

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Sciences Biologiques"

Spécialité: "microbiologie appliqué à l'environnement"

Présenté et soutenu publiquement par :

1-Ahsene Sofia

Thème

**Optimisation de la production d'un métabolite bactérien
d'intérêt technologique**

JURY:

Président: M^r.YEZLY,W MAA Université de Tiaret

Promoteur: M^{me}. KHADEM, H MAB Université de Tiaret

Examineur: M^{lle}.MEDHBER MAA Université de Tiaret

Co-promoteur : M^{lle} BOUBAKEUR , B MAA Université de Tiaret

Année universitaire: 2014 -2015

Remerciements

Avant toute , je remercie ALLAH, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

*Je tiens particulièrement à remercier ma promotrice Madame **KHADEM.HAFIDA**, et co-promotrice Madame **BOUBAKEUR.BADRA** pour leurs conseils, leurs commentaires et leurs bienveillances . Qu'elles soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire. leurs dynamismes pour la recherche des produits naturels ont été pour moi une source de motivation.*

*Je tiens à remercier Mlle **MEDJBER** et ms.**YEZLI**, des enseignements à université Ibin Kfaldoun de Tiaret. pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner ce travail.*

J'adresse mes remerciements aussi à tous les ingénieurs de laboratoire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Tiaret .

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail

Aux joyaux de ma vie « mes chères parents » qui sont la source de ma réussite, je souhaite qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible témoignage de leurs efforts et sacrifices

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

A mes très chères frères mohamad et djamal

A mes très chères sœurs mona, kira.souad.djawhar, et nassira

A mes nièces et mes neveux.maya,soulaf, chahade, imane,

aya,amine,hanae,midou,youcef,safia,rania,haytham

A tous mes amies et mes collègues.

LISTE DES TABLEAUX

LISTES DES FIGURES

SOMMAIRE

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Bactéries lactiques et métabolites d'intérêt

I. Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	03
II. Probiotiques et prebiotiques	03
III. Polysaccharides microbiens.....	04
IV. Biosynthèse des PPE par les bactéries lactiques	04
IV.1. La synthèse des homopolysaccharides en dehors de la cellule	04
IV.2. La synthèse des hétéropolysaccharides à la membrane cellulaire.....	06
V. Facteurs influençant la production d’PPE.....	07
VI. Fonctionnalité des PPE.....	09
VI.1. Fonctionnalité technologique.....	09
VI.2. Fonctionnalité physiologique.....	10
VI.3. Diminution du taux de cholestérol dans le sang.....	11
VI.4. Effet prébiotique des PPE.....	11
V.5. Effet anticancéreux des PPE.....	11

CHAPITRE I: MATERIELS ET METHODES

I. Objectif du travail.....	13
II. Lieu du travail.....	13
III. Protocole expérimental.....	14
IV. Matériels utilisés	15
IV.1. Matériel biologique.....	15
IV.1.1. souches bactériennes.....	15
IV.2. Appareillage et produits chimiques.....	15
V-Méthodes et techniques.....	16
V.1. confirmation de l'espèce « Coloration de Gram ».....	16
V.2. Optimisation des paramètres de production des PPE.....	16
V.2.1. vérification de la production des PPE par <i>S.thermophilus</i> sur milieu solide.....	16
V.2.2. Optimisation des paramètres de production	16
V.2.2.1. Optimisation de l'inoculum	17
V.2.2.2. Optimisation du milieu de production.....	17
V.2.2.3. Optimisation PH	17
V.2.2.4. Optimisation Température.....	17
V.2.2.5. Optimisation Durée d'incubation.....	17
V.2.2.6. Optimisation Taux d'oxygène.....	18
V.2.2.7. Optimisation du Rapport C/N	18
VI.3.Estimation du rendement en PPE.....	18
VI.1.Extraction des PPE.....	18
VI.2. Dosage et quantification des PPE.....	19

CHAPITRE II : RESULTAT ET DISCUSSION

I. Résultats de l'étude bactériologique.....	20
I.1. Confirmation l'espèce	20
I.2 .vérification de la production des PPE par <i>S.thermophilus</i> sur milieu solide.....	20
I.2. Résultats de l'optimisation des paramètres de production des PPE.....	21
I.2.1. Milieu de production.....	22
I.2.2 Inoculum.....	23
I.2.3. pH	24
I.2.4. Température	25
I.2.5. Durée d'incubation	26
I.2.6. Conditions d'aéro/anaerobiose	27
I.2.7. Rapport C/N	28
II. La production final d'PPE.....	28
CONCLUSION.....	29
Références bibliographiques.....	30
Annexe	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°01 : Exemples d'homopolysaccharides produits par des bactéries lactiques	05
Tableau N°02 : Hétéropolysaccharides des bactéries lactiques	07
Tableau N°03 : Réactifs et appareillages utilisés.....	15
Tableau N°04 : Résultats de l'aspect morphologique de <i>streptococcus thermophilus</i>	20
Tableau N°05 : conditions physico-chimique et organique optimales de la production d'PPE.....	28

LISTE DES FIGURES

Figure N°01 : Voie de biosynthèse des hétéropolysaccharides chez les bactéries lactique.....	08
Figure N°02 : Représentation schématique des potentiels effets bénéfiques sur la santé des PPE produits par des bactéries lactiques	10
Figure N°03: Production d'PPE par <i>S.thermophilus</i> en milieu MRS additionné de colorant violet de gentiane.....	21
Figure N°03 : Etapes essentielles du protocole expérimental.....	14
Figure N°04 : Optimisation du milieu de production d'PPE	22
Figure N°05 : Optimisation de l'inoculum pour la production des PPE.....	23
Figure N°06 : Optimisation de pH de production	24
Figure N°07 : Optimisation de la température de production	25
Figure N°08 : Optimisation de la durée d'incubation.....	26
Figure N°09 : Optimisation des conditions d'aéro/ anaérobiose.....	27
Figure N°10 : Optimisation du rapport C/N pour la production des PPE	28

Introduction

L'homme a vécu depuis des millénaires, pour se nourrir, se vêtir et se loger dans des conditions souvent difficiles, grâce aux plantes, aux animaux et sans le savoir aux microorganismes; Ces derniers sont actuellement très largement utilisés comme auxiliaire technologique dans les industries alimentaires (**Corrieu et al, 2008**).

Le groupe des bactéries lactiques dont les probiotiques sont d'une importance technologique et industrielle considérable, elles sont capables de transformer des matières premières très diverses, soit d'origine animale (laits, viandes, poissons), soit d'origine végétale (fruits, légumes, céréales) ce qui abouti à une grande diversité de produits comme les fromages, les laits fermentés, les produits carnés et les végétaux fermentés, les pains au levain et certains vins (**Carl et al, 1999**). Ces micro-organismes ont également des applications non alimentaires importantes dans les domaines médical (traitement de dysfonctionnement intestinaux) et pharmaceutiques (production de médicaments à base de sels d'acide lactique) et dans l'industrie chimique (production d'acide lactique) (**Corrieu et al, 2008**).

Par ailleurs, du fait de leur innocuité certaine de ces bactéries constituent de bonnes candidates pour de futures applications dans le domaine médical : production d'antimicrobiens et de protéines hétérologues, vecteurs de vaccins (**Corrieu et al, 2008**).

Autre l'acide lactique ces bactéries produisent un métabolite d'intérêt technologique possédant des propriétés rhéologiques particulières appelé polymères de polysaccharides externes (PPE), permettant d'améliorer la texture des produits fermentés, ce métabolite pourraient échapper à la digestion de la partie haute du système gastro-intestinal et atteindre le côlon sous sa forme native et exercer ainsi une action prébiotique au niveau de la microflore colique (**Ruas-Madiedo et al, 2002**).

Cependant, on constate que son production par les bactéries lactiques est faible, elle est souche dépendante et varie aussi selon les conditions de croissance (**Bergamier, 2002**).

Introduction

L'objectif de cette étude est d'optimiser les conditions physicochimiques et organiques de production des PPE de « *Streptococcus thermophilus* » et de déterminer le rendement de production finale.

Le corps de cette étude est composé de trois parties, la première donne une vue d'ensemble des connaissances actuelles sur les bactéries lactiques, leurs métabolites d'intérêt technologique, la seconde résume les méthodes et les techniques adoptées pour réaliser ce travail et la troisième expose les résultats obtenus et leurs interprétations.

Finalement, une conclusion générale intègre les résultats les plus pertinents et présente les perspectives pour des travaux futurs.

Partie bibliographique

bactérie lactique et métabolites d'intérêt

I. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent de nombreuses espèces très différentes les unes des autres mais qui ont toutes en commun de produire majoritairement de l'acide lactique à partir des sucres. Ce processus de fermentation est qualifié d'homoférentaire si l'acide lactique représente le seul métabolite produit ou d'hétéroférentaire si la fermentation des hexoses produit d'autres métabolites comme le CO₂, l'acétate ou l'éthanol, elles sont anaérobies, micro-aérophiles ou aéro-tolérantes et ont, en outre pour caractéristiques communes d'être Gram-positives et catalase négative (**Mozzi et al, 2010**).

Sous l'appellation « bactéries lactiques » sont regroupés les genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Tetragenococcus* et *Carnobacterium*, (appartenant à l'ordre des Lactobacillales, contenu de l'ADN en G +C < 50%) et le genre *Bifidobacterium*. Ces différentes bactéries sont généralement non mobiles, non sporulantes et très rarement pathogènes.

Elles possèdent en effet un statut GRAS qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires et qui témoigne de leur parfaite innocuité. Elles sont utilisées pour la préservation des aliments ainsi que pour l'amélioration de leurs qualités structurelles et organoleptiques. Cependant, peu entre elles survivent au passage du tractus intestinal. Elles habitent différentes niches écologiques telles que les produits laitiers et carnés, les végétaux, les muqueuses de l'homme et des animaux) (**Effie, 2011**).

II. Probiotiques et prébiotiques

Les effets bénéfiques des bactéries lactiques pour la santé du consommateur sont reconnus depuis longtemps. Déjà, le zoologiste et microbiologiste Ukrainien Ilya Ilitch Metchnikov (**1845-1916**) a mis en rapport la longévité de certains peuples, dont les Bulgares, et la protection de l'organisme contre plusieurs maladies par la consommation de laits fermentés et ainsi l'indigestion de grandes quantités de bactéries lactiques. Aujourd'hui, l'incorporation des bactéries dites probiotiques dans l'alimentation humaine a conduit à l'apparition de nouveaux produits laitiers dont certains ont un succès considérable sur le marché.

Bactéries lactiques et métabolites d'intérêt

Les probiotiques sont des micro-organismes (bactéries ou levures) qui, ingérés vivants en quantités suffisantes, sont capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Tandis que les **prébiotiques** sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de façon sélective la multiplication d'une flore intestinales au niveau du colon ou l'activité d'un nombre limité de groupes de bactéries susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte (**Gibson et al, 1995**).

III. Polysaccharides microbiens

La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides incluant les polysaccharides intracellulaires servant généralement de réserves métaboliques (glycogène), les polysaccharides structuraux participant à l'architecture de la paroi cellulaire (lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycanes, acides téichoïques) et les polysaccharides extracellulaires offrant notamment un rôle de protection à la bactérie vis-à-vis de l'environnement dans lequel elle évolue et contribuant à la virulence des bactéries pathogènes ; Ces bactéries (LAB) sont reconnues comme GRAS, ce qui rend leurs PPE très intéressants pour l'industrie agroalimentaire (**De Vuyst et al, 2001**).

IV. Biosynthèse des PEP par les bactéries lactiques

Elles produisent deux types d'PPE, les homo et les hétéropolysaccharides, d'une masse moléculaire qui varie de 4.10^4 à 6.10^6 Da (**De Vuyst et al, 1998**), cette capacité est considérée comme une particularité importante car elle améliore le développement de la texture dans les aliments laitiers fermentés, par exemple les hétéropolysaccharides sont les plus communément associés au yaourt a raison de leur production *par lactobacillus delbreuchii* subsp *bulgaricus* et *streptococcus thermophilus* (**Hui et al, 2004**).

Le site de la synthèse des PPE et la nature des précurseurs permettent de distinguer deux types principaux de biosynthèse par les LAB.

IV.1. La synthèse des homopolysaccharides en dehors de la cellule

Les homopolysaccharides sont synthétisés en dehors de la cellule grâce à des enzymes excrétés par la bactérie. La plus part sont synthétisés a partir du sucrose grâce a une enzyme appelée glycane sucrase (**Coutinho et Henrissat, 1999**), mais récemment il a été rapporté que les β -glucanes produits par les LAB

Bactéries lactiques et métabolites d'intérêt

sont synthétisés par une glycosyle transférase dont le mécanisme est encore mal connu. Dans la production du dextrane, par exemple, seulement une enzyme est utilisée, la dextrane sucrase, cette enzyme est spécifique pour le sucrose et l'énergie pour la polymérisation vient de son hydrolyse (**Cerning, 1990**).

Le tableau suivant regroupe quelques homopolysaccharides produits par les bactéries lactiques.

Tableau N° 01 : Exemples d'homopolysaccharides produits par des bactéries lactiques (**Ruas-Madiedo et al, 2002**).

EPS	Souche productrice	Liaison
α-D-glucanes	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides</i>	α -D-Glcp (1-6)
Dextrane	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>	
	<i>Streptococcus mutans</i>	
Mutane	<i>Streptococcus sobrinus</i>	α -D-Glcp (1-3)
Alternane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -D-Glcp(1-3)/(1-6)
β-D-glucanes	<i>Pediococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i>	β -D-Glcp (1-3)
Fructanes		
Levanes	<i>Streptococcus salivarius</i>	β -D-Frup (2-6)
Inuline	<i>Streptococcus mutans</i>	β -D-Frup (2-1)
Polygalactane	<i>L. lactis subsp. lactis</i> H414	α -D-Galp/ β -DGalp

IV.2. La synthèse des hétéropolysaccharides à la membrane cellulaire

La synthèse des hétéropolysaccharides, par contre, a lieu au niveau de membrane cytoplasmique. L'PPE est construit par polymérisation des unités répétitives formées dans le cytoplasme (**Cerning, 1990; De Vuyst et Degeest, 1999b**). L'unité répétitive est assemblée à la membrane cytoplasmique par addition successive d'unités glucosyle au polysaccharide naissant qui est probablement ancré sur un transporteur lipidique, nommé C55. Après complétion de l'unité répétitive, celle-ci est transportée au travers de la membrane cellulaire et polymérisée à l'extérieur de la cellule pour former l'hétéropolysaccharide, avec un poids moléculaire finale élevé d'environ $1 \cdot 10^6$ Da.

Les hétéropolysaccharides sont produits par des bactéries lactiques mésophiles (ex. *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. casei*) et thermophiles (ex. *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus*). Les thermophiles produisent des PPE composés de glucose, galactose, rhamnose et parfois des résidus de N-acétylglucose amine, la synthèse est relativement instable est liée à des chromosomes, les quantités produite dépendent de l'espèce, elles varient de 50 à 350 mg/L et de 60 à 425 mg/L pour *S.thermophilus* et *L. delbreuchii subsp bulgaricus* respectivement (**Hui et al, 2004**).

Le tableau si dessous résume certains hétéropolysaccharides produits par des LAB.

Bactéries lactiques et métabolites d'intérêt

Tableau N°02 : Hétéropolysaccharides des bactéries lactiques ((Ruas-Madiedo et al, 2002).

	Unités répétitives	References
Lactobacillus <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 291		Faber, Kamerling, and Vliegenthart (2001)
<i>Lb. helveticus</i> Lb161		Staaft et al. (2000)
<i>Lb. helveticus</i> K16		Yang et al. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> C83		Vanhaverbeke et al. (1998)
Streptococcus <i>S. macedonius</i> Sc136		Vincent et al. (2001)
<i>S. thermophilus</i> SFi 20		Navarini et al. (2001)
<i>S. thermophilus</i> Rs <i>S. thermophilus</i> Sts		Faber et al. (1998)
<i>S. thermophilus</i> MR-1C		Low et al. (1998)
<i>S. thermophilus</i> S3		Faber, van den Haak, Kamerling, and Vliegenthart (2001)
<i>S. thermophilus</i> 8S ^b		Faber (2000)
<i>S. thermophilus</i> EU20		Marshall et al. (2001)
Lactococcus <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B39		van Casteren, Dijkema, Schols, Beldman, and Voragen (2000)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B891		van Casteren, de Waard, Dijkema, Schols, and Voragen (2000)

β -D-glucose

α -D-glucose

β -D-galactose

α -D-galactose

β -L-rhamnose

α -L-rhamnose

(Rib) D-ribose

(Fuc) fructose

(Nac) N-acetyl

(Ac) acetyl

(G) glycerol

Sug: 6-O (3, 9-dideoxy-D-altro-nononic acid-2-yl)- α -D-glucopyranose

Bactéries lactiques et métabolites d'intérêt

La synthèse des hétéropolysaccharides par des LAB implique donc un grand nombre d'enzymes différentes comme, par exemple, l'UDP-glucose déshydrogénase, la glucosyl-transférase et la galactosyl-transférase. Plusieurs de ces enzymes ne sont pas seulement actives dans la synthèse des PPE, mais aussi impliquées dans d'autres activités métaboliques.

La figure suivante montre les voies métaboliques impliquées dans le catabolisme des sucres et dans l'anabolisme des PPE chez certaines bactéries lactiques.

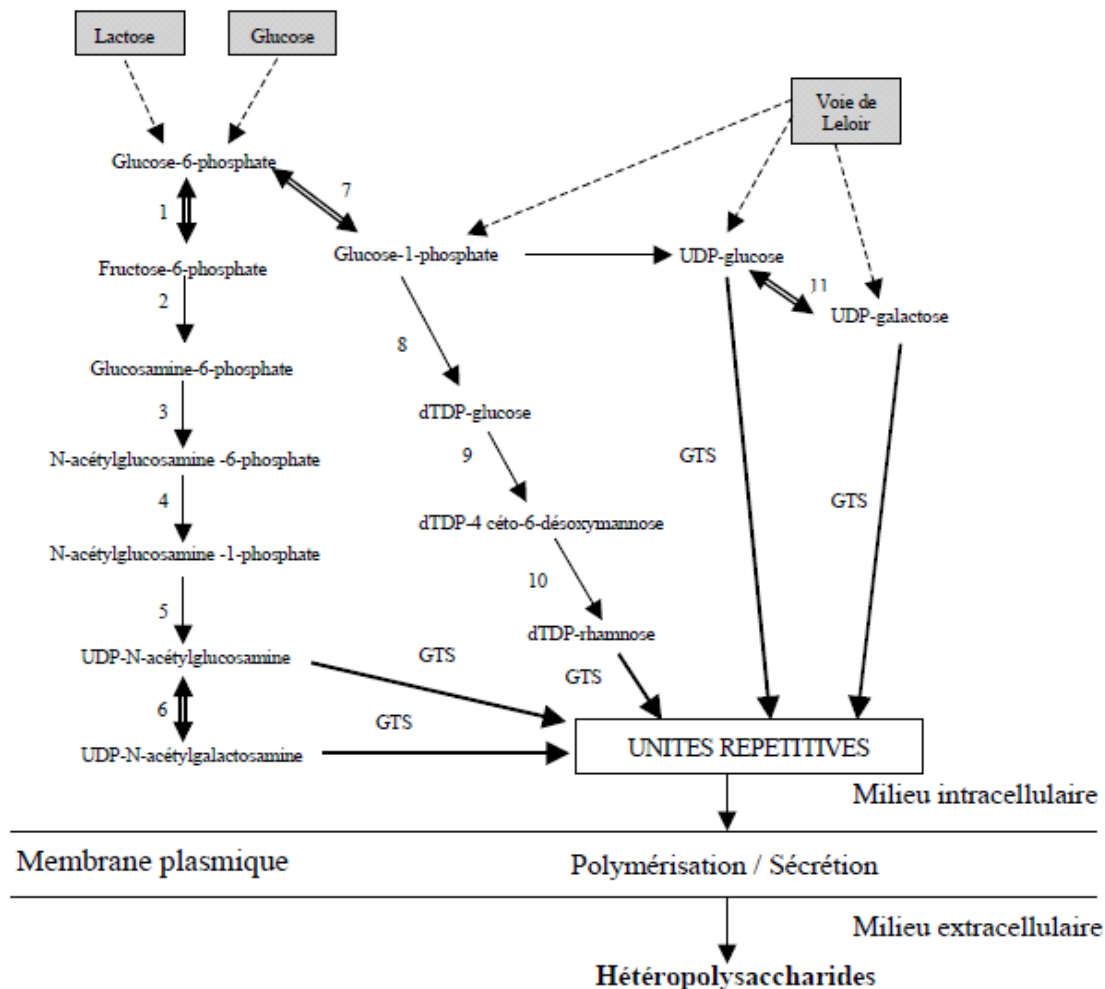


Figure N°01 : Voie de biosynthèse des hétéropolysaccharides chez les bactéries lactique (DeVuyst et al, 2001).

V. Facteurs influençant la production d'PPE

La production des PPE est étroitement liée à la concentration, la nature et la proportion des nutriments dans le milieu de culture. Chez *L. bulgaricus* la croissance et la synthèse de ce polymère sont stimulées par l'ajout de caséines hydrolysées dans le lait (Cerning et al, 1995).

La source d'azote est un paramètre important dans la production des PPE. Dans un milieu à base de perméat de lactosérum, l'ajout d'un concentré de protéines de lactosérum, favorise la production par *Lb. Rhamnosus* RW-9595M (Bergamier, 2002).

La nature de la source de carbone influence la composition et le poids moléculaire du polymère formé. *Lb. Casei* CG11 produit plus de PPE lorsque le glucose est ajouté au lait, en plus la composition en monomères change lorsque le glucose est utilisé comme monosaccharide majoritaire que le galactose. Chez *Lb. Casei* CRL87, le meilleur rendement en PPE est abouti lorsque le galactose est utilisé comme source de carbone (Steinbuchel, 2005).

La production en PPE est d'autre part, dépendante de la concentration dans le milieu des minéraux, acides aminés et vitamines. Mozzi et al, (1995) ont observé qu'un ajout de Mn^{2+} dans un milieu défini permettait de doubler la production par *Lb. casei* CRL7. L'absence d'un ou plusieurs acides aminés n'a pas d'effet sur la synthèse d'EPS par *Lb. bulgaricus* NCFB 2772 (Grobber et al, 1998).

VI. Fonctionnalité des PPE

VI.1. Fonctionnalité technologique

La fermeté, la consistance et la capacité de rétention d'eau sont des caractéristiques importantes dans beaucoup de produits laitiers comme le yaourt, le fromage et les laits fermentés. Elles sont fortement influencées par le ferment utilisé. Ainsi, on constate que des yaourts faits avec des cultures productrices d'PPE montrent une rétention d'eau accrue et une susceptibilité diminuée envers la synérèse (Wacher-Rodarte et al, 1993).

VI.2. Fonctionnalité physiologique

L'effet sur la santé des LAB produisant des PPE est attribuable aux activités biologiques de ce biopolymère. Les PPE pourraient contribuer à la santé humaine comme prébiotique ou grâce à leurs propriétés anti-tumorales, antivirales, anti-cancérigènes et immunomodulatrices (De Vuyst *al*, 1999). La figure ci-dessous résume les effets bénéfiques des PPE.

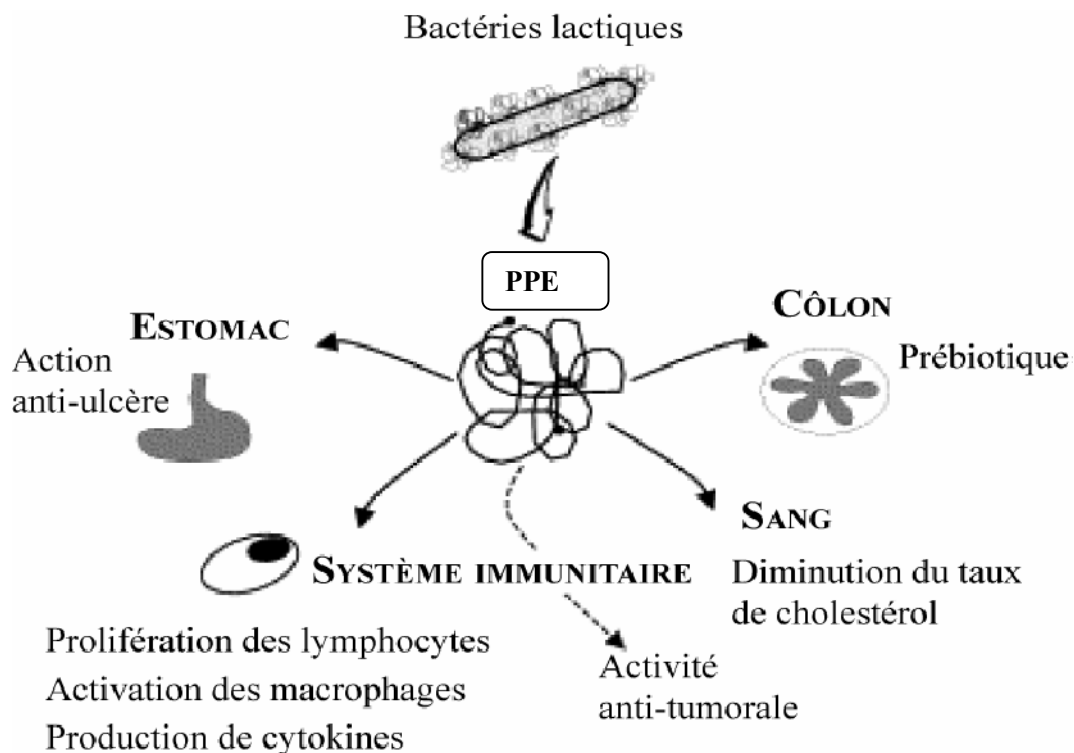


Figure N°02 : Représentation schématique des potentiels effets bénéfiques sur la santé des PPE produits par des bactéries lactiques (De Vuyst *al*, 1999)

Les PPE des LAB à grade alimentaire (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*) ont été testés pour leurs propriétés immunostimulatrices, par exemple le polymère produit par *Lb. rhamnosus* RW-9595M a été testé *in vitro* pour ses propriétés immunomodulatrices sur des cellules de souris et humaines, les auteurs montrent une stimulation de la production de TNF, IL-6 et IL-12 des cellules humaines et des souris et d'IFN- γ de splénocytes des souris. Ces résultats suggèrent

la possibilité de stimuler le système immunitaire par l'PPE des LAB, chez les individus sensibles à un tel stimulus (**Chabot et al. 2001**).

VI.3. Diminution du taux de cholestérol dans le sang

L'PPE produit par *L. Lactis spp. cremoris* SBT 0495 a provoqué une diminution du taux de cholestérol chez des rats ayant consommé du lait fermenté par cette souche, comparé à d'autres rats nourris par un lait non fermenté, en effet le rapport HDLc /cholestérol total était plus élevé chez les premiers (**Nakajima et al, 1992**).

VI.4. Effet prébiotique des EPS

La susceptibilité à la digestion pourrait être une caractéristique importante pour le rôle possible d'un PPE comme prébiotique, car, comme déjà mentionné, une des caractéristiques d'un prébiotique est sa non-digestibilité par l'humain.

Lors d'une étude de biodégradabilité des PPE par des microorganismes gastro intestinaux humains, les PPE produit par *S. thermophilus* SFi39 et SFi12 ont été dégradés contrairement à ceux produits par *Lb. sake* 0-1, *S. thermophilus* SFi20 et *Lb. helveticus* Lh59 (**Ruijssenaars et al, 2000**).

V.5. Effet anticancéreux des PPE

Plusieurs études ont proposé que les PPE ont une activité anti-cancérogène. **Kitazawa et al, (1991)** ont postulé que le polymère produit par *L. lactis spp. cremoris* KVS 20 est responsable d'un effet anti-tumoral. Ceci a été observé lors d'injections intrapéritonéales chez des souris. Dans une étude subséquente, **Kitazawa et ses collaborateurs, (1996)** ont attribué à un exophosphopolysaccharide produit par cette souche une activation des macrophages et l'induction de la production de cytokine.

Un effet anti-cancérogène a été montré in vitro et in vivo pour les polysaccharides capsulaires de *Bifidobacterium breve* YIT4014, 4043 et *Bifidobacterium bifidum* YIT 4007 (**Nagaoka et al, 1994**). Ces polysaccharides étaient composés principalement de rhamnose. Il a été montré que les

Bactéries lactiques et métabolites d'intérêt

polysaccharides contenant plus de 60% de rhamnose se sont montrés plus efficaces pour le traitement du cancer gastro-intestinal.

Partie expérimentale

Chapitre I

Materiels et methodes

I. Objectif du travail

Le but de cette étude visait à améliorer la production d'un métabolite bactérien d'intérêt technologique « PPE » et ce ci en optimisant les paramètres physicochimiques (PH, température, durée d'incubation, le taux d'oxygène) et organiques (milieu de culture, le rapport Carbone /azote) et la taille de l'inoculum.

II. Lieu du travail

La réalisation de cette étude a été accomplie sur une période de deux mois (20 Avril au 18 juin de l'année 2015) au sein des Laboratoires de Microbiologie et de Technologie Alimentaire et le laboratoire de recherche « Amélioration et valorisation des productions animales locales» de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn-Khaldoun de Tiaret.

III. Protocole expérimental

La figure N°03 illustre l'ensemble des étapes du protocole expérimental réalisé.

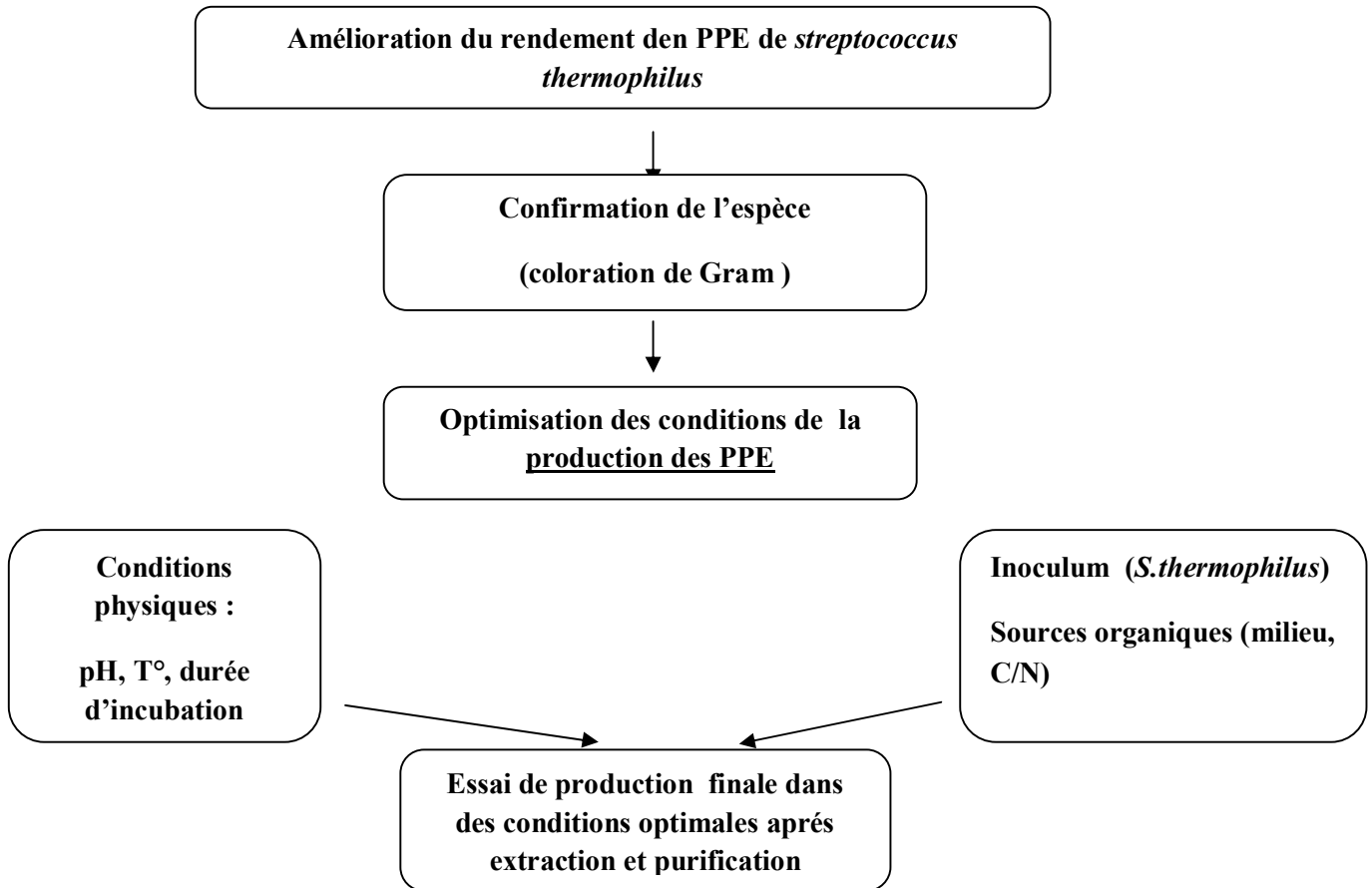


Figure N°03 : Etapes essentielles du protocole expérimental

IV. Matériels utilisés

IV.1. Matériel biologique

IV.1.1. souches bactériennes

La souche bactérienne utilisée dans cette étude est l'espèce *Streptococcus thermophilus* sous forme lyophilisée (CNRZ: 447) de provenance de France.

IV.1.2. Appareillage et produits chimiques

Le matériel utilisé ainsi que les produits chimiques sont regroupés dans le tableau ci dessous.

Tableau N°03 : Réactifs et appareillages utilisés

Appareillage	Milieux de cultures	Produits chimiques
- Autoclave	- Bouillon nutritive	-Acide acétique(CH ₃ COOH)
- Agitateur	- Gélose nutritive	-Méthanol (CH ₃ OH)
- Bain marie	- MRS(liquide)	-Violet de gentiane
- Balance	- MRS(gélose)	-Chlore de sodium (NaCl)
- Bec bunsen	- M ₁₇ (liquid)	-Hcl
- Centrifugeuse	- M ₁₇ (gélose)	-Nacl
- Etuve	- Agar	-NaHpo ₄
- pH-mètre	-milieu hypersaccharosé	.KHpo ₄
- Plaque chauffante		-Kcl
- Spectrophotomètre		

V-Méthodes et techniques

V.1. confirmation de l'espèce « Coloration de Gram »: voir annexe N°01

V.2. Optimisation des paramètres de production des PPE

V.2.1. vérification de la production des PPE par *S.thermophilus* sur milieu solide.

Il est possible de sélectionner des clones bactériens producteurs de PPE, 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.

Cette technique consiste à incorporer dans le milieu MRS solide, un colorant cationique (le violet de Gentiane à 0.02 %). Après ensemencement, les boîtes Pétri sont incubées à 44C° pendant 48h, les colonies Muc+ apparaissent blanches sur fond violet par le masquage de la couleur du aux polysaccharides produits. Les clones Muc – apparaissent en rosés (**benasla.A, 2012**).

V.2.2. Optimisation des paramètres de production

L'optimisation est une étape qui permet d'évaluer le taux de la production en fonction des différentes conditions de la culture. Elle consiste à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constantes (**larpent et Sanglier, 1989**).

Selon **DeVuyst et al, (1998)**, la cinétique de production des PPE et leur rendement dépendent fortement des conditions de fermentation, et des paramètres physicochimiques (pH, température, durée d'incubation, taux d'oxygène, la composition du milieu et le rapport C/N).

V.2.2.1. Optimisation de l'inoculum

Selon **Larpent et Sanglier (1989)**, le succès de toute expérience et de toute production dépend de la quantité de l'inoculum. En effet, on fait varier le nombre de bactéries entre 10^5 à 10^8 dont l'incubation se fait à 44°C pendant 24 h.

NB :le milieu de culture utilisé est le M₁₇ liquide.

V.2.2.2. Optimisation du milieu de production

Afin de choisir le milieu le plus convenable à la production des PPE, trois milieux ont été testés : MRS, M17 et le milieu hypersaccharosé.

V.2.3. PH

L'optimisation des facteurs physico-chimiques s'effectue à des valeurs optimales de l'inoculum.

Le pH du milieu de culture est de 5 à 6.5. Afin de déterminer l'effet du pH sur la production, le rendement été calculé à pH 3.5, 4.5, 5.5 6.5. L'incubation se fait à 44°C pendant 24 h (**Kimmel et al, 1998**).

V.2.4.Température

La température optimale correspondante au meilleur rendement en PPE sera définie en incubant les cultures à différentes températures (37°C, 44°C, 55°C) (**DeVuyst et al, 1998**).

L'incubation se fait pendant 24 h en gardant l'optimum du pH obtenu précédemment.

V.2.5.Durée d'incubation

En vue de déterminer la durée d'incubation optimale, on a fait varier la durée de 18 h à 24 h. L'incubation des cultures s'effectue à l'optimum de la température trouvée précédemment avec la valeur du pH optimale.

V.2.6. Taux d'oxygène

La production des PPE est déterminée en cultivant la souche aux conditions optimales de PH, température, durée d'incubation en présence et en absence d'oxygène (DeVuyst et al, 1998).

V.2.7. Rapport C/N

Afin de déterminer l'effet de la concentration en carbone sur la production des PPE, le sucre est incorporé à différentes concentrations dans le milieu de culture idéal en fixant la concentration en azote (DeVuyst et al, 1998). Cinq concentrations ont été testés : 10g/l ; 20 g/l ; 30 g/l ; 50 g/l ; 70g/l

IV. Estimation du rendement en PPE

IV.1 .Extraction des PPE

L'extraction des PPE a été réalisée en adoptant la technique de (Ricciro et al, 2002) en suivant ces étapes:

- récupération des cellules bactériennes par centrifugation (5000 g/ 10 min) -
précipitation des PPE

1-Ultrafiltration du surnageant à 4°C;

2-Addition de trois volume d'éthanol à -20°C;

3-Centrifugation à 10.000 g/20 min à 4°C

4-Redissolution du culot dans trois volumes d'éthanol et centrifugation aux mêmes conditions ;

5- Redissolution du culot obtenu dans de l'eau physiologique stérile.

IV.2. Dosage et quantification des PPE

La quantification des PPE a été effectuée en utilisant la technique de dosage des sucres totaux de **Dubois (1956)**. Le dosage est réalisé comme suit :

- A 1 ml de solution,
- Ajouter 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique ;
- Agiter par vortex ;
- Lire la densité optique à 490 nm

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Tous les résultats ont été exprimés en $\bar{X} \pm SEM$

Chapitre II

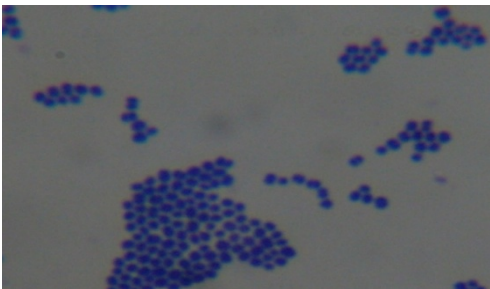
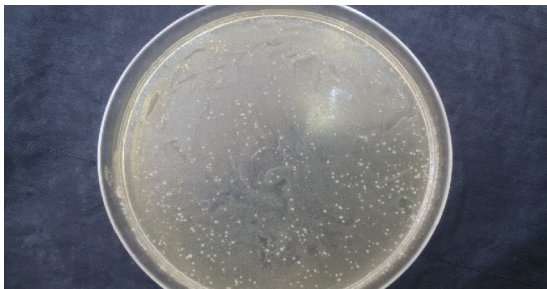
Résultats et Discussion

I. Résultats de l'étude bactériologique

I.1. Confirmation de la souche étudiée

L'ensemble des résultats de caractérisation morphologique de *streptococcus thermophilus* sont regroupés dans le **tableau N°04**

Tableau N°04 : Résultats de l'aspect morphologique de *streptococcus thermophilus*

Aspect microscopique après coloration de Gram	Aspect macroscopique de culture sur milieu M₁₇
<p>Gram positive :</p> <p>Aspect : Coques associé en chaînettes</p> <p>Couleur : violet</p> 	<p>Colonies d'environ 0.5-0.9 mm, de couleur crème, d'aspect crémeux, de surface lisse bombée et à contour régulier.</p> 

I.1.2 .vérification de la production des PPE par *S.thermophilus* sur milieu solide.

La figure suivante représente l'aspect macroscopique des colonies de *S.thermophilus* sur milieu MRS additionné de colorant cationique.



Figure N°04 : production des PPE par *S.thermophilus* en milieu MRS additionné de colorant (violet de gentiane)

D'après la figure N°03 ,la production d'PPE par la souche *streptococcus thermophilus* est confirmée par l'apparition des colonies blanches(crème) sur fond violet, par le masquage de la couleur du aux polysaccharides produits.

I.2. Résultats de l'optimisation des paramètres de production des PPE

La production des PPE par les bactéries lactiques varie énormément et dépend des conditions de culture et de la souche (**Bergmaier, 2002**), ce qui rend l'optimisation des paramètres de production une démarche importante pour un rendement maximal. Les paramètres faisant partie de l'optimisation sont souvent: l'inoculum, la température, le pH, la tension oxygénique, la durée d'incubation et le rapport C/N (**Kimmel et al, 1997; Bergmaier, 2002**).

Les résultats d'optimisation des conditions de production des PPE par *S.thermophilus* sont élucidés dans cette partie.

I.2.1. Milieu de production

La production des PPE été évaluée dans des milieux différents : MRS/M17 et le milieu hypersaccharosé. Les résultats d'optimisation de milieu de production sont représentés dans la figure N°05 qui indique que le milieu MRS était le plus convenable à la production (17.1 mg /).

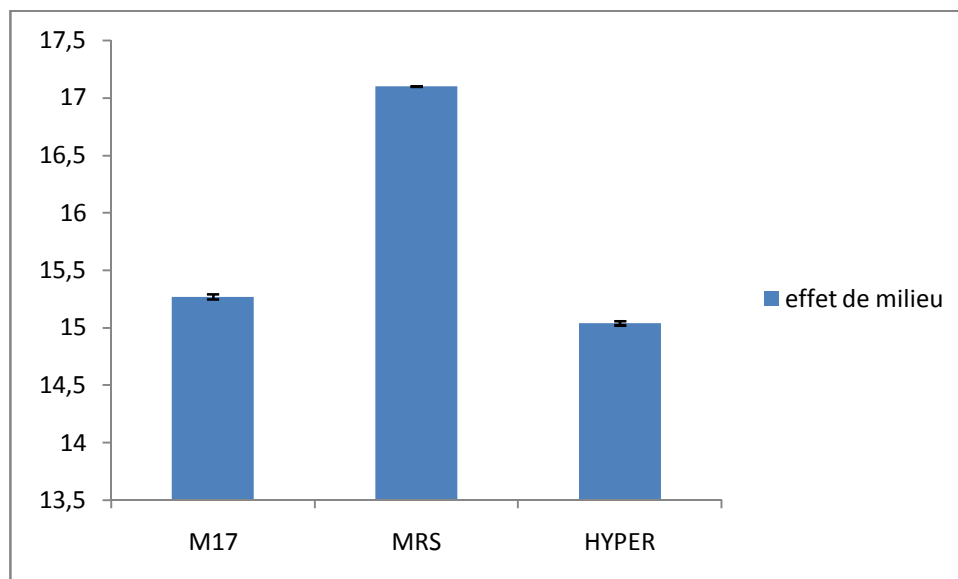


Figure N° 05 : Optimisation du milieu de production d’PPE

Selon **Cerning et al, (1994)**, la source de carbone et le type de sucre (glucose, galactose, lactose, mannose, fructose etc.) à une influence majeure sur la biosynthèse des PPE par les LAB.

De Vuyst et al, (1998) ont montré que le lait était le milieu le plus convenable pour la production par *S.thermophilus*, par contre **Petit et al, (1991)** ont trouvé que la production était importante dans le milieu MRS à un pH contrôlé que dans le M17 sans contrôle de pH.

I.22. Inoculum

Sur la figure N° 06 sont illustrés les résultats de la production à différentes concentrations en inoculum, nous pouvons constater que les plus faibles quantités

d’PPE ont été obtenues avec un inoculum de 10^5 germes/ml. Par ailleurs, l’optimal de production (18.4 mg/l) après 24h d’incubation était obtenu à 10^7 germe/ml .

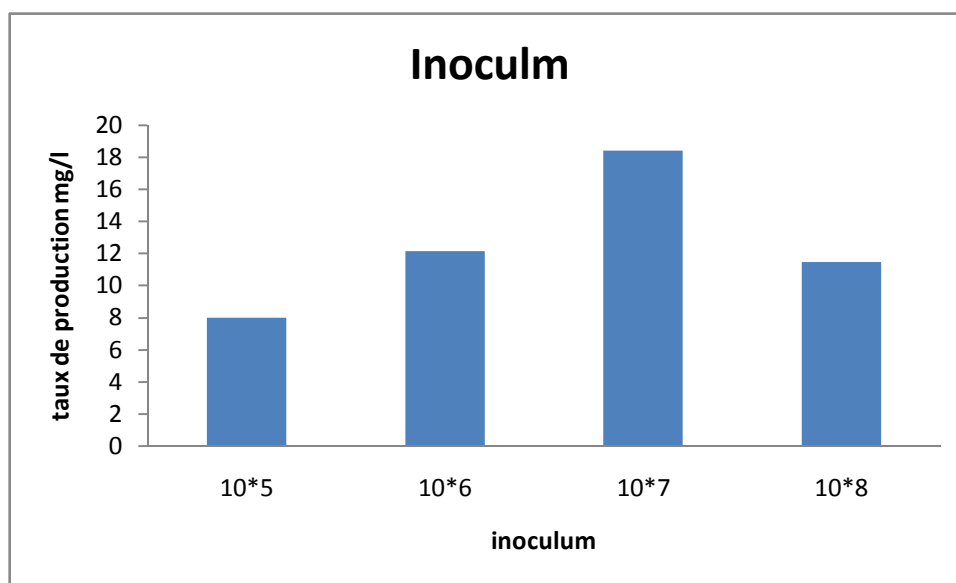


Figure N° 06 : Optimisation de l’inoculum pour la production des PPE

Nous remarquons qu’une forte inoculation entraîne une diminution du rendement, ce qui est probablement dû à la compétition au substrat et à l’épuisement rapide du milieu de production. En effet la concentration de l’inoculum a un effet significatif sur la production.

I.2.3. pH

Les résultats de l’effet de pH sur la production des PPE sont illustrés dans la figure N° 07. Nous remarquons que la variation du pH affecte clairement le rendement. En effet l’optimum de production a été obtenu à pH 3,5 pour (129 mg/L).

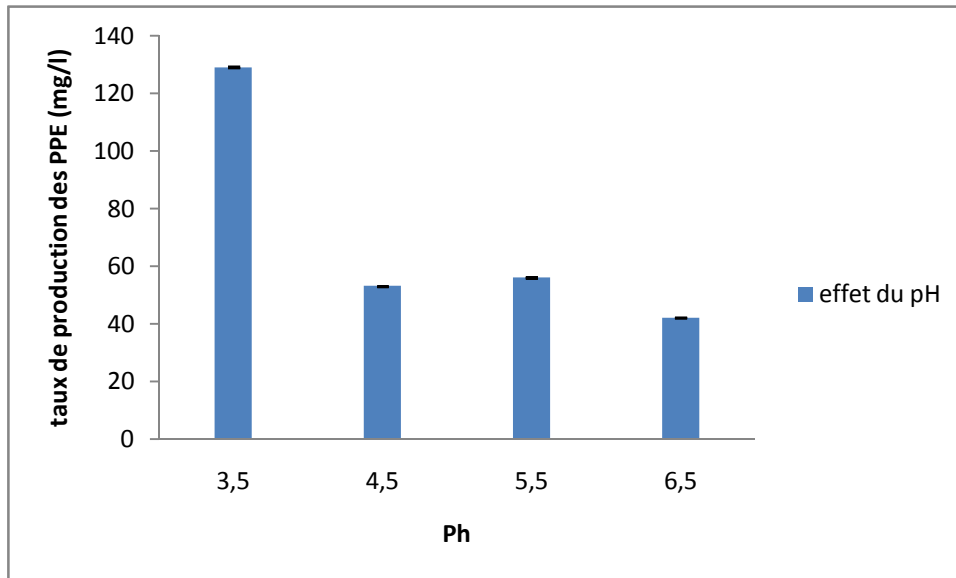


Figure N° 07: Optimisation de pH de production

Kimmel et al, (1998) ont démontré une production considérablement plus élevée à pH 5, comparé à pH 4 et 6 et que le contrôle de pH améliore la production par les bactéries lactiques.

I.2.4. Température

L'effet de la température sur la production est élucidé dans la figure N° 08 qui montre que la quantité la plus élevée en PPE correspond aux valeurs obtenus à 44°C. Cette valeur était de 158.43 mg/L, par contre les plus faibles teneurs ont été obtenus à 37°C.

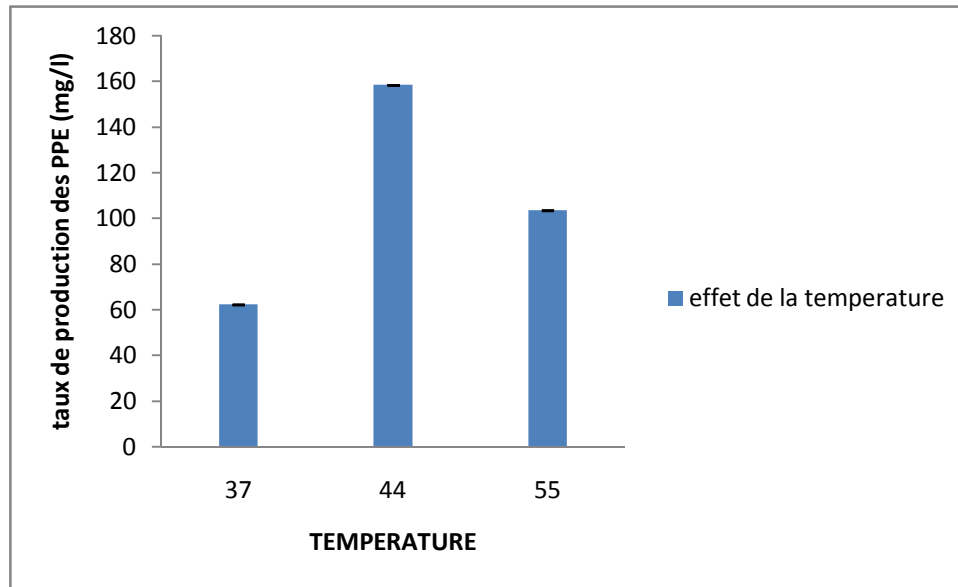


Figure N° 08 : Optimisation de la température de production

Contrairement aux bactéries lactiques mésophiles qui produisent plus d’PPE à des températures basse (25°C), les meilleurs rendements en PPE chez les thermophiles ont été enregistrés à la température optimale de la croissance (**Cerning et al, 1992**).

I.2.5. Durée d’incubation

Sur la figure N° 09 sont illustrés les résultats montrant l’effet de la durée d’incubation sur la production. Nous pouvons constater que les meilleurs rendements (137 mg/L) ont été obtenus après 24 h d’incubation.

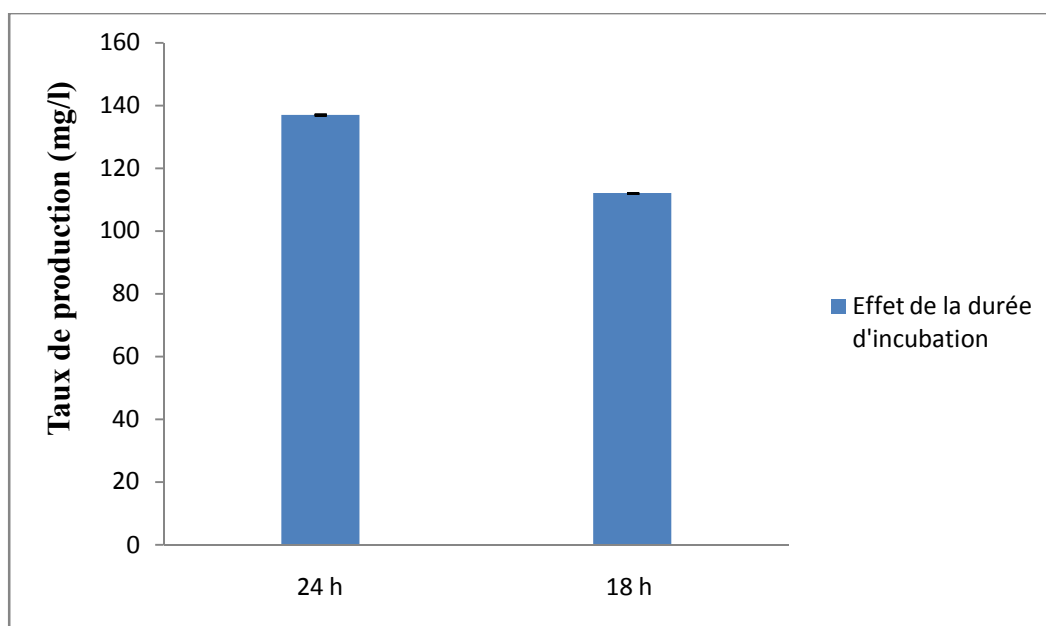


Figure N° 09 : Optimisation de la durée d'incubation.

De Vuyst et al, 1998 ; Aslim et al, 2005, ont constaté qu'une production maximale chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* a été obtenu après 18 h d'incubation et durant la phase exponentielle. En revanche certains auteurs ont observé que la production continue même durant la phase stationnaire.

I.2.6. Conditions d'aéro/anaerobiose

Les résultats de l'effet de l'oxygène sur la production sont représentés dans la figure N° 08. Cette figure révèle que les concentrations les plus élevées ont été obtenus en aérobiose.

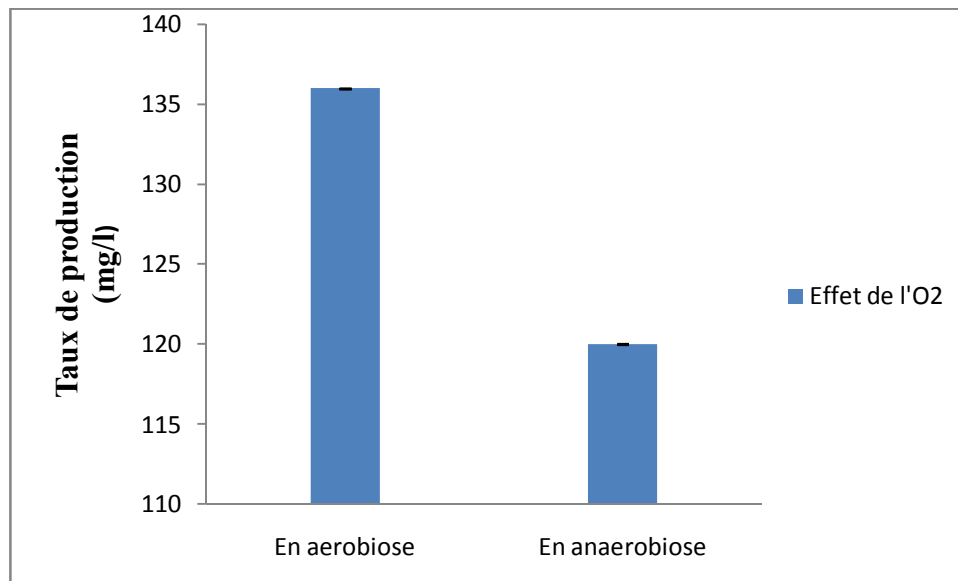


Figure N° 10: Optimisation des conditions d'aéro/ anaérobiose

Ces résultats sont en accord avec ceux constatés par **Pham et ses collaborateurs, (2000)**, par ailleurs **De Vuyst et al, 1998 ; Looijesteijn, 1999**, ont montré qu'une basse tension en oxygène stimule la production.

I.2.7. Rapport C/N

En plus de type de sucre, sa concentration peut avoir un effet stimulant sur la production. La figure N° 09 illustre les résultats de l'effet de saccharose incorporé à différentes concentrations sur la production.

D'après cette figure nous pouvons voir que les taux les plus élevés en PPE ont été enregistrés en présence d'une concentration de 70g/L de fructose.

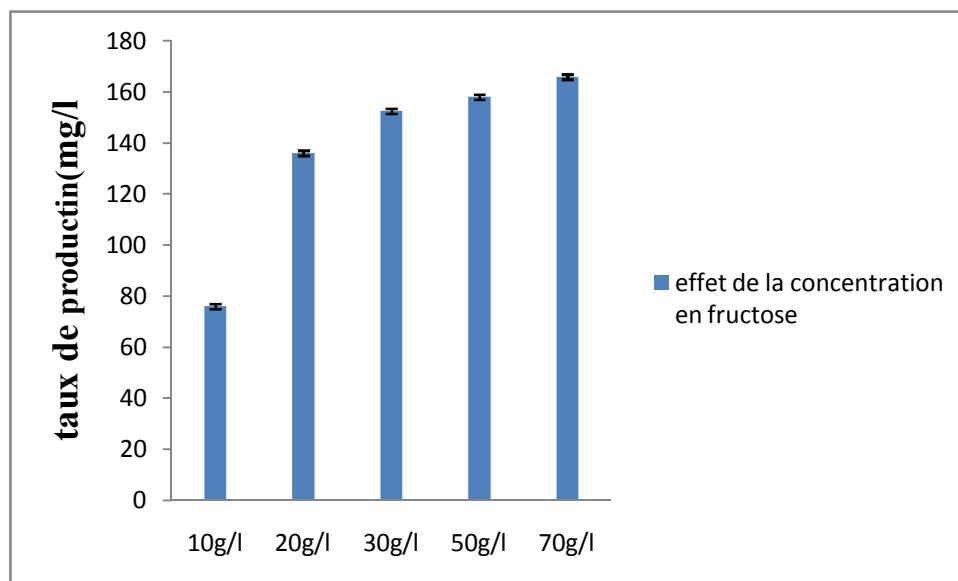


Figure N° 11 : Optimisation du rapport C/N pour la production des PPE

D'après ces résultats, on peut conclure que les effets des différents paramètres sur la production d'PPE sont spécifiques pour chaque souche étudiée.

I.3 La production final d'PPE

D'après les résultats précédents on a constaté qu'une meilleure production d'PPE (164.8mg/l) a été obtenue dans les conditions physico-chimiques et organiques indiqués dans le tableau suivant :

Tableau N°05 : les conditions physico-chimiques et organiques optimales de la production d'PPE

Milieu de culture	La taille de l'inoculum	pH de milieu	La température d'incubation	La durée d'incubation	Aero/anaérobiose	Le rapport C/N
MRS	10^7 germ/ml	3.5	44 C°	24 h	aérobiose	70 g/l

conclusion

Un intérêt grandissant est porté aux bactéries lactiques productrices des polymères extracellulaires est ce ci grâce à leur capacité d'améliorer la texture et viscosité des produits fermentés ; en plus de leur effet rhéologique, ces biopolymères constituent une alternative aux agents texturant et gélifiants synthétiques.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la détermination du rendement de production des PPE par *S. thermophilus*, en optimisant plusieurs paramètres (le milieu de culture, la taille d'inoculum, pH, la température et la durée d'incubation, le taux d'oxygène et le rapport C/N).

Les résultats obtenus ont montré que *S.thermophilus* produit plus de PPE (165mg/l) dans des conditions optimales (MRS, 10^7 germe/ml, pH 3.5, 44C°, en aérobiose, en présence d'une concentration en fructose de 70g/l et après 24h d'incubation). Cette production s'est améliorée de 17 à 165 mg/l, ce qui explique l'effet significatif de chaque paramètre sur la production.

Des études complémentaires doivent être réalisées portant sur :

- ✚ La caractérisation du polymère produit par *S.thermophilus* ;
- ✚ L'application d'autres stratégies permettant l'amélioration de la production des PPE.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Aslim. B., Yuksekdag. Z., Beyatli. Y et Mercan. N. (2005):** Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. N°21. Pp. 673-677.
- **Bergmaier. D (2002):** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. rhamnosus rw-9595* d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat. P. 27
- **Bergmaier. D (2002):** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. rhamnosus rw-9595* d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat. P. 27.
- **Bergmaier. D., Champagne. C.P., Lacroix. C., (2003):** Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus RW-9595M*. *J Appl Microbiol*. N° 95. Pp. 1049-1057.
- **Cerning J. (1994):** Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Ed. Bactéries Lactiques, Grenoble. Pp. 309-329.
- **Cerning. J (1990):** Exocellularpolysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Microbiol Revue*. P. 87. Pp. 113-130
- **Corrieu G. et Luquet F-M., (2008).** Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments, édition Tec. et Doc. Lavoisier, Paris France, 849 p.
- **Carl e G. et Luquet F-M., (1999).** Bactéries lactiques et probiotiques, édition Tec. et Doc. Lavoisier, Paris France, 307 p.
- **Cerning. J., Bouillanne. M., Landon. M., Desmazeaud. M.J (1992):** Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 75. Pp. 692-699.
- **Cerning. J (1995):** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. P. 75, 466; Pp. 463-472.
- **Coutinho. PM et Henrissat. B Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In Gilbert. H.J, Davies.G, Henrissat. B et Svensson. B(1999):** Recent advances in Carbohydrate Bioengineering. The royal society of chemistry; . Pp. 3-12.
- **Chabot. S., De Leseleuc. L., Cloutier D., Van Calsteren .M.R., Lessard. M., Roy. D.,Lacroix .M et Oth. D (2001):** Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus RW9595M* stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immuno-competent cells, and IFN-gamma mouse splenocytes. *Lait* 81. Pp. 683-687.

- **Dubois M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A, Smith F (1956):** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* P. 28; Pp. 350-356.
- **De Vuyst. L., Degeest. B (1999):** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Technological bottlenecks and practical solutions. *Macromol Symp* 140. Pp. 31-41.
- **De Vuyst .L., Vanderveken. F., Van den Ven et Degeest B (1998):** Production and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 84: Pp 1059–1068.
- **De Vuyst. L., De Vin. F., Vaningelgem. F et Degeest. B (2001):** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy.* P. 11; Pp. 687-707.
- **De Vuyst L., Degeest B. (1998)** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMSMicrobiol Rev* 23: 153-177.
- **Ricciardi, A, E Parente, MA Crudele, F Zanetti, G Scolari, and I Mannazzu (2002)** Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. *Journal of Applied Microbiology* 92 297-306.
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356
- **Grobben. G.J., Chin-Joe. I., Kitzen.V., Boels. I., Boer. F., Sikkema. J., Smith. M et de Bont .J.A.M (1998):** Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. *Appl Environ Microbiol.* N° 64. Pp. 1333-1337
- **Gibson. G.R., Roberfroid. M.B (1995):** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J.* Vol.124; Pp. 1401-1412.
- **Hui.Y.H., Lisbeth. M. G., Ase Slovejg. H(2004):** Handbook of Food and Beverage Fermentation. Ed.CRCPress. P. 351
- **Kitazawa. H., Itoh. T., Tomioka.Y., Mizugaki.M et Yamaguchi.T (1996):** Induction IFN-g and IL-1a production in macrophages stimulated with

phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *International Journal of Food Microbiology* N° 31. Pp. 99–106

- **Kimmel S.A., Roberts R.F et Ziegler G.R. (1998):** Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semi-defined medium. *Appl Environ Microbiol* N° 64. Pp. 659-664.
- **Kitazawa. H., Toba. T., Itoh. T., Kumano. N., Adachi. S et Yamaguchi. (1991):** Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian røp sour milk, “viili”. *Animal Science and Technology (Japan)*. N° 62. Pp. 277–283.
- **Kitazawa. H., Itoh. T., Tomioka.Y., Mizugaki.M et Yamaguchi.T (1996):** Induction IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *International Journal of Food Microbiology* N° 31. Pp. 99–106.
- **Looijesteijn. P.J., Trapet. L., de Vries. E., Abee. T et Hugenholtz. J (1999):** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* N° 64. Pp. 71-80.
- **Mozzi. F., Savoy de Giori. G., Oliver. G et Font de Valdez. G, (1995):** Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. I. Influence of salts. *Milchwissenschaft*. N° 50. P. 18.
- **Nagaoka. M., Hashimoto. S., Watanabe. T., Yokokura. T., Mori. Y (1994):** Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol Pharm Bull* 17. Pp. 1012- 1017.
- **Nakajima. H., Hirota.T., Toba. T., Itoh. T., Adachi, S. (1992):** Structure Of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus Lactis*, subsp. *Cremoris* SBT-0495. *Carbohydrate Research*. N° 224. Pp. 245–253
- **Nakajima. H., Hirota.T., Toba. T., Itoh. T., Adachi, S. (1992):** Structure Of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus Lactis*, subs

- **Petit. C., Grill. J.-P., Maazouzi. N. and Marczak. R (1991):** Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. N° 36. Pp. 216–221.
- **Pham. P. L., Dupont .I., Roy. D., Lapointe. G et Cerning. J (2000):** Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology.
- **Ruijsenaars. H. J., Stingle. F et Hartmans. S (2000):** Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharide. *Current Microbiology*. N°40. Pp. 194–199.
- **Steinbuchel. A. H (2005):** Polyssacharides and polyamides in the food industry. Ed. Rhee
- **Ruas-Madiedo.P et de los Reyes-Gavila'n. C. G (2002):** *Invited Review:* Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. American Dairy Science Association.
- **Wacher-Rodarte. C., Galvan. M.V., Farrés. A., Gallardo. F., Marshall. V.M et GarciaGaribay. M. (1993):** Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. *J Dairy Res* 60: 247-254

ANNEXE N°01

1. Technique de coloration de Gram(BERTRAND ,1997 ;FLANDROIS,1997).

Principe :

Elle permet l'identification de la paroi des bactéries, nous avons deux grandes catégories :

Les bactéries gram+ : la paroi est riche en muérine et en magnésium qui donne une couleur violette.

Les bactéries gram- : la paroi est riche en lipide qui donne une couleur rose.

Mode opératoire :

- ❖ Recouvrir le frottis par violet de gentiane pendant une minute.
- ❖ Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol mordant pendant une minute.
- ❖ Faire décolorer la lame inclinée par l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte soit non colorée.
- ❖ Rincer par l'eau distillée
- ❖ Recolorer avec la fuchsine et laisser pendant 10à20 secondes
- ❖ Rincer par l'eau distillée une deuxième fois
- ❖ Sécher en chaleur
- ❖ Examen à l'immersion

Résultats :

- ❖ Les bactéries Gram+ : gardant la coloration violette après décoloration par l'alcool.
- ❖ Les bactéries Gram- :décolorent par l'alcool, sont tentées par la fuchsine et apparaissent rose ou rouge.

ANNEXE N°02 : La composition des milieux de culture pour 1 litre :

• **MRS bouillon :**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	5g
fructose.....	20g
Tween 80(= polysorbate 80)	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonique	2g
Sulfate de magnésium	200mg
Sulfate de manganèse	50mg

pH = 6,5

• **MRS gélose:**

Il s'agit du milieu précédent + 5g d'agar .

- **M₁₇ bouillon:**

1l d'eau distillée

Peptone de soja	5g
Peptone de viande	2,5g
Tryptone	2,5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Acide ascorbique	0,5g
Glycerophosphate de sodium	19g
Sulfate de Mg	0,25g

pH= 7,2

autoclaver 15min à 120°C

- **M₁₇ gélose:**

Il s'agit du milieu précédent gélosé à 5g d'agar.

ANNEX 03 : Courbe d'étalonnage

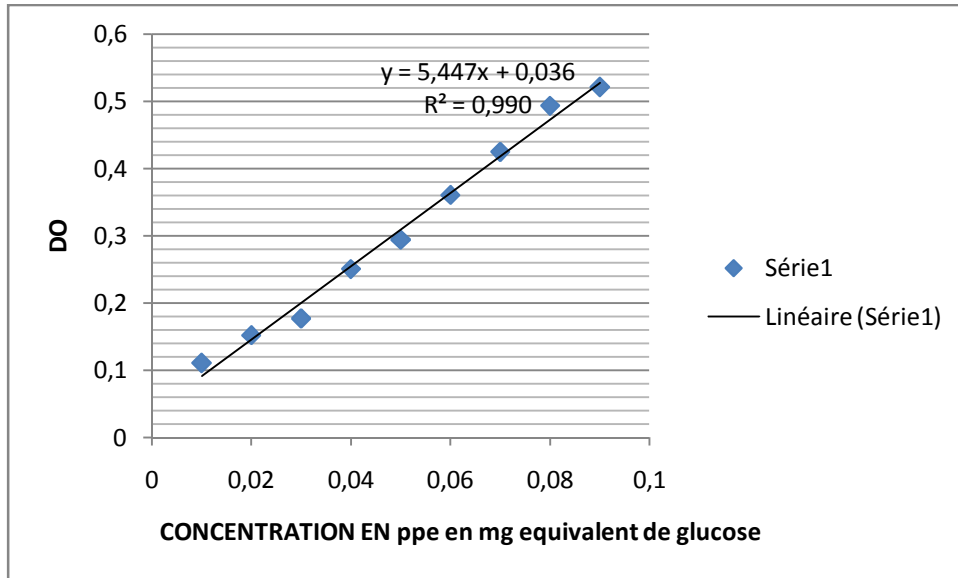


Figure N°01: Courbe d'étalonnage d'PPE

Résumé

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 GRAS, ont la capacité de produire des exopolysaccharides dans le produit fermenté et ont un impact direct sur les propriétés rhéologiques. Cependant, leur faible production, de caractère épaississant instable représente un inconvénient majeur pour l'exploitation de ces molécules dans l'industrie agro-alimentaire ce qui a exigé le recours au développement de nouvelles stratégies permettant une amélioration de la synthèse de ces molécules par les bactéries lactiques.

Dans cette étude nous avons évalué la production des PPE par une bactérie lactique: *S. thermophilus*, en optimisant les conditions de production. Nous constatons qu'après optimisation de chaque paramètre la production s'est améliorée.

Mots clés : Bactérie lactique- PPE- *S.thermophilus*- Optimisation.

في السنوات الاخيرة هناك اهتمام متزايد بالسكريات المتعددة المنتجة من طرف البكتيريا اللبنية هذه الاخيرة ذات القيمة الغذائية تمتلك القدرة على انتاج السكريات المتعددة ضمن المنتج المختمر والتي لها تأثير مباشر على الخصائص الفيزيائية الهدف من دراستنا هو تقييم انتاج السكريات المتعددة من طرف البكتيريا اللبنية و ذلك من خلال تحسين شروط الانتاج اثبتت هذه الدراسة ان كمية المنتج تحسنت بعد تحسين شروط الانتاج

الكلمات الدالة

S.thermophilus - البكتيريا اللبنية- السكريات المتعددة - تحسين