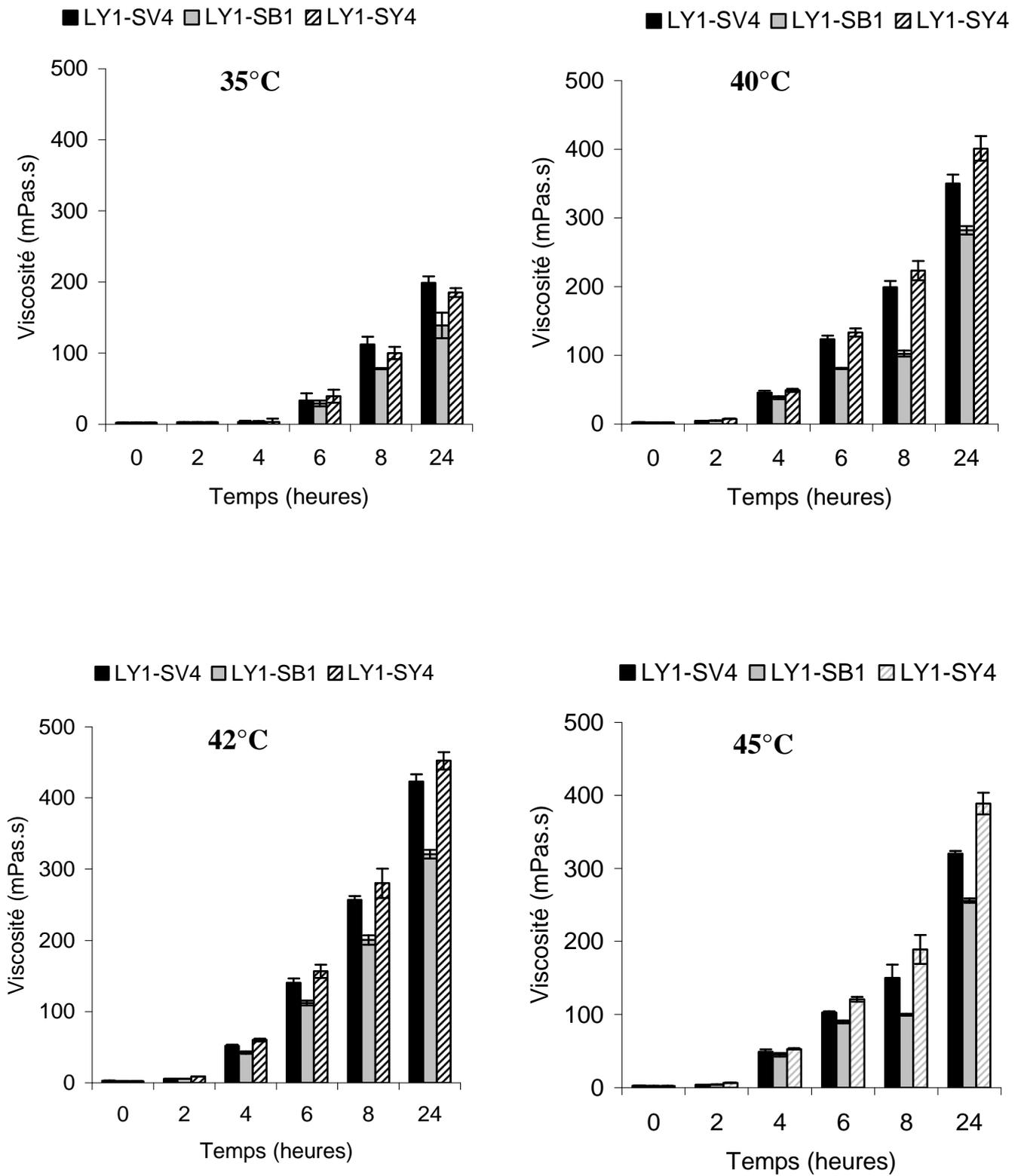


Figure 27 : Viscosité développée par les cultures mixtes.

Les barres verticales représentent les écartypes.

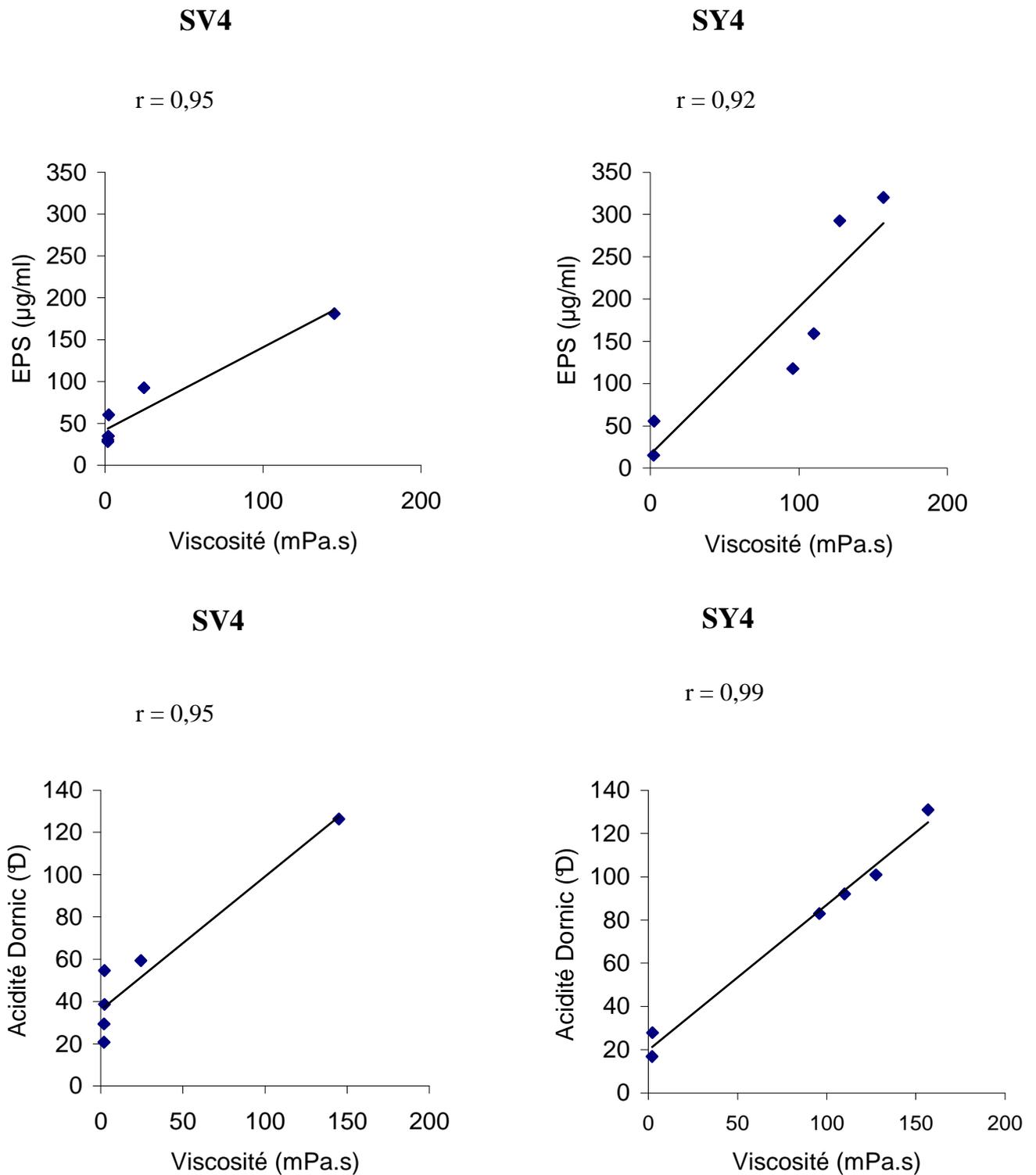


Figure 28 : Corrélation entre la viscosité développée, la production d'EPS et l'acidité élaborée par les souches SV4 et SY4

Conclusion

Au cours de la présente étude, des bactéries lactiques thermophiles ont été isolées à partir des laits de vache et de brebis, et du yaourt. Parmi les souches isolées, seize ont été identifiées sur la base de caractères biochimiques et physiologiques. Les résultats d'identification indiquent que les souches appartiennent aux espèces *S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*. Ces souches ont été caractérisées du point de vue technologique par l'évolution du pH et de l'acidité titrable à 42°C et par l'évaluation de la production des exopolysaccharides et l'estimation du pouvoir texturant par la mesure de la viscosité développée dans le lait écrémé reconstitué, à 35, 40, 42 et 45°C.

Les souches de *S. thermophilus* isolées du yaourt possèdent des activités acidifiantes meilleures (pH faible et acidité élevée) que celles des souches isolées des laits de vache et de brebis et des souches de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*.

La production des exopolysaccharides dans de lait par les souches de *S. thermophilus* et de *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* en cultures pures est importante à 42 et 45°C avec une meilleure production à 45°C. Les souches SY1 et SY4 isolées du yaourt produisent respectivement, 248 et 320 µg/ml dans le lait, après 24 heures d'incubation à 45°C.

En cultures mixtes, la production des exopolysaccharides est supérieure à celle des cultures pures. La culture mixte LY1/SY4 est la plus active, avec une production de 505µg/ml à 42°C.

L'étude de la cinétique de production des exopolysaccharides par les souches SY1 et SY4 indique que ces métabolites sont synthétisés au cours de la phase exponentielle de croissance. La synthèse répond au modèle classique de synthèse des métabolites primaires.

L'activité texturante est meilleure à 45°C pour les cultures pures et à 42°C, pour les cultures mixtes. La viscosité développée dans le lait par les cultures mixtes est plus importante que celles des cultures pures.

En fin, il serait souhaitable que ce travail soit complété par :

- L'étude de l'influence des autres paramètres tels que le pH, la source de carbone,..., sur la production des exopolysaccharides.
- L'identification de la nature des polymères synthétisés.
- L'analyse des activités biologiques des polymères produits (activités immunomodulatrices, anti-tumorales,...).

Références bibliographiques

A

Accolas J. P., Hemme D., Desmazeaud M. J., Vassal L., Bouillanne C. et Veaux M. (1980). Les levains lactiques thermophiles : Propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait*, 60: 487.

Ahmed N.H., El Soda M., Hassan A.N. et Frank J. (2005). Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. *LWT*, 38: 843-847.

Amatayakul T., Halmos A. L., Sherkat F. et Shah N. P. (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J*, 16: 40-51.

Ayad E. H. E., Nashat S., El-Sadek H., Metwaly H. et El-Soda M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiol*, 21:715-725.

B

Badis A., Guetarni D., Boudjema M. 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 Microbiol*, 21: 579-588.

Bautista E. S., Dahiya R. S. et Speck M. L. (1966). Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *J. Dairy Res*, 33: 299-307.

Beal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N. et Corrieu G. (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *J. Dairy Sci*, 82:673-681.

Bouillanne C. et Desmazeaud M J. (1980). Etude de quelques caractères de souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées en fabrication de yoghourt et proposition d'une méthode de classement. *lait*, LX : 458-473.

Bouton Y., Guyot P., Dansen A. et Grappin R. (1993). Activité protéolytique de souches de Lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. I- Validation sur minifromages des techniques da laboratoire. *Lait*, 73: 265-278.

Bouzar F., Cerning J. et Desmazeaud M. (1996). Exopolysaccharides production in milk by *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *J. Dairy Sci*, 79: 205-211.

Bouzar F., Cerning J. et Desmazeaud M. (1997). Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yoghurt production. *J. Dairy Sci*, 80: 2310-2317.

Broadbent J. R., McMahon D. J., Welker D. L., Obreg C. J. et Moineau S. (2003). Biochemistry, Genetics, and applications of Exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci*, 86 : 407-423.

Bubb W. A., Urashima T, Fujiwara R., Shinnai T. et Ariga H. (1997). Structural characterization of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. *Carbohy. Res*, 301:41–50.

C

Cerning J ., Bouillanne C., Landon M. et Desmazeaud, M. J. (1990). Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sciences des Aliments*, 10: 443-451.

Cerning J., Bouillanne C. et Landan M. (1991). Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci*, 75: 692-699.

Cerning J., Renard C. M. G. C., Thibault J. F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M et Topisirovic L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharides production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol*, 60: 3914 -3919.

Cerning J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75: 463-472.

Chabot S., Yu H-L., De Léséleuc L., Cloutier D., Van Calsteren M-R., Lessard M., Roy D., Lacroix M. et Oth D. (2001). Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes. *Lait*, 81: 683–697.

Chamba J. F. et Prost F. (1989). Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques utilisées dans la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*, 69: 417-431.

Chammas G. I., Saliba R., Corricu G. et Beal C. (2006). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk « laben ». *Int. J. Food Microbiol*, 110: 52-61.

D

De Roissart H. (1986). Bactéries lactiques. In : « Laits et produits laitiers ». Ed. Tec et Doc Lavoisier. pp. 343-407.

De Vuyst L., Vanderveken F., Van de Ven S. et Degeest B. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol*, 84: 1059-1068.

De Vuyst L. et Degeest B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 153–177.

De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. et Degeest B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*, 11: 687-707.

Degeest B., Janssens B. et De Vuyst L. (2001). Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0–1: Production kinetics, enzyme activities, and EPS yields. *J. Appl. Microbiol*, 91: 470–477.

Dellaglio F. (1989). Characteristics of thermophilic lactic acid bacteria. Les Laits Fermentés. *Actualité de la recherche*. pp.11-18.

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M. C. et Janssens D. (1994). Caractéristiques des bactéries lactiques. In : « Bactéries lactique ». Ed. Loriga. Vol.1.pp. 25-60.

Desmazeaud M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*. 5 :331.

Devauchelle G. (1981). La qualité bactériologique du Lait et des produits laitiers analyses et tests. Deuxième édition .Edition Tec et Doc.

Duboc F. et Mollet B. (2001). Application of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J*, 11: 759-768.

F

Faber E.J., Zoon P., Kamerling J.P. et Vlieninghard J.F.G. (1998). The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohy. Res*, 310: 269-276.

Faber E. J., van den Haak M. J., Kamerling J. P. et Vlieninghart J.F.G. (2001). Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohy. Res*, 331: 173-182.

Fira D., Kojic M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic I. et Topisirovic L. (2001). Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J. Appl. Microbiol*, 90 :123.

Frengova G. I., Simova E. D., Bshkova D. M. et Simov Z. I. (2000). Production and monomer composition of exopolysaccharide by yogurt starter cultures. *Can. J. Microbiol*, 46: 1123-1127.

G

Gamar L., Blondeau K. et Simonet J. M. (1997). Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol*, 83: 281-287.

Gancel F. et Novel, G. (1994). Exopolysaccharides Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Cultures. 2. Distinct Modes of Polymer Production and Degradation Among clonal variants. *J. Dairy Sci*, 77: 689-699.

Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M. et Torriani S. (1999). Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy. J*, 9: 125-134.

Gerdes S. K ., Harper W. .J. et Miller G. (2001). Bioactive compounds of whey and cardiovascular health. Application monograph cardiovascular health, pp.1-8.

Girard M. et Schaffer-Lequart C. (2007). Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *Int. Dairy. J*, 17: 666-673.

Grobben G. J., Chin-Joe I., Kitzen V.A., Boels I. C., Boer F., Sikkema J., Smith M. R. et de Bont J. A. M. (1998). Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subso. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 1333-1337.

Guiraud J. et Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. L'usine nouvelle. Paris. pp. 230-240.

H

Hassan A. N., Frank J. F., Schimidth K. A. et Shalabi S. I. (1996). Rheological of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *J. Dairy Sci*, 79: 2091–2097.

Hassan A. N., Ipsen R., Janzen T. et Qvist B. (2003). Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *J. Dairy Sci*, 86: 1632-1638. xs

J

Jolly L., Vincent S.J.F., Duboc P. et Neeser J.R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 367-374.

K

Kimmel S. A., Roberts R. F. et Ziegler G. R. (1998). Optimisation of Exopolysaccharides production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol*, 64 (3): 659-664.

Kitazawa H., Harata T., Uemura J., Saito T., Kaneko T. et Itoh T. (1998). Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol*, 40: 169-175.

L

LeBlanc J.G., Matar C., Valdéz J.C., LeBlanc J. et Perdigeon G. (2002). Immunodulating Effects of Peptidic Fractions Issued from Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci*, 85:2733.

Lemoine J., Chirat F., Wieruszkeski J.-M., Strecker G., Favre N et Neeser J.-R. (1997). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi339 and Sfi12. *Appl. Environ. Microbiol*, 63 :3512-35.

Levander F. et Radstrom P. (2001). Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharide biosynthesis in Glucose and Lactose utilizing *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol*, 67:2734-2738.

Lin T.Y. et Chang Chien M.-F. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100:1419-1423.

Loubière P., Novak L., Coccagn-Bousquet M. et Linidley N. D. (1996). Besoins nutritionnels des bactéries lactiques : interaction entre flux de carbone et d'azote. *Lait*, 75 : 5-12.

Low D., Ahlgren J. A., Horne D., McMahon D. J., Oberg, C. J. et Broadbent J. R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol*, 64 : 2147-2151.

M

Macedo M.G., Lacroix C. et Champagne C.P. (2002). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by

Lactobacillus rhamnosus RW-9595 in a whey permeate based medium. *Biotechnol. Prog*, 18: 167-173.

Marshall V.M., Dunn H., Elvin N., McLay Y.G. et Laws A P. (2001). Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. *Carbohydr. Res*, 331:413-422.

Meijer W.C., Tacken M., Noomen A. et Hugenhof J. (1994). Determination of growth parameters of Lactococci in milk and ultrafiltered milk. *J. Dairy Sci*, 78:17-23.

Moreira M., Abraham A. et De Antoni G. (2000). Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *J. Dairy Sci*, 83: 395.

Moriera B. M., Bevilacqua A. et Antoni G. (2003). Manufacture of Quattrolo cheese using exopolysaccharide producing starter cultures. *Milchwissenschaft*, 58 (5/6): 301-303.

Mozzi F., de Giori G.S., Oliver G., de Valdez G.F. (1996) Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissen* 51:670-673.

Mozzi F., Olivier G., De giori G. S. et De valdez. (1995). Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*. 50(2): 80-82.

N

Nagaoka M., Hashimoto S., Watanabe T., Yokokura T. et Mori Y. (1994). Antiulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol. Pharm Bull*, 17: 1012-1017.

Nakajima H., Suzaki Y., Kaizu H. et Hirota T. (1992). Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J. Food Sci*, 57: 1327-1329.

Novel G. (1993). Les bactéries lactiques. In. « Microbiologie industrielle ». Ed. Tec et Doc Lavoisier : 170-181.

P

Petry S., Furlan S., Crepeau M. J., Cerning J. et Desmazeaud M. (2000). Factors affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8): 3427-3431.

Pharm P. L., Dupont L., Roy D., Lapointe G. et Cerning J. (2000). Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic

Degradation during Prolonged Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 66 : 2302-2310.

R

Rajagopal S.N. et Sandine W.E. (1990). Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J. Dairy Sci*, 73: 894-899.

Rhee S. K. et Pack M. Y. (1980). Effet of environment pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Biotechnol*, 144: 217-221.

Robijn G. W., Wienk H. L. J., van den Berg D. J. C., Haas H., Kamerling J. P. et Vliegenhart J. F. G. (1996). Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohy. Res*, 285 : 129-139.

Ruas-Madiedo P., Tuinier R., Kanning M. et Zoon P. (2002). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks *Int. Dairy. J*, 12: 689-695.

Ruas-Madiedo P. et de los Reyes- Gavilan G.C. (2005). Invited Review: Methode for the Screening, Isolation, and Characterzation of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. (2005). *J. Dairy Sci*. 88: 843-856.

S

Samotus B., Dorre E., Scigalski A., Swiderski A. et Stefaniuk M. (1995). Determination of sugars by 3,4 - Dimethylphenol Reagent. *Microchemical J*, 52 : 113-117.

Savadogo A., Ouattara C.A.T., Savadogo P.W., Ouattara A.S., Barro N. et Traore A.S. (2004). Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan J. Nutr*, 3 (2): 134-139.

Shaker R.R., Abu-Jdayil B. et Jumah R.Y. (2002). Rheological properties of set yogurt as influenced by incubation temperature and homogenization. *J. Food Quality*, 25: 409-418.

Shihata A. et Shah N.P. (2002). Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *Int. Dairy Sci*, 12: 765-772.

Steele J. (1997). Biology and application of rod and Coccus Cultures. Marschall Italian and Speciality Cheese Seminars.pp. 1-8.

Stingele F., Nesser J. R et Mollet B. (1996). Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol*, 178: 1680–1690.

Sutherland I. W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol*, 8:143–212.

Svensson M., Waak E., Sevansson U. et Radstrom P. (2005). Metabolically improved exopolysaccharides production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. *Appl. Environ. Microbiol*, 6398-6400.

T

Tamime A.Y et Robinson R.K. (2000). *Yoghurt Science and Technology*. Deuxième édition. Woodhead Publishing in Food Science and Technologie.

Terré S. (1986). Propriétés technologiques, nutritionnelles et physiologiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. *Technique Laitière et Marketing*, 1008 : 26-36.

Torino M. I., Taranto P. M. et Font de Valdez G. (2001). Mixed-acid fermentation and polysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* in milk cultures. *Biotechnol. Lettr*, 23:1799-1802.

V

Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Aderiany T., Vancanneyt M., Swings J. et Luc De Vuyst. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol*, 70(2): 900-912.

W

Welman A. D. et Maddox I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *TRENDS in biotechnology*, 21(6): 269-274.

Weiner R., Langilles S. et Quintero E. (1995). Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J. Indust. Microbiol*. 173: 339-703.

Whitfield C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol*. 34:415-420.

X

Xanthopoulos V., Pedridis D. et Tzanetakis N. (2001). Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts. *J. Food Microbiol*, 66(5): 747-752.

Z

Zeynep B., Guzel-Seydim A., Emel Sezgin B., Atif C. et Seydim A. (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Control*, 16: 205–209.

Zisu B. et Shah N.P. (2003). Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. Dairy Sci*, 86 : 3405-3415.

Zourari A. et Desmazeaud M.J. (1991). Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II. Souches de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*. *Lait*, 71: 463-482.

Zourari A., Accolas J.P. et Desmazeaud M.J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Lait*, 72: 1-8.

Milieux de cultures et réactifs

- **Milieu M17 (g/l)**

Peptone tryptique de caséines (Tryptone)	2,50
Peptone de soja (peptone papaïnique de soja)	5
Peptone de viande (peptone pepsique de viande)	2,50
Extrait autolytique de levures	2,5
Extrait de viande	5
Acide ascorbique	0,50
β -glycérophosphate	19
Sulfate de magnésium ($7H_2O$)	0,25
Glucose	20
pH : 7,2	
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.	

- **Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe) (g/l)**

Peptone de caséines	10
Extrait de viande	8
Extrait de levures	4
Glucose	20
Dipotassium hydrogénophosphate	2
Diammonium hydrogénocitrate	2
Tween 80	1
Acétate de sodium ($3H_2O$)	5
Sulfate de magnésium ($7H_2O$)	0,2
Sulfate de manganèse ($4H_2O$)	0,04
pH : 6,5	
Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.	

- **Bouillon à l'arginine (g/l)**

Tryptone	5
Extrait de levures	2,5
Glucose	

Phosphate dipotassique	2
L-arginine chlorhydrate	3
pH : 7	

- **Milieu de fermentation des glucides pour les Lactobacilles**

Peptone	10g
Extrait de levure	1g
Tween 80	1ml
Rouge de chlorophénol (0.8% dans l'éthanol)	5ml
Agar	1g
Eau distillée	1000ml
Ajuster le pH à 6.	

- **Milieu de fermentation des glucides pour les Streptocoques**

Extrait de viande	5g
Peptone	5g
Tryptone	10g
Rouge de chlorophénol	40mg
Eau distillée	1000ml
Ajuster le pH à 7.	

- **Lait écrémé**

Poudre de lait écrémé	100g
Eau distillée	1000ml
Stérilisation à 110°C/10min	

- **Eau physiologique**

Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1000ml

- **Lait citraté**

Répartir le lait écrémé en tubes (10,5 ml) et stériliser à 115°C pendant 10minutes puis ajouter avant l'emploi dans chaque tube, 0,5 ml de citrate de sodium (10%) stérile.

- **Lait bleu de Sherman**

Répartir le lait écrémé en tubes (9ml), stériliser à 115 °C pendant 10minutes ; au moment de l'emploi, ajouter 1ml de bleu de méthylène (1%) stérilisé par tube.

- **Lait tournesolé**

Teinture de tournesol à 4%	10ml
Lait écrémé	1000ml

- **Réactif d'anthrone**

1g du réactif d'anthrone dissout dans 100ml d'acide sulfurique à 95%

Tableau I : Tests d'identification de *Streptococcus. thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* (Giraud et Galzy, 1980).

Caractères	<i>S. thermophilus</i>	<i>Lb.bulgaricus</i>
Production de gaz	-	-
Croissance à : 15°C 45°C 50°C	- + +	- + +
Croissance en présence de NaCl à : 2% 4% 6,5%	V - -	- - -
Croissance sur lait bleu de Sherman	-	/
Lait tournesol	ACr	/
Lait citraté	-	/
Thermorésistance à 60°C/30 min 60°C/90 min 65°C/30 min	+ / /	/ - -
Hydrolyse de l'arginine	/	-
Fermentation des glucides :		
Adonitol	-	-
Arabinose	-	-
Fructose	/	+
Galactose	V	-
Glucose	+	+
Glycerol	-	-
Glycogène	-	-
Lactose	+	+
Maltose	-	-
Mannitol	-	-
Mélibiose	V	-
Raffinose	V	-
Rhamnose	-	-
Ribose	V	-
Saccharose	+	-
Salicine	-	-
Sorbitol	-	-
Tréhalose	-	-
Xylose	-	-

- : plus de 90% de souches présentent des réactions négatives ; + : plus de 90% de souches présentent des réactions positives.

V : réactions variables ; ACr ; A : Acidification ; C : Coagulation ; r : Réduction.

Résumé

Des bactéries lactiques thermophiles ont été isolées à partir des laits de vache et de brebis, et du yaourt. Seize souches ont été identifiées sur la base de caractères biochimiques et physiologiques, et caractérisées du point de vue technologique par l'estimation de l'activité acidifiante à 42°C et l'évaluation de la production d'exopolysaccharides et de la viscosité développée dans du lait écrémé à 35, 40, 42 et 45°C. Les résultats obtenus mettent en évidence la variation de la production d'exopolysaccharides ainsi que la viscosité développée. La production des exopolysaccharides et la viscosité développée par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* est meilleure en cultures mixtes par rapport aux cultures pures ; une meilleure activité texturante est observée en cultures pures à 45°C et en cultures mixtes à 42°C.

Mots clés : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, température, exopolysaccharides, viscosité, lait.

Summary

Thermophilic lactic acid bacteria were isolated from cow and ewe milks and yogurt. Sixteen strains were identified according to biochemical and physiological characters, and characterized by technological parameters such as the evolution of pH, acidity at 42°C, exopolysaccharides production, and viscosity development at 35, 40, 42 and 45°C in skim milk. The results showed a high variation in exopolysaccharides production and viscosity development at 35, 40, 42 and 45°C. The exopolysaccharides production and viscosity development by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* is improved in mixed cultures compared to the pure cultures and a better production was obtained in pure cultures at 45°C and in mixed cultures at 42°C.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, temperature, exopolysaccharides, viscosity, milk.

ملخص

تم عزل ومعرفة بكتيريا الحليب انطلاقاً من حليب البقرة، النعجة و الباغورت. 16 بكتيريا تم التأكد من انتماءها الى الصنفين لاكتوباسيلوس دالبروكي نوع بولغاريكوس *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* من ستريبتوكوكوس ترموفيلوس *Streptococcus thermophilus* هذه البكتيريا تم تمييزها وفق قدرتها الحمضية (درجة حرارة 42) و قدرتها على إنتاج السكريات المعقدة (مواد لزجة) و اللزوجة المتحصل عليها في الحليب (درجة حرارة 35, 40, 42 و 45). النتائج المتحصل عليها تبين أن انتاج السكريات المعقدة و اللزوجة المتحصل عليها من طرف لاكتوباسيلوس دالبروكي نوع بولغاريكوس ستريبتوكوكوس ترموفيلوس في الزراعة النقية أحسن في درجة 45 و احسن في الزراعة المختلطة في درجة حرارة 42.

مفتاح كلمات:

ستريبتوكوكوس ترموفيلوس, لاكتوباسيلوس دالبروكي نوع بولغاريكوس, حرارة, سكريات معقدة, لزوجة, حليب.