

Université d'Oran Es-Sénia

Faculté des Sciences – Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Microbiologie Alimentaire Et Industrielle

Présentée par

BENNAMA Rabha

Thème

***Streptococcus thermophilus : Isolement et recherche
systématique de souches indigènes productrices
d'exopolysaccharides***

Soutenue le 03 Juillet 2012, devant le jury

Président

AOUAS AEK

Professeur, Université d'Oran Es-Sénia

Examineurs

ABBOUNI Bouziane

ABDELOUAHID Djamel-Eddine

CHEKROUNE Abdallah

HOMRANI AEK

Professeur, Université de Sidi Bel Abbès

Professeur, Université de Tlemcen

Professeur, Université d'Oran Es-Sénia

Maitres de Conférences, Université de Mostaganem

Directeur de thèse

BENSOLTANE Ahmed

Professeur, Université d'Oran Es-Sénia

AVANT-PROPOS

Avant tout propos, mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, le **Pr. BENSOLTANE Ahmed**, pour son soutien, ses conseils et ses encouragements continuels, ainsi que pour la très grande patience dont il a fait preuve à mon égard. Je suis également très reconnaissante à son égard pour ses critiques avisées et les discussions que nous avons pu avoir qui ont toujours été une source d'informations et ont beaucoup contribué à me faire avancer dans ma réflexion.

Cette thèse de doctorat a été partiellement préparée à l'institut des produits laitiers d'ASTURIAS (Espagne), durant une période de stage de trois mois étalée sur les années 2007- 2010; pour ces raisons, je ne saurais remercier suffisamment le directeur du groupe de microbiologie moléculaire le **Pr. Alvarez Angel Miguel**, qui m'a accueillie dans son laboratoire avec une grande sympathie et avoir mis à ma disposition l'équipement nécessaire pour réaliser près de 50% de mes travaux de thèse.

Je remercie également toute son équipe en particulier, le **Dr. Maria Fernández et le Dr. Victor Ladero** pour leur disponibilité, leur sympathie et aussi pour m'avoir assistée dans la réalisation de la partie moléculaire de cette thèse.

Je remercie vivement **Mr. Aouas A.E.K**, professeur de l'université d'Oran d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

J'exprime mes respectueux remerciements à messieurs : **Abdelouahid Djamel-Eddine**, professeur de l'université de Tlemcen, **Abbouni Bouziane**, professeur de l'université de Sidi Bel Abbes, **Homrani A.E.K**, maître de conférences « A » de l'université de Mostaganem et **Chekroune Abdallah**, professeur de l'université d'Oran qui me font l'honneur d'accepter d'examiner cette thèse.

J'adresse un merci tout spécial au **Dr. Patricia Ruas-Madiedo**, chercheur de l'équipe des exopolysaccharides (IPLA), pour son aide dans l'interprétation de certains résultats.

Je remercie sincèrement :

- **Mr. Lotmani Brahim**, professeur de l'université de Mostaganem pour ses conseils et son soutien moral.

Beaucoup d'autres personnes ont également permis que ce travail aboutisse. Je n'en dresserai pas la liste, de peur d'en oublier, mais j'espère qu'elles se reconnaîtront ici.

A la mémoire

De mes très chers parents

..... Je dédie ce travail

Rabha

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Abstract	
Liste des publications et communications.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des figures.....	iv
Introduction	1
Chapitre I : Revue Bibliographique	
I. Les bactéries lactiques	4
1. Généralités	4
2. Origine et habitat	5
3. Physiologie et voies métaboliques centrales	5
3.1. Catabolisme des sucres	5
3.2. Métabolisme de l'acide citrique	8
3.3. Activité protéolytique	10
3.4. Métabolisme de l'oxygène	10
3.5. Influence des cations	12
II. <i>Streptococcus thermophilus</i> : Un streptocoque atypique	12
1. Généralités	12
2. Propriétés métaboliques et physiologiques de <i>S. thermophilus</i>	15
2.1. Métabolisme des sucres	15
2.2. Activité protéolytique	18
2.3. Métabolisme des acides aminés	19
2.4. Activité uréasique	20
2.5. Biosynthèse des folates	21
2.6. Production de bactériocines	22
III. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques	23
1. Généralités	23
2. Diversité structurale et classification des exopolysaccharides des bactéries lactiques	23
2.1. Diversité structurale	23
2.2. Classification des EPS	24
2.2.1 Classification selon l'EPS produit	24
2.2.1.1. Classification selon la composition chimique	25
3. Effet et fonction des EPS dans le lait fermenté	27
4. Biosynthèse des EPS	28
4.1. Biosynthèse intracellulaire	30
4.2. Biosynthèse extracellulaire	31
5. Génétique de production des EPS	31
6. Biosynthèse des EPS par <i>S. thermophilus</i>	33
7. Applications et rôle des EPS	33
Objectifs de l'étude	35
Chapitre II : Matériel et Méthodes	36
I. Milieux de culture et conditions de croissance	36
II. Conservation des souches	36

III.	Souches de <i>S. thermophilus</i>	36
IV.	Echantillons de produits laitiers étudiés	38
V.	Techniques d'isolement des streptocoques thermophiles	38
VI.	Caractérisation phénotypique des souches	39
1.	Pré-identification des souches	39
1.1.	Test à catalase	39
1.2.	Observation microscopique à l'état frais	39
1.3.	Coloration de Gram	39
2.	Identification biochimique des souches	40
2.1.	Détermination du Type fermentaire	40
2.2.	Test de croissance à 10°C et à 45°C	40
2.3.	Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl	40
2.4.	Test de thermorésistance	40
2.5.	Fermentation des sucres	41
2.6.	Hydrolyse de l'amidon	41
2.7.	Hydrolyse de l'esculine	41
2.8.	Croissance sur le lait bleu de Shermann	42
2.9.	Croissance sur pH 9,6	42
VII.	Caractérisation moléculaire des souches	42
1.	Extraction et purification de l'ADN total bactérien	42
2.	La réaction en chaîne de polymérase (PCR)	43
3.	Electrophorèse sur gel agarose et visualisation des fragments d'ADN	44
4.	Purification des fragments d'ADN	45
5.	Analyse et séquençage de l'ADN amplifié	45
VIII.	Etude de la production des EPS	45
1.	Détection des souches Productrices d'EPS	45
2.	Caractérisation moléculaire partielle de la production des EPS	46
2.1.	Détection et séquençage des gènes de la glycosyltransférase (GT)	46
2.2.	Visualisation du gel et purification des fragments de PCR-GT	46
2.3.	Transformation bactérienne et extraction de l'ADN plasmidique	46
2.3.1.	Réactions de clonage et de transformation	47
2.3.1.	Extraction et digestion plasmidique	47
3.	Localisation au niveau du génome de la souche BN1 des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS : Technique d'hybridation « Southern blot »	48
4.	Croissance sur milieu lait et caractérisation biochimique partielle des EPS produit par la souche BN1	50
4.1.	Préparation du milieu lait et d'inoculum	51
4.2.	Etablissement des cultures	51
4.3.	Mesure de la croissance bactérienne	51
4.4.	Détermination de l'acidité titrable totale	51
4.5.	Mesure du pH	52
4.6.	Analyse des sucres résiduels et des acides organiques	52
4.7.	Extraction et purification des EPS à partir du lait fermenté	53
4.8.	Quantification des EPS et détermination de la masse molaire	53
Chapitre III :	Résultats	55
I.	Isolement et Identification des <i>S. thermophilus</i>	55
1.	Caractérisation biochimique des souches isolées	55

2.	Caractérisation moléculaire des souches isolées	62
II.	Caractérisation moléculaire partielle de la production d'EPS chez la souche BN1	66
1.	Détection et purification des gènes codants à la GT	66
1.1.	Clonage et transformation bactérienne	70
1.2.	Purification des plasmides à partir clones positifs et séquençage du fragment codant à la GT	72
1.3.	Localisation des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS au niveau du génome de la souche BN1 (Technique d'hybridation : Southern blot)	74
III.	Aspects microbiologiques et biochimiques de la production d'EPS par <i>S. thermophilus</i> BN1	78
1.	Croissance bactérienne et activité acidifiante sur milieu lait	78
2.	Dosage par HPLC des sucres consommés et des acides organiques produits par la souche BN1 au cours de la fermentation du lait.	81
3.	Quantification des EPS et la détermination de leur masse molaire	83
	Discussion	88
	Conclusion	100
	Références bibliographiques	102
	Publications	

RÉSUMÉ

Le but de cette étude a été de procéder au dépistage et à la recherche systématique de souches de *Streptococcus thermophilus* productrices d'exopolysaccharides (EPS), à partir d'écosystèmes laitiers domestiques différents à savoir le lait cru, le leben et le beurre traditionnel. Pour ces motifs, une stratégie a été adaptée pour dépister les souches productrices d'EPS. Cette méthode basée sur la détection macroscopique des colonies muqueuses, bien qu'elle soit classique, elle s'est avérée efficace et rapide. Un total, de seize souches identifiées en tant que *S. thermophilus*, a été obtenu. Il est important de mentionner que la fréquence des *S. thermophilus* présentant un aspect muqueux était faible. L'introduction de l'outil moléculaire dans cette étude a facilité la tâche dans la recherche des souches portant des gènes codants à la biosynthèse des EPS. A cet effet, la présence sur le génome d'une souche sélectionnée (BN1) du gène codant à la glycosyltransférase (GT) a été confirmée par PCR. La souche étudiée a été cultivée dans le lait 10% (P/V). Après, 6 et 12h de fermentation à 42°C, et 16h à 37°C la biomasse de la souche a augmenté de 3 log UFC/mL par rapport au temps initial d'inoculation. L'EPS produit a été purifié et quantifié par dosage gravimétrique et HPLC. Au niveau toutes les conditions d'étude, la masse molaire déterminée a été de $7,2 \times 10^5$ et $1,4 \times 10^4$ Da.

Mots Clés : *Streptococcus thermophilus*, exopolysaccharides, glycosyltransférase, masse molaire, température.

ABSTRACT

The aim of this study was to screen and search for *Streptococcus thermophilus* strains producing exopolysaccharides (EPS) from different domestic dairy ecosystems as raw milk, leben and traditional butter. For these reasons, a strategy has been adapted to screen the EPS-producing strains. This method based on the detection of macroscopic mucoids colonies, although it appears classic but, it has proven efficient and fast. A total of sixteen strains identified as *S. thermophilus* was obtained. It is important to note that the incidence of *S. thermophilus* with a mucoid aspect was low. The introduction of molecular tools in this study had facilitated the work on the search for strains carrying genes encoding to the biosynthesis of EPS. To this end, the presence on the genome of selected strain (BN1) genes encoding the glycosyltransferase (GT) was confirmed by PCR. This strain was grown in milk 10% (w /v). After, 6 and 12 hours of fermentation at 42 ° C, and 16 h at 37 ° C. the increase biomass in the biomass of the strain was about 3 log cfu / ml compared to the initial rate of inoculation. The EPS product was purified and quantified by gravimetric and HPLC methods. From all the conditions under study, the molar mass determined ranging from $1,4 \times 10^4$ Da to $7,2 \times 10^5$.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, exopolysaccharides, glycosyltransferase, molar mass, temperature.

- LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS -

A. Publications :

1. **Bennama R., Fernández M., Ladero V., Alvarez M. A., Rechidi-Sidhoum N., & Bensoltane A., 2012a** : Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk. *European Food Research Technology*. **234** : 119-125.
2. **Bennama R., Rechidi-Sidhoum N., & Bensoltane A., 2012b**. Effect of some fermentation Substrates and Growth Temperature on Exopolysaccharide Production by *Streptococcus Thermophilus* BN1. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. **2 (1)**: 44-47.
3. **Bennama R., Rechidi-Sidhoum N., & Bensoltane A., 2011**. Effect of threonine on growth and acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *World Applied Sciences Journal*, 15 (2): p. 160-163.

B. Communications internationales :

1. **Rabha BENNAMA & Ahmed BENSOLTANE. 2007**. Optimization of the growth of *Streptococcus thermophilus* using some carbohydrates. Dairy Science and Technology Conference. **Le Caire, 19- 21 Novembre 2007**.
2. **Rabha. BENNAMA, Maria FERNANDEZ, Miguel A. ALVAREZ, Nadra RECHIDI-SIDHOUM, & Ahmed BENSOLTANE. 2009**. Influence of lactose and sucrose on exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* BN1. **La 4eme semaine de science et technologie du lait de la FIL (IDF). Rennes (France), 20-24 avril 2009**.
3. **Rabha. BENNAMA, Maria FERNANDEZ, Miguel A. ALVAREZ, Nadra RECHIDI-SIDHOUM, & Ahmed BENSOLTANE. 2009**. Cinétique de croissance bactérienne et production d'acétaldéhyde dans du lait additionné de thréonine par des souches de *Streptococcus thermophilus*. **Les 8^{èmes} journées biotechnologiques de l'association tunisienne de biotechnologie. Sousse (Tunisie), 20-23 décembre 2009**.
4. **Rabha. BENNAMA, Maria FERNANDEZ, Miguel A. ALVAREZ, Victor LADERO, & Ahmed BENSOLTANE. 2010**. Identification of exopolysaccharide-producer strain isolated from Algerian raw milk and preliminary analysis of its EPS technological properties. **5th. International Meeting on Biotechnology « Biospain 2010 ». Pamplona (Espagne), 29/09/10 au 01/10/2010**.
5. **Rabha BENNAMA, Victor LADERO, Miguel A. ALVAREZ, Maria FERNANDEZ & Ahmed Bensoltane. 2011**. Effect of fermentation conditions (culture media and incubation temperature) on exopolysaccharide production by *streptococcus thermophilus* BN1. **2nd International conference on Biology, Environment and Chemistry "ICBEC 2011". DUBAI, December, 28-30, 2011**.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
dNTPs: Deoxynucleotide Triphosphates
EDTA: Acide éthylène diamine tétra- acétique
EPS: Exopolysaccharide
Gal: Galactose
Glu : Glucose
GRAS: Genarally Rocognized As Safe
GT: Glycosyltransférase
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Lac S : Lactose perméase
Lac Z : Lactose β -galactosidase
Lb : *Lactobacillus*
Lc : *Lactococcus*
Ln : *Leuconostoc*
S : *Streptococcus*
mM : Millimole
pb: Paire de bases
PDA: Photodiode Array
PDM : Polymer Dry Mass/ Masse sèche du polymère.
pH : Potentiel Hydrogène
PTS : Phosphotranférase
F: Forward primer
R: Reverse primer
Subp : Sous espèce
TCA : Acide trichloracétique
UFC : Unité Formant Colonies
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I: Caractéristiques des <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> et <i>Lactococcus</i>	14
Tableau II : les quatre groupes d'enzyme impliqués dans la synthèse des EPS	30
Tableau III : Souches de <i>S. thermophilus</i> isolées et souches de références utilisées dans le présent travail	37
Tableau IV: Endonucléases de restriction utilisées dans la présente étude	48
Tableau V : Taux moyen de la flore thermophile et fréquence des colonies muqueuses par échantillon	55
Tableau VI : Caractères biochimiques des souches isolées	61
Tableau VII : Valeurs Moyennes de la consommation du lactose et la production des acides organiques par la souche BN1 mise en culture dans le lait après 6h et 12h d'incubation à 42°C et 16h à 37°C.	82

LISTE DES FIGURES

	Page
Fig.1 : Voies métaboliques homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose chez les bactéries lactiques	07
Fig.2 : Principales étapes du métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques	09
Fig.3 : Réactions impliquant l'oxygène moléculaire ou des métabolites de l'oxygène, catalysées par des enzymes des bactéries lactiques	11
Fig.4 : Morphologie cellulaire de <i>Streptococcus thermophilus</i> observée par microscopie électronique	12
Fig.5 : Principales voies du métabolisme des sucres chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
Fig.6 : Organisation partielle des gènes uréase de <i>S. thermophilus</i>	21
Fig.7 : Classification des bactéries lactiques basées sur le type d'EPS produit	25
Fig.8 : Composition et structure du motif répété de l'exopolysaccharide produits par <i>S. thermophilus Sfi</i> (A) et <i>S. thermophilus MR-1C</i> (B)).	27
Fig.9 : Diagramme de la conversion du lactose, galactose et glucose en EPS chez les bactéries lactiques	29
Fig.10 : Organisation des clusters EPS chez <i>Lc. Lactis</i> et <i>S. thermophilus</i>	32
Fig. 11 : Marqueur de taille ou de poids moléculaire (Fermentas), utilisé dans la présente étude	43
Fig. 12 : Aspect microscopique à l'état frais de l'une des souches de <i>S. thermophilus</i> , indiquant le mode d'association en chaîne. Observation effectuée à l'objectif 40.	57
Fig. 13 : Aspect microscopique à l'état frais de l'une des souches de <i>S. thermophilus</i> , indiquant le mode d'association en chaîne. Observation effectuée à l'objectif 40.	57
Fig.14 : Aspect microscopique d'une des souches de <i>S. thermophilus</i> , après coloration de Gram indiquant le mode d'association en chaîne. Observation effectuée à l'objectif 100.	58
Fig. 15 Colonies de la souche <i>S. thermophilus</i> BN1 purifiées développées sur LM17 agar après 24h d'incubation à 42°C	59
Fig. 16 : Une chaîne de la souche BN1 observée à l'état frais, montrant la forme cellulaire type des <i>S. thermophilus</i> . Contraste négatif obtenu au moyen d'encre de chine.	59
Fig. 17 : Aspect sur de l'ADN total de quelques souches étudiées sans traitement par RNAase.	63
Fig. 18 : Aspect sur de l'ADN total de quelques souches étudiées après traitement par RNAase.	63
Fig. 19 : Produits d'amplification issus de la réaction de PCR, effectuée sur l'ADN des souches isolées, en utilisant les amorces pA, pH' de l'ARNr16S.	64
Fig. 20 : Exemple d'une séquence nucléotidique d'une des souches isolée après analyse et traitement par le Chromas.	65
Fig. 21 Détection par PCR des souches possédant la région impliquée dans la biosynthèse de la GT en utilisant les primers hybrides F-36, R-27.	67
Fig. 22 : Amplification par PCR des régions impliquées dans la biosynthèse de la GT.- Gel agarose réalisé par le dépôt du volume entier (environ 20µl) des deux réactions de PCR relatives à l'ADN des souche BN1 et BN3.	68
Fig. 23 : Bandes purifiées à partir du gel agarose de la PCR-GT, réalisée avec l'ADN des souches BN1 et BN3 respectivement.	69
Fig. 24 : Digestion plasmidique EcoRI montrant l'éjection de l'insert de 3 plasmides "pGEM-T" extraits des clones obtenus avec l'ADN de la souche BN1, suspectés porteurs du gène codant à la GT.	71

Fig. 25 : Aspect sur gel agarose des plasmides extraits à partir des clones positifs codés 1-1, 2-3, 2-5, et 2-10.	73
Fig. 26 : Digestion plasmidique ECORI, indiquant la présence de l'insert	73
Fig. 27 : Aspect de l'ADN total de la souche BN1 avant digestion.	74
Fig. 28 : Aspect de l'ADN de la souche BN1 après digestion et purification phénol chloroforme.	75
Fig. 29: ADN total de <i>S. thermophilus</i> BN1 (A) après digestion, (B) : Analyse après transfert par Southern de l'ADN digéré en utilisant un fragment interne du gène d'amorçage de la GT.	77
Fig. 30 : Biomasse en log UFC/ml développée après 6h, 12h à 42°C et 16 h de fermentation à 37°C sur milieu laitensemencé par la <i>S. thermophilus</i> BN1.	79
Fig. 31 : Valeurs du pH mesurées dans les cultures de la souche BN1 après 6h, 12h et 16h de fermentation à 42°C et 37°C respectivement.	80
Fig. 32 : Taux d'acide lactique en (mmol/l) produit par la souche dans les différentes cultures de lait fermenté après 6h, 12h et 16h respectivement à 42°C et 37°C.	80
Fig. 33 : Taux d'exopolysaccharide (mg PDM/L) quantifié à partir des cultures de lait fermenté par la souche BN1 après 12, 6 et 17 heures d'incubation à 42°C et 37°C respectivement.	83
Fig. 34 : Chromatogramme obtenu avec les échantillons d'EPS isolés et purifiés après 6h d'incubation à 42°C	85
Fig. 35 : Chromatogramme obtenu avec les échantillons d'EPS isolés et purifiés après 12h d'incubation à 42°C	86
Fig. 36 : Chromatogramme obtenu avec les échantillons d'EPS isolés et purifiés après 16h d'incubation à 37°C	87

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La biodiversité de la flore lactique originelle du lait et de l'environnement a connu un appauvrissement remarquable; et ce pour des raisons multiples liées au développement des techniques d'élevage des races laitières, de la collecte du lait, de la fabrication des produits laitiers (amélioration de l'hygiène) et de l'apport accru et sans cesse de ferments commerciaux. Ce type de ferments pose actuellement de sérieux problèmes associés à la poussée des phénomènes d'attaques phagiques, causés essentiellement par l'utilisation permanente des mêmes stocks de ferments.

La réduction de la biodiversité peut être aussi observée d'une manière indirecte et notable au niveau de certaines industries laitières, qui pour des considérations organoleptiques, incorporent dans les produits laitiers (*i.e.* yaourt) des polysaccharides d'origine végétale (*i.e.* la pectine, l'amidon et le galactomannane) et bactérienne (gomme de xanthane) comme additifs alimentaires gélifiants, stabilisants ou épaississants. Alors que l'addition des substances texturantes dans les produits laitiers fermentés est de plus en plus réglementée et même interdite dans certains pays. Aussi et de nos jours, les consommateurs recherchent davantage des produits naturels ou biologiques sans additifs.

Par ailleurs, les recherches menées sur les modifications génétiques qui ont approuvées leur succès dans l'amélioration des souches d'intérêt laitier, ont de leur côté contribué à la diminution de la biodiversité de la flore lactique. Mais l'opinion éthique et la législation de nombreux pays ont restreint l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM), pour les applications alimentaires.

Par conséquent, la recherche et la collecte de nouvelles souches sauvages de bactéries lactiques à intérêt technologique semblent de nos jours l'approche la plus appropriée afin de remédier à l'appauvrissement de la biodiversité de ce type de microorganismes.

Dans ce contexte, le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche systématique et la sélection de nouvelles souches de *Streptococcus thermophilus* productrices d'exopolysaccharides (EPS). *S. thermophilus* est employé en industrie laitière en tant que ferment dans la fabrication des produits laitiers tels que le yaourt et les fromages, dont la valeur économique est estimée à 40 milliards de dollars par an. Il faut rappeler, par ailleurs, que *S. thermophilus* produit des EPS, constituants importants et très prometteurs pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés.

L'intégration de souches lactiques productrices d'EPS comme ferments fonctionnels dans la production d'aliments laitiers fermentés a acquis beaucoup d'intérêt, compte tenu de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe), eu égard aux autres polysaccharides d'origine microbienne.

L'utilisation de polysaccharides excrétés d'une façon naturelle au cours de la fabrication d'aliment, tel que le yaourt, s'avère très intéressante pour l'industrie laitière. Ces polysaccharides devraient en effet constituer une nouvelle génération d'épaississeurs, qui ont un impact direct sur les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés.

Dans cette étude, les souches de *S. thermophilus* ont été isolées à partir d'écosystèmes laitiers naturels et variés (lait cru, beurre traditionnel et Leben). Une stratégie a été adoptée visant l'isolement et en même temps la recherche des souches exhibant des aspects relatifs à la production d'EPS, par la formation des colonies muqueuses ou visqueuses. Les souches isolées ont été identifiées sur les plans biochimique et moléculaire (Séquençage de l'ARNr 16S).

L'introduction de l'outil moléculaire dans le but de diagnostiquer la stabilité de certains phénomènes physiologiques (dans notre cas la production des EPS) semble indispensable. Utilisé dans la présente étude d'une façon modérée, il nous a permis de détecter et localiser au niveau du génome d'une souche sélectionnée les gènes responsables de la biosynthèse des EPS, confirmant ainsi la stabilité génétique

de ce caractère. Toujours chez la même souche les conditions optimales en relation avec la température d'incubation ont été à cet égard déterminées.

La présente thèse est scindée en trois chapitres :

- Le premier chapitre est présenté sous forme d'une revue bibliographique qui porte sur l'état des connaissances des bactéries lactiques, des streptocoques thermophiles et des exopolysaccharides.
- Le second chapitre concernera la partie expérimentale et technique.
- Le troisième est fondamentalement consacré à la présentation et l'interprétation des résultats obtenus à l'issue de nos investigations.

Enfin, une discussion étayée des données obtenues est proposée dans la perspective d'une analyse systématique des résultats enregistrés dans la durée et au cours de l'élaboration de ce travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I .Les bactéries lactiques

1. Généralités

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, hétérotrophes possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes, mais avec parfois peu d'homologies dans leurs acides nucléiques. Elles sont dépourvues de catalase (certaines souches possèdent une pseudo catalase sur des milieux riches en hème), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase (**Dellaglio et al. 1994; Atlan et al. 2008**).

Les bactéries lactiques sont caractérisées par un métabolisme exclusivement fermentaire, conduisant à la production d'acide lactique à partir du glucose. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les acides gras, les peptides, les vitamines, les glucides fermentescibles et les sels , Ces bactéries servent à de très nombreux procédés, aussi bien dans la transformation du lait, que dans la fermentation des végétaux, dans l'œnologie et dans la production des produits carnés fermentés (**Guiraud, 1998**). Quelques espèces peuvent devenir nuisibles et provoquent le verdissement des viandes ainsi que l'altération de d'autres produits alimentaires (sucres, produits laitiers). Par ailleurs, leur caractère pathogène est extrêmement réduit, puisque seules certaines espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* peuvent être impliquées dans des infections digestives, respiratoires ou urogénitales (**Dellaglio et al. 1994**).

Les connaissances actuelles permettent d'affirmer que le groupe des bactéries lactiques est constitué de bactéries en forme de coque : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Teragenococcus*, *Leuconostoc* et *Atopodium*, et des bactéries en forme de bacille : *Lactobacillus* et *Carnobacterium*. Mais l'appellation des bactéries lactiques est souvent étendue à d'autres bactéries qui leurs sont apparentées : *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus* et *Brevibacterium* (**Dellaglio et al. 1994**). Une grande différence évolutive sépare ces bactéries dont le contenu (G+C%) dans leur ADN génomique s'étend de 33 à 67%. Par exemple, *Lactococcus lactis subsp cremoris* (*Lc. Cremoris*) et *Lactococcus lactis subsp lactis* (*Lc.lactis*) sont caractérisées par un

G+C de 34 à 35% respectivement, alors que celui de *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb.bulgaricus*) est de 50% et que les bifidobactéries peuvent atteindre 67% (Dellaglio et al. 1994 ; Pot, 2008).

2. Origine et habitat

Les bactéries lactiques sont des germes ubiquistes aptes à se développer sur différents substrats autres que le lait (Tailliez, 2001). Leur présence est révélée dans plusieurs niches écologiques entre autres végétales (fruits, légumes, céréales, plantes), animales et humaines (tractus digestif, cavités buccales et vaginales). A titre d'exemple, les espèces du genre *Streptococcus*, *Lactococcus* sont présentes chez l'homme et chez les animaux où elles sont isolées à partir de leurs peaux , de leurs matières fécales, et elles sont aussi isolées de l'ensilage du foin et des grains. Dans le domaine laitier, elles existent sur les ustensiles laitiers en quantités considérables (Dellaglio et al. 1994).

Par ailleurs, les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature; elles se trouvent sur les végétaux mais également dans l'intestin des animaux et de l'homme. Certaines espèces comme *Lb. acidophilus* entrent dans la composition de la flore commensale de l'intestin et du vagin, où sa présence empêche l'invasion par *Candida albicans*. Les espèces du genre *Pediococcus* ne se rencontrent pratiquement que sur les plantes (Guiraud, 1998).

3. Physiologie et voies métaboliques centrales

3.1. Catabolisme des sucres

L'une des caractéristiques des bactéries lactiques est qu'elles ne sont capables de cataboliser qu'un nombre restreint de sources de carbone, et via des voies métaboliques linéaires relativement simples (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Suivant les genres ou les espèces, elles utilisent l'une des trois voies suivantes du métabolisme des sucres : la voie homofermentaire, la voie hétérofermentaire et la voie bifide (Fig. 1).

La voie homofermentaire, ou la glycolyse dans sa totalité (du glucose-6-P jusqu'au pyruvate), est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. La glycolyse conduit en condition optimale de croissance, à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose. Le métabolisme est qualifié d'homolactique (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).

Certaines bactéries du genre *Leuconostoc* et *Lactobacillus* qui ne possèdent pas de fructose-1, 6 biphosphate aldolase, ni de triose phosphate isomérase et sont également dépourvues d'un système phosphotransférase (PTS). Elles empruntent une voie hétéro-fermentaire qui conduit à la production d'une molécule de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un ATP par mole de glucose (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).

Enfin, le métabolisme des bactéries du genre *Bifidobacterium* a une voie particulière appelée voie fermentaire bifide ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase (FPC). Dans cette voie, le fructose-6-P est scindé par la fructose-6-phosphate phospho-cétolase en érythrose-4-phosphate et en acétyl-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate pour former de l'acétyl-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (**Atlan et al. 2008**).

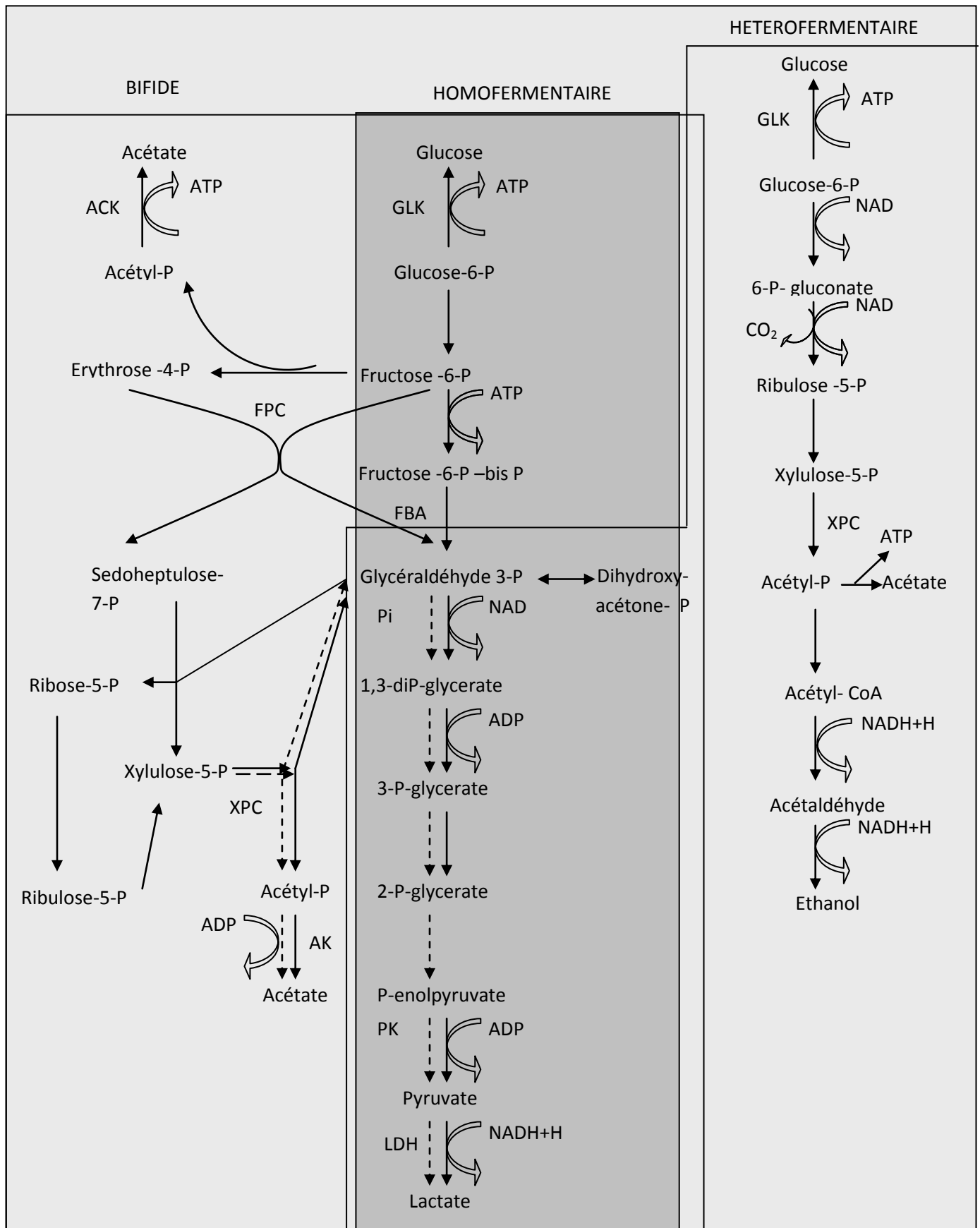


Fig. 1 : Voies métaboliques homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose chez les bactéries lactiques (Atlan et al. 2008).

3.2. Métabolisme de l'acide citrique

L'acide citrique est présent naturellement dans le lait à raison d'une concentration qui varie de 8 à 9 mM (**Garcia-quintans et al. 1998**). Le pyruvate peut en effet résulter du catabolisme des citrates en présence d'une source d'énergie comme le lactose (**Desmazeaud., 1983**). Les concentrations élevées en pyruvate sont en étroite relation avec la capacité de la bactérie à transporter le citrate dans la cellule puis le transformer en pyruvate. Les voies métaboliques du citrate ont été mises en évidence par **Collins et al. (1972)** et expliquées par **Cogan et al. (1981)**.

La première enzyme impliquée dans le métabolisme du citrate est la citrate perméase qui permet le transport de celui-ci vers l'intérieur de la cellule. Cette enzyme est fonctionnelle au pH inférieur à 6 et son optimum est à pH 5. A l'intérieur de la cellule, le citrate est transformé en acétate et en oxaloacétate (Fig.2) par la citrate-lyase (autrement appelée citratase). Chez *Lc lactis* subsp. *diacetylactis*, elle est constitutive et son pH optimum varie entre 7,4 et 7,6. L'oxaloacétate produit au cours de ces réactions de catabolisme est ensuite converti en pyruvate et CO₂ par une oxaloacétate-décarboxylase.

Les étapes conduisant à l'acétoïne s'effectuent en présence des ions Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺ et de la thiamine pyrophosphate. Le reste des enzymes (acétolactate-synthase, diacétyl-réductase, acétoïne-réductase) sont constitutives chez *Lc. lactis* subsp. *dicetylactis* (**Cogan et al. 1981**) ou partiellement inductibles (acétolactate-synthase) chez *Leuconostoc* et chez certaines bactéries hétéro -fermentaires (**Bassit et al. 1994**). **Kempler et Mc Kay (1979)** ont démontré que le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques est lié à la présence d'un plasmide (**Desmazeaud, 1992**).

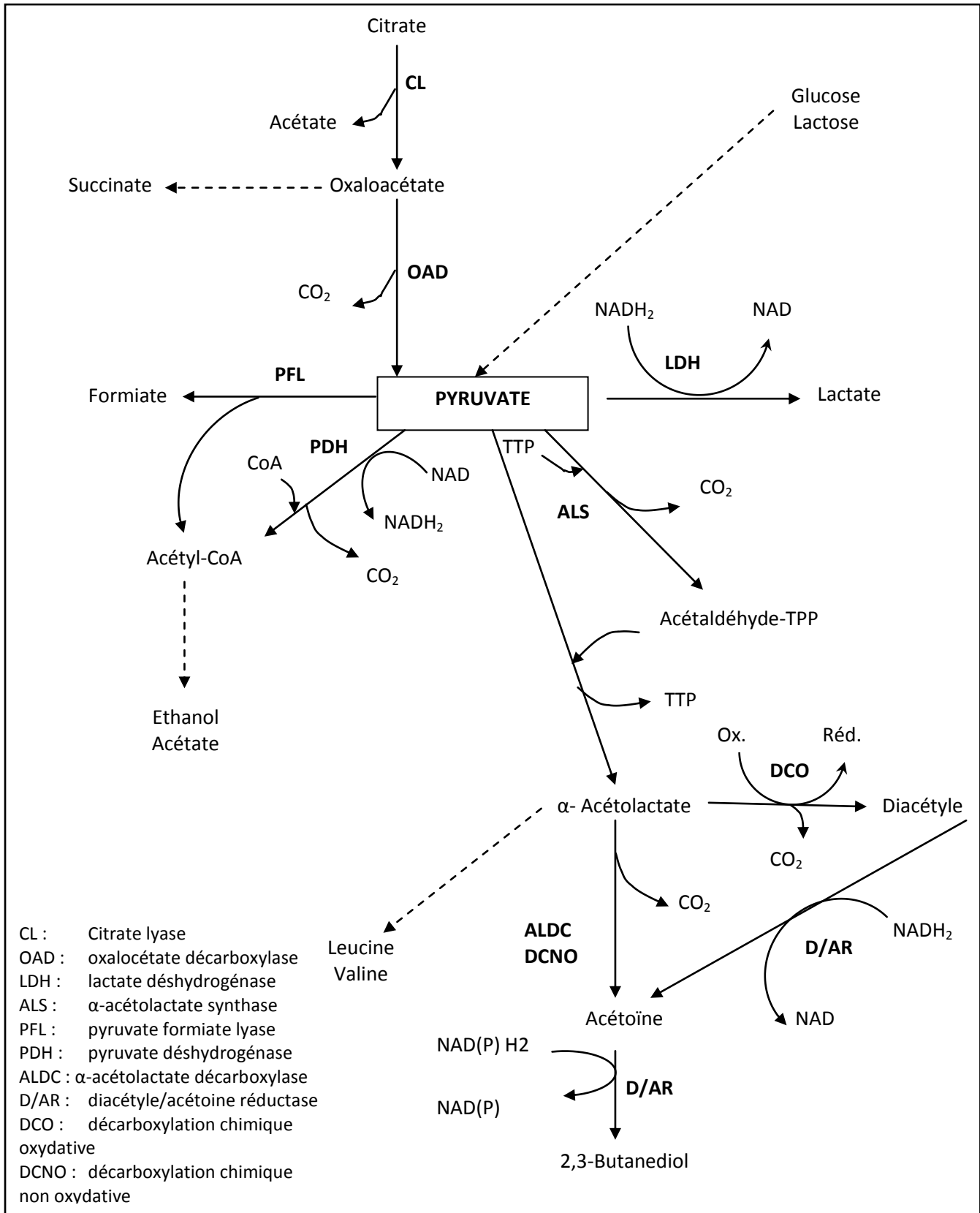


Fig. 2 : Principales étapes du métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques (Atlan et al. 2008).

3.3. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques ont des besoins nutritionnels complexes, et les quantités d'acides aminés ou de courts peptides trouvés dans le lait sont insuffisantes pour une croissance optimale. Des études plus précises ont permis de mettre en évidence des enzymes protéolytiques différentes quant à leur nature et leur localisation. Ces bactéries possèdent des protéases localisées à l'extérieur de la membrane plasmique, liées à la paroi et capables d'hydrolyser la caséine. Cette activité protéolytique est favorisée par les ions calcium et les pH acides. Il a été démontré que les lactobacilles ont une activité protéolytique marquée et produisent à partir des protéines complexes, des composés azotés de bas poids moléculaire. Ce qui explique la situation de *S. thermophilus* cultivée en association avec *Lb. bulgaricus* ou avec *Lb. helveticus* et confirmant l'absence de ces protéases extracellulaires chez la plupart des souches de *S. thermophilus*. De nombreuses protéases intracellulaires ont été caractérisées telles que les métallo-protéases chez *Lc. subsp lactis* et *S. thermophilus*. De nombreuses protéases sont synthétisées par les bactéries lactiques. Elles peuvent être des aminopeptidases, dipeptidases ou tripeptidases, situées au niveau de la membrane plasmique ou dans le cytoplasme (Hols et al. 2005; Atlan et al. 2008).

3.4. Métabolisme de l'oxygène

Les bactéries lactiques sont aéro-tolérantes et l'oxygène peut affecter leur métabolisme, mais aussi leur croissance, leur survie et l'intégrité de leur ADN (Duwat et al. 1995). Certaines espèces comme *Lc. lactis* disposent de quelques oxydases, mais ne sont pas dotées de la cascade d'enzymes de respiration établissant le gradient électrochimique de protons conduisant à la synthèse d'ATP. En présence de l'oxygène, les oxydases à NADH présentes dans le cytoplasme de nombreuses espèces entrent en compétition avec les lactates déshydrogénases pour la régénération des cofacteurs à NADH produits lors de la glycolyse et par conséquent, le métabolisme du pyruvate est modifié (Tailliez, 2001).

Les bactéries lactiques possèdent deux types d'oxydases à NADH. Ces enzymes catalysent la réduction de l'O₂ en H₂O₂ (NADH : H₂O₂ oxydase) ou de l'O₂ en H₂O (NADH : O₂ oxydase) (Fig. 3). Chez certaines espèces de *Lactobacillus*, une pyruvate oxydase et une α -glycérophosphate oxydase peuvent catalyser la réduction de l'O₂ en H₂O₂. L'activité des oxydases conduit généralement à la production moléculaire d'H₂O₂ et, dans une moindre mesure de l'O₂⁻, très toxiques pour les cellules (Desmazeaud, 1992; Dellaglio et al. 1994). Le radical O₂⁻ peut être facilement transformé en H₂O₂ par les super-oxyde dismutases largement répandues chez les bactéries lactiques des genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* (Tailliez, 2001). Les bactéries lactiques se caractérisent par l'absence de catalase, enzyme capable d'éliminer le H₂O₂ du milieu. Certaines souches semblent en effet posséder une pseudo catalase active uniquement en présence d'hème dans le milieu (Desmazeaud, 1992; Tailliez, 2001).

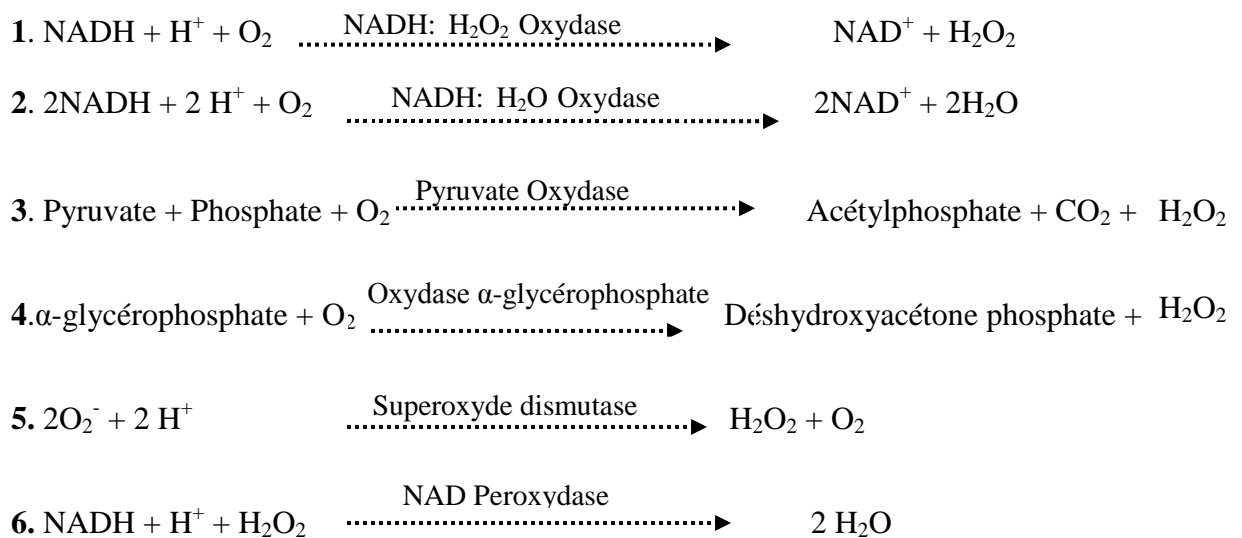


Fig. 3 : Réactions impliquant l'oxygène moléculaire ou des métabolites de l'oxygène, catalysées par des enzymes des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1992).

3.5. Influence des Cations

Le magnésium (Mg^{++}) est un activateur des différentes réactions métaboliques : divisions cellulaires, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique, comme il est essentiel pour les phosphokinases impliquées dans la glycolyse. Le manganèse (Mn^{++}) joue un rôle important pour les bactéries en les protégeant contre la toxicité de l'oxygène. Il se substituerait au super oxyde dismutase pour éliminer les radicaux du super oxyde (O_2^-). Le sodium (Na^+) quant à lui, exerce un effet sélectif sur les différentes espèces de bactéries lactiques (Desmazeaud, 1996).

II. *Streptococcus thermophilus* : Un streptocoque atypique

1. Généralités

S. thermophilus (Fig. 4) est l'une des bactéries lactiques thermophiles, largement employée en tant que levain dans la fabrication de certains produits laitiers fermentés tel que le yaourt (en culture mixe avec *Lb. bulgaricus*) et les fromages à pâte cuite (en culture mixe avec *Lb. helveticus*), notamment la Mozzarella (Hols et al. 2005 ; Delorme, 2008). Elle est connue par une forte production d'arôme tel que l'acétaldéhyde, et par sa capacité de produire de l'acide folique et des exopolysaccharides (Chaves et al. 2002 ; Delorme, 2008). Cette espèce est caractérisée par l'utilisation du glucose seul à partir du lactose, ayant pour résultat des produits fermentés contenant du galactose résiduel (Hols et al. 2005).

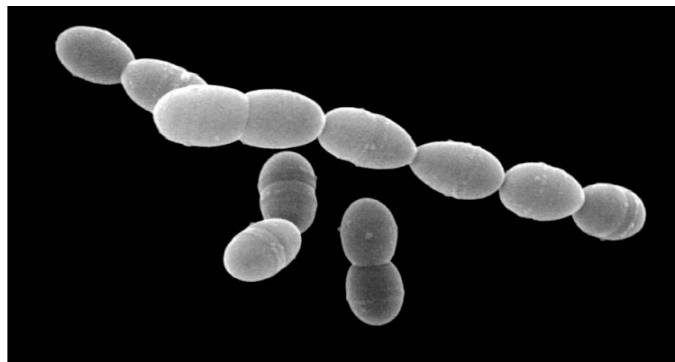


Fig. 4:- Morphologie cellulaire de *S. thermophilus* observée par microscopie électronique (Durso et Hutkins, 2003).

S. thermophilus est la seule espèce non pathogène du genre *Streptococcus*, appartenant au groupe des bactéries ayant un intérêt industriel et nutritionnel reconnu sous le nom GRAS (generally recognized as safe) (**Dellaglio et al. 1994; Hols et al. 2005**). Pourtant, elle est liée à d'autres streptocoques pathogènes tels que *S. pneumoniae* et *S. pyogenes*. Les gènes de la virulence (VRGs) sont absents du génome de *S. thermophilus* ou sont présents seulement comme pseudo gènes (**Hols et al. 2005**).

S. thermophilus possède un pourcentage en G+C (37-40 %) proche de celui des entérocoques et des lactocoques (**Dellaglio et al. 1994**). Des études moléculaires portant sur le séquençage du gène de ARNr 16S ont démontré que *S. thermophilus* est une espèce très distincte des *S. salivarius* et des entérocoques (**Delorme, 2008**).

S. thermophilus appartient au groupe des « streptocoques viridans ». Ce groupe est subdivisé en cinq sous-groupes qui sont :

- (i) le groupe des *mutans* ;
- (ii) le groupe des *anginosus* ;
- (iii) le groupe des *sanguinis* ;
- (iv) le groupe des *mitis* et
- (v) le groupe des *salivarius* (**Facklam, 2002**).

Toutes les espèces du groupe « streptocoques viridans » sont commensales, elles sont trouvées dans les cavités buccales, gastro-intestinales et dans les tractus génitaux des mammifères (**Facklam, 2002**), à l'exception de *S. thermophilus*. Cette espèce appartient au groupe des *salivarius*. Ce groupe comprend à son tour trois espèces, *S. salivarius*, *S. vestibularis* et *S. thermophilus*. Cette espèce diffère des autres coques lactiques homofermentaires par des caractères majeurs, telle que son incapacité à fermenter le maltose et à hydrolyser l'esculine (Tableau I).

Tableau I:Caractéristiques des *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* d'après (Guiraud, 1998).

	<i>Enterococcus</i>			<i>Lactococcus</i>			<i>Streptococcus</i>					
	<i>Ec.durans</i>	<i>Ec.faecalis</i>	<i>Ec.faecium</i>	<i>Lc.lactis ssp cremoris</i>	<i>Lc.lactis ssp lactis</i>	<i>Lc. « diacetylactis »</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. boris</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>
Groupe sérologique	D	D	D	N	N	N	B	D	C	-	A	-
Hémolyse	$\alpha\beta$	β	(α)	γ	γ	γ	(β)	(α)	α	(α)	β	(α)
Croissance à 10°C	V	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	-
Croissance à 45°C	+	+	+	-	-	-	-	V	-	V	-	+
Croissance à pH 9.6	+	+	+	+	-	+	-	V	-	V	-	-
Croissance à 6% Na Cl	+	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-
Croissance sur milieu bilité	+	+	+	-	-	-	V	+	-	V	-	-
Résistance 30min 60°C	V	+	+	V	V	V	-	+	-	-	-	+
Résistance à l'optochine	+	+	+	V	+	V
Croissance sur lait	V	+	+	+	V	+	-	-	-	.	.	-
Arginine	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	+	V
Résistance au tellurite	-	-	-	-
Hydrolyse de l'hippurate	V	V	+	-	V	V	+	-	-	-	-	-
Réduction du TTC	-	-	-	V
Lait tourmesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	.	AC	.	.	A	AC
Lactose	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+
Maltose	(+)	(+)	(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Acétoïne (VP)	V	V	V	+	-	-	V	V	-	-	-	V*
B-glucuronidase	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	-	(-)	-
Gélatinase	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-
Esculine	+	+	+	V	V	V	-	+	-	V	V	-

V: Variable; (+) positive pour la plupart des Souches ; A : Acidification ; R : Réduction ; C : Coagulation ; (.) : Non signalé; * : + sur citrate ; - : négative

2. Propriétés métaboliques et physiologiques de *S. thermophilus*

2.1. Métabolisme des sucres

La fonction première de *S. thermophilus* dans la fermentation des produits laitiers industriels est la conversion du lactose en lactate à des températures élevées. Cette espèce a une capacité limitée à utiliser les hydrates de carbone. Seulement cinq différents sucres sont fermentés par *S. thermophilus* : le glucose, le lactose, le saccharose, le galactose et le fructose. Ce dernier est utilisé par un nombre limité de souches. *S. thermophilus* préfère le lactose au glucose comme première source de carbone et d'énergie. Il co-métabolise le saccharose et le lactose, en utilisant un système Phosphotransférase (PTS) et un non-PTS substrat respectivement. L'utilisation de ces hydrates de carbone n'est pas hiérarchiquement contrôlée (Fig. 5). *S. thermophilus* est incapable de métaboliser le galactose, qui est expulsé dans le milieu au cours du catabolisme du lactose (Mora et al. 2002; Vaillancourt et al. 2004). Les gènes impliqués dans le métabolisme du galactose et du lactose sont situés sur un seul locus (Fig. 5), sur le chromosome de *S. thermophilus*, dans l'ordre lac SZ et gal MKTE (Vaillancourt et al. 2004; van den Bogaard et al. 2004).

Dans la littérature (Bolotin et al. 2004 ; Hols et al. 2005), 10% des gènes de *S. thermophilus* sont non-fonctionnels ou possèdent une faible activité, ils sont appelés pseudo-gènes. En outre, la grande majorité de ces gènes est dédiée pour le transport des sucres dont quatre codants pour les systèmes PTS, qui sont pseudo-gènes chez *S. thermophilus* à savoir: ptsG (glucose), fruA (fructose), bglP (β -glucoside) et trP (tréhalose).

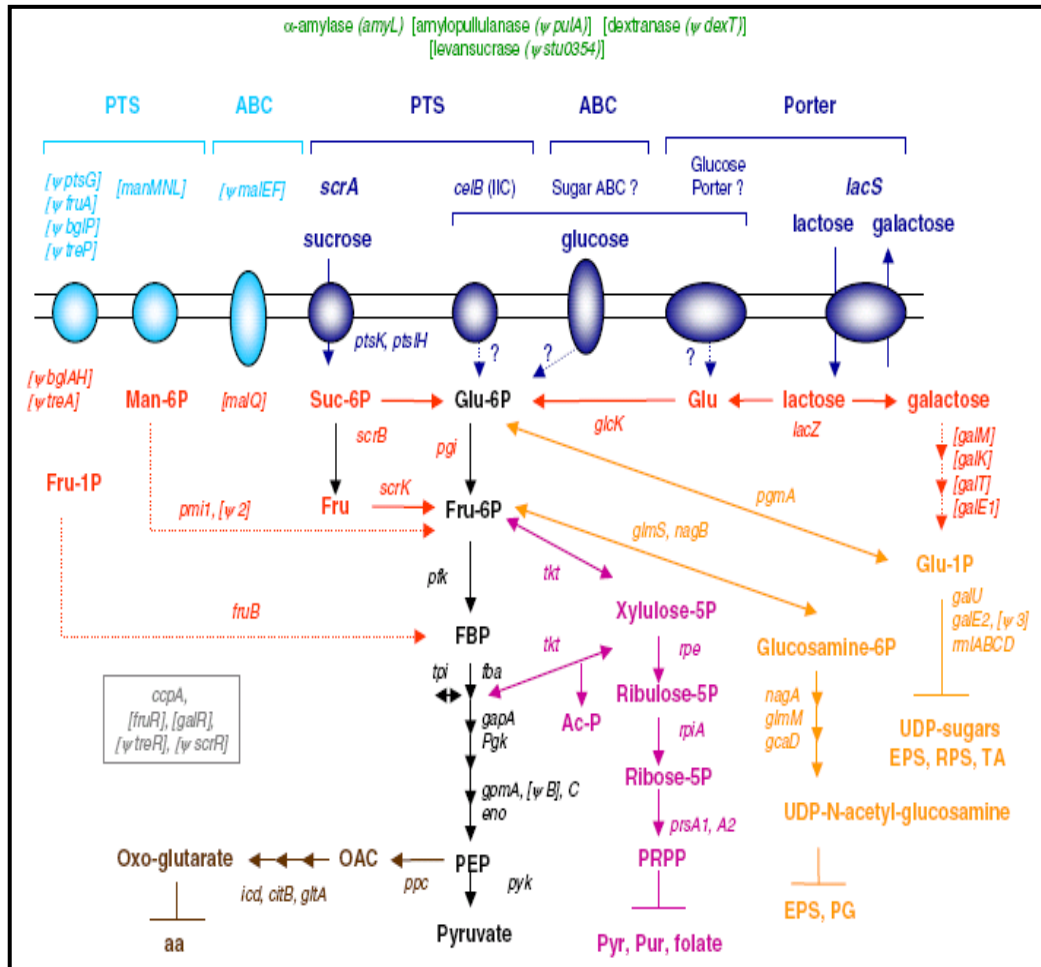


Fig. 5 : Principales voies du métabolisme des sucres chez *S. thermophilus* (Hols et al. 2005).

—> Les flèches en trait continu correspondent à une activité enzymatique active.
 ----> Les flèches en trait discontinu correspondent à une activité enzymatique inactive.
 Les gènes entre parenthèses sont des pseudo-gènes (ψ ou -tr).

- métabolisme des carbohydrates complexes,
- catabolisme des sucres
- glycolyse
- biosynthèse de nucléotide,
- voie phosphate de pentose
- régulation du métabolisme des sucres
- biosynthèse d'Oxoglutarate

Bien que la plupart des souches de cette espèce poussent faiblement sur le glucose, des recherches ultérieures réalisées ont révélé la présence des deux systèmes PTS du glucose (glu-PTS) chez *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* :

- Le premier système appelé man-PTS catalysant la phosphorylation PEP dépendante du glucose, du mannose et du fructose ;
- Le second système appelé glu-PTS spécifique au glucose et l' α -méthylglycoside.

En plus des activités PTS, *S. mutans* et *S. sanguis* possèdent des mécanismes de transport actif, ATP- dépendants permettant l'accumulation du glucose dans la cellule (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).

Par contre, *S. thermophilus* contient des gènes codants pour le Glu-PTS, mais inactifs et sont considérés comme des pseudo gènes (ψ ptsG). Quoique le système man-PTS (man LMN-PTS) semble intact et exprimé, il a été démontré qu'il n'est pas capable de transporter le glucose et le mannose, ce qui laisse un doute sur sa fonctionnalité (**Hols et al. 2005**).

Chez les streptocoques thermophiles, le lactose est transporté dans la cellule par l'intermédiaire d'une perméase (LacS), et son métabolisme comprend l'hydrolyse par la β -galactosidase (LacZ), puis le catabolisme en glucose et en galactose selon les voies de la glycolyse et de Leloir respectivement. Par ailleurs, le transport du lactose est facilité par un mécanisme de transport secondaire impliquant deux modes :

1. le système galactoside-proton (Lactose/H⁺), si la bactérie est mise en culture dans un milieu contenant du lactose grâce à la force proton motrice.
2. le système antiport lactose/galactose indépendant de la force proton motrice pour rejeter le galactose issu de l'hydrolyse du lactose dans le milieu externe, car la plupart des souches de *S. thermophilus* sont de phénotype galactose négatif (gal⁻) (**Poolman, 1993; Konings et al. 1994; Vaillancourt et al. 2004**). La culture en batch limitée en lactose a révélé que certaines souches de *S. thermophilus* utilisent le galactose, de manière incomplète (**Petit et al. 1991**) et par la mesure de l'activité enzymatique, il a été démontré que les enzymes des voies de Leloir UDP 4-glucose

épimerase et UDP glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransférase sont présentes chez *S. thermophilus*, mais le gène codant à la galactokinase (GalK) ne peut pas être exprimé à des niveaux élevés (**Poolman, 1993; Levander et Radstrom, 2001**).

Chez *S. thermophilus*, la régulation du métabolisme des sucres a été étudiée par **Hemme et al. (1980)**. Le pH est un facteur prépondérant de régulation, il module l'activité de l'hexokinase. Contrairement à certaines souches de streptocoques mésophiles qui se cultivent mieux lorsque le milieu contient du lactose ou lorsqu'il contient du glucose et du galactose, chez *S. thermophilus*, il n'y a pas d'inhibition catabolique au profit de la source de carbone la plus accessible (**Hemme et al. 1980**). Il existe à la fois des activités β -galactosidase et phospho- β -galactosidase, ce qui suggère que le lactose est transporté chez cette espèce par le système classique PTS.

2.2. Activité protéolytique

S. thermophilus contient un système protéolytique similaire à celui trouvé chez d'autres bactéries lactiques. Il est composé : (i) d'une protéase extracellulaire capable d'hydrolyse la caséine, (ii) d'un ensemble de systèmes de transport d'acides aminés et de peptides, (iii) d'un ensemble de peptidases intracellulaires impliquées dans l'hydrolyse des peptides dérivés de la caséine et l'entretien du métabolisme domestique (house-keeping) (**Hols et al. 2005**). Bien que *S. thermophilus* soit potentiellement équipé de plus de 20 enzymes protéolytiques, son système protéolytique reste mal caractérisé (**Iyer et al. 2010**).

S. thermophilus possède une protéase extracellulaire "PrtS" liée à la paroi cellulaire. La PrtS est présente dans seulement quelques souches de *S. thermophilus* et sa présence est associée à une croissance et un taux d'acidification rapide dans le lait. La PrtS est essentielle pour la croissance optimale des *S. thermophilus* lorsqu'ils sont cultivés seuls dans le lait. Toutefois, en cas de co-culture avec *Lb. bulgaricus* protéinase-positif, *S. thermophilus* est capable de croître de façon optimale en utilisant les peptides libérés par *Lb. bulgaricus* (**Courtin et al. 2002**). Cette

coopération pourrait expliquer l'absence de PrtS dans de nombreuses souches de *S. thermophilus* (Hols et al. 2005).

2.3. Métabolisme des acides aminés

Le lait contient une faible quantité d'acides aminés et de peptides et la croissance optimale de *S. thermophilus* dans le lait nécessite :

- soit une dégradation de la caséine en peptides et en acides aminés,
- soit la biosynthèse de nouveaux acides aminés nécessaires à cette croissance.

L'étude des voies de biosynthèse des acides aminés chez les souches *S. thermophilus* LMG18311 et *S. thermophilus* CNRZ1066 a montré que toutes les deux possèdent les gènes codants pour les enzymes de biosynthèse de l'ensemble des acides, à l'exception de l'histidine. La conservation relativement élevée des gènes fonctionnels dans la biosynthèse des aminés acides dans *S. thermophilus*, pourrait refléter l'importance de la synthèse des acides aminés pour la croissance dans le lait. Ceci est compatible avec la fréquence faible des pseudo- gènes associés à la biosynthèse des acides aminés (Hols et al. 2005 ; Iyer et al. 2010).

Par ailleurs, le catabolisme des acides aminés joue un rôle important puisqu'il apporte des précurseurs pour la biosynthèse des acides aminés, des nucléotides, des vitamines et de nombreux composants aromatiques clés. Le génome de *S. thermophilus* contient des gènes d'amino- transférase, à savoir trois aspartate amino- transférases (aspC1, asp2, aspC3), une amino- transférase d'acide aminé aromatique (araT) et une amino- transférase d'acides aminés à chaîne branchée (bCAT), ainsi que le gène glyA codant pour l'activité thréonine aldolase (TA) (Chaves et al. 2002).

L'activité glutamate déshydrogénase qui produit par trans-amination des acides aminés, le α -keto-glutarate un composé aromatique, très répandue chez les souches de *S. thermophilus* par rapport à d'autres bactéries lactiques, mais le niveau de l'activité est souche- dépendante. En outre, des dérivés de composés aromatiques de la leucine, la phénylalanine, et la méthionine sont également produits par cette activité (Helink et al. 2004).

L'arôme typique du yaourt est principalement l'acétaldéhyde, il est essentiellement produit par le catabolisme des acides aminés (Ogawa et al. 2000; Chaves et al. 2002). En effet, la production d'acétaldéhyde s'effectue de deux manières, soit directement du métabolisme du lactose par la décarboxylation du pyruvate, soit indirectement par la conversion des acides aminés en passant par le pyruvate. Dans le cas de *S. thermophilus*, la thréonine et la glycine peuvent directement être converties en acétaldéhyde par l'activité de la thréonine aldolase (Ott et al. 2000; Chaves et al. 2002).

2.4. Activité uréasique

Le lait contient naturellement des quantités variables en urée (0,2-0,4g/L). Cette quantité peut altérer le processus de fermentation dans l'industrie laitière. Ce qui pourrait engendrer des risques imprévisibles d'acidification et augmenter le risque de contamination (Monnet et al. 2005) La dégradation de l'urée produit de l'ammoniac, qui agit comme un tampon provoquant une diminution temporaire de la vitesse d'acidification et une augmentation du temps de fermentation. Cette réaction affecte en quelque sorte la texture et l'humidité des produits fermentés. Un retard dans l'acidification pourrait augmenter le coût du processus de fermentation dans l'industrie laitière qui se traduit par une augmentation du risque de contamination.

S. thermophilus est la seule bactérie lactique qui possède une activité uréasique. Autrement dit, qui possède une enzyme appelée uréase qui convertit l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone (CO₂). La production de l'uréase par *S. thermophilus* a été considérée comme préjudiciable à tout ce qui a trait à la production du yogourt et du fromage (Monnet et al. 2005).

Des chercheurs travaillant sur ce sujet ont pu caractériser les gènes responsables de cette activité uréasique. Le cluster formé de *ureIABCDEFGMQO* regroupe l'essentiel des gènes impliqués directement dans l'activité de l'uréase (Fig.6) (Mora et al. 2004 ; Iyer et al. 2010).

La séquence décrite dans la **figure 6**, révèle la présence de huit cadres de lectures organisés de la manière suivante : *ureI* suivi de *ure ABC* (gène de structure)

et de *ureEFCD* (gènes accessoires). L'identification des gènes responsables dans l'activité uréasique semble être d'une grande importance permettant de mieux relever le défi de l'acidification qui cause un certain problème à l'échelle industrielle (Chen et al. 2000 ; Mora et al. 2005).

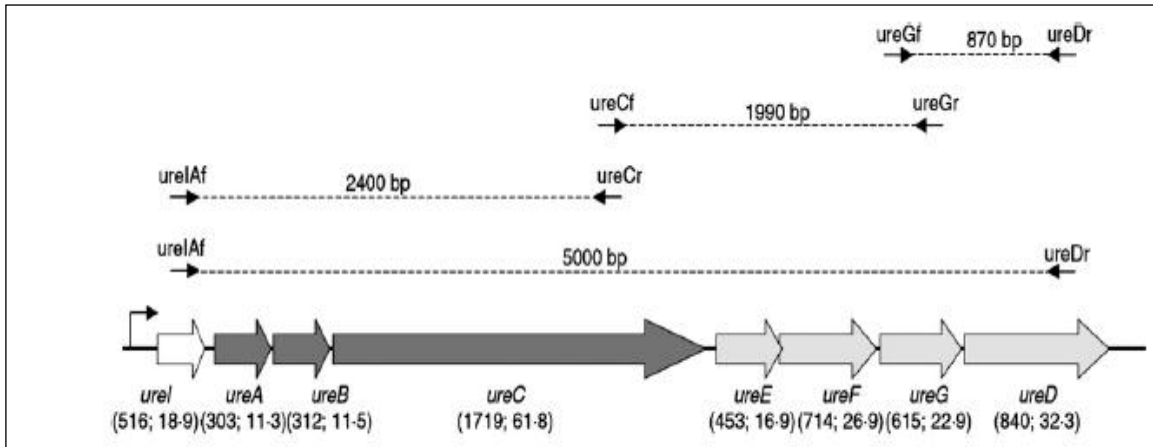


Fig.6 : Organisation partielle des gènes uréase chez *S. thermophilus* (Mora et al. 2004).

2.5. Biosynthèse des folates

Le folate est un composé nutritionnel très important. Il est impliqué dans plusieurs voies métaboliques, principalement la biosynthèse des bases purines et pyrimidine et dans l'inter-conversion des acides aminés. Le déficit en folate chez l'homme provoque plusieurs problèmes, tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et des anomalies du tube neural chez le nouveau-né. L'apport exogène d'acide folique est nécessaire pour prévenir les carences nutritionnelles (Ames, 1999). *S. thermophilus* est une espèce spécifique capable de produire une grande quantité de folate (excrété dans le lait) comparativement aux autres bactéries lactiques (Crittenden et al. 2003). La présence de *S. thermophilus* dans le lait augmente considérablement la quantité du folate pendant la fermentation. Cependant, chaque souche de *S. thermophilus* produit une quantité différente en acide folique. Certaines souches retiennent le folate à l'intérieur de la cellule, tandis que d'autres le secrètent complètement à l'extérieur de la cellule. Les quantités du

folate formées dans le yogourt varient de 2 à 15 µg par 100g, ce qui représente la dose journalière recommandée en acide folique. Actuellement, l'effort se concentre sur l'augmentation du taux du folate dans les laits fermentés. Ceci pourrait être assuré, soit par un choix judicieux des espèces microbiennes et des conditions de culture ou par l'ingénierie métabolique permettant d'atteindre la dose journalière recommandée en acide folique (**Sybesma et al. 2003**).

2.6. Production de bactériocines

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites entre-autres, les bactériocines qui sont des métabolites aux propriétés antibactériennes. Il s'agit de peptides ayant la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes. Les souches de *S. thermophilus* produisent des bactériocines connues sous le nom de thermophiline. Ces bactériocines sont thermostables et actives à différents pH contrairement à une bactériocine appelée la nisine (elle n'est pas utilisée dans les aliments acides). Les bactériocines issues de *S. thermophilus* sont considérées comme sécuritaire en raison de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Somkuti et al. 2003**). Seulement cinq (05) sur 347 bactériocines de différentes souches de *S. thermophilus* ont été caractérisées à savoir :

- a. Thermophiline A (**Ward et SomKuti, 1995**).
- b. Thermophiline T, produite par des souches isolées du fromage "Feta" (**Aktypis et al. 1998**).
- c. Thermophiline 13, une bactériocine séquencée (**Marciser et al. 1997**).
- d. Bactériocine de *S. thermophilus* 81 qui a un large spectre d'inhibition (**Ivanova et al. 1998**).
- e. Bactériocine produite par la souche *S. thermophilus* Adria 91 L 580, isolée à partir d'un fromage à pâte dure (**Malthot et al. 2003**) inhibe le *Clostridium tyrobutyricum*.

III. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques

1. Généralités

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire des polysaccharides (polymère de nature glucidique). Cette caractéristique est très importante dans l'industrie laitière, car elle représente un intérêt technologique et économique majeur de par leurs propriétés stabilisantes, gélifiantes et épaississantes (**Canquil et al. 2007 ; Ai et al. 2008**). Selon leur localisation au niveau de la cellule microbienne, ils sont regroupés en trois classes : les polysaccharides intracellulaires, les polysaccharides constituant l'enveloppe cellulaire (acides téichoïques ou le peptidoglycane), et les polysaccharides extracellulaires excrétés à l'extérieur de la cellule, d'où le terme "exopolysaccharide" (EPS) (**Cerning, 1990; Cerning, 1995; de Vuyst et al. 2003; Atlan et al. 2008**).

Les EPS regroupent les polysaccharides associés à la surface cellulaire formant ainsi la capsule et ceux excrétés dans l'environnement (**Cerning, 1995**). La production de ces polymères est bien connue chez deux espèces de bactéries lactiques : les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *S. thermophilus*, d'où leur utilisation en tant que starters dans la fabrication des yaourts. Les EPS produits par ces deux espèces confèrent aux produits laitiers fermentés une meilleure texture et une bonne viscosité tout en minimisant la synérèse ou la rétention d'eau (**Amatayakul et al. 2006 ; Durlu-Özkaya et al. 2007**).

2. Diversité structurale et classification des exopolysaccharides des bactéries lactiques

2.1. Diversité structurale

Les EPS sont des glucides composés de plusieurs sucres simples avec beaucoup de branchement, ce qui se traduit par une grande diversité structurale. En effet, deux molécules identiques de sucre simple peuvent former onze disaccharides différents, alors que deux acides aminés identiques ne peuvent constituer qu'un seul di-peptide. A cette illustration, il peut s'y ajouter : la diversité des sucres simples

composant les EPS (glucose, mannose, acide glucuronique, rhamnose, galactose, xylose), le nombre des sucres simples, la configuration absolue du sucre (D ou L), la configuration anomérique (α ou β) et la forme cyclique. Les molécules d'EPS peuvent également adopter des structures d'ordre supérieur, par exemple, les molécules de xanthane qui seraient organisées en hélices double-brin antiparallèles (Lemoine et al. 1997; Marschall et al. 2001; Säwen et al. 2010).

2.2. Classification des EPS

2.2.1. Classification selon l'EPS produit

Les EPS sont sécrétés par les microorganismes à l'extérieur du milieu cellulaire. Ce sont des polymères qui peuvent demeurer, soient attachés à la paroi cellulaire sous forme de capsule, soient libérés à l'extérieur de la cellule bactérienne. Certaines souches produisent les deux formes d'EPS, tandis que d'autres n'en produisent qu'une seule forme (Hassan et al. 2003b, Hassan, 2008).

Selon leurs capacités à produire des EPS, les souches ont été classées en « ropy » qui veut dire filantes et « non ropy ». Certaines souches « non ropy » de bactéries lactiques peuvent produire des quantités importantes d'EPS qui pourraient dépasser celles produites par des souches « ropy » (Cerning et al. 1992 ; Van Marle et Zoon, 1995; Hassan et al. 2003b).

Selon l'EPS produit, Hassan (2008) avait proposé une classification des bactéries lactiques en quatre groupes (Fig. 7) :

- **Le groupe I** : comprend des souches ropy (filantes) produisant des EPS capsulaires et des EPS extracellulaires filants.
- **Le groupe II** : comprend des souches ropy qui ne produisent pas des EPS capsulaires.
- **Le groupe III** : comprend des souches non ropy produisant des EPS capsulaires et des EPS extracellulaires
- **Le groupe IV** : comprend des souches formant des EPS capsulaires et ne produisant aucun EPS.

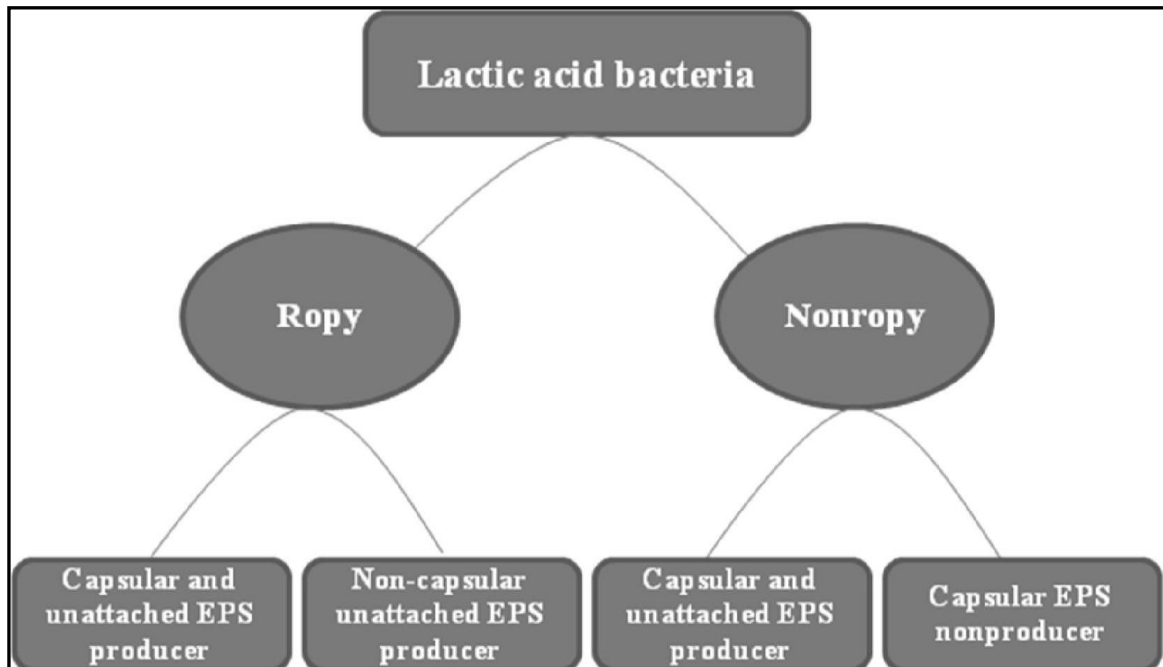


Fig.7 : Classification des bactéries lactiques basée sur le type d’EPS produit
(Hassan, 2008).

2.2.2. Classification selon la composition chimique

Chimiquement parlant, les bactéries lactiques produisent deux types d’EPS : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (de Vuyst et Degeest, 1999, Hassan, 2008) :

a) Les homopolysaccharides

Les homopolysaccharides sont constitués de la répétition d'un seul type de monosaccharide (sucre simple). Parmi les homopolysaccharides, les plus connus, il existe:

- Les α -glucanes, généralement composés de résidus de glucose liés en α -1,6 et α -1,3, comme les dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* et les glucanes par *S. mutans* et *S. sobrinus*.
- Les levanes, synthétisés par *S. salivarius*, constitués de résidus de fructose liés en β -2,6.

La masse moléculaire des homopolysaccharides est de l'ordre de 7×10^6 Da (**Ruas-Madiedo et al. 2002**).

b) Les hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides sont de longues chaînes saccharidiques organisées en sous unités répétées, principalement formées de D-glucoses, D-galactose, L-rhamnose et dans quelques cas du N-acétylglucosamine, ou de l'acide glucuronique, et encore plus rarement, du D-fructose, du L-fucose, du glycérol, du phosphate ou des groupements acétyls sont retrouvées dans ces structures (**de Vuyst et Degeest, 1999 ; de Vuyst et al. 2001**). Par exemple, l'unité répétée des EPS de *S. thermophilus* Sfi39 (Fig. 8) est tétra-saccharidique composée de D-glucose et D-galactose. La masse moléculaire des hétéropolysaccharides est comprise entre 4×10^4 et 6×10^6 Da (**de Vuyst et Degeest, 1999 ; Ruas-Madiedo et al. 2002**).

Les conditions de culture peuvent influencer sur la composition des EPS. 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 de ces polymères (**Gancel et Novel, 1994 ; Grobбен et al. 1996**).

Dans la structure des hétéropolysaccharides, le galactose est souvent majoritaire, probablement parce qu'il n'est pas métabolisé comme le glucose et serait donc disponible pour la synthèse du polymère. Ce cas concerne en particulier l'espèce *S. thermophilus*, qui transforme le lactose en acide lactique en libérant le galactose dans le milieu. Il est possible que ce résidu galactose soit alors utilisé dans la synthèse des EPS par *S. thermophilus* (**de Vos, 1996 ; Welman et Maddox, 2003**).

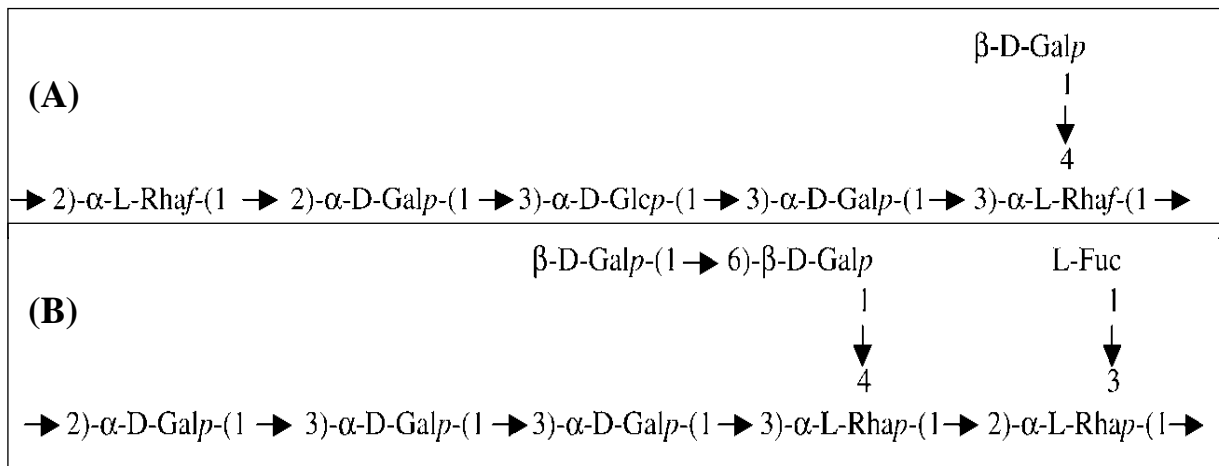


Fig.8 : Composition et structure du motif répété de l'EPS produit par *S. thermophilus* Sfi 39 **(A)** et *S. thermophilus* MR-1C **(B)**. Fuc, fucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acétyle-D-galactosamine; Glc, glucose; Rha, rhamnose; Ac, O-acétyle groupe; *p*, pyranose configuration; et *f*, furanose configuration (**Lemoine et al., 1997 ; Marschall et al. 2001**).

3. Effet et fonction des EPS dans le lait fermenté

L'effet de la production des EPS par les bactéries lactiques sur les caractéristiques physiques des laits fermentés a été largement étudié (**Hassan et al. 1996; de Vuyst et al. 2001; Ruas-Madiedo et al. 2002 ; Hassan et al. 2003b ; Awad et al. 2005**). Une des principales sources de confusion dans la littérature réside dans les termes « ropy ou filant » et « Productrices d'EPS ou ropiness».

En effet, ces termes sont utilisés indifféremment. Certaines souches dites non ropy produisent des quantités importantes d'EPS, alors qu'elles ne sont pas filantes. Généralement, le yaourt filant élaboré par des souches ropy est onctueux, plus lisse, plus épais et moins ferme. Les EPS capsulaires ne sont pas responsables de l'aspect filant du lait fermenté (**Folkenberg et al. 2006, Hassan, 2008**).

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur la fonction des EPS dans le yaourt. Parmi ces facteurs il y a : les caractéristiques moléculaires des EPS (poids

moléculaire, degré de ramification), et leur capacité à interagir avec les protéines du lait (**Ruas-Madiedo et de los Royes-Gavilan, 2005 ; Hassan, 2008**).

La microscopie électronique a montré les EPS sous forme de filaments minces attachés à un réseau de protéine et de cellules bactériennes. Dans le yaourt préparé avec une souche très filante, l'analyse microscopique a pu révéler la présence élevée en masse d'EPS par rapport à une souche non filante. La quantité et le type d'EPS déterminent l'interaction EPS-protéine qui est responsable de la formation de longs filaments. C'est ce qui explique pourquoi l'aspect filant augmente en brassant le lait fermenté. Les EPS dans le yaourt ont un rôle très important puisqu'ils diminuent les interactions entre les agrégats de protéine, en abaissant la fermeté du yaourt, tout en augmentant la sensation d'épaisseur. En plus, les EPS ont une grande capacité d'accroître la rétention d'eau, ils ont la caractéristique de faire piéger le sérum du lait fermenté en diminuant la synérèse (**Hassan et al. 2002b; Ruas-Madiedo et de los Royes-Gavilan, 2005**).

4. Biosynthèse des EPS

Le processus de la biosynthèse des EPS est presque le même chez toutes les bactéries lactiques. Il se déroule dans le cytoplasme grâce à différentes enzymes appelées les glycosyltransférases (Fig. 9). Qualifiées d'être très spécifiques, les glycosyltransférases permettent la formation d'une séquence répétitive de sucre. L'EPS est formé par addition successive de saccharides à partir de sucres précurseurs présents dans le cytoplasme (**Cerning 1990; de Vuyst et Degeest 1999b**). Le premier saccharide est lié à un transporteur lipidique (C55), puis s'ajoutent d'autres unités saccharidiques. Une fois l'unité répétitive est construite, celle-ci est transportée à travers la membrane cellulaire et polymérisée à l'extérieur de la cellule pour former l'hétéropolysaccharide (**van Kranenburg et al. 1998; Ruas-Madiedo et de los Royes-Gavilan, 2005**). Les saccharides précurseurs sont les substrats de la glycosyltransférase. Ce sont des sucres nucléotidiques comme l'UDP-glucose, UDP-galactose ou le dTDP-rhamnose (**van Kranenburg et al. 1998 ; Stinglele et al 1999**).

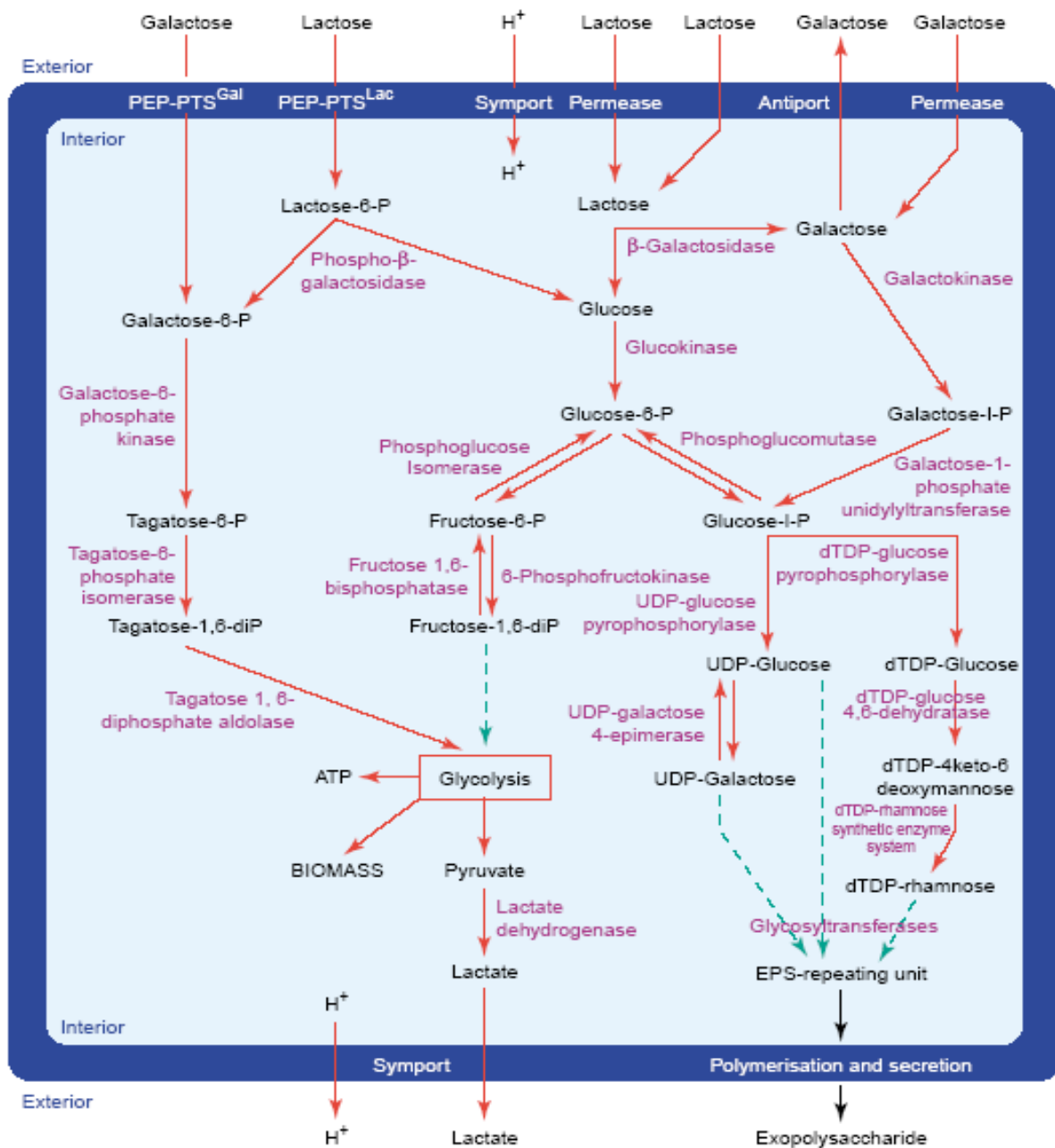


Fig. 9 : Diagramme de la conversion du lactose, galactose et glucose en EPS chez les bactéries lactiques d'après (De Vos et al. 1998).

4.1. Biosynthèse intracellulaire

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des EPS sont localisées dans différentes régions de la cellule microbienne. Elles peuvent être classées en quatre groupes d'enzymes (Tableau II). Après le travail de tous ces groupes d'enzymes, l'EPS est soit attaché à la paroi formant la capsule, soit excrété dans le milieu extérieur de la cellule (Margaritis et Pace 1985 ; Kumar et al. 1997).

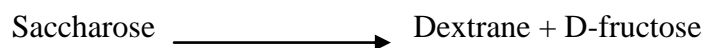
Tableau II : les quatre groupes d'enzymes impliqués dans la synthèse des EPS (Kumar et al. 2007).

	Enzyme	Fonction	localisation
Groupe I	Hexokinase Phosphoglucomutase	Phosphorylation des sucres (glucose-6-phosphate) Convertit le glucose-6-phosphate en glucose 1 phosphate	Cytoplasme
Groupe II	UDP-glucose pyrophosphorylase	Convertit le glucose-1-phosphate en UDP-glucose qui est considéré comme la clé dans la synthèse des EPS.	Cytoplasme
Groupe III	Glycosyltransférase	Permettant l'assemblage de l'unité répétée du sucre activé vers une molécule accepteuse qui est un lipide (lipide porteur)	Membrane cytoplasmique
Groupe IV		Assure la polymérisation des macromolécules	Extérieur de la cellule

4.2. Biosynthèse extracellulaire

La biosynthèse extracellulaire des EPS concerne les homopolysaccharides. Par exemple, la biosynthèse des homopolysaccharides de type glucanes ou fructanes s'effectue par des trans-glycosylases (glycane sucrase) qui à partir du saccharose effectuent la polymérisation en utilisant l'énergie de la liaison osidique (**Monson et al. 2001**).

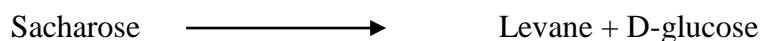
Dans la production du dextrane, une seule enzyme est utilisée, soit la dextrane-sucrase (trans-glycosylase), qui fait le transfert du saccharose vers un réducteur afin d'allonger la chaîne de dextrane selon la réaction suivante :



La formation d'alternane par *Leuconostoc mesenteroides* est assurée par une enzyme alternane -sucrase selon la réaction suivante :



Enfin la biosynthèse des levanes est assurée par une levane -sucrase selon la réaction suivante : (**Vanhooren et Vandamme, 1998**).



5. Génétique de production des EPS

Un nombre important de gènes responsables de la synthèse des EPS a été identifié, particulièrement chez deux souches de bactéries lactiques, *S. thermophilus* Sfi 6 et *Lc. lactis* NIZO B40. L'importance de ces études génétiques donne la possibilité de les manipuler et de les modifier en souches plus performantes. Les gènes *eps* de *Lactococcus lactis* NIZO B40 (Fig. 10 A) se trouvent sur un segment plasmidique de 40 Kb. La région centrale est formée des gènes *eps D, E, F, G, H et I* qui sont impliqués dans la biosynthèse des unités répétitives du polymère. Les gènes *epsA, epsB, epsC* ainsi que *epsK* seraient impliqués dans la polymérisation et

l'exportation de l'EPS formé. Par ailleurs, chez *S. thermophilus* Sfi 6 (Fig. 10 B), les gènes *eps* sont composés de 13 gènes *eps* (*epsA* à *epsM*) formant une région de 14,52Kb dans le génome de cette souche (van Kranenburg et al. 1997 ; Stinglele et al. 1999; Laws et Marshall, 2001).

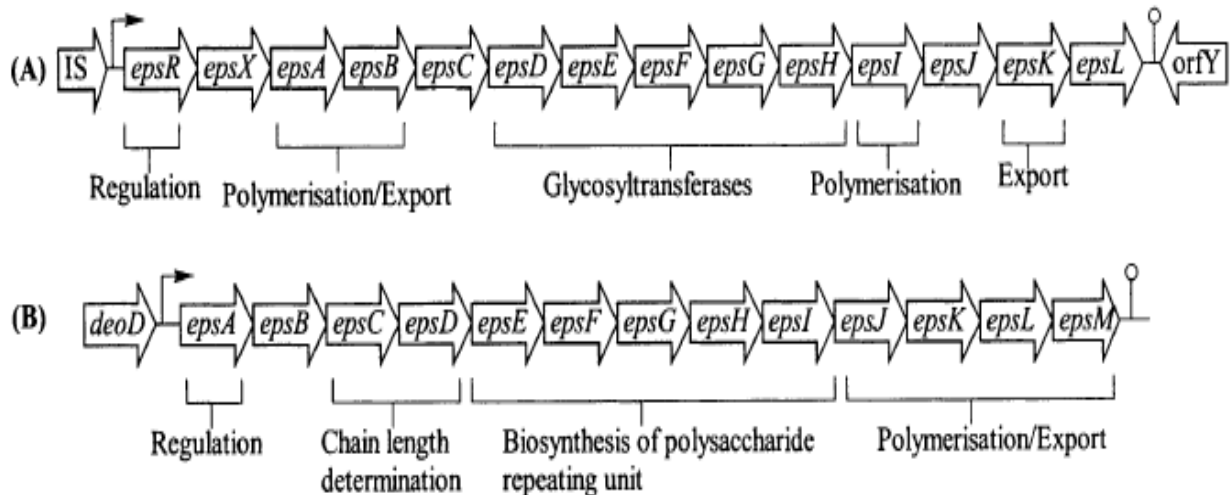


Fig. 10 : Organisation des clusters EPS de : (A) *Lc. lactis* ssp. *cremoris* NIZO B40 (Localisation plasmidique) (Stinglele et al. 1999) et (B) *S. thermophilus* Sfi6 (chromosomique) (van Kranenburg et al., 1997).

Grâce à la connaissance de la génétique de la biosynthèse des EPS, il a déjà été possible de contrôler la production d'EPS, non seulement par les conditions de fermentation, mais aussi en appliquant des techniques génétiques. Ces techniques s'avèrent dans plusieurs cas, très prometteuses, menant à des bactéries lactiques modifiées productrices de grande quantité d'EPS (Stinglele et al. 1996; Welman et Maddox, 2003).

6. Biosynthèse des EPS par *S. thermophilus*

Les EPS de *S. thermophilus* sont des hétéropolysaccharides composés de plusieurs types de sucre, principalement de : glucose, galactose et un monomère de rhamnose, et aussi de N-acétyl-galctosamine, de fucose et d'acétyl galactose (Degeest et d Vuyst, 1999 ; Laws et al. 2001, Navarini et al. 2001).

Au moins 12 gènes responsables de la biosynthèse des EPS par *S. thermophilus* ont été séquencés (Broadbent et al. 2003 ; Bolotin et al. 2004). Plus de 60 gènes codants à des EPS différents ont été proposés par différentes études en se basant sur des techniques de biologie moléculaire très modernes, comme la RFLP [Random Fragment Length Polymorphism] (Stingele, 1998 ;Stingele et al. 1999).

Généralement, les clusters d'EPS de *S. thermophilus* présentent une variabilité génétique importante due probablement à l'élément génétique mobile (les gènes variables) présent dans le génome de la plupart des espèces de *Streptococcus* (Rallu et al. 2002). Les gènes de structure des EPS sont organisés par un opéron structuré de la manière suivante : gènes de régulation (epsA, epsB), gènes responsables de la longueur de la chaîne et de son exportation (epsC, epsD), gènes responsables de la répétition des unités (epsE, epsF, epsG et epsI), gènes responsables de la polymérisation et de l'exportation des oses (epsK, epsL et epsM) (Bourgoin et al. 1999).

La production des EPS dépend en effet des souches productrices. Bien évidemment, son élaboration sur le plan expérimental dépend des conditions de culture telles que : la température, le pH, la source de carbone, la concentration et le ratio carbone/ azote (Gancel et Novel, 1994 ; Grobber et al. 1995, 1996 ; Degeest et al. 2001).

7. Application et rôle des EPS

Produits par des espèces microbiennes telles que les bactéries lactiques mésophiles ou thermophiles, les EPS sont utilisés dans l'industrie laitière comme agents épaississants, gélifiants, stabilisants et émulsifiants des produits laitiers fermentés. Ces microorganismes ont la capacité d'offrir un produit laitier avec des

propriétés organoleptiques et nutritionnelles exceptionnelles. Car, les EPS augmentent la viscosité et diminuent la synérèse (rétention d'eau). Cela pourrait éviter l'utilisation des additifs alimentaires de synthèse ou chimiques. C'est de cette manière qu'il est possible de répondre à la demande du consommateur qui préfère des produits sans additifs alimentaires. Une autre application possible des bactéries lactiques productrices d'EPS est leur utilisation comme levains de panification. Dans ce cas, les EPS aident à ramollir le gluten et ainsi à améliorer la texture et à augmenter le volume spécifique du produit boulanger (**de Vuyst et al. 2001**).

Par ailleurs, beaucoup d'études ont vu le jour concernant la fonction physiologique des EPS. Ces études ont montré que les EPS produits par les bactéries lactiques ont une influence sur le système immunitaire. Ils ont en effet une action sur la prolifération des lymphocytes T, sur l'activation des macrophages et sur l'induction ou la libération des cytokines (interféron-gamma, interleukine-1 alpha). Les EPS ont aussi un pouvoir de modifier certaines fonctions des macrophages et des splénocytes (**Vinderola et al. 2006**). Le kéfir, un lait fermenté turque, contient des EPS solubles dans l'eau. Ces EPS montrent une action immunomodulatrice chez certains modèles animaux. Cette immuno- modulation se traduit par une augmentation de la capacité phagocytose des macrophages du péritoine et des poumons (**Vinderola et al. 2005b**).

Une administration orale des EPS a un effet sur le retard de la croissance cancéreuse grâce probablement à la participation du lymphocyte T. De cette façon, les EPS pourraient contribuer à offrir une source d'aliments plus sains pour les consommateurs (**Zubillaga et al. 2001**).

Objectifs

Comme il a décrit précédemment, l'objectif principal de ce travail a été de procéder au dépistage systématique de souches, de *S. thermophilus* productrices d'EPS, isolées à partir de différents écosystèmes laitiers à savoir le lait cru, le leben et le beurre traditionnel. Les méthodes de recherches ont porté dans une première étape sur la détection phénotypique des souches susceptibles d'être productrices d'EPS, par examens visuels des colonies bactériennes présentant un aspect muqueux.

Sur la base des premières observations et la pré-identification des souches détectées, une seconde étape a consisté en la confirmation par identification moléculaire, l'appartenance des souches repérées, à l'espèce *S. thermophilus*.

C'est à l'issue des résultats de ces premiers travaux, que notre attention a été attirée vers une souche dont la spécificité est caractérisée par sa capacité exceptionnelle de produire des EPS sur les milieux utilisés.

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Milieux de culture et conditions de croissance

Les souches de streptocoques thermophiles ont été isolées et cultivées sur milieu M17 (OXOID) additionné de 5 g/L de lactose (LM17) et ajusté à pH 7. Le milieu LM17 favorise le développement de la plupart des coques de la flore lactique par l'effet tampon du bêta-glycérophosphate de sodium (**Guiraud, 1998**). Les milieux solides ont été préparés par addition d'agar-agar à raison de 2% (p/v).

Etant donné que les streptocoques thermophiles se développent à des températures optimales supérieures à 37°C (**Guiraud, 1998**), l'incubation des cultures s'effectue à 42°C. Cette température est une température de croissance optimale pour la plupart des souches de l'espèce *S. thermophilus* (**de Vuyst et al. 1998**). *S. thermophilus* est connu par ailleurs pour être une bactérie lactique anaérobie et quelquefois aérotolérante; pour cela les cultures en boîtes de *Petri* sont maintenues pendant l'incubation sous un pourcentage de 10% de CO₂ en utilisant le système « candle jarre ».

II. Conservation des souches

Toutes les souches mères isolées et pré-identifiées en tant que *S. thermophilus* ont été conservées à long terme à (-80°C) ou à (-20°C) sur milieu LM17 en présence de 20% (v/v) de glycérol (**Bennama et al. 2012a**). Pour une utilisation usuelle des souches, un stock est réalisé à partir des souches mères par repiquage sur LM17 agar et maintenu à (+4°C) pendant quatre semaines. Ce stock est renouvelé selon les besoins à partir de la banque des souches mères par une simple réactivation sur LM17.

III. Souches de *S. thermophilus*

L'ensemble des souches isolées et identifiées comme *S. thermophilus* et celles de références utilisées dans le présent travail est cité dans le tableau (III).

Tableau III : Souches isolées de *S. thermophilus* et celles de références utilisées dans le présent travail.

Souches	Source	Référence	phénotype d'EPS ^(a)
BN1	Lait de vache	Présente étude	+
BN2	Lait de vache	Présente étude	+
BN3	Lait de vache	Présente étude	+
P1	Lait de vache	Présente étude	-
P2	Lait de vache	Présente étude	-
P3	Lait de vache	Présente étude	-
P4	Lait de vache	Présente étude	-
S5	Lait de vache	Présente étude	+
SPG	Lait de vache	Présente étude	+
SN3	Beurre traditionnel	Présente étude	-
SN4	Beurre traditionnel	Présente étude	-
LB	Leben	Présente étude	+
SA	Leben	Présente étude	-
SB	Leben	Présente étude	-
T4	Leben	Présente étude	-
T5	Leben	Présente étude	-
CNRZ1066	Yoghurt	Souche de référence, INRA, France	-
LMD-9	Yoghurt	Souche de référence, NCCB collection, Hollande	+
LMG 18311	Yoghurt	Souche de référence : BCCM collection, Belgique	-

(a) : phénotype d'EPS+ attribué par examen visuel.

- BCCM: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms,
- NCCB: Netherlands Culture Collection of Bacteria,
- INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

IV. Echantillons de produits laitiers étudiés

S. thermophilus est une espèce qui peut être présente dans différents écosystèmes laitiers ou autres. Au cours de ce travail, la recherche et l'isolement de cette espèce thermophile ont été effectués à partir du lait cru de vache, du Leben et du beurre traditionnel.

1. Echantillons de lait cru

Les échantillons de lait cru ont été prélevés aseptiquement à partir de vaches originaires de la willaya de Mostaganem. Le lait est recueilli dans des flacons stériles placés tout près du mamelon afin d'éviter toute contamination. Un total de cinquante échantillons de lait cru a été collecté à partir duquel une quinzaine se sont avérés contenir des streptocoques thermophiles. Le reste des échantillons aussi analysé a été caractérisé par la dominance des entérocoques, Les résultats issus de cette dernière analyse n'ont pas été pris en considération.

2. Echantillons de produits laitiers fermentés traditionnels

Les produits concernés sont le Leben et le beurre traditionnel. Ils ont été collectés au niveau des différents points de ventes des préparations artisanales à Mostaganem. Le Leben est une boisson de lait fermenté très populaire et largement consommée dans cette région. Il est élaboré à base de lait cru fermenté à température ambiante et partiellement débarrassé de sa matière grasse. Celle-ci constitue le beurre traditionnel. Pour ces deux produits, dix échantillons de Leben et quatre autres de beurre traditionnel ont été analysés.

V. Techniques d'isolement des streptocoques thermophiles

Une fois reçu au laboratoire, tous ces échantillons étudiés (lait, leben et beurre traditionnel) ont subi une série de dilutions dans la peptone saline [(peptone 1g/L) et NaCl (8.5 g/L), pH 7]. A partir des dilutions établies, des aliquotes de 100µl sont prélevées et étalées à la surface du milieu LM17 agar. Les boîtes sont ensuite incubées à 42°C pendant 72 heures.

VI. Caractérisation phénotypique des souches

1. Pré-identification des souches

Etant donné que l'objectif premier de cette thèse concerne la recherche des *S. thermophilus* producteur d'EPS (EPS+), l'étape de pré-identification a porté sur la détection des colonies de type punctiforme et d'apparence muqueuse ou visqueuse. Les colonies repérées ont été pré-identifiées par la détermination des caractères généraux des streptocoques thermophiles classés comme coques lactiques. Pour ce faire, toutes les colonies suspectes ont été soumises au test de la catalase, suivi d'une observation microscopique à l'état frais et une coloration de Gram.

1.1. Test à catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10volumes) dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de la catalase.

1.2. Observation microscopique à l'état frais

Sur une lame une suspension homogène est préparée à partir d'un petit prélèvement d'une colonie dans une gouttelette d'eau. Cette préparation est recouverte délicatement d'une lamelle. L'observation s'effectue rapidement à l'objectif 40 et consiste à vérifier la mobilité de la souche et, sa forme et son mode d'association.

1.3. Coloration de Gram

Cette technique consiste à couvrir des frottis préparés sur des lames d'une solution de violet gentiane pendant une minute. Le violet de gentiane est ensuite éliminé en faisant couler sur les lames une solution de Lugol (2 fois en laissant agir chaque fois 20 Secondes). Les lames sont décolorées à l'alcool à 95° jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 à 10 secondes). Les préparations sont rincées immédiatement à l'eau et recouvertes d'une solution de fuchsine pendant 1 minute.

Enfin, les lames sont rincées à l'eau puis séchées et observées au microscopique. Chaque souche pré-identifiée est purifiée par repiquage sur milieu LM17 agar et conservée pour une utilisation ultérieure.

2. Identification biochimique des souches

L'identification biochimique des souches a été effectuée par la réalisation d'un certain nombre de tests clés rapportés par **Guiraud (1998)**. Pour la plupart des tests établis sur milieux liquides, la lecture consiste en la détection ou le développement d'un trouble dans les tubes, reflétant ainsi une croissance bactérienne.

2.1. Détermination du Type fermentaire

Pour déterminer le type fermentaire (homo/hétéro fermentaire), les souches sont repiquées sur le LM17 contenant une cloche de Durham, qui permet d'apprécier la production éventuelle de gaz. L'incubation s'effectue à 42°C pendant 24 heures.

2.2. Test de croissance à 10°C et à 45°C

L'aptitude des souches à la croissance à 10°C et à 45°C a été vérifiée en ensemençant deux tubes de LM17 à partir de chaque culture purifiée. Le tube à 45°C est examiné au bout d'un délai de 24 à 48 heures et celui à 10°C après 7 à 10 jours.

2.3. Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl

La croissance est testée en ensemençant trois tubes de LM17 portés aux concentrations de 4% et 6,5% (P/V) de NaCl. Les tubes sont incubés à 42°C pendant 24 heures.

2.4. Test de thermorésistance

Ce test est réalisé en inoculant 100 µl de pré-culture de chaque souche dans un tube de LM17. Ces tubes sont chauffés dans un bain-marie réglé à 60°C pendant 30 minutes. Après cette opération, les tubes sont refroidis sous un jet d'eau froide et incubés à 42°C pendant 24 heures.

2.5. Fermentation des sucres

L'identification des espèces de bactéries lactiques est basée essentiellement sur la fermentation des sucres. Celle des *Streptocoques thermophiles* concerne les sucres clés suivants: glucose, galactose, lactose, maltose, cellobiose, mannitol, sorbitol, saccharose, raffinose, salicine. Pour l'établissement de ce profil fermentaire, les souches sont cultivées sur LM17 et incubées à 42°C pendant 24h. Après ce délai, 5ml de chaque culture sont centrifugés (5000xg, 5 min) et lavés deux fois en utilisant de la peptone saline. Ensuite, le surnageant est écarté et le culot est re-suspendu dans 1ml de peptone saline. La suspension ainsi obtenue sert à ensemercer le milieu M17 contenant l'indicateur coloré le pourpre de bromocresol (**BCP**), additionné de 2% des sucres précédemment cités. Les cultures ainsi établies sont recouvertes d'une couche d'huile de paraffine stérile afin d'assurer l'anaérobiose. Les cultures sont incubées à 42°C de 24h à 48h. La fermentation des sucres est révélée par le virement de l'indicateur (BCP) du violet au jaune.

2.6. Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur LM17 agar additionnée de 0,3% d'amidon soluble stérile. L'ensemencement s'effectue par points (spots) à la surface du milieu par une ôse bactérienne prélevée d'une culture solide de 18 heures. Après trois jours d'incubation à 42°C, l'hydrolyse de l'amidon est révélée par une solution de lugol, qui colore en bleu foncé les zones où il n'y a pas eu d'hydrolyse.

2.7. Hydrolyse de l'esculine

Ce test concerne la recherche de l'enzyme esculine hydrolase. Cette enzyme hydrolyse l'esculine (un hétéroside) en glucose et esculétine. L'esculétine donne en présence du citrate ferrique une coloration noire due à la formation d'esculine ferrique. Cette activité enzymatique a été mise en évidence chez les souches isolées sur milieu esculine agar dont la composition d'après **Guiraud (1998)** comporte les ingrédients suivants : [peptone 5g, citrate de fer 0,5g, esculine 0,5g, agar-agar 18g, pH 7,4]. Après ensemencement et incubation à 42°C pendant 48h, toute coloration

noire du milieu signifie la présence de l'enzyme. Les *S. thermophilus* sont dépourvues de cette activité enzymatique.

2.8. Croissance sur le lait bleu de Shermann

Ce test est effectué sur le lait écrémé stérile additionné de 1% (v/v) de bleu de méthylène,ensemencé par les souches et incubé à 42°C pendant 48h. Les streptocoques thermophiles sont incapables de croître dans ce milieu.

2.9. Croissance sur pH 9,6

Les souches sont mises en culture sur bouillon LM17 ajusté à pH 9,6 et incubées à 42°C pendant 24h.

VII. Caractérisation moléculaire des souches

Afin de déterminer avec précision l'identification des souches isolées, des méthodes moléculaires sont utilisées. Il s'agit de la réalisation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) du gène codant à l'ARNr 16S qui a été effectuée en utilisant les amorces universelles PA/ PH` en se référant au protocole décrit par **Edwards et al. (1989)**. Toutes les techniques moléculaires qui suivent sont basées sur l'obtention de l'ADN total bactérien.

1. Extraction et purification de l'ADN total bactérien

Le protocole suivi dans l'obtention de l'ADN bactérien a été effectué selon la méthode décrite par **de Vos et Simons (1994)**. Pour ce faire, à partir des souches cultivées sur LM17 agar, une seule colonie est repiquée dans 10ml de LM17 et incubée à 42°C pour obtenir une culture en phase exponentielle.

La culture en phase exponentielle est centrifugée à (3000xg, 10min). Le surnageant est écarté et le culot est re-suspendu dans 1ml de tampon de lyse le THMS (30mM Tris-HCl pH 8 ; 3mM MgCl₂ ; 25% saccharose) additionné de 2mg/ml de lysozyme et transféré dans un tube à Eppendorff.

La préparation est ainsi incubée à 37°C pendant une heure de temps. Après la lyse cellulaire, la préparation est centrifugée une seconde fois à (3000xg, 5min). Ensuite,

le culot est repris dans 100µl du tampon THMS. Cette étape est suivie par addition de 400µl de tampon TES (50mM Tris-HCl pH 8 ; 5mM EDTA ; 50mM NaCl) additionné de 0,5% de Sodium Dodécyl sulphate (SDS). Enfin, un volume de phénol (environ 500µl) est ajouté à la préparation, suivi d'une centrifugation (3000xg, 5min).

La phase supérieure est transvasée dans un tube à Eppendorf neuf et additionnée respectivement d'un volume d'environ 0,5 part de phénol et 0,5 part de chloroforme. Le mélange ainsi obtenu est centrifugé pendant 5min, l'opération d'extraction est répétée jusqu'à l'obtention d'une interphase limpide. Une dernière extraction est effectuée par addition de 0,5 volume de chloroforme. Après nouvelle centrifugation (3000xg, 1min), la phase supérieure est ainsi récupérée et additionnée de 50µL de 3M d'acétate de sodium et 1mL d'éthanol absolu (100%). Cette étape a trait à la précipitation de l'ADN qui se déroule à température ambiante pendant 10min. L'ADN apparaît comme un fil blanc, il sera repêché après centrifugation (10.000xg, 15min, +4°C). Le culot est lavé à l'éthanol 70% (v/v) puis séché pendant 15min à température ambiante et repris dans 100µl de tris EDTA (TE) (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). L'ADN obtenu est conservé à +4°C.

2. La réaction en chaîne de polymérase (PCR)

Les amorces oligonucléotidiques universelles **pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')** et **pH' (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3')** (Sigma-genosys) ont été utilisées pour amplifier les gènes codants à l'ARNr 16S. La technique consiste à introduire 1µl de l'ADN bactérien dans un volume réactionnel final de 50µl contenant 0,5 unités de Taq polymérase (Eppendorf), 200nM de chacune des deux amorces (pA, pH') et 0,2mM de dNTPs.

La réaction s'effectue dans un thermocycleur « MyCycler™ » (Bio-Rad, Etats-Unis). Ce programme d'amplification commence par une dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles d'amplification, de chaque base à 94°C pendant 30 sec, et de 45 sec d'hybridation (annealing) des oligonucléotides à 50°C. Enfin une période d'élongation à 68°C dont la durée dépendrait de la taille du fragment attendu. La réaction s'achève par une période d'extension finale à 68°C pendant 10 min.

3. Electrophorèse sur gel agarose et visualisation des fragments d'ADN

Les produits d'amplifications sont séparés sur un gel d'électrophorèse à 0,8% (p/v) d'agarose dans une solution tampon TAE (40 mM Tris-acétate, EDTA 1 mM, pH 8). Avant de charger dans le gel, les échantillons sont colorés par un mélange composé de [(0,25% de bleu de bromophénol et de 50% de glycérol) en présence du TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8)]. Afin de déterminer la taille de chaque fragment, le marqueur de taille 10kb (Fermentas, lithuania) est utilisé (Fig. 11).

La migration se fait sous un voltage de 90Volts dans les cuves à électrophorèse horizontale (Bio Rad). Après coloration avec une solution de bromure d'éthidium à (1 mg/mL), le gel est observé sur le transilluminateur à UV grâce à la fluorescence sous émissions d'UV du complexe ADN-UV.

pb

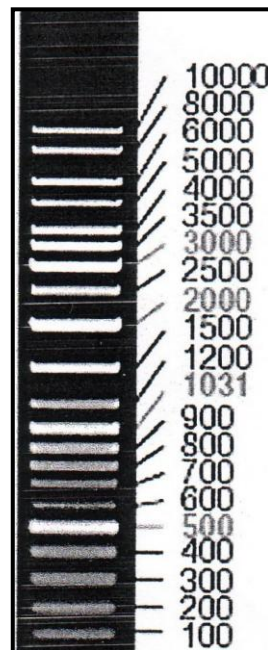


Fig. 11 : Marqueur de taille ou de poids moléculaire (Fermentas), utilisé dans la présente étude

4. Purification des fragments d'ADN

Dans certains cas de purification des fragments d'ADN à partir des gels d'agarose ou des produits d'amplification, le kit "Gen Elute PCR UP Sigma" a été utilisé en suivant les instructions recommandées par le fournisseur et portées sur la notice y afférente.

4. Analyse et séquençage de l'ADN amplifié

Les échantillons d'amplification ont été séquencés au service automatisé de séquençage ADN (SecuGen) au Centre de Recherche Biologique, CSIC, à Madrid (Espagne), utilisant un ABI PRISM 373. Les résultats obtenus nous sont communiqués pour analyses sous forme de séquences. Ces dernières ont été lues et analysées avec le programme de Chromas v 1.45.

Les séquences nucléotidiques traitées ont été comparées à des séquences d'ADN déposées au niveau du Centre International de l'Information biotechnologique "NCBI", en utilisant l'Outil de Recherche Basique d'Alignement Local (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

VIII. Etude de la production des EPS

1. Détection des souches Productrices d'EPS

La détection des souches productrices d'EPS a été effectuée selon deux méthodes. La première méthode signalée précédemment a concerné la description des souches via l'apparence muqueuse ou visqueuse des colonies développées sur LM17 agar après 24h d'incubation à 42°C.

La seconde méthode a porté sur la mise en évidence à l'état frais de la capsule par la technique de l'encre de chine, réalisée en mettant en contact sur une lame une goutte d'une suspension bactérienne avec une gouttelette d'encre de chine. La préparation est recouverte d'une lamelle et l'observation s'effectue à l'objectif 40. Si elle est présente, la capsule apparaîtra sous la forme d'un halo clair et réfringent entourant la cellule bactérienne.

2. Caractérisation moléculaire partielle de la production des EPS

2.1. Détection et séquençage des gènes de la glycosyltransférase (GT)

La détection des gènes codants à la GT a été réalisée par PCR, en utilisant l'ADN chromosomique des souches BN1, BN2, BN3 ainsi que trois souches de références, suivant les conditions décrites par **Provencher et al. (2003)**. Ce protocole est basé sur l'utilisation des amorces nucléotidiques hybrides, **F-36** (5' **TCATTTTATTCGTAAAACCTCAATTGAYGARYTNCC** 3') et **R-27** (5' **AATATTATTACGACCTSWNAYYTGCCA3'**) (**Sigma**) à raison d'une concentration initiale de 10mM dans un volume réactionnel final de 25µL. Les réactions de PCR ont été effectuées dans le thermocycleur MyCycler™ (Bio-Rad, Etats-Unis). Brièvement, le programme de PCR comprend 45 cycles, dont la phase d'annealing se déroule à 62°C pendant 30 Sec et la phase d'élongation à 72°C pendant 10min. Après amplification, les produits de PCR sont conservés à +4°C.

2.2. Visualisation du gel et purification des fragments de PCR-GT

Afin de vérifier le succès de la réaction précédente et étant donné que la taille du fragment attendu est d'un poids moléculaire inférieur à 0,3 kb, nous avons à cet effet effectué la migration d'une aliquote de produit PCR sur un gel d'agarose à 2% (p/v). Après lecture et localisation des bandes spécifiques, nous avons procédé à la purification de ces dernières. Les bandes spécifiques fluorescentes ont été directement coupées à l'aide d'un scalpel à partir du gel sous la lumière UV. Les deux bandes relatives à l'ADN des souches BN1 et BN3 ont été extraites du gel en utilisant le kit (illustra, Gfx PCR DNA and gel band purification kit).

2.3. Transformation bactérienne et extraction de l'ADN plasmidique

Le produit d'amplification par PCR a été cloné dans un plasmide « pGEM-T Easy Vector » (Promega, Espagne) en suivant le protocole cité par le fabricant. La purification de plasmides et l'analyse des fragments d'ADN ont été réalisées selon le protocole de **Sambrook et Russell (2001)**. L'analyse de la séquence d'ADN a été réalisée comme il a été décrit précédemment.

2.3.1. Réactions de clonage et de transformation

Le clonage de l'insert codant à la GT a été effectué dans un volume réactionnel final de 6 µl comportant 3 unités de la ligase (ADN ligase T4), 5µl du tampon spécifique à la ligase (rapid ligation buffer, ADN ligase T4), 1µl du plasmide pGEM-T et 1µl de l'insert purifié. Cette préparation appelée aussi la ligation (ligature) est incubée pendant une nuit à 4°C. Cette réaction de ligation *in vitro* permet d'obtenir un ADN recombinant portant l'insert.

Pour le protocole de transformation, la souche *E. coli* JM 109 est utilisée. Cette souche est cultivée sur milieu LB [5g/L d'extrait de levure, 10g/L de peptone et 10g/L de NaCl, pH 7]. Pour la transformation, un volume déterminé de chaque réaction de ligation (ADN recombinant) est additionné un autre volume de la souche *E. coli* JM 109, le tout est incubé sur la glace pendant 20min. Un choc thermique de 50 Sec à 42°C est ensuite effectué. La culture est incubée à 37°C sous agitation rapide pendant 1h30. Les cellules transformées sont bien étalées sur un milieu LB solide contenant de l'ampicilline à concentration de 100 µg/ml. Pour une sélection des clones positifs, 200 µl de X-gal 0,0004 % et 50 µl d'IPTG 0,5 mM sont additionnés au milieu LB. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, les colonies susceptibles porteuses de l'ADN recombinant apparaissent blanchâtres et celles qui n'ont pas intégré l'insert bleue.

2.3.1. Extraction et digestion plasmidique

Pour la sélection des cellules porteuses du DNA recombinant, un certain nombre de colonies blanchâtres apparues après transformation est repiqué sur milieu LB à 100µg/ml d'ampicilline. Après incubation à 37°C pendant une nuit, les plasmides sont extraits par la réalisation des minipreps selon le principe de la lyse alcaline (**Sambrook et Russell, 2001**), en utilisant un kit « Fast plasmid mini standard procedure, Eppendorf ».

La présence de plasmides est vérifiée sur un gel agarose 0,8%. Afin de confirmer que les plasmides purifiés sont porteurs de l'insert, une digestion plasmique par une endonucléase de restriction EcoRI (Takara, Japon) a été effectuée sur l'ensemble des plasmides purifiés. Cette digestion EcoRI est réalisée dans un

volume final de 20µl composé du plasmide purifié, de l'enzyme EcoRI et de son tampon spécifique. La préparation est ensuite incubée à 37°C pendant 1h. L'éjection de l'insert des plasmides est vérifiée sur un gel agarose 0,8%. Les clones positifs sont conservés à - 80°C en présence de 20% (v/v) de glycérol.

3. Localisation au niveau du génome de la souche BN1 des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS : Technique d'hybridation « Southern blot »

La localisation au niveau du DNA chromosomique de la souche BN1, des gènes conservés dans la synthèse des EPS a été établie par la technique d'hybridation « Southern blot », en utilisant un kit de marquage non radioactif (**Roche Molecular Biochemicals, Germany**). Cette technique consiste en la préparation préalable de l'ADN, il s'agit d'effectuer une digestion de l'ADN en présence de différentes enzymes de restriction. La technique « Southern blot » se déroule en plusieurs étapes.

3.1. Première étape : Digestion de l'ADN

Les enzymes de restriction (Takara, Japon) utilisées dans la digestion de l'ADN de la souche BN1 sont citées dans le tableau IV.

Tableau IV: Endonucléases de restriction utilisées dans la présente étude.

Nom de l'enzyme	Séquence cible (5' -->3')
Bam HI	G* G A T C C
Bgl II	A* G A T C T
Cla I	AT*CGAT
EcoR I	G* A A T T C
Hind III	A* A G C T T
Pst I	C T G C A * G
Xba I	T*CTAGA
Xho I	C*TCGAG

* : Site de coupure au niveau de l'ADN.

Chaque digestion comprend un volume final de 40µl composé de l'ADN de la souche, de l'enzyme de restriction, du tampon adéquat au fonctionnement de chaque enzyme, et de l'eau MillQ (Sigma). Les préparations sont incubées pendant une nuit à 37°C. Pour éliminer l'ARN des préparations, l'enzyme RNAase (5mg/ml) est additionnée à chaque tube de digestion et laissée agir pendant 30min à 37°C.

Après vérification sur gel agarose du bon déroulement de la digestion, l'étape qui suit a concerné la purification de chaque digestion par une extraction chloroforme/phénol. Enfin, une précipitation du DNA digéré a été effectuée par addition de l'éthanol absolu et de l'acétate de sodium (3M). Les digestions purifiées sont conservées à 4°C.

3.2. Seconde étape : Préparation des tampons et migration sur gel

Ce protocole est basé essentiellement sur la préparation des tampons spécifiques à cette technique. Le tampon utilisé est le Tris borate EDTA (TBE) [Tris, acide borique, EDTA 0.5M, pH final ajusté à 8]. Le TBE a été utilisé dans la préparation du gel agarose 0,8% et aussi comme tampon de migration.

Une fois préparé, le gel a été chargé de la totalité des digestions préalablement préparées. La migration se fait dans une cuve spécifique à 90Volts.

3.3. Troisième étape : Transfert du gel

Après migration et visualisation de l'aspect du gel, ce dernier a été appliqué sur une membrane spécifique (**Bio Rad**) afin de transférer les bandes du DNA digéré sur la membrane. Pour ce faire, le gel a été très bien étendu sur cette membrane et soumis à une pression en plaçant une pile de serviettes de papier et un poids au-dessus du gel. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 48h. La membrane est ensuite exposée pendant deux minutes au rayonnement UV afin de fixer de manière permanente l'ADN sur la membrane.

3.4. Quatrième étape : Amplification de la sonde plasmidique

Cette étape a consisté en l'amplification par PCR du plasmide codée 2-10 BN1 contenant la sonde purifiée de 0,26 kb codant à la GT chez la souche BN1. Il s'agit d'une PCR classique qui permettrait d'amplifier le plasmide. Le plasmide amplifié a été purifié en utilisant un kit pour purification d'ADN à partir de solutions ou réactions enzymatiques (illustra, Gfx PCR DNA and gel band purification kit). Le fragment purifié est placé dans un thermocycleur à 95°C pendant 10 min et refroidi par la suite rapidement afin de garder les deux brins d'ADN séparés.

3.5. Cinquième étape : Hybridation proprement dite

La pré- hybridation et l'hybridation ont été effectuées à 65°C respectivement pendant une heure et toute la nuit, selon le protocole standard de **Sambrook et Russell (2001)**, dans une solution d'hybridation.

La sonde amplifiée est ensuite mélangée avec une petite quantité du liquide d'hybridation et portée dans la colonne avec la membrane pendant une nuit. Le lavage de la membrane a été effectuée à température ambiante en utilisant des dilutions en série de la solution 20xSSC (2xSSC, et du 0,1xSSC additionné de 0,1% de SDS). La solution 20xSSC est composée de: [NaCl 3 M, Citrate de sodium ($C_6H_5Na_3O_7$) 0,3 M, pH 7,0].

4. Croissance sur milieu lait et caractérisation biochimique partielle des EPS produits par la souche BN1

Au niveau de chaque fermentation, la biomasse est évaluée par la méthode de numération viable sur milieu solide, le pH est aussi mesuré ainsi que la consommation du lactose et les acides produits (détermination par HPLC).

Les résultats sont la moyenne de trois essais. La comparaison des données a été effectuée en utilisant le t Student -test pour comparer les moyennes entre les différents paramètres à savoir la biomasse, le pH, le taux d'acide lactique et les EPS quantifiés. Des différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$.

4.1. Préparation du milieu lait et d'inoculum

Le lait entier (Candia) a été reconstitué à 10% (p/v) dans l'eau distillée et chauffé à 95°C pendant 5min. L'inoculum a été préparé à partir des colonies de la souche BN1 réactivée et conservée à +4°C par repiquage sur LM17. Les cultures sont incubées à 42°C jusqu'au début de la phase exponentielle; ainsi l'inoculum est ajusté à une concentration initiale de 1×10^8 UFC/ml.

4.2. Etablissement des cultures

Les cultures de la souche BN1 ont été établies en ensemençant le lait préalablement reconstitué par l'inoculum à raison d'une concentration initiale de 1% (1×10^8 ufc/ml). Une fois préparées, les cultures sont incubées pendant 6h et 12h à 42°C et 16h à 37°C. A la fin de chaque fermentation, des aliquotes sont prélevées afin d'étudier les paramètres cités ci-dessous.

4.2. Mesure de la croissance bactérienne

La croissance sur milieu lait a été évaluée par la technique de numération viable sur milieu solide (**Kouomegne et al. 1984**). Cette technique consiste à traiter les échantillons par dilutions décimales dans la peptone saline. Ensuite, 100 µl des dilutions adaptées à chaque étape de croissance sont étalés à la surface du milieu LM17 agar préalablement coulé en boîte Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à 42°C en anaérobiose pendant 48h. Le nombre des bactéries est exprimé en log unités formant colonies (log ufc/ml).

4.4. Détermination de l'acidité titrable totale

Le dosage de l'acide lactique a été effectué par titration (**Blais et al. 1988**) en utilisant le NaOH (N/9) en présence de la phénolphtaléine. La méthode consiste à verser l'échantillon de lait fermenté (10 ml) dans un bécher dans lequel sont ajoutées quelques gouttes de phénolphtaléine. Le titrage s'effectue à l'aide d'une burette, quand la couleur blanchâtre du lait fermenté vire au rose pâle et persiste pendant une dizaine de seconde, le volume de dosage utilisé est ainsi relevé. L'acidité est exprimée en équivalent acide lactique (mg/mL).

Le calcul se fait par la formule suivante :

$$A = [(NaOH) \times (PM \text{ Ac.lactique}) \times (Vol. NaOH)] / Vol. \text{ échantillon.}$$

A : Acidité titrable en équivalent acide lactique (**mg/ml**)

PM : Poids moléculaire de l'acide lactique = 90g/mol

Vol. échantillon : Volume de l'échantillon (10ml).

4.5. Mesure du pH

L'activité acidifiante de la souche *S. thermophilus* BN1 dans le lait a été aussi déterminée par la mesure du pH en utilisant un pH mètre type (Hanna instruments, pH 210 microprocessor pH-meter).

4.6. Analyse des sucres résiduels et des acides organiques

La quantification du lactose consommé et des acides produits par la souche BN1 au cours de la fermentation a été effectuée par chromatographie liquide haute performance (HPLC); à l'aide d'un système HPLC (Waters, Alliance 2690) équipé d'un réfractomètre (Waters) et doté d'un logiciel d'acquisition, de traitement et de gestion des données chromatographiques "Empower" (Waters, USA).

Les échantillons destinés à l'analyse ont été préparés comme suit : 5g de lait fermenté sont mélangés avec 20ml de H₂SO₄ 9mN,

La préparation est portée à l'agitation à 37°C pendant 2h; après centrifugation (10.000xg, 20min), les surnageants sont filtrés et analysés.

La séparation des échantillons a été effectuée dans une colonne échangeuse d'ions ICSEP ION-300 (Transgenomic, San Jose, CA, USA) en utilisant du H₂SO₄ 8,5 mN comme phase mobile à 65°C, avec un débit de 0,4 mL/min.

Le lactose a été détecté avec un détecteur à indice de réfraction (IR) et les acides organiques ont été détectés avec l'ensemble détecteur à barrettes de diodes (PDA) à 210 nm. Pour la quantification, les équations de régression ($R^2 \geq 0,99$) ont été calculées en utilisant des solutions standards correspondantes à différentes concentrations (Fluka-Sigma). Les résultats sont exprimés en mg/100ml.

4.7. Extraction et purification des EPS à partir du lait fermenté

Les EPS sont extraits à partir des milieux de lait fermenté après 6h et 12h d'incubation à 42°C et 16h à 37°C. Durant cette opération, nous avons testé deux méthodes d'extraction. La méthode décrite par **de Vuyst et al (1998)** d'une part et la méthode de **Salazar et al (2009)** d'autre part. Après plusieurs essais entre les deux méthodes, nous avons opté pour le protocole de **Salazar et al (2009)**.

Dans ce protocole, les protéines du lait fermenté sont précipitées immédiatement par addition du TCA à raison d'une concentration finale de 12% sous agitation pendant 2h à température ambiante. Les protéines sont ensuite écartées par centrifugation (10.000xg, 4°C, 30min). Les surnageants obtenus sont réajustés à pH 4,5. Pour la précipitation des EPS, deux volumes d'éthanol absolu sont additionnés aux surnageants. Les préparations sont maintenues sous agitation pendant 48h à 4°C. Après centrifugation (10.000xg, 4°C, 30min), les précipités obtenus sont placés dans une membrane à dialyse (Spectra membrane) d'un poids moléculaire d'exclusion de 12.000-14.000 daltons.

Les échantillons sont dialysés contre l'eau déminéralisée pendant 3 jours à 4°C et lyophilisés par la suite.

4.8. Quantification des EPS et détermination de la masse molaire

Une première appréciation, du taux d'EPS présent dans les échantillons purifiés, a été estimée par dosage gravimétrique (**de Vuyst et al. 1998**) en pesant la masse sèche du polymère (PDM) après 48 heures de séchage à 42 °C.

Les valeurs mesurées sont soustraites des valeurs PDM obtenues à partir du milieu lait témoin non fermenté. Ce qui permet de déterminer le taux d'EPS réellement produit par la souche. Par ailleurs, pour une quantification plus précise et la détermination de la masse molaire, les échantillons d'EPS lyophilisés ont été analysés par HPLC.

La masse molaire (MM) des fractions d'EPS a été déterminée par HPLC en utilisant le modèle décrit précédemment (Waters, USA). Les échantillons d'EPS lyophilisés sont remis en suspension à raison d'une concentration de 5 mg/mL dans

une solution de NaNO_3 0,1 M. Ils sont maintenus sous agitation douce pendant une nuit et centrifugés (10.000xg, 10 min.) avant analyse.

Les séparations chromatographiques ont été effectuées dans deux colonnes TSK-Gel G3000 PWxL et TSK - Gel G5000 PWxL, placées en séries et protégées par une colonne de protection TSK - Gel (Supelco-Sigma, USA).

Le volume de l'échantillon injecté est égal à 50 μL , la phase mobile utilisée est une solution de NaNO_3 0,1 M. Les séparations ont été effectuées à 40°C à un débit de 0,45 mL/min, les pics d'EPS ont été détectés par leurs indices de réfraction (IR).

La présence de protéines qui pourraient interférer avec l'analyse de l'IR des EPS a été contrôlée à l'aide d'un détecteur PDA à 280 nm.

Des solutions standards de dextrane (Fluka-Sigma, USA), allant de 5×10^3 à $4,9 \times 10^6$ Da ont été utilisées pour déterminer la MM de l'EPS.

Les équations de régression pour déterminer la quantité d'EPS ont été calculées en utilisant quatre concentrations différentes de (0-1 mg / ml) de chacune des sept solutions standards de dextrane ($R^2 \geq 0,98$). L'équation de régression pour la détermination de la MM a été calculée en utilisant les temps d'élution des sept standards de dextrane ($R^2 = 0,99$).

RÉSULTATS

I. Isolement et Identification des *S. thermophilus*

Les résultats de la partie isolement et identification représentent la synthèse des travaux réalisés durant une période de trois années.

1. Caractérisation biochimique des souches isolées

IL y a bien lieu de rappeler que la recherche des *S. thermophilus* a été entreprise à partir du lait cru, du leben et du beurre traditionnel. Après isolement, l'étape de pré identification a concerné la recherche systématique des souches catalase négative, formant des colonies de type punctiforme muqueuses ou d'un aspect brillant et de couleur crème. Il a été constaté à cet effet que ce type de colonies recherchées est rare et présente une fréquence quasiment faible (tableau V). A titre indicatif, le nombre de la flore thermophile sus étudiée ne dépasse pas le taux de 1×10^3 ufc/mL dans le lait cru.

Par contre, le taux de la flore thermophile développée sur le milieu LM17 agar a atteint des chiffres de l'ordre de 1×10^6 UFC/ml dans les échantillons de leben et $1,2 \times 10^7$ UFC/g pour le beurre traditionnel.

Comme première analyse, ces taux élevés de la flore thermophile comprenaient tous les types de colonies, en particulier celles caractérisant le genre *Enterococcus*.

Tableau V: Taux moyen de la flore thermophile et fréquence des colonies muqueuses par échantillon.

Echantillon	Flore thermophile (UFC/mL ou UFC/g)	Fréquence des colonies muqueuses
Lait cru	$1,2 \times 10^3$	10
Leben	$1,0 \times 10^6$	>10
Beurre traditionnel	$1,2 \times 10^7$	<10

Avant de présenter la suite des résultats, nous tenons à signaler que la détermination de la forme micro- morphologique des bactéries constitue réellement un point important dans leur classification. A cet effet au cours de ce travail, notre attention a été portée sur la précision de la forme micro- morphologique des souches après la sélection des colonies muqueuses. Car d'après nos constatations relatives au genre *Streptococcus*, toutes les espèces ont des cellules de forme coccoïde et associées en chaînettes, mais elles ne ressembleront jamais à la forme cellulaire de l'espèce *S. thermophilus*.

Toutes les souches repiquées après l'isolement sont d'apparence muqueuse et catalase négative. Examinées à l'état frais, ces souches apparaissent en formes de coques (cocci) allongés et associés pour la plupart en chaînettes (Fig. 12, 13).

Au cours de la réalisation de ces travaux, la technique d'observation microscopique à l'état frais avait montré son importance comme technique rapide dans la détermination de la forme micro- morphologique des souches. La technique de coloration de Gram a été appliquée, par ailleurs, uniquement pour confirmer les observations effectuées à l'état frais et déterminer le Gram. Un exemple d'une souche colorée au Gram est montré sur la figure (14).

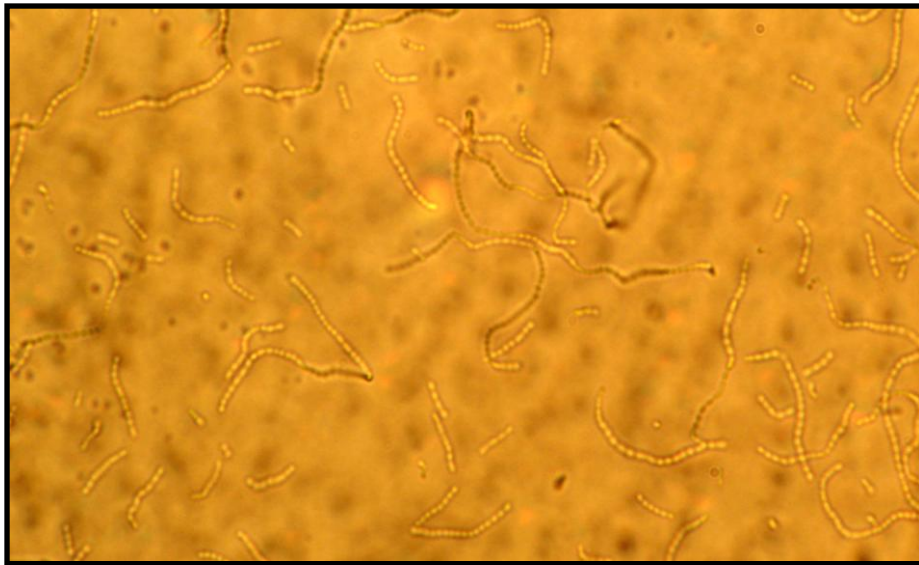


Fig. 12 : Aspect microscopique à l'état frais d'une des souches isolée de *S. thermophilus*, indiquant la forme coccoïde et le mode d'association en chaînette.
- Observation effectuée à l'objectif 40.



Fig. 13 : Aspect microscopique à l'état frais d'une autre souche isolée de *S. thermophilus*, indiquant la forme coccoïde et le mode d'association en chaînette.
Observation effectuée à l'objectif 40.



Fig. 14: Aspect microscopique d'une souche de *S. thermophilus*, après coloration de Gram, indiquant le mode d'association en chaînette.
- Observation effectuée à l'objectif 100.

Dés son isolement la souche nommée BN1 s'est distinguée des autres souches par ses propriétés culturales relatives à la production des EPS. Elle développe sur le LM17 avec un trouble visqueux au point de demeurer collé à la paroi du tube. Cette même souche forme des colonies punctiformes, de couleur crème et d'aspect muqueux. L'aspect macroscopique de la souche BN1 est indiqué à la figure 15.

D'autre part, l'observation microscopique de la souche BN1 à l'état frais par la technique de l'encre de chine, nous a permis d'observer des cellules ovoïdes à pointes associées par paires ou en chaînettes. Cette forme constitue la forme typique exacte de l'espèce *S. thermophilus* (Fig. 16).

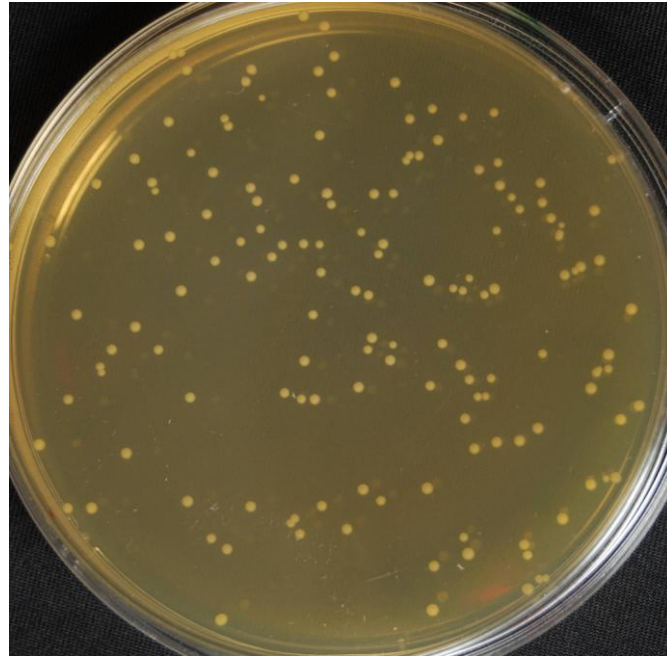


Fig. 15 Colonies purifiées de la souche *S. thermophilus* BN1 développées sur LM17 agar après 24h d'incubation à 42°C.

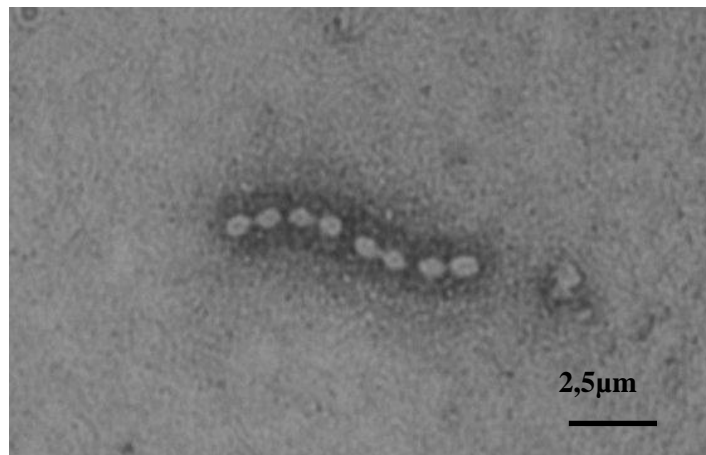


Fig. 16 : Une chaînette de la souche BN1 observée à l'état frais, montrant la forme cellulaire type des *S. thermophilus*.
- Contraste négatif obtenu au moyen d'encre de chine.
- Observation à l'immersion.

Les résultats des tests effectués pour l'identification biochimique des souches pré- identifiées sont rassemblés dans le tableau (VI). Seules les souches présentant les caractéristiques de l'espèce *S. thermophilus* ou proches ont été prises en considération.

Les souches identifiées à ce stade sont incapables :

- de produire du gaz (CO₂) à partir du glucose,
- de croître en présence de 6,5% de NaCl,
- de croître à pH 9,6,
- de croître à 10°C,
- d'hydrolyser l'esculine,
- d'hydrolyser l'amidon,
- de fermenter le galactose,
- et de fermenter le maltose.

A propos du maltose, il a été observé que certaines souches fermentent ce sucre lentement (tableau VI), mais possèdent les mêmes propriétés biochimiques que les autres souches qui ne le fermentent pas. Ces souches ont été quand même retenues pour l'identification moléculaire.

Les tests sus cités ont été pris comme étant la clé de l'identification biochimique de l'espèce *S. thermophilus*. Ceci a en effet facilité la tâche pour la recherche de ces germes thermophiles, exigeants et difficiles à distinguer des autres germes possédant une forme micro- morphologique semblable.

Les souches identifiées et comme la plupart des bactéries lactiques fermentent le lactose, le glucose et le saccharose. Elles poussent aussi à 45°C et résistent à un traitement thermique de 30min à 60°C.

A l'issue des résultats de cette identification biochimique, un total de 33 souches a été retenu pour l'identification moléculaire.

Tableau VI : Identification biochimique et génotypique des coques thermophiles isolés.

Souche	Origine	4%	6,5%	pH 9,6	Esc	Lac	Sac	Glu	Mal	Raffi	Cello	BL (1%)	10°	45°	60°,30min	identification Génotypique
BN1	Lait	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
S5	Lait	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
BN2	Lait	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
BN3	Lait	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
SPG	Lait	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
L1	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
3M1	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
3M2	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
N1	Lait	±	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
N3	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
S19	Lait	±	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
S21	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
R1	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
4M1	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
4M2	Lait	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
RL3	Leben	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
RL7	Leben	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
S1	Leben	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
SA	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
SB	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
LAP	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
LAG	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
LB	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
T4	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
T5	Leben	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
SN1	Beurre T.	±	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
SN2	Beurre T.	±	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcus sp.</i>
SN3	Beurre T.	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
SN4	Beurre T.	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
P1	Lait	±	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
P2	Lait	±	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
P3	Lait	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>
P4	Lait	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>S.thermophilus</i>

+ : réaction positive; - : réaction négative; ± : réaction lente

Esc : esculine; **Lac** : lactose; **Sac** : Saccharose; **Glu** : glucose; **Mal** : maltose; **Raffi** : raffinose; **Cello** : cellobiose ; **BL** : bleu de méthylène

2. Caractérisation moléculaire des souches isolées

Cette caractérisation est basée fondamentalement sur l'obtention de l'ADN bactérien total. L'ADN est en effet une molécule d'un poids moléculaire supérieur à 10 kb, il est souvent associé à l'ARN total de la cellule (Fig. 17). Pour l'obtenir à l'état pur, il est traité par ARNase. Un exemple de l'aspect de l'ADN total après traitement par ARNase est montré à la figure 18.

La réaction de PCR des gènes codant à l'ARNr 16S a donné des bandes d'amplifications fluorescentes d'une taille de 1,5 kb (Fig. 19). Les produits d'amplifications issus de cette réaction ont été purifiés et envoyés au service du séquençage automatique de Madrid (Espagne). Une fois reçues sous forme de chromatogramme, les séquences sont traitées à l'aide du « Chromas 1.45 », un programme informatisé pratique pour le traitement des séquences. Ce dernier permet de sélectionner et copier les bases nucléotides afin d'obtenir une séquence nucléotidique complète pour chaque souche. Un exemple d'une séquence traitée est présenté dans la figure 20. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles enregistrées au niveau de la base internationale des données (NCBI).

L'analyse des séquences en utilisant le « BLAST » a permis de confirmer l'identification de 16 souches isolées et retenues dans la collection parmi l'espèce *S. thermophilus*. La ressemblance de leurs séquences à celles de la base de données internationales a atteint 100%.

Par ailleurs, les autres souches de la collection qui étaient proches sur le plan biochimique des caractéristiques de l'espèce *S. thermophilus* en particulier celle fermentant lentement le maltose, et après analyse de leurs séquences par le « BLAST »; se sont avérées malgré leur caractère thermophile, loin des caractéristiques génotypiques de l'espèce *S. thermophilus*. Le pourcentage d'homologie était inférieur à 85%.

A cet effet, cette collection de souches thermophiles atypiques a été classifiée en tant que *Streptococcus sp* (Tableau VI).

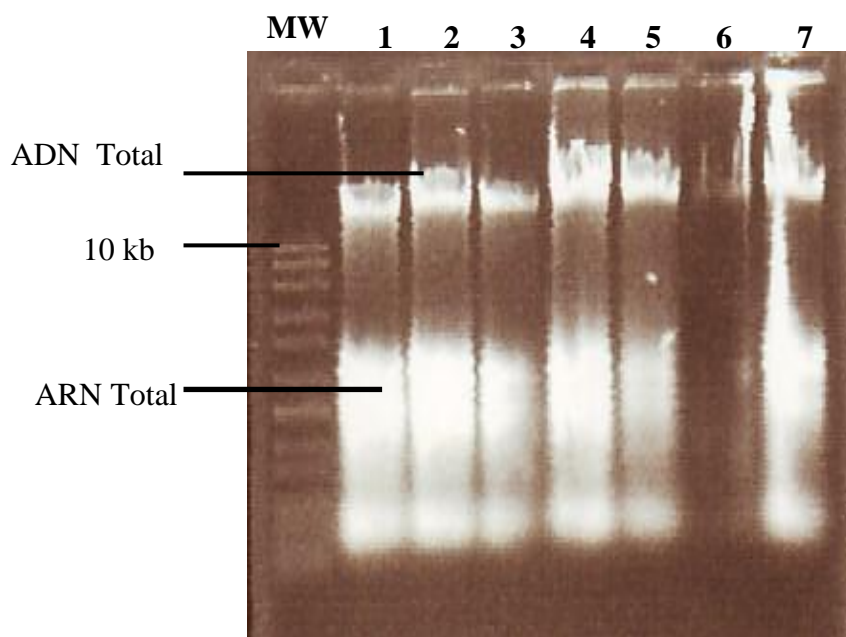


Fig. 17 : Aspect sur de l'ADN total de quelques souches étudiées sans traitement par RNAase.
Pistes : (1) : souche1066 CNRZ ; (2) : souche LMD-9 ;(3) : souche LMG 18311;(4) : souche BN1;
 (5) : souche BN2 ;(6) : souche BN3 ;(7) : souche Sx. **MW** : marqueur de poids moléculaire.

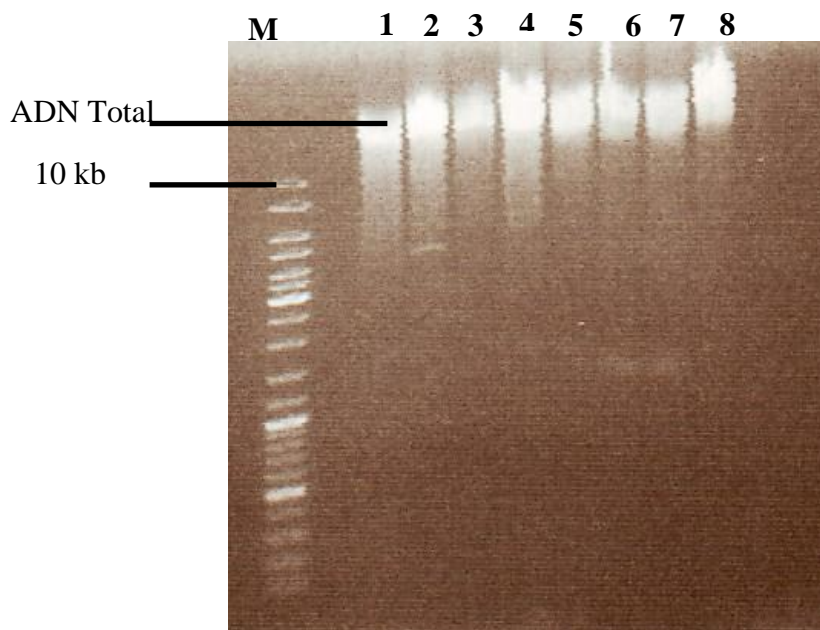


Fig. 18 : Aspect sur de l'ADN total de quelques souches étudiées après traitement par RNAase.
Pistes : (1) : souche1066 CNRZ ; (2) : souche LMD-9 ;(3) : souche LMG 18311;(4) : souche BN1;
 (5) : souche BN2 ;(6) : souche BN3 ; (7) : souche Sx ; (8) : souche S5.

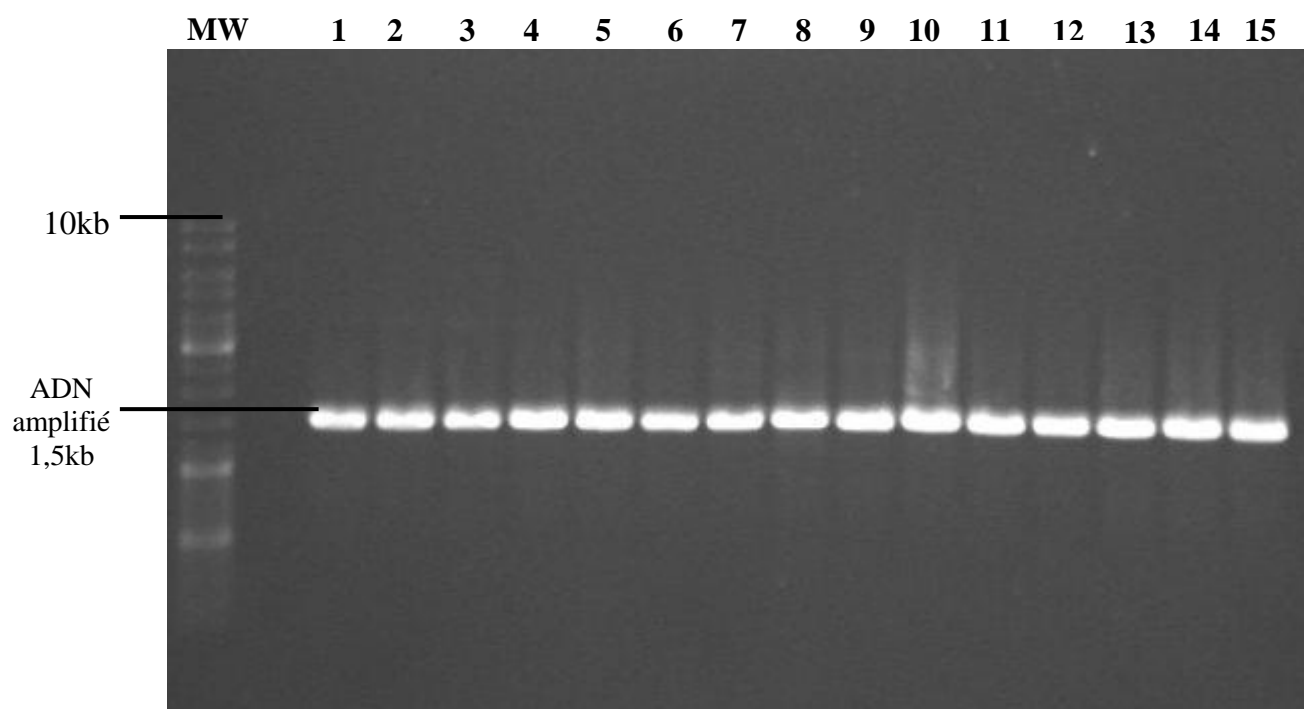


Fig. 19 : Produits d'amplification issus de la réaction de PCR, effectuée sur l'ADN des souches isolées, en utilisant les amorces pA, pH` de l'ARNr16S.

Pistes : (1) : souche S5; (2) : souche 3M2; (3) : souche LB; (4) : souche SPG; (5) : souche S5; (6) : souche SN4; (7) : souche SN2; (8) : souche 4M1; (9) : souche 4M2; (10) : souche; (11) : souche S19; (12) : souche P1; (13) : souche P2; (14) : souche P3; (15) : souche P4.

- **MW** : marqueur de poids moléculaire.

```

AAGTCGAACGCTTCTTTTTCCNCCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGCGCAAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGC
TAATACCGTATAACAATCAAACCCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCTG
CTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC
GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATG
AGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC
GCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG
GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCC
TTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATT
GTTAGTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAG
TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGA
TGATGG.

```

Fig. 20 : Exemple d'une séquence nucléotidique complète d'une souche isolée, après analyse et traitement par le «Chromas ».

II. Caractérisation moléculaire partielle de la production d'EPS par la souche BN1

1. Détection et purification des gènes codants à la GT.

La mise en évidence des gènes impliqués dans la biosynthèse de la GT a concerné seulement quelques souches de la collection. A ce propos, Il demeure important de signaler qu'au début de ces travaux relatif à la partie moléculaire, seulement trois souches d'une apparence muqueuse étaient identifiées comme étant des *S. thermophilus*.

La mise en évidence par PCR des gènes codants à la GT a été effectuée en utilisant les amorces hybrides « **F-36, R-27** ». Cette PCR (Fig. 21) a amplifié deux fragments, apparus fluorescents sur gel d'environ 0,2kb. Ces fragments correspondent à l'ADN des souches BN1 et BN3, la souche BN2 s'est en effet apparue négative. La taille de ces fragments (0,2kb) correspond à la taille attendue pour le gène codant à la GT. Ces résultats prouvent la spécificité de cette réaction de PCR et dénotent que les souches BN1 et BN3 possèdent le gène codant à la GT.

Pour valider les résultats de la PCR-GT, le séquençage des fragments obtenus était indispensable. Pour ce faire, nous avons procédé à la purification de la totalité des produits de PCR. Le volume total des deux réactions a été versé sur gel agarose 2% (p/v). L'aspect de ce gel est indiqué à la figure (22). Cet aspect confirme toujours la présence des bandes positives localisées par rapport au marqueur de taille à 0,2kb.

Les bandes fluorescentes ont été découpées à partir du gel et purifiées comme il a été décrit dans la partie « matériel et méthodes ». Après purification de ces bandes, nous avons effectivement pu observer et obtenir deux fragments purs d'une taille exceptionnelle d'environ 0,2 kb (Fig. 23).

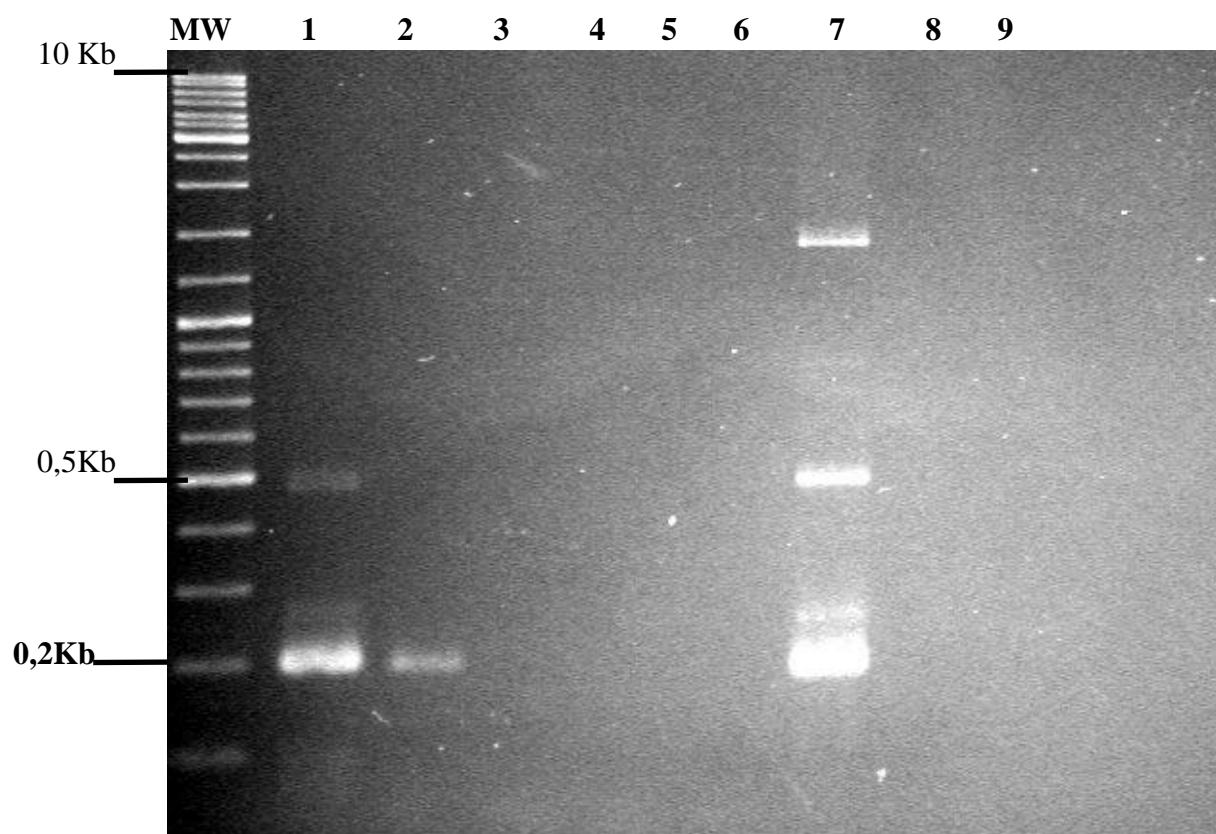


Fig. 21 : Détection par PCR des souches possédant la région impliquée dans la biosynthèse de la GT en utilisant les primers hybrides F-36, R-27.

Pistes : (1) : BN1; (2) : BN3; (3) : BN2; (4) : Sx; (5) : EN1; (6) : 1066 CNRZ; (7): LMG 18311; (8) : LMD-9; (9) : Eau.

- Le contrôle négatif (eau) en piste 9 certifie la spécificité de cette réaction de PCR.

- **MW** : marqueur de poids moléculaire (Fermenta).

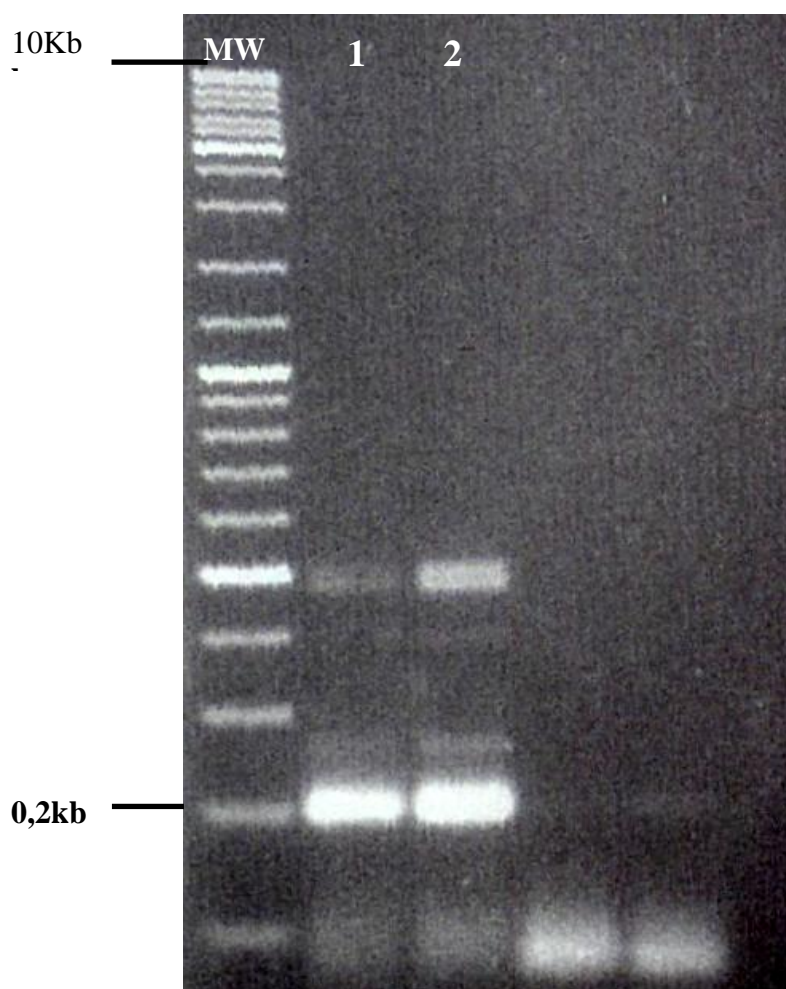


Fig. 22 : Amplification par PCR des régions impliquées dans la biosynthèse de la GT.

- Gel agarose réalisé par le dépôt du volume entier (environ 20ul) des deux réactions de PCR relatives à l'ADN des souche BN1 et BN3.

- Pistes :

(1) : Produit de PCR obtenu avec l'ADN de la souche BN1

(2) : Produit de PCR obtenu avec l'ADN de la souche BN3

- **MW** : marqueur de poids moléculaire.



Fig. 23 : Bandes purifiées à partir du gel agarose de la PCR-GT, réalisée avec l'ADN des souches BN1 et BN3 respectivement.

Pistes :

(1) : Produit de PCR-GT purifié correspondant à l'ADN de la souche BN1,

(2) : Produit de PCR-GT purifié correspondant à l'ADN de la souche BN3.

- MW : marqueur de poids moléculaire.

1.1. Clonage et transformation bactérienne

Après transformation bactérienne de la souche *E. coli* JM 109 en utilisant les fragments purifiés d'environ 0,2kb, les clones positifs choisis (40 clones par transformation) et susceptibles d'être porteurs de l'insert ont subi une extraction plasmidique minipreps suivi d'une digestion EcoRI; pour sélectionner ceux qui ont intégré l'insert dans leur construction plasmidique. Les plasmides ayant éjecté l'insert ont facilité l'identification des clones positifs.

L'aspect sur gel des plasmides digérés des clones BN1 est montré dans la figure 24. Ces plasmides sont d'une taille de 2,5kb, ce qui correspond à la taille du plasmide pGEM-T, utilisé comme vecteur dans le clonage de l'insert isolé. Après examen avec attention des gels correspondants aux clones obtenus avec l'ADN des souches BN1 et BN3, trois clones se sont avérés porteurs de l'insert avec la transformation relative à la souche BN1 (Fig. 24), et seulement un clone positif est apparu avec la transformation de la souche BN3. Les bandes éjectées des plasmides sont d'une taille avoisinant 0,2kb. Par conséquent, ces clones positifs ont été réactivés sur bouillon LB et conservés à -80C° en présence de 25% de glycérol.

Suite à ces résultats, il a été nécessaire d'approfondir les investigations sur les clones positifs, afin de démontrer qu'ils ont réellement intégré l'insert codant à la GT. A cet égard, il a été essentiel d'extraire et de purifier les plasmides à partir des quatre clones positifs et de réaliser une nouvelle digestion pour confirmer la présence de l'insert et de en procéder enfin au séquençage du fragment isolé.

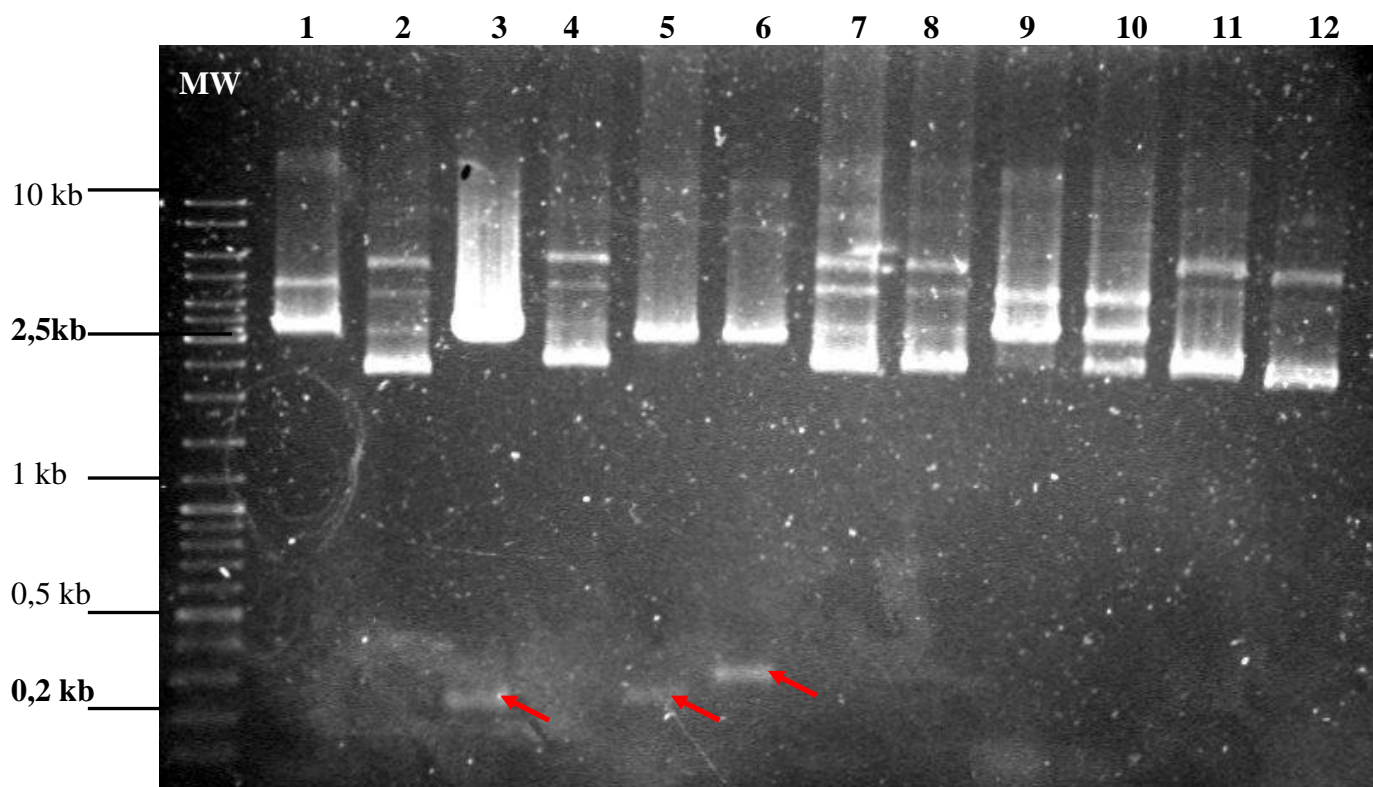


Fig. 24 : Digestion plasmidique EcoRI montrant l'éjection de l'insert de trois plasmides "pGEM-T" extraits des clones obtenus avec l'ADN de la souche BN1, suspectés porteurs du gène codant à la GT.

MW : marqueur de poids moléculaire.

→ : Insert

Pistes : (1) : Plasmide du clone 1 ; (2) : Plasmide du clone 2 ; **(3) : Plasmide du clone 3**; (4) : Plasmide du clone 4 ; **(5) : Plasmide du clone 5** ; **(6) : Plasmide du clone 10** ; (7) : Plasmide du clone 12 ; (8) : Plasmide du clone 13 ; (9) : Plasmide du clone 14 ; (10) : Plasmide du clone 15 ; (11) : Plasmide du clone 16 ; (12) : Plasmide du clone 17.

1. 2. Purification des plasmides à partir clones positifs et séquençage du fragment codant à la GT

Les clones bactériens codés 1-3, 1-5,1-10 et 2-1, ont été réactivés sur milieu LB additionné d'ampicilline et incubés à 37°C et ce pendant une nuit. Une nouvelle extraction plasmidique minipreps a été effectuée. Les plasmides purifiés se localisent toujours au niveau de 2,5kb (Fig.25). Ceci qui a confirmé une autre fois que les clones bactériens 1-3, 1-5, 1-10 et 2-1, contiennent un plasmide dont la taille correspond à celle du plasmide pGEMT.

Afin de vérifier la présence de l'insert au niveau des plasmides purifiés, une digestion EcoRI a été effectuée. L'aspect sur gel agarose de la digestion est indiqué à la figure (26). Cette étape, nous a permis de confirmer que l'insert se trouve au niveau des clones révélés positifs. L'insert éjecté se localise toujours par rapport au marqueur de taille au niveau de 0,2kb.

Ces résultats satisfaisants et prometteurs, nous ont permis d'envoyer les plasmides obtenus au service de séquençage pour déterminer avec exactitude la nature du fragment amplifié.

Après séquençage, les résultats obtenus étaient impressionnants, car par comparaison de la séquence obtenue à celle correspondant à d'autres gènes codants à la GT de souches de *S. thermophilus* déposés au niveau de la base de données "NCBI", il s'est avéré que l'insert amplifié et isolé du génome des deux souches BN1 et BN3 appartient effectivement au gènes codants à la synthèse de la GT. Le fragment obtenu est d'une taille exceptionnelle de 0,26 kb.

Cette séquence de 0,26kb est actuellement enregistrée au niveau de la base des données internationales "Gen Bank" sous le numéro d'accès : "**Hx2000001349**".

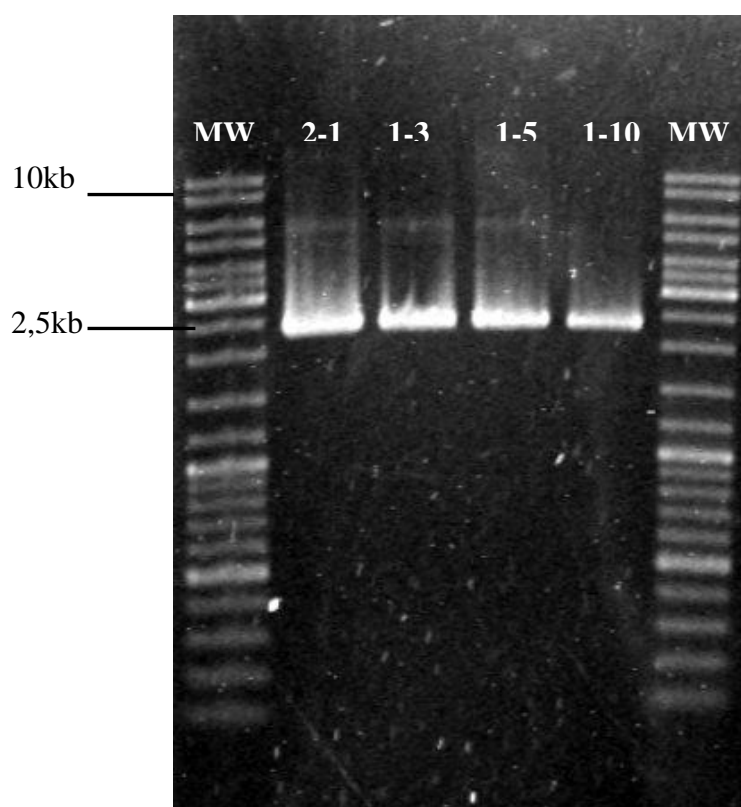


Fig. 25 : Aspect sur gel agarose des plasmides extraits à partir des clones positifs codés 1-3, 1-5, 1-10, et 2-1. **MW :** marqueur de poids moléculaire.

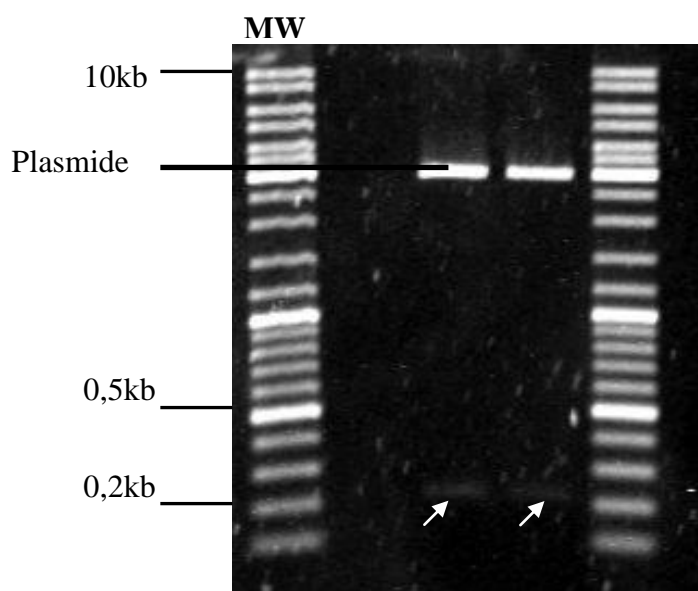


Fig. 26 : Digestion plasmidique EcoRI, indiquant la présence de l'insert codant à la GT. - **MW :** marqueur du poids moléculaire.

→ : Insert

1. 3. Localisation des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS au niveau du génome de la souche BN1 (Technique d'hybridation : Southern blot)

1. 3.1. Digestion de l'ADN

Avant de procéder à la digestion de l'ADN de la souche BN1 qui a été choisie pour ses performances phénotypiques relatives à la production d'EPS, nous avons vérifié, sur gel, l'aspect de son ADN (Fig. 27). L'ADN digéré a donné après purification l'aspect présenté à la figure 28. Comparativement à l'ADN total, il apparaît clairement que l'ADN a été digéré en fragments plus fin et d'une façon variable, selon l'endonucléase de restriction impliquée dans chaque digestion. Les résultats observés nous ont permis de poursuivre le protocole concernant l'application de la technique d'hybridation le Southern blot.

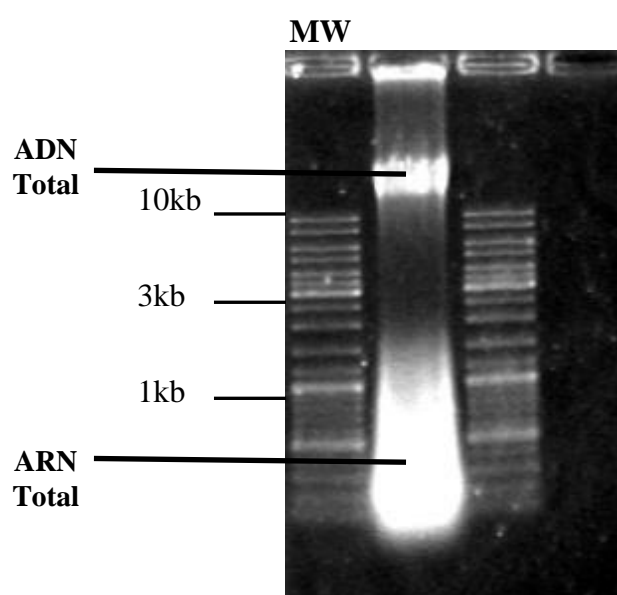


Fig. 27 : Aspect de l'ADN total de la souche BN1 avant digestion.

MW : marqueur du poids moléculaire.

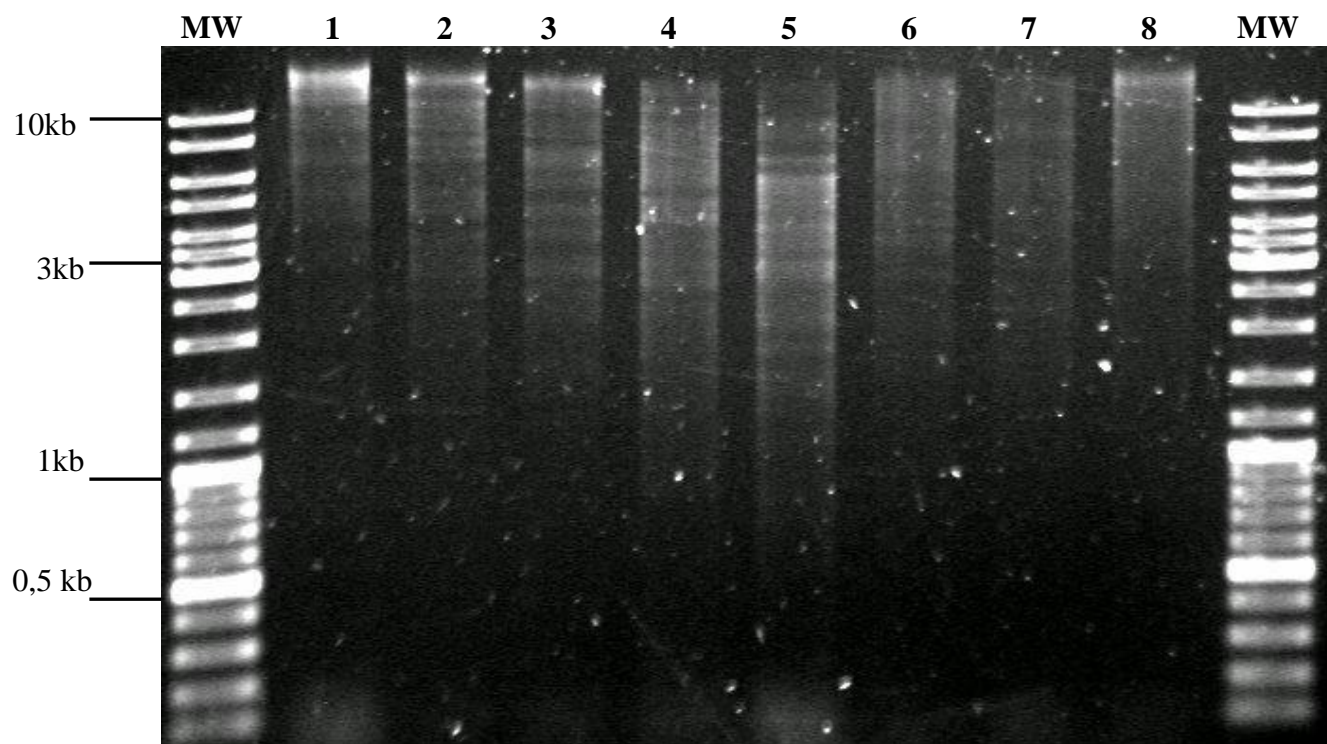


Fig. 28 : Aspect de l'ADN total de la souche BN1 après digestion par les différentes endonucléases de restriction et purification phénol/ chloroforme.

- **Pistes :** (1): Bam HI; (2): Bgl II; (3): Cla I; (4): ECOR I; (5): Hind III; (6): Pst I; (7): Xba I; (8): Xho I. - **MW :** marqueur de poids moléculaire.

1.3. 2. Localisation du gène codant à la GT sur le génome de *S. thermophilus* BN1

La membrane de nitrocellulose contenant le DNA fixé de la souche BN1 a été hybridée avec la séquence de la GT porté sur le plasmide pGEMT. Théoriquement la sonde s'hybride à l'ADN si celui-ci est complémentaire.

Les résultats de cette hybridation par le southern blot sont présentés dans la figure 29 (B). Ces résultats indiquent la présence de fragments de différentes tailles quand l'ADN total est digéré avec les endonucléases de restriction BamHI, BglII, ClaI et HindIII (8, 4, 5 et 7 kb, respectivement; Fig. 29 B). Deux bandes de 5,0 et 1,5 kb ont été détectées après digestion par EcoRI, ce qui est conforme avec le site EcoRI situé dans le fragment de 0,26 kb codant à la GT et utilisé comme sonde.

Les résultats du southern blot indiquent que le gène codant pour la GT, représente en effet le pôle du cluster responsable de la biosynthèse d'EPS. Le gène codant pour la GT est bien situé et localisé sur le chromosome de la souche *S. thermophilus* BN1.

Ces résultats sont très satisfaisants et font signe à la stabilité du caractère de la production d'EPS par la souche étudiée. La GT joue un rôle important chez les bactéries productrices d'EPS en catalysant la première étape dans la biosynthèse des EPS.

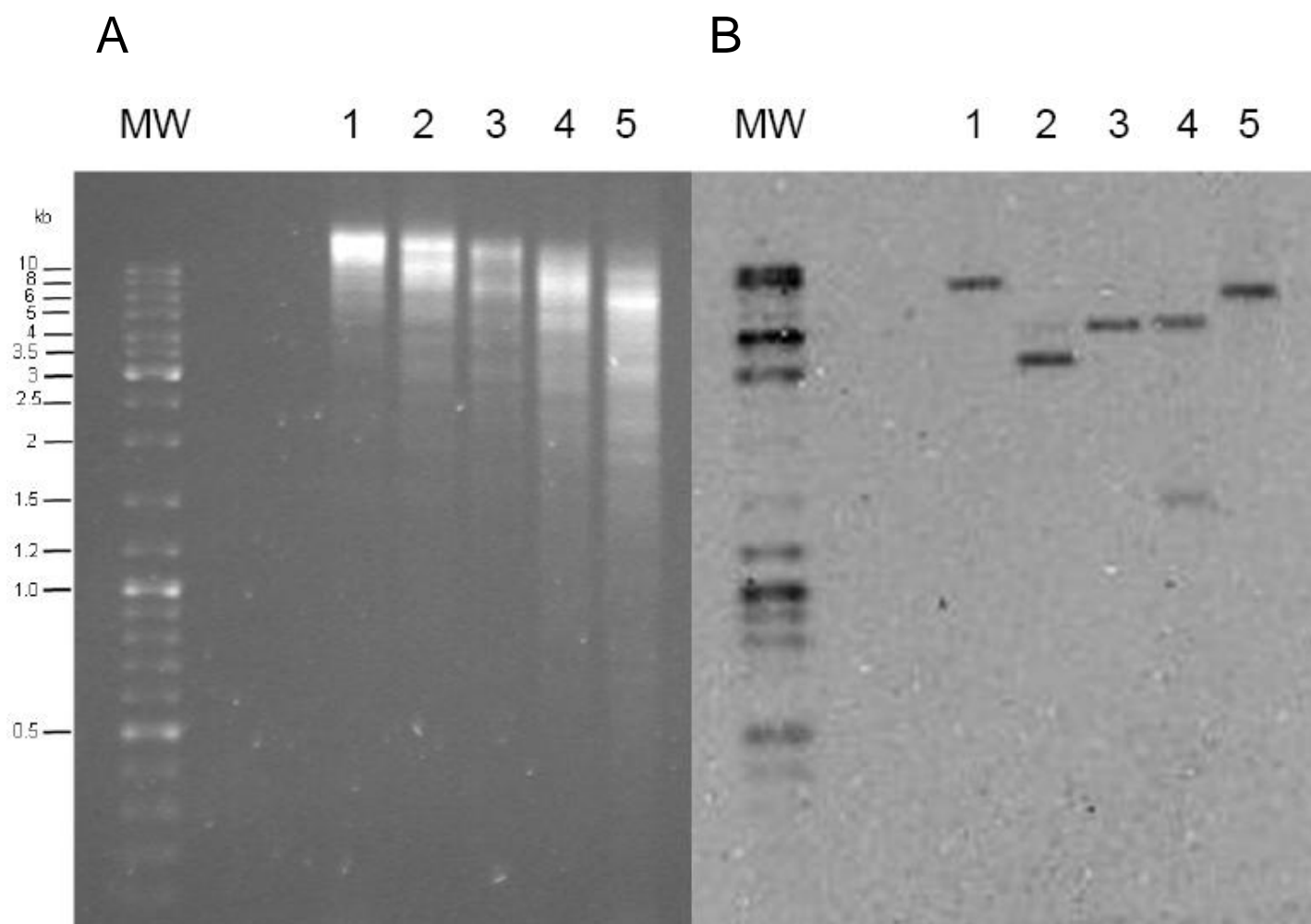


Fig. 29: ADN total de *S. thermophilus* BN1 (A) après digestion, (B) : Analyse après transfert par Southern de l'ADN digéré en utilisant un fragment interne du gène d'amorçage de la GT.

Pistes: (1) : BamHI ; (2) : BglII ; (3) : ClaI ; (4) : EcoRI et (5) : HindIII.

- MW: Marqueur de poids moléculaire.

III. Aspects microbiologiques et biochimiques de la production d'EPS par *S. thermophilus* BN1

1. Croissance bactérienne et activité acidifiante sur milieu lait

La souche *S. thermophilus* BN1 a été inoculée dans le lait à raison d'une concentration initiale de 1% (v/v), et incubée à 42°C et à 37°C. La souche a produit le plus grand nombre de cellules viables après 12h d'incubation à 42°C, et aussi après 16h à 37°C, avec une augmentation moyenne de 3 log UFC / ml par rapport au taux initial d'inoculation. Les taux de biomasse obtenus à ce niveau sont respectivement de l'ordre de $9,10 \pm 0,00$ et $9,40 \pm 0,20$ log (UFC/ml) (Fig. 30).

Après 6 h d'incubation à 42°C, la souche a affiché un nombre légèrement inférieur de cellules viables de l'ordre de $8,70 \pm 0,10$ log (UFC/ml), mais qui a suffi pour entraîner la coagulation du lait.

L'augmentation de la biomasse a par ailleurs provoqué une acidification importante dans le milieu à la fin de chaque fermentation. Ceci a été révélé par les valeurs du pH et d'acide lactique mesurées après 12h et 16h de fermentation respectivement à 42°C et 37°C (Fig.31, 32).

Pour les variations du pH, les valeurs enregistrées ont servi à apprécier les capacités acidifiantes de la souche estimées en (h^{-1}) selon **Vaningelgem et al (2004)**. Après 6h d'incubation à 42°C la souche affiche une valeur de pH de $5,03 \pm 0,04$ avec une diminution de 1,42 unités de pH et un taux d'acidification de $0,236 h^{-1}$. Par ailleurs, entre 6h et jusqu'à 12h d'incubation à 42°C, le pH a diminué en moyenne de 0,42 unités en affichant une valeur de $4,66 \pm 0,01$ et une vitesse moyenne de $0,07 h^{-1}$. Ces résultats montrent que l'activité acidifiante de la souche connaît un ralentissement après 6h d'incubation, malgré l'augmentation en biomasse.

L'activité acidifiante de la souche BN1 à 37°C après 16h d'incubation se rapproche de celle observée à 42°C après 12h d'incubation, le pH mesuré est d'une valeur moyenne de $4,60 \pm 0,00$.

Parallèlement, il a été observé que la souche BN1 produit de faibles quantités d'acide lactique (Fig. 32). Les taux quantifiés après 6h et 12h d'incubation à 42°C ont atteint respectivement $4,80 \pm 0,10$ et $6,30 \pm 0,00$ mg/mL.

D'après ces résultats, la souche *S. thermophilus* BN1 peu être considérée comme une souche ayant une bonne capacité de croissance dans le lait et une capacité de caillage acceptable.

A propos de la qualité du caillé formé par la souche BN1, une texture filante et visqueuse a été observée sur les échantillons de lait fermentés obtenus à 42°C. Cet aspect pourrait être lié à une production homogène en EPS. Par contre, une texture ferme et compacte difficile à briser a caractérisé le lait fermenté à 37°C. Ces résultats laissent penser que la température d'incubation a un effet sur la nature biochimique des EPS produits par la souche BN1.

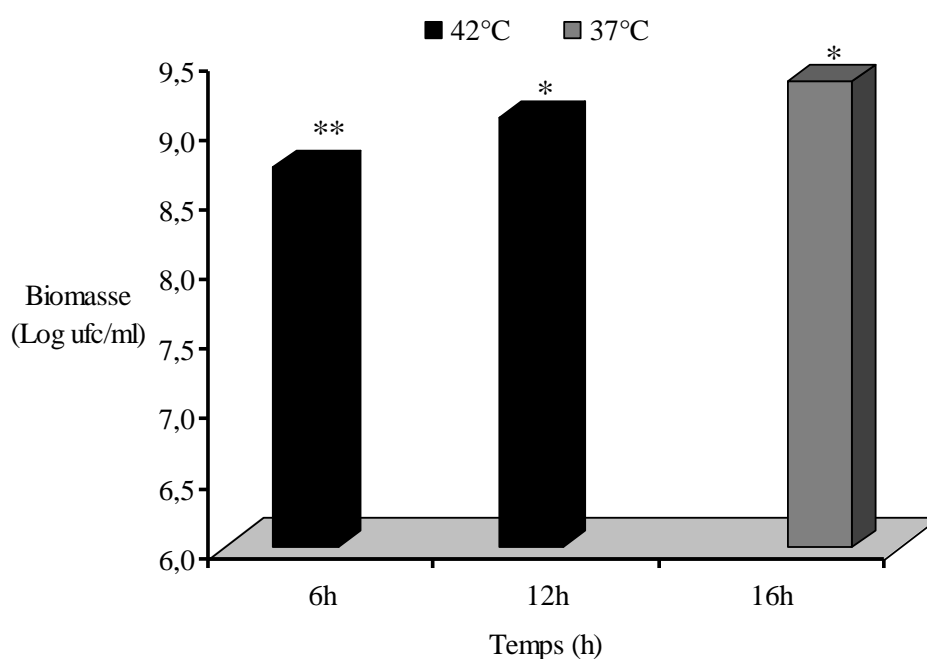


Fig. 30 : Biomasse en log UFC/ml développée après 6h, 12h à 42°C et 16 h de fermentation à 37°C sur milieu laitensemencé par la *S. thermophilus* BN1.

- Taux initial de biomasse (T_0) = $6,10 \pm 0,01$ log (UFC/mL).

*: différence non significative, ** : différence significative $p < 0,05$.

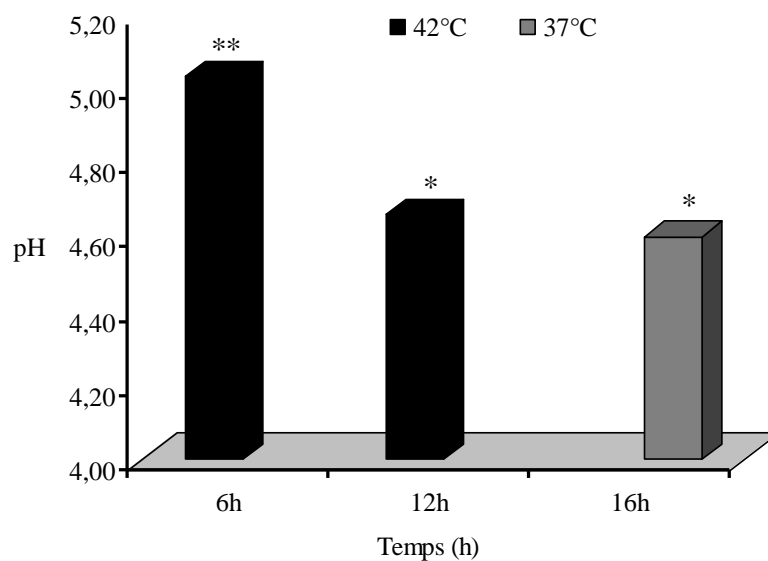


Fig. 31 : Valeurs du pH mesurées dans les cultures de la souche BN1 après 6h, 12h et 16h de fermentation à 42°C et 37°C respectivement.

- pH initial après inoculation (T_0) = 6,5.

*: différence non significative; **: différence significative, $p < 0,05$.

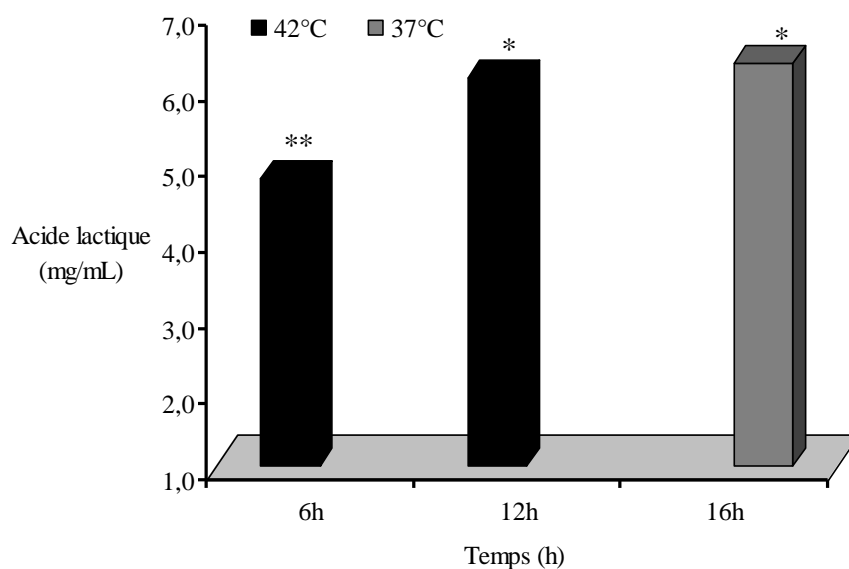


Fig. 32 : Taux d'acide lactique en (mg/mL) produit par la souche dans les différentes cultures de lait fermenté après 6h, 12h et 16h respectivement à 42°C et 37°C.

- Taux d'acide lactique à T_0 = 1,8 mg /mL

*: différence non significative; **: différence significative $p < 0,05$.

2. Dosage par HPLC des sucres consommés et des acides organiques produits par la souche BN1 au cours de la fermentation du lait.

Le système chromatographique par HPLC a été utilisé pour quantifier la consommation des sucres (lactose, glucose et galactose) et la production d'acides organiques en particulier l'acide lactique dans le lait fermenté par la souche BN1 à 42°C et 37°C.

La consommation des sucres sus indiqués et la production d'acides organiques dans le lait fermentéensemencé par la souche après 6h et 12h d'incubation à 42°C et 16h à 37°C sont reportées dans le tableau VII. Les échantillons de laits fermentés analysés ont montré une faible consommation de lactose, et par conséquent une faible production d'acide lactique. A titre d'exemple la souche produit après 12h et 16h de fermentation à 42°C et 37°C $156,91 \pm 0,37$ et $154,52 \pm 2,12$ mg/100mL respectivement. Ces taux d'acide lactique sont nettement différents de ceux obtenus lors du dosage par titrimétrie.

Ces résultats révèlent aussi et comme il a été déjà signalé quant à la biomasse et le pH, que le comportement de la souche BN1 après 12h d'incubation à 42°C se rapproche de celui observé après 16h d'incubation à 37°C.

Un aspect métabolique important concernant le *S. thermophilus* a été démontré au cours de cette analyse, il s'agit bien de l'accumulation du galactose dans le milieu au cours de la fermentation où sa concentration augmente jusqu'à $125,65 \pm 0,44$ mg/100mL après 12h d'incubation à 42°C. Ce résultat confirme et comme toutes les souches de *S. thermophilus* que la souche BN1 métabolise le lactose et libère le galactose dans le milieu de fermentation.

La souche étudiée produit en plus de l'acide lactique de faibles quantités d'acide acétique et d'acide formique. La production de ce dernier est commune parmi les souches de *S. thermophilus*.

Tableau VII : Valeurs Moyennes de la consommation du lactose et la production des acides organiques par la souche BN1 mise en culture dans le lait après 6h et 12h d'incubation à 42°C et 16h à 37°C.

Quantité (mg/100ml)	Lactose	Glucose	Galactose	Ac. lactique	Ac. formique	Ac. acétique
Lait témoin	780,18± 2,68	1,43±0,02	14,26±0,06	ND	ND	ND
Après 6h (42°C)	692,60 ± 0,65	3,41±0,01	95,44±0,16	118,79 ± 0,33	1,23±0,00	1,45±0,03
Après 12h (42°)	636,32 ± 1,29	2,35±0,04	125,65±0,44	156,91± 0,37	1,14±0,02	0,76±0,04
Après 16h (37°C)	665,59±1,90	2,29±0,03	123,46±0,29	154,52±0,71	ND	0,89±0,00

- ND : non déterminé

3. Quantification des EPS et détermination la masse molaire

La méthode gravimétrique a été initialement utilisée pour déterminer la quantité d'EPS produite par la souche BN1. La production d'EPS a eu lieu au niveau des deux températures d'incubation 37°C et 42°C. Les taux réels d'EPS exprimé en mg PDM/L sont obtenus par soustraction des valeurs calculées à partir du lait témoin non fermenté. Ce dernier en contenait en moyenne 111 ± 22 mg PDM/L de polysaccharides.

Le taux d'EPS le plus élevé a été obtenu après 6h d'incubation à 42°C avec une valeur de 356 ± 34 mg PDM/L. Aucune différence significative n'a été par ailleurs observée entre les quantités d'EPS produites après 6h et 12h à 42°C ou après 16 h à 37° C ($P > 0.05$) (Fig. 33).

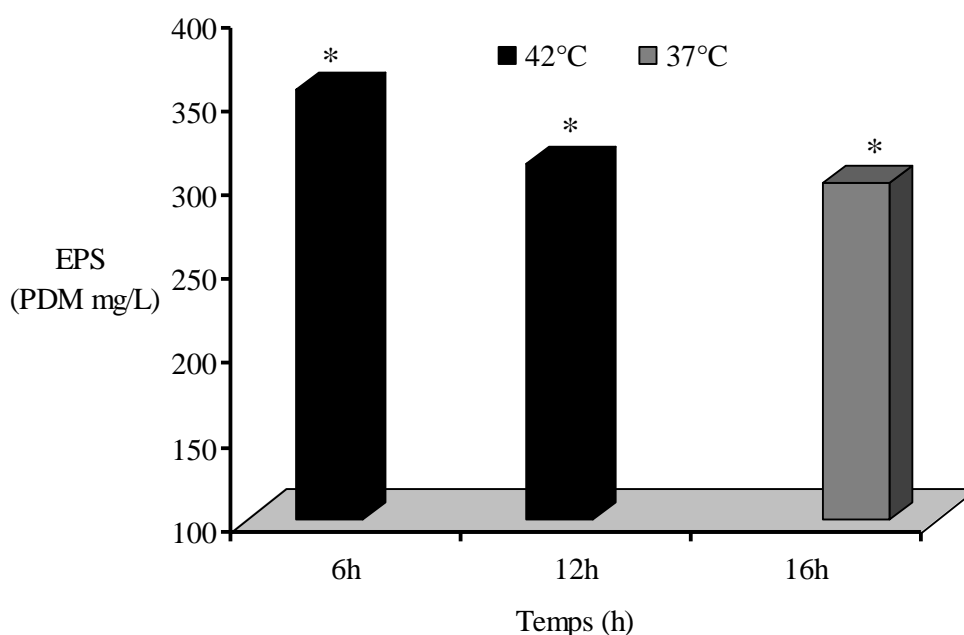


Fig. 33 : Taux d'exopolysaccharide (mg PDM/L) quantifié à partir des cultures de lait fermenté par la souche BN1 après 12, 6 et 17 heures d'incubation à 42°C et 37°C respectivement.

*: différence non significative; **: différence significative $p < 0,05$.

Cependant, lorsque les échantillons d'EPS ont été analysés par chromatographie, les valeurs enregistrées étaient de 5 à 10 fois inférieures à celles obtenues par gravimétrie. Ces valeurs sont de l'ordre de $48,3 \pm 0,1$, $36,9 \pm 0,3$ et $58,9 \pm 0,1$ mg/L respectivement pour les échantillons de 6h et 12h à 42°C et 16h à 37°C. D'après ces résultats, il est clair que la souche BN1 produit un taux élevé d'EPS à 37°C.

Rappelons ici que 37°C constitue une température sub-optimale de croissance pour *S. thermophilus*. Par ailleurs, la texture observée sur le lait fermenté par la souche à 37°C peut être en relation avec cette production maximale d'EPS comparativement à 42°C.

En revanche, la grande différence observée entre les valeurs du dosage gravimétrique et le dosage par HPLC, et comme l'indiquent les chromatogrammes (Fig. 34, 35, 36) est due à la contamination des échantillons d'EPS par des résidus protéiques (Courbes colorées en vert) provenant du lait et qui ont interféré avec les EPS au cours de leur extraction.

Toutes les fractions d'EPS analysées ont montré en effet la présence de deux pics et ce pour chaque temps et chaque température (Fig. 34, 35, 36). La nature de ces pics est en relation avec la présence d'un polymère, qui représente dans notre étude l'EPS produit par la souche BN1. Aussi, l'apparition de ces deux pics laisse penser que la souche produit deux types d'EPS.

L'analyse des pics obtenus à 37°C a donné une masse molaire de $7,2 \times 10^5$ Da et $1,4 \times 10^4$ Da. Celle des pics apparus à 42°C après 6h d'incubation a permis de calculer aussi une masse molaire de $7,2 \times 10^5$ Da et $1,4 \times 10^4$ Da. La masse molaire des pics de 12h d'incubation, est de $7,0 \times 10^5$ Da et $1,3 \times 10^4$ Da.

Les présents résultats confirment que la souche *S. thermophilus* BN1 est réellement productrice de deux types d'EPS avec deux masses molaires différentes dans toutes les conditions établies.

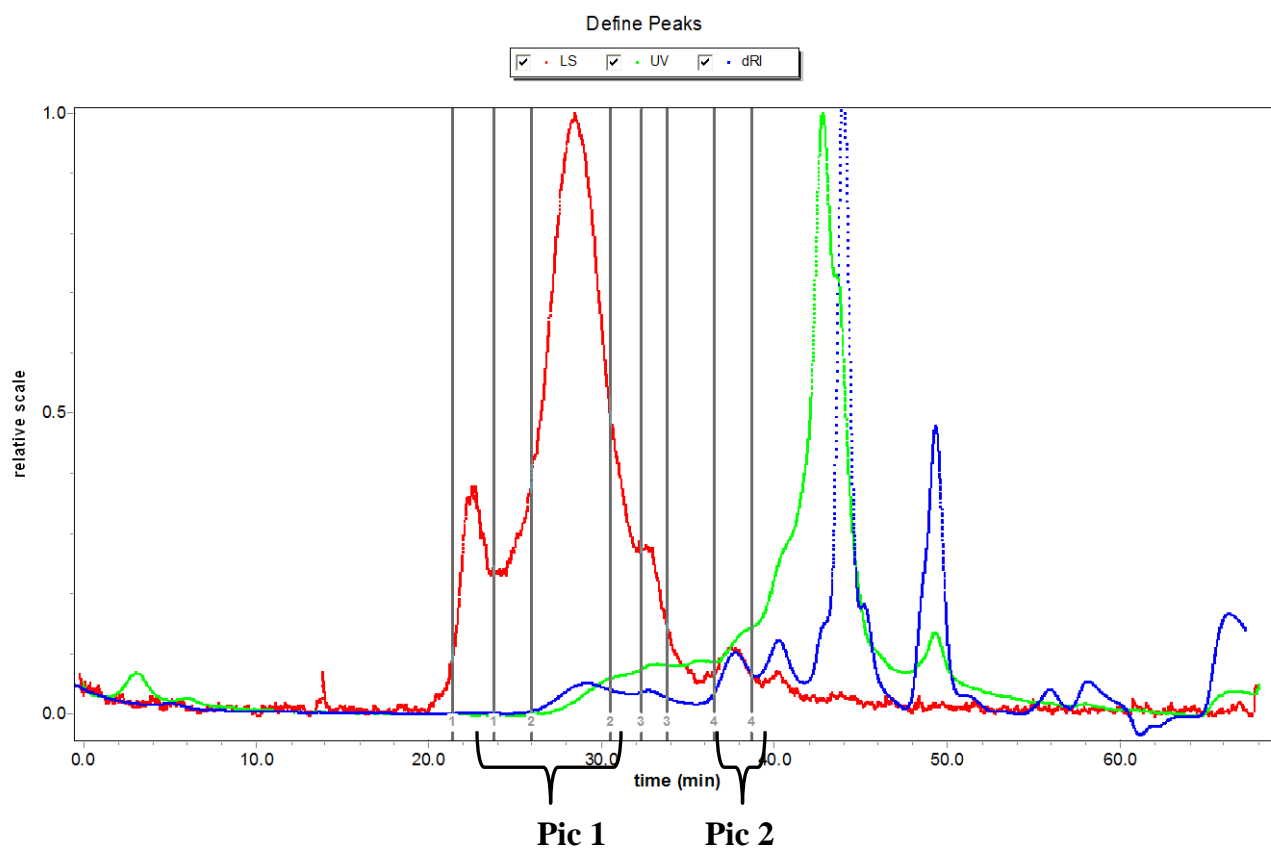


Fig. 34 : Chromatogramme obtenu après élution des échantillons d'EPS isolés et purifiés après 6h d'incubation à 42°C à partir du lait fermenté par la souche BN1.

- Diffusion de la lumière (Light scattering)
- Ultraviolet (280 nm)
- Indice de réfraction

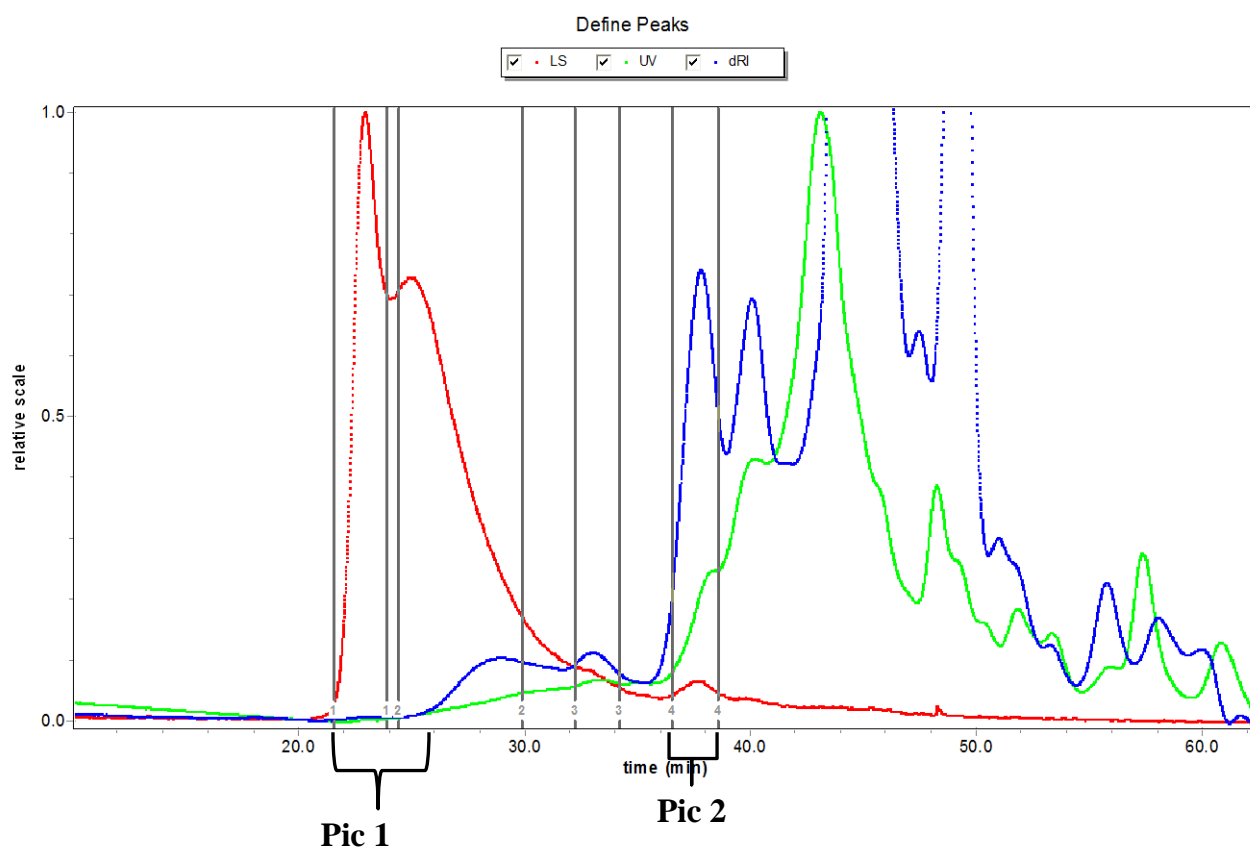


Fig. 35 : Chromatogramme obtenu après élution des échantillons d'EPS isolés et purifiés après 12h d'incubation à 42°C à partir du lait fermenté par la souche BN1.

- Diffusion de la lumière (Light scattering),
- Ultraviolet (280 nm),
- Indice de réfraction,

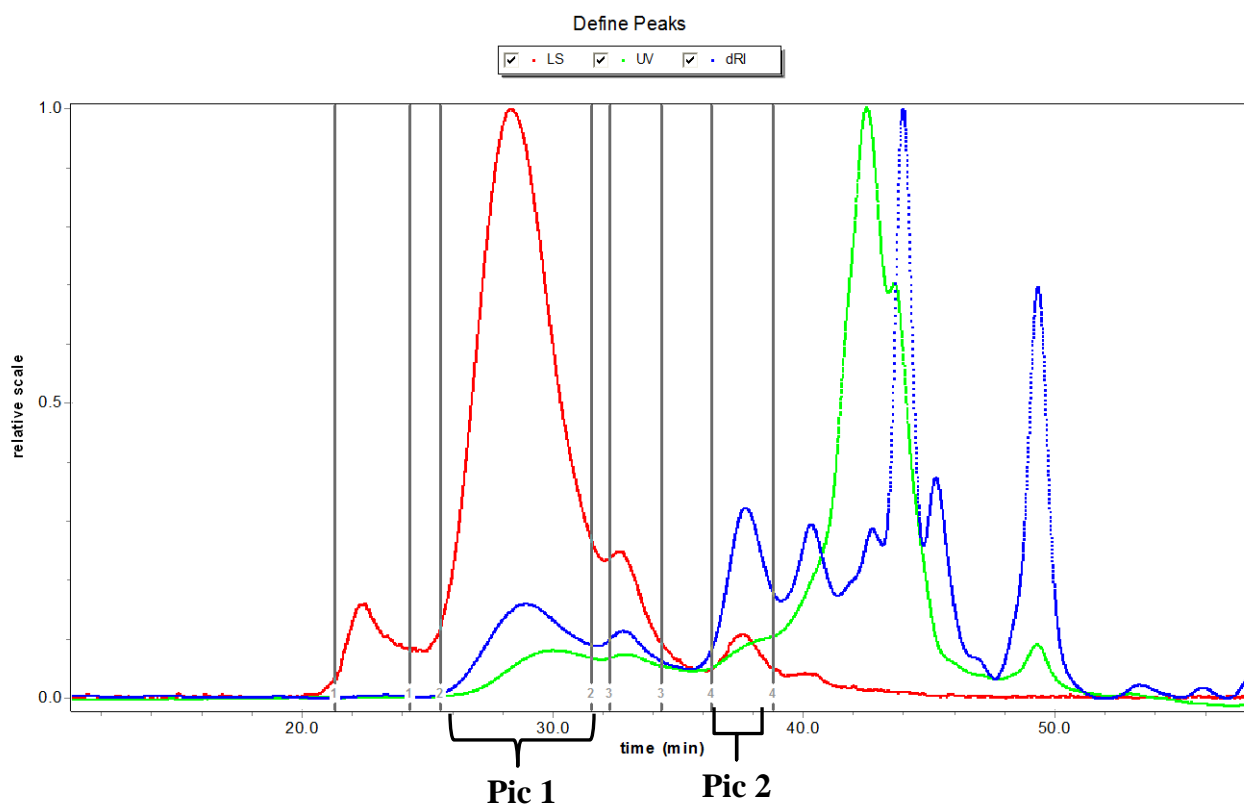


Fig. 36 : Chromatogramme obtenu après élution des échantillons d'EPS isolés et purifiés après 16h d'incubation à 37°C à partir du lait fermenté par la souche BN1.

- Diffusion de la lumière (Light scattering),
- Ultraviolet (280 nm),
- Indice de réfraction.

DISCUSSION

1. Identification phénotypique et génotypique des souches de *S. thermophilus*

Au cours de cette dernière décennie, plusieurs chercheurs se sont intéressés à la recherche de nouvelles souches de *S. thermophilus* à partir du lait cru (Ayhan et al. 2005) ou du lait fermenté artisanal (Chamas et al. 2006). La plupart des travaux réalisés dans ce sens ont omis l'identification moléculaire des souches. C'est alors qu'à l'issue de nos résultats, que nous considérons que l'identification phénotypique reste un critère relatif, qui doit être complété d'une identification génotypique par le séquençage des gènes codant à l'ARNr 16S.

Un autre élément important constaté est que dans la plupart des travaux publiés, les chiffres exacts sur la population des *S. thermophilus* présente dans les différents écosystèmes laitiers sont absents. Nos résultats ont montré que le nombre des *S. thermophilus* ne dépasse pas 1×10^3 UFC/mL dans le lait cru.

Selon Balta et al. (2011) (données non publiées), les *S. thermophilus* sont détectés dans les échantillons de laits crus par des méthodes moléculaires (DGGE) à des niveaux très faibles par rapport à d'autres espèces de bactéries lactiques, et selon cette équipe, l'isolement des *S. thermophilus* à partir du lait cru demeure une tâche difficile.

La difficulté rencontrée quant à l'isolement de cette espèce thermophile est due au fait que *S. thermophilus* est la seule bactérie lactique de grade alimentaire (GRAS) qui appartient au genre *Streptococcus*. Ce genre regroupe des espèces dont la plupart sont pathogènes; et que une identification biochimique partielle peut confondre *S. thermophilus* aux espèces pathogènes qui poussent à 45°C telle que *S. bovis*, *S. bovis* ou encore *S. lutetiensis*.

En ce qui concerne l'identification des souches isolées, elle a été effectuée dans un premier temps d'une façon classique en appliquant des tests microbiologiques et biochimiques. Les isolats sélectionnés ont d'abord été examinés à l'aide d'essais taxonomiques simples tels que, la morphologie des colonies et des cellules, le test à catalase et la coloration de Gram.

En se basant sur de nombreuses descriptions bibliographiques portant sur les aspects généraux des bactéries lactiques (**Schleifer, 1986 ; Kabuki et al. 2006 ; Delorme, 2008**); les résultats de ces tests préliminaires à savoir l'absence de la catalase et l'aspect macroscopique des colonies ont permis de classer les isolats parmi le groupe des bactéries lactiques.

Les isolats choisis présentaient des formes cellulaires associées en chaînettes, capables de croître à 45°C mais pas à 10°C. La résistance à une concentration de 6,5% de NaCl et l'hydrolyse de l'esculine ont été testées pour différencier les streptocoques des entérocoques (**Guiraud, 1998**). La croissance à pH 9,6 ne présente pas réellement un critère essentiel d'identification de *S. thermophilus*, étant donné que la souche BN3 isolée au cours de ce travail est capable de pousser à pH 9,6 et sur le plan génotypique cette souche a été identifiée comme *S. thermophilus*. Par ailleurs, les résultats du test de croissance sur le lait bleu de Shermann ont confirmé l'appartenance des souches retenues au genre *Streptococcus*. D'après **Guiraud (1998)**, toutes les espèces du genre *Streptococcus* sont incapables de se développer en présence de 1% de bleu de méthylène.

Les résultats de l'identification biochimique, ont permis de sélectionner un total de 33 souches, toutes apparentes aux caractéristiques phénotypiques de l'espèce *S. thermophilus*. Les caractéristiques phénotypiques observées chez les souches retenues ont été signalées chez de nombreuses souches de *S. thermophilus* (**Tabuki et al. 2006 ; Ayhan et al. 2005 ; Michaylova et al. 2007; Delorme, 2008**). Ces tests sont même considérés comme étant des tests clés rapides facilitant l'identification phénotypiques de *S. thermophilus* (**Kabuki et al. 2006 ; Bennama et al. 2012a**).

Pour ce qui est du profil fermentaire des sucres, il est bien connu que l'espèce *S. thermophilus* est incapable de fermenter le maltose à la différence des autres espèces du genre *Streptococcus* (**Schleifer, 1986; Manachini et al. 2002; Delorme, 2008**). En effet, à l'exception des souches isolées qui fermentaient lentement ce sucre (maltose), les autres souches appartenant à la collection ont

donné une réaction négative vis-à-vis de la fermentation de ce sucre clé indispensable dans l'identification phénotypique de *S. thermophilus*.

L'identification moléculaire des souches isolées, basée sur le séquençage et l'analyse de la séquence du gène codant à l'ARNr 16S a montré que seulement, 16 souches parmi la collection présentaient une similitude de plus de 100% avec les séquences de l'ARNr 16S des souches de référence de *S. thermophilus* déposées au niveau de la banque des données internationale (**GEN BANK**).

L'identification moléculaire des souches constitue un point très important pour toute démarche relative à l'isolement et à la sélection de nouvelles souches à intérêt technologique et biotechnologique. Elle permet en effet de poursuivre la recherche sur les souches identifiées en toute tranquillité et aussi d'écarter le doute observé lors de l'identification quand elle est limitée à des tests biochimiques.

2. Séquençage et localisation de la GT sur le génome de la souche BN1

Tous les clusters des EPS décrits à ce jour chez *S. thermophilus* semblent être codés chromosomiquement (**de Vuyst et al. 2001; Broadbent et al. 2003; Welman et Maddox, 2003**). En revanche, dans la plupart des souches de bactéries lactiques mésophiles, les gènes de production d'EPS sont codés par l'ADN plasmidique (**de Vuyst et Degeest, 1999; Welman et Maddox, 2003**).

La recherche de plasmides chez la souche BN1 a été par ailleurs effectuée en utilisant des procédures standards, mais aucun plasmide n'a été détecté (données non citées). En effet, la présence des plasmides chez *S. thermophilus* a été signalée dans seulement 20 à 30% des souches (**Turgeon et Moineau, 2001**).

En outre, la plupart des plasmides sont d'une taille de moins de 10 kb (**Turgeon et Moineau, 2001**), tandis que les clusters d'EPS sont généralement codés par des séquences génomiques de plus de 10 kb (**Germond et al. 2001 ; Broadbent et al. 2003 ; Dabour et La pointe, 2005**). **Stingle et al. (1996)** ont pu identifier le cluster des EPS de *S. thermophilus* Sfi6. Il est localisé au niveau du

génomique et constitué d'une région de 15,25 kb codant à 13 gènes (eps A à eps M), capables de diriger la biosynthèse des EPS.

Dans le présent travail, les primers hybrides **F-36** et **R-27** ont pu amplifier à partir du génome de la souche BN1 une séquence d'une taille exceptionnelle de 260pb. Cette séquence correspond bien à celle du gène codant à la glycosyltransférase. La démonstration de l'existence de cette partie de la grappe d'EPS signifie que la souche étudiée possède les gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS. Rappelons que la GT catalyse les premières étapes dans la biosynthèse des EPS chez la plupart des espèces bactériennes productrices d'EPS (**van Kranenburg et al. 1999; Provencher et al. 2003**). Des études (**van Kranenburg et al. 1997; Low et al. 1998; Stingle et al. 1996**) ont démontré que l'inactivation du gène codant à la GT altère ou interrompt la production des EPS, confirmant ainsi le rôle important de cette enzyme dans la biosynthèse des EPS.

Les primers **F-36** et **R-27** ont été désignés par **Provencher et al. (2003)** pour détecter le gène codant à la GT en particulier chez certaines souches du groupe *L. casei* et les souches *S. thermophilus* NCFB 2393, *S. thermophilus* FYE-41. Ces primers ont pu détecter sur le génome de ces souches une région d'une taille de 189pb. Par comparaison, la taille de ce fragment se rapproche à celle du fragment de la GT (260pb) isolé dans le présent travail. Ceci indique que le gène codant à la GT occupe juste une petite place au niveau des clusters responsables de la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques.

Le fragment de 260 pb codant au gène de la GT a été utilisé comme sonde pour localiser le cluster des EPS sur le génome de *S. thermophilus* BN1, par la technique du Southern blot. Les résultats observés ont confirmé que les gènes codants à la biosynthèse des EPS chez la souche étudiée sont réellement localisés sur le génome de la souche BN1.

D'un point de vue technologique, ce résultat est très intéressant et d'une importance extrême, car il relève de la stabilité du caractère relatif à la production des EPS chez la souche étudiée.

En outre, la localisation de la grappe génétique d'EPS sur des plasmides serait associée à l'instabilité du phénotype de production d'EPS chez certaines espèces de bactéries lactiques telles que *Lc. Lactis* et *Lb. casei* (Welman et Maddox, 2003 ; Provencher et al. 2003).

3. Croissance et pouvoir acidifiant de la souche BN1 sur milieu lait

La souche *S. thermophilus* BN1 a été ensemencée dans le lait et en culture pure à raison de 1% (1×10^8 UFC/ml). A ce propos, la plupart des travaux publiés (de Vuyst et al. 1998 ; Vanningelgem et al. 2004a et b ; Salazar et al. 2009) portant sur la croissance des *S. thermophilus* dans le lait parlent d'un taux d'inoculation initiale de 1% (v/v) en utilisant une culture fraîche de 12h d'incubation. Cependant, aucune étude n'a révélé l'ajustement de la taille initiale de l'inoculum en UCF/ml. Au cours de la réalisation de ces travaux, nous avons bien insisté sur la taille de l'inoculum et nous avons observé qu'une colonie de *S. thermophilus* mise en culture dans 10 ml de LM17 donne après 12h d'incubation à 42°C une population de 2×10^9 UFC/mL. Signalons au passage, que le délai d'incubation de 12h à 42°C, constitue la durée de la phase exponentielle chez *S. thermophilus* (de Vuyst et al. 1998). En revanche, l'utilisation directe d'un inoculum de cette taille ne permet pas d'étudier le comportement réel de cette espèce dans le lait, notre assertion est vérifiée, car un nombre initial élevé en cellules entraîne automatiquement une prolifération rapide des cellules bactériennes sur les milieux de culture. Dans des conditions similaires, tous les paramètres physiologiques en relation avec la biomasse, l'acidification et la production des EPS seront influencés. Néanmoins, l'augmentation du taux initial d'inoculation se révèle indispensable quand le *S. thermophilus* se développe lentement dans le lait.

Tenant compte de ces observations et étant donné que la souche BN1 est une souche nouvelle qui n'a pas été étudiée auparavant, nous avons tenu à ajuster

l'inoculum à 1×10^8 UFC/ml pour mieux explorer les aptitudes fermentaire de la souche dans le lait.

Cultivée dans les conditions sus-citées, la souche BN1 coagule le lait après une période d'incubation de six heures à 42°C. La capacité de la souche, de croître sur le lait est due principalement au métabolisme fermentaire du lactose présent naturellement dans ce milieu. Sa conversion en acide lactique ou autre diminue le pH final du milieu (**Zourari et al. 1991 ; Hols et al. 2005 ; Iyer et al. 2010**).

Ces aptitudes fermentaires de la souche pourraient être aussi liées comme il a été rapporté par de nombreux auteurs (**Bolotin et al. 2004 ; Monnet et al. 2005 ; Arioli et al. 2007**) à la présence au niveau du génome de *S. thermophilus* d'une conservation relativement élevée de gènes fonctionnels dans la biosynthèse des acides aminés; ce qui pourrait refléter l'importance de la synthèse des acides aminés pour la croissance de cette espèce dans le lait.

Toutefois, la composition du lait à savoir la disponibilité ou non de certains facteurs de croissance et la teneur en acides aminés est réputée avoir une grande influence sur la croissance des *S. thermophilus* et leurs aptitudes fermentaires dans le lait. De même, il est bien connu que les activités protéolytiques sont quasi absentes chez la plupart des souches de cette espèce thermophile (**Hols et al. 2005 ; Iyer et al. 2010**). Ce qui peut être à l'origine d'une croissance lente observée chez certaines souches de *S. thermophilus* cultivées dans le lait. Par ailleurs, il a été démontré que l'enrichissement du lait par des ingrédients comme l'extrait de levure, stimule la croissance de cette espèce dans le lait (**Vaningelgem et al. 2004a**).

Il est connu que *S. thermophilus* développe une haute affinité vis-à-vis du lactose. Il représente en effet pour la plupart des souches de streptocoques thermophiles, une source de carbone préférée et intéressante (**Poolman, 1993 ; Hols et al. 2005**). Cette affinité est en relation avec l'existence d'une panoplie de gènes et un équipement enzymatique important chez les streptocoques thermophiles (**Hols et al. 2005**). Certains auteurs (**Ricciardi et al. 2002**), ont démontré que le lactose est

responsable de la synthèse d'EPS chez *S. thermophilus* comparativement à d'autres sources de carbone telle que le fructose.

Les profils de biomasse et d'acidification affichés par la souche BN1 au cours de sa croissance dans le lait sont meilleurs par rapport à d'autres souches de *S. thermophilus*, mises en culture à 37°C ou à 42°C. Par exemple, la souche *S. thermophilus* ST-body-1, actuellement utilisée dans la fabrication du yaourt au Danemark, pousse dans le lait et d'une façon optimale à 37°C en augmentant le taux de sa biomasse de 2log et en affichant un pH final de 4,4 après 17h d'incubation (**Salazar et al. 2009**), alors que la souche BN1 donne une augmentation en biomasse de l'ordre de 3log à 37°C ou à 42°C. En outre, les souches *S. thermophilus* ST 111 et *S. thermophilus* CRL 1190 génèrent dans le lait respectivement une biomasse de $2,5 \times 10^8$ UFC/mL et $8,9 \times 10^8$ UFC/mL et affichent un pH de 4,60 et 4,58 après 12h d'incubation à 42°C (**Vaningelgem et al. 2004a**).

D'après les résultats de l'analyse par HPLC des acides produits par la souche BN1, cette dernière produit de faibles quantités d'acide lactique. Sur le plan technologique, cet aspect de la souche BN1 se révèle très utile pour élaborer des produits laitiers fermentés pas trop acides. De plus, à l'échelle industrielle l'espèce *S. thermophilus* n'est jamais utilisée en culture pure, elle est souvent associée à *L. bulgaricus* dans la fabrication du yaourt (**Guiraud, 1998 ; Iyer et al. 2010**). Cette faible production en acide lactique pourrait en effet faire de la souche BN1 une bonne candidate en industrie laitière.

Toujours d'après les résultats de l'analyse par HPLC, la souche BN1 produit d'autres acides organiques tels que l'acide formique et acétique. Ces productions microbiennes chez les streptocoques thermophiles ont été signalées par de nombreux auteurs (**Hols et. 2005; Iyer et al. 2010**).

4. Production d'EPS et détermination de la masse molaire

Différentes méthodes de recherche et de dépistage de souches productrices d'EPS ont déjà été décrites pour les bactéries lactiques. L'inspection visuelle de colonies bactériennes sur la gélose est probablement la méthode la plus simple, mais malheureusement très peu sensible (**Ruas-Madiedo et de los Royes-Gavilan, 2005**). Cette méthode adoptée initialement dans cette étude pour la détection des colonies muqueuses s'est montrée efficace, puisque la souche BN1 a été repérée à travers son aspect muqueux sur la gélose d'isolement.

Cependant, ce qui résulte des observations effectuées au cours de la recherche systématique des colonies muqueuses, confirme ce qui a été signalé par de nombreux auteurs (**Vandenberg et al, 1993; van Geel-Schutten et al, 1998 ; Sanni et al. 2002**) au fait de la rareté et la diminution de la biodiversité des bactéries lactiques productrices d'EPS en particulier celles appartenant à l'espèce *S. thermophilus*. A titre d'exemple, l'étude faite par **Van der Meulen (2007)**, montre que seulement dix isolats parmi 174 isolats de bactéries lactiques se sont avérés producteurs d'EPS.

Par ailleurs, la technique de coloration à l'encre de chine a permis aussi de sélectionner des souches formatrices de capsule. Cette technique appliquée largement dans ce travail est d'une importance non négligeable. La souche BN1 observée par cette technique est apparue sous forme de cellules associées en chaînettes entourées d'un halo transparent. La présence de la capsule ou autrement appelée les EPS capsulaires (capsule-like EPS) a été décrite chez de nombreuses souches de *S. thermophilus* (**Hassan et al. 1996 ; Hassan, 2008**).

L'influence de ce type d'EPS capsulaire sur la texture des produits laitiers fermentés a été confirmée par de nombreux auteurs (**Hassan et al. 2002 ; Hassan, 2008, Bennama et al. 2010b**). La formation des EPS de type capsulaire par la souche BN1 pourrait aussi expliquer les différentes textures observées sur le lait fermenté à 37°C et 42°C.

Concernant les EPS excrétés dans le lait par la souche BN1, la méthode gravimétrique a été utilisée dans un premier temps pour déterminer la quantité EPS formés par la souche. Au terme des conditions établies, un taux moyen d'environ 300 mg PDM/L a été obtenu; aucune différence significative n'a été observée entre les quantités d'EPS produites après 6h et 12 h à 42°C ou après 16 h à 37°C.

La quantification d'EPS chez *S. thermophilus* par la détermination du PDM a été rapportée par de nombreux auteurs (**de Vuyst et al. 1998 ; Vaningelgem et al. 2004a, b**). Ces auteurs ont obtenus différents taux selon les milieux de culture utilisés, qu'il s'agisse du lait ou du lait enrichi par addition de certains ingrédients tels que les acides aminés ou les vitamines.

La plupart des études effectuées sur des souches de *S. thermophilus* signalent la production dans le lait, des taux d'EPS en dessous de 100 mg PDM /L. Seules quelques souches déjà décrites produisent jusqu'à 150 mg PDM/L (**Vaningelgem et al. 2004**).

Par ailleurs, il a été observé que *S. thermophilus* LY03, (souche isolée à partir d'un yaourt), mise en culture dans le lait écrémé additionné de 1% de peptone et 0,5% d'extrait de levure; peut produire jusqu'à 550 mg PDM/L d'EPS (**de Vuyst et al. 1998**).

Rappelons que dans notre présente étude, l'extraction des EPS a été effectuée par précipitation à l'éthanol. Cette technique assez laborieuse, quoique démonstrative, pourrait toujours laisser des contaminants de polysaccharides ou de protéines dans les échantillons purifiés, ce qui peut interférer sur la quantification et la caractérisation des EPS (**Torino et al. 2000b; Laws et Marshall, 2001; Vaningelgem et al. 2004a**). Ceci a été observé dans notre étude où des résidus protéiques sont apparus lorsque les échantillons d'EPS sont analysés par HPLC. Les taux quantifiés d'EPS étaient à cet effet de 5 à 10 fois plus faibles que ceux obtenus avec le dosage gravimétrique.

Les résultats de quantification par HPLC indiquent que les conditions optimales de production d'EPS par *S. thermophilus* BN1 sont obtenues après 16h d'incubation à 37°C.

Concernant la température de croissance, il est utile de signaler qu'il s'agit d'un facteur ayant un impact important sur la production d'EPS par les souches de *S. thermophilus* productrices d'EPS (**Mozzi et al. 1995; de Vuyst et al. 1998; Kumar et al. 2007**). L'effet des deux températures testées (37°C et 42°C) sur la production d'EPS a été par ailleurs notable sur la qualité du caillé obtenu au niveau de chaque température. En effet, 37°C constitue une température de croissance sub-optimale pour *S. thermophilus*. De nombreuses études ont confirmé que les températures sub-optimales influencent positivement la production d'EPS par les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles (**Cerning et al. 1992; Cerning, 1995; de Vuyst et al. 1998**).

Néanmoins, **de Vuyst et al. (1998)** signalent une production maximale en EPS lorsque *S. thermophilus* est incubé à sa température optimale (42°C). Ces données indiquent que la production d'EPS peut varier entre les différentes souches de *S. thermophilus* mises en cultures dans des conditions de croissance similaires.

Cette variabilité n'est pas spécifique seulement à *S. thermophilus* car une grande diversité dans la production d'EPS a été observée au sein des autres espèces de bactéries lactiques. Par exemple, la production peut varier de 57 à 424 mg/L avec *Lb delbrueckii ssp bulgaricus* (**Cerning et al. 1986**), 30-85 mg/L, 100-600 mg/L et 105 à 150 mg/L avec *L. lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris* et *Lb. casei subsp. casei*, respectivement (**Cerning et al. 1992**) et enfin 105-168 mg/L avec les bifidobactéries (**Roberts et al. 1995**).

Il est également intéressant de noter qu'à 37°C, le lait fermenté par la souche BN1 avait une texture ferme et compacte difficile à briser. Cette texture peut être liée d'après **Vaningelgem et al. (2004a)** à une surproduction d'EPS, ou bien à la formation d'EPS de type capsulaire (**Hassan et al. 1996**). La formation de la

capsule (capsule-like EPS) a été effectivement observée chez la souche BN1. Ceci peut en effet expliquer la texture du lait fermenté à 37°C. Par ailleurs, la surproduction d'EPS à une température sub-optimale a été proposée comme un mécanisme de réponse au stress physiologique à ces niveaux, en particulier chez une espèce comme *S. thermophilus* ayant un système protéolytique déficient (**Ruas-Madiedo et de los Royes-Gavilan, 2005**).

En outre, **Vaningelgem et al. (2004a)** ont rapporté que l'utilisation d'une souche hyper-productrice d'EPS confère une forte capacité de coagulation au lait. Toutefois, chez les bactéries lactiques thermophiles, la quantité d'EPS produite est souvent associée à la croissance, et par conséquent, à la biomasse produite (**de Vuyst et al. 1998**). Cet aspect n'a cependant pas été vérifié expérimentalement chez la souche étudiée.

La plupart des données bibliographiques (**de Vuyst et Degeest, 1999 ; Ruas-Madiedo et de los Royes-Gavilan, 2005; Salazar et al. 2009**) rapportent que les EPS des bactéries lactiques possèdent une masse molaire apparente allant de 4.0×10^4 à 6.0×10^6 Da. L'analyse par HPLC des échantillons d'EPS de la souche BN1 a révélée l'existence de deux pics d'EPS avec deux masses molaires différentes ($7,2 \times 10^5$ et $1,4 \times 10^4$ Da). La production de deux types d'EPS est connue parmi certaines bactéries (**Sanchez et al. 2006**), y compris certaines souches de *S. thermophilus* (**Vaningelgem et al. 2004**) où la production de deux types d'EPS avec différentes masses molaires a été décrite.

Cependant, le fait qu'une seule de GT a été trouvée chez *S. thermophilus* BN1, ceci suggère que ces pics pourraient représenter deux fractions d'un même EPS. La production, de deux types d'EPS de masses molaires différentes, pourrait être influencée par les conditions de culture; entre autre, la disponibilité du carbone et d'azote et le rapport carbone/azote (**Dgeest et de Vuyst, 1999; Vaningelgem et al. 2004a**).

Etant donné que la souche BN1 ayant une capacité de produire des EPS, l'opération testée sur le milieu lait sans apport exogène de source d'azote ni de source de carbone, comparés à d'autres souches de *S. thermophilus* (ST 113, 534b, CH101), qui produisent des EPS de faible poids moléculaire sur le lait seul; la souche BN1 testée dans les mêmes conditions produit aussi des EPS d'un poids moléculaire faible. Chez les mêmes souches ST113, 534b et CH101, l'addition d'ingrédients exogènes (peptone ou extrait de levure) entraîne la biosynthèse d'EPS d'un poids moléculaire élevé (> à 1,000 kDa). Cependant, ces conditions n'ont pas été testées avec la souche BN1, du fait que notre principal objectif consistait à démontrer la production d'EPS par la souche BN1.

Chez *S. thermophilus* BN1, ni le temps ni la température d'incubation (optimale ou sub-optimale) n'affectent la MM des pics obtenus. Ce qui laisse penser que la souche BN1 produit des EPS stables quelque soient les conditions de culture. Par ailleurs, Il a été suggéré que la production de plus d'une fraction d'EPS par une seule souche pourrait être due à l'hydrolyse partielle du polymère par des enzymes intracellulaire libérées dans le milieu au cours de la croissance (**de Vuyst et al. 1998**). Cependant, chez la souche *S. thermophilus* BN1 une fermentation prolongée n'affecte pas la MM du polymère EPS.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons obtenu une nouvelle collection de souches de *S. thermophilus* isolées à partir de différents écosystèmes laitiers. Parmi cette collection une souche productrice d'EPS a été sélectionnée.

Les expérimentations menées dans un premier temps ont à la fois visé l'isolement et la recherche systématique de souches productrices d'EPS, par la détection visuelle des colonies d'aspects muqueux ou visqueux. Après isolement, les souches retenues ont été identifiées par des tests microbiologiques et biochimiques. Leur appartenance à l'espèce *S. thermophilus* a été par ailleurs confirmée par des méthodes moléculaires en procédant au séquençage de l'ARNr 16S. A cet effet, une collection comportant 16 souches identifiées en tant que *S. thermophilus* a été retenue. Néanmoins, il demeure important de rappeler que la population des *S. thermophilus* dans les écosystèmes laitiers étudiés est présente, mais à des taux faibles comparativement aux autres coques thermophiles.

Dans un second temps, l'étude de la production d'EPS a été traitée d'un point de vue moléculaire, où la détection de certains gènes codants à la synthèse d'EPS a été effectuée. Dans cette perspective, il a été procédé à la détection des gènes codants à la GT chez les premières souches isolées. Les résultats de cette étape ont permis d'obtenir quatre clones positifs portant le gène codant à la GT chez les souches nommées BN1 et BN3. La séquence obtenue a été enregistrée au niveau de la base internationale des données (NCBI). Cette dernière a été utilisée comme sonde dans la localisation du cluster EPS chez la souche étudiée, par la technique d'hybridation « southern blot ». Les résultats observés ont confirmé que la localisation du cluster EPS est chromosomique.

Le développement de la souche sélectionnée dans le lait a été évalué après 6h et 12h d'incubation à 42°C et 16h à 37°C. Concernant la croissance, les taux dénombrés et exprimés en log UFC/ml ont montré une bonne augmentation de la biomasse par comparaison au nombre initial d'inoculation. La biomasse produite a

provoqué une acidification dans le milieu, révélée par l'abaissement du pH d'une part et la production d'acide lactique d'autre part.

Quoique qu'elle soit inoculée dans le lait à un taux faible et comparée à d'autres souches de *S. thermophilus*, et par rapport au comportement habituel des *S. thermophilus*, la souche BN1 exhibe des propriétés technologiques intéressantes.

Quant à l'aspect biochimique des EPS produits, après extraction et quantification, *S. thermophilus* BN1 s'est avérée capable de produire des EPS. C'est ainsi que le taux le plus élevé exprimé en mg PDM/L a atteint environ 300 et ce suivant les conditions préalablement établies. L'analyse par HPLC a montré la présence de deux pics avec deux masses molaires différentes ($7,2 \times 10^5$ et $1,4 \times 10^4$ Da). La présence du polymère EPS dans les échantillons analysés a démontré et confirmé que la souche BN1 est productrice d'EPS.

Les résultats observés nous ont aussi permis de démontrer que la production d'EPS par la souche BN1, pourrait être affectée ou stimulée par certaines conditions de croissance (i.e. la température d'incubation).

Il est important d'affirmer clairement que la souche BN1 produit des EPS capsulaires et des EPS sécrétés dans le milieu lait. Ces deux types d'EPS ont nettement influencé la texture du lait fermenté à 37°C et à 42°C.

C'est ainsi qu'au terme de ce travail, une nouvelle souche de *S. thermophilus* productrice d'EPS est née, pour être une candidate dans l'industrie des produits laitiers fermentés. D'autres tentatives de recherches systématiques devraient être encouragées pour trouver de nouvelles souches productrices d'EPS à partir des écosystèmes laitiers domestiques; en particulier des préparations artisanales locales où la biodiversité semble être préservée. En conséquence, le nombre et la biodiversité des souches ayant un potentiel d'être utilisées comme starter pourraient être augmentés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ai L., Zhang H., Guo B., Chen W., Wu Z., & Wu Y., 2008** : Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. *Carbohydrate Polymers*. **74**: 353-357.
- **Aktypis A., Kalantzopoulos G., & Ten Brink B., 1998**: Purification and characterization of *Thermophilin T*, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*. **84** : 568-576.
- **Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F., & Shah N.P., 2006**: Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*. **16**: 40-51.
- **Ames B.N., 1999**: Micronutrient deficiencies cause DNA damage and cancer. *Food Science and Agricultural Chemistry* **1**: 1-15.
- **Arioli S., Monnet C., Guglielmetti S., Parini C., De Noni I., Hogenboom J., 2007**: Aspartate biosynthesis is essential for the growth of *Streptococcus thermophilus* in milk, and aspartate availability modulates the level of urease activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:5789-5796.
- **Atlan D., Béal C., Chouyekh H., Gaudu P., Hols P., Juillard V., Ladero V., Lortal S., Loubière P., Monnet C., Monnet V., & Yvon M., 2008**: Bactérie lactique: Métabolisme et ingénierie métabolique, *In* : **Corrieu G., & Luquet, F. M. 2008** : Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments, *Eds. Tec & Doc*. Paris (France). pp, 271-509.
- **Awad S., Hassan A.N. & Muthukumarappan K., 2005**: Application of exopolysaccharides producing cultures in reduces fat cheddar cheese: texture and melting properties. *Journal of Dairy Science*. **88**: 4204-4213.
- **Ayhan, K., F. Durlu-Ozkay and N. Tunail, 2005** : Commercial important characteristics of Turkish origin domestic strain of *Streptococcus thermophilus*

- and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *International Journal of Dairy Technology*. **58** (3): 150-157.
- **Bassit N., Latrille E., Boquien C. Y., Picque D., Corrieu G., 1994** : Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. *Lait*. **74** : 115-126.
 - **Bennama R., Fernández M., Ladero V., Alvarez M. A., Rechidi-Sidhoum N., & Bensoltane A., 2012a** : Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk. *European Food Research Technology*. **234** : 119-125.
 - **Bennama R., Rechidi-Sidhoum N., & Bensoltane A., 2012b**. Effect of some fermentation Substrates and Growth Temperature on Exopolysaccharide Production by *Streptococcus Thermophilus* BN1. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. **2** (1): 44-47.
 - **Blais A., Busque G., Coiffé J. C., Conrad F., Dansereau D., Dupuis R., Houle, M., Lebeuf, J., & Guerch A., 1988** : Les Fromages. Conseil des denrées alimentaires du Québec. Québec : Ministère de l'agriculture, de pêcheries et de l'alimentation.
 - **Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich S. D., Kulakauskas S., Lapidus A., Goltsman E., Mazur M., Pusch G. D., Fonstein M., Overbeek R., Kyprides N., Purnelle B., Prozzi D., Ngui K., Masuy D., Hancy F., Burteau S., Boutry M., Delcour J., Goffeau A., & Hols. P., 2004**: Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology*. **22**:1554-1558.
 - **Bourgoin F.F., Pluvinet A., Gintz B., Decaris B., & Guédon G., 1999** : Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Gene*. **233**:151-161.
 - **Broadbent J. R., McMahon D. J., Welker D. L., Oberg C. J., & Moineau S., 2003**: Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. *Journal of Dairy Science*. **86**:407-423.

- **Canquil N., Vilarroel M., Bravo S., Rubilar M., & Shene C., 2007:** Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. **68**: 270-279.
- **Cerning J., 1990:** Exocellular polysaccharides produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* **87**: 113-130.
- **Cerning J., 1995:** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. **75**: 463-472.
- **Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J. & Landon M., 1986:** Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters*. **8**: 625–628.
- **Cerning J., Bouillanne C., Landon M. & Desmazeaud M., 1992:** Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **75**: 692–699.
- **Chammas G., Rachad S., Corrieu G., & Béal C., 2006:** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban” *International Journal of Food Microbiology*. **110**: 52–61.
- **Chaves A.C., fernandez M., Lerayer A.L., Mierau L., Kleerebezem M., & Hugenholtz J., 2002 :** Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied Environmental Microbiology*. **68**: 5656-5662.
- **Chen Y. M., Weaver, C. A., & Burne R. A., 2000:** Dual function of *Streptococcus salivarius* urease. *Journal of Bacteriology*. **182**: 4667–4669.
- **Cogan T. M., O’Dow M., & Mellerick D., 1981:** Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **41**: 1-8.
- **Collins E. B., 1972:** Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. *Journal of Dairy Science*. **55**: 1022-1028.
- **Corrieu G., & Luquet, F. M. 2008 :** Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments, ” *Eds. Tec & Doc*. Paris (France). pp, 319-331.
- **Courtin P., Monnet V., & Rul F., 2002:** Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*. **148**:3413–3421.

- **Crittenden R.G., Martinez N.R., & Playne M.J., 2003:** Synthesis and utilisation of folate by yogourt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **80**:217-22.
- **Dabour N., & La pointe G., 2005:** Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 7414–7425.
- **de Vos W. M. & Simons G., 1994:** Gene cloning and expression systems in lactococci, In :Gasson M. J., de Vos W. M., (eds.) Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria, Chapman and Hall, London.
- **De Vos W.M., 1996:** Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antony Van Leeuwenhoek*. **70**: 223-242.
- **de Vos WM, Vos P, Dehaard H, Boerrigter I., 1989:** Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene*. **85**: 169–176.
- **De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. & Degeest B., 2001:** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**:687–708.
- **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.
- **De Vuyst L., Zamfir M., Adriany T., Marshall V., Degeest B. et Vaningelgen F., 2003:** Exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*. **13**:707-717.
- **Degeest B., & de Vuyst L., 1999ab:**Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*. **23**: 153-177.
- **Degeest B., & de Vuyst L., 1999b:** Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and

- exopolysaccharides production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **65 (7)**: 2863–2870.
- **Degeest B., et De Vuyst L., 2000**: Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:3519-3527.
 - **Degeest B., Vaningelgem F. & De Vuyst L., 2001**: Microbial physiology, fermentation kinetics and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **13** :707-717.
 - **Dellaglio F., De Roissant H., Torrain S, Curk C. & Janssen D., 1994** : Caractérisations générales des bactéries lactiques. In : **de Roissant H., & Luquet F. M.**, Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Uriage, France : *Lorica*. vol. **1** :25-116.
 - **Delorme C., 2008**: Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. **126**: 274- 277
 - **Desmazeaud M. J., & de Roissant H., 1994** : Métabolisme général des bactéries lactiques. In : **de Roissant H., & Luquet F. M.**, Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Uriage, France : *Lorica*. vol. **1** :169-207.
 - **Desmazeaud M. J., 1992** : les bactéries lactiques, In : **Hermier J., Lenoir J., weber F.**, Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Ed. *Cepil*. 6-14.
 - **Desmazeaud M., 1983** : L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait*. **63** : 267-316.
 - **Durlu-Özkaya F., Aslim B., & Taha Ozkaya M., 2007**: Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT. Food Science and Technology*. **40**: 564-568.
 - **Durso L., & Hutkins R., 2003**: Starter cultures. University of Nebraska, Lincoln, NE, USA. Elsevier Science Ltd. pp: 5583-5593.
 - **Duwat P., Ehrlich S. D., Cruss A., 1995**: The rec A gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Molecular Microbiology*. **17**: 1121-1131.

- **Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M., Bottger E.C., 1989:** Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. **17**:7843–7853
- **Facklam R., 2002:** What Happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**: 613-630.
- **Folkenberg D. M., Dejmek P., Skriver A., Guldager H. S., & Ipsen R., 2006:** Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*. **16**:111–118.
- **Gancel F., & Novel G., 1994 :** Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *Journal of Dairy Science*. **77**: 685- 688.
- **Garcia-quintans N., Magni C., de Mandiza D., & Lopez P. 1998 :** The citrate transport system of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**:850- 857.
- **Germond J. E., Delly M., D'Amico N., Vincent S. J. F., 2001:** Heterologous expression and characterization of the exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* Sfi 39. *European Journal of Biochemistry*. **268**: 5149-5156.
- **Grobben G.J., Sikkema J., Smith M.R. & de Bont J.A.M., 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.A.M., 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**: 279–284.
- **Guiraud J.P., 1998 :** Microbiologie alimentaire. *Edition Dunod Paris* : 19-294.
- **Hassan A. N., Frank J. F., & Qvist K. B., 2002b:** Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocalscanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*. **85**:1705-1708.

- **Hassan A. N., Frank J.F., Schmidt K.A., Shalabi S.I., 1996:** Rheological properties of yogurt made using encapsulated non ropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science.* **79**:2091-2097
- **Hassan A.N., 2008:** Possibilities and Challenges of Exopolysaccharide-Producing Lactic Cultures in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science.* **91**:1282-1298.
- **Hassan A.N., Frank J.F., & El soda M., 2003b:** Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal.* **13**:755-762.
- **Helinck S., Le Bars D., Moreau D., & Yvon M., 2004:** Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology.* **70**: 3855–3861.
- **Hemme D., Wahl D. et Nardi M., 1980.** Variations de l'équipement enzymatique de *Streptococcus thermophilus*. *Lait.* **60** : 111-129.
- **Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Blotin A., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Guedon E., Monnet V., Renault P., & Kleerebezem M., 2005 :** new insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews.* **29** :435-463.
- **Ivanova I., Miteva V., Stefanova T., Pantev A., Budakov I., Danova S., Moncheva P., Nikolova I., Dousset X., & Boyaval P., 1998 :** Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology.* **42**:147-58.
- **Iyer R., Tomar S.K., Uma Maheswari T., & Singh R., 2010:** *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* **20**:133-141.
- **Kabuki T., Uenishi H., Watanabe M., Seto Y., & Nakajima H., 2007:** Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *Journal of Applied Microbiology.* **102**: 971–980.
- **Konings W. N., Lolkema J. S., Poolman B., 1995:** The generation of metabolic energy by solute transport. *Archives Microbiology.* **164**: 232-242.

- **Koumegne R., Bracquart P., & Linde G., 1984:** Application d'un réactif de transparisation du lait au dénombrement des bactéries. *Lait*. **64** : 418-435.
- **Kumar A.S., Mody K., & Jha B., 2007:** Bacterial exopolysaccharides- a perception. *Journal basic Microbiology*. **47**:103-117.
- **Larpent J. P & Larpent M., 1997:** Mémento technique de microbiologie. 3ed. Tec & Doc. Lavoisier. 1039p.
- **Laws A., Gu Y.G. & Marshall V., 2001:** Biosynthesis chracterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. **19**: 597-625.
- **Laws A.P., & Marshall V.M., 2001:** The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **1**: 709-721.
- **Lemoine J., Chirat F., Wieruszkeski J.M., Strecker G., Favre N., & Neeser J.R., 1997:** Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SF139 and SF112. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3512-3518.
- **Levander F., & Radstrom P., 2001:** Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharide biosynthesis in glucose and lactose-utilizing *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 2734–2738.
- **Low, D., Ahlgren J. A., Horne D., McMahon D. J., Oberg C. J., & Broadbent J. R., 1998:** Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharides in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**:2147–2151.
- **Manachini P. L., Flint S. H, Ward L. J., Kelly W., Fortina M. G., Parini C., Mora D., 2002:** Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint et al. 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou et al. 1998). *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. **52**:945-951.
- **Marciset O., Jeronimus-Stratingh M.C., Mollet B., & Poolman B., 1997:** Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **272**: 277-284.

- **Margaritis A. & Pace G.W., 1985:** Microbial polysaccharides. In Comprehensive biotechnology: The principales application and regulation of biotechnology in industry, Agriculture and Medicine. *Pergamon Press New York*: 1005-1045.
- **Marshall V. M., Dunn H., Elvin M., McLay N., Gu Y., & Laws A. P., 2001 :** Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. *Carbohydrates Ressources*. **331**:413–422.
- **Mathot A.G., Beliard E. & Thault D., 2003:** *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocine potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *Journal of Dairy Science*. **86**: 3068-3074.
- **Michaylova M., Minkova1 S., Kimura K., Sasaki T., & Isawa K., 2007:** Isolationand characterization of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiology Letters*. **269**: 160-9.
- **Monnet C., Mora D. & Gorrieu G., 2005:** Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Applied Environmental Microbiology*. **71**:3376-3378.
- **Monsan P., Bozonne S., Albenne C., Joucla G., Willemot R. M., & Renaud-Siméon M., 2001.** Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11** : 673-683.
- **Mora D., Fortina M. G., Parini C., Ricci G., Gatti M., Giraffa G., 2002:** Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. **93**: 278–287.
- **Mora D., Maguin E., Masiero M., Parini C., Ricci G., Manachini P. L., 2004:** Characterization of the urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal Applied Microbiology*. **96**: 209–219.
- **Mora D., Monnet C., Parini C., Guglielmetti S., Mariani A., & Pintus P., 2005 :**Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Research in Microbiology*. **156**: 897–903.

- **Morisson H.I., Schaubel D., Desmeules M., & Wigle D.T., 1995:** Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *Journal of the American Medical Association*. **275**: 1893-1896.
- **Moschetti G. Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F. Deiana P., & Coppola S., 1998:** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. **85**: 25-36.
- **Mozzi F., Oliver G., de Giori G.S. & de Valdez G.F., 1995:** Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*. **50**: 80–82.
- **Navarini I., Abatangelo A., Bertocchi C., Conti E., Bosco M. et Picotti F., 2001 :** Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi20. *Bio-macromoles*. **28**: 219-226.
- **Ogawa H., Gomi T., & Fujioka M., 2000:** Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **32**:289-301.
- **Ott A., Germond J.E. & Chaintreau A., 2000:** Origin of acetaldehyde during milk fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:1512-1517.
- **Petit C., Grill J. P., Maazouzi N., & Marczak R., 1991:** Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-bath cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **36 (2)**: 216-221.
- **Poolman B., 1993:** Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria. *Lait*. **73**:87-96.
- **Pot B., 2008:** The taxonomy of lactic acid bacteria, *In* : **Corrieu G., & Luquet, F. M. 2008** : Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments, *Eds. Tec & Doc*. Paris (France). pp, 3-152.
- **Provencher C., Lapointe G., Sirois S., Van Calsteren M. R. & Roy D., 2003:** Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* Group. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3299-3307.

- **Rallu F., Taillez P. Ehrlich S.D. & Renault P., 2002:** Common sheme of evolution between eps clusters of the food bacteria *Streptococcus thermophilus* and cps clusters of the pathogenic streptococci. In *Proceedings of the American society of Microbiology Conference on Streptococcal Genetic*: 112. Asheville, North Carolina.
- **Ricciardi A., Parente E., Crudele M. A., Zanetti F., Scolari G., & Mannazzu I., 2002.** Exopolysaccharide by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. *Journal of Applied Microbiology*. **92** : 297-306.
- **Roberts C.M., Fett W.F., Osman S.F., Wijey C., O'Connor J.V. & Hoover D.G., 1995 :** Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**: 463-468.
- **Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilán C. G. J., 2005:** Invited review: Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **88**:843-856.
- **Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., & Zoon P., 2002:** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **12** : 163-171.
- **Salazar N., Prieto A., Leal J. A., Mayo B., Bada-Gancedo J. C., de los reyes-Gavilán C. G., & Ruas-Madiedo P., 2009.** Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal Dairy Science*. **92**: 4158–4168.
- **Sambrook J., & Russell D. W., 2001:** Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. N.Y.
- **Sánchez J.I., Martínez B., Guillén R., Jiménez-Díaz R., Rodríguez A., 2006:** Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 7495-7502.

- **Säwen E., Huttunen E., Zhang X., Yang Z., & Widmalm G., 2010:** Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST 111 solely by NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*. **47**: 125-134.
- **Schleifer, K.H., 1986.** Gram-positive cocci. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. Baltimore: Williams and Wilkins. 999–1100.
- **Somkuti G. A., & Steinberg D.H., 2003:** Pediocin production by recombinant lactic acid bacteria. *Biotechnology letters*. **25**:473-477.
- **Stingele F., 1998:** Exopolysaccharide production and engineering in dairy *Streptococcus* and *Lactococcus*. *Abstracts of the ASM Conference on Streptococcal Genetics* : 31-32. Vichy, France.
- **Stingele F., Neeser J., & Mollet B., 1996:** Identification and characterization of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*. **178**: 1680-1690.
- **Stingele F., Vincent S., Faber E., Newell J., Kamerling, J. & Neeser J., 1999:** Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular Microbiology*. **32**:1287-1295.
- **Sybesma W., Starrenburg M., Mierau I., Kleerebezem M., De Vos W.M., & Hugenholtz J., 2003:** Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*. **69** : 4542-4548.
- **Tailliez P., 2001 :** Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*. **81** : 1–11.
- **Thompson J., & Gentry-Weeks C. R., 1994:** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : **de Roissart H., & Luquet F. M.,** Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Eds. Uriage, France : *Lorica*. **vol. 1** : 239-290.
- **Torino M. I., Sesma F., & de Valdez G. F., 2000b:** Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification. *Milchwissenschaft*. **55**:314–316.

- **Turgeon N., & Moineau S., 2001:** Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid*. **45**:171–183.
- **Vaillancourt K., Lemay J.D., Lamoureux M., Frenette M., Moineau S. & Vadeboncoeur C., 2004:** Characterization of a galactokinase-positive recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 4596-4603.
- **Van den Berg D. J. C., Smits A., Pot B., Ledebouer A. M., Verbakel J. M. A., Verrips C. T., 1993:** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and cultures conditions. *Food Microbiology*. **7**: 189-205
- **Van den Bogaard P.T., Hols P., Kuipers O.P., Kleerebezem M. & de Vos W.M., 2004:** Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Systematic Applied of Microbiology*. **27**: 10-17.
- **Van der Meulen R., Grosu-Tudor S., Mozzi F., Vaningelgem F., Zamfir M., de Valdez G. F., & De Vuyst L., 2007:** Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*. **118** : 250–258.
- **Van Kranenburg R., Van Swam I. I., Marugg J. D., Kleerebezem M., & de Vos W. M., 1997.** Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. **24**:387–397.
- **Van Kranenburg R., Van Swam I.I., Kleerebezem M. & De Vos W.M., 1998:** Expression, disruption, and complementation of *eps* genes essential for exopolysaccharide biosynthesis in *L. lactis*. *Abstracts of the American Society for Microbiology. Conference on Streptococcal Genetics*: 45-46. Vichy, France.
- **Van Kranenburg R., Vos H. J., van Swam I. I., Kleerebezem M., & de Vos W. M., 1999:** Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *Journal of Bacteriology*. **181**:6347–6353.

- **Van Marle M. E., et. Zoon P. 1995:** Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim milk gels. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **49**: 47–65.
- **Vanhooren P., & Vandamme E.J., 1998:** Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent Research Development in Fermentation and Bioengineering*. **1**:253-299.
- **Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., & De Vuyst L., 2004a.** Biodiversity of Exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* .**70**: 900- 912.
- **Vaningelgem F., Van der Meulen R., Zamfir M., Adriany T., Laws P. & De Vuyst L., 2004b:** *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high-molecular-mass in milk-based medium. *International Dairy Journal*. **14**: 857-864.
- **Vinderola C.G., Duarte J. Thangavel D., Perdigon G., Farnworth E. & Matar C., 2005b :** Immunomodulating capacity of kefir. Importance of dose and cell viability. *Journal of Dairy Research*. **72**: 195-202.
- **Vinderola C.G., Perdigon G., Duarte J. Thangavel D., Farnworth E. & Matar C., 2006:** Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*. **211**: 149-156.
- **Ward D.J. & Somkuti G.A., 1995:** Characterisation of bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST 134. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **43**: 330-335.
- **Welman A.D. & Maddox I.S., 2003:** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*. **21**: 269-274.
- **Zouari A., Roger S., Chabanet C. & Desmazeaud M.J., 1991:** Characterisation of lactic acid bacteria from Greek yaourt. *Lait*. **71**:445-461.
- **Zubillaga M., Weil R., Postaire E., Goldman C., Caro R. & Boccio J., 2001:** Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*. **21**: 569-579.

PUBLICATIONS

Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk

Rabha Bennama · María Fernández ·
Victor Ladero · Miguel A. Alvarez ·
Nadra Rechidi-Sidhoum · Ahmed Bensoltane

Received: 9 June 2011 / Revised: 20 September 2011 / Accepted: 29 October 2011 / Published online: 15 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Lactic acid bacteria (LAB) play a key role in the development of the organoleptic and textural qualities of fermented dairy products. The exopolysaccharides (EPS) produced by LAB are of great technological interest since they improve the rheological characteristics of these products and help reduce syneresis. In the present work, an EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strain was isolated from Algerian raw cow milk. Its identity was confirmed by biochemical and molecular methods. The presence in its genome of a priming glycosyltransferase gene was confirmed by PCR. The strain's growth and EPS production in milk was analysed and the molar mass of the EPS produced determined by HPLC.

Keywords *Streptococcus thermophilus* ·
Exopolysaccharide · Priming glycosyltransferase gene ·
EPS production in milk · Molar mass

Introduction

The lactic acid bacteria (LAB) are Gram-positive microorganisms that play an essential role in the industrial production of fermented dairy products. Their enzymatic

activities and the metabolic products they generate during fermentation and ripening confer the rheological and organoleptic qualities desired upon these products. Some strains are known to synthesise exopolysaccharides (EPS). These macromolecules play an important role in the development of the texture of yoghurt and other fermented milks, cheeses and low-fat dairy desserts [1, 2]. EPS can be classified into two groups: homopolysaccharides (HoPS) and heteropolysaccharides (HePS) [2, 3]. HoPS are composed of monosaccharide subunits, while HePS are formed from a backbone of repeated subunits of different monosaccharides, e.g., D-galactose, D-glucose or L-rhamnose, in different ratios. Different types of linkage can occur within a repeating unit, determining the rigidity and rheological properties of a HeP [4]. Well-known examples of HoPS include the dextrans and fructans produced by *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus salivarius*, respectively [3], while HePS are synthesised by many LAB including strains of *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* and a number of dairy lactobacilli [5]. The total yield of EPS depends on the composition of the growth medium (carbon and nitrogen sources, growth factors, etc.), the temperature, pH and the incubation time. Whereas mesophilic strains can produce maximal amounts of HePS under suboptimal growth conditions, production by most of the studied thermophilic LAB strains is growth-dependent [3].

The quantity of EPS produced by LAB in milk varies widely among species and indeed strains. In some cases, only small amounts are produced in the food matrix, and even this production is commonly unstable [5]. This instability has been related to the loss of plasmids coding for the EPS gene cluster.

The Qualified Presumption of Safety (QPS) or Generally Recognized As Safe (GRAS) status of many LAB renders them very attractive as EPS producers for the food industry

R. Bennama · N. Rechidi-Sidhoum
Département de Biotechnologie, Université de Mostaganem,
BP 227, 27000 Mostaganem, Algeria

M. Fernández (✉) · V. Ladero · M. A. Alvarez
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC),
Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Spain
e-mail: mfernandez@ipla.csic.es

A. Bensoltane
Département de Biologie, Université d'Oran, Oran, Algeria

[5], and important advances have been made in the study of EPS production by these bacteria in recent years. The increasing demand for fat-free or reduced fat products is also raising interest in the use of EPS-producing LAB as natural biothickeners.

S. thermophilus is a LAB widely used in the manufacture of dairy products—in fact, it is the most important thermophilic dairy starter [6–8]. The species is able to grow (or at least survive) at the high temperatures (45 °C) required in various dairy product manufacturing processes. For cheese-making, *S. thermophilus* is used alone or in combination with different lactobacillus and mesophilic starters, while for yoghurt, it is normally used with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [9]. The role of *S. thermophilus* in milk fermentation is the rapid conversion of lactose into lactic acid, which causes a rapid reduction in the pH and encourages the production of metabolites important to the final flavour [7]. A number of *S. thermophilus* strains synthesise EPS [10–12], which contribute to the desirable viscous texture and rheological properties of fermented milk products, particularly yoghurt [10, 13].

The interest of industry in finding starters with new metabolic properties has revived the idea of screening artisanal dairy products of different origin. Currently, much attention is being paid to improving the texture of food by screening for new EPS-producing strains. The aim of the present work was to isolate EPS-producing *S. thermophilus* strains from raw cow milk samples from Algeria, and to characterise the EPSs they make.

Materials and methods

Bacteria and growth conditions

Candidate EPS-producing bacterial strains were isolated from raw milk samples by serial dilution in peptone saline solution [peptone (1 g/L) and NaCl (8.5 g/L)] followed by streaking on the surface of M17 agar supplemented with 5.0 g/L of lactose (LM17) (Oxoid, UK). These plates were incubated at 42 °C for 48 h under anaerobic conditions, established using Anaerocult A tablets (Merck, Germany), to isolate thermophilic microorganisms.

Escherichia coli used for cloning procedures were grown in Luria medium (LB) [14] at 37 °C, when appropriate ampicillin (100 mg/L) was added. For long-term maintenance, stock cultures were stored in 20% (v/v) glycerol, 80% (v/v) LM17 or LB at –80 °C.

Exopolysaccharide production

Possible EPS-producing strains were identified via their mucoid or ropy appearance. EPS production was assessed

by Indian ink (Art. Material S.A., China) staining, and by growing the candidate strains on ruthenium red (Riedel de Haën AG, Germany) agar (RRM17). Ruthenium red (0.08% wt/vol) was added to LM17 as described by Dabour and LaPointe [15]. This stain tints the bacterial cell wall: Non-EPS-producing strains produce red colonies while EPS producers are white.

Identification of isolated strains

The isolated candidate strains were identified by phenotypic and molecular methods. Colony morphology, Gram staining, catalase reaction, tolerance to 4% (w/v) and 6.5% (w/v) NaCl, growth at 10 and 45 °C and the hydrolysis of starch and esculin were all examined. Carbohydrate fermentation assays were also performed in a specially designed M17 broth without glucose but supplemented with 5.0 g/L each of lactose, inulin, sorbitol, mannitol, galactose, salicin, cellobiose, maltose, melibiose and raffinose (Biochemika, UK). Bromocresol purple was added (0.004%) as a pH indicator. The cultures were incubated at 42 °C and sugar fermentation determined at 24 and 48 h. Carbohydrate fermentation was shown by the change in the colour of the medium from purple to yellow. Analysis of the results classified all candidate EPS-producing strains as belonging to the genus *Streptococcus*. The inability to ferment maltose was used to distinguish *S. thermophilus* from the other streptococci [16].

To confirm the identity of the selected EPS-producing *S. thermophilus* strains, molecular methods were used. PCR amplification of the *16s rRNA* gene was performed with pA/pH primers [17] in a MyCycler™ (Bio-Rad, USA) thermocycler using the conditions described by Edwards et al. [17]. PCR products were purified using the GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK). The nucleotide sequence was obtained using an ABI Prism 373 automated sequencer (performed by Secugen, Spain) and compared with DNA sequences held in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Detection and sequencing of the priming glycosyltransferase gene

Total DNA was isolated as described by de Vos and Simons [18] and plasmid isolation according to de Vos et al. [19]. Priming glycosyltransferase (GT) gene was detected by PCR using total DNA as a template under the conditions described by Provencher et al. [20]. The PCR product was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega, Spain) according to the vector manufacturer's protocol. Electrotransformation of *E. coli* was undertaken in a Bio-Rad

pulser apparatus (Bio-Rad, USA) following the manufacturer's recommendations. Plasmids from *E. coli* were isolated by the alkaline lysis method [14]. Restriction endonuclease (Takara, Japan) digestions were performed according to the recommendations of the enzyme manufacturers, and DNA analysis of the fragments was performed as described by Sambrook and Russell [14]. DNA sequencing was performed as described above. DNA hybridisations were performed using the non-radioactive DNA Labelling and Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany), following the manufacturer's instructions.

Fermentation conditions and establishment of EPS-producing *S. thermophilus* cultures in milk

Commercial milk powder (Candia, Algeria) was reconstituted to 10% (w/v) in distilled water and heated for 5 min at 95 °C. Different flasks were then inoculated with a 1% overnight culture of the EPS-producing *S. thermophilus* strain raised in LM17 broth and incubated in a water bath at 37 °C for 16 h, or at 42 °C for 6 or 12 h. The acidification of these cultures was measured using a pH 210 pH meter (Hanna Instruments, France). Serial dilutions of the cultures were made in peptone before plating on LM17 agar (performed in triplicate). Viable counts were performed after incubation at 42 °C for 48 h.

Isolation and quantification of EPS

The EPS fraction was isolated from the fermented milk after 6 h and 12 h of incubation at 42 °C or after 16 h at 37 °C, according to the protocol of Salazar et al. [21]. Briefly, 40 g of fermented milk was mixed with a trichloroacetic acid (TCA) solution (12% final concentration) and stirred vigorously for 45 min at room temperature. Bacteria and proteins were removed by centrifugation (10,000×g, 4 °C for 30 min.), and the pH of the supernatant increased to 4.5 ± 0.5 using a 10-N NaOH solution. EPS was precipitated by adding two volumes of cold ethanol (95%) to the supernatant; the mixture was then continuously stirred for 48 h at 4 °C. After centrifugation as described above, the EPS fraction was resuspended in ultrapure water and intensively dialysed (three water changes every 24 h) against ultrapure water for 3 days at 4 °C using successive dialysis membranes (Sigma, UK) with molecular weight cut-offs of 6–8 and 12–14 kDa. The obtained EPS was then freeze-dried. All EPS isolation was performed in duplicate. The amounts of EPS produced were initially evaluated gravimetrically by measuring the polymer dry mass (PDM) after 48 h of drying at 42 °C.

Quantification of EPS and molar mass determination

The molar mass (MM) of the EPS fractions was determined by size-exclusion chromatography (SEC) using an HPLC system running Empower software and equipped with an Alliance 2690 module injector, a PDA 996 photodiode array detector and a 410 refractive index (RI) detector (Waters, USA). Freeze-dried fractions of the dialysis product (see above) were resuspended (5 mg/mL final concentration) in 0.1 M NaNO₃, maintained overnight under gentle stirring and centrifuged at 10,000×g for 10 min before analysis. Separations were performed in a TSK-Gel G3000 PWxL and TSK-Gel G5000 PWxL column placed in series, protected by a TSK-Gel guard column (Supelco-Sigma, USA). The injection sample size was 50 µL, and the mobile phase was 0.1 M NaNO₃. Separations were performed at 40 °C and at a flux rate of 0.45 mL/min. The EPS peaks were detected by their RI; the presence of proteins that might interfere with the RI analysis was monitored using the PDA detector at 280 nm. Dextran standards (Fluka-Sigma, USA) ranging from 5×10^3 to 4.9×10^6 Da were used to determine the MM of the EPS. The regression equations for determining the quantity of EPS were calculated using four different concentrations from 0 to 1 mg/mL of each of seven dextran standards ($R^2 \geq 0.98$). The regression equation for the determination of MM was calculated using the elution times of the seven dextran standards ($R^2 = 0.99$).

Results and discussion

Screening for EPS-producing *S. thermophilus* strains

Fifteen raw cow milk samples from different farms in the Mostaganem region of Algeria were used to screen for EPS-producing *S. thermophilus* strains on LM17 agar at 42 °C. Of approximately 1,000 candidate colonies, 20 were originated by bacteria with a mucoid—though not necessarily EPS-producing—phenotype. [22]. Although it has been reported that the use of non-milk-based media is not the most suitable for screening for EPS-producing strains [5], since the number of EPS isolates could be underestimated, it is much easier to use growth media than milk for isolation purposes in the laboratory. These 20 mucoid isolates were selected for further analysis.

Identification of EPS-producing strains

The 20 selected isolates were initially examined using simple taxonomic tests such as Gram staining, cell

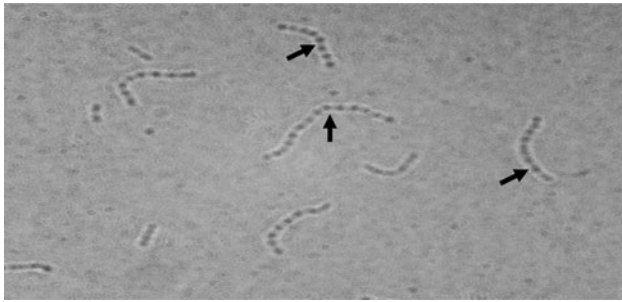


Fig. 1 Morphology of the isolated strain as observed after staining with India ink. The arrow indicates the presence of the capsule-like EPS

morphology analysis and the catalase assay. All were classified as LAB cocci growing in chains; all were able to grow at 45 °C but not at 10 °C. The capacity to grow at different NaCl concentrations and to hydrolyse esculin was tested to differentiate streptococci from enterococci. Four strains were classified as streptococci based on their inability to hydrolyse esculin and their lack of growth at either 4 or 6.5% (w/v) NaCl. The sugar fermentation profiles (mainly the inability to use maltose) of these four strains identified them as belonging to *S. thermophilus* [23]. The analysis of the *16S rRNA* gene sequence confirmed this identity (>99% sequence similarity).

Although the four colonies had been selected for their mucoid appearance on LM17 agar, only two of them were white on RRM17 plates, suggesting that only these were able to produce EPS. This was further confirmed in broth; the strain producing the highest EPS yield (data not shown) was then selected for further analysis. This was designated as *S. thermophilus* BN1.

As shown in Fig. 1, the India ink staining technique showed the *S. thermophilus* BN1 cells to be linked in chains surrounded by a transparent halo. This halo denoted the existence of an organised structure, similar to a capsule, surrounding the cells. The presence of capsular EPS has been described in some *S. thermophilus* strains [2, 24], although the capsules involved are usually thicker than that of *S. thermophilus* BN1 (see Fig. 1 for dimensions).

Detection of priming glycosyltransferase genes

The first step in the assembly of the repeating unit in HePS synthesis is achieved by priming GT. The genes encoding priming GT are well conserved. Provencher et al. [20] described hybrid primers G-**-Bact-a-F-36* and G-**-Bact-a-R-27* for the detection of the priming GT gene in *S. thermophilus*. In the present work, a PCR fragment of the expected size (260 bp) was obtained when chromosomal DNA was used as the template. This amplicon was cloned and sequenced and showed strong similarity to the

priming GT genes of other *S. thermophilus* EPS clusters deposited in the NCBI database. The sequence obtained was deposited in the GenBank database under accession number Hx2000001349. The alignment of the translated amino acid sequence showed that, although well conserved, the deduced protein was different to the priming GT of other bacteria (Fig. 2).

Location of the priming GT gene in the *S. thermophilus* genome

All the EPS clusters described to date in *S. thermophilus* appear to be chromosomally encoded [10]. In contrast, in most of the mesophilic LAB strains, exopolysaccharide production genes are encoded by plasmid DNA [3]. Plasmid isolation was attempted in the present *S. thermophilus* BN1 using standard procedures, but none were obtained. In fact, plasmids have been reported to be present in only 20–30% of *S. thermophilus* strains [25]. In addition, most of those described have been under 10 kb in length [25], while EPS clusters are usually encoded by genomic sequences over 20 kb in length [10].

The 0.26-kb-long internal fragment of the priming GT gene was used as a probe to locate the gene in the *S. thermophilus* genome. Hybridisation fragments of different size were detected when the total DNA was digested with *Bam*HI, *Bgl*III, *Cla*I and *Hind*III endonucleases (8, 4, 5 and 7 kb, respectively; Fig. 3). Two bands of 5.0 and 1.5 kb were detected after *Eco*RI digestion, which is consistent with the *Eco*RI site located in the 0.26-kb fragment used as a probe.

The results indicate that the priming GT gene, and therefore the EPS cluster, is located in the chromosome of *S. thermophilus* BN1. This is interesting from a technological viewpoint; the localisation of the EPS cluster in plasmids would be associated with the instability of the EPS-producing phenotype.

Growth and acidifying activity of *S. thermophilus* BN1 in milk

S. thermophilus BN1 was inoculated into milk at an initial concentration of 1% (v/v) and incubated at either 37 or 42 °C. The strain produced the largest number of viable cells after 12 h of incubation at 42 °C, or after 16 h at 37 °C (1.20×10^9 and 2.25×10^9 CFU/mL, respectively). After 6 h of incubation at 42 °C, the strain showed a slightly lower number of viable cells (5.30×10^8 CFU/mL) but enough for milk curdling to occur; the pH fell during the incubation period, reaching final values of 5.03 ± 0.04 and 4.66 ± 0.01 after 6 and 12 h of fermentation at 42 °C, respectively, and 4.60 ± 0.01 after 16 h at 37 °C. *S. thermophilus* BN1 may therefore be

```

S. thermophilus BN1      ---FHFIRKTSIDELPQFVNLKGMMSLVGRRPPTLDEVESYTPPEQKRRLSSKPGIIGLWVVTGRNNIN 66
S. thermophilus      TKIGGILRKTSIDELPOLINVFLGMSLVGRRPLPDREIIEYGDNDKRLSWKPGMGWVSVGRSITIG 107
S. thermophilus CNRZ1066 TKIGGILRKTSIDELPOLINVFLGMSLVGRRPLPDREIIEYGDNDKRLSWKPGMGWVSVGRSITIG 107
S. thermophilus LMD9    ---GHFIRKTSIDELPQFVNLKGMMSLVGRRPPTLDEVESYTPPEQKRRLSSKPGIIGLWVSVGRSEIT 70
S. pneumoniae SP18    ---GHFIRKTSIDELPQFVNLKGMMSLVGRRPPTLDEVESYTPPEQKRRLSSKPGIIGLWVSVGRSEHK 70
Lc. mesenteroides     ----HFIRKTSIDELPQFVNLKGMMSLIGRRPVVEDELVVEYGEDIDKRLSWKPGVPGWVLSGRNNIK 66
    
```

Fig. 2 Multiple alignment of the partial priming GT sequences of *S. thermophilus* BN1, *S. thermophilus* (AY057915.1), *S. thermophilus* CNRZ1066, (NC_006449), *S. thermophilus* LMD9 (NC_008532.1),

Streptococcus pneumoniae SP18 (NZ_ABAE01000002.1) and *Leuconostoc mesenteroides* (DQ873505.1). Conserved amino acids in all sequences are shaded black; similar residues in some are shaded grey

Fig. 3 Total DNA from *S. thermophilus* BN1 **a** was digested with *Bam*HI (1), *Bgl*II (2), *Cla*I (3), *Eco*RI (4) and *Hind*III (5). **b** Southern blot analysis using an internal fragment of the priming GT gene. MW: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Lithuania)

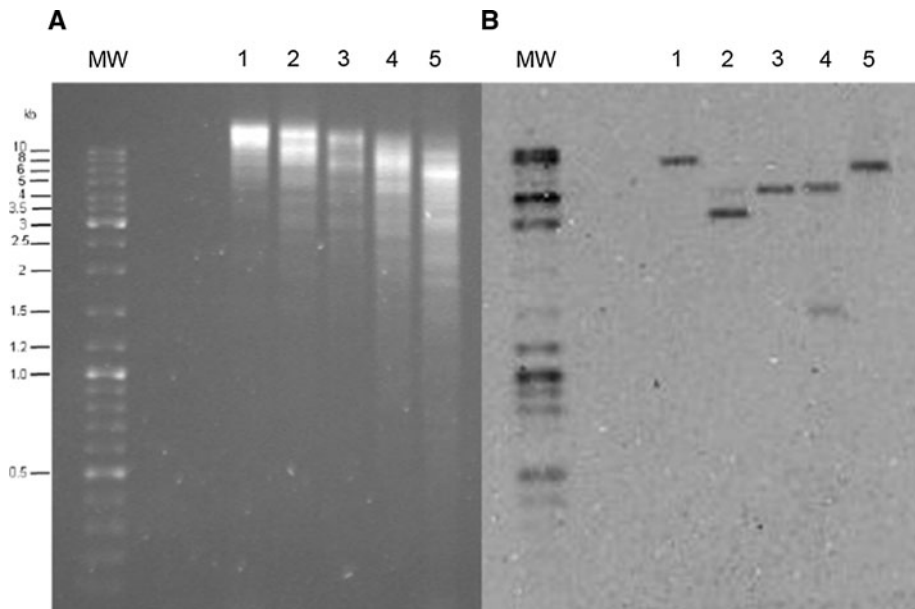


Table 1 Growth characteristics of *S. thermophilus* BN1 and EPS production in milk at 37 and 42 °C

Growth temperature	37 °C		42 °C		
	16 h		6 h		12 h
Viable cells (CFU/mL)	2.25 × 10 ⁹		5.30 × 10 ⁸		1.2 × 10 ⁹
pH	4.6 ± 0.01		5.03 ± 0.04		4.66 ± 0.01
EPS production HPLC (mg/L)	58.9 ± 0.1		48.3 ± 0.1		36.9 ± 0.3
Number of EPS peaks	2		2		2
EPS MM	7.2 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁴	7.2 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁴	7.0 × 10 ⁵ 1.3 × 10 ⁴

considered a strain with a good capacity for growth in milk and to have acceptable curdling abilities.

Quantification of EPS production and determination of the EPS molecular mass

The gravimetric method was initially used to determine the amount of EPS produced, which under all conditions was around 300 mg PDM/L. No significant differences were observed between the quantities of EPS produced after 6 and 12 h at 42 °C or after 16 h at 37 °C. The quantification of EPS production in *S. thermophilus* based on the

measurement of PDM has been reported by several authors [11, 12], with different values obtained depending on the use of a culture medium, milk or enriched milk. Most of the studied strains showed EPS yields in milk below 100 mg PDM/L; only a few have been reported to produce up to 150 mg PDM/L [12]. Thus, the amount of EPS produced by *S. thermophilus* BN1 in milk was higher than that reported for other EPS-producing *S. thermophilus* strains under similar conditions. When the EPS produced was analysed by SEC, the values returned were between 5 and 10 times lower (Table 1). This is not surprising since other compounds such as glucomannans, proteins and sugars are

co-purified with the EPS and can make up to 94% of that measured in PDM analysis [12], depending on the culture medium and purification method used [26]. The quantitative results returned by HPLC indicate the optimal conditions of EPS production to be 16 h at 37 °C (Table 1). In thermophilic bacteria, the production of EPS is usually associated with growth [3].

SEC analysis revealed the existence of two EPS peaks with different MM (7.2×10^5 and 1.4×10^4 Da) under all study conditions (Table 1). The production of two types of EPS is known in some bacteria [27], including *S. thermophilus* strains [12] in which two types of EPS with different MMs have been described. However, the fact that only one priming GT was found in *S. thermophilus* BN1 suggests that these peaks might represent two fractions of the same EPS. The production of EPS types of different MM might be influenced by culture conditions, the available carbon and nitrogen sources and the carbon/nitrogen ratio [26]. However, with respect to the present representatives of *S. thermophilus* BN1, neither increasing incubation time nor the temperature affected the MM of the peaks (Table 1). Neither was the proportion of the two EPS types affected (data not shown). It has been suggested that the production of more than one EPS fraction by a single strain might be due to the partial hydrolysis of a starting polymer by intracellular enzymes released over time into the medium [28]. In *S. thermophilus* BN1, however, prolonged fermentation times did not affect the MM of the EPS polymer (Table 1).

In this work, an EPS-producing strain of *S. thermophilus* was isolated that might be used as a starter in the production of dairy products. Further attempts should be made to find new EPS-producing strains in different raw materials and artisanal products; in this way, the number and diversity of strains with the potential to be used as starters could be increased.

Acknowledgments The authors thank Dr. P. Ruas Madiedo for her helpful comments, I. Cuesta for skilful help with HPLC analysis and Adrian Burton for linguistic assistance. This research was performed with financial support from the Ministry of Science and Innovation, Spain (AGL2010-18430).

References

1. Welman AD, Maddox IS (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* 21:269–274
2. Hassan AN (2008) ADSA foundation scholar award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *J Dairy Sci* 91:1282–1298
3. de Vuyst L, Degeest B (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23:153–177
4. Laws AP, Marshall VM (2001) The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 1:709–721
5. de Vuyst L, de Vin F, Vanningelgem F (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11:687–707
6. Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C, Ehrlich SD, Guédon E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 29:435–463
7. Delorme C (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol* 126:274–277
8. Lyer R, Tomar SK, Maheswari U, Singh R (2010) *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 20:133–142
9. Auclair J, Accolas JP (1983) Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49:313–326
10. Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, Oberg CJ, Moineau S (2003) Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J Dairy Sci* 86:407–423
11. de Vuyst L, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Marshall V, Degeest B, Vanningelgem F (2003) Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *Int Dairy J* 13:707–717
12. Vningelgem F, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Vancanneyt M, Swings J, de Vuyst L (2004) Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains Is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl Environ Microbiol* 70:900–912
13. Gancel F, Novel G (1994) Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *J Dairy Sci* 77:685–688
14. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
15. Dabour N, La pointe G (2005) Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl Environ Microbiol* 71:7414–7425
16. Flint SH, Ward LJ, Brooks JD (1999) *Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm. *Int J Syst Bacteriol* 49:759–767
17. Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17:7843–7853
18. de Vos WM, Simons G (1994) Gene cloning and expression systems in lactococci. In: Gasson MJ, de Vos WM (eds) *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Chapman and Hall, London
19. de Vos WM, Vos P, Dehaard H, Boerrigter I (1989) Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene* 85:169–176
20. Provencher C, Lapointe G, Sirois S, Van Calsteren MR, Roy D (2003) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* Group. *Appl Environ Microbiol* 69:3299–3307
21. Salazar N, Prieto A, Leal JA, Mayo B, Bada-Gancedo JC, de los reyes-Gavilán CG, Ruas-madiedo P (2009) Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J Dairy Sci* 92:4158–4168
22. Van den Berg DJC, Smits A, Pot B, Ledebor AM, Verbakel JMA, Verrips CT (1993) Isolation, screening and identification of

- lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and cultures conditions. *Food Microbiol* 7:189–205
23. Manachini PL, Flint SH, Ward LJ, Kelly W, Fortina MG, Parini C, Mora D (2002) Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint et al. 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou et al. 1998). *Int J Syst Evol Microbiol* 52:945–951
 24. Hassan AN, Frank JF, Schmidt KA, Shalabi SI (1996) Rheological properties of yogurt made using encapsulated nonropy lactic cultures. *J Dairy Sci* 79:2091–2097
 25. Turgeon N, Moineau S (2001) Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid* 45:171–183
 26. Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CGJ (2005) Invited review: methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 88:843–856
 27. Sánchez JJ, Martínez B, Guillén R, Jiménez-Díaz R, Rodríguez A (2006) Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl Environ Microbiol* 72:7495–7502
 28. de Vuyst L, Vanderve KF, 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. *J Appl Microbiol* 84:1059–1062

Effect of Some Fermentation Substrates and Growth Temperature on Exopolysaccharide Production by *Streptococcus Thermophilus* BN1

Bennama Rabha, Rechidi-Sidhoum Nadra, and Bensoltane Ahmed

Abstract—The purpose of this research was to evaluate, the effect of incubation temperature and some substrates on exopolysaccharides (EPS) production. The *S. thermophilus* BN1 an EPS-producer strain isolated from cow milk was examined in this study. Skimmed milk, whole milk and cheese whey, were selected as culture media and two different temperatures were also tested. The EPS produced in the different studied conditions was purified and quantified. The strain BN1 was able to produce EPS in all established conditions. However, significant differences were observed in the amounts of produced EPS. The strain has been shown to produce high amounts of EPS at 37°C compared to 42°C ($P < 0.05$). In skimmed milk at 37°C, the EPS amounts reached 548 PDM mg l-1, followed by 375 PDM mg l-1 and 325 PDM mg l-1 respectively in whey and whole milk. In addition, a slight significant difference was noted on the biomass, pH and lactic acid values obtained from the three fermented substrates ($p < 0.05$). The present results demonstrate that suboptimal growth temperature (37°C) had a significant effect on the EPS production by *S. thermophilus* BN1.

Index Terms—*S. thermophilus*, exopolysaccharide production, growth temperature, substrate.

I. INTRODUCTION

Today, microbial polysaccharides have regarded as interesting natural bio-ingredients in many industrial sectors. Their biological and rheological properties are widely used particularly in food sector, where they are used as gelling, emulsifiers and stabilizers agents [1]. Lactic acid bacteria (LAB) play a key role during the fermentation process since they contribute to the texture, flavour, quality and conservation of the fermented products. Several strains of LAB, are also able to produce exopolysaccharides (EPS), the main advantage of EPS from LAB is that they are produced by food-grade microorganisms known as GRAS (Generally Recognized as Safe) compared to other microbial EPS [2, 3]. These compounds have attracted great interest since they can act as natural thickeners that improve the texture properties, decrease syneresis and reduce the fat levels in fermented dairy foods. According to their, chemical composition the EPS can be classified into two major types: the homopolysaccharides and heteropolysaccharides [2]. Some

EPS may remain attached to the cell in capsule form [4]. Bacterial capsules are viscous and can affect the physical properties of cultured milk [5]. EPS-producing LAB belong to different genera such as *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Streptococcus* [6]. The observations made to date on the conditions for EPS production by LAB do not appear to be generalized, but rather related to a species, or even each studied strain [7].

Indeed, optimization designed to determine the operating growth conditions that tend to improve performance of interesting bacteria. In this work we focus on the production of EPS by *S. thermophilus* BN1. *S. thermophilus* is one of the main starters used in the dairy industry for the manufacture of cheese and yogurt, came in the second place after *Lc. lactis* [3]. Its EPS production has been related to the growth phase and the culture conditions [8]. Whereas in fermented milks, EPS concentrations were less than 600 mg l⁻¹, M17 media yielded up to 1500 mg l⁻¹ depending on the nature of the carbohydrate source used and the carbon/nitrogen ratio [9, 10]. These data show the importance of growth conditions on EPS production.

Regarding the topic of EPS production, in this paper, the influence of the growth temperature and the type of fermentation media on EPS production by *S. thermophilus* BN1 will be analyzed.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Strain, Media and Growth Conditions

S. thermophilus BN1, a strain isolated from raw milk [11] was grown in M17 supplemented with lactose (2% w/v) (LM17) at 42°C under anaerobic conditions. EPS production by this strain was evaluated using as substrates: skimmed milk, whole milk, (Candia, Algeria) and cheese whey collected from the cheese factory “Sidi Saâda” (Relizane, Algeria). The preparation of the whey was performed using the protocol described by Shams and Jaynes [12]. The residues of milk proteins present in the whey samples have been partially precipitated and the medium was adjusted at the same pH of milk substrates. All substrates were heated for 5min. at 95°C and then cooled to the temperature of incubation.

B. Growth on Different Fermentation Substrates and Eps Determination

EPS production was determined in cultures performed in skimmed milk, whole milk and cheese whey. 250 ml of each

Manuscript received December 30, 2011; revised January 30, 2012.

Bennama Rabha, Rechidi-Sidhoum Nadra are with the Département de Biotechnologie, Université de Mostaganem, BP 227, 27000. Mostaganem, Algeria (Tel.: 00 213 771623291; e-mail: bennamarabha@yahoo.fr).

Bensoltane Ahmed is with Département de Biologie, Université d'Oran, Algeria.

medium was inoculated at 0.5% (v/v) with *S. thermophilus* BN1 previously grown in LM17 as has been described before. These cultures were incubated at 37°C and 42°C for 17 h and 12h respectively. Then, aliquots were taken from each medium to determine different parameters mentioned below.

C. Growth Evaluation

From the established cultures, serial dilutions were made in peptone saline water [(1 g.l⁻¹) and NaCl (8.5 g.l⁻¹)]. Appropriate dilutions were spread on LM17 agar and incubated for 48 h at 42°C. Growth was estimated as log CFU/ml.

D. Measurement of Total Titratable Acidity (TTA) and PH

The concentration of lactic acid in the media was determined by titration with N/9 NaOH solution. The pH was also measured with a pH meter type "Hanna instruments microprocessor pH meter".

E. Isolation and Purification of EPS

Isolation of EPS was performed using the protocol described by Salazar *et al.* [13]. Briefly, this protocol is based on proteins elimination by precipitation with TCA (12 %) and subsequently precipitation of EPS using two volumes of cold ethanol. The Precipitated EPS crude was recuperated after centrifugation (10000xg, 4°C, 30 min.) These samples were then purified by dialysis against water using a membrane (Sigma) with a molecular cut-off weight of 12-14 kDa for three days at 4°C.

F. Quantification of the Purified EPS

EPS quantification was done by gravimetric analysis [8], the polymer dry mass (PDM) of the purified EPS; was determined after 48h of drying at 42°C. The measured values are subtracted from that obtained with a PDM of the control media to get real amounts of EPS produced by the strain. Also, the presence of capsule like-EPS was visualised by negative staining technique using India ink.

G. Data Analysis

All experiments were repeated two times. The results are means of two replicates. The Student's t-test was applied to compare the means values of the measured parameters.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Bacterial Growth and Acidification Activity

Cultured on the three tested substrates, *S. thermophilus* BN1 was able to grow and show relatively high number of viable cells at the end of each fermentation, with an average increase of 2.5 log CFU/ml compared to the initial rate of inoculation. The biomass developed after 12h of incubation at 42°C and 17h at 37°C is shown in Fig 1. At 37°C in skimmed milk, the biomass was quite similar to that obtained in whole milk in the conditions analyzed. By contrary, at 42°C in whey it was slightly higher to that posted at 37°C. It is also interesting to note that in whole milk the difference between the growth at 42°C is bigger than in whey or skimmed milk (P<0.05). The increase in biomass caused a significant acidification in the three studied media. This was

confirmed by TTA and pH values measured after 12h and 17h of fermentation (Fig.2, 3). The acidification in the cultures of skimmed and whole milks provoked the clotting of the milk. However, in the whey culture a thick aspect was observed. The ability of *S. thermophilus* BN1 to grow on the tested media is, in fact, due to the capacity of this species to metabolize lactose present naturally in these media. Its conversion into lactic acid decreases the final pH of the medium [14]. By HPLC analysis of some fermented skimmed milk samples, it was found that *S. thermophilus* BN1 also produced small amounts of other acids such as formic and acetic acids (data not shown).

B. Effect of Incubation Temperature on Growth and Eps Production

The growth temperature is considered, the most important factor influencing and having a significant impact on EPS production in *S. thermophilus* [15]. In this context, the effect of temperature on EPS production was analyzed. EPS production was observed at both temperatures. The higher EPS production was reached at 37°C compared to 42°C independently of the media culture. At 37°C amounts of 548 mg PDM l⁻¹, 375 mg PDM l⁻¹ and 325 mg PDM l⁻¹ were produced in skimmed milk, whey and whole milk respectively (Fig. 4). These observed results reveal the existence of significant effect of incubation temperature (37°C) on the EPS biosynthesis by *S. thermophilus* BN1. However, a well-documented finding showed that 37°C is a suboptimal growth temperature of *S. thermophilus*. Several studies have been confirmed, that suboptimal temperatures influence positively EPS production by mesophilic and thermophilic LAB [6, 16]. Nevertheless, de Vuyst *et al.* [8] obtained maximal EPS production, when *S. thermophilus* grew at its optimum temperature (42°C). These data show that EPS production could vary among the different strains of *S. thermophilus* under similar growth conditions.

This characteristic is not specific for *S. thermophilus*, a large diversity in EPS production was also observed in other LAB for instance in *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* from 57 to 424 mg l⁻¹ [17], 30-85 mg l⁻¹, 100-600 mg l⁻¹ and 105-150 mg l⁻¹ in *L. lactis subsp. lactis* or, *L. lactis subsp. cremoris* and *Lb. casei subsp. casei*, respectively [16] and 105-168 mg l⁻¹ with bifidobacteria [18]. It is also interesting to note that at 37°C the fermented skimmed milk had a firm and compact texture difficult to break. This textural aspect was reported by many authors in other EPS-producing LAB strains incubated at suboptimal temperatures. The EPS overproduction at suboptimal temperature has been proposed as answer mechanism to the physiological stress at these temperatures, especially on that species such as *S. thermophilus* with a deficient proteolytic system. In addition, Vaningelgem *et al.* [19] reported that the use of high-level EPS-producing strain displaying a stronger milk-clotting ability. However, in thermophilic LAB, the amount of EPS produced is often related to growth, therefore, to the produced biomass [8].

C. Effect of Fermentation Media on Growth and Eps Production

Several authors have stated that medium composition either carbon source, nitrogen source, or ion source are important parameters in EPS biosynthesis [6, 19]. The results

have showed that BN1 strain is able to grow and produce EPS in all substrates (Fig 4). The maximal EPS production occurred at 37°C in skimmed milk with 548 PDM mg l⁻¹ compared to whey (375 PDM mg l⁻¹) and whole milk (325 PDM mg l⁻¹). The obtained results are according to the findings of de Vuyst *et al.* [8] indicate that milk is the best media for EPS production in *S. thermophilus* compared with other media (MRS, M17 or SDM). Other authors [19] have observed that EPS production in some strains of *S. thermophilus* increases only when the skim-based media are enriched with peptone or yeast extract. Moreover, at 42°C the EPS production by *S. thermophilus* BN1 in the used substrates was approximately three times lower to that observed at 37°C (Fig. 4).

In this study, the interesting result was the ability of *S. thermophilus* BN1 to produce EPS in whey medium. Most studies [20] on EPS production by *S. thermophilus* were realized using whey, but only as based medium and not as a single substrate. Our results demonstrate the capacity of BN1 strain to produce EPS using whey as a substrate without exogenous nutrients. Whey is considered to be a rich medium; besides lactose it provides amino acids. The presence of amino acids is essential to EPS production by *S. thermophilus* BN1, the enrichment of milk with amino acids yielded a significant increase on EPS production (data not shown). According to the literature, the amino acids can generate the metabolic energy, based on the production of ATP through the phosphorylation and decarboxylation of the substrates and the transport of generator, respectively [21]. This energy is essential for cell growth and growth-associated with EPS production. The production of EPS in whey has a great economic interest because; it allows to upgrade this product that is usually rejected by most of dairy industries in Algeria. On the other hand, in the three fermented media a shooting or slime texture was observed at 42°C. Moreover, this observed aspect of fermented media obtained under this temperature could reveal a homogeneous EPS production. While at 37°C, a firm texture has characterized the samples of fermented skimmed milk. These textural characteristics could be related to the production of two types of EPS, previously observed in this strain [11]. Ever and about the texture, the microscopic observations performed on samples taken from fermented substrates showed the presence of capsule in this strain (Fig. 5). In fact, the capsule formation in this strain was already described by Bennama *et al.* [11]. The influence of this type of capsular EPS on the texture of fermented dairy products was confirmed by many authors [4, 22]. For this purpose, the presence of capsule-like EPS in this strain could also explain the different textures observed on the fermented substrates.

However, Lemoine *et al.* [23] suggested that the textural properties of several EPS-producing *S. thermophilus* are due to the synthesis of polysaccharides of similar chemical composition, but different structure. In dairy industry, the firm and shooting textures are very important. At this scale, an appropriate processing allows the interaction of the EPS with milk proteins, somehow breaking the protein matrix. Once broken, it would modulate the organoleptic properties of the end-product.

IV. CONCLUSION

From all these considerations, it appears that BN1 strain produces secreted and capsular EPS in all the tested substrates. Also, this study has demonstrated that the EPS production by *S. thermophilus* BN1 is depending on the growth conditions; i.e. the incubation temperature (37°C), which stimulated strongly the EPS production. Similarly, the nature of the fermentation substrate has also influence on EPS production. These factors associated may give optimal growth rate and have positive effects on the organoleptic quality of the fermented product. EPS production by *S. thermophilus* BN1 strain in whey substrate shows promising possibilities to promote this waste industrial dairy product.

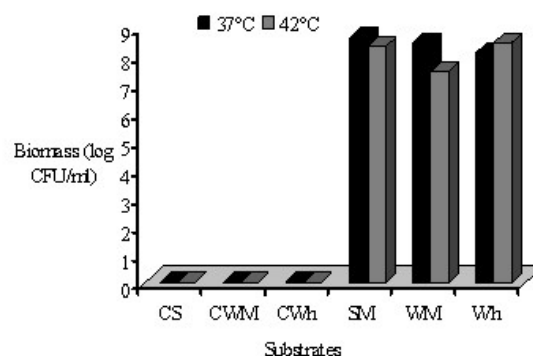


Fig. 1. Biomass developed (log CFU/ml) by BN1 strain after 12h and 17h of incubation in the fermented substrates. SM: Skimmed milk; WM: Whole milk; Wh: whey; CS: Control Skimmed milk; CWM: Control whole milk; CWWh: Control whey.

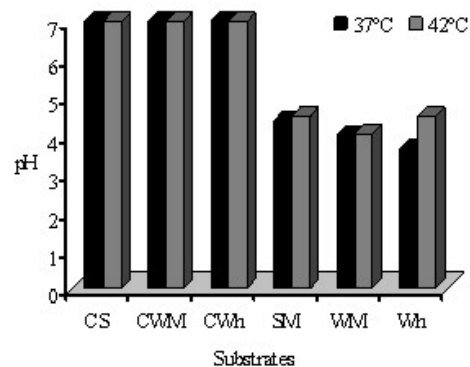


Fig. 2. PH values measured after 12h and 17h of incubation in the substrates fermented by BN1 strain. SM: Skimmed milk; WM: Whole milk; Wh: whey; CS: Control Skimmed milk; CWM: Control whole milk; CWWh: Control whey

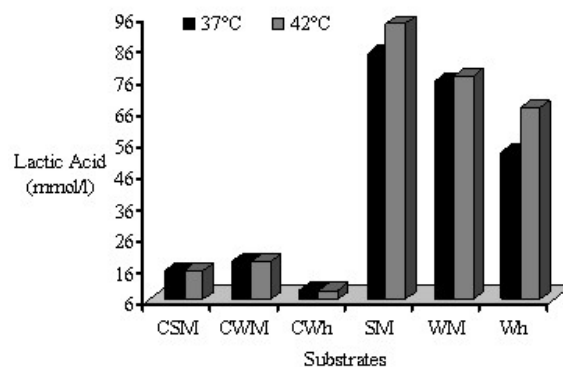


Fig. 3. Lactic acid (mmol/l) produced by BN1 strain after 12h and 17h of incubation in the fermented substrates. SM: Skimmed milk; WM: Whole milk; Wh: whey; CS: Control Skimmed milk; CWM: Control whole milk; CWWh: Control whey.

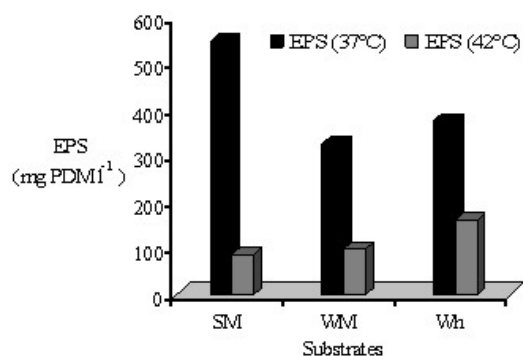


Fig. 4. EPS amounts (mg PDM l⁻¹) produced by BN1 strain after 12 h and 17h of incubation in the fermented substrates. SM: Skimmed milk; WM: Whole milk; Wh: whey

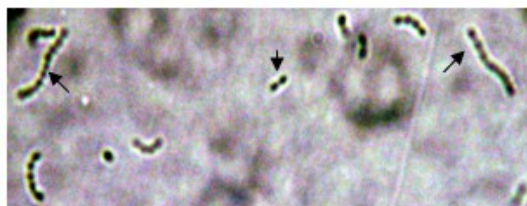


Fig. 5. Cells of BN1 strain surrounded by clear halo showing the formation of capsule -like EPS - Negative contrast obtained by India ink.

REFERENCES

- [1] A. Laws, Y. Gu, and V. Marshall, "Biosynthesis, characterisation and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria," *Biotechnol Adv.*, vol. 19, 2001, pp. 597-625.
- [2] B. Degeest, and L. De Vuyst, "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria," *FEMS Microbiol Review.*, vol. 23, 1999, pp. 153-177.
- [3] C. Delorme, "Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*," *Int J Food Microbiol.*, vol. 126, 2008, pp 274- 277.
- [4] A. N. Hassan, "Possibilities and Challenges of Exopolysaccharide-Producing Lactic Cultures in Dairy Foods," *J Dairy Sci.*, vol. 91, 2008, pp1282-1298.
- [5] A. N. Hassan, J. F. Frank, K. A. Schmidt, and S. Shalabi, "Rheological Properties of Yogurt Made with Encapsulated Nonropy Lactic Cultures," *J Dairy Sci.*, vol. 79, 1996, pp. 2091-2097.
- [6] J. Cerning, "Exocellulair polysaccharides produced by lactic acid bacteria," *FEMS Microbiol Reviews.*, vol. 87, 1990, pp. 113-130.
- [7] G. Corrieu, and F. M. Luquet, "Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments," Eds. Tec and Doc. Paris (France). 2008, pp. 319-331.
- [8] L. de Vuyst, F. Vanderveken, S. Van de Ven, and B. Degeest, "Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis," *J Appl Microbiol.*, vol. 84, 1998, pp. 1059-1068.
- [9] J. Cerning, C. M. G. C. Renard, J. F. Thibault, C. Bouillanne, M. Landon, M. Desmazeaud, and L. Topisirovic, "Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 60, 1994, pp. 3914-3919.
- [10] S. Petry, S. Furlan, M. J. Crepeau, J. Cerning, and M. Desmazeaud, "Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 66, 2000, pp. 3427-3431.
- [11] R. Bennama, M. Fernández, V. Ladero, M. A. Alvarez, N. Rechidi-Sidhoum, and A. Bensoltane, "Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk," *Eur Food Res Technol.*, vol. 234, 2012, pp. 119-125.
- [12] M. A. Shams, and H.O. Jaynes, "Characterization of exopolysaccharides produced by *Corynebacterium* #98 in cheese whey substrate," *J Food Sci.*, vol. 48, 1983, pp. 208-211.
- [13] N. Salazar, A. Prieto, J. A. Leal, B. Mayo, J. C. Bada-Gancedo, C. G. de los reyes-Gavilán, and P. Ruas-Madiedo, "Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk," *J Dairy Sci.*, vol. 92, 2009, pp. 4158-4168.
- [14] A. Zourari, S. Roger, C. Chabanet, and M. J. Desmazeaud, "Characterisation of lactic acid bacteria from Greek yaourt," *Lait.*, vol.71, 1991, pp. 445-461.
- [15] A. S. Kumar, K. Mody, and B. Jha, "Bacterial exopolysaccharides- a perception," *J Basic Microbiol.*, vol. 47, 2007, pp. 103-117.
- [16] J. Cerning, C. Bouillanne, M. Landon, and M. Desmazeaud, "Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria," *J Dairy Sci.*, vol. 75, 1992, pp. 692-699.
- [17] J. Cerning, C. Bouillanne, M. J. Desmazeaud, and M. Landon, "Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*," *Biotechnol Letters.*, vol. 8, 1986, pp. 625-628.
- [18] C. M. Roberts, W. F. Fett, S. F. Osman, C. Wijey, J. V. O'Connor, and D. G. Hoover, "Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79," *J Appl Bacteriol.*, vol. 78, 1995, pp. 463-468.
- [19] F. Vaningelgem M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings, and L. De Vuyst, "Biodiversity of Exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 70, 2004, pp. 900- 912.
- [20] A. Ricciardi, E. Parente, M. A. Crudele, F. Zanetti, G. Scolari, and I. Mannazu, "Exopolysaccharide by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer," *J Appl Microbiol.*, Vol. 92, 2002, pp. 297-306.
- [21] K. Abe, H. Hayashi, and P. C. Maloney, "Exchange of aspartate and alanine mechanism for development of a proton-motive force in bacteria," *J Biol Chem.*, vol. 271, 1996, pp. 3079-3084.
- [22] A. N. Hassan, M. Corredig, and J. F. Frank, "Capsule Formation by Nonropy Starter Cultures Affects the Viscoelastic Properties of Yogurt during Structure Formation," *J Dairy Sci.*, vol. 85, 2002, pp.716-720.
- [23] J. Lemoine, F. Chirat, J. M. Wieruszkeski, G. Strecker, N. Favre, J. R. Nesser, "Structural characterization of exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 63 (9), 1997, pp. 3512-3518.

Effect of Threonine on Growth and Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*

¹Bennama Rabha, ¹Rechidi-Sidhoum Nadra and ²Bensoltane Ahmed

¹Laboratoire Des Sciences Et Techniques De Production Animale, Université
De Mostaganem, BP 227. Mostaganem 27000, Algeria
²Département De Biologie, Université d'Oran, Algeria

Abstract: This work evaluates performance of three strains of *Streptococcus thermophilus* on the basis of acetaldehyde production. The studied strains BN1, BN2 and BN3 were isolated from Algerian raw milk. Moreover, the growth of these strains and acetaldehyde determination have been established in skim milk reconstituted at 10% (w / v) supplemented with 5 mmol and 10mmol of threonine. The results show that the strains have similarity biomass profiles. After 10h of fermentation, biomass reached in average 09.03 ± 0.23 log CFU / ml. For acetaldehyde and after quantification, the studied strains proved producing this compound and in varying amounts. The obtained amounts indicate that a large proportion of this compound flavour comes from threonine. The statistical treatment of data confirmed the significant effect of threonine on the formation of acetaldehyde ($P < 0.01$). The highest amounts were quantified in the presence of 10 mmol of threonine and whose values are 309 ± 0.00 μmol , 400 ± 0.14 μmol and 290 ± 1.60 μmol respectively with BN1, BN2 and BN3 strains.

Key words: *Streptococcus thermophilus* % New starter % Acetaldehyde production % Threonine

INTRODUCTION

Flavour is usually due to the presence of many volatile and non-volatile compounds with diverse physicochemical properties [1]. The non-volatile compounds contribute mainly to the taste volatile influence the taste and aroma. A vast array of compounds may be responsible for the aroma of food products, such as alcohols, aldehydes, esters, short to medium-chain free fatty acids, lactones, phenolics and sulfur compounds [1, 2].

The aroma compounds are multiple and since the first time, the compounds responsible for flavours were extracted from plant sources. However, after elucidation of their structures, most of these compounds are produced by chemical synthesis. Nevertheless, consumers seek more "natural" or "organic" food products without additives. To overcome these problems an alternative strategy was adopted. It is considered to the natural selection microbial strains producing aromas [1].

In the dairy sector where the flavour is the key property of fermented dairy products, the research of new generally recognized as safe (GRAS) bacteria producing aroma is quite desired. Thus, nowadays a large number of publications explain the function of lactic acid bacteria (LAB) in the production of compounds, which give the taste and flavour to the fermented dairy products [3, 4]. Some strains of LAB are able to produce aromatic compounds such as acetaldehyde. Acetaldehyde is indeed recognized as one of the major aroma compounds of fermented dairy products such as yoghurt [5, 6] and some cheeses [7]; it gives them a fruity and refreshing taste [3, 5, 8]. The production of acetaldehyde by LAB seems to be strains dependent. However, there are many literature contradictions regarding the acetaldehyde amounts formed by both yoghurt starters [5]. For instance, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* has been reported by some authors to be a greater acetaldehyde producer than *Streptococcus thermophilus*, whereas other authors have reported the contrary [8]. The secreted amounts of acetaldehyde in yoghurt strains

vary from 5 to 21 mg/l [5, 8]. In LAB, acetaldehyde is generally formed directly from the decarboxylation of pyruvate by the action of pyruvate decarboxylase or indirectly from the acetyl- CoA through pyruvate dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase [3, 5]. Moreover and especially in *S. thermophilus* bacterium, acetaldehyde can also be produced through Serine Hydroxymethyl Transferase (SHMT), which performs a cleavage on the threonine, forming thus acetaldehyde and glycine [5, 9].

The overall objective of this work concerns the selection of three strains of *S. thermophilus* as dairy starter; on the basis of acetaldehyde production and also to evaluate the effect threonine on the production of this aroma compound.

MATERIALS AND METHODS

Studied Strains And Growth Conditions: This work has involved three strains of *S. thermophilus* BN1, BN2 and BN3. The strains were reactivated from frozen stock cultures at - 20°C. They were reactivated and usually grown on M17 medium [10]. For the enumeration of strains in milk, LAPT agar [11] was used. Regarding the conditions of incubation, the strains were incubated at 42°C using an anaerobic jar.

Growth, Acidification Profiles and Acetaldehyde Production in Milk in the Absence and Presence of Threonine

Cultures Preparation: Defined volumes of skim milk reconstituted to 10% (W / V) supplemented with 5 and 10 mmol threonine were inoculated by the studied strains at a final concentration of 1%. Established cultures were incubated at 42°C and after 10h of fermentation, aliquots were taken to determine the following parameters:

Biomass Evaluation and pH Measurement: *S. thermophilus* population developed in milk medium after 10h of incubation was performed by conducting serial dilutions in peptone saline solution [peptone (1 g LG¹) and NaCl (8.5 g LG¹)]. Then, 0.1ml of the chosen dilutions was spread on the surface of LAPT agar. The plates were then incubated at 42°C for 24 to 48h. The number of bacteria is given as colony forming units (cfu/ml). Developed acidification was monitored by measuring pH using a pH meter type "Hanna Instruments, pH 210 microprocessor pH meter.

Acetaldehyde Determination: Acetaldehyde was determined after 10h of fermentation. Crops for the assay were established under the same conditions described above. Acetaldehyde was measured by spectrophotometer, using a kit for determining acetaldehyde (R-Biopharm: enzymatic bioanalysis). This assay is based on the reduction of NAD to NADH by acetaldehyde dehydrogenase.

Data Analysis: The Student's t test was used to compare means values of produced biomass (log cfu / ml) and acetaldehyde (µmol) between the strains in the presence of different concentrations of threonine.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth, Milk Acidification and Acetaldehyde Production:

After 10h of fermentation in reconstituted skim milk in the absence and presence of 5 and 10 mmol of threonine, the strains BN 1, BN2 and BN3 grew in milk and showed similar appearance in growth, as no significant difference ($P > 0.05$) was observed on the biomass profiles (in log cfu / ml) (Figure 1). In addition, the pH decrease recorded in this growth reflects the acidification potential of the strains in milk. The values reached after 10h of fermentation were in average 4.78, 4.67 and 4.58 respectively in the absence and the presence of 5 mmol and 10mmol of threonine (Figure 1). These results describe one of the metabolic aspects of *S. thermophilus* species in milk; which consist to the rapid conversion of lactose into lactic acid causing a decrease in pH [12, 13].

Since the hypothesis of this study was to demonstrate the performance of the strains towards the production of acetaldehyde and to check the influence of threonine concentration on its produced amounts. As shown in Figure 2, the strains BN1, BN2 and BN3 are able to produce acetaldehyde. The production appears to be variable and proportional to the concentration of threonine used in the medium. These results indicate also that the addition of threonine had a significant effect on the amounts of acetaldehyde quantified after 10h of fermentation. Several reports [3, 5, 6, 9] have been stated that acetaldehyde produced by thermophilic lactic acid bacteria may have different metabolic pathways. Ott *et al.* [8] showed that glucose appears to be the main precursor of acetaldehyde in milk fermented by *S. thermophilus*. The same authors reported that large proportions of acetaldehyde were derived from glycolytic pathway.

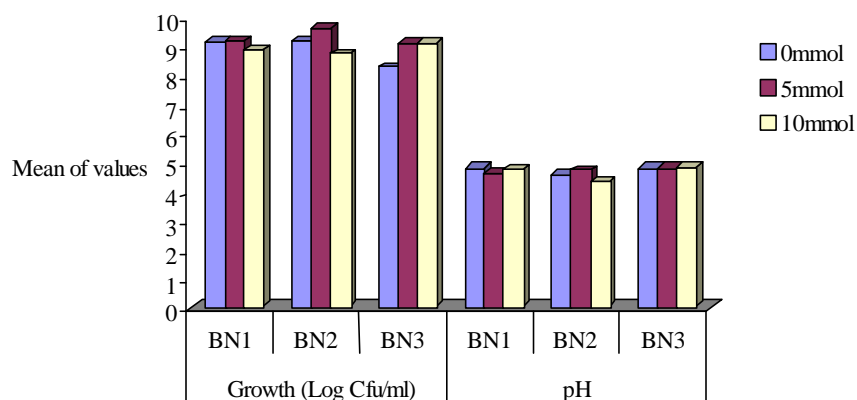


Fig. 1: Produced biomass (cfu/ml) and pH values developed in milk inoculated with studied *S. thermophilus* BN1, BN2, BN3 in the absence or in the presence of 5mmol and 10mmol of threonine, at 42°C after 10h of fermentation

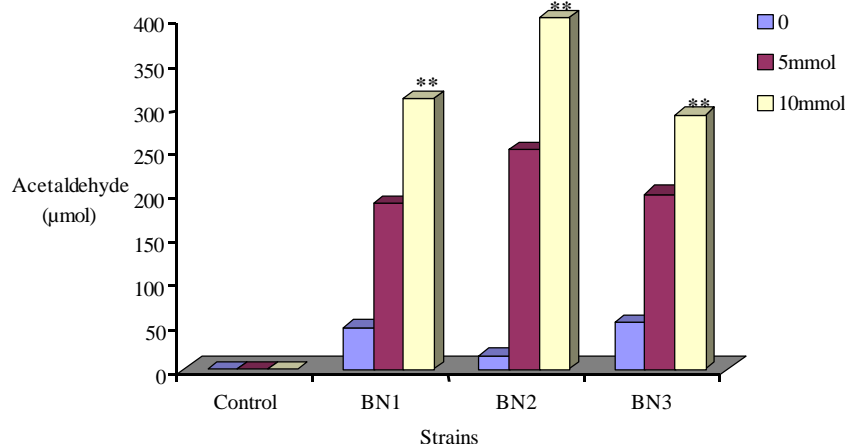


Fig. 2: Acetaldehyde amounts (µMol) produced after 10h of fermentation with the strains BN1, BN2 and BN3 grown on skimmed milk 10% (W / V) in the absence and presence of 10mmol of 5 mmol of threonine. Student's t test, **<0.01 compared with the values obtained in the absence of threonine

In fact, taking into account our results and assuming that lactose is the main sugar of milk and when metabolized by *S. thermophilus*, it is converted into glucose and galactose. This one is generally excreted in the external environment [13, 14]. Of all these considerations, it appears that acetaldehyde formed during the growth of the studied strains is essentially and primarily related to the threonine metabolism. In addition, the obtained amounts with threonine-free milk are very low (Figure 2). For example, BN2 strain produces in milk alone about 15.4µMo of acetaldehyde, whereas these amounts increased significantly ($P < 0.01$) in the presence of 5 mmol and 10mmol of threonine. They reached respectively 280 ± 0.00 and $400 \pm 0.14 \mu\text{mol}$. Similar observations have been recorded on the amounts formed by BN1 and BN3 strains. Chaves *et al.* [5] found that a five to ten-fold increase in acetaldehyde production was resulting from addition of threonine (10mmol) to the growth medium.

The same authors were observed a nearly linear relationship between the amounts of acetaldehyde formed during milk fermentation and SHMT activity measured in different *S. thermophilus* strains. Attention regarding the influence of selected factors on acetaldehyde production was also reported by other authors [15]. These authors have been demonstrated that amino acids supplementation, lactose hydrolysis and heat-shock treatments had a significant effect on acetaldehyde formation in yoghurt starter cultures. However, based on the amounts of acetaldehyde obtained under different culture conditions including the concentrations of threonine, it is clearly that acetaldehyde formation of by the BN1, BN2 and BN3 strains was non-growth associated, but rather, it was quite variable depending on the strain. The production of acetaldehyde by LAB appears to be strains dependent [5, 8]. The variability of acetaldehyde production among a number of

S. thermophilus strains was in fact widely documented [16-19]. Otherwise, as it was reported above, threonine has no effect on the obtained biomass, since no significant differences were observed on the cell concentration in the absence and presence of threonine. The present results confirmed that threonine is required for acetaldehyde synthesis.

CONCLUSION

The results thus obtained are promising to use the studied strains as dairy starters. They showed that the three strains produced significant and varying amounts of acetaldehyde in the presence of threonine.

REFERENCES

1. Longo, M.A. and M.A. Sanroman, 2006. Production of food Aroma Compounds. Food. Technology Biotechnol., 44(3): 335-353.
2. Urbach, G., 1997. The flavour of milk and dairy Products: cheese: contribution of volatile compounds. International J. Dairy Technol., 50: 79-89.
3. Bongers, S.R., M.H.N. Hoefnagel and M. Kleerebezem, 2005. High-Level acetaldehyde Production in *Lactococcus Lactis* by Metabolic Engineering. Applied and Environmental Microbiol., 71(2): 1109-1113.
4. Seitz, E.W., 1990. Microbial and enzyme-induced flavon in dairy foods. J. Dairy Sci., 73: 3664-3691.
5. Chaves, A.C.S.D., M. Fernandez, A.L.S. Lerayer, I. Mierau, M. Kleerebezem and J. Hugenholtz, 2002: Metabolic Engineering of Acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. Applied and Environmental Microbiol., 68(11): 5656-5662.
6. Ott, A., L.B. Fay and A. Chaintreau, 1997. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavour. J. Agriculture and Food Chemistry, 45: 850-858.
7. Mcsweeney, P.L.H. and M.J. Sousa, 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Lait., 80: 293-324.
8. Ott, A., J.E. Germond and A. Chaintreau, 2000. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. J. Agriculture and Food Chemistry, 48: 1512-1517.
9. Chaves, A.C.S.D., P.R. Madiedo, M. Starrenburg and J. Hugenholtz, 2003. Impact of engineered *Streptococcus* Strains overexpressing GlyA gene on folic acid and acetaldehyde production in fermented milk. Brazilian J. Microbiol., 34: 114-117.
10. Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine, 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied and Environmental Microbiol., 29: 807-813.
11. De Vuyst, L., M. Zamfir, T. Adriany, V. Marshall, B. Degeest and F. Vaningelgen, 2003. Exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. International Dairy J., 13: 707-717.
12. Delorme, C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. International J. Food Microbiol., 126: 274-277.
13. Lyer, R., S.K. Tomar, U. Maheswari and R. Singh, 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. International Dairy J., 20: 133-142.
14. Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S.D. Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault and M. Kleerebezem, 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. FEMS Microbiology Reviews, 29: 435-463.
15. Ozer, B. and F. Atasoy, 2002. Effect of addition of amino acids treatment with β -galactosidase and use heat shocked on the acetaldehyde level in yoghurt. International J. Dairy Technol., 55: 166-170.
16. Ayhan, K., F. Durlu-Ozkay and N. Tunail, 2005. Commercial important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. International J. Dairy Technol., 58(3): 150-156.
17. Ott, A., J.E. Germond, M. Baumgartner and A. Chaintreau, 1999. Aroma comparisons of traditional and mild yogurt: Headspace-GC quantitation of volatiles. J. Agriculture and Food Chemistry, 47: 2379-2385.
18. Soomro, A.H. and T. Masuds, 2008. Selection of yoghurt starter culture from indigenous isolates of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* on the basis of technological properties. Annals of Microbiol., 58(1): 67-71.
19. Zourari, A., S. Roger, C. Chabanet and M.J. Desmazeaud, 1991. Caractérisation de Bactéries lactiques thermophiles isolées de Yaourts artisanaux grecs. I. souches de *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*. Lait., 71: 445-461.