

ISABELLE DUPONT

**Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices  
d'exopolysaccharides et comparaison de la production  
d'exopolysaccharides par trois de ces souches**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc)

Département des Sciences des Aliments et de Nutrition  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE  
ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL

Décembre 1998

© Isabelle Dupont, 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-38073-4

**Canada**

## RÉSUMÉ

L'étude effectuée dans le cadre de ce projet porte sur la comparaison de la production d'exopolysaccharides (EPS) par trois souches de lactobacilles. Dans un premier temps, sept souches, provenant de banques de souches industrielles et commerciales, ont été sélectionnées pour leur caractère mucoïde et probiotique et caractérisées à l'aide de techniques génétiques de pointe dans le but de les identifier plus précisément (au genre et à l'espèce) et de les différencier. Des sept souches de départ, cinq se sont révélées génétiquement différentes. Trois souches, deux *Lactobacillus rhamnosus* et un *Lactobacillus casei*, ont été retenues pour la suite du projet. La production d'EPS a été évaluée dans un milieu minimal défini et sous contrôle de pH. Les paramètres étudiés sont : l'influence de la source de carbone (glucose et lactose) et la température de croissance (32°C et 37°C). Les fermentations se sont déroulées sur une période de 72 heures avec des échantillonnages à neuf temps définis préalablement. Les deux souches de *Lb. rhamnosus* se sont avérées d'excellentes productrices d'exopolysaccharides. La production atteint 1275 mg/l pour la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M et 601 mg/l pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell. La croissance de la souche de *Lb. casei* est plus lente dans le milieu minimal et la production d'EPS se situe entre 65 et 93 mg/l.

## AVANT-PROPOS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de maîtrise, le Dr Denis Roy, de m'avoir donné l'opportunité de faire une maîtrise. Merci pour tes bons conseils et ta grande disponibilité tout au long de mes expérimentations et de ma rédaction.

Je remercie également ma codirectrice, le Dr Gisèle LaPointe, pour sa disponibilité et son intérêt soutenu dans mon travail et pour m'avoir si bien accueillie lors de mon séjour à Québec.

Un merci spécial au Dr Jutta Cerning qui, lors de sa visite au CRDA, fut une grande source de motivation et d'inspiration, et qui a gentiment accepté de corriger ce travail.

Je ne peux surtout pas oublier de remercier, tel que demandé, Pierre Ward pour son excellent encadrement concernant le volet génétique et pour avoir su répondre à mes innombrables questions existentielles. Je remercie aussi Daniel Vincent pour ses précieux conseils en génétique et en informatique.

Un merci tout spécial à Cathy Provencher pour ses nombreuses heures de travail pendant la période des fermentations. Je ne sais pas si j'y serais arrivée sans ton aide et tes encouragements.

Je remercie de tout mon coeur mes parents pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études. Merci à Eric Lebel pour ses judicieux conseils sur la langue française (particulièrement sur les virgules) et son support de tous les instants.

Enfin, je tiens à remercier tous mes amis et compagnons de laboratoire pour avoir su m'écouter, m'encourager et me soutenir tout au long de cette grande aventure. Merci à Martine, Julie, Hélène, Lysianne, Manjit, Caroline et tous les autres.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	I
AVANT-PROPOS .....	II
TABLE DES MATIÈRES .....	III
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	XI
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
<b>CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES</b> .....	<b>3</b>
1.1 Les polysaccharides .....	3
1.1.1 Introduction .....	3
1.1.2 Structure et composition générale des polysaccharides .....	7
1.1.3 Les polysaccharides bactériens : rôles et fonctions .....	7
1.1.3.1 Fonctions des polysaccharides bactériens .....	8
1.2 Les exopolysaccharides de bactéries lactiques .....	10
1.2.1 Les produits fermentés .....	10
1.2.2 Les souches bactériennes productrices .....	11
1.2.3 Structure et composition des EPS de bactérie lactiques .....	13
1.2.4 Les conditions de production .....	17
1.2.4.1 Les conditions de culture .....	18
1.2.4.1.1 La température .....	18
1.2.4.1.2 La source de carbone .....	19
1.2.4.1.3 Le milieu de croissance .....	20
1.2.4.1.4 Le pH .....	21
1.2.5 Instabilité du caractère .....	22
1.2.5.1 Les enzymes dégradantes .....	23
1.2.5.2 Les plasmides .....	24

1.2.5.3 Identification et structure des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS .....	25
1.2.5.4 Les glycosyl-transférases .....	29
1.3 Détection de polysaccharides exocellulaires .....	30
1.3.1 Examen visuel .....	30
1.3.2 Les colorations .....	30
1.3.3 Microscopie électronique .....	31
1.3.4 Détection des EPS par mesure de la viscosité du milieu fermenté .....	32
1.3.5 Extraction, purification et dosage .....	33
1.4 Les bactéries probiotiques .....	35
1.4.1 Généralités .....	35
1.4.2 Les probiotiques .....	35
1.4.3 Les espèces probiotiques .....	36
1.4.3.1 Les bifidobactéries .....	36
1.4.3.2 Les lactobacilles .....	37
1.4.4 Critères de sélection de bonnes souches de probiotiques .....	38
<b>CHAPITRE II : PROBLÈME DE RECHERCHE, HYPOTHÈSE ET QUESTION DE RECHERCHE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>39</b>
2.1 Définition du problème de recherche .....	39
2.2 Hypothèse et question de recherche .....	40
2.3 Objectifs .....	41

**CHAPITRE III : CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE-PRODUCING STRAINS OF THE *LACTOBACILLUS CASEI* GROUP BY DOT-BLOT HYBRIDIZATION, DNA FINGERPRINTING, ELECTRON MICROSCOPY AND MILK FERMENTATION . . . . . 42**

3.1	Résumé . . . . .	43
3.2	Abstract . . . . .	45
3.3.	Introduction . . . . .	46
3.4	Materials and methods . . . . .	47
3.4.1	Microorganisms . . . . .	47
3.4.2	DNA extraction . . . . .	47
3.4.3	DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) . . . . .	48
3.4.4	Dot blot hybridization with 23S rDNA probes . . . . .	50
3.4.5	Dot-blot hybridization with genomic DNA as probe . . . . .	51
3.4.6	Pulsed-field gel electrophoresis . . . . .	51
3.4.7	Plasmid profile determination . . . . .	52
3.4.8	Transmission electron microscopy . . . . .	52
3.4.9	EPS production, isolation and characterization . . . . .	52
3.5	Results . . . . .	53
3.6	Discussion . . . . .	60
3.7	Acknowledgments . . . . .	66
3.8	References . . . . .	67

**CHAPITRE IV : COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'EXOPOLYSACCHARIDES PAR TROIS SOUCHES DE LACTOBACILLES . . . . . 70**

4.1	Introduction . . . . .	70
4.2	Matériel et méthodes . . . . .	71
4.2.1	Micro-organismes . . . . .	71

	VI
4.2.2 Conservation des souches .....	71
4.2.3 Conditions de culture .....	72
4.2.3.1 Préparations des pré-cultures .....	72
4.2.3.2 Milieu minimal BMM .....	72
4.2.4 Fermenteurs et fermentations .....	73
4.2.4.1 Préparation et stérilisation des fermenteurs .....	73
4.2.4.2 Contrôle de pH .....	74
4.2.4.3 Inoculation des fermenteurs .....	74
4.2.4.4 Échantillonnage .....	74
4.2.4.5 Suivi de la croissance .....	75
4.2.5 Extraction et purification des EPS .....	76
4.2.6 Dosage des EPS purifiés .....	78
4.2.7 Analyse des sucres résiduels et des acides organiques .....	79
4.3 Analyses statistiques .....	81
4.3.1 Plan expérimental .....	81
4.3.2 Régression non linéaire .....	82
4.3.2 Régression linéaire .....	84
4.3.3 Calculs de rendement et de productivité .....	85
4.4 Résultats .....	86
4.4.1 Croissance et production d'exopolysaccharides par <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M .....	86
4.4.2 Croissance et production d'exopolysaccharides par <i>Lb. rhamnosus</i> Rosell .....	88
4.4.3 Croissance et production d'exopolysaccharides par <i>Lb. casei</i> Type V .....	96
4.4.4 Comparaison de la production D'EPS par les trois souches .....	104
4.4.4.1 Paramètres associés aux maximums de production d'EPS .....	104
4.4.4.2 Rendement et productivité d'exopolysaccharides .....	106

	VII
4.5 Discussion .....	111
4.5.1 Croissance et production d'exopolysaccharides par trois souches de lactobacilles .....	111
4.5.2 Comparaison de la production d'EPS par les trois souches .....	114
4.6 Conclusion .....	115
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	116
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	118
Annexe A .....	128
Annexe B .....	129

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE I

**Tableau 1.1** : Fonctions et applications des principaux polysaccharides utilisés dans l'industrie alimentaire ..... 4

**Tableau 1.2** : Tableau récapitulatif de la production d'EPS et de la viscosité produite par les principales bactéries lactiques productrices ..... 12

## CHAPITRE III

**Table 3.1** : Molecular identification of selected EPS-producing strains of lactobacilli ..... 54

**Table 3.2** : Percentage of similarity estimated by dot-blot hybridization with DNA from type strains of *Lactobacillus zeae*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. paracasei* ..... 57

## CHAPITRE IV

**Tableau 4.1** : Analyses de variance des résultats de croissance spécifique (CFU  $\mu$  et D.O.  $\mu$ ) et de production d'EPS (EPS  $k$ ) ainsi que des maximums des deux variables reliées à la population maximale (CFU  $_{max}$  et D.O.  $_{max}$ ) pour la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M ..... 87

**Tableau 4.2** : Analyses de variance des résultats de croissance spécifiques (CFU  $\mu$  et D.O.  $\mu$ ) et de production d'EPS (EPS  $k$ ) ainsi que des maximums des deux variables reliées à la croissance (CFU  $_{max}$  et D.O.  $_{max}$ ) pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell ..... 93

**Tableau 4.3** : Analyse de variance présentant une interaction significative entre les effets température et sucre des taux de croissance spécifiques pour la production d'EPS (EPS  $k$ ) pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell  
..... 93

<b>Tableau 4.4</b> : Analyses de variance des résultats de croissance spécifiques (CFU $\mu$ et D.O. $\mu$ ) et de production d'EPS (EPS $k$ ) ainsi que des maximums des deux variables reliées à la croissance (CFU $\text{max.}$ et D.O. $\text{max.}$ ) pour la souche <i>Lb. casei</i> Type V .....	97
<b>Tableau 4.5</b> : Analyse de variance présentant une interaction significative entre les effets température et sucre des taux de croissance spécifiques pour mesure de D.O. (D.O. $\mu$ ) pour la souche <i>Lb. casei</i> Type V .....	97
<b>Tableau 4.6</b> : Analyse de variance présentant une interaction significative entre les effets température et sucre des mesures de D.O. maximum (D.O. $\text{max.}$ ) pour la souche <i>Lb. casei</i> Type V .....	99
<b>Tableau 4.7</b> : Production d'EPS (mg/l) maximale mesurée et estimée par les trois souches de <i>Lactobacillus</i> spp. selon la température d'incubation ( $t^\circ$ ), la source de carbone (Sucre) et le temps d'échantillonnage (Temps) .....	105
<b>Tableau 4.8</b> : Analyse de variance des maximums de production D'EPS(mg/l) par les trois souches de lactobacilles évaluées selon les deux méthodes de modélisation des courbes de production (Les effets significatifs sont indiqués avec un astérisque) .....	107
<b>Tableau 4.9</b> : Rendement (%) et productivité (mg/l h <sup>-1</sup> ) maximale pour les trois souches de <i>Lactobacillus</i> spp. productrices d'EPS selon la température d'incubation ( $t^\circ$ ) et la source de carbone (Sucre) .....	108
<b>Tableau 4.10</b> : Analyses de variance des rendements et des productivités maximales pour les trois souches de lactobacilles productrices d'EPS .....	110
<b>Tableau 4.11</b> : Production d'EPS et productivité de quelques souches de lactobacilles cultivée en milieu synthétique avec ou sans contrôle de pH .....	116

## ANNEXE A

<b>Tableau 1</b> : Composition du milieu de croissance BMM pour la production d'EPS .....	129
---	-----

## ANNEXE B

<b>Tableau 1</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M cultivée à 37°C dans le glucose .....	130
<b>Tableau 2</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M cultivée à 37°C dans le lactose .....	130
<b>Tableau 3</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M cultivée à 32°C dans le glucose .....	131
<b>Tableau 4</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M cultivée à 32°C dans le lactose .....	131
<b>Tableau 5</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> Rosell cultivée à 37°C dans le glucose .....	132
<b>Tableau 6</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> Rosell cultivée à 37°C dans le lactose .....	132
<b>Tableau 7</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> Rosell cultivée à 32°C dans le glucose .....	133
<b>Tableau 8</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. rhamnosus</i> Rosell cultivée à 32°C dans le lactose .....	133
<b>Tableau 9</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. casei</i> Type V cultivée à 37°C dans le glucose .....	134
<b>Tableau 10</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. casei</i> Type V cultivée à 37°C dans le lactose .....	134
<b>Tableau 11</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. casei</i> Type V cultivée à 32°C dans le glucose .....	135
<b>Tableau 12</b> : Moyennes des résultats des fermentations de <i>Lb. casei</i> Type V cultivée à 32°C dans le lactose .....	135

# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE I

**Figure 1.1** : Similitude des gènes *eps* avec des gènes impliqués dans la production de polymères chez d'autres micro-organismes (Stingele *et al.*, 1996 ; van Kranenburg *et al.*, 1997). . . . . 29

## CHAPITRE III

**Figure 3.1** : Dendrogram obtained by genomic DNA fingerprinting using the random amplification of polymorphic DNA (RAPD) method. Patterns were combined using the Molecular Analyst Fingerprinting Plus Software and grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic averages (UPGMA) . . . . . 58

**Figure 3.2** : Dendrogram constructed with restriction patterns obtained by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Patterns were combined using the Molecular Analyst Fingerprinting Plus Software and grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic averages (UPGMA) . . . . . 59

**Figure 3.3** : Transmission electron micrographs of thin sections of isolates of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M (A and B), *Lactobacillus rhamnosus* Rosell (C) and *Lactobacillus casei* Type V (D) stained with ferritin . . . . . 61

**Figure 3.4** : Growth (A), pH (B) and exopolysaccharides (EPS) produced (C) during fermentation of milk by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M (●), *Lactobacillus rhamnosus* Rosell (○) and *Lactobacillus casei* Type V (▼). The values are the means of two experiments . . . . . 62

**Figure 3.5** : Viscosity produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M (●), *Lactobacillus rhamnosus* Rosell(O), *Lactobacillus casei* Type V (▼) and glucono-delta-lactone (■) at different pH values in milk. The values are the means of two experiments. . . . . 63

## CHAPITRE IV

- Figure 4.1** : Schéma de l'extraction et de la purification des polysaccharides exocellulaires produits dans un milieu synthétique (Cerning *et al.* 1994) ..... 80
- Figure 4.2** : Schématisation du plan expérimental utilisé pour comparer la production d'EPS des trois souches de lactobacilles ..... 81
- Figure 4.3** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M à 37°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique ..... 89
- Figure 4.4** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M à 32°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique ..... 90
- Figure 4.5** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell à 37°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le glucose B : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le lactose ..... 94
- Figure 4.6** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell à 32°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le glucose B : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le lactose ..... 95
- Figure 4.7** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 37°C en milieu défini additionné de glucose à pH contrôlé  
A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique ..... 100
- Figure 4.8** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 37°C en milieu défini additionné de lactose à pH contrôlé  
A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique ..... 101
- Figure 4.9** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C en milieu défini additionné de glucose à pH contrôlé

**Figure 4.9** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C en milieu défini additionné de glucose à pH contrôlé

A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique ..... 102

**Figure 4.10** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C en milieu défini additionné de lactose à pH contrôlé

A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique ..... 103

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS. La présence de ces souches productrices d'exopolysaccharides dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour l'industrie laitière. En effet, les polymères excrétés par les cellules lors des fermentations permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini tout en diminuant la synérèse. Ainsi, la présence dans des produits fermentés de ces bactéries lactiques mucoïdes permet de limiter l'ajout de substances texturantes et stabilisantes d'origine végétale ou animale.

Les propriétés épaississantes des ferments lactiques, en particulier mésophiles, ne sont pas actuellement exploitées pleinement par l'industrie laitière, car on ne dispose pas de souches productrices de polysaccharides entièrement caractérisées et performantes. Il est donc intéressant de mieux connaître ces souches productrices d'exopolysaccharides dans le but futur de les incorporer à des produits fermentés tel le yogourt. Cette étude porte donc sur l'identification moléculaire de souches de *Lactobacillus* spp. productrices d'exopolysaccharides ainsi que sur la comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches.

Ce mémoire comprend tout d'abord une revue de littérature portant sur les polysaccharides, de façon générale, et plus précisément sur les bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides. Un survol des principales études sur le sujet permet de bien comprendre les facteurs influençant la synthèse de polymères par les différentes souches de bactéries lactiques productrices utilisées dans l'industrie laitière. Suivent ensuite la problématique et la question de recherche, ainsi que les objectifs fixés. Le chapitre III est consacré à la première étape du travail,

soit l'identification moléculaire des souches sélectionnées. Cette partie est présentée en anglais sous la forme d'un article scientifique. Finalement, le chapitre IV est consacré à l'évaluation de la production d'EPS par les trois souches de lactobacilles. Ce chapitre comporte une description du matériel et des méthodes utilisés ainsi que des analyses statistiques effectuées. Suivent les résultats des fermentations et des dosages de polysaccharides excrétés par les trois souches ainsi que la discussion.

# **CHAPITRE I**

## **ÉTAT DES CONNAISSANCES**

### **1.1 Les polysaccharides**

#### **1.1.1 Introduction**

Les polysaccharides sont largement utilisés dans la formulation des aliments en tant qu'agent texturant, émulsifiant, gélifiant et/ou stabilisant. Leur marché, en termes de volume utilisé pour une variété d'applications dans les aliments, est en croissance constante. Les polysaccharides font partie de la classe des fibres alimentaires et peuvent aussi servir de substituts aux gras dans la préparation de certains aliments à faible teneur en calories (Stephen et Churms, 1995). Plusieurs types de polysaccharides provenant de sources diverses peuvent être employés selon le produit visé et l'effet recherché. Le tableau 1.1 présente un survol des principaux polysaccharides utilisés par l'industrie alimentaire.

**Tableau 1.1 Fonctions et applications des principaux polysaccharides utilisés dans l'industrie alimentaire (Stephen et Churms, 1995)**

Polymères	Sources principales	Fonctions	Applications
Amidon (amylose et amylopectine)	Graines et tiges de céréales	Agent stabilisant, texturant et gélifiant	
Carboxyméthyl-cellulose	Cellulose de plant de coton	Agent stabilisant, texturant, rétention de l'eau	Crème glacée, pâtes à frire, sirops, mélanges à gâteaux, produits carnés
Carraghénanes	Algues rouges ( <i>Gracilaria</i> , <i>Gigartina</i> , <i>Eucheuma</i> spp.)	Agent stabilisant, texturant et gélifiant	Crème glacée, desserts, produits carnés, assaisonnements, pudding instantanés
Alginates	Algues brunes ( <i>Macrocystis</i> , <i>Ascophyllum</i> , <i>Laminaria</i> , <i>Ecklonia</i> spp.)	Agent stabilisant, texturant	Crème glacée, pudding instantanés, boissons
Agar	Algues rouges ( <i>Gelidium</i> spp.)	Agent gélifiant	Produits laitiers, produit carnés
Gomme arabique	Extrait de sève d' <i>Acacia senegal</i>	Agent stabilisant, texturant et émulsifiant, encapsulation	Confiseries, boulangeries, pâtisseries, boissons, sauces
Galactomannanes	Gomme de guar et de locuste, gomme de graines de caroube	Agent stabilisant, rétention de l'eau	Produits laitiers, crème glacée, desserts, boulangeries, pâtisseries
Pectines	Pommes, citron, et autres fruits	Agent gélifiant, texturant et stabilisant	Confitures, agents de conservation, boissons, boulangeries, pâtisseries, confiseries, produits laitiers
Gomme de tragacathe	<i>Astragalus</i> spp.	Agent stabilisant, texturant et gélifiant	Produits laitiers, assaisonnements, sauces, confiseries
Gomme de xanthane	<i>Xanthomonas campestris</i>	Agent stabilisant, texturant	Assaisonnements, boissons, produits laitiers

La majorité des polysaccharides employés dans l'industrie alimentaire sont d'origine végétale (amidons et dérivés, celluloses et pectines) ou produits par des algues (agars, carraghénanes et alginates). L'amidon et ses dérivés ainsi que la cellulose sont les polymères les plus utilisés par l'industrie alimentaire ; ils sont facilement disponibles en grande quantité et aucun traitement n'est nécessaire avant leur utilisation. Le principal intérêt des polymères dérivés d'algues est leur caractère thermo-réversible qui permet une foule d'applications dans les produits alimentaires.

Il est aussi possible de produire des polysaccharides par fermentation microbienne. Le xanthane produit par *Xanthomonas campestris* et le gellan produit par *Pseudomonas elodea* sont deux types de polysaccharides bactériens largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme agent stabilisant et texturant. La stabilité de la production et la régularité de la structure des polymères produits par des bactéries en font des bio-ingrédients de choix (Stephen et Churms, 1995).

Traditionnellement, l'industrie des produits laitiers fermentés cherche à améliorer le corps et la texture des aliments, tels les yogourts, en faisant varier un ou plusieurs des facteurs suivants : composition du mélange de départ, traitement par chauffage du mélange avant la fermentation, modification de la composition des ferments et des conditions d'incubation, manipulation du produit fini et ajout de stabilisants.

L'ajout de substances stabilisantes dans les produits fermentés est de plus en plus réglementé et même interdit dans certains pays. Les consommateurs recherchent davantage des produits «naturels» ou «biologiques» sans additifs. De plus, les substances stabilisantes peuvent affecter le goût et l'arôme du produit (Bouzar *et al.*, 1997).

L'industrie se doit donc de trouver d'autres options afin d'offrir aux consommateurs des produits de qualité. Depuis quelques années, une attention croissante est portée sur les polysaccharides produits par des souches de bactéries lactiques. Certaines de ces souches, de grade alimentaire, ont la capacité de produire des exopolysaccharides dans le produit fermenté et ont un impact direct sur les propriétés rhéologiques. L'intégration dans les ferments de souches de bactéries lactiques productrices de polysaccharides exocellulaires (exopolysaccharides ou EPS) permettrait de limiter l'ajout d'agents stabilisants tout en améliorant la texture et en limitant la synérèse. La présence de polymères produits par ces souches aurait aussi un effet bénéfique sur le goût et l'arôme du produit fini (Stephen et Churms, 1995).

Des produits fermentés avec des souches de bactéries lactiques productrices de polysaccharides exocellulaires, aussi appelées mucoïdes, sont déjà produits dans certains pays. Au Japon, un lait fermenté appelé «Yakult» est fait avec une souche de *Lactobacillus casei* productrice de polysaccharides exocellulaires (Mozzi *et al.*, 1994). Le «villi» finlandais et le «longfil» suédois sont deux laits fermentés contenant des souches de bactéries lactiques productrices de polysaccharides exocellulaires très appréciés dans ces pays européens (Neve *et al.*, 1988). La production à grande échelle et l'exportation de ces produits sont difficiles à cause de l'instabilité du caractère épaississant chez les souches utilisées. Une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides chez les bactéries lactiques utilisées par l'industrie laitière pour la production de produits fermentés est donc souhaitable.

### 1.1.2 Structure et composition générale des polysaccharides

Un polysaccharide est un polymère de résidus monosaccharidiques reliés entre eux par des liens glycosidiques. Ces liens se forment par l'élimination d'une molécule d'eau entre le groupe hémiacétal hydroxyle de l'extrémité de l'un et le groupe hydroxyle primaire ou secondaire du résidu suivant. Le groupement hydroxyle peut être dérivé par estérification et être présent sous forme d'acétate, de sulfate ou de phosphate. Les groupements hydroxyles peuvent aussi être substitués par des *pyruvates ketals*. Des résidus d'acides uraniques (ex. : acide D-galacturonique) peuvent être présents dans certains polysaccharides (certaines unités sont méthyl-estérifiées alors que d'autres sont associées à des cations mono ou divalents) (Stephen et Chums, 1995).

Les polysaccharides peuvent être linéaires, avec embranchements ou, dans certains cas, cycliques. Le degré de ramification du polymère a une incidence sur les propriétés physiques telles que la solubilité dans l'eau, la viscosité et les comportements gélifiants des solutions de polysaccharides. Le nombre de résidus contenus dans un polysaccharide peut être de quelques-uns à plusieurs milliers et la composition d'un polysaccharide peut être homogène (un seul type de monosaccharide) ou hétérogène (plusieurs types de monosaccharides) (Cerning, 1994b). Le poids moléculaire d'un polysaccharide peut varier de 5 000 à plusieurs millions de daltons.

### 1.1.3 Les polysaccharides bactériens : rôles et fonctions

Toutes les cellules bactériennes synthétisent des polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent dans le cytosol et servent de source de carbone et d'énergie,

tandis que d'autres, tels les peptidoglycanes et les acides téichoïques, sont les constituants de la paroi. Le troisième type regroupe les polysaccharides élaborés et excrétés par la cellule dans le milieu de culture. Ces derniers se présentent sous forme de capsule enrobant la cellule ou sont directement excrétés dans le milieu environnant et sont connus sous le nom d'*exopolysaccharides* ou EPS (Cerning, 1990).

Les polysaccharides excrétés par certaines souches peuvent avoir un impact négatif : par exemple, la production de glucanes par *Streptococcus mutans* permet à la souche de coller aux dents et participe à la formation de la plaque dentaire. La production de polysaccharides par des souches de leuconostocs ou de pédiocoques donne un aspect filant et huileux au vin (Gerbaux, 1994). Cependant, la production de polysaccharides exocellulaires par des souches bactériennes peut être avantageuse et même avoir un intérêt industriel. C'est le cas du xanthane produit par *Xanthomonas campestris* et le gellan produit par *Pseudomonas elodea*, polysaccharides servant de bio-ingrédients pour l'industrie alimentaire. Finalement, la production d'EPS par des souches de bactéries lactiques utilisées par l'industrie laitière permet d'améliorer la texture et la viscosité des produits fermentés (Stephen et Churms, 1995).

### **1.1.3.1 Fonctions des polysaccharides bactériens**

Le rôle et les fonctions des polysaccharides exocellulaires bactériens paraissent incertains et semblent très complexes. Plusieurs équipes de recherche se sont cependant penchées sur la question et un certain nombre d'hypothèses ont été mises de l'avant.

Les travaux sur les polysaccharides bactériens, quant à leur rôle et aux conséquences de leur existence, ont d'abord été réalisés en recherche

médicale. Dès 1928, le rôle des polysaccharides capsulaires dans la virulence de la souche *Streptococcus pneumoniae* est mis en évidence par Griffith. La virulence des pneumocoques diminue considérablement lorsque ceux-ci ne sont plus encapsulés alors que les pneumocoques encapsulés résistent à la phagocytose et se propagent rapidement (Garcia et Lopez, 1997). Par contre, on sait que beaucoup de bactéries possèdent une capsule d'EPS, mais ne sont pas pour autant pathogènes (Cerning, 1990).

Les EPS ne semblent pas constituer une source d'énergie puisque les bactéries productrices ne catabolisent généralement pas le polymère qu'elles synthétisent. Dans certains cas, il y a dégradation du polymère produit, mais il n'est pas certain que l'organisme utilise le polymère dégradé (Cerning, 1990).

La présence d'EPS peut être responsable de la résistance aux phages en masquant le site récepteur des cellules bactériennes sensibles. Le transfert du caractère mucoïde d'une souche résistante aux phages à une souche non mucoïde sensible aux phages provoque une résistance aux phages des nouveaux transconjugants (Vedamuthu et Neville, 1986).

Finalement, les EPS peuvent servir de protection contre la dessiccation ou contre un milieu hostile. Ils peuvent servir d'agent adhésif et avoir un rôle dans certaines interactions entre les plantes et les bactéries, comme dans la formation de nodules par *Rhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* par exemple (Sutherland, 1998). Ils peuvent aussi être utiles au captage des ions métalliques (Cerning, 1994b).

## 1.2 Les exopolysaccharides de bactéries lactiques

### 1.2.1 Les produits fermentés

Comme nous l'avons vu précédemment, le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans des ferments lactiques lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. En effet, les polymères produits 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 du lait. Dans le cas des yogourts brassés additionnés de fruits, la présence de polysaccharides empêche que ceux-ci ne se déposent au fond. En général, la présence de polysaccharides produits par des souches de bactéries lactiques dans des produits fermentés, tels les yogourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (Desmazeaud, 1990).

La production d'exopolysaccharides par des souches de bactéries lactiques dans les laits fermentés est certes intéressante, mais peut aussi être défavorable. Une forte production de polysaccharides masque la saveur et les arômes et peut produire un yogourt filamenteux (Desmazeaud, 1990). Dans certains cas, les souches produisant des polysaccharides envahissent les autres souches acidifiantes mais non productrices d'EPS, ce qui peut compromettre la fermentation puisque généralement les souches productrices ne démontrent qu'une faible production d'acides en début de croissance (Rasic *et al.*, 1978). La sélection des souches mucoïdes lors de la fabrication de yogourt doit donc être faite avec précaution pour ne pas compromettre le processus fermentaire.

Le kéfir est un lait fermenté fait à base de grains de kéfir contenant les bactéries lactiques et les levures responsables de la fermentation. Un polysaccharide appelé kéfiran est produit par une souche de *Lactobacillus kéfiran* au cours de la fermentation. Le kéfiran enveloppe les micro-organismes sur les grains de kéfir, mais n'influence pas la texture du produit (Yokoi, 1990, 1992).

### 1.2.2 Les souches bactériennes productrices

Un grand nombre de souches bactériennes ont la capacité de produire des polysaccharides extra-cellulaires (Tableau 1.2). Dans le cas des bactéries lactiques utilisées dans la fabrication de produits tels que le yogourt ou des laits fermentés comme le «villi » ou le «longfil», la production de polysaccharides extracellulaires est un caractère désirable et recherché (Macura et Townsley, 1984). À ce jour, la majorité des études porte sur la production d'EPS par des souches de *Lactobacillus bulgaricus* (Manca de Nadra *et al.*, 1985 ; Garcia-Garibay et Marshall, 1991 ; Grobber *et al.*, 1995, 1996 ; Bouzar *et al.*, 1995 ; Hess *et al.*, 1997 ; Gassem *et al.*, 1997 ; Kimmel *et al.*, 1998), de *Streptococcus thermophilus* (Macura et Townsley, 1984 ; Cerning *et al.*, 1988, 1990 ; Gancel et Novel, 1994a et b ; Escalante *et al.*, 1998), de *Lactococcus lactis* (Nakajima *et al.*, 1990 ; Marshall *et al.*, 1995 ; Dierksen *et al.*, 1997) ou encore par des mélanges de plusieurs souches (Cerning *et al.*, 1986 ; Bouzar *et al.*, 1997). L'intérêt s'est depuis peu tourné vers les souches de *Lb. casei* (Cerning *et al.*, 1994a ; Mozzi *et al.*, 1994, 1995 a et b, 1996 ; Gamar *et al.*, 1997) et de bifidobactéries (Shimamura *et al.*, 1990 ; Andaloussi *et al.*, 1995 ; Roberts *et al.*, 1995). Ces souches sont considérées comme probiotiques : ce qui est une qualité de plus en plus recherchée par les consommateurs.

**Tableau 1.2** Tableau récapitulatif de la production d'EPS et de la viscosité produite par les principales bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides selon le milieu de croissance utilisé.

Souches	Milieu de croissance	Production d'EPS	Viscosité	Référence
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	milieu synthétique	25 mg/l		Marshall et al., 1995
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	perméat de lactosérum	150 mg/l		Nakajima et al., 1990
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> C83	milieu synthétique sans contrôle de pH	6 à 132 mg/l		Gamar et al., 1997
<i>Lactobacillus casei</i> CG11	milieu synthétique sans contrôle de pH	130 mg/l		Cerning et al., 1994
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 87	milieu synthétique avec contrôle de pH	231 à 488 mg/l		Mozzi et al., 1996
<i>Lactobacillus plantarum</i>	milieu synthétique	114 à 445 mg/l		Lubdroom et al., 1997
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CNRZ1187	lait écrémé	70 à 130 mg/l	170 à 280 mPas.S	Bouzar et al., 1995
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CNRZ416	lait écrémé	285 mg/l	164 mPas.S	Cerning et al., 1986
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CNRZ737	lait écrémé	424 mg/l	218 mPas.S	Cerning et al., 1986
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> RR	lactosérum supplémenté milieu synthétique avec contrôle de pH	354 mg/l	2.4 mPas.S	Gaasem et al., 1997 Kimmel et al., 1998
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> NCFB2772	milieu synthétique avec contrôle de pH	250 mg/l		Grobben et al. 1998
<i>Lactobacillus brevis</i>	milieu synthétique	213 à 270 mg/l		Lubdroom et al., 1997
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	milieu synthétique	248 mg/l		Lubdroom et al., 1997
<i>Streptococcus thermophilus</i> NCFB859	milieu Bellinker modifié	89 mg/l		Escalante et al., 1998
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	milieu synthétique	250 mg/l	39.82 cps	Lubdroom et al., 1997
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	milieu synthétique	531 mg/l	77.75 cps	Lubdroom et al., 1997

### 1.2.3 Structure et composition des EPS de bactéries lactiques

Dans le but de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques des polymères produits, il est important d'en connaître la composition et la structure tridimensionnelle (Robijn *et al.*, 1996). Pour cette raison, de nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur le sujet. La différence dans la composition chimique et la structure des polymères reflètent la complexité de la synthèse des polysaccharides exocellulaires à partir d'une source de carbone. Plusieurs facteurs tels que la souche étudiée, le milieu de culture, la durée d'incubation, la nature de la source de carbone et la présence d'enzymes capables de dégrader le polymère ont une influence considérable sur le poids moléculaire et la structure des polymères.

Chez les bactéries lactiques, deux types de polysaccharides sont produits et excrétés dans le milieu environnant, soit : les homopolymères et les hétéropolymères. Les dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* et les glucanes formés par *Streptococcus mutans* sont des homopolymères de glucose tandis que les levanes produits par *Streptococcus salivarius* sont des homopolymères de fructose. Les hétéropolysaccharides contenant plusieurs types d'oses constitutifs forment un groupe très hétérogène de polysaccharides élaborés par différentes bactéries lactiques thermophiles et mésophiles (Cerning, 1994b).

En général, les bactéries lactiques produisent des polysaccharides hétérogènes neutres dont la composition en monomères varie peu et se résume souvent au glucose et au galactose. Souvent, le galactose est majoritaire, probablement parce qu'il n'est pas métabolisé comme le glucose et serait donc disponible pour la synthèse du polymère (Marshall, 1987). Par exemple, *S. thermophilus*, une bactérie homofermentaire,

transforme le lactose en acide lactique, mais ne métabolise généralement pas le galactose libéré par cette hydrolyse. Le galactose est relâché hors de la cellule dans le milieu tandis que le glucose sert de source de carbone. Il est possible que ce résidu galactose soit alors utilisé dans de la synthèse du polysaccharide exocellulaire par *Sc. thermophilus* (Escalante *et al.*, 1998).

Les sections suivantes feront état de la structure et de la composition des exopolysaccharides produits par les principales souches de bactéries lactiques utilisées par l'industrie des produits laitiers fermentés.

### *Streptococcus thermophilus*

Une souche de *Sc. thermophilus* élabore dans du lait un polysaccharide composé essentiellement de galactose (52%), de glucose (36.2%) et d'une petite quantité de pentose (4.9%), de rhamnose (2%) et de mannose (4.9%) (Cerning *et al.*, 1988). Par ailleurs, la souche de *Sc. thermophilus* de Doco *et al.* (1990), cultivée dans le lait, produit un polymère soluble dans l'eau. Ce polymère est composé de D-glucose, de D-galactose et de N-acétyl-D-galactosamine dans une proportion de 1:2:1, formant une unité répétitive tétrasaccharidique. Finalement, Lemoine *et al.* (1997) ont étudié la structure des EPS de deux *Sc. thermophilus* et ont remarqué des différences dans la composition en monosaccharides des polymères. *Sc. thermophilus* SFi39 produit un polymère composé de D-glucose et de D-galactose dans un rapport de 1:1, formant une unité répétitive tétrasaccharidique, alors que *Sc. thermophilus* SFi12 synthétise un polymère composé de D-galactose, de L-rhamnose et de D-glucose en un rapport de 3:2:1, formant une unité répétitive hexasaccharidique. Par l'analyse de ces derniers résultats, Lemoine (1997) suggère que les propriétés texturantes de différents *Sc. thermophilus* EPS+ sont dues à la

synthèse de polysaccharides de composition chimique semblable mais de structure différente.

*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

La souche épaississante de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ 416 produit dans le lait un polysaccharide composé de galactose, de glucose et de rhamnose dans un rapport 4:1:1, d'un poids moléculaire de 500 000 Da et d'une viscosité intrinsèque de 4.7 dl/g (Cerning *et al.*, 1986). Grobber *et al.* (1996) ont étudié la composition de polysaccharides exocellulaires produits par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 dans un milieu synthétique favorable à la production d'EPS, supplémenté soit de lactose, soit de glucose. Ils ont constaté qu'indépendamment de la source de carbone, la composition du polymère reste la même, soit glucose, galactose et rhamnose dans un rapport de 1:6.8:0.7. Cependant, le polysaccharide produit en début de phase de croissance pour la même souche, dans les mêmes conditions de croissance, contenait relativement plus de glucose.

La composition en monomère des EPS produits peut varier dans le temps lors de la fermentation. Ainsi, la souche parentale de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ1187 de Bouzar *et al.* (1995) ainsi que ses deux mutants produisent tous les trois, dans du lait, des polymères composés majoritairement de galactose et de glucose, et de mannose et de l'arabinose en faible proportion. Cependant, les EPS isolés d'une culture mère de 2 h sont composés de galactose à 70,5% et de glucose à 19,8%, alors qu'après 24 h, le galactose ne forme plus que 57,4% du polymère et le glucose 38,6%.

*Lactobacillus rhamnosus*

*Lb. rhamnosus* C83 cultivée dans un milieu chimiquement défini avec différents sucres ajoutés produit un polymère composé de glucose et de galactose dans un rapport de 1:1, indépendamment de la source de carbone (Gamar *et al.*, 1997).

*Lactobacillus casei*

Contrairement à *Lb. rhamnosus* C83, la composition du polymère produit par la souche de *Lb. casei* CG11 varie selon le sucre ajouté. Lorsque le glucose est la principale source de carbone l'EPS produit est différent de celui produit en présence de lactose. En général, le glucose, le galactose, le rhamnose et le mannose sont toujours identifiés, mais les concentrations varient. Dans certains cas, des traces de fucose, d'arabinose et de xylose sont aussi détectées (Cerning *et al.*, 1994).

*Lactobacillus kéfir*

Le kéfir produit par une souche de *Lactobacillus kefir* KPB-167B est composé de glucose et de galactose dans un rapport de 1:1 (Yokoi, 1990, 1992). Les polymères produits dans le kéfir sont difficiles à extraire et la production d'EPS dans le lait fermenté est faible. Cependant, dans des conditions optimales, la production atteint 2.04 g/l de kéfir (Yokoi, 1992).

*Lactococcus lactis ssp. cremoris*

La souche de *Lc. lactis ssp. cremoris* LC330 produit deux types d'hétéropolymères. Le premier est un polymère ramifié, neutre et de

masse moléculaire de  $1 \times 10^6$  Da composé de galactose, de glucose et de glucosamine dans un rapport variable. Le second est chargé, plus petit mais plus complexe. Il s'agit d'un phosphopolysaccharide composé de glucose, de rhamnose, de galactose et de glucosamine dans un rapport de 6:5:4:1 (Marshall *et al.*, 1995).

Certains auteurs rapportent la présence de protéines associées aux polymères de saccharides (Cerning, 1992). Macura et Townsley (1984) démontrent que *Lc. lactis* ssp. *cremoris* synthétise un polymère contenant 47% de protéines et 29% de carbohydrates, ce qui veut dire que leur matériel serait sous forme de glycoprotéine. Une analyse plus poussée des échantillons a permis de constater que la partie protéinique possède un profil similaire à celui des protéines de lactosérum déprotéinisé utilisé comme milieu de croissance. Dans ce cas-ci, il s'agit donc d'une contamination de nature protéique provenant du milieu de culture.

#### **1.2.4 Les conditions de production**

Il est important de se rappeler que la production d'EPS dépend d'abord de la souche étudiée. Ce ne sont pas toutes les souches de bactéries à Gram positif qui produisent des polysaccharides qui sont excrétés dans le milieu et la production peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien. Enfin, même si la majorité des bactéries mucoïdes peuvent produire des EPS dans n'importe quel milieu, la production peut être optimisée sous certaines conditions dans certains milieux définis.

### 1.2.4.1 Les conditions de culture

#### 1.2.4.1.1 La température

La température de croissance est un paramètre ayant un impact important sur la production d'EPS par des souches de bactéries lactiques EPS+. Cependant, les résultats publiés jusqu'à maintenant sont contradictoires. Plusieurs auteurs s'entendent pour dire que la production de polysaccharides extra-cellulaires est plus importante aux températures suboptimales de croissance. Cerning (1990) remarque que la production d'EPS par des bactéries lactiques mésophiles augmente de 50 à 60% quand la température de croissance choisie est de 25°C au lieu de 30°C. La température optimale de croissance de *Sc. salivarius* ssp. *thermophilus* est de 42°C alors que la production d'EPS est optimale à 30°C (Mozzi *et al.*, 1995a). Une souche de *Lb. delbrueckii* produit le maximum d'EPS à 37°C, alors que la température optimale de croissance de cette souche se situe autour de 42°C. Une étude faite sur une souche de *Lb. rhamnosus* montre que la production d'EPS est de 37% plus importante entre 20 et 25°C plutôt qu'à 37°C (température optimale de croissance de la souche) (Gamar *et al.*, 1997).

Par contre, la souche de *Lb. delbrueckii* de Garcia-Garibay (1991), cultivée 24 h dans le lait à 37°C, présente une bonne croissance ( $1.6 \times 10^8$  CFU/ml) mais une faible production d'EPS (69 mg/l). Toutefois, la production d'EPS est meilleure (120 mg/l) à température élevée, soit entre 40 et 45°C, alors que la croissance est ralentie ( $7.0 \times 10^7$  CFU/ml et  $5.0 \times 10^7$  CFU/ml). Grobber *et al.* (1995) ont aussi constaté que la production de polysaccharides par *Lb. delbrueckii* augmente lorsque la température est élevée ; cependant, la souche perd son caractère épaississant à 47°C.

Ce phénomène peut être expliqué par l'hypothèse émise par Sutherland en 1972 qui suggère que, lorsque la croissance des cellules bactériennes est ralentie (à température basse ou élevée), la synthèse de polymères est stimulée. La production d'EPS implique un grand nombre d'enzymes dont des glucosyl-transférases et des polymérases. Le rôle premier de ces enzymes se trouve dans la synthèse de la paroi bactérienne (peptidoglycanes) ainsi que de certains constituants cellulaires (acides téichoïques). Ces enzymes ne sont donc pas toutes spécifiques à la synthèse des polysaccharides capsulaires ou exocellulaires. Certains intermédiaires lipidiques semblent aussi avoir un rôle à jouer dans la synthèse d'EPS. Ce sont des esters phosphates et des alcools isoprénoïdes à longues chaînes identiques à ceux impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides, de l'antigène O et de peptidoglycanes. Leur rôle précis n'est pas encore bien connu, mais des observations indirectes laissent supposer que la disponibilité de ces intermédiaires est importante dans la synthèse des EPS (Sutherland, 1972). Donc, dans des conditions de croissance optimales qui stimulent la production de lipopolysaccharides ou de peptidoglycanes, la synthèse d'EPS est réduite en raison de la moins grande disponibilité des enzymes et des intermédiaires lipidiques. Par contre, dans des conditions où la croissance est ralentie (à une température ou à un pH défavorable par exemple), la bactérie produit moins de constituants cellulaires, et les enzymes et les intermédiaires lipidiques sont alors disponibles pour la synthèse des EPS.

#### **1.2.4.1.2 La source de carbone**

Cerning *et al.* (1994) ont étudié les effets de différentes sources de carbone à différentes concentrations sur la production d'EPS chez *Lactobacillus casei* CG11. La souche est capable de produire des EPS avec

les différents sucres ajoutés (glucose, mélobiose, lactose, galactose, etc.). Néanmoins, l'ajout du glucose dans le milieu synthétique de base permet la meilleure production d'EPS alors que, lorsque le lactose est ajouté, la production est faible. En effet, à une concentration de 20 g/l de glucose, la production d'EPS peut atteindre 160 mg/L produit alors que, pour une même concentration de lactose, la production d'EPS n'atteignait que 45 mg/l.

Gancel et Novel (1994 a) ont étudié les conditions de production d'EPS pour une souche de *Sc. salivarius* ssp. *thermophilus* et ont remarqué que le glucose et le fructose favorisent la production d'EPS, mais ralentissent la croissance alors que l'inverse est observé avec le lactose et le sucrose.

#### 1.2.4.1.3 Le milieu de croissance

La majorité des bactéries productrices d'EPS utilise un sucre comme source d'énergie et de carbone, et un sel d'ammonium ou des acides aminés comme source d'azote. Des ions comme le  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Fe^{3+}$  et  $Ca^{2+}$  qui agissent comme cofacteurs sont essentiels à la synthèse des polysaccharides (Sutherland, 1982).

Les bactéries lactiques peuvent produire des EPS dans le lait ou dans l'ultrafiltrat de lait, dans du lactosérum et dans des milieux synthétiques définis ou semi-définis.

Les travaux de Cerning démontrent que l'addition de 1% de caséine dans le lait écrémé provoque une augmentation de la production d'EPS par *Lb. bulgaricus* (Cerning *et al.*, 1986 et 1990), tandis que l'addition de 1% de «casamino acid» dans l'ultrafiltrat augmente la production d'EPS en plus d'en changer la composition (Cerning *et al.*, 1990). La souche productrice

*Lb. bulgaricus* 416 produit 60 mg/l d'EPS dans du lait écrémé et ne produit que très peu de viscosité. Avec l'ajout de 1% de «casamino acid», la même souche, incubée dans les mêmes conditions, peut produire jusqu'à 285 mg/l d'EPS et avoir une viscosité de 165 mPas.S. *Lb. bulgaricus* CNRZ 737 produit jusqu'à 425 mg/l d'EPS et a une viscosité de 220 mPas.S dans du lait écrémé enrichi de 1% de casamino acid. Cette souche ne semble pas capable de produire des EPS dans un milieu autre que du lait (Cerning *et al.*, 1986).

Kimmel *et al.* (1998) rapportent que, pour la souche de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR cultivée dans un milieu semi-défini (38°C, pH 5.0), l'ajout de 30 g de Bacto-Casitone (Difco Laboratories, Détroit, Mich.) permet d'obtenir une production maximale de 354 mg/l d'EPS.

#### 1.2.4.1.4 Le pH

L'influence du pH initial du milieu de culture sur la production d'EPS par plusieurs bactéries a été clairement démontrée par plusieurs auteurs (Kimmel *et al.*, 1998 ; Mozzi *et al.*, 1994 ; Shellhaass *et al.*, 1983). L'effet du pH sur la production d'EPS peut cependant être évalué de deux façons ; par l'étude de pH initial lors de fermentations sans contrôle du pH ou par l'étude de l'effet d'un pH stable tout le long d'une fermentation en contrôle de pH.

En 1958, Wilkinson démontrait qu'un pH près de la neutralité favorisait la production de mucus chez plusieurs souches. Depuis, l'étude des facteurs influençant la production de polysaccharides par les bactéries lactiques a permis de déterminer que, en général, un pH entre 6.0 et 6.5 est favorable à la production d'EPS (Mozzi *et al.*, 1994 ; Gassem *et al.*, 1997 ; Kimmel *et al.*, 1998). Shellhaass *et al.* (1983) rapporte que la

production d'EPS par la souche de *Lb. delbrueckii* RR cultivée dans du lait écrémé est meilleure lorsque le pH de départ se situe entre 6.0 et 6.2, plutôt que entre 5.5 et 5.8. Les mêmes observations ont été faites pour des souches de *S. thermophilus* et de *Lc. cremoris*.

Le contrôle du pH lors de la fermentation est favorable à la production d'EPS et à la stabilité du caractère (Mozzi *et al.*, 1996 ; Kimmel *et al.*, 1998). Ainsi, la production d'EPS par la souche de *Lb. delbrueckii* RR est 3,6 fois plus importante dans une fermentation en contrôle de pH que dans une fermentation sans contrôle de pH (Mozzi *et al.*, 1996). Par contre, pour la souche de *Lb. casei* de Mozzi (1996), la croissance et la production d'EPS (488 mg/l) atteignent un maximum à un pH stable à 6.0. Dans le cas de *Lb. sake*, il semble qu'un pH de 5.8 favorise la production d'EPS, alors qu'un pH de 6.2 stimule la croissance.

L'hypothèse émise plus haut pour expliquer l'effet de la température sur la production de polymères exocellulaires peut aussi s'appliquer pour le pH. Un pH stable permet d'allonger la phase logarithmique et la phase stationnaire de croissance de la bactérie, ce qui provoque un ralentissement de la synthèse des peptidoglycanes et des acides téichoïques, favorisant la production de polymères exocellulaires (Gassem *et al.*, 1997).

### **1.2.5 Instabilité du caractère**

L'instabilité du caractère épaississant des bactéries lactiques est un phénomène bien connu et problématique pour les industries laitières. La diminution ou même la perte du caractère épaississant peut survenir à la suite d'une série de repiquages ou lors d'une incubation prolongée (Macura et Townsley, 1984 ; Cerning *et al.*, 1991 ; Garcia-Garibay *et al.*,

1991). L'instabilité du caractère épaississant peut aussi être reliée à la présence d'enzymes dégradantes de type glycohydrolase, activées dans certaines conditions (Macura et Townsley, 1984 ; Cerning *et al.*, 1990 ; Mozzi *et al.*, 1996), ou de plasmides (Cerning, 1990). Finalement, l'instabilité du caractère peut être causée par la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des polymères (Stingele *et al.*, 1996). La diminution ou la perte du caractère épaississant lors de repiquages subséquents ne semble pas associée à une diminution de croissance. D'après Garcia-Garibay *et al.* (1991), une souche de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* peut perdre son caractère épaississant lorsque repiquée plusieurs fois dans le lait, alors que la population se maintient entre  $5 \times 10^7$  et  $1 \times 10^8$  CFU/ml.

#### 1.2.5.1 Les enzymes dégradantes

Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a permis de relier la diminution ou la perte du caractère épaississant à la présence d'enzymes dégradantes. Cependant, le phénomène a été observé par plusieurs auteurs. L'hypothèse de la présence de glycohydrolases, enzymes dégradantes capables d'hydrolyser les polysaccharides dans du lait ou dans de l'ultra filtrat de lait, a été rapportée pour la première fois par Cerning (1988) dans une étude sur les EPS des bactéries lactiques mésophiles.

Le contenu en EPS d'un échantillon chauffé à 90°C pendant 10 min a été comparé au contenu d'un autre échantillon non traité. La concentration en EPS est de 40% plus élevée lorsqu'un traitement thermique est appliqué avant l'extraction (Cerning *et al.*, 1988). Gancel et Novel (1994a) ont obtenu des résultats similaires avec *Sc. thermophilus*. Ils ont cependant observé deux phases de dégradation. La première apparaît en phase stationnaire et diminue la quantité d'EPS produite et la seconde se produit

en phase de croissance de la souche et affecte la quantité d'EPS accumulée.

### 1.2.5.2 Les plasmides

Pour certaines bactéries lactiques mésophiles, le caractère mucoïde peut être causé par la présence de plasmides ; dans ce cas, l'instabilité du caractère épaississant est due à la perte de un ou plusieurs plasmides. Ainsi, le caractère mucoïde de quelques bactéries lactiques mésophiles a pu être lié à la présence de plasmides.

Vedamuthu et Neville (1986) ont démontré que la capacité d'une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* à produire des EPS est directement reliée à un plasmide de 18.5 MDa. Le phénotype mucoïde a ensuite été transféré avec succès à un autre lactocoque non épaississant. De la même façon, Von Wright et Tynkkynen (1987) ont transféré le caractère mucoïde d'une souche de *Lc. lactis* ssp. *lactis* à une souche de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* muc- par l'entremise d'un plasmide de 30 MDa. Le phénotype mucoïde de deux souches de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* utilisées dans des laits fermentés en Finlande et en Suède a aussi pu être relié à la présence de deux plasmides de taille différente : 17 MDa pour la première et 30 MDa pour la seconde (Neve *et al.*, 1988). La digestion par une endonucléase de restriction et l'hybridation ADN-ADN de ces plasmides ont révélé des régions d'ADN homologues permettant de croire à l'origine commune du caractère mucoïde chez les lactocoques. Vescovo *et al.* (1989) ont démontré l'implication d'un plasmide de 4.5 MDa dans le phénotype muc+ d'une souche de *Lactobacillus casei* ssp. *casei*.

Plus récemment, un plasmide de 40 kilopaires de bases codant pour la production d'EPS chez *Lc. lactis* NIZO B40 a été isolé et caractérisé (van

Kranenburg *et al.*, 1997). Pour la première fois, des gènes *eps* impliqués dans la synthèse de polysaccharides ont été identifiés sur un plasmide d'une souche mucoïde. Les détails de cette étude sont présentés plus loin.

### **1.2.5.3 Identification et structure des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS**

L'instabilité de la production d'EPS ne peut pas toujours être reliée à la perte de plasmides puisque certaines souches au caractère mucoïde instable n'en possèdent pas. Les gènes nécessaires à la synthèse du polymère seraient dans ce cas chromosomiques et l'instabilité du caractère pourrait être causée par des éléments génétiques mobiles ou par de l'instabilité génomique généralisée comme des délétions et des réarrangements (Stingele *et al.*, 1996). Ces deux phénomènes ont déjà été observés chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Sc. thermophilus*.

Malgré l'intérêt marqué que suscitent les polysaccharides produits par ces souches, très peu d'études ont été faites jusqu'à maintenant sur les gènes responsables de la synthèse et de l'assemblage d'EPS chez les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. En fait, les premiers travaux traitant de l'aspect moléculaire de la biosynthèse, les polysaccharides, ont été faits sur les bactéries à Gram négatif. Les travaux sur la capsule de *Escherichia coli* ont permis d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage des polysaccharides bactériens. Ainsi, la biosynthèse de la capsule commence par la formation de sous-unités d'oligosaccharides et les monosaccharides activés sont transférés un à un sur un transporteur lipidique grâce à l'action de transférases. Ensuite, le polymère est formé par polymérisation des sous-unités d'oligosaccharides et transporté à travers le cytoplasme vers l'extérieur

de la membrane pour former la capsule (Boulnois et Jann, 1989).

De par leur rôle dans la virulence, les polysaccharides capsulaires des pneumocoques ont fait l'objet de plusieurs études. La structure des capsules de plusieurs sérotypes de *S. pneumoniae* est bien connue, mais on sait peu de choses sur l'aspect moléculaire de la biosynthèse de ces polymères capsulaires (Kolkman *et al.*, 1996). Les premiers travaux ont permis de déterminer que les gènes *cps* codant pour la synthèse de la capsule des pneumocoques sont regroupés en une même séquence et sont similaires d'une espèce à l'autre. De plus, il semble y avoir une certaine similarité entre les gènes codant pour la biosynthèse de la capsule et ceux codant la biosynthèse de polysaccharides plus ou moins complexes que d'autres souches bactériennes mieux connues.

Le premier travail significatif sur l'aspect moléculaire de la production de polysaccharides exocellulaires par une souche de bactéries lactiques utilisée dans des produits fermentés a été publié par Stingle et coll. en 1996. Les gènes *eps* de la souche de *Streptococcus thermophilus* Sfi6 codant pour la production d'EPS ont été identifiés et caractérisés. La séquence de 13 gènes *eps* (*epsA* à *epsM*) forme une région de 14.5 kilobases dans le génome de *S. thermophilus* Sfi6. Les fonctions de certains de ces gènes ont pu être déduites par l'étude de la similarité des séquences avec celles de gènes connus pour être impliqués dans la production de polysaccharides chez d'autres espèces bactériennes. Ainsi, une région impliquée dans la régulation serait localisée au début de la séquence (*epsA*), la région centrale formée des gènes *epsE*, *F*, *G*, *H* et *I* coderaient pour des glucosyl-transférases impliquées dans la biosynthèse des unités répétitives et, finalement, les gènes *epsC*, *epsD*, ainsi que *epsJ* et *epsK* seraient impliqués dans la polymérisation et l'exportation du polysaccharide formé. Les fonctions des gènes *epsB*, *epsL* et *epsM* n'ont

pu être déterminées par cette méthode.

Sur le plasmide responsable de la production d'EPS chez *Lc. lactis*, une région de 12 kilopaires de bases contenant 14 gènes (*epsRXABCDEFGHIJKL*) a été identifiée comme étant essentielle à la synthèse du polymère. De la même façon que pour *S. thermophilus* Sfi6, le rôle de ces gènes dans la biosynthèse du polymère a été proposé. Ainsi, le gène *epsD* coderait pour une glycosyl-transférase responsable de l'attachement des premiers sucres de l'unité répétitive au transporteur lipidique alors que les gènes *epsE*, *epsF*, *epsG* et *epsH* coderaient pour d'autres glycosyl-transférases responsables de l'attachement des sucres suivants. La polymérase du polysaccharide serait codée par le gène *epsI* qui pourrait aussi coder pour une protéine transmembranaire permettant l'exportation du polymère. Finalement, *epsK* serait impliqué dans le transport à travers la membrane du polymère formé (van Kranenburg et al., 1997).

Depuis quelques années, plusieurs séquences de gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides exocellulaires ou capsulaires, de lipopolysaccharides ou d'acides téichoïques de différentes bactéries ont été identifiées et caractérisées. Dans leurs travaux sur *S. thermophilus* et sur *Lc. lactis*, Stingle et van Kranenburg ont respectivement démontré une certaine similarité (Figure 1.1) entre des séquences de gènes *eps* et de des séquences de gènes de plusieurs autres micro-organismes comme *cps* de *S. agalactiae* et *S. pneumoniae*, *cap* de *S. aureus*, *lyt* de *B. subtilis*, *exo* de *R. meliloti*, *cld* de *Enterobacteriaceae* et *lip* de *N. meningitidis*.

<i>S. thermophilus</i>	<i>epsA epsB epsC epsD epsE epsF</i>	<i>epsG epsH epsI epsJ epsK epsL epsM</i>		
<i>L. lactis</i>	<i>epsR epsX epsA epsB epsC epsD epsE epsF epsG epsH epsI epsJ epsK epsL</i>			
<i>S. agalactiae</i>	<i>cpsA cpsB cpsC cpsD</i>			
<i>S. pneumoniae</i>	<i>cpsA cpsB cpsC cpsD cpsE</i>			
<i>S. aureus</i>	<i>capC</i>	<i>capB</i>	<i>capM</i>	<i>capG</i>
			<i>capH</i>	
<i>B. subtilis</i>	<i>lytR</i>			<i>cysE</i>
<i>R. meliloti</i>		<i>exoP exoP exoY</i>		<i>nodL</i>
Enterobacteriaceae		<i>cld</i>	<i>rfbP</i>	<i>rfaK lacA rbfV rfc</i>
<i>N. meningitidis</i>				<i>lipB</i>
	<b>Régulation</b>	<b>Polymérisation et exportation</b>	<b>Biosynthèse (Glycosyl-transférases)</b>	<b>Polymérisation et exportation</b>

**Figure 1.1** : Similitude des gènes *eps* avec des gènes impliqués dans la production de polymères chez d'autres micro-organismes (Stingele *et al.*, 1996 ; van Kranenburg *et al.*, 1997).

#### 1.2.5.4 Les glycosyl-transférases

Maintenant que les gènes impliqués dans la synthèse des polysaccharides ont été révélés, la recherche se penche sur la compréhension de l'implication de ces gènes dans les différentes étapes de biosynthèse des polymères exocellulaires. Ces gènes de la biosynthèse sont majoritairement retrouvés dans la partie centrale de la séquence et codent pour des glycosyl-transférases. Ces enzymes sont essentiels lors de la formation des polysaccharides et font en ce moment l'objet de nombreuses études (Kolkman *et al.*, 1996, 1997).

Une meilleure connaissance fondamentale de ces gènes et de leur implication dans la biosynthèse des polymères permettra éventuellement la création d'outils génétiques qui pourront être utilisés pour étudier la régulation ou même modifier des bactéries lactiques mucoïdes. Ces applications peuvent constituer un avantage considérable dans l'utilisation de bactéries lactiques tant aux niveaux industriel et commercial que du point de vue de la recherche fondamentale.

## **1.3 Détection de polysaccharides exocellulaires**

Il existe plusieurs façons de détecter la présence de polysaccharides. Les polysaccharides peuvent être détectés qualitativement par un examen visuel, par coloration ou par microscopie électronique. La mesure de la viscosité et le dosage des EPS purifiés permet de les détecter quantitativement.

### **1.3.1 Examen visuel**

La façon la plus simple de détecter la production d'EPS chez une souche consiste à examiner une colonie sur un milieu gélosé. La colonie d'une souche productrice aura une apparence brillante et en touchant la colonie avec un cure-dents ou avec une anse à ensemencer (manche de Koch), il y aura formation de longs filaments visqueux. Cependant, certaines souches de bactéries lactiques ne produisent pas de polymères sur un milieu gélosé mais en produisent en milieu liquide sous certaines conditions bien définie.

### **1.3.2 Les colorations**

Il est possible de sélectionner des clones bactériens producteurs d'EPS, appelés clones Muc+, en ajoutant des colorants cationiques dans le milieu de culture. Les clones Muc+ sont révélés par le masquage de la coloration par le polysaccharide produit.

Les colorants cationiques ont une affinité pour les polysaccharides anioniques et neutres ; ils développent des interactions ioniques avec les anions organiques ou inorganiques du milieu environnant. Additionné au

milieu de croissance, le colorant cationique se fixe donc sur le peptidoglycane de la paroi bactérienne, ce qui entraîne une coloration de la colonie d'une souche non-productrice. Ces colorants ne présentant pas d'affinité pour les polysaccharides excrétés, les polysaccharides produits masquent alors la coloration et les clones Muc<sup>+</sup> apparaissent blancs (Gancel *et al.*, 1988).

Un exemple de colorant cationique est le rouge de ruthénium qui donne une coloration rose foncé au milieu de culture. Les colonies Muc<sup>+</sup> apparaissent donc blanches sur fond rose par le masquage de la couleur dû aux exopolysaccharides produits. Les clones Muc<sup>-</sup> apparaissent rosés. Cette technique a été utilisée par Bouzar *et al.* (1995) pour la sélection de clones d'une souche de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* produisant différents niveaux de polysaccharides extracellulaires. De cette façon, Stinglele *et al.* (1996) ont sélectionné la souche *Streptococcus thermophilus* Sfi6 possédant le phénotype de production d'EPS stable.

### 1.3.3 Microscopie électronique

Des photos de microscopie électronique à balayage ont permis de mettre en évidence les polysaccharides produits par des souches de bactéries lactiques mucoïdes dans des laits fermentés. Il a ainsi été observé que le film de polymère entoure la cellule et relie entre elles les cellules productrices. Les polymères forment aussi des liens entre les cellules et la matrice de caséines coagulées (Bottazzi et Bianchi, 1986 ; Shellhaass *et al.*, 1985).

Les polysaccharides capsulaires et excrétés par cellules peuvent aussi être mis en évidence par microscopie électronique à transmission. Les polymères sont marqués et visualisés autour de la capsule cellulaire.

Plusieurs marqueurs cationiques peuvent être utilisés pour colorer les polysaccharides. La ferritine est un marqueur polycationique qui se lie électrostatiquement aux sites anioniques à la surface de la cellule. Cette technique a permis de mettre en évidence la capsule de plusieurs bactéries comme *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* et *Pasteurella haemolytica* (Jacques et Foiry, 1987).

Le rouge de Ruthénium, la combinaison de la lysine avec du rouge de Ruthénium et le bleu alcian sont d'autres types de marqueurs cationiques qui peuvent être utilisés pour marquer les polysaccharides exocellulaires bactériens dans le but de les visualiser par microscopie (Fassel *et al.*, 1992).

#### **1.3.4 Détection des EPS par mesure de la viscosité du milieu fermenté**

La mesure de la viscosité produite par les EPS est une méthode très utilisée, mais qui a des limites ; les résultats sont généralement difficiles à analyser, en particulier pour les solutions non-newtoniennes. La viscosité en milieu liquide n'est pas seulement affectée par la quantité de polysaccharides formée, mais aussi par le type de polymère et autres produits métaboliques sécrétés dans le milieu. Un micro-organisme peut former d'une fois à l'autre la même quantité de polymères, mais de structure légèrement différente ce qui modifie leur comportement rhéologique. De plus, les produits métaboliques, tel l'acide lactique, peuvent agir sur la viscosité, notamment en provoquant une baisse de pH, ce qui a pour conséquence de faire précipiter les caséines et ainsi coaguler le lait. Enfin, des interactions peuvent se produire dans le milieu de culture entre les polysaccharides et d'autres constituants du milieu comme les caséines et les cellules elles-mêmes (Bottazzi et Bianchi, 1986 ; Schellhaass et Morris, 1985 ; Teggatz et Morris, 1990). La

viscosité semble aussi diminuer après une incubation prolongée (Macura et Townsley, 1984).

Il y a plusieurs façons de mesurer la viscosité et, par le fait même, différentes unités de mesure. La viscosité peut se mesurer directement dans le milieu de culture ; il s'agit alors de viscosité apparente. La viscosité des polysaccharides peut aussi se mesurer à partir d'un échantillon purifié, resuspendu dans de l'eau distillée; il s'agit alors de viscosité intrinsèque (Brookfield Engineering Laboratories, MA., USA).

L'unité fondamentale de mesure de viscosité est le «poise» ou le «centipoise». Le «pascal-seconde» (Pa\*s) ou «millipascal-seconde» (mPa\*s) est l'unité de mesure de viscosité du système internationale et est souvent utilisé conjointement avec le système métrique (Brookfield Engineering Laboratories, MA., USA). Un «pascal-seconde» équivaut à 10 «poises».

### **1.3.5 Extraction, purification et dosage**

La meilleure façon de doser quantitativement les EPS est de les extraire du milieu de culture et de les doser. Les polysaccharides bactériens extracellulaires précipitent en présence d'éthanol. Après les avoir purifiés pour enlever les protéines et les résidus du milieu pouvant interférer lors du dosage, il est possible de les doser avec une méthode colorimétrique comme celle de Dubois (1956) à l'acide sulfurique et phénol. Lors de ce dosage, la courbe étalon est produite avec du glucose et les unités de mesure sont exprimées en mg/l d'équivalents glucose. Cette méthode a aussi ses limites et un milieu défini est recommandé. En effet, certains éléments présentes dans le MRS par exemple peuvent précipiter avec l'éthanol et fausser les résultats de dosage (Garcia-Garibay et Marshall,

1991). L'extraction des EPS dans le lait est plus compliquée ; les constituants du lait peuvent interférer dans la précipitation des polymères et les EPS bactériens ont tendance à s'associer aux protéines du lait pour former un complexe glycoprotéique. Il faut alors hydrolyser les caséines avec des enzymes spécifiques et bien purifier les polymères recueillis par une précipitation à l'éthanol (Bouzar *et al.*, 1997).

## **1.4 Les bactéries probiotiques**

### **1.4.1 Généralités**

Le marché des produits fermentés est en expansion dans plusieurs pays européens et au Japon. Les consommateurs sont davantage à la recherche de produits dits naturels et biologiques, c'est-à-dire bons pour la santé. Les produits laitiers fermentés répondent à la demande des consommateurs par leurs qualités biologiques et la vaste gamme de produits disponibles. Afin de répondre à cette demande grandissante, de plus en plus de produits contenant des souches de bactéries lactiques probiotiques ont fait leur apparition sur les marchés alimentaires. Ces aliments contiennent des bactéries probiotiques reconnues pour leurs effets bénéfiques sur le métabolisme intestinal de l'humain.

### **1.4.2 Les probiotiques**

Le terme probiotique met l'accent sur la bactérie plutôt que sur la substance, qui fait référence à antibiotique. Les bactéries probiotiques peuvent être décrites comme étant «un supplément alimentaire microbien qui peut affecter favorablement l'animal hôte en améliorant sa flore intestinale» (Roy, 1996 ; Marshall, 1996).

Les produits contenant des bactéries probiotiques peuvent avoir un effet prophylactique et ainsi prévenir un déséquilibre de la flore intestinale ou un effet thérapeutique et rétablir l'équilibre de la flore intestinale lorsqu'il est perturbé. Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau

de substances carcinogènes, et de l'inactivation de composés toxiques à la stimulation du système immunitaire (Bottazzi, 1994). Il est cependant important de souligner que, malgré le nombre grandissant d'études portant sur les probiotiques, certaines de ces affirmations restent à confirmer. Par exemple, l'amélioration nutritionnelle et l'augmentation de la tolérance au lactose ont été prouvées scientifiquement alors que le pouvoir antitumorale reste encore à établir.

### **1.4.3 Les espèces probiotiques**

Les bactéries probiotiques sont des bactéries lactiques entériques. Elle sont présentes naturellement dans le tractus intestinal de l'animal à un moment ou un autre de sa vie. Les bifidobactéries et les lactobacilles sont les deux principales souches de bactéries probiotiques utilisées dans les produits alimentaires.

#### **1.4.3.1 Les bifidobactéries**

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram positif, anaérobies, immobiles, et non-sporulantes en forme de bâtonnets (Ballongue, 1993). Dans les jours suivant la naissance, les bifidobactéries dominent la flore intestinale des enfants. Avec l'âge, et selon les habitudes alimentaires, la population de bifidobactéries est surpassée par d'autres espèces de micro-organismes. Chez l'adulte, elle forme de 5 à 10% de la flore intestinale de l'humain (Roy, 1997).

Des 32 espèces de bifidobactéries connues, les espèces *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, et *B. animalis* sont les plus utilisées. Comme son nom l'indique, cette dernière espèce est d'origine animale tandis que les deux premières proviennent du tractus intestinal de l'homme. En général, les

produits probiotiques commerciaux contiennent un mélange de *Streptococcus thermophilus*, de *Lactobacillus bulgaricus*, de *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium animalis* (Roy, 1996).

#### 1.4.3.2 Les lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positifs, anaérobies facultatives, homo-fermentaires, catalase négatives, non-sporulantes et en forme de bâtonnets (Bergey's, William R. Hensyl, 1994). Contrairement aux bifidobactéries, les lactobacilles n'apparaissent dans la flore intestinale de l'humain qu'après la naissance et leur population reste moins importante (Roy, 1996).

Traditionnellement, les lactobacilles font partie des ferments de départ pour la fabrication de différents produits fermentés dans l'industrie laitière. *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* sont le plus souvent retrouvés dans des produits comme que le yogourt, les fromages de type suisse ou italien, le babeurre bulgare, le kéfir et le koumis. *Lactobacillus helveticus* peut aussi faire partie de certains de ces produits. *Lactobacillus acidophilus* est utilisé dans la production de laits acidifiés et de certains types de yogourts (Marshall et Tamine, 1997). *Lactobacillus casei* fait partie du ferment de départ dans la fabrication du Yakult, un lait fermenté japonais (Mozzi *et al.*, 1994) et est de plus en plus introduite dans les nouvelles générations de yogourt en tant que probiotique. Finalement, la souche de *Lactobacillus rhamnosus* GG est certainement la plus connue et la plus utilisée dans les produits fermentés comme ferment probiotique.

#### **1.4.4 Critères de sélection de bonnes souches de probiotiques**

Les souches de probiotiques (lactobacilles et bifidobactéries) peuvent faire partie des produits alimentaires de deux façons : soit dans des laits fermentés, ou l'on fait croître les bactéries en tant que ferments, soit dans d'autres types de produits (produits non-fermentés) où elles sont ajoutées en quantité importante. Dans les deux cas, les bactéries doivent rester viables au cours de la préparation et de l'entreposage du produit. Ainsi, les souches utilisées doivent être en mesure de tolérer le degré d'acidité du produit fermenté et, généralement, la survie des lactobacilles est meilleure que celle des bifidobactéries. Ensuite, une bonne souche probiotique doit être résistante aux sécrétions du système digestif et doit pouvoir proliférer dans l'intestin. La survie des bactéries lactiques aux acides de l'estomac et à la bile de l'intestin dépend, d'une part, des propriétés de l'aliment vecteur et, d'autre part, de leur résistance à l'acidité (Roy, 1996). Les produits fermentés possèdent ce pouvoir tampon favorisant la survie des bactéries lactiques ingérées.

## **CHAPITRE II**

### **PROBLÈME DE RECHERCHE, HYPOTHÈSE ET QUESTION DE RECHERCHE ET OBJECTIFS**

#### **2.1 Définition du problème de recherche**

Les polysaccharides sont largement utilisés dans la formulation des aliments, et leur marché, en terme de volume utilisé pour une variété d'applications, est en croissance constante. Les propriétés physiques des polysaccharides les rendent capables d'épaissir ou de gélifier les solutions et ainsi de contrôler l'état de l'eau dans le produit. Leurs propriétés fonctionnelles exploitées dans les aliments sont diverses et incluent les propriétés épaississantes, gélifiantes, texturantes, stabilisantes, émulsifiantes et celles permettant la liaison de l'eau et la formation d'arômes. Les polysaccharides appartiennent à la classe des fibres alimentaires et peuvent servir de substitut à basse teneur en calories pour remplacer le gras (Stephen et coll. 1995).

Beaucoup de bactéries lactiques utilisées en industries laitières produisent des polysaccharides extra cellulaires, qui sont excrétés lors de la fermentation. La production de ces exopolysaccharides par les bactéries lactiques est une propriété technologique forte intéressante pour

prévenir la synérèse et améliorer la texture des produits fermentés (Cerning, 1994). Cependant, les propriétés épaississantes des ferments lactiques, en particulier mésophiles, ne sont pas actuellement exploitées pleinement par l'industrie laitière, car on ne dispose pas de souches productrices de polysaccharides entièrement caractérisées et performantes.

Parmi les bactéries lactiques productrices de polysaccharides, (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. et *Streptococcus* spp.), nous nous intéresserons principalement aux lactobacilles du groupe casei. Les propriétés épaississantes de ces bactéries lactiques mésophiles ne sont pas encore bien connues et peu de données sont disponibles sur la production de polysaccharides exocellulaires de ces souches.

De plus, de par leurs propriétés nutritionnelles, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* sont considérées comme des probiotiques ; ce qui est un caractère de plus en plus recherché par les consommateurs.

## **2.2 Hypothèse et question de recherche**

La production d'exopolysaccharides est différente chez trois souches distinctes de bactéries lactiques mésophiles (*Lactobacillus* spp.) utilisées en industrie laitière

Quelles sont les conditions de culture (température, source de carbone) permettant la production optimale d'exopolysaccharides (EPS) par trois souches de bactéries lactiques mésophiles (*Lactobacillus* spp.) utilisées en industrie laitière ?

## 2.3 Objectifs

Sélectionner des souches de bactéries lactiques mésophiles (*Lactobacillus* spp.) sur la base d'une production abondante d'EPS. La souche *Lactobacillus casei rhamnosus* ATCC 9595M servira de souche témoin.

Caractériser et différencier génétiquement les souches sélectionnées ainsi que déterminer leur profil plasmidique.

Évaluer et comparer la production d'EPS de trois souches de *Lactobacillus* spp. sélectionnées. L'évaluation de la production se fera dans le milieu synthétique BMM en faisant varier la température de croissance (optimale : 37°C et sub-optimale : 32°C) et la source de carbone (glucose et lactose) dans des fermenteurs sous contrôle de pH constant à 6.0.

## **CHAPITRE III**

# **CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE-PRODUCING STRAINS OF THE *LACTOBACILLUS CASEI* GROUP BY DOT-BLOT HYBRIDATION, DNA FINGERPRINTING, ELECTRON MICROSCOPY AND MILK FERMENTATION**

**I. Dupont<sup>1</sup>, P. Ward<sup>2</sup>, D. Roy<sup>2</sup>, D. Montpetit<sup>2</sup> and G. LaPointe<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dairy Research Centre, Université Laval, Qc, Canada.

<sup>2</sup> Food Research and Development Centre, Agriculture Canada 3600, Casavant Boulevard West, Saint Hyacinthe, Québec, J2S 8E3, Canada

### 3.1 Résumé

Des souches de référence ainsi que des souches industrielles appartenant au groupe *Lactobacillus casei* ont été criblées pour leur capacité à produire des EPS. La caractérisation et la différenciation de sept souches productrices d'EPS ont été effectuées à l'aide de méthodes génétiques. En utilisant des amorces basées sur des séquences d'ADN codant pour l'ARN 16S, l'appartenance des souches sélectionnées au genre *Lactobacillus* a été confirmée puisque, par le test PCR, il a été possible de générer un amplicon de 541 pb. L'identification rapide des souches de lactobacilles a été réalisée en utilisant des oligonucléotides complémentaires à une région de l'ARN ribosomal 23S spécifiques pour *Lb. casei(zeae)/rhamnosus* et *Lb. paracasei (casei)*. L'identification finale des souches a été obtenue par une mesure quantitative d'hybridation ADN-ADN en utilisant l'ADN marqué de façon non radioactive des souches de référence pour les espèces *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. zeae* et *Lb. paracasei*. Enfin, l'électrophorèse par champs pulsés (PFGE) a été utilisée pour séparer de longs fragments d'ADN générés par l'utilisation de l'une ou l'autre des deux enzymes de restriction les plus utiles pour différencier les souches productrices d'EPS soit : *Sma* I et *Apa* I. Le profil des bandes générées permet de comparer les souches entre elles. Un profil plasmidique a aussi été fait pour essayer de relier la production de polysaccharides et le caractère mucoïde à la présence d'un ou de plusieurs plasmides.

L'analyse des profils d'ADN génomiques générés par RAPD (random amplified polymorphic DNA) indique que quatre des sept souches étudiées appartiennent au groupe des *Lb. zeae/rhamnosus* alors que les trois autres souches font partie du groupe *Lb. paracasei/casei*. L'analyse des

profils des bandes obtenues par l'électrophorèse par champs pulsés (PFGE) démontre que trois souches de *Lb. rhamnosus* sont identiques de même que deux souches *Lb. casei*. Ainsi, ces résultats permettent de réduire le nombre de souches à trois ; *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, *Lb. rhamnosus* Rosell et *Lb. casei* Type V ont été retenues pour la suite du projet. Le marquage à la ferritine du matériel extracellulaire a permis de visualiser par microscopie électronique les différents niveaux de production d'EPS des souches étudiées.

Finalement, la production de polysaccharides des trois souches retenues a été évaluée lors de fermentations dans le lait. Les souches de *Lb. rhamnosus* produisent plus de 240 mg/l d'EPS alors que la souche *Lb. casei* produit à peine 60 mg/l d'EPS dans le lait. Ces résultats démontrent que des souches appartenant au même groupe de *Lactobacillus (casei)* ne produisent pas nécessairement la même quantité d'exopolysaccharides.

### 3.2 Abstract

Characterization and differentiation of seven selected exopolysaccharide (EPS)-producing strains were performed using molecular methods. Using a set of 16S rDNA primers for PCR amplification, oligonucleotides complementary to sequences of 23S rDNA specific for *Lb. casei/rhamnosus* and *Lb. paracasei* and dot-blot hybridization, four isolates were identified as *Lb. casei (zeae)/rhamnosus* and three as *Lb. paracasei (casei)*. Some mucoid strains of *Lb. rhamnosus* showed identical restriction patterns when compared with reference strains which were non-mucoid. Genomic DNA fingerprinting using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) profiles identified three isolates as belonging to *Lb. rhamnosus* and four strains grouped into the *Lb. casei* cluster. PFGE restriction analysis allowed detection of identical genomic profiles, thereby reducing the number of strains to screen for EPS production. *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, *Lb. rhamnosus* Roselland *Lb. casei* Type V were used for further analysis. Cytochemical labeling with ferritin shows that the capsular material had variable thickness from one strain to the other. These strains were also used for fermentation of milk. The strains of *Lb. rhamnosus* produced more than 240 mg/l of EPS whereas the strains of *Lb. casei* gave only a small amount of EPS (< 60 mg/l) in milk. These results indicate that strains belonging to the same group (*casei*) of *Lactobacillus* did not show similar EPS production.

### 3.3. Introduction

Exopolysaccharides (EPS) produced by mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria play an important role in the improvement of the texture and viscosity of food products (Cerning, 1990). It has also been claimed that EPS isolated from lactic acid bacteria may have anti-tumor activity and could be considered as probiotic (Oda *et al.*, 1983). EPS production by *Lactobacillus casei* remains the least known among EPS-producing lactic acid bacteria, although this group of lactobacilli has become important as adjunct cultures for the production of fermented milks (Salminen *et al.*, 1996).

Kojic *et al.* (1992) described an EPS-producing strain *Lactobacillus casei* CG11 which was isolated from soft, white, home-made cheese. Plasmid curing experiments revealed that EPS production by this strain seems to be linked to a plasmid approximately 30 kb in size. Strain CG11 was grown in basal minimal medium (BMM) which allows a more precise determination of EPS production and of monomer identity, because it does not contain any of the polysaccharides present in complex media.

An industrial strain of *Lb. rhamnosus* isolated from fresh fermented milk which efficiently produces EPS in a synthetic medium was selected by Gamar *et al.* (1997). A number of physiological conditions (medium composition, physico-chemical and kinetic parameters) have already been described and are known to influence EPS production by LAB, but few studies have concerned slime formation by strains of *Lb. rhamnosus*.

The aim of the present study was to perform molecular characterization by dot-blot hybridization and DNA fingerprinting for comparing with

reference strains, and for discriminating between exopolysaccharide-producing isolates presumptively identified as belonging to the *Lactobacillus casei* group. Milks fermented with three selected strains were studied by measuring viscosity and quantity of EPS produced.

### **3.4 Materials and methods**

#### **3.4.1 Microorganisms**

Mucoid strains of lactobacilli were obtained from commercial preparations or reference cultures, and kept frozen in BHI with 15% glycerol. Other reference strains of the *Lactobacillus casei* group were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM, Göttingen, Germany). Strains were selected for ropiness by touching colonies with a sterile inoculation loop. For DNA analysis, mucoid and non-mucoid strains were subcultured in 20 ml of Lactobacilli MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI). For EPS extraction, mucoid strains were subcultured in MRS twice before subculturing in skim milk.

#### **3.4.2 DNA extraction**

DNA of bacterial strains was prepared according to the procedure of Klaenhammer (1984) for the simultaneous utilization of mutanolysin and lysozyme, and the procedure of Ausubel *et al.* (1991) for the extraction with CTAB/NaCl. Cultures (10 ml) of *Lactobacillus* spp. were pelleted by centrifugation and the pellet was resuspended in 1 ml of 12% sucrose and 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), washed twice and finally resuspended in 400  $\mu$ l of the same buffer. Mutanolysin (100  $\mu$ g) and lysozyme (200  $\mu$ g) were

added to the solution, which was incubated for 2 h at 37°C. After the addition of 100  $\mu$ l of 10% sodium dodecyl sulfate, 200  $\mu$ l of 250 mM EDTA (pH 8.0) and 1 mg of proteinase K (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada), the solution was incubated for 2 h at 37°C. After incubation, 100  $\mu$ l of CTAB/NaCl solution (10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide in 0.7M NaCl) and 120  $\mu$ l of 5 M NaCl were also added and the mixture was incubated at 65°C for 20 min. The DNA was extracted three times with 0.7 ml of 24:1 chloroform/isoamyl alcohol (24:1). The aqueous phase was collected and then 0.5 ml of cold isopropanol was added. The precipitated DNA was chilled at -20°C for 30 min and recovered by centrifugation. The DNA pellet was resuspended in 200  $\mu$ l of deionized water. The concentration of purified DNA was determined using a mini-fluorometer TKO 100 (Hoefer Scientific, San Francisco, CA, USA) and capillary tubes.

### 3.4.3 DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR)

The procedure of Tilsala-Timisjärvi *et al.* (1991) was followed, with some modifications. The forward primer was LACTO U1 (P6): CCATGCACCACCTGTC (Tilsala-Timisjärvi *et al.*, 1991) and the reverse primer was UNIVER L11:CAGCMGCCGCGGTAATWC. The reaction volume used was 50  $\mu$ l, and the DNA concentration was 100 ng. PCR amplification was performed with an Amplitron Thermal Cycler (Barnstead/Thermolyne, Qc, Canada) using the following cycle parameters: denaturation at 92°C for 30 sec, primer annealing at 45°C for 30 sec and primer extension at 72°C for 1 min, repeated for 35 cycles. The program included a preincubation at 92°C for 2 min before the first cycle and a final incubation at 72°C for 10 min followed by a cooling step down to 4°C after the last cycle. After cycling, 10  $\mu$ l of each PCR reaction mixture was run on a 2% agarose gel in 1.0X TAE buffer for 2-3 h at

100V. Gels were stained for 45 min. with 0.5 mg/l ethidium bromide, washed for 1 h with demineralized water, photographed under UV transillumination with the gel print 2000i system (Bio/Can Scientific Inc., Ont., Canada).

The RAPD reaction volume of 25  $\mu$ l consisted of 12.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ l of 10X Taq buffer (Boehringer Mannheim), 2  $\mu$ l of each dNTP (A,T,G, and C at 2.5 mM; Pharmacia Biotech Inc. Qc., Canada), 1  $\mu$ l of template DNA (25 ng/ml), 1  $\mu$ l of primer (5 pmol/ $\mu$ l) and 0.25  $\mu$ l of Taq polymerase (Boehringer Mannheim). The reaction mixture was covered with one drop of Nujol oil (Perkin Elmer Canada Ltd., Montréal, Qc. Canada). PCR amplification was performed using the following random primers: OPA-02, OPA-18, OPL-07, OPL-16 and OPM-05 (Operon Technology Inc., CA, USA) with the Amplitron II Thermal Cycler (Barnstead/Thermolyne, Montréal, Qc, Canada). The following cycle was used : template DNA and oligonucleotide primers were initially heated at 95°C for 5 min and then cooled at 56°C. The PCR reaction mixture (PCR buffer, dNTPs and Taq polymerase) was added at this temperature for a hot start. PCR amplification was run for 45 cycles under the following conditions: denaturation at 94 °C for 1 min, 30°C for 1.5 min ramp, primer annealing at 30 °C for 1 min, 72°C for 1.5 min ramp, and DNA extension at 72°C for 2 min. After cycling, the samples were rapidly cooled to 4°C until required for electrophoresis.

Three ml of loading buffer were added to the RAPD product and 10  $\mu$ l of each PCR reaction mixture was run on a 2% agarose gel in 1x TAE (Sambrook *et al.*, 1989) at 300 V/h, visualized by ethidium bromide staining and photographed under UV transillumination, with the gel print 2000i system (Bio/Can scientific Inc., ON, Canada). The digitized gel images were analysed with the software Molecular Analyst Software Plus

Fingerprinting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After background subtraction, the normalized patterns obtained with each of the four primers were combined to obtain a single pattern for each strain. These patterns were used to construct a dendrogram using the UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) clustering algorithm.

#### 3.4.4 Dot blot hybridization with 23S rDNA probes

The probes described by Hertel *et al.* (1993) were synthesized and labeled with digoxigenin by GSD (General Synthesis and Diagnostics, Centre for Biomaterials, Toronto, Canada) as described previously by Hertel *et al.* (1991). One mg of crude nucleic acid in 100 ml of water was denatured at 100°C for 10 min. The denatured nucleic acid was deposited onto positively charged nylon membranes (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada) in a Bio-dot apparatus (Bio-Rad Laboratories Ltd, Ont, Canada). The nucleic acids were immobilized on the membrane by heating at 120°C for 30 min in a vacuum oven. The membranes were incubated in 1% SSC, 0.5% SDS for 1 h at room temperature and then pre-hybridization was carried out in a solution containing 6X SSC, 0.1% SDS, 0.5% sodium N-lauryl sarcosine, and 5X Denhardt's solution (Denhardt 50X: 1% Ficoll, 1% polyvinylpurrolidone, 1% bovine serine albumin) for 2 h at 42°C for *Lb. casei* and at 40°C for *Lb. paracasei*. Hybridization was performed in pre-hybridization solution containing 10  $\mu$ l of labeled probe (10 pmol  $\mu$ l<sup>-1</sup>) for 4 h at 42°C for *Lb. casei* and 40°C for *Lb. paracasei*. The membranes were washed twice in 2X SSC containing 1.0% SDS for 5 min each at room temperature and subsequently once at 53°C for *Lb. casei* and 49°C for *Lb. paracasei*. Signal detection was carried out by chemiluminescence using anti-Dig antibodies conjugated with alkaline phosphatase, CSPD substrate (Boehringer Mannheim Canada), and

revealed by autoradiography using X ray film (Eastman Kodak Company, Rochester, New York).

#### **3.4.5 Dot-blot hybridization with genomic DNA as probe**

Probe DNA was labeled with biotin by nick-translation using the BIONICK system (Gibco/BRL, Canadian Life Technologies Inc, Ontario, Canada), with double the suggested quantity of DNA. Preparation of filters, and dot hybridization were carried out as described by Jahnke (1994) with the following modifications: the DNA concentration was 1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , and hybridization was carried out in a Red Roller II hybridization oven (Hoefer Scientific instruments, San Francisco). Colorimetric detection was carried out using the BluGENE system (Gibco, BRL, Canadian Life Technologies Inc). Signals were measured with the Pharmacia LKB-ImageMaster DTS (Pharmacia Biotech Canada, Qc, Canada).

#### **3.4.6 Pulsed-field gel electrophoresis**

Preparation of genomic DNA was performed as described by Roy *et al.* (1996) with some modifications. For a better lysis, Triton X-100 was added and the quantity of lysozyme used was 2 mg/ml. Genomic DNA was digested with *Sma*I at 25°C and *Apa*I at 30°C for 18 h (Boehringer Mannheim Canada). Samples were separated by using transverse alternating field electrophoresis (TAFE; Geneline II, Beckmann Instruments) in 0.25 x TBE buffer at 15°C. The running conditions were: (stage 1) 2-s pulse for 6 h at 350 mA; (stage 2) 5-s pulse for 6 h at 370 mA; (stage 3) 10-s pulse for 4 h at 390 mA; (stage 4) 15s for 4 h at 410 mA; (stage 5) 30s for 4 h at 430 mA; (stage 6) 60s for 3 h at 450 mA. Gels were stained for 45 min. with 0.5 mg/l ethidium bromide, washed for 1 h with demineralized water, photographed under UV transillumination

with the gel print 2000i system. The digitized gel images were analysed with the Molecular Analyst Fingerprinting Plus Software (Bio-Rad Laboratories).

#### **3.4.7 Plasmid profile determination**

Plasmid DNA of EPS-producing strains was isolated according to the procedure of Klaenhammer (1984). Ten ml of each sample was run on 0.8% agarose gel in 1.0X TAE buffer for 3-4 h at 100V. Gels were stained for 45 min. with 0.5 mg/l ethidium bromide, washed for 1 h with demineralized water, photographed under UV transillumination with the gel print 2000i system.

#### **3.4.8 Transmission electron microscopy**

The capsular and exocellular materials were stained and preserved by the ferritin procedure according to Fassel *et al.* (1992), using 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) instead of phosphate. Cells were harvested, pelleted, resuspended in subsequent changes of buffer, encased in 4% agar prior to postfixation, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Spurr resin. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips EM420 at 80 kv.

#### **3.4.9 EPS production, isolation and characterization**

After boiling culture supernatant for 15 min, the EPS were isolated by ethanol precipitation as described by Cerning *et al.* (1988, 1994). The fermented milks were made from sterilized (110°C for 10 min) reconstituted skim milk (10%). For each strain studied, one liter of milk was inoculated with 3% overnight culture, equally distributed in 100-ml

screw capped bottles and incubated at 37°C for 24 h. Total sugar concentration was determined by the phenol-sulfuric method (Dubois, 1956). The results are expressed in milligrams of glucose per liter. To obtain reliable viscosity measurements, a separate sample was withdrawn after 0, 12, 15, 18, 21 and 24 h of incubation and stirred before measurement. Rotational viscosity measurements were made with a coaxial cylinder (Rotovisco RV20; Haake M5-OSC; Haake, Karlsruhe, Germany) at a steady shear rate of 173 sec<sup>-1</sup>, using an MK 50 rotor with an NVST sensor system operating at room temperature. Viscosity was expressed in millipascals per second.

### 3.5 Results

Seven isolates were selected for EPS production on the basis of the mucoid appearance of the colonies. They were presumptively classed in the *Lactobacillus casei* group using biochemical tests (results not shown). These seven isolates were identified as *Lactobacillus* spp. using PCR amplification based on DNA primers specific for 16S rDNA. The primers yielded PCR products of 541 bp (Table 3.1) with DNA from lactobacilli reference strains and from all the isolates studied.

Dot blot hybridization, using specific 23S rDNA probes previously designed by Hertel *et al.* (1993), was used for specific identification to the species level of *Lactobacillus*. The oligonucleotide probe specific for *Lb. casei (zeae)/rhamnosus* hybridized with nucleic acid extracted from isolates 1 to 4 while the *L. paracasei (casei)*-specific probe reacted with DNA from isolates 5, 6 and 7 (Table 3.1). Finally, no EPS-producing strains possessed any plasmids.

**Table 3.1 :** Molecular identification of selected EPS-producing strains of lactobacilli

Designation	Isolated from	Identified as <sup>b</sup>	Presence of plasmid	Name <sup>c</sup>
Isolate 1	original culture of <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595 <sup>a</sup>	<i>Lb. casei (zeae)/Lb. rhamnosus</i>	-	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M
Isolate 2	Cheddar cheese, Canada	<i>Lb. casei (zeae)/Lb. rhamnosus</i>	-	<i>Lb. rhamnosus</i> isolate 2
Isolate 3	Fermented milk, France	<i>Lb. casei (zeae)/Lb. rhamnosus</i>	-	<i>Lb. rhamnosus</i> isolate 3
Isolate 4	Commercial culture Rosell Institute <sup>a</sup> , Canada	<i>Lb. casei (zeae)/Lb. rhamnosus</i>	-	<i>Lb. rhamnosus</i> R
Isolate 5	Commercial culture Rosell Institute, Canada	<i>Lb. paracasei (casei)</i>	-	<i>Lb. casei</i> Type V
Isolate 6	Fermented milk, (Vitalité) Danone, Canada	<i>Lb. paracasei (casei)</i>	-	<i>Lb. casei</i> Vitalité
Isolate 7	Fermented milk beverage (Actimel) Danone, Germany	<i>Lb. paracasei (casei)</i>	-	<i>Lb. casei</i> Actimel

<sup>a</sup> ATCC = American Type Culture collection, Rockville, MD, USA; Rosell Institute, Montréal, Qc, Canada.

<sup>b</sup> Identified by dot-blot hybridization, using specific 23S rDNA probes previously designed by Hertel *et al.* (1993). The probe were : *Lbcr* (5'-GCAGGCAATACACTGATG-3') specificity for *Lb. casei (zeae)*, *Lb. rhamnosus* and; *Lbpa* : (5'-CATGACAAGCAATACAC-3')

<sup>c</sup> Name as specified after identification using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis

Dot blot hybridization with biotin-labeled DNA probes prepared from whole chromosomal DNA of type strains *Lb. zaeae* ATCC 393 and *Lb. casei* ATCC 334, *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 and *Lb. paracasei* ATCC 25598 was used to differentiate strains identified in this study as belonging to the *Lb. casei/rhamnosus* group. Homology values were estimated using densitometry. The DNA probe prepared from *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 strongly hybridized with DNA from isolate 4 (Table 3.2), with over 70% homology. The labeled DNA of *Lb. casei* ATCC 334 and *Lb. paracasei* ATCC 25598 strongly hybridized with target DNA of isolates 5, 6 and 7, which is in agreement with identification using specific 23S rDNA probes (Table 3.2). Isolates 1, 2 and 3, however, exhibited high homology values with DNA probes from the four species.

Genomic DNA fingerprint using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) profiles reveals the similarity between the strains of exopolysaccharides-producing isolates and references strains of the *Lb. casei* group (Fig. 3.1). Three clusters are well-defined and correspond to three separate species of the casei group (*Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. zaeae*, respectively) at a similarity level of 25%. Three isolates (from 1 to 3) were grouped into the *Lb. rhamnosus* cluster, whereas isolate 4 previously identified as *Lb. rhamnosus* was not included in the corresponding cluster (Figure 3.1). Isolates 5, 6 and 7 were identified as *Lb. casei* according to their RAPD profiles.

Genomic DNA from 26 strains of the *Lb. casei* group was digested by the restriction enzyme *Sma*I and *Apa*I and examined by PFGE (Figure 3.2). Out of the seven EPS-producing strains, isolates 1 to 3 showed an average percentage of similarity higher than 78% with four reference strains of *Lb. rhamnosus*. The pattern of type strain ATCC 7469 of *Lb. rhamnosus* was identical to that of strains ATCC 10863, 11981 and 9595.

EPS-producing isolates 1, 2 and 3, which respectively originated from ATCC 9595, Cheddar cheese and fermented milk, had similarity values higher than 95% using both restriction enzymes. Isolate 4 exhibited similarity values higher than 67% with strain ATCC 15008 and three commercial strains used in European yoghurt-type products. Isolate 5 had a unique restriction pattern, while isolates 6 and 7 were identical.

*Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, *Lb. rhamnosus* Rosell and *Lb. casei* Type V (isolates 1, 4 and 5, respectively) were used for further analysis. Cytochemical labeling with ferritin shows that the capsular material had variable thickness from one strain (Figure 3.3A and B) to another (Figure 3.3C) and generally covers the entire cells, especially for *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M (Figure 3.3A and B). In some cases, however, it is loosely attached and may be found in the surrounding environment (Figure 3.3D).

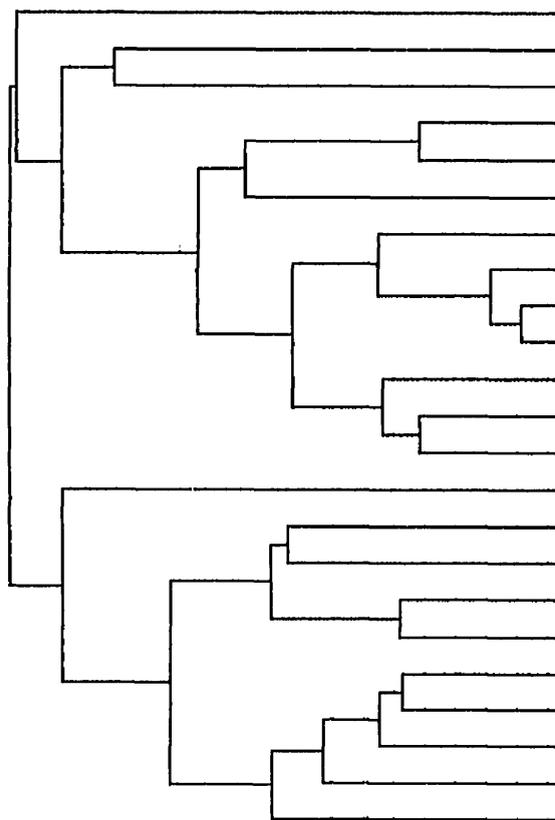
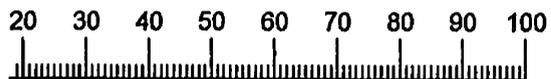
*Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, *Lb. rhamnosus* Rosell and *Lb. casei* Type V were also used for fermentation of milk. Growth of *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M and *Lb. rhamnosus* Rosell was faster than that of *Lb. casei* Type V (Figure 3.4A) whereas the decrease of milk pH was slower with this latter strain than with the others (Figure 3.4B). EPS production for the two strains of *Lb. rhamnosus* was higher than that of *Lb. casei* Type V (Figure 3.4C). EPS production by *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M increased slowly but steadily throughout the 24 h of milk incubation whereas the amount of EPS produced for *Lb. rhamnosus* Rosell reached a maximum after 12 h of fermentation. EPS produced by *Lb. casei* Type V attained only 57 mg/l after 15 h and decreased slightly thereafter.

Table 3.2 Percentage of similarity estimated by dot-blot hybridization with DNA from type strains of *Lactobacillus zeae*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. paracasei*.

<u>% similarity estimated by dot-blot hybridization with DNA from</u>				
<b>STRAINS</b>	<i>Lb. zeae</i> ATCC 393	<i>Lb. casei</i> ATCC 334	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 25598
<i>Lb. zeae</i>				
ATCC 393	100	44	36	37
ATCC 15820	39	0	0	31
<i>Lb. casei</i>				
ATCC 334	54	100	56	88
DSM 20244	0	75	0	74
ATCC 39392	0	80	0	75
ATCC 15008	0	0	93	30
ATCC 4913	43	86	0	92
<i>Lb. rhamnosus</i>				
ATCC 7469	31	56	100	53
ATCC 53103	40	52	100	74
ATCC 9595	37	37	100	40
ATCC 10863	0	38	92	33
ATCC 11981	0	0	79	34
ATCC 14957	47	53	100	67
Isolat 1 (ATCC 9595M)	99	98	100	100
Isolat 2 (Cheddar cheese)	96	91	100	94
Isolat 3 (Yoplait Inc.)	98	100	100	100
Isolat 4 (Rosell Institute)	48	0	92	41
<i>Lb. paracasei</i>				
ATCC 25598	37	76	41	100
DSM 20207	49	100	55	81
ATCC 11582	0	87	38	89
Isolat 5 (Rosell Institute)	57	100	40	100
Isolat 6 (fermented milk)	59	100	48	95
Isolat 7 (fermented milk)	30	90	22	75

**Figure 3.1** : Dendrogram obtained by genomic DNA fingerprinting using the random amplification of polymorphic DNA (RAPD) method. Patterns were combined using the Molecular Analyst Fingerprinting Plus Software and grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic averages (UPGMA).

**SIMILARITY (%)**



**OPA-02**

**OPM-05**

**OPL-16**

**OPA-18**

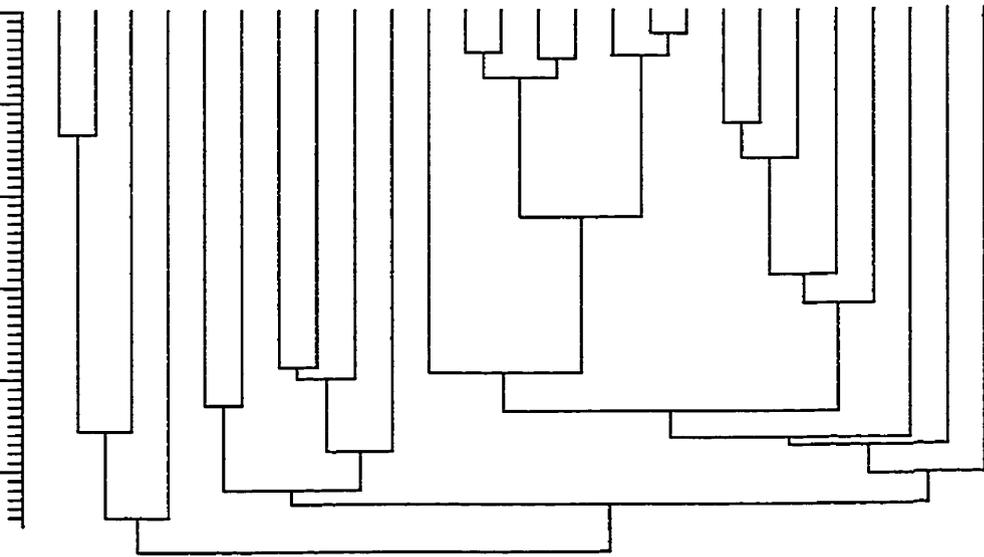


- Lb. paracasei ATCC 25588
- Lb. zeae ATCC 393
- Lb. zeae ATCC 15820
- Lb. rhamnosus ATCC 53103
- Lb. rhamnosus ATCC 14957
- Lb. rhamnosus ATCC 15008
- Lb. rhamnosus ATCC 7489
- Lb. rhamnosus ATCC 11991
- Lb. rhamnosus ATCC 10883
- Lb. rhamnosus ATCC 9595
- Lb. rhamnosus isolate1 ATCC 9595M
- Lb. rhamnosus isolate2 Cheese Canada
- Lb. rhamnosus isolate3 Fermented milk France
- Lb. rhamnosus isolate4 R Rosell Inst Canada
- Lb. casei ATCC 334
- Lb. casei ATCC 4913
- Lb. casei ATCC 39392
- Lb. casei DSM 20244
- Lb. casei isolate7 Fermented milk Germany
- Lb. paracasei DSM 20207
- Lb. casei isolate6 Fermented milk Canada
- Lb. casei isolate5 Type V Rosell Inst Canada
- Lb. paracasei ATCC 11582

**Figure 3.2** : Dendrogram constructed with restriction patterns obtained by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Patterns were combined using the Molecular Analyst Fingerprinting Plus Software and grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic averages (UPGMA).

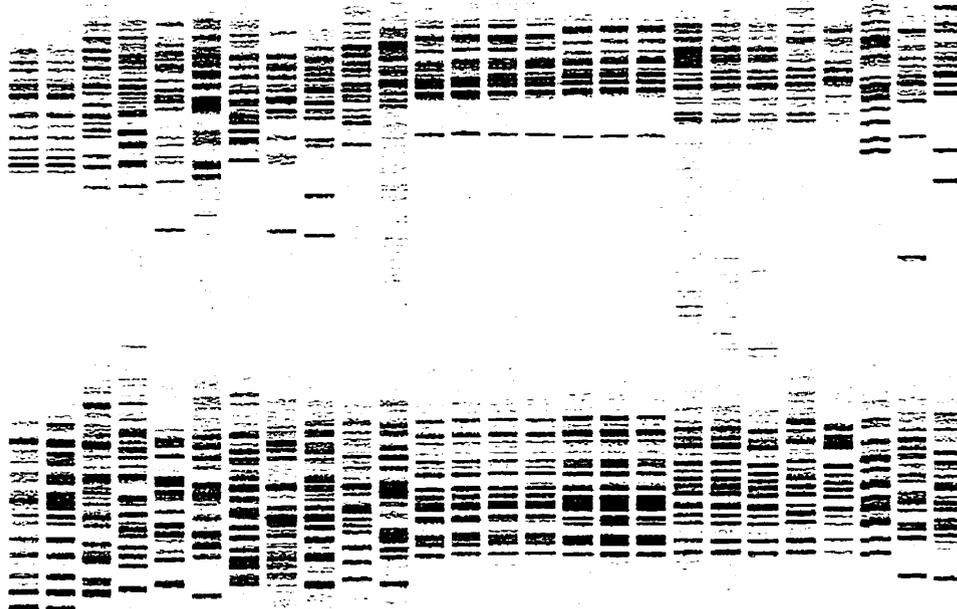
SIMILARITY (%)

100  
90  
80  
70  
60  
50



*Apa I*

*Sma I*



- Lb. casei isolate6 Fermented milk Canada
- Lb. casei isolate7 Fermented milk German
- Lb. casei ATCC 334
- Lb. casei DSM 20244
- Lb. casei isolate5 TypeV Rosell Inst. Canada
- Lb. casei ATCC 4913
- Lb. casei ATCC 39392
- Lb. paracasei ATCC 25598
- Lb. paracasei ATCC 11592
- Lb. rhamnosus ATCC 14957
- Lb. paracasei DSM 20207
- Lb. rhamnosus ATCC 7469
- Lb. rhamnosus ATCC 10863
- Lb. rhamnosus ATCC 11861
- Lb. rhamnosus ATCC 9595
- Lb. rhamnosus isolate1 ATCC 8565M
- Lb. rhamnosus isolate2 Cheese Canada
- Lb. rhamnosus isolate3 Fermented milk France
- Lb. rhamnosus LbRV2 Fermented milk France
- Lb. rhamnosus LbRV3 Yogurt mild France
- Lb. rhamnosus LbCV1 Fermented milk Portug
- Lb. rhamnosus ATCC 15008
- Lb. rhamnosus isolate4 R Rosell Inst. Canada
- Lb. rhamnosus ATCC 63103
- Lb. zeae ATCC 393
- Lb. zeae ATCC 15920

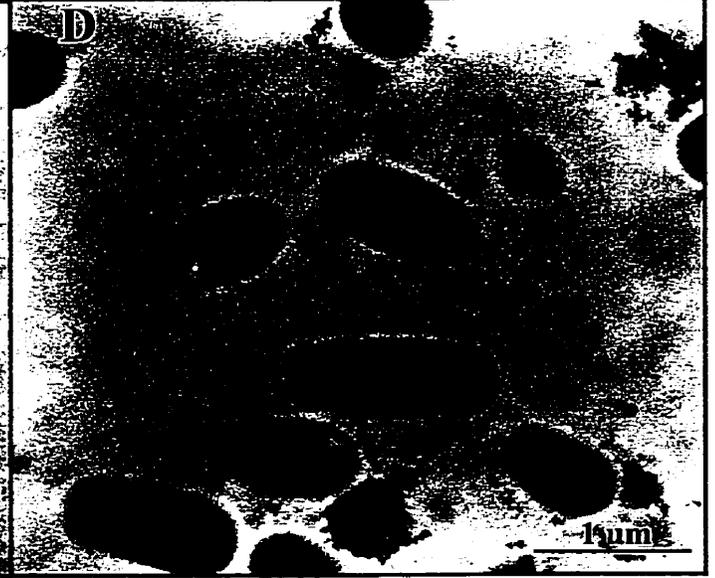
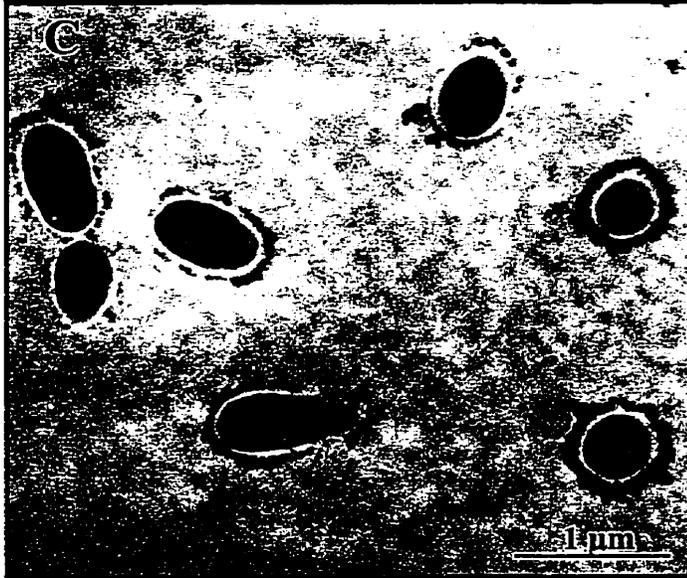
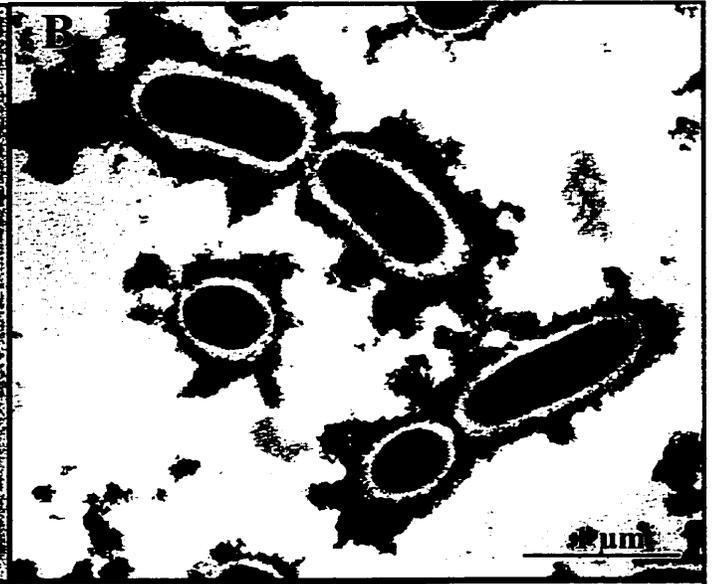
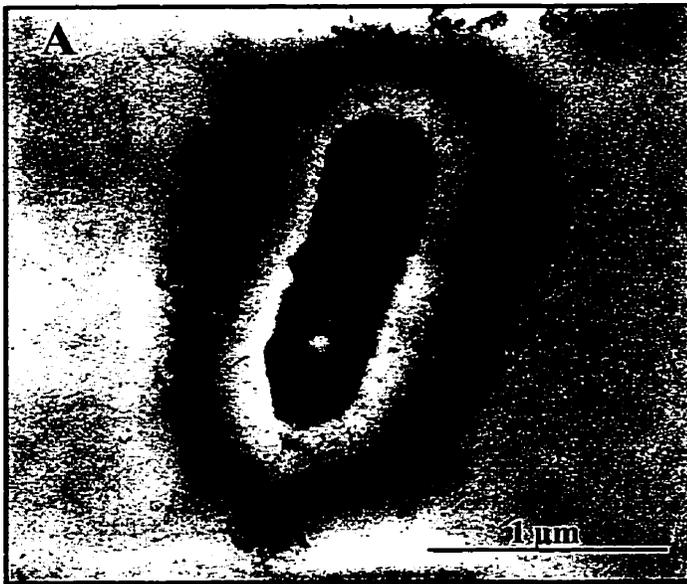
Viscosities of milks fermented by the EPS-producing lactobacilli and milk acidified with GDL (glucono-delta-lactone) progressively increased when the pH decreased (Figure 3.5). Acidification of milk obtained by the use of GDL was faster than that obtained with bacterial fermentation (results not shown). At pH 5.0, the highest viscosities were obtained with *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M and *Lb. rhamnosus* Rosell whereas *Lb. casei* type V gave intermediate viscosity. GDL-acidified milk exhibited the lowest viscosity, suggesting that higher viscosities of fermented milks might be related to the EPS produced by the strains of *Lb. rhamnosus* and *Lb. casei*. These results indicate that the *Lb. rhamnosus* strains can produce more EPS than the strain of *Lb. casei*.

### 3.6 Discussion

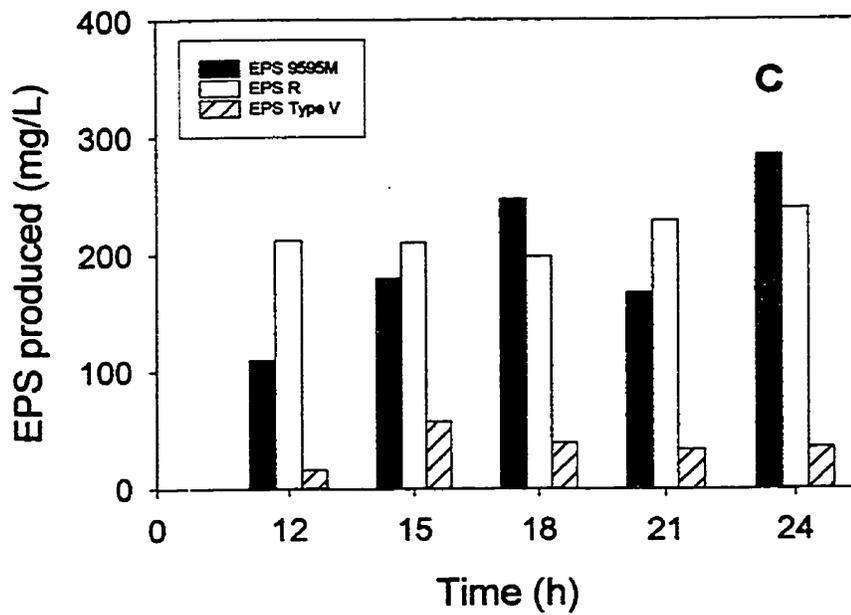
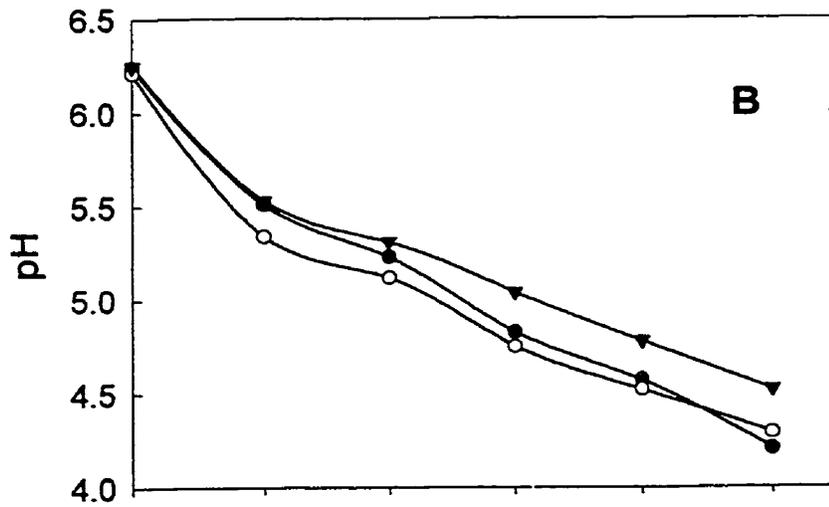
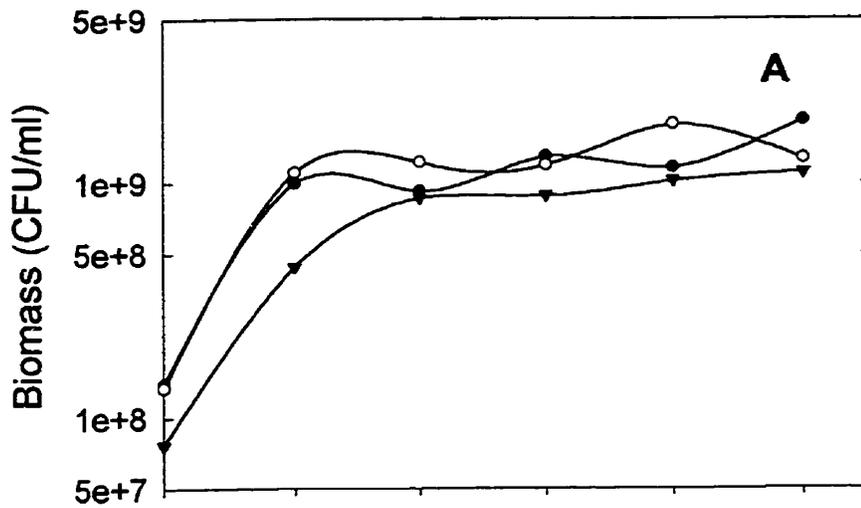
Using PCR amplification of 16S rDNA, the seven selected isolates were identified as belonging to *Lactobacillus* spp. These results are in agreement with Tilsala-Timisjärvi et Alatosava (1991), who noted that primer P6 could be suitable for specifically amplifying the 16S rDNA sequence of the *Lb. casei* group. With specific DNA probes, identification to the level of species was made possible.

Kojic *et al.* (1992) observed from plasmid curing experiments that EPS production by *Lb. casei* CG11 seems to be linked to a plasmid approximately 30 kb in size. However, EPS production in thermophilic lactic acid bacteria has not been associated with the presence of plasmids (Cerning, 1990). No plasmids were found in any of the seven isolates. Therefore, the genes required for EPS synthesis for the mesophilic strains.

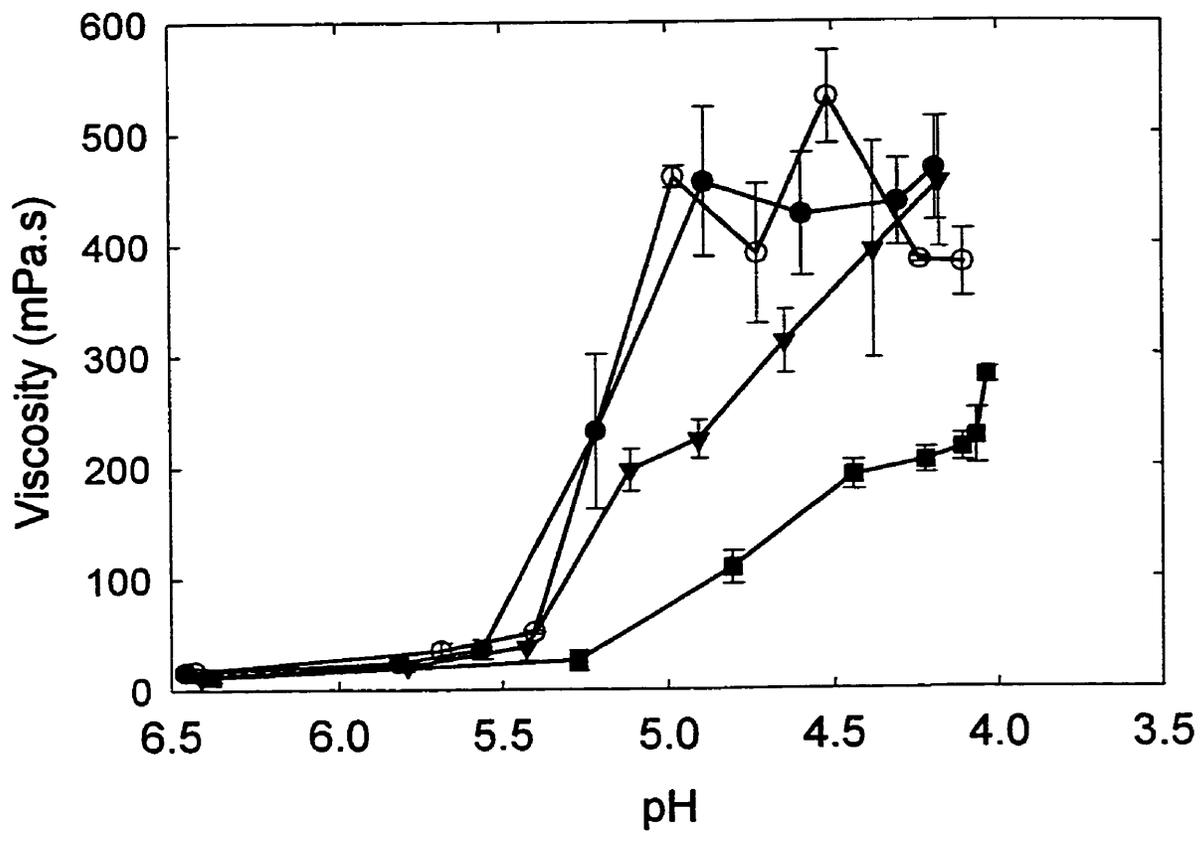
**Figure 3.3** : Transmission electron micrographs of thin sections of isolates of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M (A and B), *Lactobacillus rhamnosus* Rosell (C) and *Lactobacillus casei* Type V (D) stained with ferritin.



**Figure 3.4** : Growth (A), pH (B) and exopolysaccharides (EPS) produced (C) during fermentation of milk by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M (●), *Lactobacillus rhamnosus* Rosell (○) and *Lactobacillus casei* Type V (▽). The values are the means of two experiments



**Figure 3.5** : Viscosity produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595M (●), *Lactobacillus rhamnosus* Rosell(○), *Lactobacillus casei* Type V (▽) and glucono-delta-lactone (■) at different pH values in milk. The values are the means of two experiments. Bars = Standard Error.



of the *Lb. casei* group studied seem to be chromosomally located.

Isolate 4 is most closely related to *Lb rhamnosus* ATCC 7469. These two strains exhibited DNA-DNA homology values higher than 70%, which corresponds to the species boundary for bacteria (Jahnke *et al.*, 1994). Isolates 5, 6 and 7 can be placed in the *Lb. paracasei/casei* group on the basis of high homology to whole chromosomal DNA probes. However, isolates 1, 2 and 3 cannot be placed in any one group on this basis. These isolates were identified as belonging to *Lb. rhamnosus* with the RAPD method using four single-primer reactions.

Restriction patterns obtained by PFGE fell roughly into four similarity groups. The restriction pattern of strain ATCC 9595M is identical to that of the original culture of ATCC 9595, which is non-mucoid. Strain ATCC 9595M was isolated from the original culture of ATCC 9595 on the basis of mucoid and non-mucoid colonies. Although strain ATCC 15008 gave non-mucoid colonies, it shared high similarity by PFGE to strains giving mucoid colonies (isolate 4 and three commercial strains). Lortal *et al.* (1997) indicated that strains sharing identical restriction profiles could differ in their technological properties. However, Björkroth and Korkeala (1996) observed that ribotyping distinguished ropy slime-producing strains from the non-ropy reference strains of *Lb. sake*, although ribotyping was unable to differentiate ropy and non-ropy strains sharing the same carbohydrate fermentation pattern. They finally concluded that more sensitive methods such as pulsed-field gel electrophoresis should be used to detect differences between strains of *Lb. sake*.

It should also be noted that strain ATCC 15008, which is recognized as a strain of *Lb. casei*, was identified in this study as *Lb. rhamnosus*. Indeed, dot-blot hybridization revealed that the DNA probe from strain ATCC 7469

strongly hybridized with DNA extracted from strain ATCC 15008. However, the EPS-producing isolates 1, 2, 3 and 4 did not share the restriction pattern of probiotic strain GG (*Lb. rhamnosus* ATCC 53103). Finally, EPS-producing isolates 6 and 7 identified as *Lb. casei*, isolated from Canadian fermented milk and European fermented milk beverages were identical, whereas isolate 5 did not share any restriction pattern with the other strains studied. On the basis of their genomic profiles, therefore, PFGE restriction analysis allowed a reduced number of strains to be selected for technological screening for EPS production.

Exopolysaccharide material visualized by electron microscopy after ferritin labeling varied with respect to the degree of its association to the cells of different isolates. Localizing specific sugar residues by using lectins would provide more information concerning the nature and location of these carbohydrates.

The quantities of EPS and the viscosity of milk containing different species of lactic acid bacteria in pure culture may vary considerably (Bouzar *et al.*, 1997). *Lb. rhamnosus* strains produced more than 240 mg/l of EPS whereas the strains of *Lb. casei* gave only a small amount of EPS (< 60 mg/l) in milk. These results indicate that strains belonging to the same group (*casei*) of *Lactobacillus* did not show similar EPS production. These results are in agreement with Ludbrook *et al.* (1997) who found that isolates of *Lb. plantarum* produced EPS yields from 114 to 445 mg/l. Cerning *et al.* (1986) also observed that the amount of EPS range from 60 to 420 mg/l for various strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown on skim milk

Finally, a good correlation was found between the amount of EPS produced by the strains of *Lb. casei* group and the viscosity of fermented milk, although viscosity depends not only on the quantity of EPS present,

but also on the structure and apparent molecular mass of the polymer and the physical state of the proteins. In addition, pH has a considerable influence on the structure of the coagulum formed by milk proteins. However, when the viscosity readings of fermented milks are compared with that of GDL-acidified milk at the corresponding pH values, it seems that the observed viscosities were affected primarily by EPS produced by the strains of lactobacilli, in agreement with Bouzar *et al.* (1996, 1997).

Genetic methods used in this study were appropriate for characterization and differentiation of EPS-producing strains of lactobacilli. Comparison of sequences of genes responsible for EPS production should be carried out in future work to determine the differences between mucoid and non-mucoid strains of *Lb. rhamnosus* sharing identical restriction patterns. In addition, experiments will be performed in chemically-defined medium under pH-controlled conditions to determine the influence of carbon source and temperature on EPS production by the three strains of the *Lb. casei* group selected in this study.

### **3.7 Acknowledgments**

The authors wish to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Research Partnerships Program - Research Network on Lactic Acid Bacteria), Agriculture and Agri-Food Canada, Novalait Inc., Dairy Farmers of Canada and Institut Rosell Inc. for financial support. We are also grateful to Maryse Berthiaume and Daniel Vincent for their technical assistance.

### 3.8 References

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A and Struhl, K. (1991)** *Current Protocols in Molecular Biology*, Volume 1, p. 241, John Wiley and Sons, New York, NY, USA.

**Björkroth, J. and Korkeala, H. (1996)** rRNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* strains producing ropy slime. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 293-302.

**Bouzar, F., Cerning, J. and Desmazeaud, M. (1996)** Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science* **79**, 205-211.

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

**Cerning, J. (1990)** Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **87**, 113-130.

**Cerning, J., Bouillane, C., Desmazeaud, M.J. and Landon, M. (1986)** Isolation and characterization of exocellular polysaccharides production by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters* **8**, 625-628.

**Cerning, J., Bouillane, C., Desmazeaud, M.J. and Landon, M. (1988)** Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters* **10**, 255-260.

**Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C, Landon, M, Desmazeaud, M. and Topisirovic, L.** (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3914-3919.

**Fassel, T.A., van Over, J.E., Hausser, C.C., Buchholz, L.E., Edmiston, C.E., Sanger, J.R. and Remsen, C.C.** (1992) Evaluation of bacterial glycocalyx preservation and staining by ruthenium red, ruthenium red-lysine and alcian blue for several methanotroph and staphylococcal species. *Cells and Material* **21**, 37-48.

**Gamar, L., Blondeau, K. and Simonet, J.-M.** (1997) Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 281-287.

**Hertel, C., Ludwig, W., Obst, M. Vogel, R.F., Hammes, W.P. and Schleiler, K.H.** (1991) 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the rapid identification of meat lactobacilli. *Systematic and Applied Microbiology* **14**, 173-177.

**Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K. and Schleiler, K.H.** (1993) Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, 463-467.

**Jahnke, K.D.** (1994) A modified method of quantitative colorimetric DNA-DNA hybridization on membrane filters for bacterial identification. *Journal of Microbiological Methods* **20**, 273-288.

**Klaenhammer, T.R.** (1984) A general method for plasmid isolation in *Lactobacilli*. *Current Microbiology* **10**, 23-28.

**Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. and Vliegenhart, J.F.G.** (1992) Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 4086-4088.

**Lortal, S., Rouault, A., Guezenc, S. And Gautier, M.** (1997) *Lactobacillus helveticus*: Strain typing and genome size estimation by pulsed field gel electrophoresis. *Current Microbiology* **34**, 180-185.

**Mozzi, F., de Giori, G.S., Oliver, G. and de Valdez, G.F.** (1996) Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnology Letters* **18**, 435-439.

**Roy, D., Ward, P. and Champagne, G.** (1996) Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 11-29.

**Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen.** (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:347-358.

**Sambrook, J., Fristch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Tilsala-Timisjarvi, A and Alatossava, T.** (1993) Enzymatic amplification of 16S rRNA gene sequences from dairy *Lactobacillus* species. *Milchwissenschaft* **48**, 123-125.

## CHAPITRE IV

# COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'EXOPOLYSACCHARIDES PAR TROIS SOUCHES DE LACTOBACILLES

### 4.1 Introduction

Les propriétés épaississantes de certains ferments lactiques contenant des souches productrices de polysaccharides exocellulaires présente un intérêt technologique important pour l'industrie laitière. Les polymères excrétés par les cellules lors des fermentations permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini tout en diminuant la synérèse. Les paramètres de biosynthèse d'EPS sont bien connus chez plusieurs souches de bactéries lactiques largement utilisées en industrie, mais peu de choses sont connues sur la production d'EPS par des souches de bactéries lactiques mésophiles. Le troisième objectif de ce travail est donc d'évaluer et de comparer la production d'EPS de trois souches de *Lactobacillus* spp. La production d'EPS a été évaluée au cours de fermentations dans le milieu synthétique BMM en faisant varier la température de croissance (optimale : 37°C et sub-optimale : 32°C) et la source de carbone (glucose et lactose) sous contrôle de pH constant à 6.0. Des échantillonnages à des temps définis ont permis de caractériser la production d'EPS des souches en fonction de la croissance bactérienne.

## **4.2 Matériel et méthodes**

### **4.2.1 Micro-organismes**

Les souches de lactobacilles utilisées lors de ce travail proviennent de préparations commerciales et de collections de cultures de référence. La souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, appelée M pour son caractère mucoïde, a été isolée au CRDA par l'équipe du Dr. Denis Roy à partir d'une culture de la souche de référence ATCC 9595 de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Quant aux souches *Lb. rhamnosus* Rosell et *Lb. casei* Type V, elles proviennent toutes deux de ferments commerciaux de l'Institut Rosell (Mtl, Qc, Can).

### **4.2.2 Conservation des souches**

Les bactéries sont ensemencées en tapis sur du MRS agar (Difco Laboratoire, Détroit, MI, USA) et incubées pendant 48 h à 37°C. À l'aide d'un écouvillon, un grand nombre de colonies est récolté et ensemencé dans un vial (Wheaton, USA) contenant du bouillon BHI (Difco) avec glycérol 15% (ACP Chemical, MTL, Qc). Les vials sont ensuite entreposés à -40°C.

Pour respecter les contraintes statistiques, une pré-culture différente est préparée à partir d'un vial de glycérol congelé pour chaque fermentation.

### 4.2.3 Conditions de culture

#### 4.2.3.1 Préparations des pré-cultures

Des essais préliminaires ont démontré que l'utilisation du milieu BMM pour préparer l'inoculum de départ ne permet pas l'obtention d'une population d'environ  $1 \times 10^9$  bactéries par ml. Le milieu MRS (Difco Laboratoire, Détroit, MI, USA) est plus favorable à la croissance des lactobacilles et permet l'obtention d'une meilleure population de départ. Pour chaque fermentation, une nouvelle culture est préparée à partir d'une souche congelée dans le BHI-glycérol tel que décrit au point 4.2.2.

Dans un premier temps, 1 ml d'une culture de BHI-glycérol décongelée est ajouté à 20 ml de MRS (Difco) stérile et incubé en aérobie à 37°C pendant 16 h. Les bactéries sont ensuiteensemencées à 2% (v/v) dans 100 ml de bouillon MRS (Difco) et incubées en aérobie à 37°C pendant 16 h. Cette culture estensemencée à 1% (v/v) dans le fermenteur.

#### 4.2.3.2 Milieu minimal BMM

Le milieu BMM est un milieu chimiquement défini, favorable aux lactobacilles (Morishita *et al.*, 1981). Il contient les vitamines, les oligo-éléments et les acides aminés et bases nécessaires à leur croissance et à la production d'EPS. La composition détaillée du milieu BMM est présentée en annexe. Ce milieu a été choisi pour limiter les interférences possibles dues au milieu de culture. On sait que certains composés tels les mannanes contenus dans l'extrait de levure du MRS (Difco) peuvent fausser les résultats de dosage des EPS (Cerning *et al.*, 1991 ; Garcia-Garibay et Marshall, 1991).

Les fermenteurs Chemap (Chemapec Inc, Woodbury, NY, 11797) utilisés ont une capacité de 7 l et le volume de travail utilisé est de 6 l. Tous les composants du milieu sont pesés à l'aide d'une balance analytique et dissous un à un dans de l'eau déionisée (Millipore). La solution de vitamines est préparée à l'avance et conservée à 4°C pour une période maximale de 1 mois. Les sels (BDH Inc. Toronto Canada) sont dissous dans 2 l d'eau déionisée (Millipore) dans une fiole Erlenmeyer d'une capacité de 6 l. Dans un second Erlenmeyer de 6 l contenant 2 l d'eau, les acides aminés (Sigma Chemical) sont dissous de la même façon. Les sels et les acides aminés sont préparés séparément pour en faciliter la dissolution ; la solution de sels est ensuite ajoutée à la solution d'acides aminés. À l'aide d'une pipette, 6 ml de la solution de vitamines et 6 ml de Tween 80 (BDH Inc. Toronto Canada) sont ajoutés. La solution est ensuite agitée jusqu'à dissolution complète du Tween 80. Selon le sucre utilisé, 120 g de lactose ou de dextrose (BDH) sont pesés et dissous dans une fiole Erlenmeyer contenant 2 l d'eau déionisée (Millipore). Les deux solutions (sels-acides aminés et sucres) sont transvidées dans le fermenteur Chemap et le pH est ajusté à 6.0 avec une solution de HCl 3 N (BDH).

#### **4.2.4 Fermenteurs et fermentations**

##### **4.2.4.1 Préparation et stérilisation des fermenteurs**

Entre chaque fermentation, les sondes à pH (Ingold, Suisse) sont conservées dans du KCl saturé. Avant de mettre le milieu dans la cuve du fermenteur, la sonde est calibrée avec des solutions standards à pH 4.0 et 7.0, rincée et placée dans la cuve. Le milieu BMM est alors transvidé dans la cuve et le pH ajusté. Le couvercle du fermenteur est ensuite fixé à la cuve. La stérilisation du fermenteur et du milieu de culture se fait

automatiquement. Les conditions de stérilisation sont : 120°C pendant 20 minutes. La température du fermenteur est ensuite ramenée automatiquement à la température de la fermentation (32°C ou 37°C). L'agitation est maintenue à 100 RPM tout au long de la fermentation.

#### **4.2.4.2 Contrôle de pH**

Le pH est continuellement ajusté à 6.0 avec de l'hydroxide d'ammonium 7 N (J.T. Baker Chemical Co, Phillipsburg, NJ, USA) à l'aide d'une pompe (Chemap AG, Woodbury, NY).

#### **4.2.4.3 Inoculation des fermenteurs**

L'inoculum de départ du fermenteur doit avoir une population minimum de  $1 \times 10^7$  bactéries par ml. Si on considère que la population dans la pré-culture est de  $1 \times 10^9$  bactéries par ml, l'ensemencement se fait à 1% du volume total de milieu dans le fermenteur, soit 60 ml de pré-culture. Cet instant correspond au temps 0 h de la fermentation.

#### **4.2.4.4 Échantillonnage**

Pour chaque temps choisi, sont prélevés deux échantillons de 50 ml pour le dosage des polysaccharides et un échantillon de  $\pm 10$  ml pour le suivi microbiologique et pour les analyses HPLC. Les échantillons pour le dosage des EPS qui ne doivent pas être stériles sont prélevés dans des bouteilles d'une capacité de 250 ml (Corning Inc, USA). L'échantillon de 10 ml devant être stérile, il est prélevé dans un tube à centrifugation stérile d'une capacité de 15 ml (Fisher Brand, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA).

#### **4.2.4.5 Suivi de la croissance**

Le suivi de la croissance microbienne lors des fermentations se fait par dénombrement bactérien et par lecture de l'absorbance pour chaque temps d'échantillonnage.

##### Dénombrements microbiens

Cette méthode consiste à ensemencer plusieurs dilutions d'une suspension cellulaire dans un milieu nutritif stérile, gélosé à 1,5% et coulé dans des boîtes de Pétri. Chaque cellule ou chaîne de cellules donne naissance, après incubation, à une colonie bien individualisée ; il s'agit donc d'une unité formant une colonie (UFC) ou Colony Forming Unit (CFU).

Un compte total en milieu MRS-agar (Difco Laboratoire) est fait pour chaque temps d'échantillonnage. À partir des échantillons prélevés stérilement, des dilutions successives sont faites dans de l'eau peptonée 0.1 % - NaCl 0.9 % (BDH Inc. Toronto Canada) stérile. Des billes de verre sont ajoutées dans les bouteilles à dilution pour briser les chaînes de cellules. Un ensemencement dans la masse, en duplicata, est fait pour les deux dilutions jugées appropriées. Les géloses sont incubées à 37°C pendant 48 heures en aérobie. Les colonies formées sont comptées et les moyennes sont calculées afin d'obtenir la population finale en CFU par ml.

##### Lecture de l'absorbance

L'absorption lumineuse d'une suspension bactérienne est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde comprise généralement entre

480 et 650 nm. L'absorbance ou la densité optique obtenue est proportionnelle à la concentration cellulaire, mais le facteur de proportionnalité est lié à la taille et à la forme des cellules ainsi qu'à l'absorbance intrinsèque du milieu. Il est donc important de faire un étalonnage pour chaque espèce bactérienne et chaque condition de culture. Cette méthode de dosage est précise mais ne s'applique qu'aux suspensions bactériennes dont la population est supérieure à  $10^6$  cellules/ml et dont le milieu absorbe peu la lumière.

Environ 10 ml de milieu de culture sont transférés dans une cuvette à spectrophotomètre d'une capacité de 15 ml. Le blanc est fait avec du milieu BMM stérile avant chaque lecture. La lecture de l'absorbance est faite avec un spectrophotomètre (Sequoia) à une longueur d'onde de 600 nm et les résultats sont exprimés en unités de densité optique (unités de D.O.).

#### **4.2.5 Extraction et purification des EPS**

Les exopolysaccharides sont extraits du milieu de culture et purifiés selon la méthode mise au point par l'équipe de Cerning (1994) présentée à la figure 4.2.

Tout de suite après la prise de l'échantillon, les deux bouteilles de 250 ml sont placées pendant 15 minutes dans un bain d'eau à ébullition. Cette étape permet d'inactiver les enzymes capables de dégrader les polymères. Les échantillons sont ensuite refroidis à 4°C, transvidés dans des bouteilles à centrifugation (Nalgene, Brand Products, USA) et centrifugés à 9 950 g pendant 30 minutes à 4°C (7 500 RPM centrifugeuse Beckman, rotor Beckman JA-10). Le culot de cellules est jeté et trois volumes d'éthanol 95% à 4°C sont ajoutés au surnageant

pour faire précipiter les polysaccharides. Les échantillons sont gardés à 4°C pendant au moins 3 heures avant d'être centrifugés de nouveau pendant 20 minutes à 4°C à une vitesse de 8 000 g (6 500 RPM, centrifugeuse Beckman, rotor Beckman JA-10). Le culot de polysaccharides est resuspendu dans de l'eau déionisée (Millipore) et placé dans une membrane à dialyse d'un seuil d'exclusion de 3 500 daltons (Spectra Por 7, Spectrum Medical Industries, USA). Les échantillons sont gardés sur la glace lors du transfert dans les membranes à dialyse pour éviter toute dégradation enzymatique. Les échantillons sont dialysés contre de l'eau distillée pendant 24 heures, à 4°C, avec de fréquents changements d'eau. Cette étape permet d'éliminer les sucres résiduels, les sels et les acides aminés du milieu de culture. Après la dialyse, le contenu des membranes est transféré dans des tubes Corning d'une capacité de 50 ml et les membranes sont bien rincées avec de l'eau déionisée (Millipore). Les tubes sont congelés à - 20°C et placés dans le lyophilisateur (Consol 12, Virtis Compagny, Gardner NY). Les échantillons sont lyophilisés pendant 2 jours.

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans de l'acide trichloracétique (TCA) 10% (Sigma Chemical Co, St-Louis MO, USA) et centrifugés à 5 000 RPM (Beckman rotor JS-75) pendant 15 minutes. Après trois lavages au TCA, le culot de polysaccharides purifiés est dialysé dans une membrane à dialyse d'un seuil d'exclusion de 3 500 daltons (Spectra Por 7, Spectrum Medical Industries, USA) contre de l'eau distillée pendant 7 jours à 4°C avec de fréquents changements d'eau. Finalement, les échantillons sont de nouveau lyophilisés.

#### 4.2.6 Dosage des EPS purifiés

Les exopolysaccharides purifiés et lyophilisés sont resuspendus dans 10 ml d'eau déionisée (Millipore) et dosés selon la méthode de dosage des sucres totaux de Dubois *et al.* (1956) modifiée par Gerhardt *et al.* en 1981.

Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'ajout d'acide sulfurique provoque l'hydrolyse des polysaccharides et la formation de 5-hydroxyméthyl-furfural qui donne, en présence de phénol, une coloration orangée. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité de sucre présent et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable. De petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées et la présence de protéines ou de peptides n'influence pas le dosage.

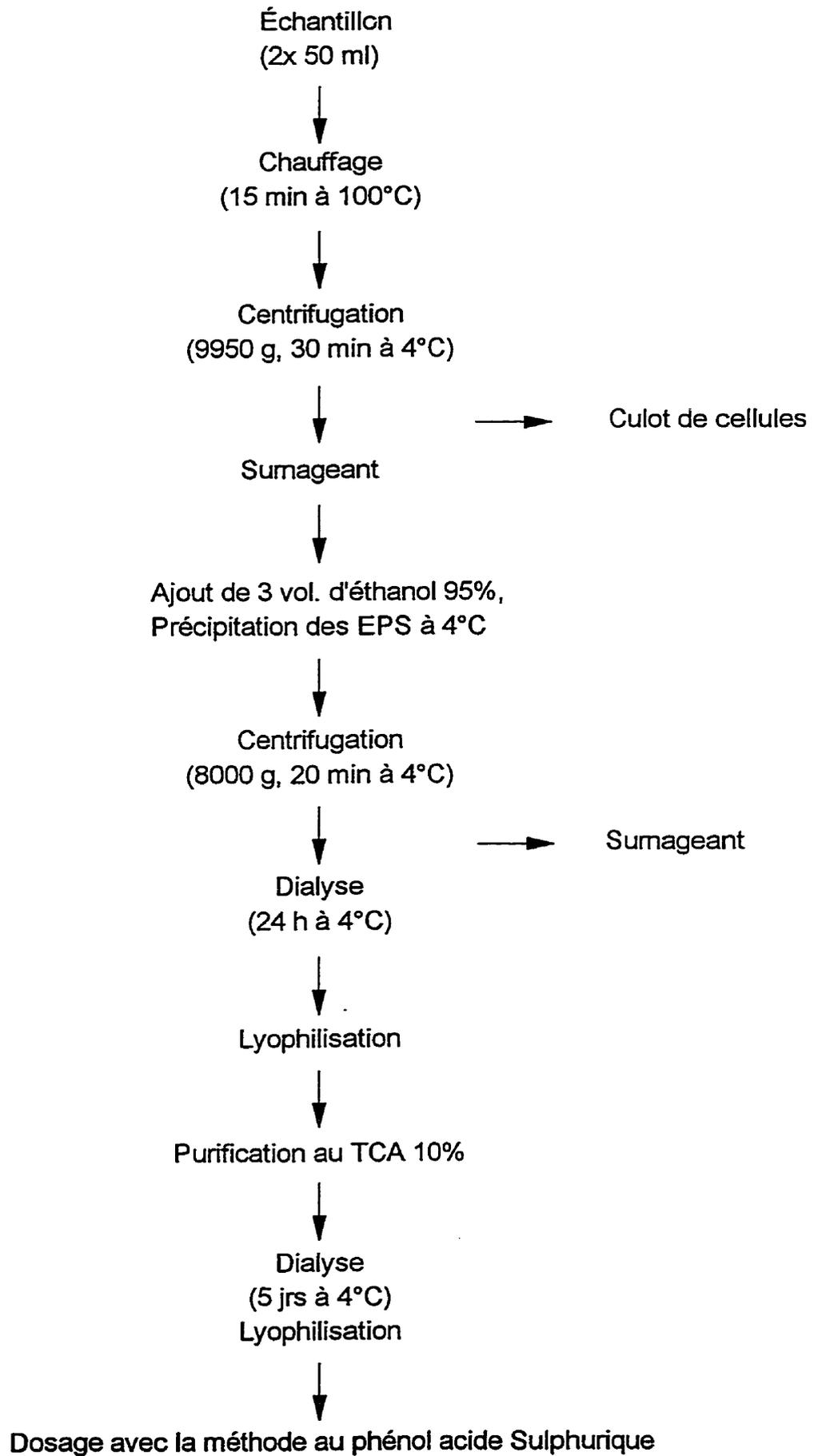
Une courbe standard de 0 à 100 mg/l est préparée à partir d'une solution stock. Chaque échantillon est préparé quatre fois et pré-dilué si nécessaire. Le blanc est fait avec la concentration 0 mg/l. À l'aide d'une micro-pipette calibrée (Pipetman, Gilson, Mandel Scientific), 1 ml de standard ou d'échantillon inconnu est placé dans un tube à essai en pyrex propre (Fisher Brand, Fisher Scientific, Germany). Avec la même micro-pipette, 1 ml de Phénol 5% (BDH) est ajouté. Finalement, 5 ml d'acide sulfurique (Fisher Scientific, Nepean, Ont.) sont ajoutés à l'aide d'un distributeur automatique de 10 ml (Brinkmann, Germany). Les tubes sont immédiatement agités au vortex et refroidis pendant environ 10 minutes à température ambiante. Les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie à 25°C pendant 15 minutes.

La lecture de l'absorbance est faite avec un spectrophotomètre (Ultraspec 2000, UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech Cambridge, England) à une longueur d'onde de 488 nm. Les quantités de polysaccharides sont exprimées en mg/l d'équivalent glucose, selon la courbe standard.

#### **4.2.7 Analyse des sucres résiduels et des acides organiques**

Les sucres résiduels et les acides organiques dans le milieu de culture ont été dosés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à l'aide d'un système Waters (Milford, MA, USA) muni du logiciel Millennium (Waters, MA, USA). Le système comprend un détecteur à indice de réfraction (Waters 410) maintenu à 35°C, un détecteur UV (Linear UVIS 200) à 210 nm et une colonne Ion-300 (Interaction Chromatography, San José, California). Une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N maintenue à un débit de 0.4 ml/min à température ambiante a été utilisée comme phase mobile. Les courbes étalons des sucres et de l'acide lactique ont été préparées avec des produits de grade analytique (Sigma). Les échantillons ont été dilués (1:4) avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N et filtrés avec une unité de filtration munie d'un filtre de 0,45 µm (Durapore Membrane Filters, Millipore, Ireland).

**Figure 4.1 :** Schéma de l'extraction et de la purification des polysaccharides exocellulaires produits dans un milieu synthétique (Cerning *et al.* 1994)



### 4.3 Analyses statistiques

#### 4.3.1 Plan expérimental

Le plan expérimental retenu pour évaluer et comparer la production d'EPS par les trois souches de lactobacilles est une recherche de développement et a été effectués tel que présenté à la figure 4.1. Il s'agit d'une expérience factorielle avec trois souches sélectionnées, deux sources de carbone (glucose et lactose), et deux températures (optimale de 37°C et sub-optimale de 32°C). Deux échantillons sont pris à neuf intervalles de temps pour évaluer la production d'EPS par rapport à la croissance bactérienne. Pour obtenir une plus grande précision, chaque souche sélectionnée est étudiée séparément, l'une après l'autre, dans un ordre défini au hasard. Il y a trois répétitions pour un total de 36 fermentations.

ATCC 9595M				Rosell				Type V			
37°C		32°C		37°C		32°C		37°C		32°C	
glu	lac	glu	lac	glu	lac	glu	lac	glu	lac	glu	lac
9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x	9T x
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**Figure 4.2** : Schématisation du plan expérimental utilisé pour comparer la production d'EPS des trois souches de lactobacilles

### 4.3.2 Régression non linéaire

Dans un premier temps, les données de fermentation ont été modélisées à l'aide d'un modèle de courbe de croissance. Cette modélisation a été effectuée selon le modèle de Gompertz (courbes en "S") :

$$Y=a*\exp [-(b - c* t)]$$

Par cette méthode, on obtenait ainsi l'estimation de trois paramètres pour la courbe de croissance temporelle : l'asymptote (plateau de croissance maximale), le  $\mu$  (coefficient directeur de la tangente au point d'inflexion de la courbe [appelé  $k$  pour les courbes de production d'EPS]) et lambda (intersection de cette tangente avec l'axe des abscisses). En plus de ces trois paramètres, les critères de normalité, de symétrie et d'aplatissement étaient vérifiés pour la courbe. Tout cela a été réalisé sur les trois variables mesurées dans ce projet, soit : les EPS produits, les décomptes microbiens exprimés en CFU/ml et les mesures de densité optique exprimées en unités de D.O.

Certaines contraintes relatives aux types de courbes générées ont nécessité l'établissement de critères de travail lors des modélisations. Dans un premier temps, comme les plateaux de croissance maximale n'étaient pas toujours stables, les observations correspondant à une diminution à la suite de l'atteinte du maximum n'ont pas été considérées dans les modélisations. Ensuite, dans certains cas, l'application du premier critère ne permettait pas d'obtenir une estimation adéquate de l'asymptote, car les croissances rapides sans allure de plateau peuvent amener des asymptotes jusqu'à dix fois le maximum mesuré. Dans ces

situations, des points suivant le maximum ont été utilisés afin de donner une allure de plateau aux courbes. Finalement, dans d'autres cas plus rares, il a fallu enlever un point intermédiaire afin d'obtenir la convergence de la modélisation non linéaire (généralement dans des situations avec un maximum suivi d'une descente assez rapide et d'une remontée à un niveau semblable à celui du maximum).

Ces contraintes montrent que les paramètres associés aux modèles de Gompertz (il en serait de même pour les autres modèles non linéaires associés à des courbes de croissance) sont très sensibles à des structures particulières de courbes de croissance. Comme le modèle de Gompertz a trois paramètres et que les courbes modélisées contiennent entre 3 et 9 observations (mais souvent 7 ou moins pour les souches 9595 et Rosell), la modélisation peut souvent très bien suivre les courbures dans les courbes de croissance et de production d'EPS.

Des analyses de variance ont été effectuées pour faire ressortir les différences de comportement par souche, suivant les variations de sucre et de température. Les traitements statistiques ont été effectués à l'aide des procédures GLM, REG et NLIN du progiciel SAS.

Bien que les résultats des régressions non linéaires soient adéquats statistiquement, ils ne le sont pas nécessairement, en pratique, pour caractériser la croissance des bactéries. En effet, les avantages de la régression non linéaire (très bonne modélisation des courbures de la courbe en S et de la période de latence) deviennent en quelque sorte un désavantage lorsqu'on est intéressé à comparer les paramètres estimés par ces régressions, puisqu'on a alors une grande variabilité des paramètres estimés ainsi que des relations entre les paramètres (en particulier  $\mu$  et  $\lambda$ ) qu'il devient difficile de prendre en compte

complètement.

Devant ces limitations reliées à la régression non linéaire, une deuxième série d'analyses a été effectuée afin de voir si l'utilisation de paramètres de modélisation plus simples montre plus d'avantages pratiques.

#### 4.3.2 Régression linéaire

La seconde série de paramètres associés à la croissance bactérienne est obtenue à l'aide d'estimateurs plus simples. Tout d'abord, la variation de la concentration cellulaire ( $dX$ ) par unité de temps ( $dt$ ) traduit la vitesse de croissance ( $dX/dt$ ) et est proportionnelle à la concentration cellulaire ( $X$ ) et au taux de croissance ( $\mu$ ) :

$$dX/dt = \mu X$$

et par intégration, on en arrive à l'approximation :

$$\ln X = \mu t$$

Il est alors possible d'estimer  $\mu$  en effectuant une régression linéaire simple entre  $\ln x$  et  $t$ . Le  $\mu$  représente le taux de croissance (en  $h^{-1}$ ) dans le cas des comptes microbiens (CFU) et des mesures de densité optique (unités de D.O.). Lorsque la régression linéaire est effectuée sur les courbes de production d'EPS, le  $\mu$  est appelé  $k$  et représente le taux de production de polysaccharide. Ces régressions sont effectuées pour les points inférieurs ou égaux au maximum (début de la phase plateau). Le deuxième paramètre évalué est le maximum (MAX) mesuré pour les différentes variables (CFU, EPS et D.O.).

À partir de ces nouveaux résultats, d'autres analyses de variance ont été réalisées dont les résultats ont été retenus pour l'interprétation des facteurs de croissance favorisant la production d'EPS par des souches de lactobacilles présentés plus loin. Ces analyses de variance ont généré deux types de variables, soit des effets significatifs (*P*) et des interactions significatives (*I*). Les effets significatifs font ressortir l'impact de la température ou du sucre ajouté sur les paramètres de croissance et de production d'EPS. Les interactions significatives impliquent que les effets de la température ne sont pas les mêmes pour les deux types de sucres ou que l'effet des sucres n'est pas le même pour les deux températures.

#### 4.3.3 Calculs de rendement et de productivité

Le rendement en quantité d'EPS produit selon le sucre consommé a été calculé comme suit :

$$(\text{mg EPS} \times 100) / \text{mg de sucres consommés} = \% \text{ de rendement}$$

La productivité est définie comme étant la production maximale d'EPS en un minimum de temps et a été calculé avec la formule suivante :

$$\text{Maximum d'EPS produits} / \text{temps d'incubation} = P_{\text{max}} \text{ en (mg/l)/h}$$

Des analyses de variance ont aussi été effectuées sur ces résultats.

## 4.4 Résultats

### 4.4.1 Croissance et production d'exopolysaccharides par *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M

L'analyse statistique a révélé un effet significatif de la température sur le taux de croissance (D.O.  $\mu$ ) ainsi que pour la valeur maximale de biomasse (D.O.  $\mu_{max}$ ) (Tableau 4.1). Le taux de croissance spécifique, estimé à partir de la densité optique, de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est plus élevé à 37°C ( $\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$ ) qu'à 32°C ( $\mu = 0.17 \text{ h}^{-1}$ ). À l'exception de ces effets significatifs, il n'y a pas d'effet de température ou de type de sucre significatif pour la souche ATCC 9595M en ce qui concerne le taux de croissance (CFU  $\mu$ ), la population maximale (CFU  $\mu_{max}$ ) et le taux de production d'EPS ( $k$ ).

Comme le paramètre sucre ajouté n'a aucun effet sur la production d'EPS et sur le taux de croissance de la souche, les figures 4.3a et 4.4a présentent les courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M en fonction de la température de croissance (32°C ou 37°C), les sucres ajoutés étant confondus. Les valeurs retrouvées dans les figures représentent donc les moyennes de six fermentations (3 répétitions x 2 sucres ajoutés). L'illustration graphique de ces résultats permet de mettre en relief la relation entre la croissance bactérienne et la production d'EPS. Dans un premier temps, lorsque la souche est cultivée à 37°C, on remarque que, dès le début de la phase exponentielle de croissance, la quantité d'EPS produite augmente. Une fois la croissance terminée, soit vers 21 h de fermentation, la production d'EPS cesse et la quantité d'EPS dosée reste stable malgré une phase de déclin précoce et importante de la population

**Tableau 4.1** : Analyses de variance des résultats de croissance spécifique (CFU  $\mu$  et D.O.  $\mu$ ) et de production d'EPS (EPS  $k$ ) ainsi que des maximums des deux variables reliées à la population maximale (CFU  $\text{max.}$  et D.O.  $\text{max.}$ ) pour la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M

Paramètre	<i>I</i>	t32moy	t37moy	<i>P</i>	glumoy	lacmoy	<i>P</i>
EPS $k$	0,13	0,14	0,19	0,12	0,17	0,17	0,86
CFU $\text{max.}$	0,86	7,93e+09	6,84e+09	0,34	7,31e+09	7,46e+09	0,89
CFU $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,78	0,19	0,23	0,16	0,21	0,21	0,92
D.O. $\text{max.}$	0,14	4,68	5,75	0,04*	4,99	5,44	0,34
D.O. $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,93	0,17	0,21	0,02*	0,21	0,18	0,08

*I* : interaction *P* : effet \* : interactions ou effet significatif

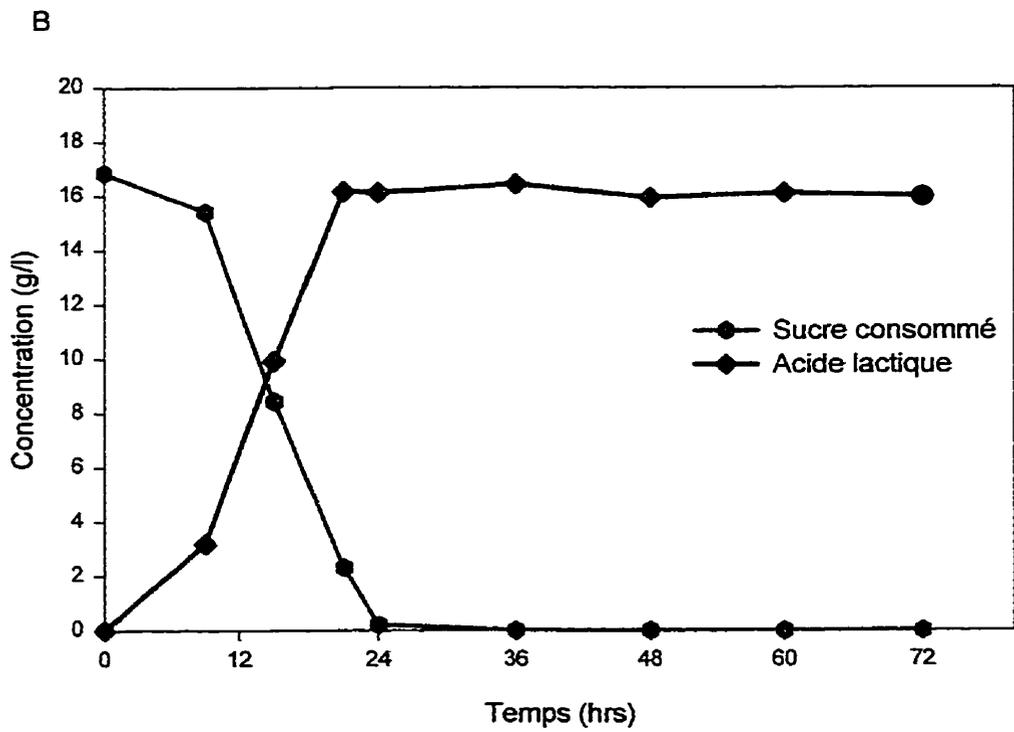
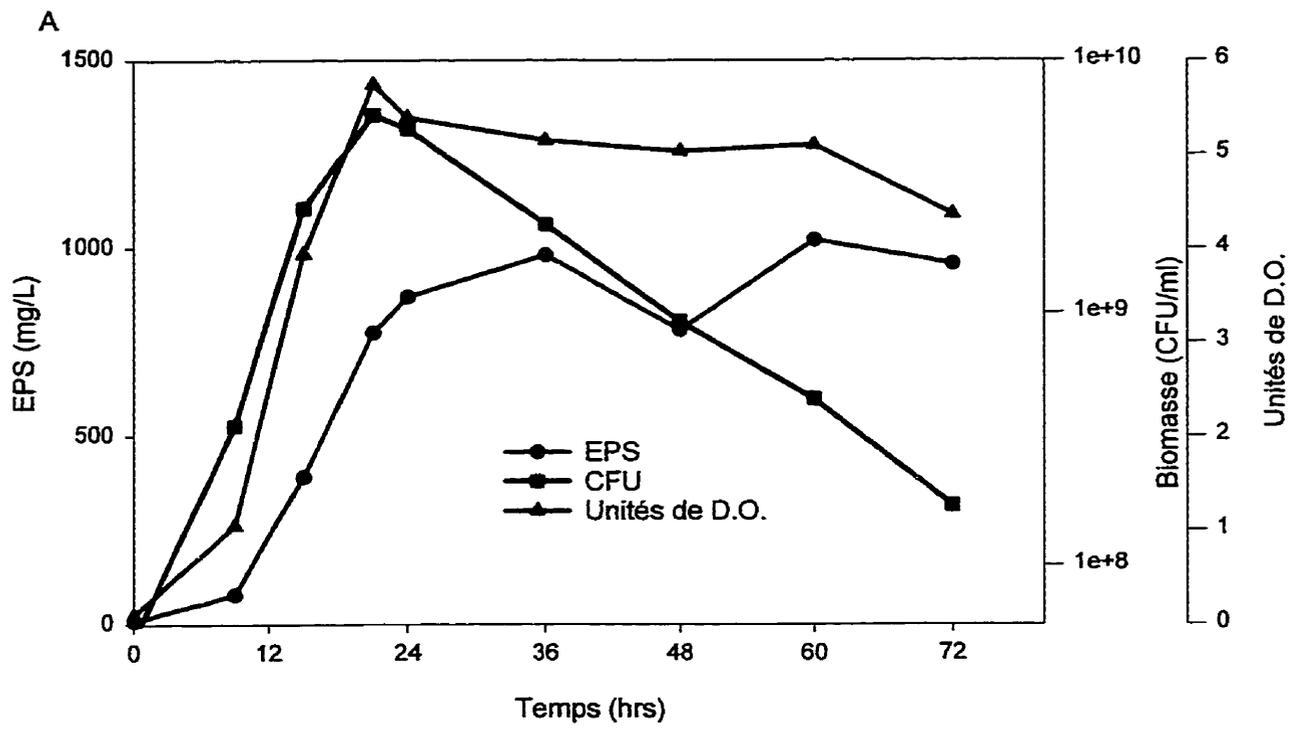
bactérienne. Lorsque la souche est cultivée à 32°C, la production d'EPS est légèrement plus lente, mais semble toujours reliée à la croissance. À cette température, on remarque aussi une diminution de la population (CFU et D.O.) et des polysaccharides produits en fin de fermentation. Cependant, cette diminution semble être moins importante lorsque la souche est cultivée à 32°C qu'à 37°C, surtout en ce qui a trait à la biomasse (CFU).

Les figures 4.3b et 4.4b présentent les courbes de consommation de sucre et de production d'acide lactique de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M en fonction de la température de croissance (32°C ou 37°C), les sucres ajoutés étant confondus. La croissance bactérienne est reliée à la consommation du sucre. En effet, une fois que la source de carbone est épuisée, la croissance cesse et la production d'acide lactique est maximum. Ce phénomène est aussi remarqué pour la souche Rosell (voir section 4.4.2).

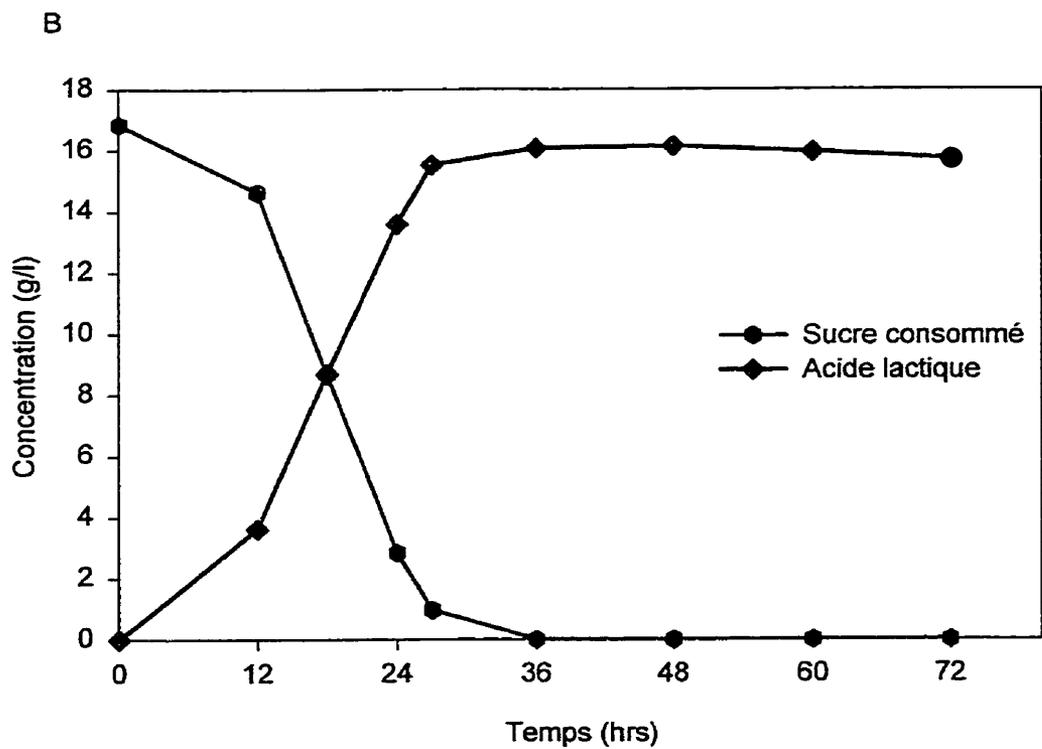
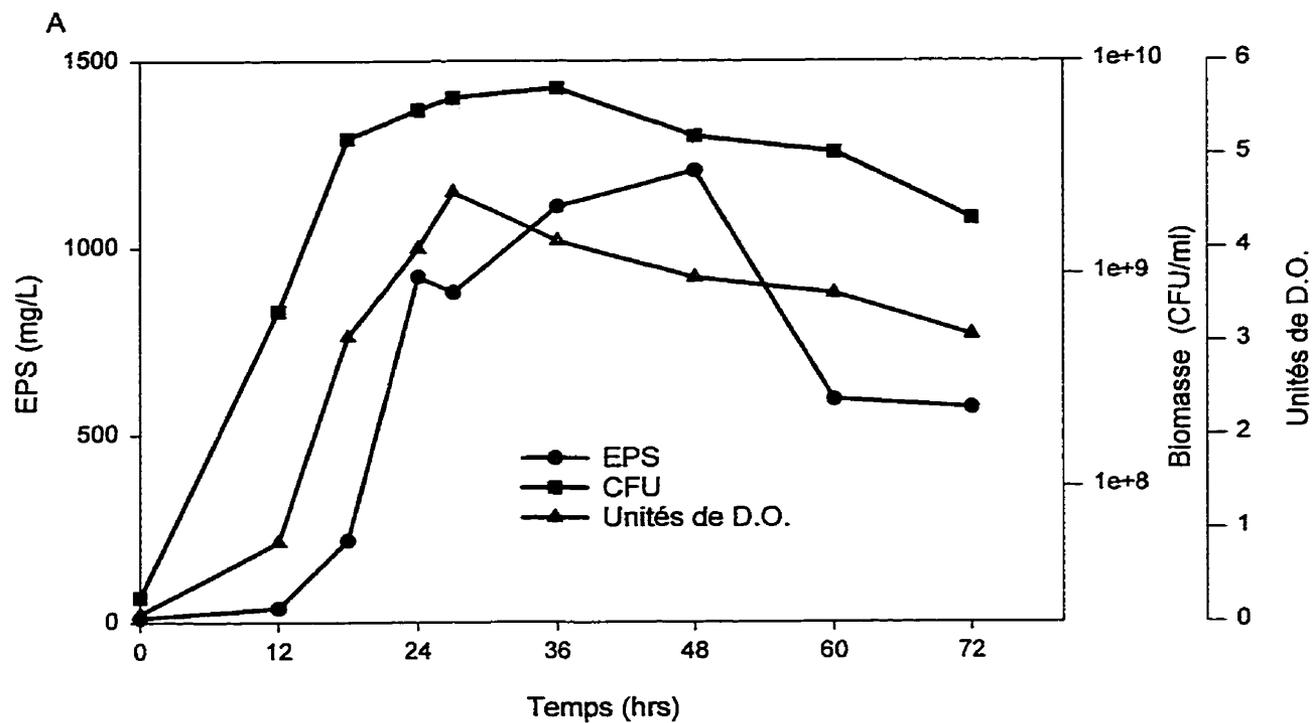
#### **4.4.2 Croissance et production d'exopolysaccharides par *Lb. rhamnosus* Rosell**

Une interaction significative et deux effets significatifs ont été décelés lors de l'analyse statistique des résultats de fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell (tableau 4.2). L'interaction significative concerne le  $k$  de la production d'EPS et les données représentant cette interaction sont présentées en détail dans le tableau 4.3. Le premier effet significatif est révélé pour la variable EPS  $k$  en fonction du sucre utilisé. Puisque le taux de production est plus élevé en présence de lactose qu'en présence de glucose. Le second est mis en évidence pour le taux de croissance D.O.  $\mu$  en fonction de la température. Ce taux de croissance, D.O.  $\mu$ , de

**Figure 4.3** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M à 37°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique



**Figure 4.4 :** Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M à 32°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique



la souche *Lb. rhamnosus* Rosell est plus élevée à 37°C ( $p=0,01$ ) qu'à 32°C et cela, indépendamment du sucre utilisé.

À l'exception de ces deux effets significatifs, il n'y a pas d'autres effets température ou type de sucre significatif pour la souche Rosell en ce qui concerne les taux de croissance ( $\mu$ ) ou de production d'EPS (EPS  $k$ ).

L'interaction significative, présentée en détail au tableau 4.3, implique que les effets de température ne sont pas les mêmes pour les deux types de sucre et/ou que l'effet des sucres n'est pas le même pour les deux températures. Premièrement, l'effet de la température sur le taux de production d'EPS est très différent pour les deux sucres. Ainsi, en présence de glucose le taux de production d'EPS (EPS  $k$ ) est significativement plus élevé ( $p=0,0122$ ) à 32°C qu'à 37°C. En revanche, en présence de lactose, EPS  $k$  à 32°C est significativement plus faible ( $p=0,0006$ ) qu'à 37°C. En ce qui concerne l'effet du type de sucre, il n'y a pas d'effet significatif ( $p=0,29$ ) à 32°C. Par contre, il y a un effet fortement significatif ( $p<0,0001$ ) à 37°C ; le taux de production d'EPS en présence de lactose est alors beaucoup plus élevé qu'en présence de glucose.

Les figures 4.5 et 4.6 présentent les courbes de croissance et de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell pour les quatre conditions de fermentation. Étant donné que le taux de consommation des sucres et de production d'acide lactique par cette souche est identique à celui observé pour la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, ces courbes ne sont pas présentées pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell, mais les données sont disponibles en annexe. La cinétique de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell est différente de celle de la

souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M. La croissance cellulaire commence dès le début de la fermentation alors que la production d'EPS ne commence qu'après 15 h. La cinétique de production d'EPS est de type mixte, une partie est associée à la croissance cellulaire et l'autre est non associée à la croissance. Dans tous les cas, la synthèse des polymères commence pendant la phase exponentielle de croissance et continue au début de la phase stationnaire. Ce phénomène est plus important en présence de glucose (figure 4.5a et 4.6a). Lorsque la souche est cultivée à 37°C dans le lactose, la production d'EPS subit une forte baisse après la phase exponentielle de croissance et une diminution de la population (CFU et D.O.) se produit presque simultanément. Toutefois, dans le glucose, à cette même température, ce phénomène n'est pas observé. Lorsque la température de fermentation est de 32°C (figure 4.6a et b), la diminution des EPS et de la croissance est aussi présente mais moins importante.

**Tableau 4.2** : Analyses de variance des résultats de croissance spécifiques (CFU  $\mu$  et D.O.  $\mu$ ) et de production d'EPS (EPS  $k$ ) ainsi que des maximums des deux variables reliées à la croissance (CFU  $\text{max}$  et D.O.  $\text{max}$ ) pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell

Paramètre	<i>I</i>	t32 <sub>moy</sub>	t37 <sub>moy</sub>	<i>P</i>	glu <sub>moy</sub>	lac <sub>moy</sub>	<i>P</i>
EPS $k$	0,0001*	0,14	0,14	0,9	0,12	0,16	0,0005*
CFU $\text{max}$	0,33	3,45e+09	2,49e+09	0,21	3,39e+09	2,46e+09	0,26
CFU $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,46	0,21	0,19	0,6	0,2	0,19	0,79
D.O. $\text{max}$	0,52	5,08	5,36	0,73	5,26	5,18	0,93
D.O. $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,14	0,14	0,19	0,01*	0,17	0,17	0,87

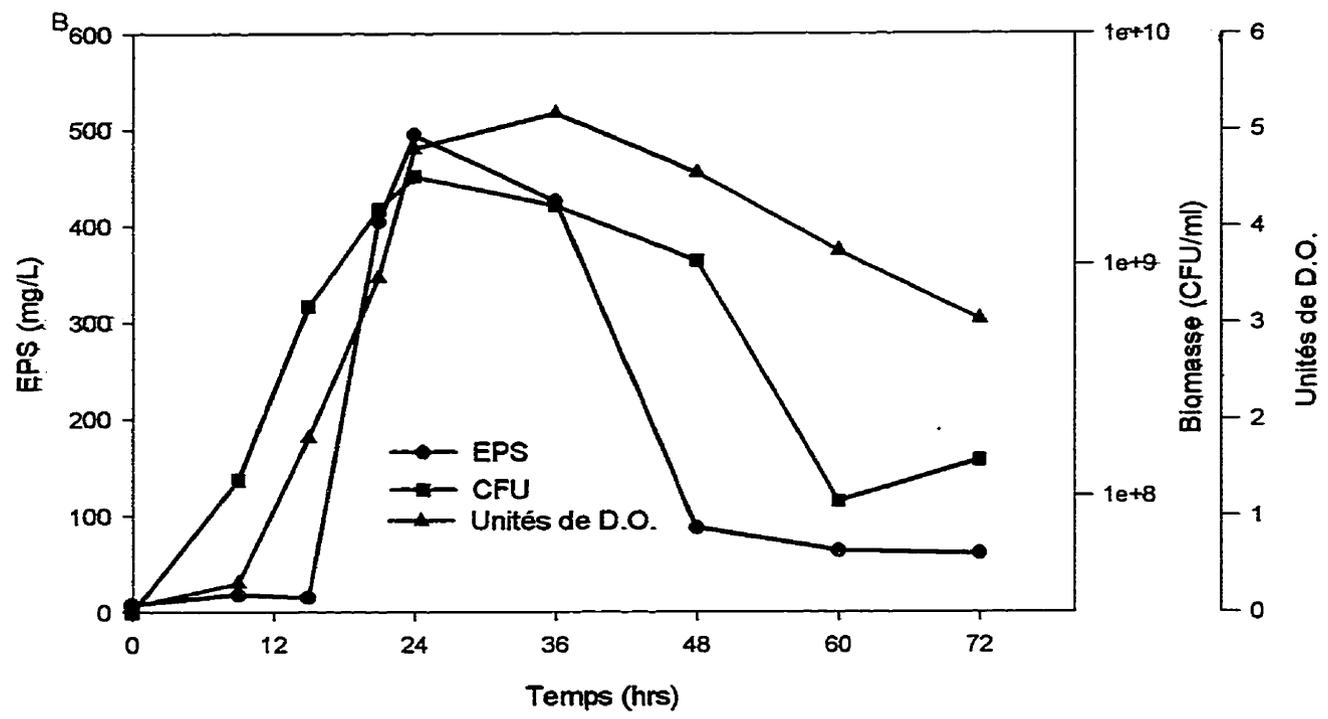
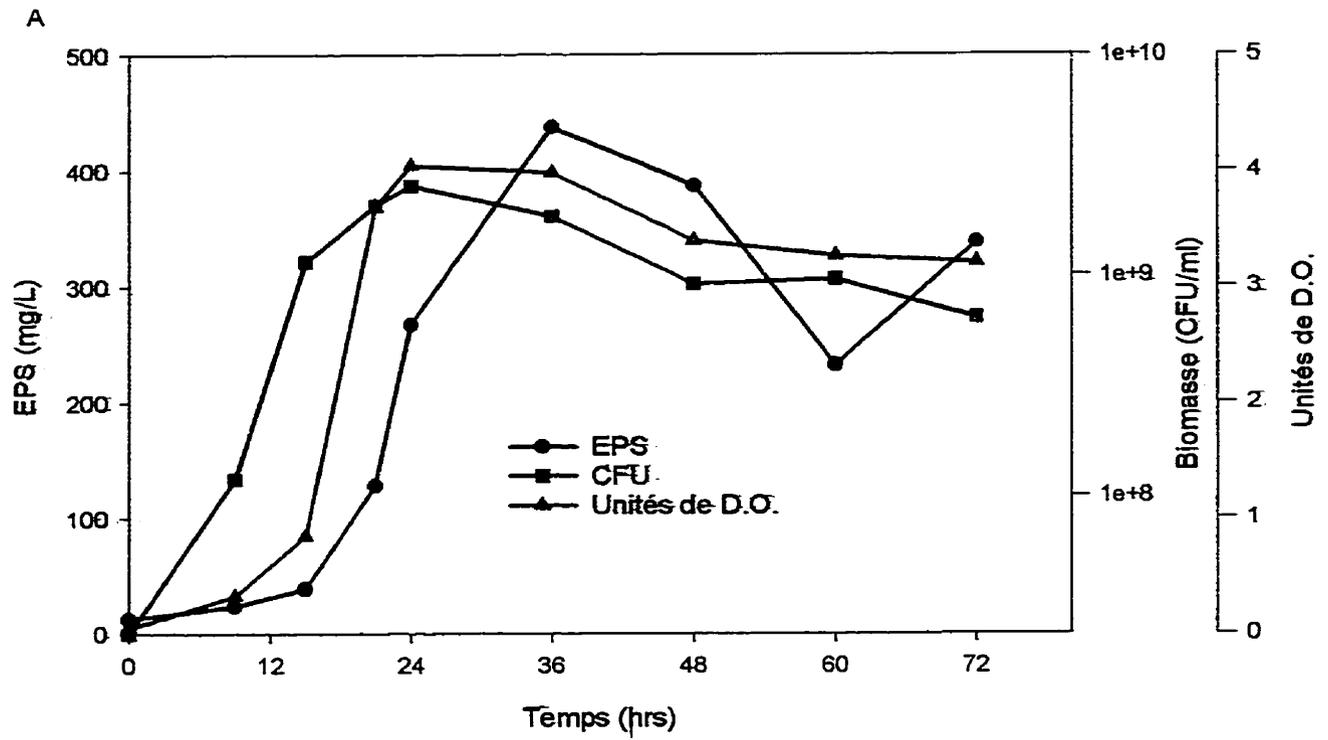
*I* : interaction *P* : effet \* : interactions ou effet significatif

**Tableau 4.3** : Analyse de variance présentant une interaction significative entre les effets température et sucre des taux de croissance spécifiques pour la production d'EPS (EPS  $k$ ) pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell

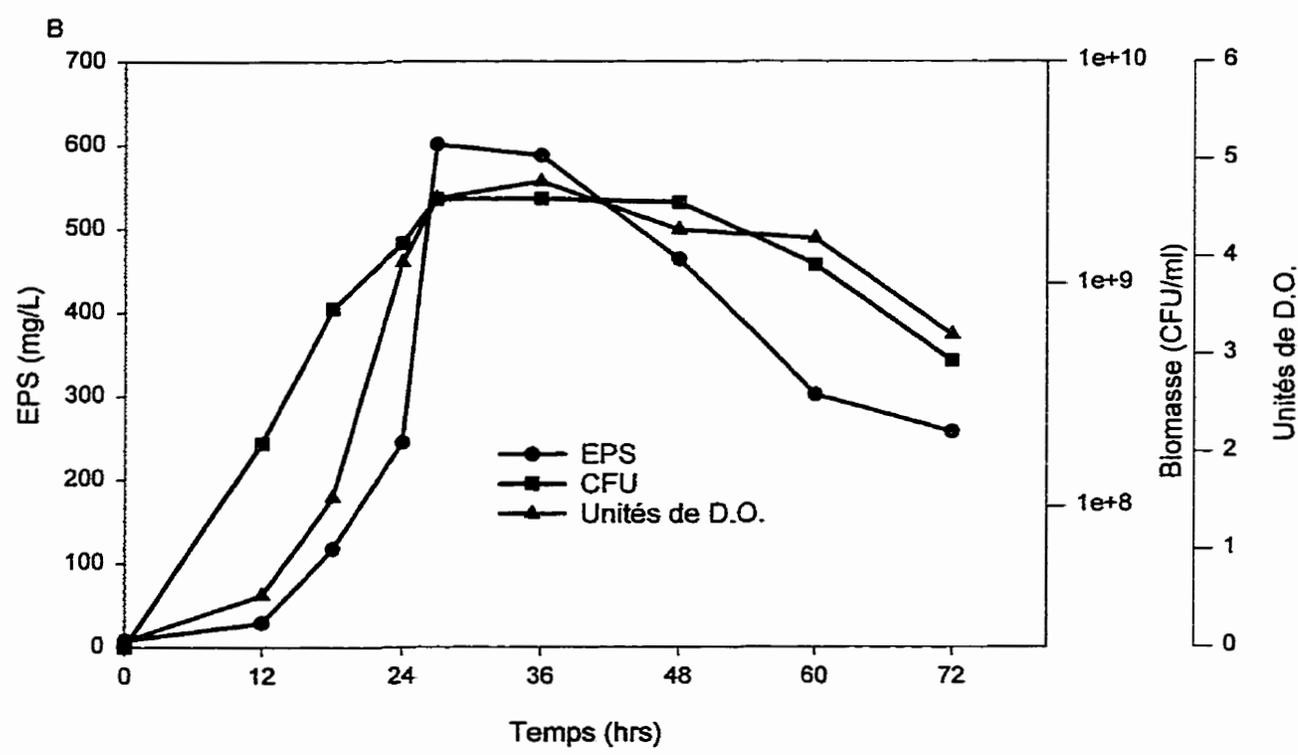
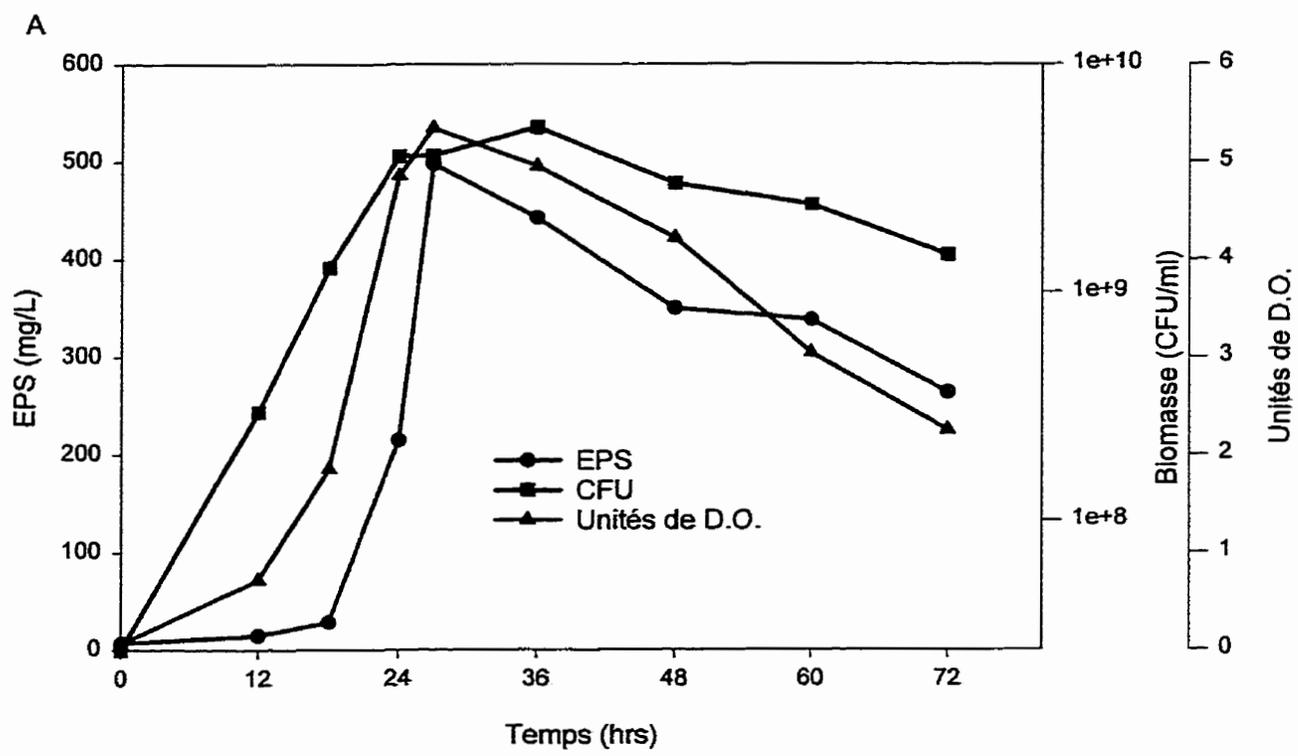
Effet température					
37°C-glu	32°C-glu	<i>P</i>	37°C-lac	32°C-lac	<i>P</i>
0,100	0,148	0,0122*	0,184	0,134	0,00006*
Effet sucre					
37°C-glu	37°C-lac	<i>P</i>	32°C-glu	32°C-lac	<i>P</i>
0,100	0,184	< 0,0001*	0,148	0,134	0,29

*P* : effet \* : effet significatif

**Figure 4.5** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell à 37°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le glucose B : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le lactose



**Figure 4.6** : Fermentation de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell à 32°C en milieu défini à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le glucose B : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS dans le lactose



#### 4.4.3 Croissance et production d'exopolysaccharides par *Lb. casei* Type V

Deux interactions et deux effets significatifs sont décelés par la méthode de régression  $\ln X$  vs  $t$  pour la variable D.O. de la souche *Lb. casei* Type V (tableau 4.4). L'étude plus approfondie des interactions significatives est présentée au tableau 4.5.

Le premier effet significatif est constaté pour le type de sucre du  $\mu$  moyen de la variable D.O. : le taux de croissance est plus élevé pour le lactose ( $p=0,01$ ) que pour le glucose. Le second effet significatif très important est aussi provoqué par le type de sucre ajouté mais cette fois-ci pour la variable D.O. <sub>max</sub>. Le  $\mu$  moyen de la mesure de densité optique maximale est plus élevé dans le lactose ( $p=0,0002$ ) que dans le glucose.

À l'exception de ces effets significatifs, il n'y a pas d'autre effet température ou de type de sucre significatif pour la souche Type V en ce qui concerne le taux de croissance ( $\mu$ ) ou le taux de production d'EPS (EPS k).

La première interaction significative concerne le  $\mu$  des courbes D.O. (tableau 4.5). Dans ce cas-ci, l'effet de la température n'est pas significatif pour les deux sucres. Aucun effet significatif de température n'est décelé dans le glucose ( $p=0,20$ ) ou dans le lactose ( $p=0,30$ ). En ce qui concerne l'effet du type de sucre, il n'y a pas d'effet significatif ( $p=0,78$ ) à 37°C, mais il y a un effet significatif ( $p=0,03$ ) à 32°C ; le D.O. $\mu$  moyen en présence de lactose (0,069) est plus grand que le D.O. $\mu$  moyen en présence de glucose (0,036).

**Tableau 4.4** : Analyses de variance des résultats de croissance spécifiques (CFU  $\mu$  et D.O.  $\mu$ ) et de production d'EPS (EPS  $k$ ) ainsi que des maximums des deux variables reliées à la croissance (CFU  $\mu_{\max}$  et D.O.  $\mu_{\max}$ ) pour la souche *Lb. casei* Type V

Paramètre	<i>I</i>	t32 <sub>moy</sub>	t37 <sub>moy</sub>	<i>P</i>	glu <sub>moy</sub>	lac <sub>moy</sub>	<i>P</i>
EPS $k$	0,41	0,05	0,05	0,90	0,05	0,05	0,77
CFU $\mu_{\max}$	0,24	2,91e+09	2,80e+09	0,92	2,43e+09	3,28e+09	0,42
CFU $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,52	0,11	0,13	0,69	0,12	0,12	0,82
D.O. $\mu_{\max}$	0,02*	3,68	3,05	0,09	2,27	4,45	0,01*
D.O. $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,03*	0,05	0,05	0,66	0,05	0,06	0,05*

*I* : interaction *P* : effet \* : interactions ou effet significatif

**Tableau 4.5** : Analyse de variance présentant une interaction significative entre les effets température et sucre des taux de croissance spécifiques pour mesure de D.O. (D.O.  $\mu$ ) pour la souche *Lb. casei* Type V

Effet température					
37°C-glu	32°C-glu	<i>P</i>	37°C-lac	32°C-lac	<i>P</i>
0,057	0,036	0,20	0,054	0,069	0,30
Effet sucre					
37°C-glu	37°C-lac	<i>P</i>	32°C-glu	32°C-lac	<i>P</i>
0,057	0,054	0,7800	0,036	0,069	0,03*

*P* : effet \* : interactions ou effet significatif

La seconde interaction est constatée pour le maximum des mesures D.O. (tableau 4.6) . Ici aussi, aucun effet température n'est détecté dans le glucose ( $p=0,25$ ) ou dans le lactose ( $p = 0,067$ ). En ce qui concerne l'effet type de sucre, il y a un effet fortement significatif ( $p < 0,0001$ ) à 32°C contrairement à 37°C ( $P = 0.11$ ) ; la mesure de D.O. <sub>max</sub> en présence de lactose (5,23) est alors beaucoup plus grande que la mesure de D.O. <sub>max</sub> en présence de glucose (2,12).

Il est donc possible de conclure que dans le cas de la souche *Lb. casei* Type V, la mesure de densité optique est significativement plus élevée lorsque la souche est cultivée à 32°C dans le lactose que dans toute les autres conditions de culture.

La croissance de la souche *Lb. casei* Type V dans le milieu BMM est beaucoup plus lente que celle des deux autres lactobacilles (figures 4.7a À 4.10a). La phase exponentielle de croissance n'est pas bien définie et à 32°C dans le lactose elle se prolonge jusqu'en fin de fermentation. La population maximale atteint quand même plus de  $2 \times 10^9$  cellules/ml dans tous les cas. La production d'EPS n'est pas directement reliée à la croissance, des polymères continuent d'être synthétisés pendant la phase stationnaire. Ce phénomène est surtout constaté dans le glucose à 37°C (figure 4.7a) et à 32°C (figure 4.9a).

La consommation totale du sucre ainsi que la production maximale d'acide lactique n'est atteinte qu'après 60 h de fermentation à 37°C dans le glucose (figure 4.7b) et dans le lactose (figure 4.8b) ainsi qu'à 32°C dans le lactose (figure 4.10b). À 32°C, dans le glucose, le sucre n'est pas complètement consommé même après 72 h de fermentation (figure 4.9b).

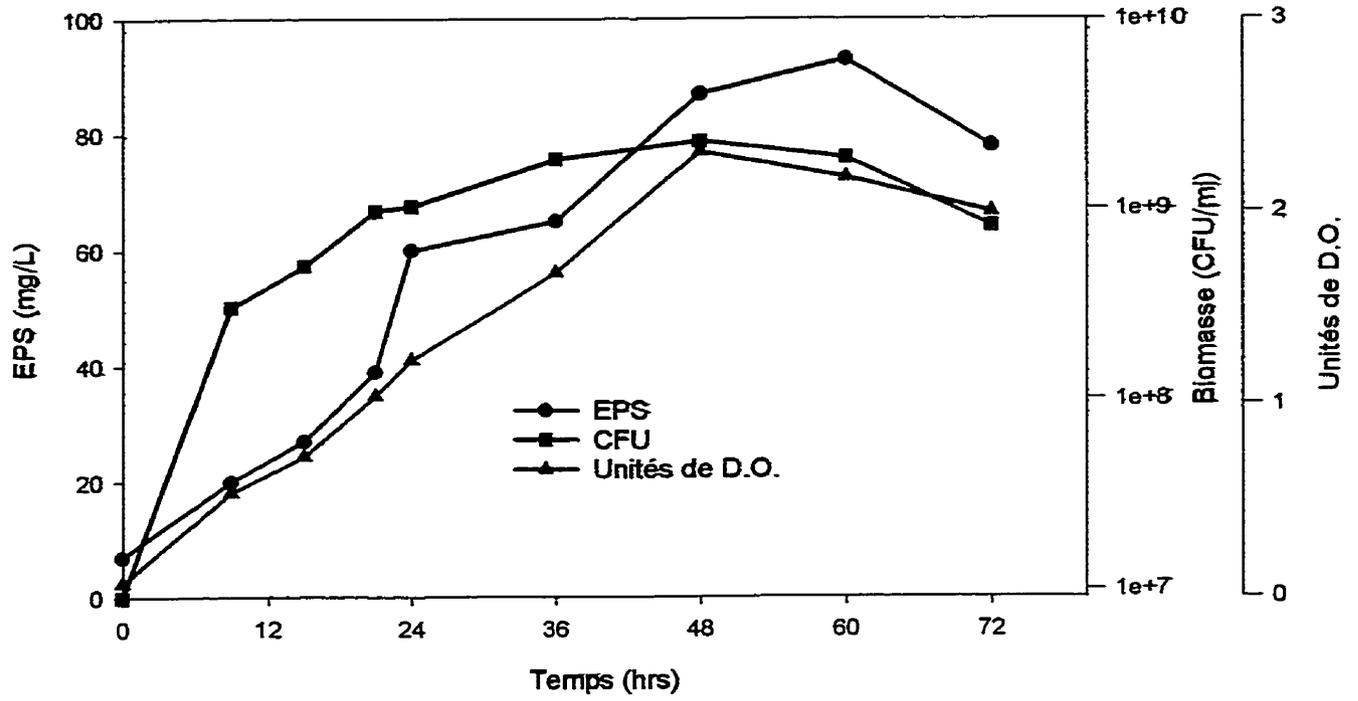
**Tableau 4.6** : Analyse de variance présentant une interaction significative entre les effets température et sucre des mesures de D.O. maximum (D.O. <sub>max</sub>) pour la souche *Lb. casei* Type V

<b>Effet température</b>					
<b>37°C-glu</b>	<b>32°C-glu</b>	<b>P</b>	<b>37°C-lac</b>	<b>32°C-lac</b>	<b>P</b>
2,42	2,12	0,25	3,68	5,23	0,07
<b>Effet sucre</b>					
<b>37°C-glu</b>	<b>37°C-lac</b>	<b>P</b>	<b>32°C-glu</b>	<b>32°C-lac</b>	<b>P</b>
2,42	3,68	0,11	2,12	5,23	<0.0001*

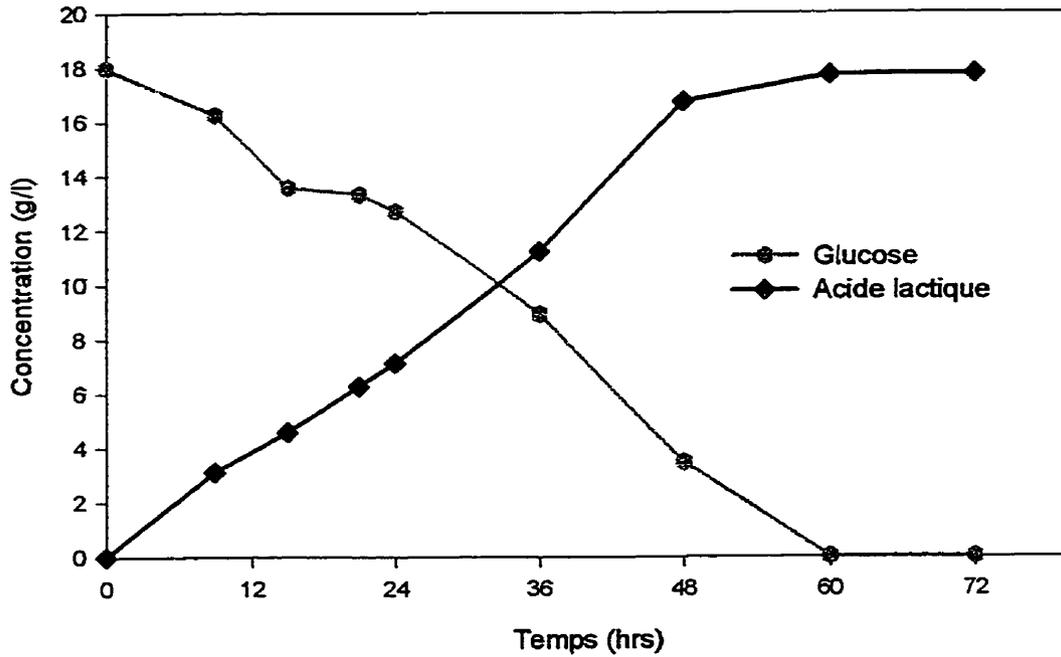
*P* : effet \* : effet significatif

**Figure 4.7** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 37°C en milieu défini additionné de glucose à pH contrôlé  
A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS  
B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique

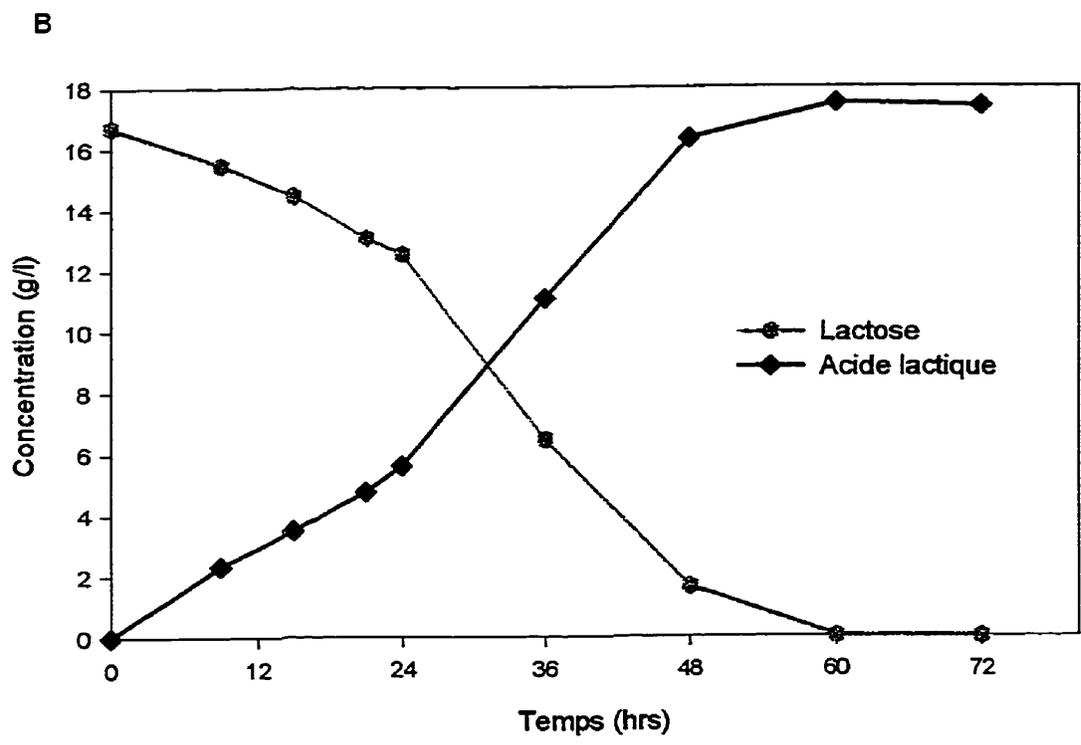
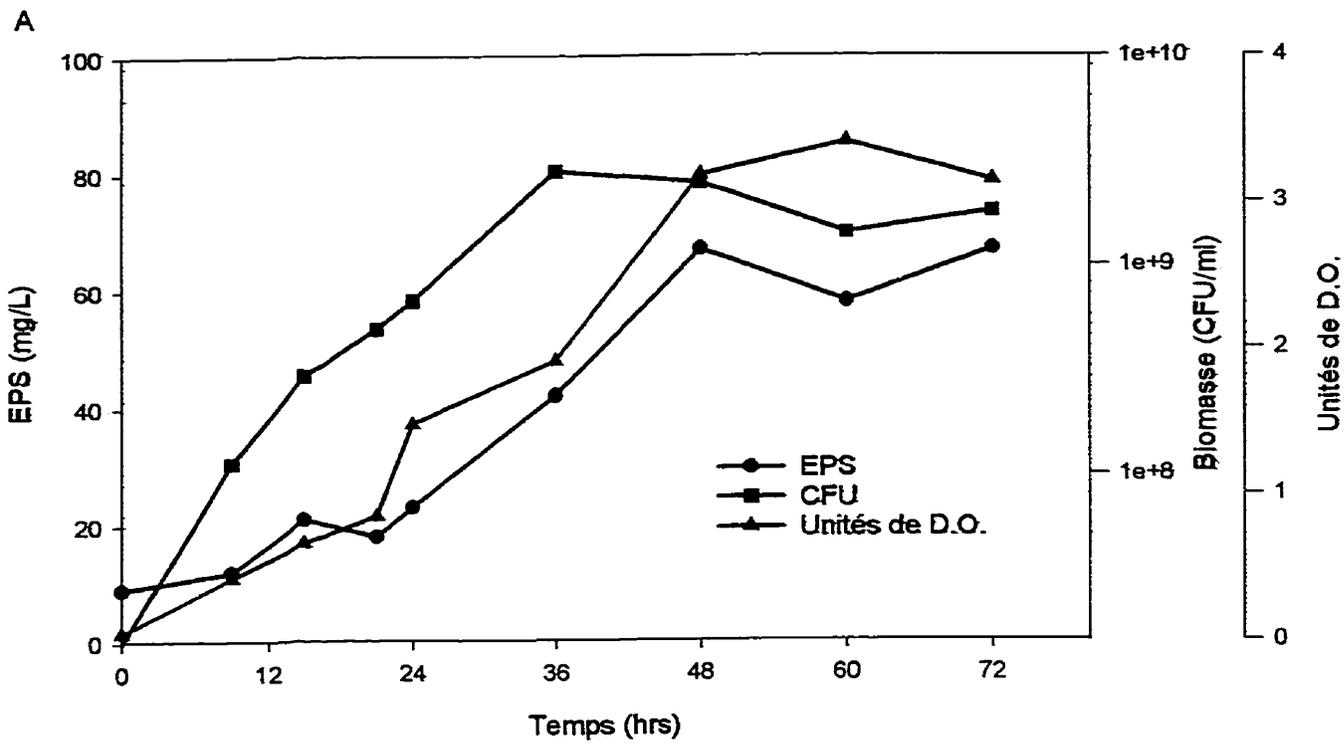
A



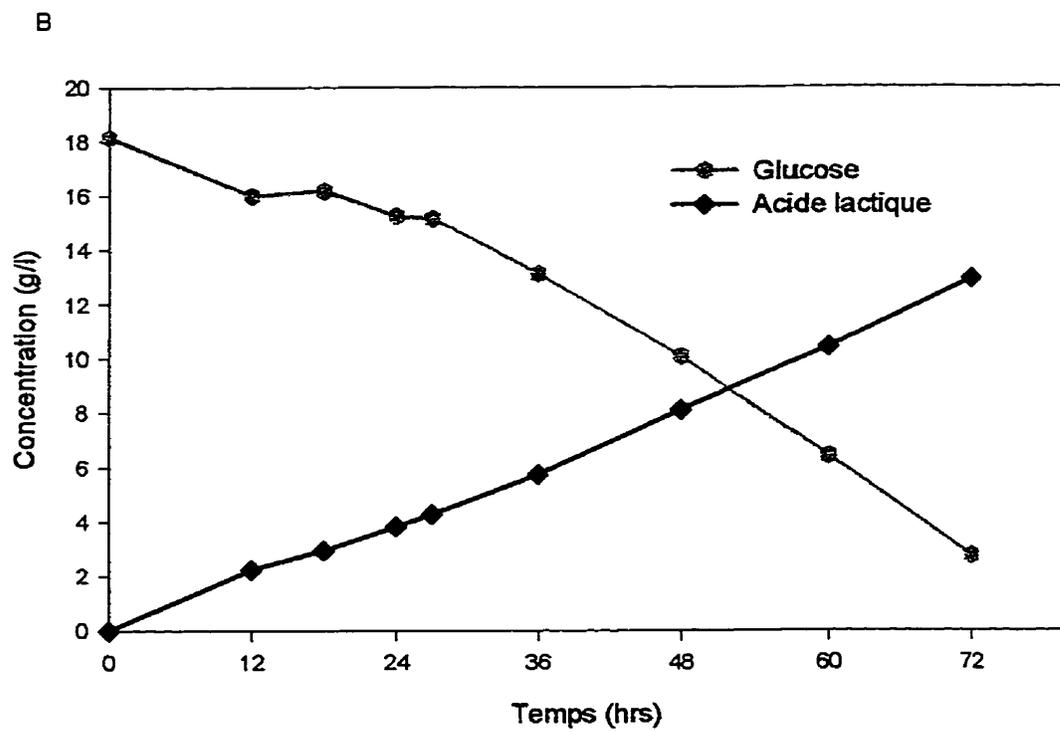
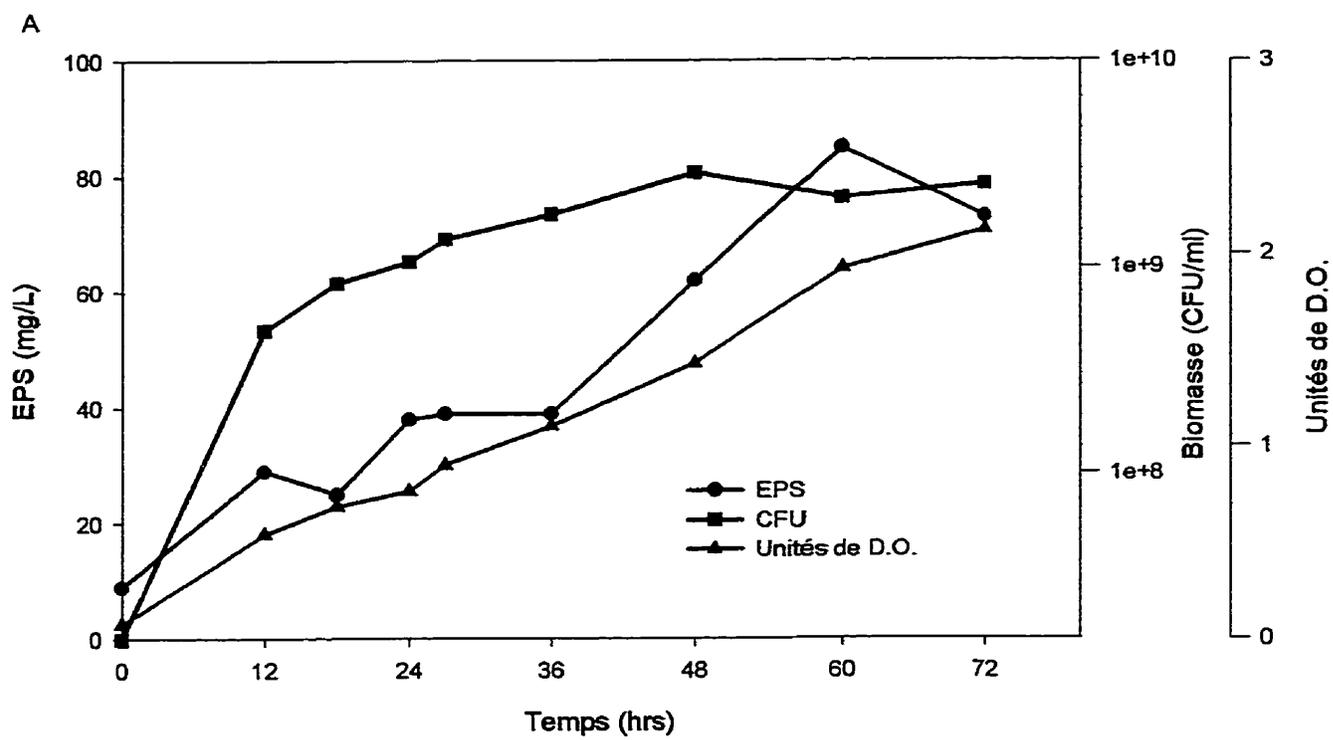
B



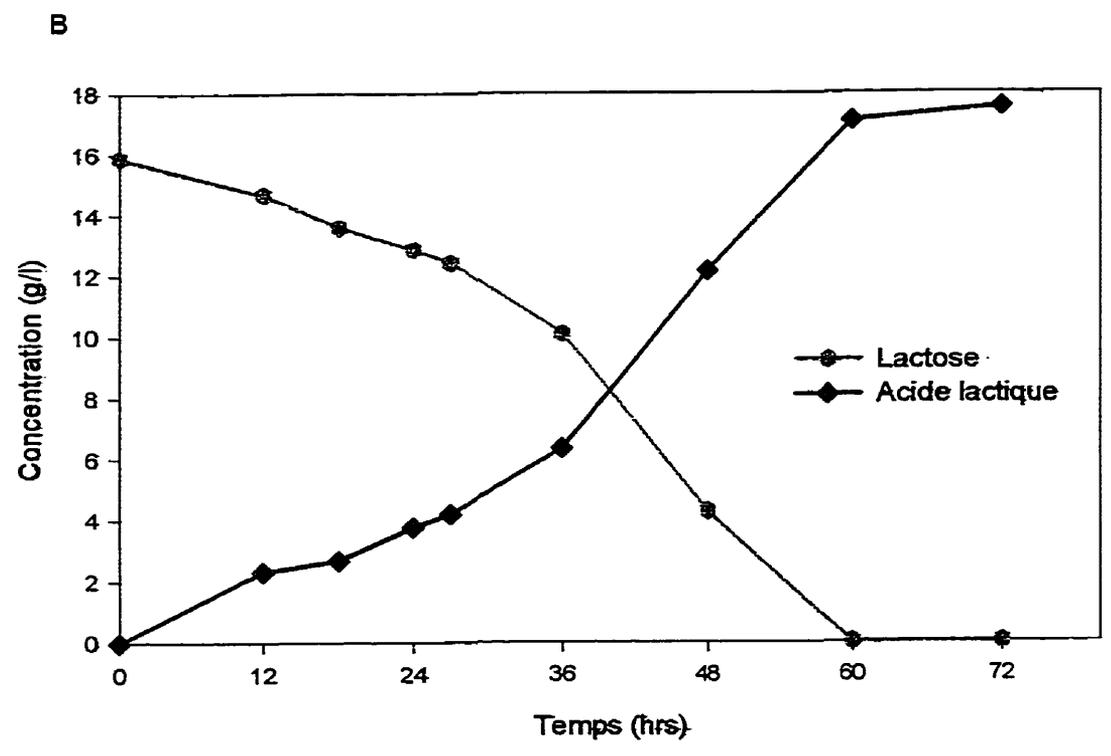
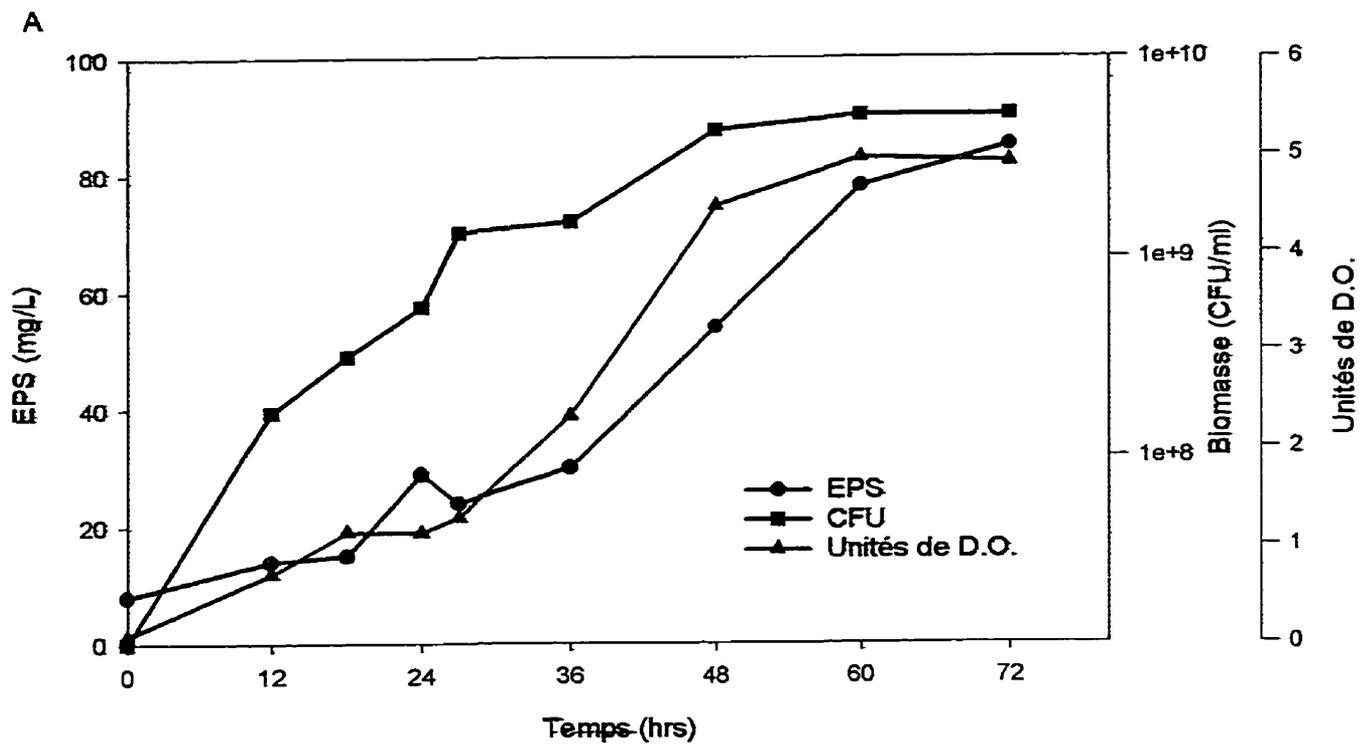
**Figure 4.8** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 37°C en milieu défini additionné de lactose à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique



**Figure 4.9** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C en milieu défini additionné de glucose à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS  
B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique



**Figure 4.10** : Fermentation de la souche *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C en milieu défini additionné de lactose à pH contrôlé A : Courbes de croissance (biomasse et unités de D.O.) et de production d'EPS  
B : Courbes de consommation du sucre et de production d'acide lactique



#### 4.4.4 Comparaison de la production d'EPS par les trois souches

##### 4.4.4.1 Paramètres associés aux maximums de production d'EPS

La production maximale d'EPS est très différente d'une souche à l'autre (tableau 4.7). La production d'EPS par la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M se situe entre 933 et 1 275 mg/l de polysaccharides. La souche *Lb. rhamnosus* Rosell produit entre 438 et 601 mg/l d'EPS et, finalement, la souche *Lb. casei* Type V produit entre 67 et 93 mg/l d'EPS. Des analyses statistiques confirment les différences significatives de production pour les trois souches de lactobacilles (tableau 4.8).

De plus, pour les deux souches de *Lb. rhamnosus*, la production d'EPS est maximale en fin de phase exponentielle de croissance ou au début de la phase plateau, soit entre 36 et 48 h pour *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M et entre 24 et 36 h pour *Lb. rhamnosus* Rosell. Lorsque la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est cultivée à 37°C dans le lactose, la production d'EPS est de 1 031 mg/l après 36 h, mais atteint quand même 1 195 mg/l à 60 h de fermentation (Annexe B). Dans le cas de *Lb. casei* Type V, la production d'EPS est maximale en fin de fermentation, soit entre 60 et 72 h.

Dans le tableau 4.8 (analyses de variance des maximums de production d'EPS par les trois souches de lactobacilles), la colonne MAX présente les moyennes des valeurs maximales **mesurées** lors des fermentations. Ces valeurs peuvent être associées aux temps d'échantillonnage (T). La colonne "Gompertz" présente les moyennes des valeurs maximales **estimées** par l'asymptote du modèle de Gompertz.

**Tableau 4.7 :** Production d'EPS (mg/l) maximale mesurée et estimée par les trois souches de *Lactobacillus* spp. selon la température d'incubation (t°), la source de carbone (Sucre) et le temps d'échantillonnage (Temps)

Souche bactérienne	t°	Sucre	Eps <sup>max</sup> (mg/l)	Erreur	Temps	Gompertz
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M	37°C	glu	933	96	36 h	981
		lac	1 031	104	36 h	1 434
	32°C	glu	1 138	89	48 h	1 110
		lac	1 275	41	48 h	1 272
<i>Lb. rhamnosus</i> Rosell	37°C	glu	438	45	36 h	541
		lac	495	33	24 h	538
	32°C	glu	498	88	27 h	689
		lac	601	153	27 h	665
<i>Lb. casei</i> Type V	37°C	glu	93	36	60 h	102
		lac	67	6	72 h	97
	32°C	glu	85	36	60 h	103
		lac	85	16	72 h	149

Quels que soient les estimateurs utilisés pour expliquer la production maximale d'EPS, aucune interaction significative n'a été trouvée entre les variables. Par contre, on constate un effet principal du type de sucre avec l'asymptote des modèles de Gompertz pour la variable EPS pour la souche ATCC 9595M (maximum d'EPS plus élevé pour le lactose [ $p=0,00$ ]). Dans ce cas-ci, seulement un paramètre sur deux (asymptote ou maximum) conclut à un effet significatif. Il faut donc conclure sur le paramètre en question (asymptote ou maximum) plutôt que sur la production maximale de façon générale. Notons cependant que le paramètre non significatif (par exemple asymptote) montre souvent un effet presque identique bien que non significatif.

Le fait qu'on ne constate qu'un effet significatif mais aucune interaction par cette analyse de variance implique que la production maximale de EPS n'est pas influencée par les facteurs sucre et température. La comparaison des maximums évalués et mesurés permet cependant de valider la modélisation par Gompertz. En effet, les valeurs estimées par cette méthode sont presque identiques à celles mesurées lors des dosages.

#### **4.4.4.1 Rendement et productivité d'exopolysaccharides**

Les résultats des calculs de rendement et de productivité de la production d'EPS par les trois souches de lactobacilles sont regroupés dans le tableau 4.9. La souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M présente un rendement de production de polymères qui se situe entre 4,28 et 6,09% pour une productivité se situant autour de 40 (mg/l)/h. Le rendement de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell est plus faible et se situe entre 1,33 et

**Tableau 4.8 :** Analyse de variance des maximums de production d'EPS (mg/l) par les trois souches de lactobacilles évaluées selon les deux méthodes de modélisation des courbes de production (Les effets significatifs sont indiqués avec un astérisque)

Souche bactérienne	Type d'analyse	<i>I</i>	t32 <sub>moy</sub> (mg/l)	t37 <sub>moy</sub> (mg/l)	<i>P</i>	glu <sub>moy</sub> (mg/l)	lac <sub>moy</sub> (mg/l)	<i>P</i>
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M	Gompertz	0,07	1 191	1 208	0,82	1 046	1 353	0,00*
	MAX	0,11	1 043	1 106	0,59	1 088	1 062	0,82
<i>Lb. rhamnosus</i> Rosell	Gompertz	0,90	677	540	0,15	615	602	0,88
	MAX	0,48	587	477	0,24	481	583	0,28
<i>Lb. casei</i> Type V	Gompertz	0,48	126	100	0,47	103	123	0,57
	MAX	0,59	49	73	0,12	62	60	0,91

*I* : interaction *P* : effet \* : interactions ou effet significatif

**Tableau 4.9 :** Rendement (%) et productivité (mg/l h<sup>-1</sup>) maximale pour les trois souches de *Lactobacillus* spp. productrices d'EPS selon la température d'incubation (t°) et la source de carbone (Sucre)

Souche bactérienne	t°	Sucre	Rendement (%)	Erreur	Productivité (mg/l h <sup>-1</sup> )	Erreur
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M	37°C	glu	4,28	0,83	40,71	7,93
		lac	4,85	0,60	40,38	5,03
	32°C	glu	4,89	0,88	40,73	7,35
		lac	6,09	0,71	36,16	5,21
<i>Lb. rhamnosus</i> Rosell	37°C	glu	2,19	0,23	12,17	1,25
		lac	2,52	0,19	20,64	1,37
	32°C	glu	1,33	0,40	12,29	2,30
		lac	3,31	0,82	22,26	5,66
<i>Lb. casei</i> Type V	37°C	glu	0,46	0,18	1,54	0,59
		lac	0,33	0,03	0,93	0,09
	32°C	glu	0,64	0,28	1,42	0,61
		lac	0,43	0,13	1,02	0,31

*I* : interaction *P* : effet \* : interactions ou effet significatif

3,31% pour une productivité passant de 12,17 (mg/l)/h à 22,26 (mg/l)/h selon les conditions de culture. Finalement, la souche *Lb. casei* Type V présente des rendements de production entre 0,33 et 0,64% pour une productivité se situant entre 0,93 et 1,54 (mg/l)/h.

Les analyses de variance effectuées sur les calculs de rendements et de productivité sont présentées dans le tableau 4.10. Aucune interaction significative ni effet significatif n'est détecté pour les calculs de rendement de production d'EPS et ce, pour les trois souches de lactobacilles quels que soient les paramètres associés. Donc, ni l'effet température ni l'effet sucre n'a d'impact sur les rendements de production d'EPS chez les trois lactobacilles étudiés. Pour les productivités maximales, un effet significatif de température est détecté pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell. Dans ce cas-ci, la productivité est meilleure lorsque la souche est cultivée à 37°C plutôt qu'à 32°C. En dehors de cet effet, aucune interaction ni effet significatif n'est mis en évidence pour la productivité maximale des trois souches.

**Tableau 4.10** : Analyses de variance des rendements et des productivités maximales pour les trois souches de lactobacilles productrices d'EPS

<b>Rendements</b>							
Souche bactérienne	I	t32moy	t37moy	P	glumoy	lacmoy	P
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M	0,69	5,49	4,56	0,26	4,58	5,47	0,28
<i>Lb. rhamnosus</i> Rosell	0,42	2,76	2,36	0,18	2,2	2,92	0,44
<i>Lb. casei</i> Type V	0,47	0,54	0,4	0,37	0,55	0,38	0,83
<b>Productivités maximales</b>							
Souche bactérienne	I	t32moy	t37moy	P	glumoy	lacmoy	P
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M	0,75	38,45	40,56	0,75	38,27	40,73	0,72
<i>Lb. rhamnosus</i> Rosell	0,79	17,28	16,41	0,02	12,23	21,45	0,79
<i>Lb. casei</i> Type V	0,47	1,05	1,23	0,64	1,32	0,97	0,38

I : interaction P : effet \* : interactions ou effet significatif

## 4.5 Discussion

### 4.5.1 Croissance et production d'exopolysaccharides par trois souches de lactobacilles

Les résultats obtenus au cours de la présente étude indiquent que les cinétiques de production d'EPS en conditions de contrôle de pH sont différentes pour les trois souches de lactobacilles mésophiles étudiées. Bien que le taux de croissance ( $\mu$ ), estimé à partir de la densité optique, soit significativement plus élevé à 37°C, le taux de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est semblable aux deux températures. De plus, la synthèse des polysaccharides par la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est associée à la croissance. Les polymères sont principalement synthétisés pendant la croissance cellulaire et, une fois la phase exponentielle de croissance terminée, la production d'EPS cesse. Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour d'autres bactéries lactiques. En effet, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 (Grobben *et al.*, 1995), *Lb. rhamnosus* C83 (Gamar *et al.*, 1997) et *Sc. thermophilus* LY03 (De Vuyst *et al.*, 1998) présentent la même cinétique de production d'EPS reliée à la croissance. De Vuyst *et al.* (1998) ont d'ailleurs observé que la biosynthèse des EPS associée à la croissance chez *Sc. thermophilus* résulte d'une relation directe entre des conditions de croissance optimales et les rendements en EPS élevés. La conversion complète du glucose en acide lactique fournit l'énergie nécessaire à la croissance tandis, que les cellules produisent les EPS. La souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M a aussi utilisé complètement le glucose ou la lactose indiquant, ici aussi, une relation directe entre la croissance la production d'EPS et la production d'acide lactique (Gamar *et al.*, 1997).

Par contre, certaines souches de bactéries lactiques continuent de produire des EPS après la fin de leur croissance cellulaire. La cinétique de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell est de type mixte, c'est à dire qu'elle est en même temps associée et non associée à la croissance. La production d'EPS de cette souche commence environ 15 h après le début de la croissance cellulaire et continue au début de la phase stationnaire. Ce phénomène est aussi observé chez d'autres souches de bactéries lactiques comme *Lb. casei* CG11 (Kojic *et al.*, 1992) et de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CRL 420 (Manca de Nadra *et al.*, 1985).

La température d'incubation et la source de carbone n'ont pas d'effet sur la croissance et sur le taux de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M. La température et la source de carbone influencent cependant le taux de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* Rosell. Cet effet est différent selon les combinaisons de paramètres de fermentation puisque la production d'EPS est plus rapide dans le glucose à 32°C. De plus, contrairement à *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M, le taux de production d'EPS est plus élevé dans le lactose à 37°C, température à laquelle on observe également un taux de croissance plus élevé qu'à 32°C.

Ces résultats sont en contradiction avec l'hypothèse de Sutherland (1972) stipulant que des conditions de croissance défavorables stimulent la production d'EPS. Cette hypothèse stipule que dans des conditions de croissance optimales qui stimulent la croissance et donc la production de constituants cellulaires tels les lipopolysaccharides ou le peptidoglycane, la synthèse d'EPS serait réduite en raison de la moins grande disponibilité de certaines enzymes et intermédiaires lipidiques essentielles à la synthèse des EPS. Par contre, dans des conditions où la croissance est ralentie (à une température ou à un pH défavorable par exemple), la

bactérie produirait moins de constituants cellulaires, et les enzymes et les intermédiaires lipidiques seraient alors disponibles pour la synthèse des EPS. Cette hypothèse n'a cependant jamais été vérifiée expérimentalement.

Les conditions d'incubation ont un impact important sur la production d'exopolysaccharides par les souches de bactéries lactiques productrices. En général, le pH, la température et la source de carbone sont les paramètres influençant le plus la production d'EPS (Gamar *et al.*, 1997). Mozzi *et al.* (1996) ont déterminé qu'un pH constant de 6.0 favorise la production d'EPS pour *Lb. casei*. L'effet de la température sur la production d'EPS varie d'une souche à l'autre. *Lb. rhamnosus* (Gamar *et al.*, 1997) et *Lb. casei* (Kojic, 1992) produisent plus d'EPS à basse température alors que pour *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Garcia-Garibay et Marshall, 1991 ; Grobden, 1995) la production est stimulée à température élevée. La température idéale de production d'EPS par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR (Kimmel *et al.*, 1998) et *Sc. thermophilus* LY03 (De Vuyst *et al.*, 1998) est la même que la température optimale de croissance. Finalement, le type de sucre disponible lors de la fermentation influence la production et la composition des polymères produits (Manca de Nadra *et al.*, 1985 ; van den Berg *et al.*, 1995).

Les profils de fermentation des deux souches de *Lb. rhamnosus* se caractérisent par une diminution de la quantité d'EPS plus accentuée au cours de la phase stationnaire à 37°C qu'à 32°C. Toutefois, cette diminution des EPS est plus importante en présence de lactose que de glucose pour la souche *Lb. rhamnosus* Rosell. Ces diminutions de quantité de polysaccharides pendant la phase stationnaire de croissance pourrait être due à l'activation d'une glycohydrolase dégradant les polymères telle que suggérée par Macura et Townsley (1984) et par Cerning (1988).

Enfin, la croissance de la souche *Lb. casei* Type V est beaucoup plus lente que celle des deux autres souches. La cinétique de production d'EPS de cette souche est aussi de type mixte : dans toutes les conditions, plus de 50% des polysaccharides sont excrétés pendant la phase stationnaire de croissance.

#### 4.5.2 Comparaison de la production d'EPS par les trois souches

La quantité d'EPS produite peut varier considérablement d'une souche de bactérie lactique à l'autre (Bouzar *et al.*, 1997). Les différences de production d'exopolysaccharides par les trois souches de lactobacilles étudiées sont assez importantes. *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est sans aucun doute la meilleure souche productrice d'EPS étudiée jusqu'à maintenant avec une production maximale de 1275 mg/l, alors que *Lb. rhamnosus* Rosell se situe aussi parmi les meilleures avec 601 mg/l d'EPS produits. En comparaison, la souche de *Lb. casei* de Mozzi (1996) produit 488 mg/l d'EPS et *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* RR (Kimmel *et al.*, 1998) synthétise 354 mg/l d'EPS dans des conditions semblables (milieu synthétique avec contrôle de pH). *Lb. rhamnosus* C83 produit un maximum de 132 mg/l de polysaccharides dans un milieu synthétique sans contrôle de pH (Gamar *et al.*, 1997) (Tableau 1.2).

La production d'EPS dans le but d'en faire un bio-ingrédient peut entraîner des coûts de production importants. La productivité définie comme étant la production maximale d'EPS en un minimum de temps est donc une variable importante du point de vue industriel (Kimmel, 1998). La productivité de *Lb. casei* CRL 87 est d'environ 20.33 mg/l h<sup>-1</sup> après 24 h de fermentation et celle de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* RR est de 23.35 mg/l h<sup>-1</sup> après 15 h de fermentation (Tableau 4.12). Même si le maximum de production n'est atteint qu'entre 36 et 48 h, la productivité de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est d'environ 40 mg/l h<sup>-1</sup>, soit environ le double

La productivité maximale de *Lb. rhamnosus* Rosell est de 22.26 mg/l h<sup>-1</sup> après 27 h d'incubation. Finalement, la productivité de *Lb. casei* (1.54 mg/l h<sup>-1</sup>) se compare avec celle de *Lb. rhamnosus* C 83 (2.84 mg/l h<sup>-1</sup>) (Gamar et al., 1997) et de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB2772 (2.77 mg/l h<sup>-1</sup>), et cela, même si le maximum de production de cette souche n'est atteint qu'après 60 h de fermentation.

## 4.6 Conclusion

Deux éléments importants sont à retenir de cette étude. Premièrement avec une production d'EPS atteignant plus de 1275 mg/l d'exopolysaccharides, la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M est la plus performante des souches de lactobacilles productrices d'EPS étudiées jusqu'à maintenant, la souche de *Lb. rhamnosus* Rosell se retrouvant aussi parmi les meilleurs.

Ensuite, les cinétique de croissance et de production d'EPS sont différentes pour les trois souches étudiées. La production est liée à la croissance pour *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M alors que pour *Lb. rhamnosus* Rosell et *Lb. casei* Type V, la cinétique de production d'EPS est de type mixte soit en même temps associée et non-associée à la croissance.

**Tableau 4.11 : Production d'EPS et productivité de quelques souches de lactobacilles cultivées en milieu synthétique avec ou sans contrôle de pH.**

<b>Souches</b>	<b>Milieu de croissance</b>	<b>Production d'EPS</b>	<b>Productivité</b>	<b>Référence</b>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	milieu synthétique	25 mg/l	1.56 mg/l h <sup>-1</sup>	Marshall et al., 1995
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> C83	milieu synthétique sans contrôle de pH	132 mg/l	2.84 mg/l h <sup>-1</sup>	Gamar et al., 1997
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595M	milieu synthétique avec contrôle de pH	1275 mg/l	36.16 mg/l h <sup>-1</sup>	Dupont, 1998
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Rosell	milieu synthétique avec contrôle de pH	601 mg/l	22.26 mg/l h <sup>-1</sup>	Dupont et al., 1998
<i>Lactobacillus casei</i> CG11	milieu synthétique sans contrôle de pH	130 mg/l	3.33 mg/l h <sup>-1</sup>	Cemling et al., 1994
<i>Lactobacillus casei</i>	milieu synthétique avec contrôle de pH	488 mg/l	20.33 mg/l h <sup>-1</sup>	Mozzi et al., 1996
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> RR	milieu synthétique avec contrôle de pH	354 mg/l	23.35 mg/l h <sup>-1</sup>	Kimmel et al., 1998
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> NCFB2772	milieu synthétique avec contrôle de pH	250 mg/l	2.77 mg/l h <sup>-1</sup>	Grobben et al. 1998

## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'intérêt accru des dernières années pour les bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides est du principalement à leur capacité à améliorer la texture et à augmenter la viscosité des produits fermentés de type yogourts.

Les propriétés épaississantes des ferments lactiques, en particulier mésophiles, ne sont pas actuellement exploitées pleinement par l'industrie laitière, car on ne dispose pas de souches productrices de polysaccharides entièrement caractérisées et performantes. Cette étude a permis d'identifier au niveau moléculaire des souches de *Lactobacillus* spp. productrices d'exopolysaccharides et d'évaluer et de comparer la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches.

Des techniques génétiques appropriées ont permis de bien identifier et différencier les souches de lactobacilles productrices d'EPS de départ. De plus, ce travail permet de confirmer que la production d'EPS est liée à la croissance cellulaire et peut être très variable d'une souche à l'autre à l'intérieur du même groupe. En effet, *Lb. casei* ne produit que 100 mg/l d'EPS alors que *Lb. rhamnosus* synthétise plus de 1200 mg/l d'EPS en conditions de pH contrôlé. Dans le lait, la production diminue pour les trois souches et se situe autour de 60 mg/l d'EPS pour *Lb. casei* à environ 240 mg/l d'EPS pour *Lb. rhamnosus*. Enfin, il existe une bonne relation entre la viscosité et la production d'EPS particulièrement pour la souche de *Lb. casei*.

La composition des polymères synthétisés par les trois souches est en cours d'analyse, mais il semble que leur composition ressemble à celles des autres souches de bactéries lactiques étudiées jusqu'à maintenant : du rhamnose, du galactose et du glucose ayant été détecté. Ce travail est effectué par Marie-Rose van Calsteren au Centre de Recherche et de développement sur les aliments de St-Hyacinthe.

On sait peu de choses sur l'influence des souches non-productrices utilisées dans la fabrication des produits fermentés sur la croissance, la production et la composition des EPS des souches mucoïdes. Bouzar et *al.* (1997) rapportent que la production d'EPS par une souche mucoïde de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* est stimulée par la présence de *Sc. thermophilus* et que la composition des polymères est différente qu'en culture pure.

Finalement, alors qu'un grand nombre de travaux ont permis de déterminer les conditions favorisant l'optimisation de la production d'EPS par les bactéries lactiques, les recherches se tournent maintenant vers l'étude de la synthèse de ces polymères. Les enzymes de synthèse et d'assemblage ainsi que les gènes codant pour ces enzymes font l'objet d'une attention de plus en plus grande de la part des chercheurs.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andaloussi, A.S., Talbaoui, H., Marczak, R., Bonaly, R.** 1995. Isolation and characterisation of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43 : 995-1000.
- Ballongue, J.** 1993. Bifidobacteria and probiotic action. *Lactic Acid Bacteria*. : 357-428.
- Bergey's manual of Determination Bacteriology.** 1994. William R. Hensyl (Ed), 9<sup>ième</sup> édition. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, États-Unis.
- Bottazzi, V., Bianchi, F.** 1986. Types of microcolonies of lactic acid bacteria. Formation of void spaces and polysaccharides in yogourt. *Scienza E Technica Lattiero Casearia*. 37 : 297-315.
- Bottazzi, V., Mercenier, A.** 1994. Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques. *Dans : Bactéries lactiques*. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Loriga-Uriage. Vol.2. pp.409-418.
- Boulnois, G.J., Jann, K.** 1989. Bacterial polysaccharidecapsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Molecular Microbiology*. 3 (12) : 1819-1823.
- Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M.** 1995 Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science*. 79 : 205-211.
- Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M.** 1997. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *Journal of Dairy Science*. 80 : 2310-2317.

**Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M. J., Landon M.** 1986. Isolation and characterisation of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters*. 8 (9) : 625-628.

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

**Cerning J., Bouillanne C., Landon L., Desmazeaud M.** 1992. Isolation and characterisation of exopolysaccharide from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 75 (3) : 692-699.

**Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon L., Desmazeaud M., Topisirovic L.** 1994a. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (11) : 3914-3919.

**Cerning, J.** 1994b. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. *Dans : Bactéries lactiques*. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Loriga-Uriage. Vol.1, pp.309-329.

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

**Desmazeaud, M.** 1990. Rôles des cultures de microorganismes dans la flaveur et la texture des produits laitiers fermentés. Fédération Internationale de Laiterie ; Bruxelles (BEL), and Proceeding of the International Dairy Congress Biotechnology-Milk Products : 23

**Dierksen, K., Sandine, W.E., Trempy, J.E.** 1997. Expression of ropY and muciod phenotype in *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*. 80 : 1528-1536.

**Doco, T., Wieruszki, J.-M., Fournet B., Carcano, D., Ramos, P., Loones, A.** 1990. Structure of exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrates Research*. : 313-321.

**Ebenezer, R.V., Neville, J.M.** 1986. Involvement of plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied and Environmental Microbiology*. 51 (4) : 677-682.

**Escalante A., Wachter-Rodarte, C., Garcia-Garibay, M., Farres, A.** 1998. Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*. 84 : 108-114.

**Fassel, T.A., Van Over, J.E., Hauser, C.C., Buchholz, L.E., Edminston, C.E., Sanger, J.R., Remsen, C.C.** 1992. Evaluation of bacterial glycocalyx preservation and staining by ruthenium red-lysine and alcian blue for several methanotroph and staphylococcal species. *Cells and Materials*. 2 (1) : 37-48.

**Gamar, L., Blondeau, K., Simonet, J.-M.** 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*. 83 : 281-287.

**Gancel, F., Novel, G., Carcano, D., Loones, A., Ramos, P.** 1988. Procédé de sélection de clones bactériens producteurs d'exopolysaccharides et clones producteurs obtenus. Brevet No : R 2 632 968 - A1. France 88 08009.

- Gancel, F., Novel, G.** 1994a. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1- Conditions of production. Journal of Dairy Science. 77 : 685-688.
- Gancel, F., Novel, G.** 1994b Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2- Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. Journal of Dairy Science. 77 : 689-695.
- Garcia, E., Lopez, R.** 1997. Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiology Letters. 149 : 1-10.
- Garcia-Garibay, M., Marshall, V.M.E.** 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Journal of Applied Bacteriology. 70 : 325-328.
- Gassem, M.A., Schimdt, K.A., Frank, J.F.** 1997 Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Journal of Food Science. 62 (1) : 171-173.
- Gerbaux.M.**1994. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques Dans : Bactéries lactiques. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Lorica-Uriage. vol.2. pp.586.
- Griffin, A.M., Morris, V.J., Gasson, M.J.** 1996. The *cpsABCDE* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* strain NCBF2393. Gene. 183 : 23-27.
- Grobber, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R., de Bont, J.M.A.** 1995. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. Journal of Applied Bacteriology. 79 : 103-107.

**Grobben, G.J., Smith, M.R., Sikkema, J., de Bont, J.M.A** 1996. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Applied Microbiology and Biotechnology. 46. (3) : 279-284.

**Grobben, G.J., Chin-Joe, I., Kitzen, V.A., Boels, I.C., Sikkema, J., Smith, M.R., de Bont, J.M.A** 1998. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Applied Microbiology and Biotechnology. 64. (4) : 1333-1337.

**Hess, S.J., Roberts, R.F., Ziegler, G.R.** 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. Journal of Dairy Science. 80 : 252-263.

**Jacques, M., Foiry, B.** 1987. Electron microscopy visualization of capsular material of *Pasteurella multocida* Types A and D labeled with polycationic ferritin. Journal of Bacteriology. 169 (8) : 3470-3472.

**Jicinska, E., Erban, V., Havlova, J.** 1992. Dissociation and stability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 357 culture, with respect to sucrose-fermenting ability and exopolysaccharide production. Symbiosis. 14 : 315-324.

**Kimmel, S.A., Roberts, R.F., Ziegler, G.R.** 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. Applied and Environmental Microbiology. 64 (2) : 659-664.

**Kojic M., Vujcic M., Banina A., Coccincelli P., Cerning J., Topisirovic L.** 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. Applied and Environmental Microbiology. 58 (12) : 4086-4088.

**Kolkman, M.A.B., Morrison, D.A., van der Zeijst B.A.M., Nuijten, P.J.M.** 1996. The capsular polysaccharide synthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 : Identification of the glycosyl transferase gene cps14E. Journal of Bacteriology. 178 (13) : 3736-3741.

**Kolkman, M.A.B., van der Zeijst B.A.M., Nuijten, P.J.M.** 1997. Functional analysis of glycosyltransferases encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. Journal of Biological Chemistry. 1997. 272 (31) : 19502-19508.

**Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Favre, N., Neeser, J.R.** 1997. Structural characterisation of exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. Applied and Environmental Microbiology. 63(9) : 3512-3518.

**Llauberes, R.M., Lonvaud, A., Richard, B., Durourdieu, D.** 1987. Structure d'un B-glucan exocellulaire produit par un bactérie du vin, *Pediococcus* sp. Les polysaccharides microbiens, Colloque Paris, CNRS.

**Ludbrook, K.A., Russell, C.M., Greig, R.I.** 1997. Exopolysaccharide production from Lactic Acid Bacteria isolated from fermented food. Journal of Food Science. 62 (3) : 597-600.

**Macura, D., Townsley, P.M.** 1984. Scandinavian ropy milk - identification and characterisation of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. Journal of Dairy Science. 67 : 735-744.

**Manca De Nadra M.C., Strasser de Saad A.M., Pesce De Ruiz Holgado A.A., Oliver G.** 1985. Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft*. 40 (7) : 409-411.

**Marshall V.M.** 1987. Lactic acid bacteria : starters for flavour.. *FEMS Microbiological Review*. 46 : 327-336.

**Marshall, V.M., Cowie, E.N., Moreton, R.S.** 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*. 62 : 621-628.

**Marshall, V.M.** 1996. Bioyogurt : how healthy? *Dairy Industries International*. 61 (1) : 28-29.

**Marshall, V.M., Tamine, A.Y.** 1997. Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*. 50 (1) : 35-41.

**Morishita Takashi, Deguchi Yoriko, Yajima Masako, Sakurai Toshizo, Yura Takashi.** 1981. Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthesis pathways. *Journal of Bacteriology*. 48 (1) : 64-71.

**Mozzi F., S. De Giori G., Oliver G., F. De Valdez G.** 1994. Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*. 12 (49) : 667-670.

**Mozzi F., Oliver G., S. De Giori G., F. De Valdez G.** 1995a. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*. 50 (2) : 80-82.

**Mozzi F., S. De Giori G., Oliver G., Font De Valdez G.** 1995b. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* 1- Influence of salt. *Milchwissenschaft*. 50

(4) : 186-188.

**Mozzi F., S. De Giori G., Oliver G., Font De Valdez G.** 1995c. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* 2-Influence of carbon source. *Milchwissenschaft*. 50 (6) : 307-309.

**Mozzi F., de Giori Graciela S., Oliver G., de Valdez G. F.** 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under pH control. *Biotechnology Letters*. 18 (4) : 435-439.

**Nakajima Hajime, Toyoda Shiuji, Toba Takahiro, Takatoshi Itoh, Mukai Takao, Kitazawa Haruki, Adachi Susumu.** 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Journal of Dairy Science*. 73 : 1472-1477.

**Neve, H., Geis, A., Teuber, M.** 1988. Plasmid-encoded functions of ropY lactic acid streptococcal strains from Scandinavian fermented milk. *Biochimie*. 70 : 437-442.

**Pidoux M., Brillouet J.M., Quemener B.** 1988. Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology Letters*. 10 (60) : 415-420.

**Rasic, J.L, Kurmann, J.A.** 1978. Yoghurt-Scientific grounds, technology, manufacture and preparations. *Fermented Fresh Milk Products*. : 192-194

**Roberts Cynthia M., Fett W.F., Osman S.F., Wijey C., O'Connor J.V., Hoover D.G.** 1995. Exopolysaccharides production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of Applied Bacteriology*. 78 : 463-468.

**Robijn, G.W., Gutiérrez Gallego R., van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G.** 1996. Structural characterization of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydrate research*. 288 : 203-218.

**Roy, D.** 1996. Les probiotiques : des bactéries bienfaitantes. Diététique en action. 15-20.

**Roy, D.** 1997. Probiotics : new challenge for the next millenium. Canadian Dairy. March 2.

**Shellhaass, S.M.** 1983. Characterisation of exocellular slime produced by bacterial starter cultures used in the manufacture of fermented dairy product. .Ph.D.Thesis. University of Minnesota, St-Paul.

**Shellhaass, S.M., Morris, H.A.** 1985. Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. Food Microstructure. 4 : 279-287.

**Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Tomita, M.** 1990. Endogenous oxygen uptake and polysaccharide accumulation in Bifidobacterium. Agricultural Biology and Chemistry. 54 (11) : 2869-2874.

**Stingele, F., Neeser, J-R., Mollet, B.** 1996. Identification and characterisation of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. Journal of Bacteriology. 178 (6) : 1680-1690.

**Stephen, A.M., Churms, S.C.** 1995. Introduction. Dans : Food Polysaccharides and Their Applications. Alistair M. Stephen. Eds Marcel Dekker, Inc. pp. 1-18.

**Sutherland, I.W.** 1972. Microbial polysaccharides - Potential. Process Biochemistry. 26-30.

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

**Sutherland, I.W.** 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*. 16 : 41-46.

**Teggatz, A.Y., Morris, H.A.** 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Structure*. 9 : 133-138.

**van Kranenburg, R., Marugg, J.D., van Swam, I.I., Willwm, N.J., de Vos, W.M.** 1997. Molecular characterisation of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. 24 (2) : 387-397.

**Vedamuthu, E.R., Neville, J.M.** 1986. Involvement of a plasmid in production of ropiness (Mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986. 51 (4) : 677-682.

**Vescovo, M., Scolari, G.L., Bottazzi, V.** 1989. Plasmid-encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnology Letters*. 11 (10) : 709-712.

**von Wright, A., Tynkkynen, S.** 1987. Construction of *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* strains with a single plasmid association with mucoid phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. 53 (6) : 1385-1386.

**Yokoi H, Watanabe T.** 1992. Optimum culture conditions for production of Kefiran by *Lactobacillus* sp. Kpb-167B. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75 (5) : 327-329.

**Yokoi Haruhiko, Watanabe Takashi, Fujii Yoshitsugu, Toba Takahiro, Adachi Susumu.** 1990. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from Kefir grains. *Journal of Dairy Science*. 73 : 1684-1689.

## Annexe A

### Composition du milieu de croissance BMM pour la production d'EPS

(Morishita *et al.*, 1981)

#### Ingrédients

	<u>g/l</u>
<b><u>Sels</u></b>	
MnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,5
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,02
Sodium acetate	6
Ammonium citrate	1
KH <sub>2</sub> PO	3
K <sub>2</sub> HPO	3
MgS <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,5
<b><u>Acides aminés</u></b>	
L-Tyrosine	0,1
L-Arginine	0,1
L-Aspartic acid	0,2
L-Cysteine	0,2
L-Glutamic acid	0,2
L-Isoleucine	0,1
L-Leucine	0,1
L-Lysine	0,1
L-Methionine	0,1
L-Phénylalanine	0,1
L-Serine	0,1
L-Thréonine	0,1
L-Tryptophane	0,1
L-Valine	0,1
Tween 80	1 ml
<b><u>Solution de vitamines</u></b>	
Acide Folique	0,01
Acide nicotinique	0,1
Acide pantothénique	0,1
Pyridoxal	0,2
Riboflavine	0,1

## Annexe B

**Tableau 1** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M cultivée à 37°C dans le glucose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Glucose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	8	0	5.84 E+07	0,1	17,9	0
12	115	55	5.77 E+08	1,503	15,4	4,4
15	661	131	3.81 E+09	5,613	4	14,6
21	855	167	6.42 E+09	5,737	0	16,5
24	770	107	5.00 E+09	5,237	0	16,1
36	933	96	1.53 E+09	5,013	0	16,9
48	787	109	8.38 E+08	4,84	0	16,2
60	848	96	7.88 E+08	4,91	0	16,3
72	923	21	2.30 E+08	4,32	0	15,9

**Tableau 2** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M cultivée à 37°C dans le lactose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Lactose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	10	1	4.27 E+07	0,1	15,8	0
12	42	23	1.38 E+08	0,6	15,4	2,1
15	122	71	1.36 E+09	2,26	12,9	5,3
21	694	70	5.73 E+09	5,75	4,6	15,8
24	969	121	5.68 E+09	5,54	0,4	16,2
36	1031	194	2.96 E+09	5,28	0	16,1
48	780	301	1.00 E+09	5,22	0	15,9
60	1195	165	1.24 E+08	5,29	0	15,9
72	995	12	1.16 E+08	4,4	0	15,9

**Tableau 3** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M cultivée à 32°C dans le glucose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Glucose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	13	0	3.70 E+07	0,1	18	0
12	37	10	9.58 E+08	1,07	14,6	5,1
18	379	168	4.63 E+09	3,81	5	12,8
24	978	176	6.38 E+09	3,74	0	15,7
27	979	151	6.68 E+09	3,94	0	16
36	1044	106	6.50 E+09	3,68	0	16
48	1138	89	2.62 E+09	3,09	0	16
60	327	223	3.49 E+09	2,98	0	15,8
72	112	11	1.76 E+09	2,41	0	15,5

**Tableau 4** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595M cultivée à 32°C dans le lactose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Lactose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	12	1	2.33 E+07	0,1	15,6	0
12	42	30	3.72 E+08	0,65	14,6	2,1
18	59	23	3.97 E+09	2,29	12,4	4,6
24	868	125	1.88 E+09	4,24	5,7	11,4
27	784	245	5.38 E+09	5,25	1,9	15,1
36	1179	44	6.75 E+09	4,47	0	16,1
48	1275	41	8.45 E+09	4,28	0	16,4
60	863	66	6.23 E+09	4,05	0	16,1
72	1033	74	3.97 E+09	3,73	0	15,9

**Tableau 5** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* Rosell cultivée à 37°C dans le glucose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Glucose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	13	5	7.80 E+08	0,1	15,2	0
12	24	9	1.19 E+08	0,33	15,2	2,3
15	39	3	1.15 E+09	0,85	12,8	5,6
21	128	76	2.07 E+09	3,69	5,9	12,5
24	267	106	2.55 E+09	4,05	0,8	16,3
36	438	45	1.85 E+09	3,99	0	16,4
48	387	160	9.13 E+08	3,4	0	16,2
60	119	57	9.60 E+08	3,26	0	16,7
72	338	20	6.41 E+08	3,21	0	16,8

**Tableau 6** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* Rosell cultivée à 37°C dans le lactose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Lactose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	8	0	3.13 E+07	0,1	16,4	0
12	18	6	1.17 E+08	0	14,5	2,1
15	15	4	6.57 E+08	1,81	11,1	5,4
21	405	16	1.72 E+09	3,47	3,2	14,6
24	495	33	2.40 E+09	4,8	0,7	16,8
36	426	34	1.80 E+09	5,18	0	17,1
48	88	10	1.04 E+09	4,55	0	16,9
60	64	6	9.50 E+07	3,75	0	17
72	61	6	1.43 E+08	3,04	0	17

**Tableau 7** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* Rosell cultivée à 32°C dans le glucose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Glucose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	7	1	2.71 E+07	0,1	18,2	0
12	15	2	2.99 E+08	0,72	17,2	2,9
18	29	10	1.29 E+09	1,86	13,6	6,2
24	215	89	3.95 E+09	4,86	7,9	12,3
27	498	88	3.98 E+09	5,35	1,5	15,5
36	443	83	5.30 E+09	4,96	0	16,5
48	350	164	3.00 E+09	4,22	0	16,7
60	338	185	2.42 E+09	3,04	0	16,6
72	264	88	1.46 E+09	2,25	0	16,6

**Tableau 8** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. rhamnosus* Rosell cultivée à 32°C dans le lactose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Lactose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	8	0	2.33 E+07	0,1	16,6	0
12	29	11	1.93 E+08	0,53	15	2,2
18	118	28	7.77 E+08	1,54	12,6	4,5
24	245	119	3.33 E+08	3,94	5,6	11,9
27	601	153	2.41 E+09	4,6	1,9	15,8
36	588	39	2.43 E+09	4,77	0	16,9
48	464	24	2.33 E+09	4,28	0	16,6
60	302	122	1.22 E+09	4,19	0	16,8
72	258	129	4.52 E+08	3,2	0	16,8

**Tableau 9** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. casei* Type V cultivée à 37°C dans le glucose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Glucose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	7	1	9.00 E+06	0,1	18	0
12	20	6	3.03 E+08	0,55	16,3	3,1
15	27	7	4.98 E+08	0,73	13,6	4,6
21	39	10	9.70 E+08	1,05	13,3	6,3
24	60	27	1.03 E+09	1,23	12,7	7,1
36	65	20	1.82 E+09	1,69	8,9	11,2
48	87	31	2.27 E+09	2,31	3,5	16,7
60	93	36	1.86 E+09	2,18	0	17,7
72	78	22	5.40 E+08	2	0	17,8

**Tableau 10** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. casei* Type V cultivée à 37°C dans le lactose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Lactose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	9	1	1.59 E+07	0,1	16,7	0
12	12	2	1.14 E+08	0,44	15,5	2,3
15	21	5	2.98 E+08	0,68	14,4	3,5
21	18	1	4.98 E+08	0,86	13,1	4,8
24	23	3	6.77 E+08	1,49	12,5	5,6
36	42	7	2.80 E+09	1,92	6,5	11,1
48	67	6	2.47 E+09	3,19	1,7	16,3
60	59	5	1.42 E+09	3,41	0	17,5
72	87	6	1.20 E+09	3,15	0	17,4

**Tableau 11** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C dans le glucose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Glucose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	9	1	1.57 E+07	0,1	18,1	0
12	29	7	4.92 E+08	0,55	15,9	2,3
18	25	6	8.35 E+08	0,69	16,2	2,9
24	38	11	1.06 E+09	0,77	15,2	3,8
27	39	10	1.36 E+09	0,9	15,2	4,3
36	39	7	1.80 E+09	1,11	13,1	5,8
48	62	18	2.87 E+09	1,43	10,1	8,1
60	85	36	2.17 E+09	1,92	6,4	10,5
72	73	22	2.52 E+09	2,12	2,7	12,9

**Tableau 12** : Moyennes des résultats des fermentations de *Lb. casei* Type V cultivée à 32°C dans le lactose

Temps (hrs)	EPS (mg/l)	erreur	CFU	D.O.	Lactose (g/l)	Ac. lactique (g/l)
0	8	0	1.17 E+07	0,1	15,9	0
12	14	2	1.68 E+08	0,71	14,7	2,3
18	15	1	3.20 E+08	1,15	13,6	2,7
24	29	3	5.68 E+08	1,14	12,9	3,8
27	24	5	1.33 E+09	1,3	12,4	4,2
36	30	4	1.51 E+09	2,33	10,1	6,4
48	54	17	2.89 E+09	4,48	4,3	12,2
60	78	12	3.43 E+09	4,97	0	17,1
72	85	16	3.47 E+09	4,93	0	17,5