



UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1 (U.F.M.C. 1)



**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)**

N° d'ordre : 05/INA/2020

N° de série : 64/DS/2020

Thèse de Doctorat en Sciences
Spécialité : Sciences Alimentaires

**Caractérisation des bactéries lactiques autochtones
productrices d'exopolysaccharides et étude de leurs effets
intrinsèques sur une matrice laitière**

Présentée par :

BACHTARZI ép. BENHEDANE Nadia

Soutenue le : 02 / 11 / 2020

Devant le Jury composé de :

Président(e) :	Pr. SATTA Dalila	SNV, UFMC 1, Algérie
Rapporteur :	Pr. KHARROUB Karima	INATAA, UFMC 1, Algérie
Co-encadrant :	Dr. RUAS-MADIEDO Patricia	CSIC/IPLA, Asturias, Espagne
Examineurs :	Pr. BECILA Samira	ATRBSA, Algérie
	Dr. BOUGHACHICHE Faiza	INATAA, UFMC 1, Algérie
	Dr. YAHIAOUI Bilal	SNV, UFAS1, Algérie

Remerciements

Au terme de ce travail de thèse, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué dans sa réalisation.

*Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, professeur **Kharroub Karima**, pour m'avoir proposé ce sujet passionnant, pour son écoute, ses précieux conseils et sa rigueur scientifique. J'aimerais également la remercier pour le temps consacré aux relectures de cette thèse, et pour ses précieuses corrections.*

*Je remercie chaleureusement le Dr. **Ruas-Madiedo Patricia**, co-encadrante, chercheuse sénior auprès du Conseil national de la recherche espagnol, de m'avoir accueillie dans son équipe, de son soutien, de sa grande générosité scientifique et de ses remarques pertinentes. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités avant tout humaines d'écoute et de compréhension, tout au long de mes séjours en Espagne.*

Je suis très honorée à remercier de la présence à mon jury de thèse et je tiens à remercier :

*- Mme **Satta Dalila**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la présidence de ce jury de thèse.*

*- Mme **Becila Samira**, Professeur et chef de département à l'Agence thématique de Recherche en Biotechnologie et Sciences Agroalimentaires, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse, en qualité d'examinatrice, et pour le temps consacré à la lecture de cette thèse.*

*- Mme **Boughachiche Faiza**, Maitre de conférences à l'Institut de l'Alimentation de la Nutrition et des Technologies Agro-Alimentaires, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse, en qualité d'examinatrice, et pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail.*

*- M. **Yahiaoui Bilel**, Maitre de conférences à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger mon travail, et pour le temps consacré à son évaluation.*

La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce à l'aide de plusieurs personnes auxquelles je tiens également à exprimer ma gratitude.

*Au Dr. **Mekhancha Djamel-Eddine** et au Professeur **Nezzal Lahcen**, pour avoir mis à ma disposition les moyens matériels du laboratoire de recherche Alimentation Nutrition et Santé, Université de Constantine 3.*

*Mes remerciements vont également à M. et Mme **El Haddef El Okki**, enseignants-chercheurs à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires, pour leur précieuse aide dans l'analyse statistique de mes résultats.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également au personnel de l'IPLA-CSIC Asturias, à la Directrice **María Fernández** pour son accueil, au Dr. **Abelardo Margolles Barros** pour son aide, au Dr. **Lorena Ruiz** pour sa collaboration et son aide dans l'analyse des résultats génomiques, à **Diana Luaces Quesada** et à **Natalia Molinero Garcia** pour leur assistance.*

*Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des enseignants et au personnel de l'INATAA spécialement à M. **Gomri Mohamed-Amine** pour son aide et à Mmes **Benkadri Soulef**, **Boudida Yasmine** et **Khaldi Tej El Moulouk**, pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.*

Sur une note plus personnelle, je voudrais remercier ma famille, pour avoir eu la grande patience de supporter mes absences, pour m'avoir encouragé dans cette longue aventure qu'est le doctorat.

*Mille Mercis
Bachtarzi Nadia*

À la mémoire de mes très chers parents.

TABLE DES MATIERES

	Page
Avant-propos	I
Liste des abréviations	II
Liste des figures	III
Liste des tableaux	V
Liste des annexes	VI

Introduction	1
---------------------	----------

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Bactéries lactiques

1. Généralités sur les bactéries lactiques	4
2. Taxonomie des bactéries lactiques	4
2.1 Classification des bactéries lactiques au rang genre	5
2.2 Classification des bactéries lactiques au rang espèce	6
3. Génétique des bactéries lactiques	8
4. Métabolisme des bactéries lactiques	10
4.1 Métabolisme des glucides	10
4.2 Métabolisme du citrate	11
4.3 Métabolisme des acides aminés	12
5. Applications des bactéries lactiques technologie laitière	13

Chapitre 2. Exopolysaccharides des bactéries lactiques

1. Exopolysaccharides des bactéries lactiques	15
2. Classification des exopolysaccharides des bactéries lactiques	16
2.1 Classification des exopolysaccharides selon leur type et localisation	16
2.2 Classification des EPS selon leur composition chimique	17
3. Rôle des exopolysaccharides	20
4. Techniques de détection des exopolysaccharides	21
4.1 Sélection du phénotype producteur en milieu de culture	23
4.2 Mise en évidence de la production d'exopolysaccharides par l'utilisation de colorants	23

4.3 Utilisation des méthodes moléculaires	24
5. Biosynthèse des exopolysaccharides à l'échelle cellulaire	24
5.1 Biosynthèse des homopolysaccharides	24
5.2 Biosynthèse des hétéropolysaccharides	25
6. Biosynthèse des exopolysaccharides à l'échelle moléculaire	28
7. Production d'exopolysaccharides	31
8. Extraction et dosage des exopolysaccharides	32
9. Caractérisation des exopolysaccharides	34
9.1 Dépolymérisation chimique (clivage de la liaison osidique)	34
9.2 Composition en monomères et types de liaisons glycosidiques	36
9.3 Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	36
9.4 Analyse de la masse molaire	37

Chapitre 3. Exopolysaccharides- Matrice laitière

1. Propriétés techno-fonctionnelles des exopolysaccharides dans une matrice laitière	38
2. Interactions exopolysaccharides-caséines au cours de la fermentation	41
3. Rhéologie des gels lactiques contenant des exopolysaccharides	43

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 1. Recherche, sélection et caractérisation polyphasique de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides

1. Recherche de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharide	46
1.1 Lieu et période de l'étude expérimentale	46
1.2 Nature et origine des échantillons	46
1.3 Isolement et purification des bactéries lactiques	48
1.4 Tests d'appartenance au groupe lactique	49
1.5 Recherche des souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides	50
1.6 Conservation des isolats	50
2. Caractérisation physiologique et biochimique des souches sélectionnées	51
2.1 Type fermentaire	51
2.2 Température de développement	51
2.3 Thermorésistance	52
2.4 Croissance en présence de NaCl	52

2.5 Croissance à pH 3,9	52
2.6 Production d'H ₂ S	52
2.7 Utilisation du citrate	52
2.8 Mobilité	52
2.9 Etude du métabolisme glucidique	52
3. Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées	53
3.1 Extraction de l'ADN génomique	53
3.2 Migration des ADN extraits par électrophorèse	53
3.3 Quantification et contrôle de la qualité de l'extrait d'ADN	54
3.4 Réaction de polymérisation en chaîne des gènes de l'ARNr 16S	54
3.5 Purification des produits PCR	55
3.6 Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR	55
3.7 Séquençage des gènes de l'ARNr 16S	55
3.8 Analyses bioinformatiques des séquences du gène de l'ARNr 16S	56
4. Typage moléculaire des isolats par amplification aléatoire d'ADN polymorphe	57

Chapitre 2. Production de laits fermentés en culture batch et évaluation de leurs caractéristiques physiques

1. Caractérisation macroscopique des gels lactiques produits par monoculture	59
1.1 Conditions de fermentation des milieux laitiers	59
1.2 Fermentation des milieux laitiers	59
1.3 Caractères macroscopiques des gels lactiques	60
2. Croissance bactérienne, acidification et dosage des exopolysaccharides produits par les isolats sélectionnés	60
2.1 Croissance bactérienne	61
2.2 Dosage des acides organiques	61
2.3 Extraction et dosage des exopolysaccharides	61
3. Viscosité apparente des gels lactiques générés	64
3.1 Viscosité des gels lactiques brassés	64
3.2 Viscosité des gels lactiques fermes	66
4. Etude de la structure des gels lactiques	66
4.1 Macrostructure des gels lactiques	67
4.2 Microstructure des gels lactiques	69

5. Observation des bactéries productrices des exopolysaccharides par <i>cryo-scanning electron microscopy</i> (Cryo-SEM)	70
6. Méthodes statistiques	71

Chapitre 3. Localisation et identification et moléculaire des gènes de production des exopolysaccharides

1. Recherche et extraction de l'ADN plasmidique	72
1.1 Extraction par Kit	72
1.2 Extraction par méthode conventionnelle	73
2. Séquençage, assemblage et annotation des génomes	73

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Recherche, sélection et caractérisation polyphasique de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides

1. Constitution de la collection de souches lactiques	76
2. Caractérisation phénotypique des isolats sélectionnés	76
2.1 Caractérisation macroscopique	78
2.2 Caractérisation microscopique	80
3. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats sélectionnés	80
4. Caractérisation moléculaire des isolats sélectionnés	85
4.1 Extraction de l'ADN	85
4.2 Amplification, séquençage partielle et analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S	85
4.3 Etude des liens phylogénétique	90
4.4 Comparaison par analyse <i>in silico</i> des gènes de l'ARNr 16S des souches sélectionnées	92
4.5 Analyse des profils d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)	93

Chapitre 2. Production de laits fermentés en culture batch et évaluation de leurs caractéristiques physiques

1. Fermentation des laits supplémentés en hydrolysats de caséines (SMC) en mode Batch	95
1.1 Croissance bactérienne et acidification du milieu SMC par les isolats sélectionnés	95
1.2 Caractérisation macroscopique des gels lactiques obtenus	98
2. Croissance bactérienne, acidification et dosage des exopolysaccharides produits	101
3. Analyses par chromatographie d'exclusion SEC-MALLS des lyophilisats d'EPS	106
3.1 Quantification des exopolysaccharides	106

3.2 Détermination des poids moléculaires des exopolysaccharides	109
4. Analyse des acides organiques produits dans le SMC par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	110
5. Viscosité apparente des gels lactiques SMC brassés	112
6. Viscosité apparente des gels lactiques SMC fermes	114
7. Macrostructure des gels lactiques SMC	118
7.1 Perméabilité des gels lactiques SMC	118
7.2 Synérèse des gels lactiques SMC	121
8. Microstructure des gels lactiques SMC	124
9. Cryo- microscopie électronique	126
Chapitre 3. Localisation et identification des gènes de production des exopolysaccharides	
1. Recherche de la présence de plasmide	127
2. Identification des <i>clusters eps</i> par analyse génomique comparative	127
Conclusion	137
Références bibliographiques	141
Annexes	i-xxiv
Résumés	

Avant- Propos

Ce travail de thèse a fait l'objet des publications et des communications internationales suivantes :

- **Bachtarzi, N.**, Kharroub, K., & Ruas-Madiedo, P. (2019). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *LWT, Food Science and technology*, 107, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.005> ;

- **Bachtarzi, N.**, Speciale, I., Kharroub, K., De Castro, C., Ruiz, L., & Ruas-Madiedo, P. (2020). Selection of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) Isolated from Algerian Fermented Foods for the Manufacture of Skim-Milk Fermented Products. *Microorganisms*, 8 (1101), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081101> ;

- **Bachtarzi, N.**, Kharroub, K. (2017). Potentiel technologique de souches de bactéries lactiques autochtones. Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des BioRessources (Mars, 2017), Tabarka, Tunisie ;

-**Bachtarzi, N.**, Kharroub, K., & Ruas-Madiedo, P. (2018). Screening of exopolysaccharide-producing LAB isolated from traditional Algerian dairy products and preliminary characterization of selected strains during skim-milk fermentations. 12^{ème} réunion RedBAL, Séville, Espagne.

LISTE DES ABREVIATIONS

ANOVA:	Analysis Of VAriance
ACP :	Analyse Factorielle des Correspondances
ADN:	Acide Désoxyribo Nucléique
ARN :	Acide Ribo Nucléique
BL :	Bactérie lactique
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA :	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CLSM :	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CPS :	Polysaccharides Capsulaires
Cryo-ESM :	<i>Cryo Scanning Electron Microscopy</i>
Da :	Dalton
EDTA :	Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EPS :	Exopolysaccharide
EPS⁺ :	Phénotype producteur
ENA :	<i>European Nucleotide Archive</i>
ESM :	<i>Exopolysaccharide Selection Medium</i>
FTF :	Fructosyl Transferase
g:	force centrifuge
GC-MS :	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
GH:	Glycosides Hydrolases
HPAEC-PAD:	<i>High Performance Anion Exchange Chromatography With Pulsed Amperometric Detection</i>
HPLC:	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HPSEC :	<i>High-Performance Size-Exclusion Chromatography</i>
HoPS :	HomoPolysaccharides
HePS :	HétéroPolysaccharides
ID :	Identifiant
PBS :	Tampon Phosphate Salin
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA :	<i>Polysaccharid Dry Matter</i>
pI :	point isoélectrique
Log :	logarithme décimal
MALLS:	<i>Multi Angle Light Scattering</i>
MEB:	Microscopie Électronique à Balayage
Mpb :	Million de paires de bases
NaNO₃ :	Nitrate de Sodium
NaOH :	Hydroxyde de Sodium
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NSLB :	<i>Non Starter Lactic Bacteria</i>
RAPD :	<i>Random Amplified Polymorphie DNA</i>
RAST :	<i>Rapid Annotation Using Subsystem Tehnology</i>
RI :	<i>Refractive Index</i>
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
SBL :	Starter Bactérie Lactique
SEC:	Chromatographie d'exclusion
SMC:	lait écrémé additionné d'hydrolysats enzymatique de caséines
SNK:	Test statistique de comparaison post-hoc <i>Student, Newmann, Keuls</i>
TBE:	Tris Borate EDTA
TCA:	Acide Trichloro-Acétique
TDP :	TDP Thymidine Diphosphate
TFA :	Acide TriFluoroAcétique
TSI :	Triple Sugar Iron
UDP:	Uridine Diphosphate
WGS :	<i>Whole Genome Sequencing</i>

LISTE DES FIGURES

	Revue bibliographique	Page
Figure 1 :	Représentation schématique des voies impliquées dans le métabolisme central du sucre	9
Figure 2 :	Polysaccharides associés à la surface cellulaire des bactéries à Gram positif	15
Figure 3 :	Structure des homo et des hétéropolysaccharides	19
Figure 4 :	Aspect macroscopique d'une souche de bactérie lactique filante sur milieu MRS solide et liquide	22
Figure 5 :	Détection de la production des exopolysaccharides	22
Figure 6 :	Mécanismes de synthèse des homopolysaccharides(HoPS) et hétéropolysaccharides (HePS) chez les bactéries lactiques	26
Figure 7 :	Schéma du métabolisme des sucres et de la biosynthèse des hétéropolysaccharides chez les bactéries lactiques	26
Figure 8 :	Organisation des gènes de production des EPS(Ruas-madiedo, 2014)	29
Figure 9 :	Diagramme d'extraction des exopolysaccharides	32
Figure 10 :	Etapes d'analyse structurale des polymères	35
Figure 11 :	Exemples de structures primaires des unités répétitives résolues par RMN	37
Figure 12 :	Lait fermenté avec deux souches de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> non productrice EPS- et productrice EPS+	38
Figure 13 :	Relation entre la structure du polysaccharide et la rigidité de la chaîne	39
Figure 14 :	Modification de la structure micellaire lors de l'acidification du lait	40
Figure 15 :	Représentation schématique du comportement des mélanges de protéines et de polysaccharides	40
Figure 16 :	Micrographies par microscopie électronique à balayage de microstructure de beurre fermenté par une souche productrice d'EPS anionique	42
Figure 17 :	Evolution de la viscosité apparente en fonction du taux de cisaillement pour un fluide pseudo-plastique	44
	Matériel et Méthodes	
Figure 18 :	Emplacement géographique de l'échantillonnage des produits laitiers utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques productrices d'EPS	47
Figure 19 :	Schéma de l'entonnoir Posthumus	65
Figure 20 :	Photographie du rhéoviscosimètre montrant le cisaillement d'un gel SMC	65
Figure 21 :	Mesure de la perméabilité des gels lactiques	68
	Discussion et Résultats	
Figure 22 :	Exemples d'aspects macroscopiques de cultures productrices des EPS	79
Figure 23 :	Aspect macroscopique des culots cellulaires après centrifugation de deux cultures EPS+ et EPS-	79
Figure 24 :	Observation par microscopie photonique des cultures EPS+ après coloration à l'encre de chine	79
Figure 25 :	Produits d'amplification par PCR des gènes de l'ARN16S de quelques isolats sur gel d'agarose à 1 % (p/v)	87
Figure 26 :	Amplicons de PCR sur gel d'agarose à 1 % (p/v)	90
Figure 27 :	Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S	91
Figure 28 :	Profils RAPD des trois souches sélectionnées	93
Figure 29 :	Evolution de la croissance bactérienne des 7 isolats sélectionnés et de l'acidification des SMC durant 24 h	96

Figure 30 :	Analyse factorielle des correspondances (AFC) des caractéristiques qualitatives des 6 gels lactiques	99
Figure 31 :	Cinétique de croissance et d'acidification des souches sélectionnées	101
Figure 32 :	Poids des lyophilisats d'EPS bruts extraits à partir de 40 g de SMC fermenté	103
Figure 33 :	Quantification par SEC-MALLS des EPS produits par les deux souches sur milieu SMC	107
Figure 34 :	Chromatogrammes de la SEC-MALLS des lyophilisats d'EPS extraits des SMC après 48 h de fermentation	108
Figure 35 :	Photographie montrant l'aspect du gel brassé à l'intérieur de l'entonnoir Posthumus	112
Figure 36 :	Viscosité apparente des SMC fermentés et brassés par les trois souches testées mesurée par l'entonnoir Posthumus	113
Figure 37 :	Aspect macroscopique des SMC fermentés brassés	114
Figure 38 :	Viscosité apparente mesurée à 25°C en fonction de la vitesse de cisaillement des SMC fermentés	115
Figure 39 :	Viscosité cinématique des lactosérums, perméabilité des SMC fermentés par les trois souches	118
Figure 40 :	Pourcentage de synérèse en fonction des vitesses de centrifugation ($\times g$)	121
Figure 41 :	Microstructures (1D et 3D) des SMC fermentés	123
Figure 42 :	Micrographies électroniques réalisées par cryo-SEM des cellules bactériennes	126
Figure 43 :	Produits de l'amplification de l'ADN plasmidique	127
Figure 44 :	Carte physique des <i>clusters eps</i> des souches étudiées	130

LISTE DES TABLEAUX

	Revue Bibliographique	Page
Tableau 1 :	Principaux genres de bactéries lactiques	5
Tableau 2 :	Caractéristiques de quelques génomes de bactéries lactiques isolées de produits laitiers	7
Tableau 3 :	Exemples de représentation schématique des unités répétitives des Homopolysaccharides	18
Tableau 4 :	Caractéristiques comparatives des homo et des hétéro- polysaccharides produits par les bactéries lactiques	19
	Matériels et Méthodes	
Tableau 5 :	Nature et origine des échantillons	47
Tableau 6 :	Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'analyse RAPD	58
	Résultats et Discussion	
Tableau 7 :	Origine et caractères macroscopiques et microscopiques des isolats sélectionnés	77
Tableau 8 :	Caractères physiologiques et biochimiques des souches lactiques sélectionnées	81
Tableau 9 :	Résultats des tests biochimiques des 7 isolats lactiques par système API50CH	83
Tableau 10 :	Résultats des alignements des séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats lactiques sélectionnés avec ENA/Genbank/DDBJ	86
Tableau 11 :	Résultats des alignements des séquences des gènes d'ARNr 16S des isolats lactiques sélectionnés avec les banques ENA/Genbank/DDBJ et EZBioCloud	89
Tableau 12 :	Analyse comparative réalisée <i>in silico</i> des séquences du gène de l'ARNr 16S des 7 souches sélectionnées	93
Tableau 13 :	Caractéristiques de la croissance et de l'acidification des SMC par les souches sélectionnées	96
Tableau 14 :	Caractérisation préliminaire macroscopique des gels lactiques SMC	101
Tableau 15 :	Production d'acides organiques (mM) dans le SMC	111
Tableau 16 :	Paramètres rhéologiques du model Ostwald des SMC fermentés	117
Tableau 17 :	Caractéristiques des génomes et localisation des gènes de production des EPS	128
Tableau 18 :	Résumé du BlastN des <i>clusters eps</i> des souches étudiées avec la souche de référence <i>Lb. plantarum</i> WCFS1	133

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 :	Composition des milieux de cultures
Annexe 2 :	Electrophorèse pour migration d'ADN génomique et plasmidique
Annexe 3 :	Dosage des protéines résiduelles
Annexe 4 :	Photographie de quelques matériels utilisés
Annexe 5 :	Séquences générées par les amorces Y1Y2
Annexe 6 :	Séquences obtenues par les amorces pA et pH
Annexe 7 :	Résultats de <i>clustérisation</i> des profils RAPD par logiciel PyElph 1.4
Annexe 8 :	Evolution de la croissance bactérienne (log/mL) et de l'acidification des 7 isolats sélectionnés inoculés 2% dans le milieu SMC
Annexe 9 :	Analyses statistique ACP
Annexe 10 :	Evolution de la croissance, de l'acidification et de la production des EPS au cours de la fermentation
Annexe 11 :	Résultats du dosage des protéines à DO 550nm
Annexe 12 :	Viscosité apparente Posthumus des gels fermentés SMC
Annexe 13 :	Paramètres du model rhéologique des trois gels lactiques SMC
Annexe 14 :	Données de perméabilité enregistrées pour les trois gels SMC
Annexe 15 :	Résultats de la centrifugation des gels SMC
Annexe 16 :	Micrographies selon axes-Z réalisées au microscope confocal à balayage laser (CLSM) des SMC fermentés
Annexe 17 :	L'organisation des <i>clusters cps</i> chez la souche <i>Lb. plantarum</i> WCFS1
Annexe 18 :	Production Scientifique

INTRODUCTION

Les aliments fermentés sont consommés dans le monde entier depuis des siècles et constituent l'une des plus anciennes formes de conservation des aliments. Ils sont généralement fermentés par des interactions microbiennes, principalement par des bactéries et des levures, mais aussi parfois par des moisissures (Villéger *et al.*, 2017). Les bactéries lactiques participent intensément à ce processus de fermentation, et se révèlent comme de véritables usines de cellules grâce à leur capacité biosynthétique, leur polyvalence métabolique et leur physiologie relativement simple. Elles sécrètent durant la fermentation, de nombreux métabolites comme les acides organiques, l'éthanol, les vitamines, les bactériocines et les exopolysaccharides (Behare *et al.*, 2009; Khandelwal *et al.*, 2015 ; Nampoothiri *et al.*, 2016 ; Silveti *et al.*, 2017). La capacité des bactéries lactiques à produire des exopolysaccharides *in situ* durant la fermentation, est en général associée à l'amélioration des propriétés rhéologiques (Wu *et al.*, 2014). Les cultures texturantes sont traditionnellement utilisées dans la fabrication des laits fermentés visqueux comme le "Viili", le "longfill" et le "kéfir". Dans lesquels, les bactéries *Lactobacillus kefiranofaciens* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ont été identifiées comme productrices d'hétéropolymères le kéfiran et le viilian (MäYra Mäkinen et Bigret, 2004 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2006a ; Flahaut et de Vos, 2014 ; Mende *et al.*, 2016 ; Santos et Amorim, 2018). Vers la fin des années 80, l'emploi de ces cultures s'est élargi à l'industrie, où des souches thermophiles productrices d'exopolysaccharides telles que *Streptococcus thermophilus* ST-3021 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-3984 (collection ferments Hansen), ont été employées dans la fabrication de yaourt visqueux. L'intérêt suscité par ces biopolymères de grade alimentaire, car produits par des microorganismes considérés comme GRAS « *Generally Recognized As Safe* », est qu'ils agissent en tant qu'agents viscosifiants, texturants et stabilisants, ce qui permet de réduire l'emploi d'additifs alimentaires (amidon modifié, pectine, agar, etc.), soumis à une législation stricte (MäYra Mäkinen et Bigret, 2004 ; Folkenberg *et al.*, 2006 ; Canquil *et al.*, 2007; Prajapat et Patel, 2013 ; Zannini *et al.*, 2016 ; Yan *et al.*, 2018).

Grâce à ces propriétés techno-fonctionnelles, les exopolysaccharides limitent ainsi certains défauts de fabrication fréquemment rencontrés en industrie laitière, comme une faible viscosité, une rupture de gel ou une synérèse élevée. Ils remplacent aussi, dans les yaourts et les fromages, les matières grasses et répondent ainsi, à une nouvelle demande de consommation en produits allégés (Feldmane *et al.*, 2013 ; Torino *et al.*, 2015 ; Bajpai *et al.*, 2016).

Il est donc essentiel de connaître les caractéristiques chimiques du polymère afin de prédire son effet épaississant dans les matrices laitières, telles que les laits fermentés, bien que les

interactions entre les protéines du lait et l'exopolysaccharide, ne soient pas encore complètement élucidées (Tuinier *et al.*, 2001 ; Mende *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2019). La relation structure-fonction est en effet assez complexe, en raison du faible rendement des exopolysaccharides et de leur grande diversité chimique liée essentiellement à leur poids moléculaire, leur charge, et leur conformation spatiale (Gentès *et al.*, 2013 ; Ruas-Madiedo, 2014 ; Gangoiiti *et al.*, 2017 ; Ikeda *et al.*, 2019 ; Berthold-pluta et Garbowska, 2019). Toutefois, les travaux réalisés sur les effets des exopolysaccharides synthétisés par les bactéries lactiques *in situ* dans différents produits laitiers fermentés tels que : les yaourts, les fromages, les crèmes sûres et les crèmes glacées, ont tous conclu que ces biopolymères influençaient la texture de ces produits même à faible concentration, et sont à l'origine d'une texture crémeuse et d'une très faible synérèse (Adapa et Schmidt, 1998 ; Dertli *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Ikeda *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2018).

Quelques travaux de recherche algériens se sont également intéressés aux exopolysaccharides des bactéries lactiques, seulement la plupart de ces études ont porté sur la production des polymères dans des milieux synthétiques (Benasla, 2012 ; Zidani, 2015 ; Kersani, 2018 ; Larouci, 2018; Zarour, 2018). Peu de données existent sur l'emploi de souches lactiques autochtones productrices d'exopolysaccharides dans des matrices laitières. Seule l'étude - à notre connaissance - réalisée par Bennama *et al.* (2012) sur des souches de l'espèce *Streptococcus thermophilus*, a utilisé le lait comme milieu de fermentation.

D'autre part, l'industrialisation et l'utilisation des mêmes ferments lactiques a réduit la biodiversité, et les propriétés organoleptiques des produits fermentés. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la disponibilité de nouvelles souches intéressantes soit très limitée, en raison du développement de la pasteurisation (Altieri *et al.*, 2017). En industrie laitière, l'utilisation des mêmes starters commerciaux a engendré un appauvrissement de la qualité sensorielle des produits obtenus, qui ne se distinguent plus, par leurs modes de fabrication ou par leurs origines géographiques (Corbo *et al.*, 2017 ; Partovi *et al.*, 2018). Les résultats d'une étude sur ce sujet, ont révélé que le comportement des consommateurs algériens étudiés tendait vers une préférence pour les produits laitiers artisanaux considérés plus goûteux par rapport à leurs équivalents industriels (Mamine *et al.*, 2016).

La sélection de souches sauvages isolées de produits traditionnels autochtones, représente donc une source intéressante de nouvelles cultures lactiques génétiquement stables, aux propriétés fonctionnelles intéressantes (Domingos-Lopes *et al.*, 2018). Le séquençage du génome entier d'un grand nombre de souches lactiques, a permis en outre l'acquisition de connaissances génomiques sur les caractéristiques fonctionnelles d'isolats lactiques d'intérêt

industriel provenant de produits de fermentation artisanale (Bron *et al.*, 2019). Ces données ont contribué à la mise en œuvre d'applications réussies dans l'industrie alimentaire, par la sélection de cultures robustes présentant les caractéristiques recherchées (Gaspar *et al.*, 2013). Ce travail de thèse s'inscrit dans un cadre socioéconomique actuel, en vue de répondre aux besoins du marché national en produits alimentaires innovants, répondant aux nouvelles exigences de consommation avec des produits naturels et moins caloriques. Les ferments lactiques étant en totalité importés, la mise en place d'une production industrielle de ferments, s'avère nécessaire pour un proche avenir. Mais elle doit être précédée par la constitution de souchothèques de cultures lactiques autochtones, génétiquement caractérisées et dotées de potentialités technologiques stables, assurant la préservation de la typicité de nos produits locaux.

Ainsi, les objectifs de ce travail se résument comme suit :

- Isoler de nouvelles souches de bactéries lactiques mésophiles productrices d'exopolysaccharides, à partir de produits laitiers fermentés locaux ;
- Caractériser par une approche polyphasique les isolats sélectionnés ;
- Etudier la production des exopolysaccharides ;
- Caractériser la macro- et la microstructure des gels lactiques générés par les souches lactiques les plus performantes ;
- Identifier les gènes de production des exopolysaccharides.

Le document est organisé en quatre parties :

- Une première partie est une revue bibliographique qui présente les principales données de littérature sur les bactéries lactiques, la biosynthèse des exopolysaccharides ainsi que l'impact de leur présence dans des matrices laitières ;
- Une deuxième partie structurée en trois chapitres, est consacrée à la description des protocoles et techniques réalisés pour l'étude expérimentale ;
- Une troisième partie comprenant trois chapitres dans lesquels les principaux résultats obtenus sont présentés et discutés ;
- Enfin, une quatrième partie est présentée sous forme d'une conclusion générale qui met en évidence les principaux résultats de ce projet de thèse. Certaines questions non résolues au cours de cette étude, constituent les perspectives pour de futurs travaux.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. Bactéries lactiques

1. Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) forment un groupe hétérogène de microorganismes unis par une multitude de caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Ces bactéries présentent en effet les caractères communs suivants : bâtonnets ou cocci à Gram positif, immobiles, asporulées, aéro-anaérobies ou microaérophiles (Stile et Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004). Elles sont dépourvues de cytochrome oxydase, de nitrate réductase et de catalase. Certaines souches, semblent pourtant posséder une pseudo-catalase fonctionnant uniquement en présence d'hème exogène présent dans le milieu (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Axelsson et Ahn, 2000 ; Tailliez, 2001).

Les BL ont un métabolisme de type fermentaire utilisant plusieurs substrats carbonés, à partir desquels elles produisent, principalement de l'acide lactique. Elles sont ubiquistes, capables de se développer sur différents substrats, malgré leurs exigences en facteurs de croissance (acides aminés, vitamines, peptides, bases puriques et pyrimidiques). On les trouve dans les plantes, les aliments fermentés, le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux, ainsi que dans le sol et l'eau (Gaspar *et al.*, 2013 ; Hatti-Kaul *et al.*, 2018).

Les BL possèdent en outre, le statut GRAS «généralement reconnu comme sûr», et sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, où elles jouent un rôle crucial dans les processus de fermentations alimentaires. Grâce à leur capacité biosynthétique, leur polyvalence métabolique et leur physiologie relativement simple, les BL apportent à l'aliment une valeur nutritionnelle améliorée, des caractéristiques sensorielles et des propriétés thérapeutiques bénéfiques. Ce sont les probiotiques les plus couramment utilisés pour la fabrication d'aliments fonctionnels (Behare *et al.*, 2009; Khandelwal *et al.*, 2015 ; Silveti *et al.*, 2017 ; Pophaly *et al.*, 2018).

2. Taxonomie des bactéries lactiques

La taxonomie proposée par Orla-jensen en 1919 a été à l'origine de la classification des bactéries lactiques, sur la base de la morphologie cellulaire et des caractéristiques physiologiques (types fermentaires, températures de croissance et utilisation des sucres). Cette approche classique s'est ensuite étendue, pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques tels que la composition en acides gras et en protéines de la paroi cellulaire (Stile et Holzapfel, 1997; Pot, 2008).

Plus tard, la taxonomie polyphasique a été utilisée pour décrire les nouvelles espèces bactériennes, elle intègre à la fois des données phénotypiques, génotypiques et

phylogénétiques, et est en constante évolution grâce à l'utilisation des méthodes moléculaires plus sophistiquées (Sarethy *et al.*, 2014 ; Vandamme *et al.*, 2014 ; Björkroth et Koort, 2016). Les BL sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales* avec 06 familles et 40 genres, tous caractérisés par un faible pourcentage en guanine et cytosine ($GC \leq 55\%$) (Holzapfel et Wood, 2014 ; Björkroth et Koort, 2016). Les douze principaux genres de BL sont présentés en **tableau 1**.

Tableau 1. Principaux genres de bactéries lactiques (Hopzalfel et Wood, 2014).

Familles	Nombre de genres	Principaux genres	Morphologie cellulaire Mode de groupement
<i>Aerococcaceae</i>	7	<i>Aerococcus</i>	Coque/ tétrade
<i>Carnobacteriaceae</i>	16	<i>Carnobacterium</i>	Bacille /en paire, chaîne
		<i>Enterococcus</i>	Coque/ en paire, chaîne
<i>Enterococcaceae</i>	7	<i>Tetragenococcus</i>	Coque/ tétrade
		<i>Vagococcus</i>	Coque/ isolé en paire, chaîne
		<i>Lactobacillus</i>	Bacille/ isolé en paire, chaîne
<i>Lactobacillaceae</i>	3	<i>Pediococcus</i>	Coque/ tetrade
		<i>Leuconostoc</i>	Coque/ en paire, chaîne
<i>Leuconostocaceae</i>	4	<i>Oenococcus</i>	Coque/ en paire, chaîne
		<i>Weissella</i>	Bacille ou coque/ en paire, chaîne courte
<i>Streptococcaceae</i>	3	<i>Streptococcus</i>	Coque/ en paire, chaîne
		<i>Lactococcus</i>	Coque/ en paire, chaîne

2.1 Classification des bactéries lactiques au rang genre

La classification des BL en genres est essentiellement basée sur la morphologie cellulaire, le type de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit, la capacité de croissance à de fortes concentrations en sel et la tolérance au stress acide ou alcalin (Axelsson, 2004).

Selon leur morphologie cellulaire, les BL peuvent être divisées en deux groupes : *Lactobacillus*, *Carnobacterium* et certaines *Weissella* cas des espèces *W. confusa* et *W. kandleri* sont des bacilles, tandis que les autres genres sont des cocci (Simpson et Tagushi, 1995 ; Fusco *et al.*, 2015). Bien qu'en pratique, les conditions et le stade de croissance des cellules bactériennes peuvent considérablement affecter la morphologie cellulaire (Pot, 2008). De même, le mode de division cellulaire permet la différenciation entre cocci. Ainsi, les genres *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* se différencient des autres coques, par

leur division bidirectionnelle formant des tétrades (Simpson, 1995 ; Axelsson, 2004 ; König et Fröhlich, 2009).

Une seconde caractéristique également utilisée dans la différenciation des genres, est le type de fermentation du glucose. Les BL sont réparties en deux groupes selon les deux principales voies de fermentation du sucre : la glycolyse (voie Embden-Meyerhof-Parnas-EMP), et la voie des pentoses phosphate (phosphocétolase) ; le métabolisme est dit homofermentaire et hétérofermentaire, respectivement (Axelsson, 2004).

La croissance à différentes valeurs de températures, de salinité et de pH représente un critère physiologique de différenciation entre les BL. La température de croissance permet de différencier le genre *Enterococcus* qui poussent à 10°C et à 45°C, des genres *Lactococcus* et *Vagococcus* qui se développent à 10 °C mais pas à 45 °C à l'inverse du genre *Streptococcus* (Axelsson, 2004).

De même la tolérance à 6,5 % (p/v) de NaCl permet la distinction entre les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, bien que les réactions soient variables. Le genre *Tetragenococcus* résiste cependant à 18% (p/v) de NaCl. Alors que, la plupart des BL sont partiellement ou totalement inhibés par des taux de NaCl supérieurs à 5 % (p/v) (Altieri *et al.*, 2017). La tolérance aux conditions acides et/ou alcalines peut également être utile. Ainsi, les genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* sont caractérisés par une croissance à des valeurs de pH relativement élevées, malgré qu'ils soient tous incapables de croître à pH 9,6. Cette caractéristique permet entre autre la discrimination entre les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*, puisque ce dernier étant incapable de croître à pH 4,5 ou sur la gélose à l'acétate par contre, il peut croître à pH 9 (Axelsson 2004 ; Pot, 2008).

2.2 Classification des bactéries lactiques au rang espèce

Le profil de fermentation des glucides permet la classification des BL au niveau des espèces, il existe pour cela des kits d'identification standardisés les galeries API® qui permettent l'identification rapide de cultures pures de BL par comparaison des résultats aux bases de données API. Mais dans certains cas, l'exactitude de l'identification peut être problématique pour des espèces étroitement apparentées, et parfois pour la même souche, une variabilité peut être observée. Celle-ci peut résulter de la perte ou de gain de gènes plasmidiques, qui codent pour des protéines impliquées dans la fermentation des glucides (Klaubauf et Segers, 2018). En somme, les méthodes phénotypiques présentent des limites en termes de capacité de discrimination et de précision.

Tableau 2. Caractéristiques de quelques génomes de bactéries lactiques isolées de produits laitiers (Douillard et de Vos, 2014).

Bactéries lactiques	Code	Source	Taille génome (Mpb)	Nombre de plasmides	GC%	Nombre de protéines
<i>Lactobacillus</i>						
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23	Fromage	3,08	0	46,3	2997
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842	Produits laitiers	1,87	0	49,7	1529
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DPC 4571	Fromage	2,08	0	37,1	1610
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	ZW3	Kefir	2,35	2	37,4	2162
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>casei</i>	N1115	Produits laitiers	3,06	4	46,5	2985
<i>Lactococcus</i>						
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	IL1403	Fromage	2,37	0	35,3	2277
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	MG1363	Produits laitiers	2,53	0	35,7	2434
<i>Streptococcus</i>						
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNRZ1 066	Yaourt	1,8	0	39,1	1914
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMD9	Fromage	1,86	2	39,1	2258

Mpb : millions paires de bases ; GC % : pourcentage en base guanine et cytosine.

De ce fait, la distinction entre les souches nécessite toujours l'emploi d'approches moléculaires telles que : l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S, le typage par *Multilocus Sequence Typing (MLST)*, l'hybridation ADN-ADN, l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) ou par analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié (ARDRA) etc. (Rossetti et Giraffa, 2005 ; Domingos-Lopes *et al.*, 2018).

3. Génétique des bactéries lactiques

Le génome des BL est composé d'un chromosome unique et d'éléments génétiques comme les plasmides, les transposons conjugatifs et les prophages (Leblond-Bourget et Guedon, 2009). Des mégaplasmides de taille comprise entre 110 et 490 kpb ont été trouvés chez plusieurs espèces de bactéries lactiques. Leur présence avec celle des plasmides est très importante en termes de production alimentaire, car ils sont porteurs de gènes supplémentaires impliqués dans les voies métaboliques tels que le métabolisme du lactose, du citrate, la résistance aux bactériophages, la protéolyse et la production de bactériocines et d'exopolysaccharides (Khandelwal *et al.*, 2015; Hatti-Kaul *et al.*, 2018).

Le génome des BL est relativement de petite taille comparativement à ceux d'autres bactéries comme les *Pseudomonas* (6 Mpb). Seulement, sa taille varie, selon les espèces de 1,23 Mpb (*Lactobacillus sanfranciscensis*) à 4,91 Mpb (*Lactobacillus parakefiri*), et est généralement corrélée au nombre de gènes, donc aux capacités métaboliques de la cellule. Le **tableau 2** présente quelques données sur leurs génomes.

L'information génomique facilite en outre, la compréhension des caractéristiques physiologiques et métaboliques à l'origine de la biodiversité et de l'adaptation des BL à divers habitats. Elle fournit en même temps d'importantes données sur les propriétés fonctionnelles comme la formation des arômes, le métabolisme du sucre, la réponse au stress, les interactions et la biosynthèse de molécules comme les bactériocines et les exopolysaccharides (Giraffa, 2014 ; Holzapfel et Wood, 2014 ; Sun *et al.*, 2014 ; Bron *et al.*, 2019).

Actuellement, plusieurs génomes de ces bactéries sont complètement séquencés et publiés. À titre d'exemple, 124 génomes séquencés de l'espèce *Lactobacillus plantarum* sont accessibles au public dans la base de données du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1108>, consultée en juin 2020). Parmi lesquels figure celui de la souche modèle *Lactobacillus plantarum* WCSF1 isolée de la salive humaine, qui fut le premier génome analysé chez les espèces de *Lactobacillus*. Sa taille est

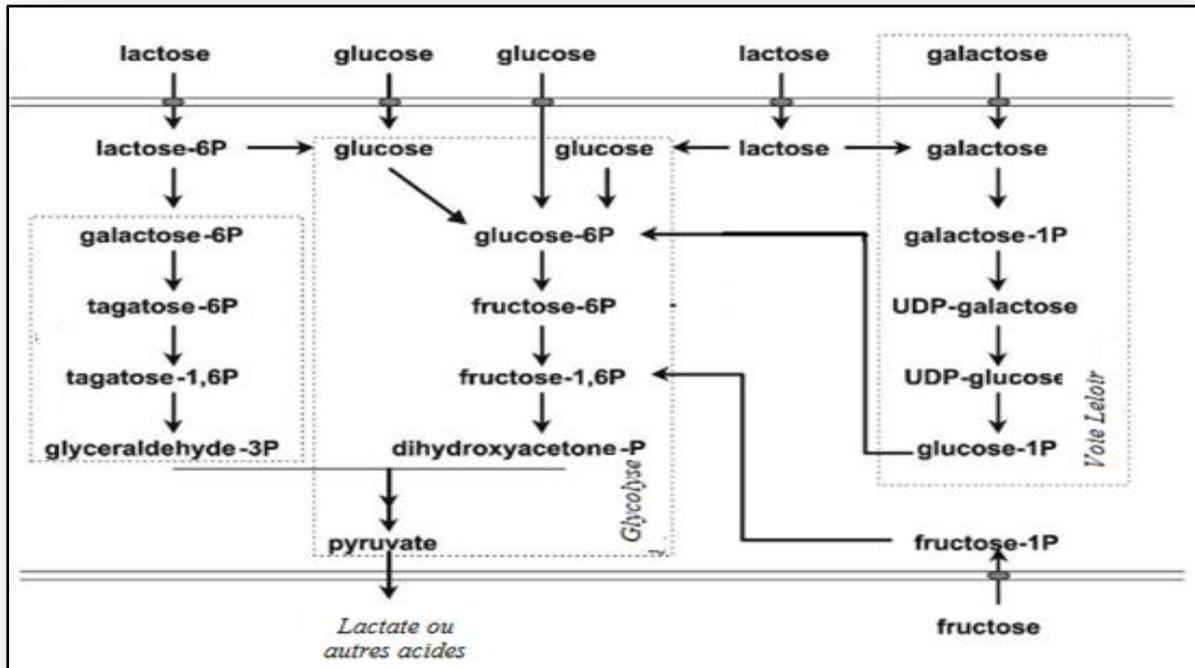


Figure 1. Représentation schématique des voies impliquées dans le métabolisme central du sucre : la voie de la glycolyse, la voie de Leloir et la voie du tagatose-6P sont indiquées par des lignes pointillées, les membranes cellulaires sont indiquées par des lignes horizontales (Boels *et al.*, 2001).

d'environ 3,3 Mpb, avec une teneur en GC de 44,4 % et il contient 3 plasmides (Kleerebezem *et al.*, 2003 ; Flahaut et de Vos, 2014 ; Stefanovic *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018).

4. Métabolisme des bactéries lactiques

La fabrication de produits laitiers fermentés tels que le yaourt, le beurre et le fromage, nécessite l'emploi de BL pour la fermentation du lait. Ces dernières entraînent la dégradation des glucides et autres macromolécules nutritionnelles présentes dans le lait en acide lactique et différents produits (Khalid, 2011). Ainsi, les différentes voies métaboliques empruntées par ces bactéries sont le métabolisme du lactose, du citrate (seconde source d'énergie pour quelques espèces), ainsi que la protéolyse et le catabolisme ultérieur des acides aminés. Le métabolisme des acides gras ou la lipolyse est cependant peu impliqué (Blaya *et al.*, 2017).

4.1 Métabolisme des glucides

Les BL consomment rapidement les glucides fermentescibles de diverses matrices alimentaires et les transforment en acides organiques, principalement en acide lactique. Cette acidification rapide leur permet de concurrencer d'autres microorganismes pour le substrat, mais aussi grâce à l'abaissement du pH, la durée de conservation du produit est prolongée (Khandelwal *et al.*, 2015). Sur le plan génétique, la capacité des BL à utiliser les sucres est souvent fonction des souches, certaines facultés sont chromosomiques, d'autres sont par contre plasmidiques (Loubiere et Cocaign- Bousquet, 2009).

Les BL métabolisent les sucres par fermentation dans des conditions microaérophiles et génère de l'ATP par phosphorylation du substrat. L'acide lactique est le principal produit du glucose pour les BL homofermentaires tels que *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et quelques espèces de *Lactobacillus*, formé par la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou glycolyse (**figure 1**). Cette voie génère 2 molécules de pyruvate pour une molécule de glucose puis le pyruvate agit comme accepteur d'électrons, et est réduit en 2 molécules d'acide lactique (C3) (Hatti-Kaul *et al.*, 2018).

Les BL homofermentaires peuvent, cependant emprunter la fermentation acide mixte dans des conditions de limitation du carbone et de modification de la concentration en oxygène (Hatti-Kaul *et al.*, 2018). C'est d'ailleurs, le cas de plusieurs espèces homofermentaires du genre *Lactobacillus* qui produisent en dehors de l'acide lactique, du formiate, de l'éthanol et de l'acétate. De même, en conditions de carences nutritionnelles, le pyruvate est métabolisé en éthanol et en acétate permettant à la bactérie de synthétiser de l'ATP (Bourgeois et Larpent, 1996).

Par contre, d'autres genres lactiques comme *Leuconostoc*, *Weissella* et quelques espèces de *Lactobacillus* empruntent la voie de la phosphocétolase, ils sont dits hétérofermentatifs (Villéger *et al.*, 2017). Cette voie génère lors du catabolisme du glucose des quantités équimolaires de lactate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol avec un rendement énergétique net de 1 molécule d'ATP (Kandler, 1983 ; Monedero *et al.*, 2010).

Dans les environnements laitiers, le lactose reste la principale source de carbone disponible aux BL (dans le lait 45-50g/L), mais seulement 30 % dans le cas du yaourt sont métabolisés, en raison de l'effet inhibiteur qu'exerce l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu fermenté (Pernoud *et al.*, 2004)

Lors de la fermentation du lait, les BL produisent dans un premier temps la β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Le glucose est ensuite converti en acide lactique par la voie glycolytique ou par celle de la phosphocétolase, par contre le galactose est soit fermenté par la voie du tagatose-6P, soit métabolisé par la voie de Leloir. Seulement, il n'est pas facilement décomposé par certaines espèces telle que *Streptococcus thermophilus*, et ce en raison de la faible transcription des promoteurs du galactose ou de la mutation des gènes de la voie de Leloir (Mayo *et al.*, 2010). Par conséquent, il s'accumule dans les produits fermentés, comme dans le fromage Mozzarella, où le galactose forme une coloration brune à la fonte (Arfaoui, 2014 ; Chandan, 2014).

En outre, l'utilisation des nutriments peut aussi être élargie à d'autres molécules que le lactose. En effet, au cours de l'affinage du fromage, le développement des cultures de BL non starter (NSBL), peut être attribué en partie à leur capacité d'utiliser d'autres molécules disponibles dans le milieu. Au cours des premières semaines d'affinage du fromage, le lactose est métabolisé. Après son épuisement, les NSBL puisent leur énergie de divers composés tels que l'acide lactique, l'acide citrique, le ribose, les acides gras, le glycérol et les acides aminés (Blaya *et al.*, 2017). Dans le fromage Cheddar, ces cultures contribuent au développement de saveur désirable tout en réduisant l'amertume associée à la protéolyse (Corsetti et Valmorri, 2011).

4.2 Métabolisme du citrate

A côté du métabolisme glycolytique, les ferments lactiques utilisés en industrie laitière en particulier *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, ont la capacité de métaboliser des composés comme le citrate. Ces souches utilisent simultanément le citrate et le lactose en co-métabolisme, afin de produire de l'énergie (Altieri *et al.*, 2017).

L'utilisation du citrate entraîne également la formation de diacétyl, un composé aromatique, principalement recherché dans les produits laitiers frais (beurre, fromage frais et crème fraîche). D'autres espèces de lactobacilles telles que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* utilisent aussi le citrate au cours de l'affinage des fromages. L'amélioration significative de la saveur du fromage de type *Kefalograviera* à faible teneur en gras, est obtenue en associant aux ferments des cultures auxiliaires de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* qui synthétisent des quantités élevées de diacétyl (Monnet *et al.*, 2008 ; Bekal *et al.*, 2009 ; Di Cagno *et al.*, 2014).

A l'échelle cellulaire, le citrate est transporté vers le cytoplasme par une citrate perméase et rejoint la voie glycolytique qui conduit au pyruvate. Sa fermentation par les BL génère des composés à quatre carbones (C₄), comme le diacétyl, l'acétoïne et le butanediol, qui ont des propriétés aromatiques. Le métabolisme du citrate conduit aussi à la formation de CO₂, ce dégagement gazeux joue un rôle important dans la texture, y compris dans la formation d' "yeux" (trous) de plusieurs types de fromages tels que l'Emmental, le Roquefort et le Gouda (Monnet *et al.*, 2008 ; Rincon-Delgadillo *et al.*, 2012; Zarour *et al.*, 2017).

Cependant, l'utilisation de ce composé est observée essentiellement en conditions de limitations en glucose (Bekal *et al.*, 2009 ; Mayo *et al.*, 2010). Dans ce contexte, Corsetti et Valmorri (2011) ont rapporté que le métabolisme du citrate chez ces bactéries est ralenti par la présence de sucres fermentescibles, et ont aussi souligné que l'utilisation du citrate par *Lactobacillus plantarum* est grandement influencée par le pH du milieu et par l'état physiologique des cellules.

4.3 Métabolisme des acides aminés

La majorité des BL utilisées en industrie laitière sont des bactéries homofermentaires où la glycolyse est la principale voie associée à la conversion rapide des sucres. La croissance et l'énergie sont obtenues par phosphorylation du substrat avec conversion du glucose en acide lactique. Par contre, les voies de dégradation des acides aminés sont essentiellement activées en conditions de carence en nutriments ou en phase de croissance stationnaire avancée (Monnet, 2009; Flahaut et de Vos, 2014).

Le catabolisme des acides aminés permet la production de molécules aromatiques (aldéhydes, acides, alcools) ou non aromatiques (hydroxyacides), mais peut également générer des composés toxiques tels que les amines biogènes. Les molécules aromatiques dérivant des acides aminés aromatiques auront une note florale, celles dérivant des acides aminés ramifiés,

une note plutôt animale et ceux dérivant de la méthionine une note soufrée, aillée (Monnet, 2008;2009).

En fromagerie, les cultures NSBL présentent une protéolyse secondaire intense, *via* les activités élevées de l'oligoendopeptidase et de l'aminopeptidase, produisant des quantités élevées d'acides aminés libres. Ces derniers contribuent directement ou comme précurseurs au développement de la saveur du fromage. L'espèce *Lactobacillus plantarum* considérée comme culture NSBL, est capable de cataboliser les acides aminés aromatiques et à chaîne ramifiée par transamination, générant ainsi des composés aromatiques recherchés dans les fromages (Corsetti et Valmorri, 2011).

5. Applications des bactéries lactiques en technologie laitière

L'exploitation des BL dans la fabrication d'aliments fermentés, était considérée comme le moyen le plus fréquemment utilisée pour la conservation des denrées périssables telles que le lait (Jamet, 2009). Leur emploi s'est ensuite étendu grâce à leurs propriétés fonctionnelles, à l'industrie où, elles sont à la base de fermentations de produits divers (produits laitiers, carnés, céréaliers, de la mer et les végétaux).

En technologie laitière pour la fermentation du lait, les BL communément appelées cultures starters (SBL), sont responsables de l'acidification rapide du lait à un niveau où les composés aromatiques tels que l'acétaldéhyde, le diacétyle ainsi que d'autres composés sont aussi formés (Chandan, 2014). Ces ferments appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus*, représentés par les espèces et sous espèces suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc* sp. et *Streptococcus thermophilus* (Tamang *et al.*, 2016).

À ces cultures acidifiantes, s'ajoutent également d'autres BL dites cultures non starters (NSBL), ces bactéries sont souvent des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs telles que : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus curvatus* ; *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* et *Lactobacillus plantarum* (Nieto-Arribas *et al.*, 2009 ; Tamang *et al.*, 2016). Ces cultures auxiliaires font partie de la flore lactique secondaire, et jouent un rôle important dans la maturation des fromages, en favorisant le développement d'arômes, particulièrement pour les produits à base de lait pasteurisé (Blaya *et al.*, 2017; Stefanovic *et al.*, 2017).

Les BL sont également utilisées comme cultures protectrices, pour améliorer et prolonger la durée de conservation des aliments. En effet, elles produisent en plus, des acides organiques

de l'éthanol, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des bactériocines qui inhibent la croissance et l'activité métabolique de nombreux microorganismes pathogènes et d'altérations (Roy et Lapointe, 2016). D'autres applications concernent l'amélioration de la texture des produits laitiers, par l'emploi de BL productrices d'expolysaccharides, ces biomolécules produites *in situ* répondent à une nouvelle demande en produits naturels, faibles en sucre et en gras (Lapointe, 2009 ; Behera *et al.*, 2018).

CHAPITRE 2. Exopolysaccharides

1. Exopolysaccharides des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, comme beaucoup d'autres microorganismes, sont capables de produire des polysaccharides qui sont des polymères d'hydrates de carbone. Selon leurs fonctions biologiques dans la cellule, les polysaccharides se répartissent en trois groupes. Des polysaccharides intracellulaires qui sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie. D'autres sont des composants de la paroi tels que les peptidoglycanes (PG) et les lipopolysaccharides (LPS). Alors que le troisième groupe est excrété à l'extérieur de la cellule, et comprend les polysaccharides capsulaires (CPS) qui restent liées à la surface cellulaire, et les exo (ou *extracellular*) polysaccharides (EPS) qui sont totalement dissociés de la membrane (Sutherland, 1999 ; Bergmaier, 2002 ; Cescutti, 2009 ; Lapointe, 2009 ; Schmid *et al.*, 2015) (**figure 2**). Seulement, la distinction entre les deux formes CPS et EPS est plutôt théorique, car les CPS peuvent être libérés progressivement dans le milieu, comme c'est le cas du CPS produit par la souche *Lactobacillus plantarum* EP56 (Tallon *et al.*, 2003).

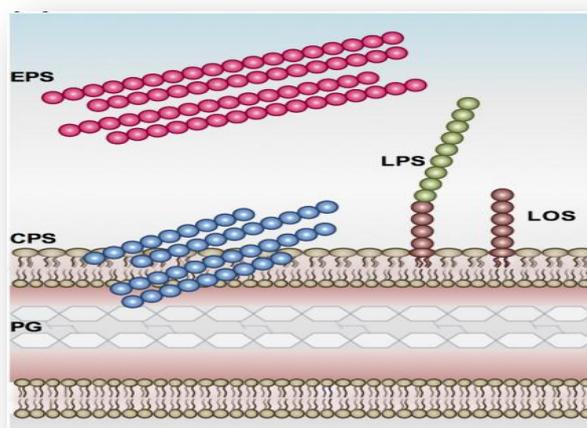


Figure 2. Polysaccharides associés à la surface cellulaire des bactéries à Gram positif. polysaccharides capsulaires (CPS), exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS), lipooligosaccharides (LOS), peptidoglycane (PG) (Zeidan *et al.*, 2017).

En industrie alimentaire, les EPS sont très utilisés comme agent épaississant, en raison de leurs propriétés rhéologiques uniques dans les aliments (Lynch *et al.*, 2017). Certains d'entre eux sont produits par des souches pathogènes comme le xantane synthétisé par la souche *Xanthomonas campestris*. C'est pourquoi l'industrie alimentaire s'est orientée vers des microorganismes producteurs d'EPS ayant un statut GRAS (généralement reconnu comme sûr), comme les bactéries lactiques (Berg *et al.*, 2009).

2. Classification des exopolysaccharides des bactéries lactiques

Deux types de classifications d'EPS ont été proposés, la première repose sur leur localisation et le type de polymère produit; tandis que la seconde les répertorie selon leur composition chimique en monomère. Cette dernière classification peut également être élargie à d'autres caractéristiques telles que: la configuration absolue (D ou L) et anomérique (α ou β), le poids moléculaire, la charge en électrons, la présence de chaînes latérales, et la rigidité des molécules (Montoya, 2019).

2.1 Classification des exopolysaccharides selon leur type et localisation

Cette classification permet de séparer les deux formes de polymère produites par les bactéries lactiques selon leur localisation en : forme capsulaire (CPS) qui reste étroitement attachée à la cellule bactérienne et la forme libre (EPS) excrétée dans le milieu. Certaines souches peuvent produire les deux formes, par contre d'autres ne produisent que le second type (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005 ; Hassan, 2008).

Il est fréquent que, le terme « EPS » tel que proposé par Sutherland (1972), soit utilisé en faisant allusion aux deux types de polysaccharides excrétés (CPS et EPS) (Cerning, 1990 ; 1995), car en fait la localisation des polysaccharides dépend fortement des conditions de croissance de la souche productrice (Cirrincione *et al.*, 2018).

En outre, les polymères produits par les cultures lactiques peuvent être mucoïdes ou filants. Cette nomenclature souvent confuse décrit le phénotype mucoïde comme ayant une apparence brillante et visqueuse sur gélose, sans formation de brins après étirement des colonies à l'anse de platine, contrairement au second phénotype (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).

Sur la base de la localisation et du type de polysaccharide produit, Hassan *et al.* (2008) ont classé les bactéries lactiques en quatre groupes distincts :

- *groupe I*: souches filantes produisant des capsules et des EPS libres ;
- *groupe II*: souches filantes ne formant pas de capsules mais produisant des EPS libres;
- *groupe III* : souches non filantes produisant des capsules et des EPS libres ;
- *groupe IV* : souches ne produisant pas ou peu d'EPS détectable.

Plusieurs souches productrices d'EPS filants « *ropy* » sont actuellement utilisées dans la fabrication de produits laitiers fermentés, comme source d'épaississants naturels et d'ingrédients stabilisants (Mishra et Jha, 2013; van de Velde *et al.*, 2015). D'un autre côté, les souches productrices de polymères non filants « *non-ropy* » ont aussi suscité l'intérêt des industries laitières. Ceci est dû à leur capacité à produire de grandes quantités d'EPS libres

et/ou capsulaires, qui améliorent la texture des produits laitiers sans induire la sensation en bouche gluante parfois indésirable pour les consommateurs (Hassan, 2008).

2.2 Classification des exopolysaccharides selon leur composition chimique

Selon leur composition chimique, les EPS sont classés en deux catégories : les homopolysaccharides (HoPS) et les hétéropolysaccharides (HePS). Outre cette disparité chimique, ces macromolécules présentent également une grande diversité structurale (Welman et Maddox, 2003 ; Birch *et al.*, 2019). L'une des raisons en est, que deux sucres identiques peuvent se lier pour former 11 disaccharides différents, par contre deux acides aminés ne peuvent former qu'un seul dipeptide (Ruas-Madiedo, 2014).

2.2.1 Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides (HoPS) sont composés d'un seul type de monosaccharides (**tableau 3**), généralement du glucose ou du fructose (Mende *et al.*, 2016), parfois on retrouve aussi du galactose (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005). Les polymères générés par ces oses sont respectivement, le glucane, le fructane et le galactane. Les deux premiers sont utilisés comme ingrédients en industrie alimentaire (Domingos-Lopes *et al.*, 2017).

Les caractéristiques de la structure de la chaîne principale et de celle des branches constituent les principales différences entre les HoPS, elles sont dépendantes de la souche productrice. La biosynthèse des glucanes par *Lactobacillus* sp. conduit au dextrane linéaire, alors que la souche *Lactobacillus reuteri* 180 synthétise un homopolymère ramifié (Zannini *et al.*, 2016).

Une sous-classification des HoPS a été proposée en fonction du type de liaison et de la position du carbone impliqué dans cette dernière. Ceci a permis de distinguer quatre groupes :

- α -D-glucanes;
- β -D-glucanes ;
- Fructanes ;
- Polygalactane (Nwodo *et al.*, 2012 ; Zannini *et al.*, 2016).

Des différences à l'intérieur des groupes existent aussi, ainsi le dextrane contient principalement des liens α (1-6) entre les unités de glucose, par contre le reutéranne comprend essentiellement des liens α (1-4). De même, l'inuline et le lévane sont des fructanes avec des liaisons β (2-1) et β (2-6), respectivement (Lynch *et al.*, 2018). Le **tableau 3** expose quelques structures des HoPS.

Le poids moléculaire des homopolymères varie selon l'espèce productrice et les conditions de culture, il est généralement compris entre 10^6 Da et 10^7 Da (Ruas-Madiedo et de los Reyes-

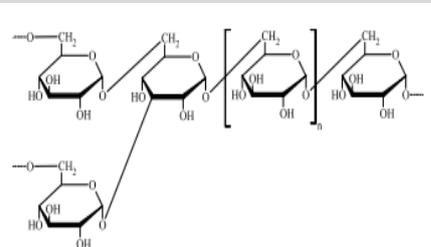
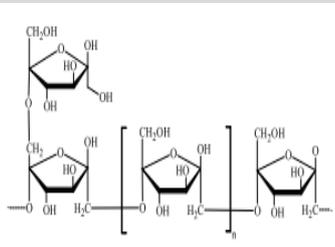
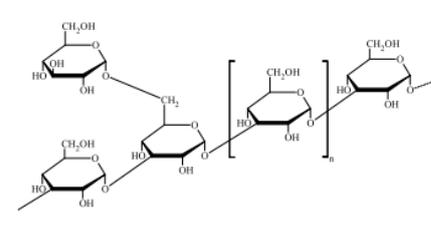
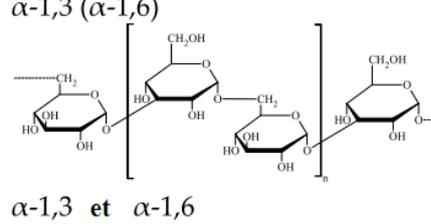
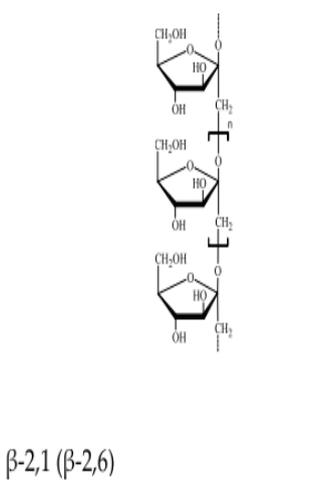
Gavilán, 2005; Harutoshi, 2013), les principaux genres producteurs d'HoPS sont : *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Weissella* (Baruah *et al.*, 2017).

Sur le marché industriel le seul HoPS commercialisé, est le dextrane synthétisé par les deux sous espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* qui trouve son application dans plusieurs domaines.

Dans l'industrie alimentaire, il est utilisé comme agent texturant dans les yogourts, les crèmes dessert, les boissons à base de lait et les sauces à salade (Schmid *et al.*, 2015). Il est par ailleurs utilisé comme composé de filtration sur gel (Sephadex), en tant que substitut du plasma sanguin et dans la biosorption des métaux lourds (Patel et Prajapati, 2013; Mende *et al.*, 2016).

Le mutane est un homopolymère très décrit, il est à l'origine de la carie dentaire, produit par *Streptococcus mutans*, c'est un HoPS linéaire contenant des résidus de D-Glucose liés par des liaisons glucosidiques α (1-3) associés au D-Glucose ramifié au niveau des liaisons α (1-6). (Badel *et al.*, 2011 ; Kwon *et al.*, 2016 ; Oleksy et Klewicka, 2018).

Tableau 3. Exemples de représentation schématique des unités répétitives des Homopolysaccharides (Harutoshi, 2013).

	Glucanes	Fructanes
Dextrane	 <p>α-1,6 (α-1,3)</p>	 <p>β-2,6 (β-2,1)</p>
Mutane	 <p>α-1,3 (α-1,6)</p>	Inuline
Alternane	 <p>α-1,3 et α-1,6</p>	 <p>β-2,1 (β-2,6)</p>

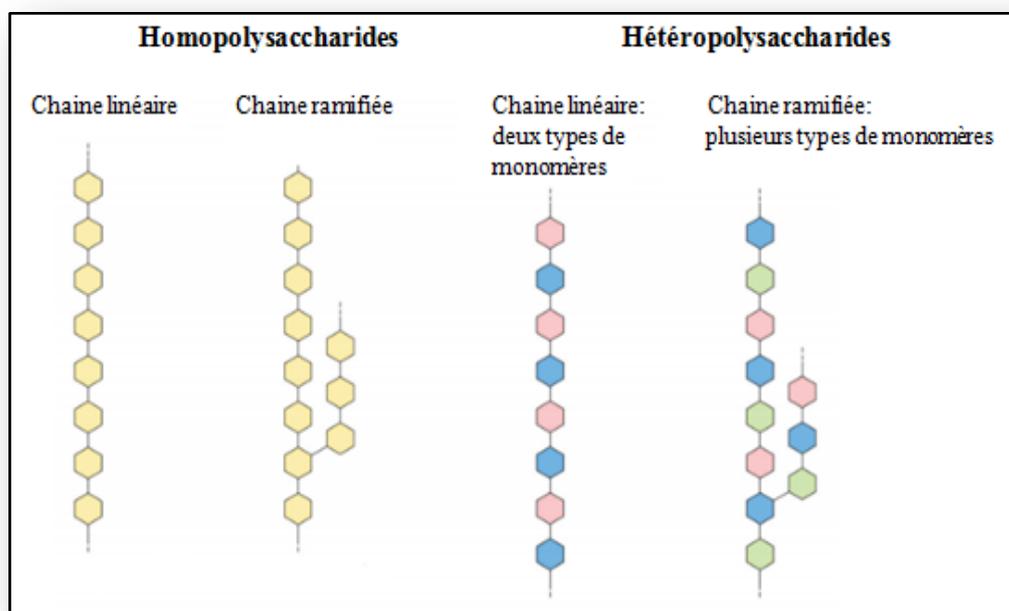


Figure 3. Structure des homo et des hétéropolysaccharides (Sanalibaba et Cakmak, 2016).

Tableau 4. Caractéristiques comparatives des homo et des hétéropolysaccharides produits par les bactéries lactiques (Lynch *et al.*, 2018).

Homopolysaccharides	Hétéropolysaccharides
Contient un seul type de monosaccharide	Contient plus d'un type de monosaccharide
Monosaccharides majeurs : glucose ou fructose	Monosaccharides majeurs : glucose, galactose et rhamnose
Présence de Lien α ou β	Présence de liens α et β
Chaîne linéaire ou avec branchement	Généralement chaîne avec branchement
Masse molaire $> 10^6$ Da	Masse molaire 10^4 - 10^6 Da
Principalement produits par <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , et <i>Weissella</i>	Principalement produits par <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , et <i>Streptococcus</i>
Produits extracellulairement à partir de saccharose ou d'amidon	Produits au niveau intracellulaire
Produits en grande quantité (grammes/Litre)	Produits en petite quantité (milligrammes/Litre)
Absence de groupe non glucidique	Présence de groupe non glucidique
Ne sont pas chargés	Peuvent contenir des groupes chargés
Principalement associé à l'activité prébiotique	Principalement associé à l'activité d'immuno-modulatrice

2.2.2 Hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides (HePS) sont composés de différents monomères dont la taille varie du tri aux octasaccharides (**figure 3**), principalement du glucose, du galactose, du rhamnose, de la N-acétylglucosamine, ou de la N-acétylgalactosamine pour l'EPS non chargé ou neutre (Cerning, 1990 ; Broadbent *et al.*, 2003). Pour les HePS chargés négativement, des groupes phosphate, sulfate ou de l'acide glucuronique sont liés aux monosaccharides (Mende *et al.*, 2016).

En général, la composition en monomères varie peu, on y retrouve surtout du glucose et du galactose. Ce dernier est souvent majoritaire, probablement parce qu'il n'est pas métabolisé par la bactérie comme le glucose et serait donc disponible pour la synthèse du polymère (Dupont, 1998). Seulement, la composition des sous-unités monosaccharidiques et la structure des unités répétitives ne sont pas spécifiques à une espèce donnée, sauf dans le cas de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*. Cette sous espèce, isolée du kéfir, un aliment laitier fermenté du nord du Caucase, produit de grandes quantités de polysaccharide hydrosoluble appelé kéfirane. Ce polymère est capable d'améliorer les propriétés viscoélastiques des gels lactiques (Behare *et al.*, 2009).

Les HePS ont des poids moléculaires qui varient de 4×10^4 Da (*Lactobacillus plantarum*) à 6×10^6 Da (*Lactobacillus sakei* 0-1) (Oleksy et Klewicka, 2018). Selon Laws *et al.* (2009), la construction du polymère s'arrête à la fin de la phase de croissance exponentielle, par contre d'autres sous unités s'ajoutent à la chaîne préexistante durant la phase de croissance stationnaire. De ce fait, le poids moléculaire augmente avec une fermentation plus longue (van de Velde *et al.*, 2015). Le **tableau 4** résume les principales caractéristiques des homo et hétéropolymères (Lynch *et al.*, 2018).

3. Rôle des exopolysaccharides

Le rôle physiologique des EPS de BL est complexe et encore incertain. Généralement, ils ne sont pas utilisés comme source énergétique, car la plupart des espèces productrices ne possèdent pas les gènes impliqués dans leur dégradation (Torino *et al.*, 2015). Bien que, le *Streptococcus mutans* et le *Streptococcus sobrinus* aient été signalées, comme dégradant le dextrane produit par une dextranase (Zannini *et al.*, 2016).

Les trois principaux rôles fonctionnels rattachés aux EPS sont : *i*) la protection contre la dessiccation, les attaques de bactériophages, la phagocytose et la résistance au stress (acide, thermique, osmotique et oxydatif) ; *ii*) la reconnaissance et les interactions cellule-cellule ;

(iii) la formation de biofilms (Josephsen et Neve, 2004 ; Lapointe, 2009 ; Ruas-madiedo, 2014).

Ces dernières années, beaucoup de travaux scientifiques ont été consacrés aux EPS des BL, dont la majorité est produite par les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, et *Pediococcus*. Les recherches les plus récentes ont porté sur l'intérêt de leurs utilisations en industries alimentaire, pharmaceutique et en biotechnologie (Patel et Prajapati, 2013; Lynch *et al.*, 2018 ; Xu *et al.*, 2019).

En industrie alimentaire, les EPS sont utilisés comme agents épaississants, gélifiants et hydrocolloïdes. Produits *in situ* pendant la fermentation, ils remplacent les amidons chimiquement modifiés ainsi que le gras dans les aliments allégés, comme les fromages et les yaourts. De plus, les EPS ont la capacité d'inhiber la cristallisation et d'augmenter la rétention d'eau dans les fromages et yaourts, tout comme ils confèrent une texture et une onctuosité aux produits laitiers fermentés (Patel et Prajapati, 2013 ; Ruas-madiedo, 2014 ; Wu *et al.*, 2014). En revanche, pour certaines productions alimentaires comme en cidrerie, la présence de polymères produits par les BL est plutôt préjudiciables, car ils modifient la rhéologie de la boisson en donnant un 'cidre huileux' aux propriétés gustatives altérées (Puertas *et al.*, 2018). D'autres effets bénéfiques sur la santé leurs sont par ailleurs attribués, tels que la baisse du taux de cholestérol sanguin (Sasikumar *et al.*, 2017), ils sont considérés comme des prébiotiques (Tsuda et Miyamoto, 2010) et présentent des activités anti-tumorales (Wang *et al.*, 2014), anti-ulcère et immunomodulatrices (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b). Les EPS participent en effet, à la fixation des bactéries lactiques aux cellules intestinales de l'hôte, empêchant ainsi celle des bactéries pathogènes concurrentes aux cellules hôtes tout en favorisant la croissance des bactéries bénéfiques. Ce sont également des composants importants des biofilms qui aident à maintenir les cellules bactériennes à proximité les unes des autres, ce qui contribue au transfert horizontal des gènes et au développement de micro-consortiums synergiques (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006b ; Rendueles de la Vega et Díaz, 2014 ; Castro-Bravo *et al.*, 2017 ; Jiang *et al.*, 2018; Deo *et al.*, 2019).

4. Techniques de détection des exopolysaccharides

Plusieurs techniques sont utilisées dans le criblage des bactéries lactiques productrices d'EPS. Les méthodes les plus usuelles s'appuient sur l'aspect des colonies, d'autres méthodes plus élaborées font recours au criblage des gènes de production des EPS. Ci-dessous, sont décrites les techniques les plus courantes.

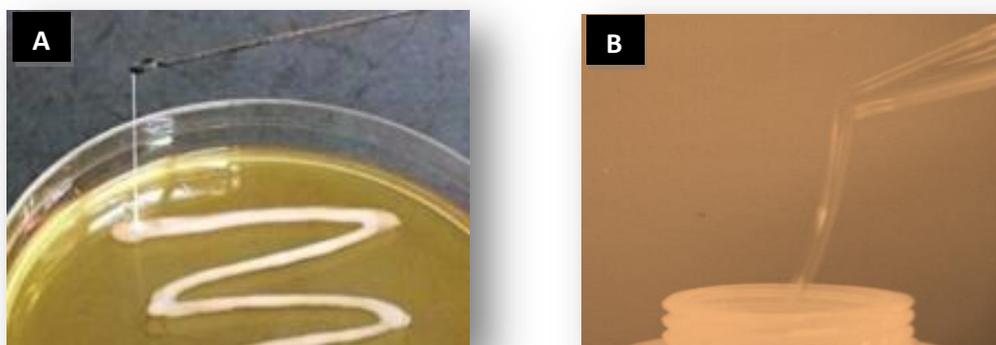


Figure 4. Aspect macroscopique d'une souche de bactérie lactique filante sur milieu MRS. (A) solide (Oleksy et Klewicka, 2018) et (B) liquide (Dimopoulou, 2013).

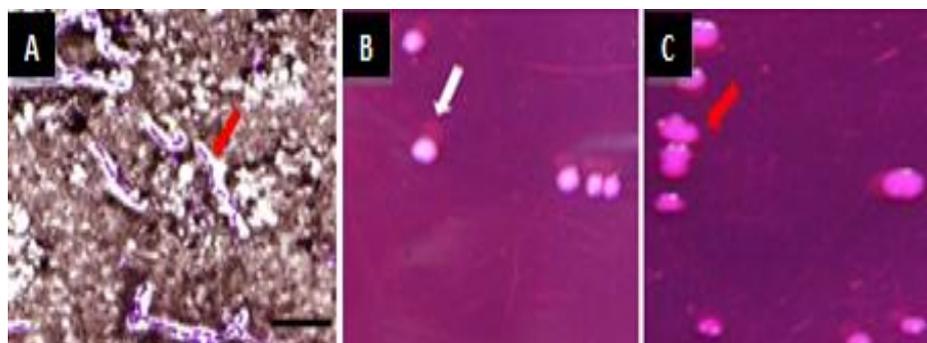


Figure 5. Détection de la production des exopolysaccharides. (A) Observation microscopique à l'encre de Chine (Yang *et al.*, 2010). (B) et (C) Colonies blanches EPS⁺ et rouges EPS⁻ sur gélose M17 au rouge ruthénium (Kang, 2014).

4.1 Sélection du phénotype producteur en milieu de culture

La croissance des souches sur gélose est souvent la méthode de choix, la plus simple, pour l'identification du phénotype producteur. Deux phénotypes existent : (i) Le phénotype filant 'ropy' forme de longs filaments lorsqu'une boucle d'inoculation est placée dans la colonie, puis lentement retirée (**figure 4A**), tandis que le second dit (ii) mucoïde apparaît plutôt sous forme de colonies larges brillantes et lisses mais ne formant pas de filaments au touché (Degeest *et al.*, 2001 ; Rühmann *et al.*, 2015 ; Zannini *et al.*, 2016). Toutefois, cette approche dans la sélection, ne permet pas de détecter des souches faiblement productrices, à moins qu'elles ne soient très filantes (Cunlei *et al.*, 2015).

La capacité de production des EPS par les bactéries lactiques peut parfois s'exprimer uniquement dans les milieux de culture liquides (Dupont, 1998), tels que l'ESM ou le mESM (*Modified Exopolysaccharides Selection Medium*), utilisés dans plusieurs méthodologies de *screening*. Les milieux fermentés positifs au test de production, présentent une résistance à l'écoulement, avec formation de brins visqueux pendant la chute libre de l'extrémité de la pipette (Van den Berg *et al.*, 1993; Ludbrook *et al.*, 1997 ; Abid *et al.*, 2018) (**figure 4B**).

La supplémentation en saccharose à des taux de 5 à 10 % (p/v) des géloses ou bouillons, pour stimuler la production des EPS, a été utilisée dans plusieurs protocoles (Van Geel-Schutten *et al.*, 1998 ; Van der Meulen *et al.*, 2007). Cette méthode permet la sélection de souches productrices d'homopolysaccharides. D'autres sucres tels que le glucose, le fructose, le galactose, ou le maltose peuvent également être additionnés au milieu de culture (Palomba *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2018).

4.2 Mise en évidence de la production des exopolysaccharides par l'utilisation de colorants

4.2.1 Par culture

L'ajout du rouge de ruthénium, un colorant cationique au milieu de culture permet de mettre en évidence une production d'EPS même si celle-ci est faible. Cette technique a été brevetée par Gancel *et al.* en 1988, et repose sur le principe que ce colorant ne présente aucune affinité pour les polysaccharides excrétés. De ce fait, les colonies des souches productrices apparaissent blanches, tandis que les souches non productrices prennent une couleur rose (Dupont, 1998) (**figure 5**).

4.2.2 Par microscopie

La technique de coloration négative à l'encre de Chine (Van der Meulen *et al.*, 2007 ; Espeche *et al.*, 2012), permet de visualiser la présence de CPS par microscopie photonique (Mozzi *et*

al., 2006 ; Costa *et al.*, 2012) , elle peut aussi être associée à une contre coloration au crystal violet (Yang *et al.*, 2010; Paulo *et al.*, 2012) (**figure 5**).

4.3 Utilisation des méthodes moléculaires

La technique moléculaire de criblage de production des homopolysaccharides et des hétéropolysaccharides utilise des amorces ciblant les gènes régulateurs, les gènes impliqués dans la détermination de la longueur de la chaîne ainsi que ceux codant les glycosyltransférases (Sanalibaba et Cakmak, 2016). Cette méthode permet un dépistage rapide des souches productrices des EPS (Provencher *et al.*, 2003; Van der Meulen *et al.*, 2007), mais elle présente des limites liées au fait que, certaines souches possèdent les gènes *eps* mais ne produisent pas de polymères (Van der Meulen *et al.*, 2007).

5. Biosynthèse des exopolysaccharides à l'échelle cellulaire

Selon le type de polysaccharide produit, il existe deux principales voies de biosynthèse qui sont différenciées par le site de synthèse extracellulaire (pour les HoPS) ou intracellulaire (pour les HePS) et la présence ou l'absence de précurseurs (Bergmaier, 2002).

5.1 Biosynthèse des homopolysaccharides

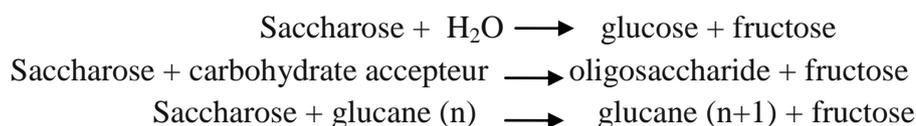
Deux mécanismes ont été décrits pour la biosynthèse des HoPS. Dans le premier cas, les homopolymères (dextrane, alternane et lévane) sont synthétisés à l'extérieur de la cellule en présence de saccharose et implique l'une de ces deux enzymes la glucansucrase (GTF) et la fructansucrase (FTF). Ces deux enzymes sont des glycosides hydrolases (GH) classées dans les familles GH68 et GH70, respectivement. Elles catalysent la polymérisation des glucanes et des fructanes, en utilisant généralement le saccharose, comme donneur du monosaccharide correspondant, et en transférant ce résidu à l'extrémité réductrice de l'HoPS en croissance (Leemhuis *et al.*, 2013 ; Ruas-madiedo, 2014 ; Malang *et al.*, 2015 ; Zeidan *et al.*, 2017) (**figure 6**).

Les glucanes sucrares responsables de la synthèse du α glucane, sont spécifiques aux bactéries lactiques, contrairement aux fructanes sucrares rencontrées chez les bactéries à Gram positif et négatif (Ruas-Madiedo *et al.*, 2009). Ces deux enzymes sont en outre produites, soit de manière constitutive comme c'est le cas chez *Streptococcus* sp., ou induites par le saccharose, cas des *Leuconostoc* sp. (Monsan *et al.*, 2001).

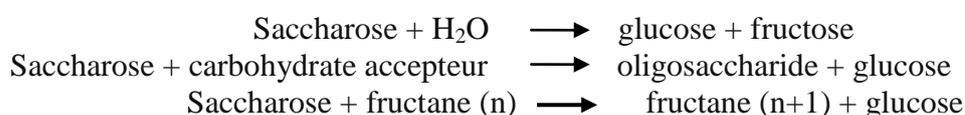
La production des HoPS n'exige pas un apport énergétique supplémentaire, car elle n'implique pas de processus de transport actif, ni d'utilisation de précurseurs de glucides activés, elle est donc indépendante du métabolisme central du carbone (Boels *et al.*, 2001). De

plus, l'énergie utilisée pour l'allongement des chaînes est fournie par l'hydrolyse du saccharose (Duboc et Mollet, 2001). Par conséquent, de grandes quantités de ce sucre peuvent facilement être converties en polymère (Harutoshi, 2013). En revanche, les variations de structure sont assez limitées pour les HoPS (Boels *et al.*, 2001).

La biosynthèse des glucanes catalysée par la GTF, peut être représentée au moyen des formules suivantes (Badel *et al.*, 2011) :



De même pour la biosynthèse des fructanes, la réaction catalysée par la FTF peut être résumée comme suit :



Un deuxième mécanisme de biosynthèse des HoPS a été également décrit, ce dernier implique une seule enzyme la glucane synthase retrouvée chez *Oenococcus oeni* et *Pediococcus damnosus* (Lapointe, 2009). Dans ce mécanisme, la formation du β -glucane ressemble plus à celle des HePS, étant donné que le polymère est synthétisé au niveau intracellulaire par une seule β -glycosyltransférase qui utilise l'UDP-glucose comme unité répétitive, puis elle effectue son exportation à l'extérieur de la cellule (Lapointe, 2009 ; Lynch *et al.*, 2018).

Il convient aussi de mentionner, que l'utilisation de l'amidon comme substrat dans la biosynthèse du α -glucane, a été mise en évidence chez des souches de *Lactobacillus reuteri* (**figure 6**). Pour la souche *Lactobacillus reuteri* 121, l'enzyme impliquée dans ce mécanisme est une glycoside hydrolase (GH70), codée par un seul gène, situé dans la région adjacente du gène de la glucansucrase qui code pour la production de reutéran à partir du saccharose (Lynch *et al.*, 2018).

5.2 Biosynthèse des Hétéropolysaccharides

La biosynthèse des HePS est plus complexe, elle combine des étapes intra- et extracellulaires impliquant plusieurs enzymes. L'unité répétitive de l'HePS est d'abord produite à l'intérieur de la cellule en utilisant des sucres nucléotidiques comme molécules précurseurs, puis elle est transloquée à travers la membrane cellulaire, polymérisée, et finalement libérée dans le milieu extérieur (Van der Meulen *et al.*, 2007) (**figure 6**).

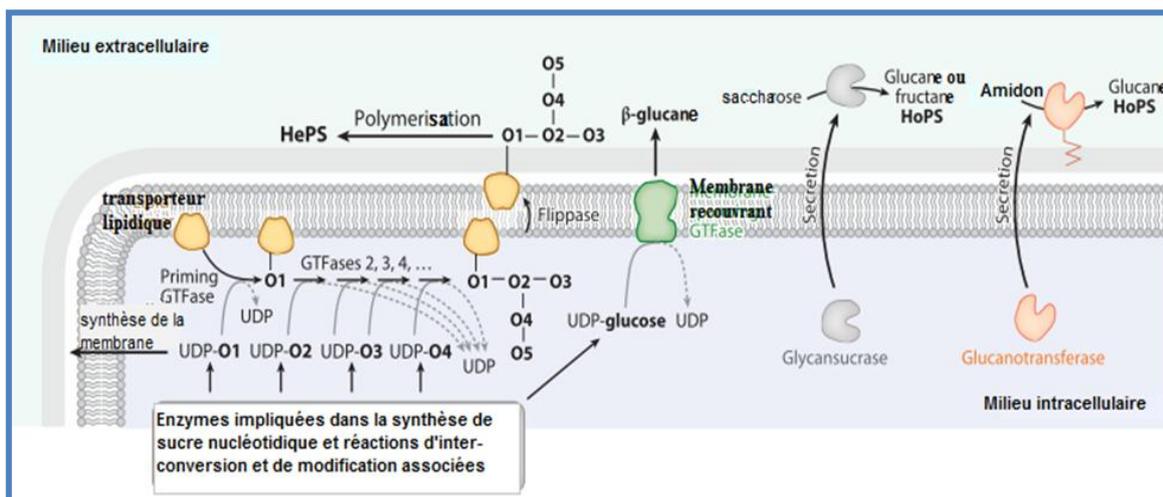


Figure 6. Mécanismes de synthèse des homopolysaccharides (HoPS) et des hétéropolysaccharides (HePS) chez les bactéries lactiques. GTFase, glycosyltransférase ; UDP, uridine diphosphate ; O1-O5, glycoside1-glycoside5 (Lynch *et al.*, 2018).

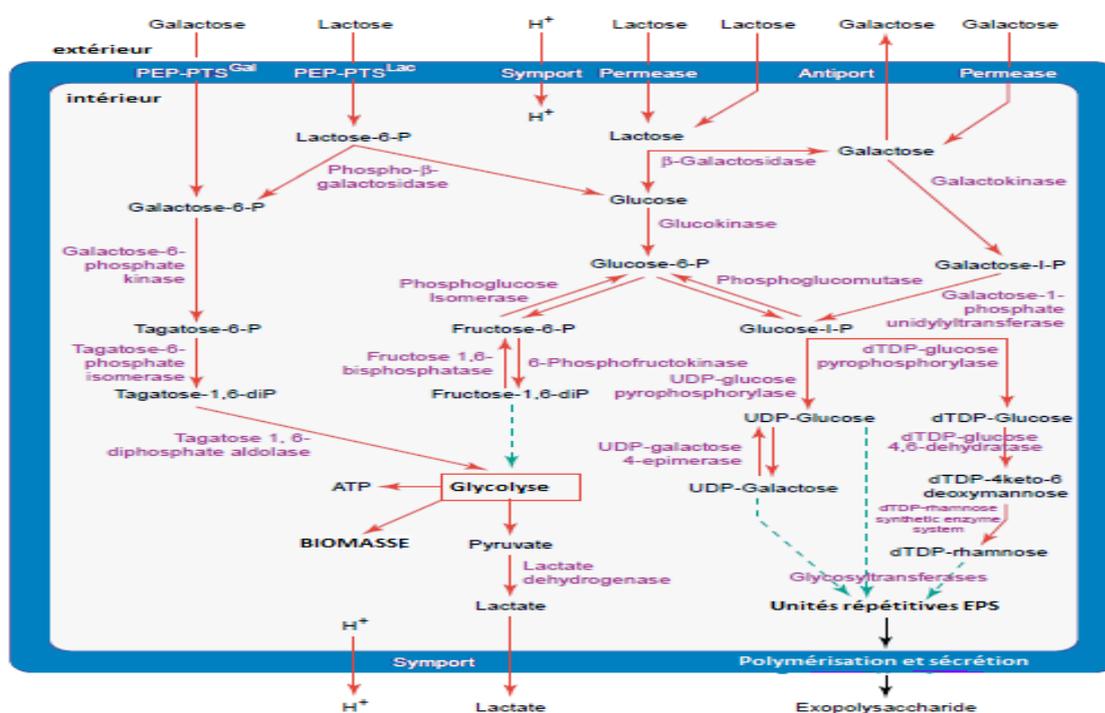


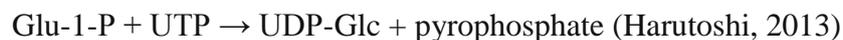
Figure 7. Schéma du métabolisme des sucres et de la biosynthèse des hétéropolysaccharides chez les bactéries lactiques (Welman et Maddox, 2003).

Durant la biosynthèse des HePS, les bactéries investissent une partie de leur énergie, soit environ 70 % (Ripari, 2019) pour : *i*) la conversion des sucres en sucres phosphate, *ii*) la synthèse des sucres nucléotidiques et *iii*) la phosphorylation de l'isoprénoïde C55 (l'undecaprényl-phosphate) qui est un transporteur lipidique (Sanalibaba et Cakmak, 2016). Cette dépense énergétique est en concurrence avec le métabolisme central du carbone, puisqu'elle utilise les mêmes réserves de sucres activés (Duboc et Mollet, 2001; Ruas-madiedo, 2014). Les étapes de biosynthèse d'HePs peuvent être résumées comme suit :

5.2.1 Biosynthèse des sucres précurseurs

Les sucres utilisés pour la biosynthèse du polymère sont déviés de la glycolyse et ceci n'est pas sans conséquence sur la croissance cellulaire et la production d'énergie par la cellule (Lapointe, 2009).

L'unité répétitive de l'EPS est synthétisée à partir de précurseurs activés, qui sont en fait des sucres nucléotidiques riches en énergie, tels que l'uridine diphosphate glucose (UDP-glucose), l'uridine diphosphate galactose (UDP-galactose) et le thymidine diphosphate rhamnose (TDP-rhamnose). Ces derniers sont synthétisés à partir du glucose 1-phosphate (selon la réaction ci-dessous), lui-même issu du glucose 6-phosphate. Ces deux formes de glucose phosphorylé font partie du métabolisme central de la bactérie (Lapointe, 2009 ; Freitas *et al.*, 2011 ; Werning, 2012).



La conversion du glucose 1-phosphate en uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) ou en désoxythymidine-diphosphate-glucose (dTDP-glucose) est catalysée, respectivement par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (GalU) et la dTDP-glucose pyrophosphorylase (Lapointe, 2009).

L'UDP-Glc est considérée comme étant la molécule clé dans la synthèse des EPS (Kumar *et al.*, 2007). Les sucres activés en l'occurrence l'UDP- glucose et le dTDP-glucose peuvent soit rejoindre le polymère en construction soit, ils sont convertis en d'autres sucres activés, comme c'est le cas du TDP-rhamnose synthétisé à partir du dTDP-glucose par la rhamnose synthase (De Vuyst *et al.*, 2001). La **figure 7** synthétise l'ensemble de ces réactions.

La synthèse des hétéropolysaccharides utilise ainsi des sucres déviés de la glycolyse, et implique un grand nombre d'enzymes d'activation, de modification et d'interconversion de sucres (épipimérisation, décarboxylation, déshydrogénation, etc.), ce qui n'est pas sans

conséquences sur la croissance cellulaire et la production d'énergie par la cellule (De Vuyst et Degeest, 1999a ; Bergmaier, 2002 ; Lapointe, 2009).

5.2.2 Assemblage des unités répétitives et sécrétion du polymère

La biosynthèse des HePS nécessite l'assemblage des sucres activés, à l'unité répétitive en croissance. Celle-ci est ancrée à un transporteur lipidique le C55 (un alcool isoprénoïde), qui facilite la formation et le transport de la chaîne glucidique à travers la membrane cellulaire. Chaque sucre provenant du sucre nucléotidique, est transféré vers l'unité répétitive avec formation de liaison glycosidique qui est catalysée par des glycosyltransférases spécifiques (GTF) (Donot *et al.*, 2012). Les sous unités répétitives sont ensuite assemblées pour former l'unité répétitive de l'hétéropolymère (Donot *et al.*, 2012 ; Mishra et Jha, 2013), qui est exportée à travers la membrane cellulaire par une enzyme de la famille des flipases (Wzx). Cette enzyme transfère les unités répétitives liées aux lipides de la face interne de la membrane cytoplasmique vers la face externe, puis la polymérisation assurée par une polymérase (Wzy) se produit à l'extérieur de la cellule générant une unité HePS finale (De Vuyst *et al.*, 2001 ; Werning, 2012 ; Silva *et al.*, 2019).

6. Biosynthèse des exopolysaccharides à l'échelle moléculaire

La synthèse des EPS est contrôlée par un ou plusieurs gènes chromosomiques ou portés par des mégaplasmides (Mishra et Jha, 2013). Dans le cas des bactéries lactiques mésophiles, les gènes codant pour les enzymes et les protéines régulatrices nécessaires à la synthèse d'EPS sont généralement plasmidiques comme chez les *Lactococcus*, alors que ceux des souches thermophiles des genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*, sont chromosomiques (Laws *et al.*, 2001).

Généralement, les groupes de gènes des EPS ont une taille de 15-20 kpb et comprennent moins de 30 gènes. Leurs séquences nucléotidiques comptent parmi les séquences les plus variables des génomes de BL. En effet, la présence fréquente des éléments génétiques mobiles et de séquences d'insertion (IS) à proximité des gènes *eps*, permet un échange génétique latéral ce qui explique la grande variabilité de cette région (Ryan *et al.*, 2015 ; Mende *et al.*, 2016 ; Zeidan *et al.*, 2017).

La synthèse des homopolymères est généralement assurée par une seule enzyme, la glucansucrase, codée par un seul gène (**figure 8A**). Seulement, la présence de deux gènes codant pour deux types de glucansucrases générant du dextrane et du lévane a été observée, chez la souche *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB-512F (Lynch *et al.*, 2018).

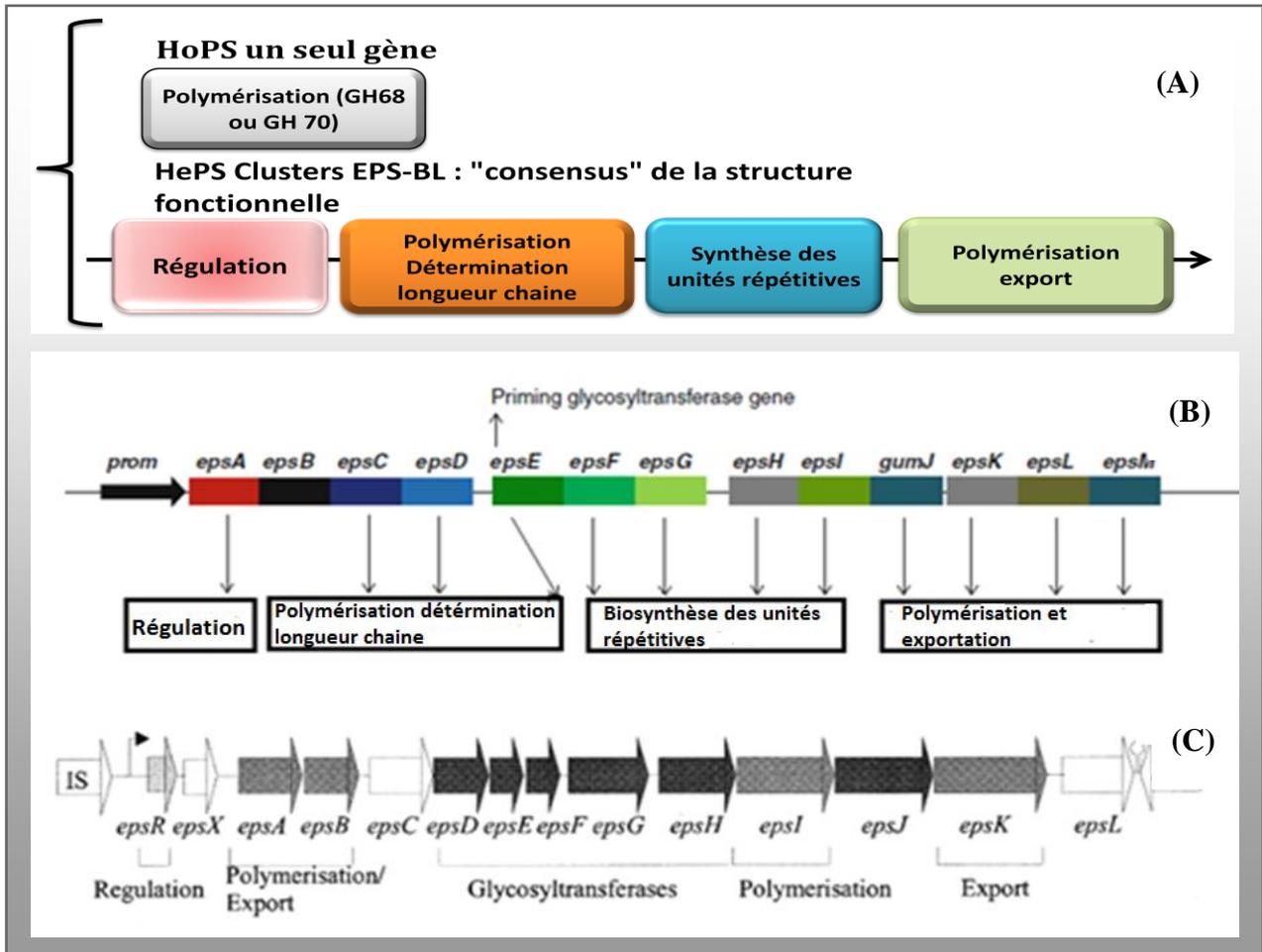


Figure 8. (A) Organisation des gènes de production des EPS (Ruas Madiedo, 2014).
 (B) gènes chromosomiques chez *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (Mishra et Jha, 2013).
 (C) gènes plasmidiques chez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 (De Vuyst et Degeest, 1999a).

Il en va de même pour la souche *Streptococcus thermophilus* ST 1275 utilisée en industrie laitière, excréant deux homopolysaccharides différents codés par les gènes *eps1C-eps1D* et *eps2C-eps2D* (Wu *et al.*, 2014).

En ce qui concerne les HePS, le nombre de gènes impliqués dans leur synthèse peut être plus ou moins important en fonction de leur complexité chimique (Kumar *et al.*, 2007). Les gènes codants les protéines de biosynthèse des HePS Wzy-dépendants sont organisés en groupes ou *clusters* avec une structure fonctionnelle conservée, et très souvent orientée dans une seule direction formant un opéron (Ruas-madiedo, 2014 ; Poulsen *et al.*, 2019). Ils sont répartis sur quatre régions (**figure 8A**) :

La première région contient les gènes régulateurs, la seconde ceux codant pour les protéines impliquées dans la détermination de la longueur de la chaîne du polymère, la troisième contient des gènes codant pour les glycosyltransferases (GTFs) spécifiquement requis pour l'assemblage de l'unité répétitive; et la quatrième inclut des gènes impliqués dans l'exportation et la polymérisation (Ruas-Madiedo *et al.*, 2009).

Les gènes codant pour la production et la sécrétion des HePS, ont été identifiés en premier chez les deux souches *Streptococcus thermophilus* Sfi6 par Stingle *et al.* (1996) et *Lactococcus lactis* NIZO B40 par Van Kranenburg (1997) (Lapointe, 2009).

Il existe également une nomenclature des gènes codant pour la biosynthèse des HePS désignée par des lettres, elle est fondée sur la fonction du gène. Elle a été adoptée pour la souche *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (**figure 8B**), dont la région *eps* présente une taille de 14,5 kpb comprenant 13 gènes chromosomiques (*eps* ABCDEFGHIJKLM), organisés au sein de quatre régions (Lapointe, 2009).

De même chez la souche *Streptococcus thermophilus* Sfi39 (**figure 8C**), quatre groupes de gènes EPS ont été caractérisés, ils sont situés sur un fragment génomique de 20 kb. Deux de ces gènes, *epsE* et *epsG*, sont responsables du type d'EPS produit, leur modification entraîne la perte du phénotype filant (Kumar *et al.*, 2007).

Dans les *clusters eps* des BL d'autres gènes ont été également identifiés, ils codent des protéines (enzymes) impliquées dans le transfert de constituants non glucidiques sur le polymère telles que les O-acétyltransferases et les pyruvyltransferases.

L'apport de l'analyse bioinformatique des séquences génomiques des BL, est d'une grande importance dans la prédiction des fonctions des groupes de gènes *eps*, ainsi que dans l'élucidation des mécanismes de leurs biosynthèse (Zeidan *et al.*, 2017).

7. Production d'exopolysaccharides

La quantité d'EPS produite par les souches lactiques varie considérablement, selon les conditions de croissance (pH, température et durée d'incubation), la composition du milieu de culture (ratio carbone/azote) et la souche productrice (Cerning, 1995 ; Mozzi *et al.*, 1995 ; Degeest *et al.*, 2001 ; Petry *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2010).

L'estimation du rendement de production est également affectée par la méthode d'extraction utilisée. Polak-Berecka *et al.* (2013), ont démontré que la méthode utilisée pour isoler l'EPS exerçait une forte influence sur la quantité finale obtenue. Mais en général à quelques exceptions près, le rendement de production des HoPS est inférieur à 1 g.L^{-1} , en conditions de culture non optimisées, et encore moins pour la majorité des HePS (Badel *et al.*, 2011 ; Werning, 2012 ; Notararigo *et al.*, 2013). Cela est dû au fait que la biosynthèse d'HePS dépend du métabolisme central du carbone contrairement à celle des HoPS (De Vuyst *et al.*, 2001 ; Lapointe, 2009 ; Wu *et al.*, 2014).

Différents niveaux de production d'EPS par les espèces de bactéries lactiques ont été rapportés, ils varient de 60 à 150 mg.L^{-1} pour la sous espèce *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 50 à 350 mg.L^{-1} pour *Streptococcus thermophilus*. Quelques rendements plus élevés ont été par ailleurs enregistrés, comme pour la souche *Lactobacillus reuteri* Lb121 produisant 10 g.L^{-1} d'HoPS et la souche *Lactobacillus rhamnosus* RW-959595M produisant jusqu'à 2775 mg.L^{-1} d'HePS (Harutoshi, 2013).

Malgré que les rendements soient relativement bas, comparativement à d'autres polymères produits par d'autres groupes bactériens, tels que le gellane ou le xanthane (rendement supérieur à 15 g.L^{-1}), les EPS de BL en plus d'être de grade alimentaire, ils influencent considérablement la rhéologie et la texture des produits alimentaires fermentés (Duboc et Mollet, 2001 ; Werning *et al.*, 2012 ; Ruas-madiedo, 2014 ; Leroy et De Vuyst, 2016). À concentration égales, ils sont plus efficaces que les polysaccharides commerciaux utilisés comme additifs alimentaires (Mende *et al.*, 2016).

Bien que l'aptitude technologique des BL de produire des EPS soit importante, le principal problème associé à leurs utilisation est l'instabilité du caractère de production (Cerning, 1995 ; De Vuyst et Degeest, 1999b ; Laws *et al.*, 2001). Chez les souches mésophiles, cela peut s'expliquer par la perte spontanée des gènes plasmidiques, suite aux transferts fréquents de cultures ou, à la prolongation de la durée d'incubation (Cerning, 1990 ; 1995 ; Lynch *et al.*, 2018). Par contre, dans le cas des souches thermophiles, les gènes *eps* sont chromosomiques, l'instabilité pourrait être due aux éléments génétiques mobiles ou aux nouveaux réarrangements génomiques produits lors des délétions (Behare *et al.*, 2009).

8. Extraction et dosage des exopolysaccharides

Divers milieux de culture ont été utilisés pour l'étude de la production des EPS par les BL, tels que le lait écrémé, le lactosérum ainsi que des milieux de culture synthétiques. Cependant l'efficacité de l'extraction du polymère repose sur l'utilisation d'un milieu de culture approprié, permettant non seulement d'obtenir des rendements de production élevés, mais assure aussi l'absence d'interférence des composants du milieu, comme l'extrait de levure, l'extrait de bœuf et la protéose peptone avec l'EPS. La mise au point d'un milieu de culture chimiquement définis ou semi définis, permet d'éviter la surestimation du polymère lors du dosage (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005 ; Leroy et De Vuyst, 2016).

D'autre part, l'extraction et la purification de l'EPS sont des opérations fastidieuses, dont la difficulté augmente avec la complexité du milieu de fermentation. Le lait écrémé est un exemple de milieu complexe contenant plusieurs composants, où l'extraction du polymère nécessite plusieurs étapes. Dans ce cas, le choix d'une méthodologie d'extraction s'avère très importante, afin d'éviter d'une part les interactions entre le polymère et les solvants utilisés et d'autre part la coprécipitation du polymère avec les protéines du lait (Cerning, 1995 ; Mende *et al.*, 2016). La **figure 9** représente un diagramme général des étapes d'extraction des EPS.

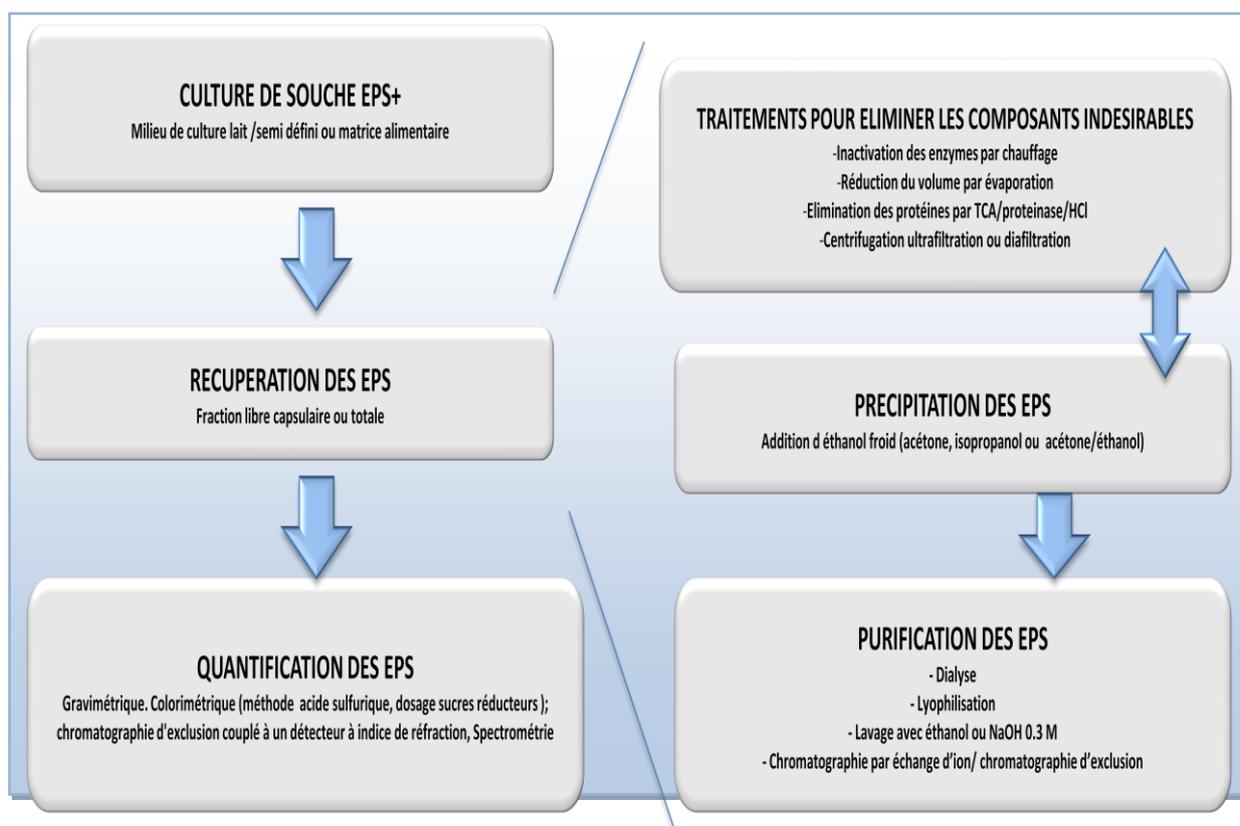


Figure 9. Diagramme d'extraction des exopolysaccharides selon Leroy et De Vuyst (2016).

Après la fermentation, l'extraction du polymère débute parfois par un traitement thermique, qui permet la dissolution du polysaccharide capsulaire fixé à la paroi cellulaire mais aussi l'inactivation des enzymes responsables de sa dégradation (Kumar *et al.*, 2007 ; Polak-Berecka *et al.*, 2013). L'extraction des EPS capsulaires, est réalisée soit par sonication du culot cellulaire ou par agitation prolongée dans du phénol ou de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) (Wang *et al.*, 2014).

Dans le cas des EPS libres, l'absence de fixation physique entre le polysaccharide et la cellule, permet l'utilisation des moyens mécaniques comme la centrifugation ou la filtration, afin d'éliminer les cellules. Le problème principal dans ce cas, est la viscosité élevée des solutions fermentées qui empêchent partiellement le dépôt des cellules (Cerning, 1990).

Après centrifugation, les EPS sont récupérés du surnageant par précipitation à l'éthanol réfrigéré, d'autres solvants organiques peuvent également être utilisés comme l'acétone, le propanol et l'isopropanol (De Vuyst *et al.*, 1998 ; Dabour *et al.*, 2005). Les polysaccharides précipités apparaissent alors sous forme de fibres, ou de flocons (Rühmann *et al.*, 2015).

Concernant les milieux de culture complexes comme le lait, l'acide trichloroacétique (TCA) est souvent employé pour la précipitation des protéines, le polymère est alors récupéré dans le surnageant après centrifugation, sa concentration par précipitation aux solvants peut être associée à son extraction (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).

Les extraits d'EPS bruts sont ensuite prépurifiés par dialyse afin d'éliminer les contaminants de faible poids moléculaire (Werning, 2012). Le rendement en EPS est enfin estimé sous forme de teneur en glucides neutres, habituellement déterminée par la méthode phénol-acide sulfurique (Dubois, 1956), ou en pondérant la matière sèche du polymère (Degeest *et al.*, 2001). Il est aussi possible d'extraire l'EPS par la méthode enzymatique en utilisant une protéase, la pronase E de *Streptomyces griseus*, mais si le traitement enzymatique est appliqué après séparation du polymère, il est plutôt considéré comme une étape de prépurification (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005 ; Lynch *et al.*, 2018).

Après lyophilisation de l'extrait d'EPS, il est souvent purifié par des techniques chromatographiques, telles que la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) ou la chromatographie d'échange d'ions pour réduire sa teneur en protéines (Werning, 2012 ; Lynch *et al.*, 2018). En effet, un degré élevé de pureté du polysaccharide est nécessaire pour déterminer sa structure au moyen de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), afin d'entreprendre des études sur son activité biologique et fonctionnelle (Ruas-madiedo, 2014).

9. Caractérisation des exopolysaccharides

Il existe une grande variété d'EPS produits par les bactéries lactiques en termes de composition chimique, configuration absolue (D ou L), configuration anomérique (α ou β), poids moléculaire, charge, présence de chaînes latérales, et rigidité des molécules (Montoya, 2019). L'analyse structurale des polysaccharides permet d'élucider leurs structures chimiques qui sont considérées comme la base de la compréhension des mécanismes de leurs synthèse et de la relation structure-fonction (Gerwig, 2018 ; Zhang *et al.*, 2018) .

En effet, en solution les propriétés physiques et rhéologiques d'un polysaccharide sont étroitement liées à sa structure tridimensionnelle. Sa caractérisation associée à l'étude de la relation structure-fonction, sont donc très utiles pour prédire son efficacité en tant qu'épaississant (De Vuyst et Degeest, 1999a).

L'analyse structurale est toutefois assez complexe, et celle des hétéropolysaccharides comparativement aux homopolysaccharides, est plus difficile en raison du faible rendement et de la difficulté de purification (Nishimura, 2018). Elle combine différentes techniques, comme les méthodes de dépolymérisation chimique, les méthodes de séparation par chromatographie telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-SM), la chromatographie d'exclusion (SEC) et la chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC ou la chromatographie par échange d'anions à haute performance (HPAEC) associées aux méthodes d'analyse instrumentale, comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire une dimension RMN 1D¹H et ¹³C et la bidimensionnelle 2D-RMN (DI *et al.*, 2018 ; Gerwig, 2018).

La **figure 10** résume le diagramme d'analyse de la structure chimique des EPS (Gerwig, 2018). Après extraction et purification du polymère, les étapes suivantes sont destinées à obtenir des oligosaccharides purs.

9.1 Dépolymérisation chimique (clivage de la liaison osidique)

La caractérisation du polysaccharide natif, nécessite d'abord sa dépolymérisation en oligosaccharides, qui peuvent ensuite être analysés par des techniques instrumentales. Pour cela, une hydrolyse est réalisée avec de l'acide trifluoroacétique (ATF), de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'acide sulfurique (H₂SO₄) (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005 ; Chen et Narbad, 2018 ; Gerwig, 2018).

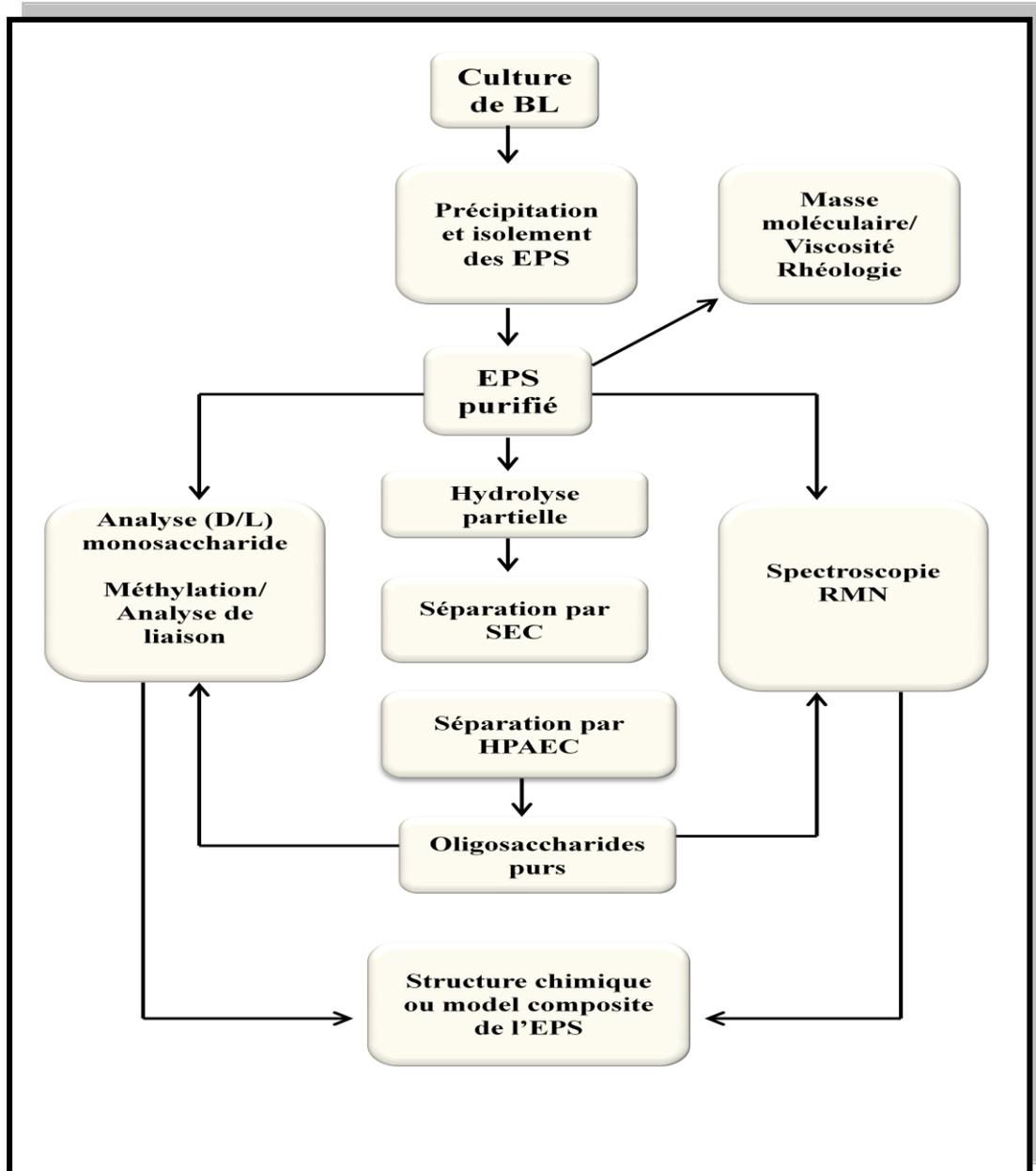


Figure 10. Etapes d'analyse structurale des polymères (Gerwig, 2018).
(SEC : Chromatographie d'exclusion stérique ; HPAEC : Chromatographie échangeuse d'anions à haute performance; RMN : spectroscopie résonance magnétique nucléaire).

9.2 Composition en monomères et types de liaisons glycosidiques

L'analyse des oligosaccharides obtenus est réalisée soit directement par chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) ou le plus souvent après dérivatisation des échantillons, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). À noter que la dérivatisation consiste à convertir les hydrolysats obtenus par l'acide trifluoroacétique en leurs acétates d'alditol correspondants par réduction au tétrahydruroborate de sodium (NaBH_4) suivie d'une acétylation (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005 ; Werning, 2012). Chaque pic du chromatogramme de la GC/MS est ensuite identifié par son temps de rétention et son spectre de masse, alors que la quantification est associée à la surface des pics. La configuration des monosaccharides D ou L est également résolue (Werning, 2012 ; Leemhuis *et al.*, 2013).

En outre, pour définir le type de liaison entre les résidus du polymère, une méthylation est généralement utilisée. Les polysaccharides méthylés sont hydrolysés par l'acide trifluoroacétique avant d'être réduits en alditols avec du sodium borodeuteride NaBD_4 , puis finalement acétylés et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) (Werning, 2012 ; DI *et al.*, 2018).

9.3 Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est une technique très avancée dans l'élucidation des structures de molécules biologiques, elle exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. C'est aussi la seule méthode non destructive permettant de déterminer toutes les caractéristiques structurales d'un polysaccharide, tels que le type de monosaccharides constitutifs, la taille du cycle, la configuration anomérique ainsi que la position des liaisons glycosidiques (Leemhuis *et al.*, 2012 ; Bajpai *et al.*, 2016 ; Lynch *et al.*, 2017 ; DI *et al.*, 2018).

Les RMN les plus couramment utilisées sont: la ^1H -NMR et la ^{13}C -NMR. La première est principalement utilisée pour caractériser les liaisons glycosidiques, tandis que la seconde, est un outil important dans l'élucidation de la structure du polymère. Elle permet de déterminer le déplacement de divers carbones, les types, les proportions, les sites de substitution et les emplacements de ramification des résidus monosaccharidiques, ainsi que les configurations et conformations des EPS (Gerwig, 2018).

La **figure 11** expose deux exemples de structures primaires de polymères de BL résolues par RMN.

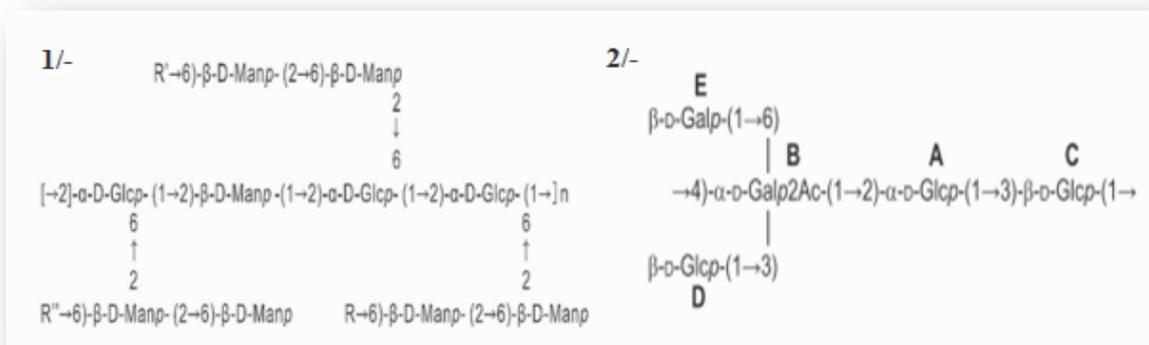


Figure 11. Exemples de structures primaires des unités répétitives résolues par RMN d'hétéropolysaccharides. (1) *Lb. plantarum* BC-25EPS ; (2) *Lb. plantarum* C88. Les lettres majuscules font références aux résidus de sucre (Fontana *et al.*, 2015).

Quelques études sur la caractérisation des polysaccharides des BL, ont en outre traité les données de la RMN *in silico* par le programme *Computer Assisted Spectrum Evaluation of Regular polysaccharides (CASPER)* (www.casper.org.se/casper) (Fontana *et al.*, 2015 ; Van Calsteren *et al.*, 2015 ; Górska *et al.*, 2016). Ce programme développé à l'origine par Jansson *et al.* (1989), a été utilisé dans la prédiction des structures de polysaccharides complexes à partir de leurs spectres RMN 1H et ^{13}C (DI *et al.*, 2018).

9.4 Analyse de la masse molaire

La capacité de l'EPS à augmenter la viscosité en solution aqueuse ou dans des produits fermentés, est généralement déterminée par les paramètres moléculaires du biopolymère, à savoir, la masse molaire (M) et le rayon de giration (Rg) (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005). La masse molaire est une indication de la longueur du polymère alors que le second paramètre définit sa taille. Seulement, la relation entre les deux, est déterminée par la rigidité de la chaîne qui dépend de la composition en monomères, du type de liaisons, des groupes chargés et du degré de ramification du polymère (Boels *et al.*, 2001).

Le poids moléculaire des polymères peut être estimé, par chromatographie d'exclusion de taille (haute performance) couplée à la détection de l'indice de réfraction (HPSEC-RI) ou, encore, à la diffusion de la lumière laser multi-angle (HPSEC-MALLS). Le principe de cette dernière technique repose sur le temps de rétention du polysaccharide élué comparativement à une gamme d'étalons appropriés. Le polymère est également fractionné et purifié durant son passage à travers la colonne (Leemhuis *et al.*, 2012 ; Notararigo *et al.*, 2013 ; Lynch *et al.*, 2018).

CHAPITRE 3. Exopolysaccharides- Matrice laitière

1. Propriétés techno-fonctionnelles des exopolysaccharides dans une matrice laitière

Beaucoup de travaux se sont intéressés aux propriétés des polysaccharides dans les matrices alimentaires, que se soit par ajout de polymères purifiés (Doleyres *et al.*, 2005 ; De Jong et van de Velde, 2007 ; Mende *et al.*, 2013), ou par sa production *in situ* lors des fermentations par des BL productrices d'EPS. En général, la présence des EPS dans les produits laitiers est surtout liée à l'amélioration des propriétés rhéologiques, ils ont en effet la capacité de lier l'eau et d'augmenter l'humidité tout en réduisant la synérèse (Hassan, 2008; Ayyash *et al.*, 2020)

En plus de ces effets, les EPS entraînent également une diminution de la perméabilité du gel au lactosérum, améliorent la fermeté, l'onctuosité et la brillance des produits laitiers fermentés (De Vuyst et Degeest, 1999b ; Schmidt *et al.*, 2016; Birch *et al.*, 2017 ; Montoya, 2019). En **figure 12** sont présentés deux laits fermentés par une culture productrice et non productrice d'EPS.

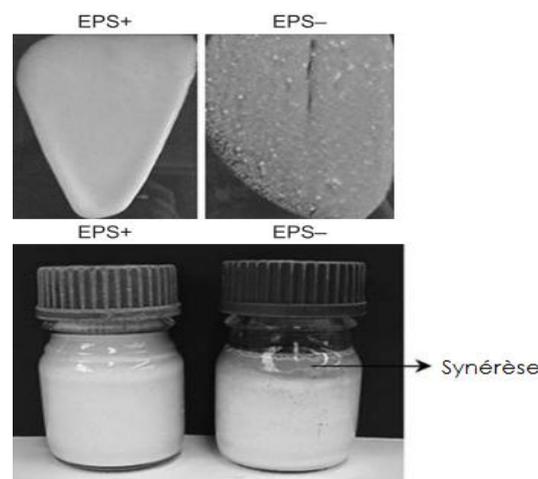


Figure 12. Lait fermenté avec deux souches de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* non productrice d'EPS- et productrice d'EPS+ (Ruas-Madiedo *et al.*, 2009).

Les propriétés techno-fonctionnelles des EPS ont été étudiées, dans de nombreuses matrices laitières telles que : les laits fermentés, les crèmes sûres, les crèmes glacées et les fromages, où les EPS ont influencé la rhéologie même à de faibles concentrations (Adapa et Schmidt, 1998 ; Badel *et al.*, 2011 ; Patel et Prajapati, 2013; Dertli *et al.*, 2016 ; Ayyash *et al.*, 2018 ; Zehir Şentürk *et al.*, 2019). Cependant, les mécanismes par lesquels les EPS agissent sur les propriétés du gel lactique ne sont pas encore entièrement élucidés, ils ont été fréquemment associés à leurs caractéristiques structurales (composition en monosaccharides, charge, masse molaire, degré de ramification, disposition spatiale et rigidité de la chaîne) ainsi qu'à leurs interactions avec les protéines du lait (Welman et Maddox, 2003 ; Mende *et al.*, 2013).

En effet, la structure du polymère notamment la longueur et la ramification de sa chaîne, influencent fortement les propriétés rhéologiques, puisqu'elles affectent sa compacité (Duboc et Mollet, 2001). En solution et à concentration égale, le volume hydrodynamique occupé par un polysaccharide linéaire, est supérieur à celui d'un polymère ramifié, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité (BeMiller, 2019).

En outre, Ruas-Madiedo *et al.* (2002a) ont démontré que la viscosité est positivement corrélée au poids moléculaire, elle est aussi plus importante lorsque le polymère possède une chaîne relativement rigide, c'est-à-dire peu mobile autour de certaines liaisons (**figure 13A**). De même Gentès *et al.* (2011a), ont soutenu que les EPS de masse moléculaire élevée avec une chaîne rigide présentant peu de branches ou ramifications, génèrent une texture crémeuse et une viscosité élevée des laits fermentés. Par contre, des EPS flexibles, fortement ramifiés de faibles poids moléculaires donnent des produits de faible viscosité.

En effet, des chaînes plus rigides caractérisent des polymères dont les monosaccharides sont liés par des liaisons β (1-4) par rapport aux liaisons α (1-4) ou β (1-3), tandis que des liens α (1-6), β (1-6), α (1-2) et β (1-2) sont les plus souples. Mais en générale, les liaisons α sont considérées comme étant plus flexibles que les liaisons β (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b ; Van de Velde *et al.*, 2015 ; Zhou *et al.*, 2019).

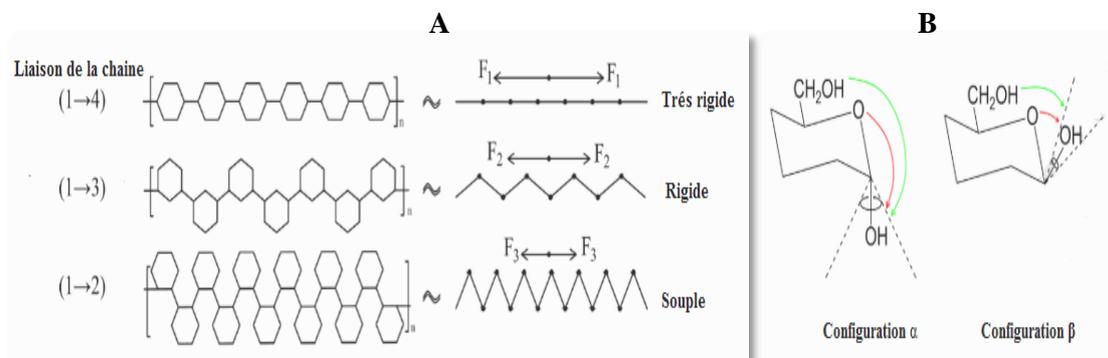


Figure 13. (A) Relation entre la structure du polysaccharide et la rigidité de la chaîne. F_1 , F_2 et F_3 indiquent les forces de résistance à la déformation. (B) Comparaison de la flexibilité des deux configurations α et β (Zhou *et al.*, 2019).

La **figure 13B** montre une comparaison entre les deux configurations α et β , les flèches rouges et vertes représentent, respectivement les forces exercées par l'atome d'oxygène adjacent et le groupe hydroxyméthyle en position para ; l'hydroxyle en configuration α reçoit une force plus faible qu'en configuration β ; les hydroxyles α sont donc caractérisés par une large gamme d'extension et une grande flexibilité (Zhou *et al.*, 2019).

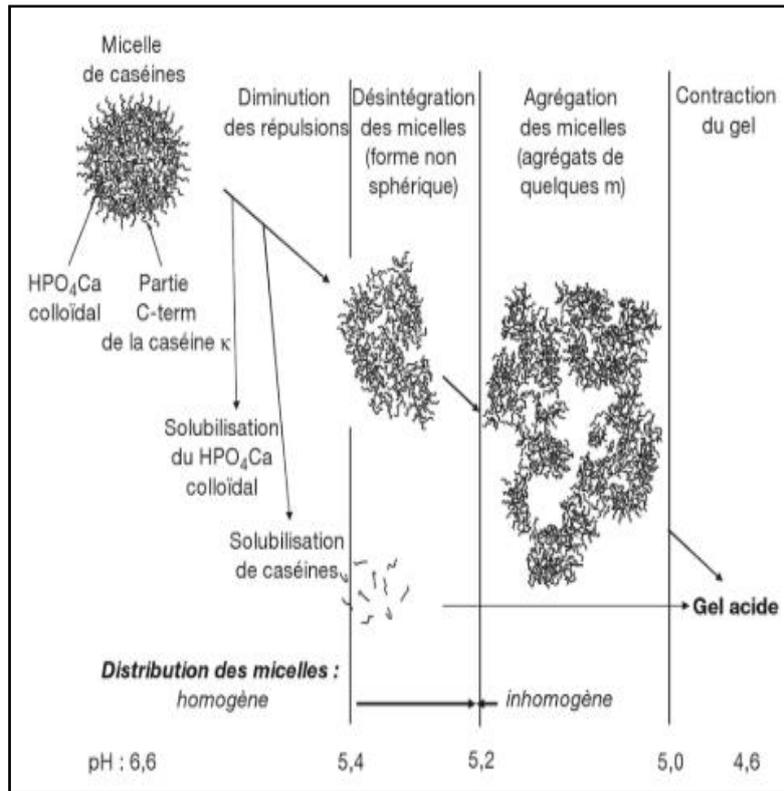


Figure 14. Modification de la structure micellaire lors de l'acidification du lait (Croguennec *et al.*, 2008).

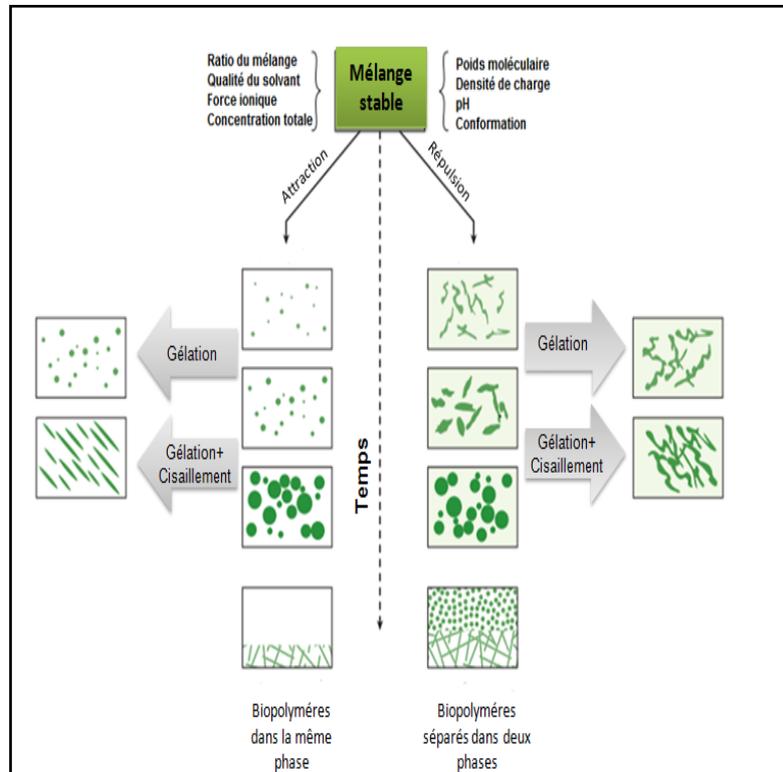


Figure 15. Représentation schématique du comportement des mélanges de protéines et de polysaccharides (Van de Velde *et al.*, 2015).

D'autres auteurs, ont essayé de corrélérer les concentrations en EPS aux viscosités, seulement la majorité d'entre eux, n'ont pas pu établir le lien entre ces deux paramètres (Welman *et al.*, 2003 ; Mende *et al.*, 2012 ; Feldmane *et al.*, 2013).

Par conséquent, l'étude des propriétés intrinsèques du polymère reste la principale approche pour une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles de ces complexes (Birch *et al.*, 2019).

2. Interactions exopolysaccharides-caséines au cours de la fermentation

Pendant la fermentation du lait par des BL productrices d'EPS, deux processus se produisent, l'acidification et la production des EPS. Il en résulte, la formation d'un réseau tridimensionnel dans lequel les interactions protéines-EPS, sont en constante évolution durant la fermentation, et sont surtout influencées par l'abaissement du pH et par l'agrégation des caséines du lait (Kristo *et al.*, 2011).

La transformation du lactose par les BL en acide lactique réduit le pH du lait, ce qui entraîne des modifications physico-chimiques importantes dans la structure des micelles de caséines (**figure 14**). Au pH naturel du lait (6,6-6,7), les caséines sont chargées négativement, puis à mesure que cette valeur diminue, leur charge négative nette est réduite graduellement. Lorsque le pH du lait passe de 6,6 à 5,0, cette acidification entraîne une réduction de la répulsion électrostatique et une solubilisation du phosphate de calcium (CCP) initialement lié aux micelles. La dissociation du CCP s'accompagne d'une déstructuration progressive des micelles de caséines qui perdent leur forme sphérique, la gélification se produit alors au pH 5,2 à 5,4, où il se forme des agrégats de quelques micromètres de diamètre. À pH inférieur à 5, les caséines solubilisées acquièrent une charge globale positive et s'agrègent pour former un réseau tridimensionnel d'amas et de chaînes de caséines reliées entre elles par des interactions hydrophobes au point isoélectrique pI 4,6 (Lucey, 2002 ; Croguennec *et al.*, 2008 ; Lee et Lucey, 2010).

La présence d'EPS dans le gel lactique formé, entraîne des interactions EPS-protéines qui peuvent être soit de nature agrégative ou ségrégative, induisant la formation de deux types de systèmes compatible et incompatible (**figure 15**) (de Jong et van de Velde, 2007 ; van de Velde *et al.*, 2015).

Les interactions attractives entre les protéines et les polysaccharides peuvent résulter d'interactions électrostatiques, de van der Waals, de liaisons hydrogène ou d'interactions hydrophobes. Cependant, la complexation entre les deux biopolymères est généralement plus

importante par les forces électrostatiques qui résultent essentiellement de la charge du polymère ou plus précisément de la densité de charge du polymère représentée par le rapport charge négative mol/ monosaccharides mol. Les interactions électrostatiques sont dépendantes de facteurs intrinsèques comme le pH, la force ionique, le ratio de biopolymère, le poids moléculaire et la charge du biopolymère et extrinsèques comme la température, la pression et le taux de cisaillement (Goh *et al.*, 2008 ; van de Velde *et al.*, 2015).

Dans une matrice laitière, les EPS neutres n'interagissent pas avec les protéines du lait fermenté, entraînant ainsi une séparation de phase (système incompatible), la structure du gel est alors en forme de réseau complexe avec de larges pores, où les EPS sont concentrés dans la phase sérique liés aux molécules d'eau par des liaisons hydrogènes (Hassan *et al.*, 2003b; Yang *et al.*, 2010 ; Costa *et al.*, 2012). Cette seconde phase présentera alors un comportement rhéologique ressemblant à celui d'un polymère, en augmentant la consistance et la viscosité du produit (Lynch *et al.*, 2018).

En revanche, les EPS anioniques s'associent par des interactions électrostatiques aux caséines chargées positivement, au $\text{pH} \leq \text{pI}$ (4,6). Dans ce système compatible, l'EPS chargé négativement est en fait, adsorbé sur la caséine chargée positivement (van de Velde *et al.*, 2015). Cela a été démontré par Ayala-Hernandez *et al.* (2008) pour la souche *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1, où le polymère a été visualisé par microscopie électronique à balayage, sous forme de filaments attachés aux agrégats de protéines et aux cellules bactériennes (**figure 16**). Les gels formés sont de ce fait, plus fermes et plus visqueux comme cela a été rapporté par Oleksy et Klewicka (2018) pour la souche *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2104.

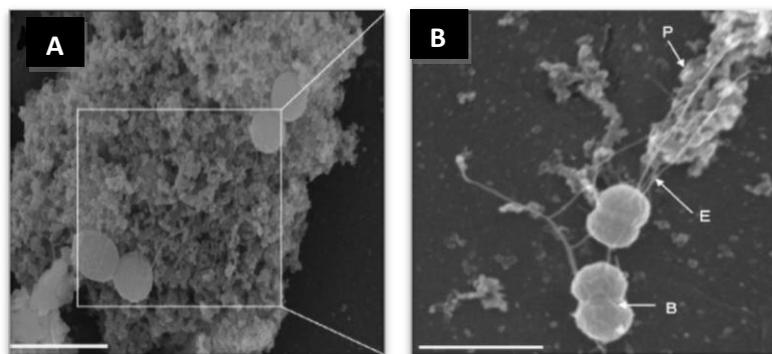


Figure 16. Micrographies par microscopie électronique à balayage de la microstructure de beurre fermenté par une souche productrice d'EPS anionique. B, bactérie ; P, protéine ; E, EPS. (A) barre d'échelle 1500 nm, (B) 3000 nm (Ayala-Hernandez *et al.*, 2008).

3. Rhéologie des gels lactiques contenant des exopolysaccharides

La rhéologie alimentaire est l'étude de la déformation et de l'écoulement des matériaux, sous l'effet d'une contrainte appliquée. Les aliments sont des mélanges complexes de composés biochimiques qui présentent une grande variation de composition et de structure. Par conséquent, l'étude de leurs propriétés rhéologiques est importante pour la transformation, le contrôle de la qualité et l'évaluation sensorielle (Rao, 2014).

Les aliments présentent deux types d'écoulement rhéologiques, newtoniens et non newtonien. Dans le premier type, la viscosité est constante indépendamment du cisaillement appliqué, la relation est donc linéaire entre la contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement avec un tracé qui commence à l'origine. Les aliments ayant un comportement newtoniens sont ceux qui contiennent des composés de faible poids moléculaire et qui ne contiennent pas de grandes concentrations de polymères dissous ou de solides insolubles comme par exemple : les huiles comestibles, les jus filtrés et le lait (Rao, 2014).

Par contre, dans le second type, la fonction n'est pas linéaire du fait que la viscosité varie selon la contrainte de cisaillement. La plupart des aliments présentent un comportement rhéologique dépendant du cisaillement (BeMiller, 2019 ; Tan, 2019).

Dans un système protéines-polysaccharides comme les gels lactiques, il est essentiel de déterminer les propriétés rhéologiques pour comprendre la nature des interactions et la microstructure qui en résulte (Goh *et al.*, 2008). La viscosité est une grandeur physique très importante dans la caractérisation du comportement rhéologique, elle représente la friction interne du matériau, c'est-à-dire sa tendance à résister à l'écoulement sous l'effet d'une force appliquée (BeMiller, 2019). Sa mesure est réalisée par des viscosimètres rotatifs ou capillaires s'il s'agit de liquides, et par des rhéomètres pour des échantillons solides en appliquant un cisaillement afin d'étudier leurs propriétés d'écoulement.

La viscosité est alors calculée par le rapport entre la contrainte de cisaillement appliquée et le taux de cisaillement.

$$\text{Viscosité apparente} = \frac{\text{Contrainte de cisaillement}}{\text{Taux de cisaillement}}$$

Où :

- La contrainte de cisaillement (*shear stress*) est la force appliquée par unité de surface son unité est le Pascal (Pa) ;
- Le taux de cisaillement (*Shear rate*) est la vitesse à laquelle le liquide s'écoule, il est exprimé en s^{-1} . L'unité de base du système international (SI) de la viscosité d'une solution, est le Pascal.seconde ou encore le milliPascal.seconde (mPa.s) (BeMiller, 2019).

Pour des fluides non newtonien, lorsque la viscosité diminue suite à l'augmentation du taux de cisaillement le comportement est dit rhéofluidifiant ou pseudoplastique, il se caractérise par un amincissement au cisaillement (*shear thinning*) (Rao, 2014). Ce phénomène peut s'expliquer en supposant que le fluide est constitué de grandes chaînes moléculaires qui s'alignent progressivement dans la direction de la force de cisaillement, ce qui leur permet de glisser les unes sur les autres, entraînant une diminution de la résistance à l'écoulement (Tan, 2019).

Lorsque ce comportement est étudié sur une large gamme de taux de cisaillement, il présente trois phases. À faibles taux de cisaillement, le fluide présente des propriétés newtoniennes avec une viscosité constante (η_0) sur un intervalle de cisaillement limitée, suivi d'un second intervalle d'amincissement par cisaillement où la viscosité de la solution diminue selon la loi de puissance (*power law*). À des taux de cisaillement élevés, il présente une viscosité limite et constante à l'infini (η_∞) (Rao, 1999) (**figure 17**).

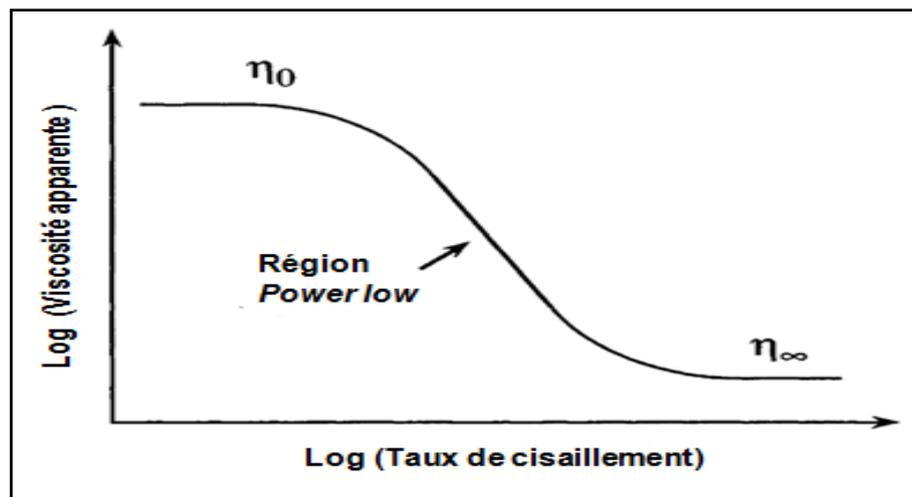


Figure 17. Evolution de la viscosité apparente en fonction du taux de cisaillement pour un fluide pseudoplastique identifiant trois régions distinctes : Une viscosité η_0 à faible taux de cisaillement, une région de loi de puissance à taux de cisaillement intermédiaire, et une viscosité η_∞ à taux de cisaillement élevé (Rao, 2014).

La loi de puissance ou loi d'Ostwald-de Waele permet de modéliser un fluide non newtonien sans seuil, elle est donnée par la formule qui suit :

$$\tau = K\gamma^n$$

Où : τ est la contrainte de cisaillement (Pa), K est l'indice de consistance (Pa s^n), γ est la vitesse de cisaillement (s^{-1}) et n l'indice d'écoulement (sans dimension).

Si $0 < n < 1$ le fluide est pseudoplastique, plus sa valeur est faible, plus les caractéristiques d'écoulement s'écartent de celles d'un fluide newtonien pour lequel $n = 1$.

En revanche, si $n > 1$, le fluide est dit rhéoépaississant ou dilatant, dans ce cas, la viscosité augmente avec le taux de cisaillement (Stanbury *et al.*, 2017 ; Tan, 2019).

Le gel lactique est classé comme un matériau pseudoplastique, il a une structure en réseau tridimensionnel qui possède les propriétés élastiques d'un solide par sa résistance aux contraintes appliquées, alors que sa phase sérique emprisonnée dans les mailles du réseau présente des propriétés visqueuses d'un liquide en étant moins rigide (Lee et Lucey, 2010 ; BeMiller, 2019). Si le gel est brassé comme par exemple un yaourt à boire, il est considéré comme un fluide viscoélastique ; s'il est ferme (non brassé), c'est un solide viscoélastique (Lee et Lucey, 2010). Selon Zheng (2019), les propriétés viscoélastiques sont caractéristiques des matériaux ayant un comportement rhéologique dépendant du cisaillement (*shear-dependent*), où la relation entre le taux de cisaillement et la contrainte n'est pas linéaire, ce qui implique donc le comportement pseudoplastique.

Lors du cisaillement l'écoulement est différent selon que le gel lactique contient ou non des EPS produits par des cultures texturantes. Hess *et al.* (1997) ont suggéré que dans un gel ne contenant pas de polysaccharides, les interactions présentes dans le réseau sont essentiellement entre les micelles de caséines, l'énergie nécessaire pour rompre ces interactions est donc équivalente pour toutes les liaisons. Cependant, dans un gel contenant des EPS, outre les interactions entre les caséines, il existe également des interactions EPS-protéines qui nécessitent plus d'énergie pour se rompre que celles entre les caséines, ce qui explique la capacité de ces gels à résister à la déstructuration et leur viscosité plus importante comparativement aux gels ne contenant pas de polysaccharides.

Selon Goh *et al.* (2008), les polysaccharides ont généralement un pouvoir viscosifiant significativement plus important que celui des protéines, car leurs molécules sont beaucoup plus grandes et plus étendues ($5,0 \times 10^5 - 2,0 \times 10^6$ Da) que celles des protéines ($1,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$ Da). Par conséquent, ils occupent des volumes hydrodynamiques plus importants, ce qui donne lieu à une viscosité plus élevée du gel.

Les travaux scientifiques réalisés sur le comportement rhéologique des matrices laitières contenant des polysaccharides (anionique, neutre, d'origine végétale ou bactérienne), ont tous conclu que l'incorporation ou la production *in situ* des polysaccharides améliorerait significativement les propriétés rhéologiques des gels obtenus (Sanchez *et al.*, 2000 ; Bertrand et Turgeon, 2007 ; de Jong et van de Velde, 2007; Arfaoui, 2014; Kazazi *et al.*, 2017; Ripari, 2019). Les données rhéologiques peuvent être donc corrélées aux propriétés intrinsèques des polysaccharides et leurs interactions avec les protéines du lait, en vue de les exploiter dans la formulation de nouveaux produits laitiers allégés (Yousefi et Jafari, 2019).

MATERIEL ET METHODES

1. Recherche de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides

1.1 Lieu de l'étude expérimentale

La réalisation du travail expérimental a été hébergée par trois entités de recherche :

- Les isollements et la caractérisation phénétique des souches lactiques ont été réalisés au niveau des laboratoires de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), et Alimentation, Nutrition et Santé (ALNUTS) situés au sein de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro- Alimentaires (INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1) ;
- La caractérisation moléculaire des souches lactiques et l'analyse de leurs exopolysaccharides (EPS), ont été réalisées à l'Institut des Produits Laitiers relevant du Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique Espagnol (IPLA-CSIC, Asturias).

1.2 Nature et origine des échantillons

1.2.1 Présentation des produits laitiers fermentés utilisés

Les isollements réalisés dans le cadre de cette étude ont été effectués, à partir de produits laitiers fermentés. Une brève présentation des échantillons, est donnée dans ce qui suit :

- *Raïb*

Le « *Raïb* » est obtenu par fermentation spontanée des laits de vache ou de chamelle au laboratoire, à température ambiante pendant 24 à 72 h pour le premier lait et 10 à 15 jours pour le second.

- **Matières grasses**

Le beurre fermier « *Zebda* » est extrait après barattage mécanique (baratte en inox) et écrémage à froid du lait fermenté.

Le « *Smen* ou *Dhan* » est obtenu après élimination d'eau par cuisson et salage du beurre. L'échantillon utilisé contenait également de l'armoise blanche, rajoutée en fin de préparation afin d'allonger sa durée de conservation.

- **Fromages**

La « *Klila* » est un fromage préparé à partir de *Lben*, l'échantillon est sous forme fraîche.

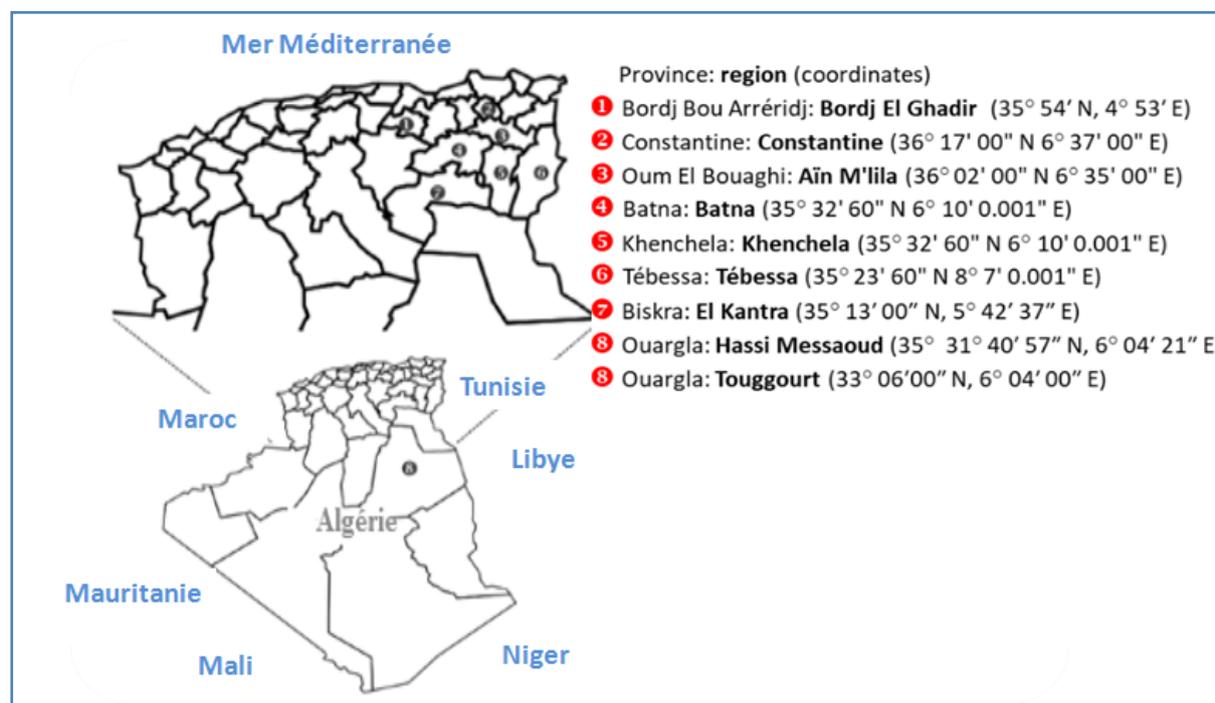
Le « *Bouhezza* » est un fromage affiné fabriqué par fermentation essentiellement lactique, les échantillons sont de deux types avec et sans rajout de piment rouge.

Le « *Takammart* » est un fromage à coagulation enzymatique, l'échantillon est sous forme sèche.

Tableau 5. Nature et origine des échantillons.

Détails Produits	Nombre d'échantillons	Espèce animale	Régions	Provenance	Durée fermentation
Lait^a	6	Bovin	Bordj El Ghadir	Ferme	1 jour
	6	Caprin	Tebessa	Ferme	1 jour
	2	Caprin	Touggourt	Ménage	1 jour
	1	Camelin	Hassi Messaoud	Eleveur	15 jours
	1	Camelin	Ain Mlila	Nomade	10 jours
Lben	4	Bovin	Constantine	Point de vente	1 jour
Klila fraîche	2	Bovin	Batna	Ménage	10 jours
Bouhezza	3	Bovin	Batna, Khenchela	Point de vente	ND
	1 ^b				
Takammart sec	1	Caprin	Touggourt	Ménage	> 60 jours
Beurre (zebda)	1	Bovin	Constantine	Point de vente	2 jours
Smen^c	2	Ovin	El Kantra	Ménage	60 jours

ND : non déterminé ; (^a) transformé par fermentation spontanée au laboratoire; (^b) contient du piment rouge ; (^c) contient de l'armoise blanche.



2

Figure 18. Emplacement géographique de l'échantillonnage des produits laitiers utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques productrices d'EPS (à droite coordonnées géographiques).

1.2.2 Conditions de prélèvement

La collecte des échantillons s'est étalée sur trois années de 2015 à 2017, pendant la période de forte lactation (mars-juin). Les 30 échantillons obtenus sont répartis selon leur nature comme suit : lait (16), *lben* (4), fromages (7), beurre fermier (1) et *Smen* (2) (**tableau 5**). Ces derniers, sont issus de différentes régions géographiques, situées à l'Est et au Sud-Est de l'Algérie (**figure 18**). Ce choix de diversification par nature et par origine géographique, visait à optimiser nos chances d'obtenir des souches productrices d'EPS intéressantes pour des fermentations laitières.

Les volumes d'échantillons liquides (lait et *lben*) prélevés étaient de 250 mL, après identification, ils sont acheminés, vers le laboratoire à 4°C pour analyse. Seuls les échantillons provenant de Hassi Messaoud, ont été congelés en raison de l'éloignement de cette région.

Concernant la collecte d'échantillons solides (fromages et matière grasse), environ 100 g de produit sont prélevés et conservés à 4°C jusqu'à leurs analyse.

1.3 Isolement et purification des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques mésophiles est réalisé sur les géloses MRS (Man, Rogoza et Sharpe), M17 et Mayeux (MSE). Leur composition est donnée en **annexe 1**. Les échantillons sont analysés différemment selon leur nature (Guiraud, 2003).

- Pour les laits fermentés et les fromages, le citrate de sodium à 2 % (p/v) est utilisé comme diluant pour la préparation de la solution mère, à raison de 10 g de produit pour 90 mL de diluant. La solution Ringer ¼ est utilisée pour la préparation des différentes dilutions.

L'ensemencement de la gélose MRS ajustée à pH $6,2 \pm 0,2$ par 1 mL et 0,1 mL, des dilutions (10^{-5} - 10^{-8}) s'est fait en profondeur pour l'isolement du genre *Lactobacillus* et en surface pour le genre *Pediococcus*, respectivement.

La gélose M17 ajustée à pH $7,1 \pm 0,2$ estensemencée en surface par 0,1 mL, des dilutions (10^{-5} - 10^{-8}) pour l'isolement des genres *Streptococcus* et *Lactococcus*.

La gélose MSE ajustée à pH $6,2 \pm 0,2$ estensemencée en surface par 0,1 mL, des dilutions (10^{-5} - 10^{-8}) pour l'isolement du genre *Leuconostoc*.

- Pour les échantillons de *Smen* et de beurre fermier, des prélèvements de 2,5 g sont réalisés, puis additionnés de 2,1 mL de la solution de Ringer au ¼. Les mélanges sont placés dans un bain-marie (Julabo, GmbH) réglé à 45°C, pour la fusion du produit. Après homogénéisation, le mélange est conservé jusqu'à séparation des deux phases. Récupération de la phase aqueuse

puis préparation des dilutions. Inoculation des dilutions 10^{-3} à 10^{-5} comme précédemment décrit.

L'incubation des cultures est réalisée à 30°C en aérobiose, pendant 48 à 72 h. Seul le genre *Lactobacillus*, est incubé en anaérobiose.

La purification des souches est réalisée en surface dans les mêmes conditions de culture.

1.4 Tests d'appartenance au groupe lactique

Sur la base des premiers critères de classification des bactéries lactiques établis par Orla Jensen (1924), deux tests sont retenus afin de vérifier l'appartenance des isolats obtenus au groupe lactique.

1.4.1 Recherche de la catalase

Elle est mise en évidence par contact de la souche à tester avec une solution fraîche d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes. Un dégagement d'oxygène abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Guiraud, 2003).

1.4.2 Caractérisation morphologique des cellules et de leurs colonies

- Macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies (taille, forme, opacité, couleur ou pigmentation, consistance) est déterminé après croissance en surface à 30°C pendant 48 jusqu'à 72 h, sur leurs milieux de culture solides à l'aide d'une loupe binoculaire (Motic) au grossissement $\times 20$ (Joffin et Leyral, 2006).

La croissance est également appréciée sur bouillon MRS après 18 heures d'incubation à 30°C, une centrifugation à $10\ 000 \times g$ pendant 10 min à 4°C permet d'observer l'aspect du culot des cellules bactériennes (Cirrincione *et al.*, 2018).

- Microscopique

Elle est révélée par la coloration différentielle de Gram (Gram, 1884). La technique permet successivement de faire la différenciation entre le Gram positif et le Gram négatif, la forme et l'arrangement cellulaire. Les lames sont observées à l'immersion au microscope photonique de marque Leica DM 1000 LED muni d'une camera numérique Leica EC3.

Les bactéries en forme de bâtonnets ou coques à Gram positif et catalase négative sont retenues et considérées comme bactéries lactiques présomptives.

Une coloration à l'encre de Chine a été également appliquée pour la visualisation des polymères autour des cellules bactériennes.

1.5 Recherche des souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides

La recherche du caractère de production d'exopolysaccharides (EPS) a nécessité l'emploi de quatre méthodes :

- Sur gélose MRS à 2 % (p/v) de glucose, après ensemencement et incubation à 30°C pendant 48 h. La recherche du phénotype visqueux se fait en touchant la colonie par l'anse de platine, de longs filaments de plus de 5 mm visqueux se forment dans le cas d'une production de polymère. Un autre phénotype producteur existe aussi, il se présente sous forme de colonies mucoïdes ayant une apparence luisante mais ne produisant pas de filaments. Ces isolats ont été également retenus (Lapointe, 2009).

- Sur gélose MRS à 5 % (p/v) de saccharose, l'addition de ce sucre au milieu de culture permet de sélectionner les souches produisant des homopolysaccharides (van Geel-Schutten *et al.*, 1998). Les isolats producteurs après incubation à 30°C pendant 48 h, se présentent sous forme de colonies visqueuses de grande taille, ils sont ensuite classés en fonction de leur aspect macroscopique (compact, crémeux ou filant) (Herrero *et al.*, 1996 ; Van der Meulen *et al.*, 2007; Joshi et Kojam, 2014).

- Sur bouillon ESM (EPS *selection medium*, composition en **annexe 1**) inoculé à 1% par une culture de 18 h de la souche à tester. Après une incubation à 30°C pendant 24 h, le caractère filant est recherché tel que décrit par Vedamuthu et Neville (1986), par la résistance à l'écoulement et la formation de longs filaments au cours de la chute libre de 1mL de la culture à travers la pipette sérologique (van den Berg *et al.*, 1993; Paulo *et al.*, 2012).

- Le criblage des isolats producteurs d'EPS, est également réalisé en ajoutant des colorants cationiques comme le rouge ruthénium à 0,08 % (p/v) à la gélose MRS ou M17. Les colonies productrices apparaissent blanches sur un fond rose, en raison du masquage de la coloration par les exopolysaccharides produits (Pham *et al.*, 2000 ; Dabour *et al.*, 2005; Joshi et Kojam, 2014).

1.6 Conservation des isolats

1.6.1 Courte durée

Les souches productrices des EPS sont cultivées sur gélose inclinée en tube. Après une incubation à 30°C pendant 24 à 48 h, les tubes sont conservés à 4°C pour une courte durée d'utilisation inférieure à 15 jours.

1.6.2 Longue durée

- Congélation

Les cellules bactériennes sont récupérées, à partir de 10 mL d'une culture sur bouillon MRS de 18 h par centrifugation à $15\,778 \times g$, pendant 10 min à 4°C. Une fois le surnageant éliminé, les cellules sont lavées par le tampon phosphate salin (PBS, composition en **annexe 1**) stérile à pH 7,4, puis 1,5 mL de bouillon MRS stérile est ajouté comme milieu de conservation additionné de 30% (v/v) de glycérol stérile. Les cultures ainsi préparées sont conservées à -20°C et - 80°C (Denis *et al.*, 2006).

- Lyophilisation

Les isolats retenus sont également lyophilisés. La technique consiste à éliminer l'eau, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide (Coulibaly *et al.*, 2011).

Les cellules bactériennes sont obtenues comme précédemment décrit, elles sont ensuite resuspendues dans du lait écrémé reconstitué à 10% (p/v) stérile. Les suspensions bactériennes sont disposées dans des vials et lyophilisées durant 3 jours à -83°C et à une pression de 1 mBar dans un lyophilisateur Freeze mobile 12EL (VirTis, Gardiner NY, USA).

2. Caractérisation physiologique et biochimique des souches sélectionnées

Les souches sélectionnées ont fait l'objet d'une caractérisation physiologique et biochimique, selon les clés dichotomiques proposées par Johnson *et al.* (1980), Bourgeois et Larpent (1996), De Roissard et Luquet (1994), Guiraud (2003) et Holzapfel et Wood (2014).

2.1 Type fermentaire

Il est déterminé en utilisant le bouillon MRS muni d'une cloche de Durham. Le bouillon est ensemencé par la souche à tester, puis incubé à 30°C durant 48 h. Ce test permet de classer les espèces en homo ou hétérofermentaire sur la base de la production de CO₂ dans la cloche à partir de glucose.

2.2 Température de développement

Deux tubes de bouillon MRS sont inoculés par souche à tester, le premier est incubé à 45°C pendant 24 à 48 h et le second à 15°C durant 1 à 2 semaines. Pour les coques l'incubation est réalisée à 37°C. La croissance est notée positive lorsque la densité optique (DO) est supérieure à 0,1 (Acedo-Félix et Pérez-Martínez, 2003).

2.3 Thermorésistance

La thermorésistance est étudiée sur bouillon MRS pour les bacilles par deux tests effectués, le premier à 60°C pendant 90 min, l'autre à 65°C pendant 30 min. Pour les coques isolés du MSE, la thermorésistance est testée à 55°C pendant 15 min.

2.4 Croissance en présence de NaCl

Un bouillon MRS préparé à 6,5% (p/v) de NaCl est inoculé par la souche à tester puis incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours.

2.5 Croissance à pH 3,9

Elle est testée pour les lactobacilles à 30°C sur bouillon MRS ajusté avec du HCl à pH 3,9.

2.6 Production d'H₂S

La production d'H₂S est recherchée sur la gélose *Triple Sugar Iron* (TSI), qui après fermentation forme un précipité noir avec les sels de fer. Ce milieu permet également la mise en évidence de l'utilisation du glucose, du saccharose et/ou du lactose ainsi que la production de CO₂ après fermentation.

2.7 Utilisation du citrate

Elle est testée sur gélose Citrate de Simmons, ce milieu ne contient que du citrate qui est la seule source d'énergie disponible pour la croissance de la bactérie.

2.8 Mobilité

L'étude de la mobilité est réalisée par examen à l'état frais et sur gélose mannitol-mobilité. Ce milieu permet aussi de tester l'utilisation du mannitol.

2.9 Etude du métabolisme glucidique

L'étude du métabolisme des hydrates de carbones (49 sucres) est réalisée par l'emploi des galeries API50 CHL (bioMérieux, France). Par manque de galerie API50 CHL, ce test a été réalisé uniquement pour les souches retenues lors de la seconde sélection.

Une suspension dense est préparée en inoculant 2 mL d'eau distillée stérile, par plusieurs colonies de la souche à tester. A partir de cette suspension dense, est prélevé un nombre 'n' de gouttes dans 5 mL du medium API 50CHL, jusqu'à atteinte d'une absorbance de 0,45 à 600 nm (soit 2 Mc Farland). Puis de cette deuxième solution, sont transférées (2 × n) gouttes dans 5 mL de milieu API50 CHL. Celui-ci est réparti dans les cupules, de l'huile de paraffine stérile est rajoutée pour tous les tests (Delarras, 2014).

La galerie humidifiée (par l'addition d'eau distillée dans le fond du couvercle) est incubée à 30°C, une première lecture est effectuée à 24 h puis une seconde à 48 h. L'analyse du profil biochimique est réalisée par le logiciel de Joffin (2011) téléchargeable sur le lien : http://www.techmicrobio.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=149&Itemid=191.

En raison des fortes similitudes entre les profils de fermentation des sucres chez les BL, la distinction entre les souches appartenant au même genre et souvent à la même espèce, est très difficile par les méthodes classiques. Le recours aux techniques moléculaires, est donc plus qu'indispensable, afin de les caractériser au rang espèce (Klijn *et al.*, 1991).

3. Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées

3.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des souches productrices d'exopolysaccharides, a été réalisée par l'emploi du kit GenElute (Sigma-Aldrich), en suivant les instructions du fabricant. Une étape supplémentaire de lyse cellulaire enzymatique est rajoutée au protocole par l'emploi du lysozyme (45 mg/mL, Merck), de la protéinase K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) et de la mutanolysine (5U, Sigma-Aldrich).

Les souches bactériennes sont mises en culture dans 10 mL le bouillon MRS pendant 18 h à 30°C. Un volume de 1,5 mL de chaque culture est centrifugé à 12 000 × g pendant 2 min, puis le culot cellulaire est lavé par du tampon phosphate salin (PBS). La lyse de la paroi bactérienne est réalisée en resuspendant le culot bactérien dans 200 µL de lysozyme additionné de 0,5 µL de mutanolysine. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C. Le lysozyme et la mutanolysine sont responsables de l'hydrolyse du peptidoglycane, un constituant de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif. Les protéines associées à l'ADN sont ensuite digérées en incubant la suspension bactérienne à 55°C pendant 10 min, en présence de 20 µL de la protéinase K (20 mg/mL) et 200 µL de la solution de lyse C (fournie avec le kit). L'ADN génomique est précipité par 200 µL d'éthanol absolu, puis purifié par des lavages successifs sur des colonnes en silice fournies avec le kit, puis enfin élué par de l'eau de qualité biologie moléculaire (Sigma-Aldrich) avant d'être conservé à -20°C jusqu'à manipulation.

3.2 Migration des ADN extraits par électrophorèse

Afin de vérifier l'efficacité de l'extraction, l'ADN génomique extrait est soumis à une migration dans un gel d'agarose à 1% (p/v) (**annexe 2**), sous un voltage de 120V pendant 35min dans une cuve d'électrophorèse horizontale Bio-Rad. La migration est réalisée dans

une solution tampon tris acétate éthylène diamine tétraacétique 1X (TAE 1X, **annexe 2**), préparée par dilution de la solution mère à 50X [40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA à pH 8)].

Dans le premier puits du gel, sont déposés 4 µL du marqueur de taille (*DNA Ladder* 1kb). Les puits suivants reçoivent chacun 5 µL d'ADN mélangés à 1 µL du tampon de charge 6X (composition en **annexe 2**). Après migration, le gel est placé dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) pendant 15 min. La visualisation, l'enregistrement et l'impression de la photographie du gel sont réalisés par un transilluminateur UV032 Mid Wave.

3.3 Quantification et contrôle de la qualité de l'extrait d'ADN

La pureté et la concentration de l'ADN génomique extrait, sont mesurées dans un NanoDrop (EPOCH Take3, BioTek, USA). Ce dernier est relié à un e-book Toshiba, sur lequel est installé le logiciel Gen5 1.09 permettant la lecture et l'analyse des résultats. Des volumes de 2 µL des produits d'extraction sont déposés en double dans la plaque du NanoDrop, puis la lecture de l'absorbance est réalisée à deux longueurs d'ondes 260nm et 280nm. Le ratio d'absorption 260nm/280nm doit se situer entre 1,8 et 2 pour une pureté optimale des extraits d'ADN (Ennadir *et al.*, 2014). La concentration de l'ADN génomique est automatiquement mesurée par le NanoDrop et exprimée en ng/µL.

3.4 Réaction de polymérisation en chaîne des gènes de l'ARNr 16S

L'amplification du gène codant l'ARNr 16S par PCR a été réalisée dans un thermocycleur (VWR), en utilisant deux paires d'amorces universelles. La première paire sens **Y1** (5'-TGG CTC AGG ACG AAC GCT GGC GGC-3') et anti-sens **Y2** (5'-CCT ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (Fermentas, Espagne) génère des séquences d'une taille d'environ 500pb (Ward *et al.*, 1998).

La seconde paire d'amorce donne des séquences d'une taille d'environ 1500 pb sens **pA** (5'-AGAG TTT GAT CCT GGC TCAG -3') et anti-sens **pH** (5'-AAG GAG GTG ATCC AGC GCA-3') (Sigma-Aldrich) (Edwards *et al.*, 1989; Devereux et Wilkinson, 2004).

La première étape de cette technique consiste à préparer le mélange réactionnel d'un volume de 50 µL, (identique pour les deux paires d'amorces) comprenant :

- 1,2 µL de l'amorce sens (10µM) ;
- 1,2 µL de l'amorce anti-sens (10µM) ;
- 25 µL Taq 2x master mix AMPLIQON RED ;
- 2 µL d'ADN génomique ;
- 20,6 µL d'eau de qualité biologique moléculaire (Sigma-Aldrich).

Les programmes d'amplification réalisés se résument comme suit :

- Pour la paire d'amorces **Y1/Y2** : Il comprend une phase de pré-dénaturation à 95°C pendant 5 min, puis 30 cycles d'amplification (45 s de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation à 56°C, 1 min d'extension à 72°C) ; la réaction se termine par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 min.

- Pour la paire d'amorces **pA/pH** : Il débute par une phase de pré-dénaturation à 95°C pendant 5 min, puis 35 cycles d'amplification (30 s de dénaturation à 95°C, 30 s d'hybridation à 55°C, 5 min d'extension à 72°C) ; la réaction se termine par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Un contrôle négatif comprenant le mix sans ADN et un contrôle positif représenté par un extrait de l'ADN génomique de la souche *Lb. rhamnosus*, ont été utilisés au cours de l'amplification.

3.5 Purification des produits PCR

Les produits de l'amplification sont purifiés avant séquençage par l'emploi du kit GenElute PCR Clean-Up (100 à 10000 pb), cela consiste en l'élimination de l'excès des produits de la réaction PCR à savoir : les *primers*, les nucléotides, l'ADN polymérase et les sels.

L'opération de purification consiste dans un premier temps à lier l'ADN à la membrane de silice, il sera par la suite lavé et concentré par les solutions du kit. Au final, l'ADN purifié est élué par de l'eau de qualité biologie moléculaire (Sigma-Aldrich).

3.6 Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR

Afin de vérifier l'efficacité de l'amplification, les amplicons, sont soumis à une migration dans un champ électrique de 120V pendant 10 min. Le gel d'agarose est préparé à 1 % (p/v), les échantillons déjà colorés par le redmix, ne nécessitent pas l'ajout de tampon de migration. Les amplicons migrent en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire (*DNA Ladder* 100-10 000bp). Le gel est visualisé dans le transilluminateur (UV032 Mid Wave) après 15 min d'incubation dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL).

3.7 Séquençage des gènes de l'ARNr 16S

Les produits PCR des souches retenues sont séquencés par la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) modifiée, en utilisant les deux paires d'amorces sens et anti-sens **Y1/ Y2** et **pA/pH**.

Le séquençage a été réalisé au niveau de la société *Macrogen* (Séoul, Corée du Sud).

3.8 Analyses bioinformatiques des séquences du gène de l'ARNr 16S

3.8.1 Identification moléculaire par comparaison avec les données des banques biologiques

L'identification moléculaire des souches bactérienne étudiées est réalisée, en comparant par alignement les séquences nucléiques au format FASTA à celles contenues dans les banques de séquences nucléotidiques ENA (*European Nucleotide Archive*)/Genbank/DDBJ (*DNA Database of Japan*). L'alignement est réalisé par l'algorithme Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*), qui est un outil de recherche d'alignement local de base accessible par le lien https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.

Afin de minimiser les erreurs d'interprétation liées à la qualité des séquences et confirmer les résultats d'affiliation des souches, un second alignement est réalisé avec la banque EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) (Yoon *et al.*, 2017).

3.8.2 Recherche de liens phylogénétiques

L'étude des relations phylogéniques entre les souches de l'étude, nécessite la construction d'un arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S, dans lequel sont également insérées des séquences homologues appartenant aux souches les plus apparentées.

Un alignement multiple est réalisé avec Clustal W sous le logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) version 6.06, utilisant la méthode du maximum de vraisemblance composite *likelihood* avec regroupement produit par la méthode de *Neighbor-Joining* (Saitou et Nei, 1986). La fiabilité de l'arbre est estimée par l'analyse *Bootstrap*, ce test estime la probabilité de l'existence de chaque branche interne et retient en dernier une seule topologie de l'arbre. Le choix d'utilisation de 1 000 répliques, se justifie par une bonne précision des estimations des soutiens de chaque branche (Deléage et Gouy, 2013).

La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 est utilisée comme groupe externe (*out group*).

3.8.3 Analyse comparative de la structure secondaire des séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats et des sites de restriction

La prédiction de la structure secondaire des séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats est réalisée à l'aide de la version RNAfold 2.4.13. du serveur RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Gruber *et al.*, 2008). Les caractéristiques des structures secondaires sont utilisées, pour observer les différences dans les données des séquences du gène de l'ARNr 16S des souches (Imran *et al.*, 2016).

Le logiciel Ncbutter (*New England BioLabs*) version 2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), est utilisé pour générer *in silico* des sites de restriction théoriques (Vincze *et al.*, 2003). Ces derniers sont obtenus, uniquement par les enzymes de restriction du fournisseur NEB (*New England Biolabs*, USA). Les résultats des profils théoriques de restriction sont affichés sous formes de cartes de restriction avec les pourcentages en GC et AT des séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats.

Ces deux analyses réalisées *in silico* permettent de vérifier que les isolats lactiques retenus en première sélection, basée sur une production stable des EPS, sont bien différents sur le plan génétique.

3.8.4 Numéros d'accèsion des séquences nucléiques

Les séquences des gènes codant l'ARNr 16S des souches sélectionnées ont été déposées dans les banques de données biologiques ENA/GenBank/DDBJ sous les numéros d'accèsion MG822861 ; MG822863 à MG822868

4. Typage moléculaire des isolats par amplification aléatoire d'ADN polymorphe

Les ADN génomiques extraits des souches EPS⁺ retenues en seconde sélection après caractérisation des gels lactiques, et de la souche témoin négatif sont comparés entre eux par une amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD).

Cette technique est basée sur la méthode PCR, elle permet de générer des profils d'ADN génomiques, par l'emploi d'une ou de plusieurs amorces courtes. L'hybridation des amorces avec l'ADN testé, induit l'amplification au hasard de certains fragments permettant d'avoir une sorte d'empreinte digitale de ce dernier. L'analyse des profils électrophorétiques, permet de distinguer des souches génétiquement différentes (Renault, 2008).

La RAPD est réalisée en utilisant 4 amorces (**tableau 6**), le volume de la réaction pour chaque amorce est de 30 µL, constitué de :

- 15 µL de master mix (Ampliqon Taq 2x Master mix Red 1,5 mM MgCl₂)
- 2 µL de l'amorce (10mM)
- 2 µL d'ADN génomique
- 11 µL d'eau de qualité biologie moléculaire (Sigma-Aldrich).

Le programme d'amplification comprend une étape de pré-dénaturation de 5 min à 94°C suivi par 30 cycles d'amplification (60 secondes de dénaturation à 94°C, 60 secondes d'hybridation

à 40°C, 8 min d'extension à 72°C), puis la réaction se termine par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min. Les amplicons sont conservés à 4°C.

Tableau 6. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'analyse RAPD

Désignation de l'amorce	Séquence nucléotidique	Référence
OPA-18	5'- AGGTGACCGT -3'	(Roy <i>et al.</i> , 2000)
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	(Rossetti et Giraffa, 2005)
ISSRev	5'-GGATCCAAGACAACGTTTCAAA-3'	(Acedo-Félix et Pérez-Martínez, 2003)
BOX A2R	5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3 '	(Nayak <i>et al.</i> , 2011)

Une électrophorèse horizontale (Bio-Rad) des amplicons dans un gel d'agarose préparé à 1% (p/v) est réalisée, la migration est conduite à 80 Volt pendant 1 heure 30 min (section 3.2 Chapitre1). Les profils des ADN génomiques générés par la RAPD sont visualisés et photographiés dans un transilluminateur (UV032 Mid Wave), avant d'être analysés à l'aide du logiciel PyElph1.4 (Kumari *et al.*, 2015).

1. Caractérisation macroscopique des gels lactiques produits par monoculture

Cette seconde partie de l'étude vise à sélectionner après fermentation en mode batch, les meilleures souches productrices d'exopolysaccharides viscosifiants. Un isolat non producteur d'EPS de la même espèce bactérienne a été utilisé en tant que témoin négatif.

1.1 Conditions de fermentation des milieux laitiers

1.1.1 Préparation du milieu de fermentation

Les taux de matières sèches du milieu de culture, ont été déterminés dans une première étape par des essais préliminaires de fermentation.

L'utilisation du lait écrémé à 11% (p/v) comme milieu de culture (Hassan, *et al.*, 2002; 2003b ; Purohit *et al.*, 2009), n'a pas généré de coagulation. Ce milieu a donc été supplémenté par des hydrolysats enzymatiques de caséines à 1% (p/v) qui constituent une source de peptides (Briggiler-Marcó *et al.*, 2007 ; Pernoud *et al.*, 2004 ; Lopez-Kleine et Monnet, 2011).

Le milieu de culture reconstitué (SMC) par de l'eau distillée, est homogénéisé et filtré à travers une passoire stérile en inox maillée 1×1 mm. Il est soumis à deux pasteurisations séparées, par 24 h, à 90°C pendant 5 min dans un bain chauffant (HB4 basic K/IKA-Werke).

1.1.2 Préparation de l'inoculum

La taille de l'inoculum pour la fermentation du lait varie de 2 à 5% (v/v), l'objectif étant d'atteindre une population bactérienne initiale de l'ordre de 10^7 UFC/mL (Chandan, 2014). L'inoculation a donc été réalisée au taux de 2%, avec un ajustement de la taille de l'inoculum par spectrophotométrie.

La préparation de l'inoculum comprend une première étape de mise en culture des isolats sélectionnés sur milieu de culture solide. Pour cela, les souches sont repiquées à partir du stock congelé à -80°C sur gélose MRS puis incubées à 30°C pendant 48 h. Après incubation, trois colonies sont prélevées etensemencées chacune dans 10 mL de bouillon MRS, les tubes sont incubés à 30°C pendant 18 h. Un second repiquage à 1% (v/v) est réalisé dans 10 mL de bouillon MRS, suivi d'une incubation à 30°C pendant 18 h. La préculture obtenue en triplicata pour chaque souche, est centrifugée à 10 000 rpm ($15880 \times g$) pendant 10 min à 4°C, puis lavée deux fois avec du tampon PBS avant d'être inoculée dans le milieu de fermentation SMC.

1.2 Fermentation des milieux laitiers

Le lait écrémé supplémenté d'hydrolysats enzymatiques de caséines (SMC) pasteurisé est refroidit à la température de 30°C, il est ensuite inoculé à 2% (v/v) par la préculture puis

homogénéisé par agitation à 300 rpm durant 15 min. Le dénombrement bactérien à temps $t = 0$ h, est réalisé par ensemencement en masse de 1 mL de la gélose MRS des dilutions décimales de 10^{-5} à 10^{-7} , à raison de trois boîtes par dilution.

Les SMC inoculés et homogénéisés sont répartis dans des tubes de 50 mL, puis placés dans un bain thermostaté (Julabo TW20) réglé à 30°C jusqu'à l'atteinte d'une valeur de pH de 4,6 (fin de la fermentation). Il est important de noter que, c'est la valeur à laquelle le gel est formé et les propriétés sensorielles peuvent être évaluées (Sodini *et al.*, 2004).

Un tube par souche est consacré à la mesure du pH toutes les 30 min durant 24 h par l'emploi d'un pH mètre (Thermo Scientific ORION Versa Star) relié à un micro-ordinateur portable (Toshiba).

En fin de fermentation, un dénombrement bactérien est également réalisé, par la dissolution de 5 g de SMC fermenté dans 45 mL d'une solution stérile de citrate de sodium à 2% (p/v). La solution mère est homogénéisée dans un stomacher, puis les dilutions décimales sont préparées par l'emploi du diluant Ringer ¼. Le dénombrement est réalisé par ensemencement de 1 mL en masse de la gélose MRS des dilutions de 10^{-5} à 10^{-8} , à raison de trois boîtes par dilution.

1.3 Caractères macroscopiques des gels lactiques

En fin de fermentation, les caractéristiques apparentes des gels lactiques obtenus sont notées. L'analyse de la structure macroscopique des gels, s'est basée sur les attributs physiques des gels souvent corrélés positivement ou négativement à la présence des exopolysaccharides (Hassan, 2008 ; Güler-Akin *et al.*, 2009 ; Costa *et al.*, 2012 ; Ale *et al.*, 2016) à savoir : la synérèse naturelle, le temps d'écoulement, l'aspect lisse ou rugueux du coagulum, la granulation du gel (grosse, fine) ainsi que la présence ou l'absence du caractère filant.

Les essais sont au nombre de trois pour chaque souche testée. Les résultats des données qualitatives ont été traités par une étude statistique (voir section 6. Chapitre 2).

2. Croissance bactérienne, acidification et dosage des exopolysaccharides produits par les isolats sélectionnés

Le suivi de la croissance bactérienne et de la production *in situ* des EPS dans le SMC, a été réalisé pour les souches sélectionnées après la caractérisation macroscopique des gels lactiques (section 1 de ce chapitre). Un isolat non producteur d'EPS de la même espèce bactérienne a été utilisé en tant que témoin négatif.

Le protocole utilisé est celui de Hassan *et al.* (2003a), avec un réajustement de la taille de l'inoculum à 5% (v/v). L'augmentation de la taille de l'inoculum a été appliquée suite, aux résultats obtenus en section 1 du chapitre 2.

2.1 Croissance bactérienne

Les SMCensemencés en triplicata par les souches sélectionnées, sont répartis après homogénéisation dans des tubes de 50 mL. Ces derniers sont aussitôt placés dans un bain thermostaté (Julabo TW20, GmbH) à 30°C.

Les tubes correspondants au temps de fermentation $t = 0$ h, font l'objet d'un dénombrement bactérien (voir section 1.2), ils sont ensuite déposés à - 20°C pour l'extraction ultérieure des EPS.

Afin de déterminer la phase de croissance durant laquelle les EPS sont produits par les souches, et sur la base des résultats obtenus en section 1.2 de ce chapitre. Cinq prélèvements sont effectués pour les temps de fermentation $t = 0$ h, $t = 14$ h, $t = 20$ h, $t = 24$ h et enfin $t = 48$ h, l'analyse réalisée en triplicata comprend la mesure du pH, les dénombrements des cellules bactériennes et les dosages des EPS.

2.2 Dosage des acides organiques

Le dosage des acides organiques produits au cours de la fermentation du SMC, est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters, Alliance 2690), selon le protocole de Salazar *et al.* (2009).

Les échantillons à analyser sont préparés comme suit : 5 g de SMC fermentés sont mélangés à 20 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 9 mN. Le mélange est maintenu sous agitation constante, pendant 2 h à 37°C. Il est ensuite centrifugé à $10\ 000 \times g$ pendant 20 min, puis le surnageant est filtré par passage à travers un filtre de porosité 0,22 μm (VWR, USA).

La séparation des analytes est effectuée dans une colonne échangeuse d'ions ION-300 IC Sep (Transgenomic, San Jose, CA, USA), dont la phase mobile est de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 8,5 mN à une température de 65 °C, et un débit de 0,4 mL/min.

Les acides organiques sont détectés avec le détecteur *photodiode array* PDA réglé à 210 nm. Pour la quantification, les équations de régression ($R^2 \geq 0,99$), ont été calculées en utilisant différentes concentrations des étalons correspondants (Fluka-Sigma).

2.3 Extraction et dosage des exopolysaccharides

La technique d'extraction des EPS à partir du milieu de fermentation SMC a été réalisée selon les protocoles de Van Marle et Zoon (1995), Ruas-Madiedo *et al.* (2002a) et Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán (2005).

2.3.1 Extraction des exopolysaccharides

L'extraction des EPS à partir du SMC est réalisée, par précipitation des protéines à l'acide trichloracétique (TCA) à 60% (p/v). Ainsi, chaque prélèvement (cinq au total) de SMC fermenté, soit un poids de 40 g est additionné de 8 mL de TCA pour une concentration finale de 12% (p/v).

Le mélange est soumis à une agitation vigoureuse (500 tr/min) dans un agitateur (variomag POLY15, Thermoscientific™) à température ambiante durant 45 min. Il est ensuite centrifugé à $10\,000 \times g$ pendant 30 min à 4°C, afin d'éliminer les protéines et les cellules bactériennes présentes dans le culot.

Le pH du surnageant récupéré est ajusté à $\text{pH } 5,0 \pm 0,5$ par une solution de NaOH à 10M, il est ensuite filtré à travers du papier Whatman n°41.

2.3.2 Purification partielle des exopolysaccharides par dialyse

Cette étape permet d'éliminer les sels et les monosaccharides libres par dialyse, elle est réalisée dans des boudins à dialyse MWCO (Sigma-Aldrich Dialysis tubing cellulose, USA) avec un seuil de coupure de 12-14 kDa.

Le surnageant filtré et neutralisé est introduit à l'intérieur de la membrane préalablement réhydratée. Le boudin à dialyse chargé est ensuite placé, dans un bain de 5L d'eau Milli-Q sous agitation. Des changements quotidiens d'eau sont effectués, durant les trois jours de la dialyse.

En fin d'opération, le contenu des boudins est transvasé dans des vials codifiés, afin d'être lyophilisé à -83°C à une pression de 1 mBar pendant 3 jours. Les lyophilisats obtenus sont pesés et conservés à température ambiante.

2.3.3 Dosage des protéines résiduelles des lyophilisats

La purification des EPS par dialyse, n'élimine pas en totalité les contaminants, principalement les protéines présentes dans les lyophilisats d'EPS. Cette fraction de protéines résiduelles, est par conséquent dosée puis soustraite du poids des lyophilisats.

Le dosage des protéines résiduelles a été réalisé par l'emploi du kit Pierce™ BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Thermo-Fisher, Rockford, IL, USA) selon les recommandations du fabricant.

Le principe de cette méthode repose sur la réduction en milieu alcalin des ions Cu^{+2} en Cu^{+1} par les protéines (Walker, 1994). Le Cu^{+1} forme avec l'acide bicinchoninique (BCA) qui est un réactif chromogène spécifique des ions cupriques, un complexe stable de couleur violette (Hill et Straka, 1988).

La quantité des ions Cu^{+2} réduite est proportionnelle à la concentration en protéines présentes dans la solution, cette dernière est estimée par spectrophotométrie à 550 nm. L'absorbance lue est corrélée à la quantité de protéines, en comparaison avec une protéine standard l'albumine bovine sérique (BSA) (Walker, 1994).

Les étapes de réalisation du dosage des protéines résiduelles sont portées en **annexe 3**.

2.3.4 Rendement gravimétrique en exopolysaccharides

La quantité d'EPS réellement produite par chaque souche est obtenue, après déduction de deux poids, celui du lyophilisat en début de fermentation ($t= 0$ h), et celui des protéines. Le rendement est estimé après 24 h de fermentation, exprimé en mg de polysaccharide sec par litre (mg PDM.L^{-1}) (Degeest *et al.*, 2001).

2.3.5 Analyse des exopolysaccharides par chromatographie d'exclusion (SEC-MALLS)

Les lyophilisats d'EPS sont analysés, par chromatographie d'exclusion de taille couplée à un détecteur de lumière laser multiangle (SEC-MALLS). L'analyse permet de déterminer avec précision, la concentration et la distribution des masses molaires des EPS. Elle est réalisée selon le protocole de Salazar *et al.* (2009).

Les échantillons sont d'abord préparés par dissolution de 5 mg/mL des lyophilisats d'EPS, dans une solution de nitrate de sodium (NaNO_3) à 0,1M. Ils sont ensuite maintenus sous agitation douce pendant une nuit, puis centrifugés à $10\,000 \times g$ durant 10 min.

La séparation est réalisée par deux colonnes de TSK-Gel® G3000 PW_{xl} et TSK-Gel® G5000 PW_{xl} placées en série et protégées par une colonne de garde TSK-Gel (SEC-MALLS) (Supelco-Sigma).

Le volume d'échantillon injecté est de 50 μL , il est entraîné par une phase mobile de NaNO_3 0,1M à 40°C et à un débit de 0,45 mL/min en utilisant un système de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Waters, Alliance 2690, Milford, MA, USA).

Ce système HPLC est composé d'un module de séparation Alliance 2690 muni d'un injecteur, d'un détecteur à barrettes de diodes (PDA) 996 et d'un détecteur d'indice de réfraction (RI 2414) couplés au détecteur MALLS Dawn Heleos II (Wyatt Europe GmbH, Dernbach, Allemagne). L'interférence des protéines avec les polysaccharides qui sont détectés par le signal du réfractomètre (RI), est décelée par le détecteur PDA réglé à 280 nm.

Les données sont gérées et analysées par deux logiciels ; le premier Empower (Waters, Milford, MA, USA) permet la quantification des EPS à partir des différentes concentrations des étalons de dextrane variant de 0 à 1 mg/mL. Le second logiciel Astra 3.5 (Wyatt Europe GmbH, Dernbach, Allemagne) est conçu pour la détermination de la masse moléculaire (MM)

et du rayon moyen de giration (R_w) du polymère glucidique (Burns *et al.*, 2011), en se référant aux temps d'élution des solutions standards de dextrane (Fluka-Sigma) de MM allant de 5×10^3 à $4,9 \times 10^6$ Da.

3. Viscosité apparente des gels lactiques générés

L'étude de la viscosité des gels lactiques a concerné deux systèmes laitiers fermentés, de type brassé et non brassé, afin d'apprécier l'influence de la présence des EPS dans les deux produits. Un échantillon témoin préparé sous les mêmes conditions, par la souche non productrice a servi aux tests de comparaison.

3.1 Viscosité des gels lactiques brassés

3.1.1 Production de SMC fermentés brassés

L'expérimentation est basée sur les travaux de Van Marle et Zoon (1995), de Ruas-Madiedo *et al.* (2002a) et de Salazar *et al.* (2009).

Des précultures des souches retenues sont préparées tel que décrit en section 1 du chapitre 2. À partir desquelles, un volume d'inoculum correspondant à 1% (v/v) sert à ensemercer 50 mL de bouillon MRS, qui est ensuite incubé à 30°C pendant 18 h. Les cultures obtenues sont alors centrifugées à 10 000 rpm ($15\,880 \times g$) pendant 10 min à 4°C, puis lavées par du tampon PBS, avant d'être inoculées à 5% (v/v) en monoculture dans le SMC pasteurisé.

Après homogénéisation, les SMC inoculés sont transvasés dans des bouteilles en verre stériles d'une contenance de 0,5 L, et dans un tube de 50 mL prévu pour le suivi du pH. L'incubation est réalisée dans un bain thermostaté (Julabo TW20, GmbH), jusqu'à l'obtention d'une valeur de pH de 4,6. Les SMC fermentés sont refroidis à 18°C, puis brassés délicatement tel que décrit par Salazar *et al.* (2009) à l'aide d'un ustensile de brassage (photographie en **annexe 4**), avant d'être entreposés dans une chambre froide à 4°C durant 24 h.

3.1.2 Mesure de la viscosité apparente des gels lactiques brassés

La viscosité apparente des SMC fermentés brassés, est mesurée à l'aide de l'entonnoir Posthumus (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b). Cet appareil permet la prédiction des propriétés de texture des aliments liquides et semi-solides présentant des propriétés d'écoulement de type Ostwald-de Waele et Newtonienne (Kutter *et al.*, 2011).

Il est aussi, conçu pour des tests comparatifs des produits à rhéologie complexe comme les gels lactiques (Monnet *et al.*, 2008). Il s'agit d'un cylindre creux dont l'une des extrémités est prolongée d'un entonnoir avec une ouverture de $8,0 \times 6,0$ mm (diamètre \times longueur) (**figure 19**) (Hellings, 1986).

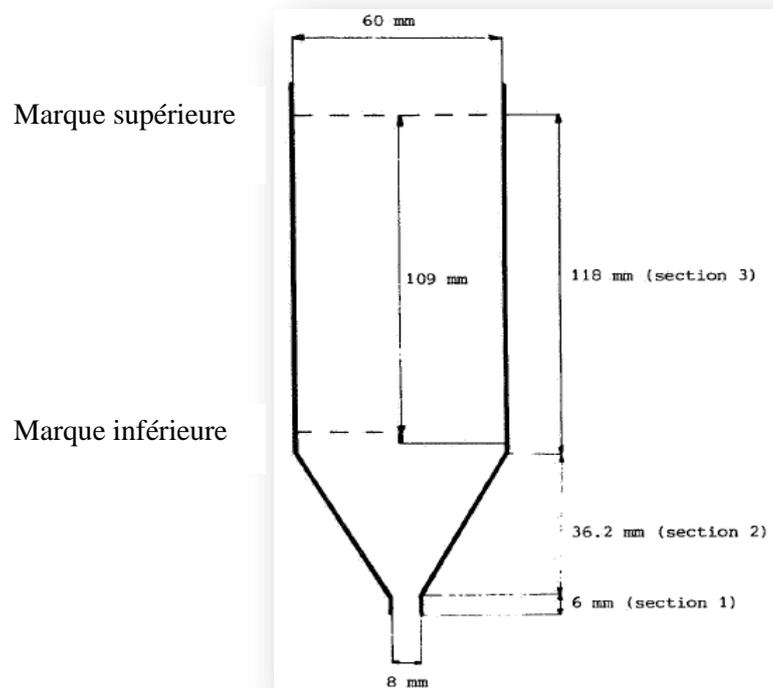


Figure 19. Schéma de l'entonnoir Posthumus (Hellings, 1986).

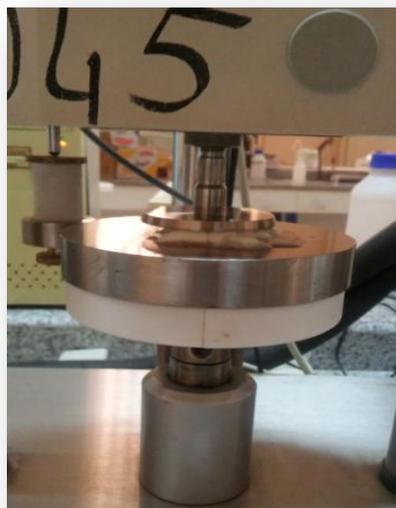


Figure 20. Photographie du rhéoviscosimètre montrant le cisaillement d'un gel SMC.

L'entonnoir est rempli par le SMC fermenté brassé, jusqu'à atteindre la marque supérieure de l'entonnoir, soit un volume de 450 mL.

Les mesures de la viscosité apparente, consistent à suivre l'écoulement du produit en fonction du temps, elles ont été effectuées dans une chambre froide à 4 °C.

3.2 Viscosité apparente des gels lactiques fermes

L'expérimentation a été réalisée sur la base des travaux de Hamet *et al.* (2015). Les milieux de cultures sont préparés puis fermentés, tel que décrit dans la section 1 du chapitre 2.

Les mesures de la viscosité sont effectuées à 25°C, par l'emploi du rhéoviscosimètre Haake VT550. Le maintien de cette température est assuré, grâce à la circulation d'eau en circuit fermée dans un bain thermostaté (Haake K115) relié au viscosimètre.

10g de l'échantillon de SMC fermenté, sont placés entre un plan et un cône d'angle 0,5° parallèles (**figure 20**). Le mécanisme rotatif de la plaque supérieure induit un cisaillement qui force l'échantillon à s'écouler, avec un gradient de cisaillement évoluant de 0,1 s⁻¹ à 1000 s⁻¹ en 180 secondes.

Le principe de cette mesure est que la résistance de l'échantillon à la déformation, développe une force tangentielle appelée contrainte de cisaillement. Cette contrainte qui est proportionnelle à la résistance à l'écoulement, est mesurée par l'intermédiaire d'une barre de torsion. La viscosité de l'échantillon est alors déterminée, pour une vitesse de cisaillement donnée, par le rapport entre la contrainte de cisaillement (Pa) et la vitesse de cisaillement (s⁻¹) (Rao, 1999).

Les données de mesures recueillies sont traitées par un logiciel VT1.x0s550, installé sur un ordinateur permettant l'obtention des valeurs de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement. Le traitement informatique permet également de modéliser l'écoulement du fluide en model Newtonien, pseudo-plastique et plastique. Les résultats rapportés sont la moyenne de trois essais.

4. Etude de la structure des gels lactiques

L'étude de la structure des gels lactiques générés par les souches productrices des EPS sélectionnées, et par la souche témoin non productrice de polymères a été évaluée sous deux aspects : la macrostructure, qui est caractérisée par deux phénomènes physiques, la synérèse et la perméabilité, et la microstructure révélée par microscopie à balayage.

4.1 Macrostructure des gels lactiques

4.1.1 Estimation de la synérèse provoquée

La synérèse est l'expulsion du lactosérum après fermentation, elle est représentée par la fraction liquide visible à la surface du gel lactique. Elle peut être soit naturelle liée à un phénomène physique de contraction du gel, ou provoquée induite par une force externe de centrifugation appliquée au gel lactique. Cette seconde approche a été expérimentée dans plusieurs études, elle définit la capacité du gel à retenir le lactosérum (Lee et Lucey, 2010 ; Gentès, 2011 ; Gentès *et al.*, 2011). Le taux de synérèse provoquée par la centrifugation, à différentes vitesses a été déterminé selon les protocoles de Harwlakar et Kalab (1983) modifié et de Ruas-Madiedo et Zoon (2003).

Les SMC sont préparés, inoculés à 5% (v/v) puis répartis dans des tubes Falcon de 50mL. Ils sont fermentés selon les conditions de la section 1 du chapitre 2, jusqu'à l'atteinte du pH 4,6. La centrifugation est réalisée dans une centrifugeuse Kubota 7780. Les vitesses appliquées sont : 3000 rpm (1430 × g), 5000 rpm (3970 × g), 7000 rpm (7780 × g) et 10000 rpm (15880 × g) à 4°C pendant 10 min.

Le surnageant représentant le lactosérum expulsé dans chaque tube sous l'effet de la force centrifuge, est recueilli puis pesé. Le rapport exprimé en pourcentage entre le poids du lactosérum et le poids du SMC fermenté représente l'indice de synérèse calculé par la formule qui suit (Ruas-Madiedo et Zoon, 2003 ; Lee et Lucey, 2004 ; Han *et al.*, 2016) :

$$\text{Synérèse (\%)} = \frac{\text{Poids du surnageant (g)}}{\text{Poids du SMC fermenté (g)}} \times 100$$

4.1.2 Estimation de la perméabilité des gels

Le coefficient de perméabilité (B_t) d'un gel, est déterminé en mesurant le flux du lactosérum (phase liquide) à travers un gel (matrice de caséines) causé par un petit gradient de pression (Lee et Lucey, 2010). Ce coefficient donne une indication sur la taille des pores du gel formé au cours du processus d'acidification. Un coefficient élevé indique qu'il y a de gros pores dans le gel, ce qui favorise un écoulement plus rapide du sérum à travers la matrice et vice-versa.

Le B_t est mesuré en utilisant la formule donnée par Van Dijk et Walstra (1986), Roefs de Groot Mostert et Van Vliet (1990), Van Marle et Zoon (1995), Peng *et al.* (2009) et Lee et Lucey (2010) :

$$Bt = - \left[\ln \frac{h_{\infty} - ht_2}{h_{\infty} - ht_1} \right] vH / g(t_2 - t_1)$$

B_t : Coefficient de perméabilité [m^2] ;

h_{∞} : Hauteur du lactosérum dans le tube de référence [m] ;

h_{t1} : Hauteur du lactosérum dans le tube au temps t_1 [m] ;

h_{t2} : Hauteur du lactosérum au temps t_2 [m^2] ;

v : Viscosité cinématique du lactosérum [$m^2 \cdot s^{-1}$] ;

H : Hauteur du gel [m] ;

g : Accélération due à la gravité [$m \cdot s^{-2}$] sa valeur est de $9,80665 m \cdot s^{-2}$.

La **figure 21 A** est un schéma simplifié du dispositif de mesure de la perméabilité, montrant le principe de la méthode ainsi que les différents facteurs intervenants dans le calcul de l'indice de perméabilité.

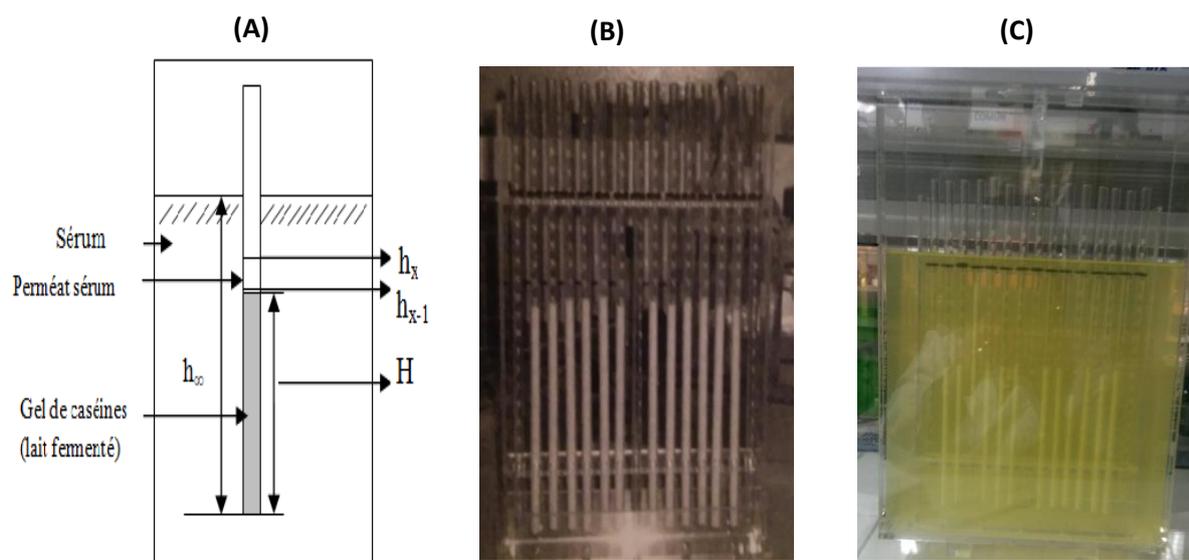


Figure 21. Mesure de la perméabilité des gels lactiques.

(A) représentation schématique du tube gradué (van Marle et Zoon, 1995), (B) tubes insérés dans la grille (Ruas Madiedo, 2002a), (C) dispositif de mesure chargé.

Pour déterminer le coefficient de perméabilité des SMC fermentés en monoculture, 4L de SMC par souche sont préparés et pasteurisés. Après refroidissement à la température de $30^{\circ}C$, ils sont inoculés par la souche à tester à 5% (v/v). La fermentation est conduite dans un bain thermostaté (Julabo TW20, GmbH) réglé à $30^{\circ}C$, jusqu'à l'atteinte d'une valeur de pH de 4,6. Les SMC fermentés sont ensuite centrifugés à $10\,000 \times g$ durant 30 min à $4^{\circ}C$, le surnageant ou lactosérum est récupéré puis filtré à travers du papier Whatman n°41. Sa viscosité

cinématique est mesurée à 20°C par un viscosimètre capillaire Ubbelodhe n° 532 type 0C (SI Analytics GmbH, Germany) (photographie en **annexe 4**).

Une quantité supplémentaire de SMC est préparée (1L par souche) dans un Erlen, elle est inoculée à 5 % (v/v) par la souche à tester et homogénéisée, puis 12 tubes gradués en verre stériles sont insérés à l'intérieur (25cm longueur, diamètre interne 4mm, graduation 1mm. Pobel, Barcelone). Leurs extrémités inférieures sont ouvertes, afin de permettre l'ascension par capillarité du milieu de culture inoculé. L'Erlen contenant les 12 tubes, est ensuite incubé à 30°C pendant 24 h dans un bain thermostaté (Julabo TW20, GmbH).

En fin de fermentation, les tubes sont délicatement prélevés, puis placés avec trois tubes de référence (vides), dans une grille à l'intérieur d'une cuve remplie de lactosérum (de la même souche) comme montré en **figure 21B**. Le dispositif de mesure chargé est présenté en **figure 21C**.

L'ascension du lactosérum à la surface des gels est suivie durant 8 h, avec l'enregistrement du niveau de lactosérum chaque heure. Le calcul du coefficient de perméabilité (B_t) est établi en utilisant la formule suscitée. L'expérimentation a été réalisée en duplicata.

4.2 Microstructure des gels lactiques

La microstructure des gels lactiques, a été visualisée par l'emploi de la microscopie confocale à balayage laser (CSLM), en utilisant des colorants fluorescents selon le protocole de Ruas-Madiedo et Zoon (2003) et de Hassan (2008).

Utilisation de 300 mL de SMC par souche, avant sa pasteurisation, le milieu subit une centrifugation à $10\ 160 \times g$ à 10°C pendant 30 min, afin d'éliminer les éléments non dissouts. Deux colorants sont ensuite ajoutés au milieu de fermentation, la Rhodamine B (Sigma-Aldrich) et l'Acridine orange (Sigma-Aldrich) à des concentrations finales respectives, de 0,001 % (p/v) et 0,002 % (p/v). La rhodamine colore les protéines et l'acridine orange colore les acides nucléiques des bactéries.

Ce milieu de culture est ensuite inoculé par la souche à 5 % (v/v), puis 2 mL sont délicatement déposés dans les puits des microplaques en plastique de haute qualité optique (Ibidi cells GmbH, Germany). Ces dernières sont ensuite déposées dans des boîtes de Pétri, et incubées à 30°C à l'obscurité pendant 24 h.

Le microscope confocal utilisé pour les observations des gels lactiques est de type Ultra Spectral Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Microsystems GmbH) de l'université d'Oviedo. Il possède 3 lasers : le premier laser à 488 nm à l'argon, le second Hélium-Néon 543nm, et le troisième Hélium -Néon 633 nm.

Les bactéries colorées à l'acridine orange sont visualisées avec le laser à 488 nm, alors que les protéines majoritairement des caséines colorées par la rhodamine B, sont visualisées avec le laser à 543 nm en rouge, mais aussi au laser à 488 nm. Après traitement des images par le programme LCS (Leica), les bactéries sont colorées en vert tandis que, la matrice de caséines apparaît en jaune (combinaison du rouge et du vert). Les objectifs d'immersion 40×/1,25 et 63×/1,40, sont utilisés soit directement ou avec un zoom de 1,58 ; les micrographies ont été prises au grossissement final × 630.

5. Observation des bactéries productrices des exopolysaccharides par *cryo-scanning electron microscopy* (Cryo-SEM)

Les cellules bactériennes entourées par l'EPS sécrété dans le milieu environnant peuvent être visualisées par cryo-microscopie électronique (Castro-Bravo *et al.*, 2018). Dans cette technique, les spécimens sont stabilisés par congélation rapide et observés à l'état hydraté congelé, ce qui permet de visualiser avec plus de précision la structure des composants hautement hydratés comme les polysaccharides (Hassan *et al.*, 2003a).

Les deux souches productrices d'EPS et la souche témoin non productrice d'EPS, sont préparées par leur mise en culture dans 50 mL de bouillon MRS. Afin d'obtenir des cultures denses, plusieurs colonies bactériennes prélevées de la gélose MRS, ont servi à l'inoculation du bouillon. Après 18 h d'incubation à 30°C, les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à $7\,780 \times g$ à 4°C durant 10 min, puis remises en suspension dans 5 mL de solution Ringer au $\frac{1}{4}$, avant d'être centrifugées de nouveau et enfin resuspendues dans 1 mL de la même solution. La suspension est répartie en deux aliquotes (0,5 mL), qui sont identifiés et congelés dans de l'azote liquide à -80°C jusqu'à leurs transfert dans de la neige carbonique au laboratoire des sciences marines (CSIC) de Barcelone (Espagne), où a été réalisée l'observation au cryo-SEM.

Pour l'observation microscopique au cryo-SEM, un spécimen est d'abord préparé. Pour cela une ou deux gouttes de culture sont placées dans un porte objet (*cryo stub*) spécialement conçu pour la cryo-préservation. Le spécimen est immédiatement plongé dans de l'azote liquide, puis transféré sous vide dans la chambre de cryo-préparation Quorum PP3000T (Quorum Technologies, www.quorumtech.com), fixée à la colonne du microscope SEM Hitachi S-3500N (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japon).

Le spécimen congelé est ensuite fracturé à l'aide d'un couteau réglable. Après cela, il est sublimé à -90°C pendant 5 min, puis recouvert de platine pendant 30 secondes et transféré

dans un compartiment froid à l'intérieur de la chambre du microscope. Le spécimen est maintenu à -135°C pendant l'observation qui est réalisée à une tension d'accélération de 4 kV.

6. Méthodes statistiques

Les analyses statistiques présentées dans cette étude ont été réalisées sous R (version 3.3.0), packages Rcmdr (version 2.2-5) et RcmdrPlugin.FactoMineR (version 1.6-0) (R Core Team, 2016).

- Les données des analyses effectuées en triplicata, ont été utilisées pour le calcul des moyennes et des écarts types.
- Les comparaisons entre les moyennes des variables quantitatives, en l'occurrence les dénombrements bactériens, les pH et les dosages des EPS, ont été réalisées par le test Anova à un facteur (*One-way Analyse of Variance*). Le test post-hoc SNK (Student, Newmann et Keuls), a été utilisé pour déterminer les différences significatives à $p < 5 \%$.
- La sélection des souches productrices d'EPS, ayant générées les gels lactiques avec les meilleurs attributs physiques, a été effectuée par une analyse factorielle des correspondances (AFC). Les données qualitatives des SMC fermentés, ont été catégorisées en valeurs numériques de 0 à 3. Les variables qualitatives et les souches, ont été ensuite représentées dans un nuage de points et analysées selon les deux axes factoriels enregistrant le plus d'inertie.
- Le traitement statistique des données de la caractérisation de la structure du gel lactique, a été réalisé par une Anova à un facteur (souche) pour la viscosité, et à deux facteurs pour la perméabilité (souche, temps) et la synérèse provoquée (souche, vitesse de centrifugation). Le test post-hoc de Dunnett a été utilisé, pour déterminer la différence significative entre les souches testées productrices d'EPS et la souche témoin non productrice de polymère à $p < 5 \%$.

Les gènes de production des EPS chez les bactéries lactiques sont soit plasmidiques ou chromosomique (Bajpai *et al.*, 2016 ; Sanlibaba et Çakmak, 2017).

La première approche, a donc été, de rechercher la présence de plasmides chez les souches productrices d'EPS LBIO1, LBIO28, la souche LBIO14 a servi de témoin. Cela permettra ultérieurement de maintenir ou non, l'hypothèse que les groupes de gènes *eps* soient plasmidiques.

Deux protocoles d'extraction de plasmides ont été employés.

1. Recherche et extraction de l'ADN plasmidique

1.1 Extraction par kit

Le kit *GenElute Plasmid Miniprep* a été utilisé, pour l'extraction de l'ADN plasmidique des deux souches productrices des EPS et de la souche témoin non productrice d'EPS. La souche *Lb. plantarum* IPLA441 contenant 4 plasmides a servi de témoin positif.

Les souches sont mises en culture dans 10 mL de bouillon MRS, durant 18 h à 30°C. Un volume de 1,5 mL de la culture est prélevé, puis centrifugé à $12\ 000 \times g$ à 4°C pendant 1 min. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 200 µL d'une solution de resuspension additionnée de lysozyme (30 mg/L, Merck) et de 5 µL de mutanolysine (5U, Sigma-Aldrich), ce mélange est homogénéisé puis incubé au bain thermostaté à 37°C durant 1 h.

La lyse des parois cellulaire est complétée, par l'ajout d'un volume de 200 µL d'une solution de lyse contenant le dodécyl sulfate de sodium (SDS). Les contaminants (protéines, lipides et débris cellulaires) sont précipités par 350 µL de la solution de neutralisation et de fixation suivie d'une centrifugation à $12\ 000 \times g$ pendant 10 min à 4°C. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est purifié sur des colonnes échangeuses d'ions par des lavages successifs, il est ensuite élué par une solution d'élution fournie avec le kit puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 % (p/v) (composition **annexe 2**) est réalisée en faisant migrer 5 µL du produit d'extraction additionné de 2 µL de tampon de charge. Les extraits d'ADN plasmidiques migrent en même temps qu'un marqueur de taille «*High Range DNA Ladder* 10171-48502 pb».

La révélation des bandes d'ADN plasmidique se fait après incubation du gel dans une solution de bromure d'éthidium, le gel est ensuite visualisé dans un transluminateur (UV032 Mid Wave) (voir section 3.1 Chapitre 1).

1.2 Extraction par méthode conventionnelle

La seconde méthode d'extraction de l'ADN plasmidique est une modification de celle de O'sullivan et Klaenhammer (1993).

La préparation des cultures bactériennes est réalisée selon la technique décrite en section 1.1 du chapitre 1. Après centrifugation de la culture obtenue, le culot cellulaire récupéré est resuspendu dans une solution de saccharose à 25 % (p/v), pour être centrifugé une seconde fois à 12 000×g pendant 10 min à 4°C. Il est ensuite resuspendu dans une solution de saccharose à 25 % (p/v), additionnée de lysozyme (30 mg/mL, Merck) pour un volume final de 200 µL. La solution est incubée à 37°C pendant 30 min. Une lyse alcaline est réalisée par addition de 400 µL d'une solution alcaline de SDS (SDS à 3% p/v et NaOH 0,2N). La solution de lyse est mélangée et laissée à température ambiante durant 5min. A cette étape tout l'ADN (génomique et plasmidique) est dénaturé. Une neutralisation est réalisée par addition de 300 µL d'acétate de sodium à 3M à pH 4,8 (solution froide). Le mélange est mixé puis centrifugé à 12 000×g à 4°C pendant 15 min. L'étape de neutralisation permettra la renaturation de l'ADN plasmidique, il est alors contenu dans le surnageant, contrairement à l'ADN génomique qui précipite avec les débris cellulaires.

Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré et additionné de 650 µL d'isopropanol puis centrifugé à 12 000×g à 4°C pendant 15min. Le culot est remis en suspension dans un mélange formé de 320 µL d'eau distillée stérile, de 200 µL d'acétate d'ammonium à 7,5 M et de 350 µL phénol/chloroforme (v/v). L'ensemble est centrifugé à 12 000×g pendant 5 min à température ambiante. Cette étape permet la précipitation des protéines et leur élimination dans le culot. La phase aqueuse (supérieure) contenant l'ADN plasmidique est récupérée et précipitée par 1 mL d'éthanol à froid puis centrifugée à 12 000×g à 4°C pendant 15min. Le culot est précipité une seconde fois par une solution d'éthanol 70% (v/v), puis centrifugé. Il est enfin resuspendu dans 40 µL d'une solution de Tris-EDTA contenant 0,1 mg/mL d'ARNase.

La révélation de la présence de l'ADN plasmidique est réalisée tel que décrit en section 1.1 de ce chapitre.

2. Séquençage, assemblage et annotation des génomes

Les résultats obtenus en section 1 de ce chapitre, n'ont pas permis de confirmer l'emplacement des gènes codant les EPS. Un séquençage complet des génomes des trois souches a donc été entrepris.

L'ADN génomique des souches sélectionnées et de la souche contrôle, a été extrait comme détaillé dans la section 3.1 du chapitre 1, sa qualité et sa quantité ont été contrôlées au NanoDrop. Les extraits d'ADN génomique ont été par la suite expédiés vers les installations GenProbios srl (Parma, Italie), où a été réalisé le séquençage du génome des trois souches (*Whole Genome Sequencing WGS*), par le système de séquençage Illumina MiSeq®, selon le protocole du fournisseur (Illumina, Royaume-Uni).

Les fichiers obtenus après séquençage ciblé du génome des souches, sont assemblés en ligne avec la ressource PATRIC 3.5.23 (<https://www.patricbrc.org/app/Assembly>) (Wattam *et al.*, 2017) en utilisant l'assembleur SPAdes (v.3.10.0) (Bankevich *et al.*, 2012). L'annotation automatique des cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frames*) est réalisée sur le serveur RAST (*Rapide Annotations Using Subsystems Technology*, <http://rast.theseed.org>), intégré au pipeline d'annotation des génomes procaryote « *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline PGAP* » du portail *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* accessible sur le lien (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) (Tatusova *et al.*, 2016).

Les séquences nucléotidiques et protéiques d'intérêt extraites des génomes assemblés et annotés, sont localisées par des recherches d'homologie réalisées par l'outil BLASTP en utilisant comme requête, les séquences de protéines correspondantes des groupes de gènes *cps1*, *cps2*, *cps3* et *cps4* annotés dans le génome de référence *Lb. plantarum* WCFS1 (Kleerebezem *et al.*, 2003).

Une approche similaire est également utilisée pour la recherche des gènes des enzymes GH68 et GH70 décrits à partir des séquences de lactobacilles dans la base de données de gènes du NCIB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

En outre, les enzymes métaboliques des glucides des génomes ont été annotées par l'outil dbCAN (Zhang *et al.*, 2018) et comparées à la base de données CAZyme (*Carbohydrate-Active enZymes*) (<http://www.cazy.org/>). L'annotation RAST a été étudiée pour rechercher les voies de biosynthèse des vitamines. Les groupes de gènes codants les bactériocines ont été recherchés à l'aide de l'outil web BAGEL4 (De Jong *et al.*, 2006). Les déterminants de la résistance aux antibiotiques ont été prédits par des recherches d'homologie dans la base CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (<http://arpcard.mcmaster.ca/>) (Arndt *et al.*, 2019) et l'outil en ligne RESfinder (<https://omictools.com/resfinder-tool>) a été utilisé pour prédire les gènes de résistance aux antibiotiques (Zankari *et al.*, 2012). Pour identifier les séquences associées aux plasmides, les lectures brutes de séquençage ont été analysées à l'aide de PLACNETw (<https://bio.tools/PLACNETw>), un outil graphique interactif permettant de reconstruire les plasmides en créant un réseau d'interactions contig

(Vielva *et al.*, 2017). Les trois génomes ont été déposés dans les trois banques de données biologiques ENA/GenBank/DDBJ, sous les numéros d'accès SAMN14671341, SAMN14671394 et SAMN14671401.

RESULTATS ET DISCUSSION

Avant d'entamer la partie résultats et discussion, il y a lieu de rappeler les principaux objectifs de ce travail de thèse qui sont : la recherche et la sélection de souches de bactéries lactiques productrices d'EPS à partir de produits laitiers fermentés ; la caractérisation polyphasique de ces isolats ; l'étude de la production *in situ* des EPS ; la caractérisation des gels lactiques obtenus et enfin l'identification des gènes de production des EPS.

Plusieurs méthodes culturales ont été utilisées pour le *screening* afin d'obtenir des isolats producteurs d'EPS. Ces derniers, ont été caractérisés puis utilisés en fermentations batch (monoculture), dans un milieu laitier, en vue de sélectionner les meilleurs isolats producteurs de polymères viscosifiants. À l'issue de cette sélection, une étude de la production a été réalisée, dans laquelle les EPS après extraction, ont été analysés par chromatographie d'exclusion. Une caractérisation plus poussée des gels lactiques générés par les souches retenues en plus d'une souche témoin non productrice a été effectuée afin d'évaluer l'impact de la présence des EPS dans une matrice laitière. Enfin, un séquençage complet des trois génomes (y compris celui de la souche témoin) a été entrepris, dans le but d'identifier les gènes responsables de la production des EPS.

1. Constitution de la collection de souches lactiques

Le nombre d'échantillons utilisés pour la recherche de BL productrices d'EPS s'élevait à 30 échantillons, réparti en 20 laits fermentés (*rayeb* et *lben*), 08 fromages, 01 beurre fermier et 01 *smen*. Tous les échantillons étaient issus de fermentations spontanées, et ont été collectés de plusieurs régions géographiques, le plus souvent auprès d'éleveurs.

De ces échantillons, 731 isolats ont été obtenus, dont 584 sont à Gram positif, asporulés et dépourvus de catalase. Ces souches présumées être des BL, ont été criblées pour la production des EPS, en utilisant les techniques précédemment décrites en matériel et méthodes (section 1.5- chapitre 1).

Les résultats du *screening* ont révélé que, 18 isolats possédaient un phénotype producteur d'EPS. Au cours de l'étude, une souche de phénotype non producteur, a été retenue comme témoin pour les expérimentations nécessitant des tests de comparaison.

2. Caractérisation phénotypique des isolats sélectionnés

Une synthèse des caractères culturels et microscopiques des 19 isolats est présentée dans le **tableau 7**.

Tableau 7. Origine et caractères macroscopiques et microscopiques des isolats sélectionnés.

Code Souches	Produit	Origine	Milieu d'isolement	Caractères cultureux				Caractères Microscopique	
				Forme	Opacité	Type	Pigmentation	Forme cell.	Mode group.
L BIO28	Rayeb bovin	BEI Ghadir	MRS	Plate	Opaque	Très filante	Crème	Bacille	Diplobacilles
L BIO10	Rayeb bovin	BEI Ghadir	MRS	Plate	Opaque	Très filante	Crème	Bacille	Diplobacilles
L BIO33	Rayeb bovin	BEI Ghadir	MRS	Plate	Opaque	Très filante	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO41	Rayeb bovin	BEI Ghadir	MRS	Bombée	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Diplobacilles
L BIO43	Rayeb bovin	BEI Ghadir	MRS	Bombée	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO1	F. Bouhezza	Batna	MRS	Plate	Opaque	Très filante	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO2	F. Bouhezza	Batna	MRS	Ombiliquée	Opaque	Très filante	Crème	Bacille	Diplobacille
L BIO3	F. Bouhezza	Batna	MRS	Ronde	Opaque	Très filante	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO22	F. Bouhezza	Khenchela	MRS	Ronde	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Diplobacille
L BIO4	Rayeb caprin	Touggourt	Mayeux	Plate	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Diplobacilles
L BIO34	Lben	Constantine	MRS	Plate	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO29	Lben	Constantine	MRS	Bombée	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Diplobacilles
L BIO11	Lben	Constantine	MRS	Plate	Opaque	Mucoïde	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO7	Lben	Constantine	MRS	Plate	Opaque	Filante	Crème	Bacille	Streptobacilles
L BIO13	F. Klila	Batna	Mayeux	Bombée	Translucide	Filante	Transparente	Cocci	Diplocoques
L BIO5	F. Klila	Batna	MRS	Bombée	Translucide	Mucoïde	Transparente	Cocci	Diplocoques
L BIO32	Rayeb caprin	Touggourt	Mayeux	Plate	Opaque	Mucoïde	Crème	Cocci	Diplocoques
L BIO27	Lben	Constantine	MRS	Bombée	Opaque	Mucoïde	Crème	Cocci	Diplocoques
L BIO14*	F. Klila	Batna	MRS	Bombée	Opaque	Crémeuse	Crème	Bacille	Diplobacilles

(F) : fromage ; Filante > 5mm ; Très filante >1cm ; (*) : souche témoin non productrice d'EPS.

2.1 Caractérisation macroscopique

La description des caractères culturels des isolats sur géloses MRS et MSE, est basée sur une observation macroscopique des colonies par la loupe binoculaire (Motic, France) au grossissement $\times 20$.

Toutes les colonies productrices d'EPS sont de couleur blanc-crème, opaques à la lumière, à l'exception de celles formées par les souches L_{BIO5} et L_{BIO13} qui sont transparentes et translucides. Elles sont lisses et brillantes avec des contours réguliers, la majorité est de grande taille supérieure à 5 mm, plates parfois bombées, ou même ombiliquées cas des colonies produites par la souche L_{BIO2}. Une seule souche codée L_{BIO5} présentait un aspect macroscopique différent, elle formait de larges colonies, envahissantes possédant un aspect gluant, brillant mais non filant. Quant à la souche L_{BIO14} (témoin), elle a formé des colonies de taille moyenne, de couleur blanc-crème, aux contours ronds et réguliers.

Par ailleurs, deux types d'EPS ont été observés ; le type mucoïde caractérisait dix souches, tandis que le type filant concernait les huit autres. Parmi lesquelles, cinq souches étaient très filantes, et s'étiraient longuement à l'anse. En revanche, les colonies des souches mucoïdes, bien que brillantes, ne s'étendaient pas à l'anse de platine.

En revanche, le caractère de production d'EPS pour les 4 souches L_{BIO4}, L_{BIO13}, L_{BIO5} et L_{BIO32}, s'exprimait uniquement sur milieux solide ou liquide ESM (*exopolysaccharide screening medium*) supplémentés par du saccharose à 5 % (p/v). Les cultures après fermentation ont présenté une viscosité élevée du milieu, avec formation de longs filaments visqueux (**figure 22**). D'après la littérature, la détection de la production par ajout de saccharose dans le milieu de culture, concerne uniquement des souches produisant des homopolysaccharides. Ce type de polymère est synthétisé par la bactérie, en utilisant le saccharose comme substrat (Monsan *et al.*, 2001; Salazar *et al.*, 2016).

La technique de coloration au rouge de ruthénium a également permis d'obtenir des isolats positifs au test de production des EPS ; leurs colonies sur le milieu gélosé additionné de ce colorant sont apparues blanches (**figure 22**). Cependant, cette technique a présenté des limites pour les colonies qui sont à l'origine transparentes pour lesquelles, nous n'avons donc pas eu de résultats.

Les cultures des souches filantes en bouillon MRS montrent également une turbidité élevée, en raison de la résistance à la précipitation des cellules, induite par une viscosité élevée du milieu. Une récente étude menée par Cirrincione *et al.* (2018), a montré l'existence d'une corrélation positive entre la turbidité du surnageant et le phénotype filant.

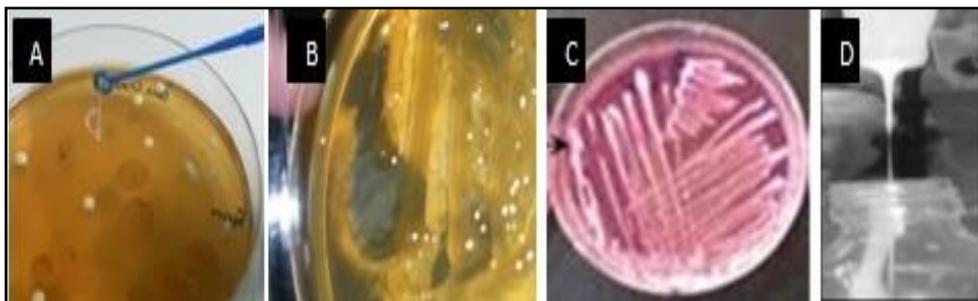


Figure 22. Exemples d'aspects macroscopiques de cultures productrices des EPS. (A) LBIO1 sur MRS; (B) LBIO5 sur MRS à 5 % (p/v) de saccharose ; (C) LBIO1 sur MRS + rouge de ruthénium 8 % (p/v) et (D) LBIO5 sur ESM.



Figure 23. Aspect macroscopique des culots cellulaires après centrifugation de deux cultures LBIO14 EPS⁻ (à gauche) et LBIO28 EPS⁺ (à droite).

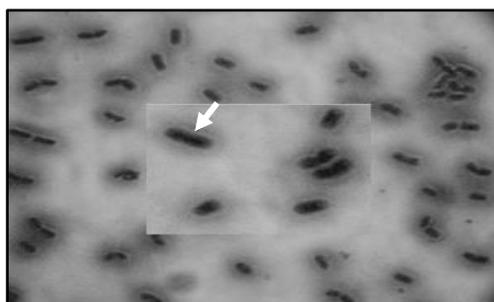


Figure 24. Observation par microscopie photonique (Leica DM 1000 LED) des EPS par coloration à l'encre de chine ($G \times 1000$). La flèche indique le halo clair formé autour de la cellule.

Le culot cellulaire récupéré après centrifugation de ces mêmes cultures à $10000 \times g$ pendant 10 min à 4°C , s'est révélé être liquide, visqueux et filant, contrairement à celui de la culture témoin qui était compacte (**figure 23**). D'après plusieurs auteurs, le phénotype filant serait lié aux propriétés chimiques de l'EPS, et non à la quantité de polymère produite (Folkenberg *et al.*, 2006 ; Mozzi *et al.*, 2006 ; Mende *et al.*, 2012).

2.2 Caractérisation microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram des 19 isolats a révélé la présence de deux formes cellulaires, coque et bacille, avec une prédominance de la seconde forme.

En ce qui concerne le mode de regroupement, les observations microscopiques à l'immersion montrent que les coques avaient un arrangement cellulaire en paire, mais aussi en chaînette, de même pour les bacilles. Ce critère morphologique n'est pas réellement discriminatoire, car il dépend aussi des conditions de culture et de la phase de croissance cellulaire de la souche (Ludwig *et al.*, 2009).

L'observation microscopique à l'immersion, après une coloration par la technique à l'encre de Chine, a permis de détecter la présence d'un halo clair entourant les cellules bactériennes (**figure 24**). Ce dernier peut être assimilé à l'EPS capsulaire ou libre, car la forme excrétée dépend essentiellement des conditions environnantes (Sánchez *et al.*, 2006 ; Pachekrepapol *et al.*, 2017). Le phénomène de désorption du polymère a été rapporté dans l'étude de Tallon *et al.* (2003), il serait provoqué par l'abaissement du pH.

Par ailleurs, l'examen à l'état frais des suspensions bactériennes par la méthode de la goutte pendante, a révélé que toutes les souches sont immobiles, une caractéristique qui a été ensuite confirmée sur gélose Mannitol-Mobilité par une croissance bactérienne limitée autour de la piqûre centrale.

3. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats sélectionnés

Les résultats de la caractérisation physiologique et biochimique des 19 souches sont présentés dans le **tableau 8**.

Toutes les souches testées ne possèdent pas de catalase, sont à Gram positif et immobiles. Deux groupes d'isolats ont été distingués, sur la base de la fermentation du glucose. Le premier groupe comprend tous les coques lactiques ayant fermentés le glucose avec un dégagement gazeux dans la cloche de Durham, ce qui révèle un métabolisme hétérofermentaire, alors que le second, regroupe les bacilles n'ayant pas produit de CO_2 , ils sont donc homofermentaires.

Tableau 8. Caractérisation physiologique et biochimique des souches lactiques sélectionnées.

	LBIO 28	LBIO 10	LBIO 33	LBIO 41	LBIO 43	LBIO 1	LBIO 2	LBIO 3	LBIO 22	LBIO 4	LBIO 34	LBIO 29	LBIO 11	LBIO 7	LBIO 13	LBIO 5	LBIO 32	LBIO 27	LBIO 14*
Croissance à 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	+
37°C	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	+	+	+	/
45°C	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	+/-
pH 3,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	+
6,5 % (p/v) NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	+
Résist. à 65°C/30'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	+
60°C/90'	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	+
55°C/15'	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	/
Production de :																			
CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance sur :																			
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose et/ou Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Résist. : Résistance ; + test positif ; - test négatif ; +/- faible ; / : non effectué ; (*) : souche témoin.

Ce dernier groupe a pu croître à 15°C mais non à 45°C, à l'exception de quelques isolats mais leur croissance reste très faible. La croissance observée autour de 30 °C étant plus importante, les souches sont donc mésophiles.

Ces résultats préliminaires, ont permis de rattacher les bacilles de la collection au genre *Lactobacillus* au sein du second groupe *Streptobacterium*, qui comprend tous les bacilles mésophiles homofermentaires à hétérofermentaires facultatifs (Guiraud, 2003).

L'ensemble des isolats de forme bacillaire ont fermenté, le glucose, le lactose et/ou le saccharose mais sans production d'H₂S sur gélose TSI, ils sont aussi capables de fermenter le mannitol sur gélose Mannitol-Mobilité. Par contre, le citrate n'a pas été utilisé comme unique source de carbone et d'énergie. Les souches ont également résisté aux deux traitements thermiques de 60°C pendant 90 minutes et de 65°C pendant 30 minutes sauf LBIO33.

La croissance dans les conditions hostiles (milieu acide et salin) a révélé que les formes bacillaires pouvaient se développer à pH 3,9, et en présence de NaCl à 6,5 % (p/v). Cette capacité à croître dans des milieux acides et salins, constitue deux critères technologiques très intéressants dans la sélection des ferments. Les lactobacilles sont bien connus pour leur résistance à l'acidité, quant au NaCl, il est considéré comme l'un des additifs les plus importants pour la conservation des aliments (Jamet, 2009 ; Abid *et al.*, 2018).

D'autre part, les coques lactiques de la collection se développaient à 37°C, mais ils sont incapables de résister au traitement thermique de 55°C pendant 15 minutes. Ils ne fermentent ni le citrate ni le mannitol, mais sont capables d'utiliser les autres sucres.

Selon le *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2009), ces caractères phénétiques correspondent à ceux décrits pour les genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Hammes et Hertel, 2009 ; Schleifer, 2009). Ces deux genres sont bien documentés pour leur production d'EPS (Patel et Prajapat, 2013; Zeidan *et al.*, 2017).

* La non disponibilité des galeries API 50CH, nous a contraints à réduire le nombre de souches testées à sept isolats. Les souches retenues sont celles présentant une stabilité de la production d'EPS lors des repiquages successifs et la souche témoin LBIO14 non productrice de polymère.

Les résultats des tests biochimiques API 50CH des 7 souches retenues sont consignés dans le **tableau 9**. Ainsi, le glucose, le fructose et le mannose sont fermentés au bout de 24 h par l'ensemble des souches, alors que, le ribose et le galactose sont utilisés après 48 h d'incubation par les souches LBIO10, LBIO28, LBIO1, LBIO2, LBIO33 et LBIO4.

La souche LBI014 n'utilise pas le galactose et présente un résultat variable pour le ribose. Les sucres alcool sont aussi fermentés par les isolats, cas du mannitol et du sorbitol.

L'ensemble des souches ont fermenté le lactose, ce qui est en relation avec leur habitat d'origine le lait, elles ont également la capacité d'utiliser d'autres disaccharides tels que le saccharose, le maltose, le mélézitose, le gentiobiose, le tréhalose et le cellobiose, ce dernier n'est pas utilisé par la souche LBI014. Quant au raffinose, seule la souche LBI033 est capable de l'utiliser. D'autres substrats carbonés sont également utilisés par nos isolats tels que : l'amygdaline, l'arbutine, l'esculine et la salicine.

Le traitement des profils de fermentation des 49 sucres à l'aide du tableur API 50CH de Joffin (2011), a permis d'identifier les 7 isolats au rang d'espèce à des taux de similarité variant de 92 à 98 % avec la souche de référence *Lb. plantarum* ATCC 14917. En utilisant le même système d'identification biochimique, les taux de similarités rapportés pour 10 souches testées par Sawitzki *et al.* (2007) variaient de 90 à 99,5 %, alors que, Tanganurat *et al.* (2009) ont obtenu des taux allant de 78,4 à 99,9 %. L'homologie des profils biochimiques (API 50CH), de nos isolats avec la souche de référence *Lb. plantarum* ATCC 14917 est donc importante.

L'étude menée par Siezen *et al.* (2010) sur la diversité phénétique de l'espèce *Lb. plantarum*, a révélé que la majorité des 185 souches testées isolées de viande, levain et légumes étaient capables de se développer à une concentration de 6 % (p/v) de NaCl, alors que la croissance à 45°C était modérée. Les glucides les plus utilisés par ces souches étaient le glucose, le saccharose, le mannitol, le mélibiose, le mélézitose, le sorbitol, le turanose, le tréhalose et l'amygdaline. Ces résultats sont en accord avec les profils biochimiques et physiologiques rapportés dans la présente étude, seuls deux sucres semblent ne pas être utilisés par nos souches, il s'agit du mélibiose et du turanose. Cela peut être corrélé à la niche écologique des bactéries et à leur adaptation à l'environnement, l'espèce *Lb. plantarum* est connue pour être très hétérogène. Les profils biochimiques des souches se rattachant à l'espèce *Lb. plantarum* observés par Sawitzki *et al.* (2007) et Tanganurat *et al.* (2009), sont également très proches des nôtres.

Selon Corsetti et Valmorri (2011), l'espèce *Lb. plantarum* étant hétérofermentaire facultative, elle utilise les hexoses et les pentoses par la voie de la glycolyse et de la phosphocétolase respectivement. Les sucres fermentés par cette espèce sont : l'amygdaline, l'arabinose, le cellobiose, le fructose, le galactose, le glucose, le gluconate, le lactose, le maltose, le mannitol, le mannose, le mélibiose, le raffinose, le ribose, la salicine, le sorbitol, le saccharose et le tréhalose. Les sucres sont transportés chez les BL par deux systèmes de transport actifs

qui sont le système phosphoénolpyruvate- phosphotransférase dépendant (PEP/PTS) qui couple le transport et la phosphorylation du glucide, et le système perméase qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres. Le second mécanisme est généralement le plus utilisé chez l'espèce *Lb. plantarum* (Loubiere et Cocaigne-Bousquet, 2009 ; Corsetti et Valmorri, 2011). Il convient aussi de mentionner que, l'utilisation des sucres chez la plupart des bactéries est régulée par un système de répression catabolique (CCR *Carbon Catabolite Repression*), qui assure outre la fonction de régulation et d'adaptation de la bactérie au milieu l'utilisation en premier des sources de carbone les plus profitables à la cellule (Chen *et al.*, 2019).

Par ailleurs, l'espèce *Lb. plantarum* est très utilisée comme modèle pour les études métaboliques et génétiques, elle est aussi exploitée dans les fermentations alimentaires, particulièrement celle des fromages, où elle se développe au cours de la maturation et atteint des densités cellulaires importantes ($\sim 10^9$ UFC/g) grâce à sa résistance aux milieux acides et à sa grande flexibilité métabolique. Plusieurs souches de cette espèce ont été décrites comme productrices d'EPS, dont certains polymères ont présenté des propriétés fonctionnelles intéressantes (Tsuda et Miyamoto, 2010 ; Tang *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2018). L'identification biochimique des isolats fournie par le système API 50CH, doit cependant être confirmée par une caractérisation moléculaire, car celui-ci n'est pas considéré comme suffisamment discriminatoire pour une identification au rang espèce.

4. Caractérisation moléculaire des isolats sélectionnés

4.1 Extraction de l'ADN

L'ADN génomique des 19 isolats (dont la souche témoin) a été extrait, mais la difficulté rencontrée avec les souches productrices d'EPS était le colmatage des membranes. De ce fait, un temps supplémentaire de centrifugation de 2 minutes a été appliqué afin de récupérer l'éluât. La réussite de l'extraction de l'ADN a été vérifiée, par la présence de bandes sur le gel d'agarose à 1 % (p/v) visualisé au transilluminateur après migration des extraits d'ADN.

4.2 Amplification, séquençage partielle et analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S

4.2.1 Paire d'amorces Y1/Y2

Les extraits d'ADN génomiques des 19 souches, ont été soumis à une réaction d'amplification par PCR du gène codant l'ARNr 16S réalisée par l'emploi de la première paire d'amorces Y1/Y2.

Tableau 10. Résultats des alignements des séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats lactiques sélectionnés avec les banques ENA/Genbank/DDBJ.

Souche	Taille des séquences (pb)	Souche bactérienne la plus apparentée	Numéro d'accès	Pourcentage de similitude
LBIO28	645	<i>Lb. plantarum</i> NWAFU1556	MG551233.1	98
LBIO10	655	<i>Lb. plantarum</i> HBUAS52058	MH392778.1	98
LBIO33	785	<i>Lb. plantarum</i> AAC3	KY810532.1	98
LBIO41	633	<i>Lb. plantarum</i> 1.2.35	KX648748.1	95
LBIO43	629	<i>Lb. plantarum</i> LLY-606	CP023306.1	97
LBIO1	662	<i>Lb. plantarum</i> MG207	MN069033.1	99
LBIO2	655	<i>Lb. plantarum</i> GS26A	MK955489.1	95
LBIO3	691	<i>Lb. plantarum</i> 30.2.30	KX649078.1	99
LBIO22	772	<i>Lb. plantarum</i> AAC3	KY810532.1	97
LBIO13	723	<i>Lc. mesenteroides</i> MPL24	KF697619.1	99
LBIO5	793	<i>Lc. mesenteroides</i> 10-7	KJ477420.1	100
LBIO4	669	<i>Lb. plantarum</i> HBUAS51215	MH665831.1	97
LBIO32	798	<i>Lc. mesenteroides</i> lmn4	MH198322.1	99
LBIO34	679	<i>Lb. plantarum</i> KCCM200693	MF992230.1	98
LBIO29	656	<i>Lb. plantarum</i> KCCM200693	MF992230.1	98
LBIO27	746	<i>Lc. mesenteroides</i> lmn4	MH198322.1	100
LBIO11	670	<i>Lb. plantarum</i> IPhp-D25	KX943019.1	95
LBIO7	659	<i>Lb. plantarum</i> AR504	MK311262.1	98
LBIO14*	678	<i>Lb. plantarum</i> NWAFU1556	MG551233.1	99

(*) : Souche témoin.

Les amplicons séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 % (p/v), ont été visualisés sous lumière UV, sous forme de bandes électrophorétiques d'une taille allant de 750 à 500 pb par comparaison au marqueur de taille utilisé (**figure 25**).

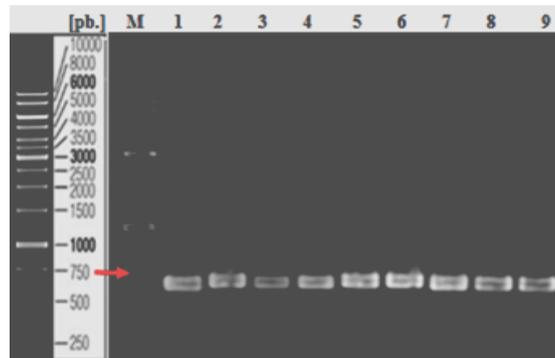


Figure 25. Produits d'amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S de quelques isolats sur gel d'agarose à 1 % (p/v). Puits M : marqueur de poids moléculaire ; puits 1 à 9 ; 1 : LBIO28 ; 2 : LBIO27 ; 3 : LBIO29 ; 4 : LBIO11 ; 5 : LBIO43 ; 6 : LBIO41 ; 7 : LBIO32 ; 8 : LBIO3 ; 9 : LBIO34.

Le séquençage des amplicons PCR générés par les amorces Y1/Y2, a ensuite permis l'obtention de séquences nucléotidiques partielles des gènes de l'ARNr 16S d'une taille allant de 633 à 798 pb (**annexe 5**). Ces séquences ont été comparées à celles des banques de données biologiques ENA/Genbank/DDBJ, puis un alignement multiple des séquences homologues par l'outil Blast_n version 2.9.0 a été réalisé. Les résultats reportés dans le **tableau 10**, donnent les souches et les numéros d'accès des séquences les plus proches des nôtres avec des pourcentages de similarité variant entre 95 et 100 % (Yoon *et al.*, 2017).

Les résultats de cet alignement, ont révélé que nos isolats sont affiliés au phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales*, famille des *Lactobacillaceae*, et appartiennent aux deux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, ce qui concorde avec les résultats obtenus par les méthodes classiques. Ainsi, le premier genre regroupe 15 souches et le second 4 souches (Schleifer, 2009 ; Holzappel et Wood, 1995 ; 2014).

Plusieurs souches appartenant aux espèces *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. curvatus*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. plantarum*, ont été décrites comme productrices d'EPS (Miao *et al.*, 2015 ; Aarti et Khusro, 2019). Pour les leuconostokes, deux sous espèces produisent le dextrane à partir du saccharose, il s'agit de *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Schleifer, 2009).

Selon le même tableau, les pourcentages de similarité constatés entre nos séquences et celles des banques de données biologiques sont supérieur à 95 % dans la plupart des cas, ce qui est acceptable pour une identification au rang de l'espèce (Benson *et al.*, 2018).

Dans la collection lactique, 15 souches parmi les 19 isolats caractérisés ont été affiliées à la même espèce *Lb. plantarum*. Il faut signaler qu'une proposition de reclasser les membres du genre *Lactobacillus* dans 25 nouveaux genres a été faite par Zheng *et al.* (2020) sur la base des résultats de comparaison des génomes complets. La même étude a classé l'espèce *Lb. plantarum* dans le nouveau genre *Lactiplantibacillus*, en tant que *Lactiplantibacillus plantarum* comprenant deux sous espèces *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* et *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *argenteratensi*, ayant un contenu en (G+C) % de l'ADN variant entre 42,9 et 48,7.

La présence de *Lb. plantarum* dans les matrices laitières est très fréquente, elle a été rapportée par de nombreux auteurs dans des produits laitiers fermentés comme le lait de chèvre (Badis *et al.*, 2004), le *Shmen* qui est un beurre issu de lait de chamelle (Kacem et Kaid Harche, 2008), les fromages traditionnels locaux tels que *Bouhezza*, *Djben* et *Klila* (Mechai *et al.*, 2014). Son abondance est aussi citée dans des préparations traditionnelles originaires d'autres pays comme le fromage *Siahmazgi* originaire d'Iran (Partovi *et al.*, 2018), le *Tarhana* qui est une préparation turque à base de céréales et de yaourt (Zehir Şentürk *et al.*, 2019), le *Dadih* (lait fermenté Sumatra) ainsi que dans le *Kéfir* originaire du Tibet (Jiang *et al.*, 2018).

L'espèce *Lb. plantarum* fait partie de la flore secondaire, succédant les cultures acidifiantes, elle devient majoritaire surtout dans les derniers stades de la fermentation (Siezen et van Hylckama Vlieg, 2011 ; Domingos-Lopes *et al.*, 2018 ; Jiang *et al.*, 2018). Cependant, la production des EPS est souvent instable, particulièrement pour les souches mésophiles, en raison de la perte spontanée de plasmide portant les gènes codant ces polymères. Cela peut résulter de repiquages successifs ou d'une incubation prolongée (Cerning, 1990 ; Bouzar *et al.*, 1997).

Pour cette raison, nous avons procédé à une nouvelle sélection des isolats basée sur la stabilité de la production des EPS. Ainsi six souches LBIO28, LBIO10, LBIO33, LBIO1, LBIO2, LBIO4 ont été retenues pour la suite de l'étude. A ce groupe d'isolat une souche LBIO14 non productrice et affiliée à la même espèce a été également retenue. Il nous a également semblé utile de procéder à une caractérisation complète des séquences de leurs gènes d'ARNr 16S.

4.2.2 Paire d'amorces pA/pH

Une nouvelle amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S, des 7 souches en utilisant la paire d'amorces pA/pH a été réalisée. Les amplicons purifiés et le marqueur de poids moléculaire, ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (p/v). Après migration, la présence des bandes électrophorétiques visualisées sous lumière ultraviolette, a

Tableau 11. Résultats des alignements des séquences des gènes d'ARNr 16S des isolats lactiques sélectionnés avec les banques biologiques ENA/Genbank/DDBJ et EZBioCloud.

Souche	Numéro d'accès	Taille (pb)	Max. de similarité ENA/Genbank/DDBJ	Numéro d'accès	TC (%)	TI (%)	Max de similarité sur EzBioCloud	Numéro d'accès	TC (%)	TI (%)
LBIO1	MG822866	1492	<i>Lb. plantarum</i> KS6I1	KM485577	99	99,8	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	99,59
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	99,52
LBIO28	MG822865	1499	<i>Lb. plantarum</i> gp23	KM495865	99	99,6	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	99,19
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	99,12
LBIO10	MG822867	1488	<i>Lb. plantarum</i> W2	KX261527	99	99,66	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	99,52
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	99,45
LBIO33	MG822864	1492	<i>Lb. plantarum</i> 46Y	MK774597	99	99,53	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	99,66
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	99,59
LBIO2	MG822861	1473	<i>Lb. plantarum</i> Ni1377	AB598978	100	99,52	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	99,52
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	99,45
LBIO4	MG822863	1489	<i>Lb. plantarum</i> KLAB4	KM497502	100	98,46	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	98,09
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	98,02
LBIO14*	MG822868	1489	<i>Lb. plantarum</i> CSI7	KM513642	99	99,32	<i>Lb. pentosus</i>	AZCU01000047	100	99,18
							<i>Lb. plantarum</i>	ACGZ01000098	100	99,11

pb : paire de base ; Max : maximum ; TC : taux de couverture ; TI : taux d'identité (similarité) ; (*) : souche témoin.

permis de confirmer l'efficacité de l'amplification et la taille des amplicons, soit environ 1500 pb (**figure 26**).

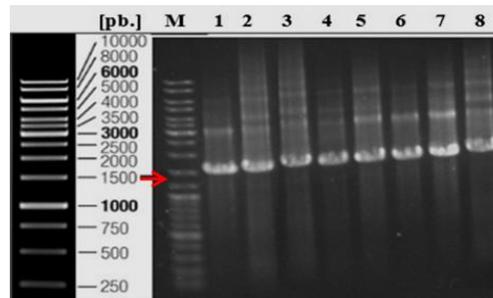


Figure 26. Amplicons de PCR sur gel d'agarose à 1 % (p/v).
M : marqueur de poids moléculaire ; puits 1 à 8 ; 1 : LBIO28 ; 2 : LBIO1 ;
3 : LBIO2 ; 4 : LBIO33 ; 5 : LBIO10 ; 6 : LBIO4 ; 7 : LBIO14 ; 8 : *Lb. rhamnosus*.

Les séquences obtenues de tailles allant de 1473 à 1499 pb (**annexe 6**), ont été déposées dans les banques ENA/Genbank/DDBJ sont notés dans le **tableau 11**.

Les résultats des alignements de séquences des gènes de l'ARNr 16S des 7 isolats, avec celles des banques de données biologiques ENA/Genbank/DDBJ version 08 mars 2019 et EzBiocloud version du 09-04-2019 sont également présentés dans le même tableau.

Les taux de similarité et de couverture obtenus par alignement de nos séquences par l'outil Blast sont supérieurs à 99 %, ce qui reflète une meilleure identification avec une séquence complète du gène de l'ARNr 16S (Janda et Abbott, 2002).

Les résultats d'alignements obtenus par la banque EzBiocloud, ont généré pour toutes les séquences requêtes, des taux de similarité et de couverture entre 98 % et 100 % avec les deux espèces *Lb. plantarum* et *Lb. pentosus*. Cela s'explique par le fait que ces deux espèces sont phylogénétiquement très proches et appartiennent au même groupe « *Lactobacillus plantarum group* » (Corsetti et Valmorri, 2011 ; Behera *et al.*, 2018). Cependant, en comparant les résultats de la galerie biochimique API 50CH (section 3), le glycérol et le D-xylose ne sont pas fermentés par l'ensemble des isolats testés, ce résultat permet donc d'affilier les isolats à l'espèce *Lb. plantarum*, étant donné que l'espèce *Lb. pentosus* fermente ces deux glucides (Tailliez *et al.*, 1996).

4.3 Etude des liens phylogénétiques

Les séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S des 7 souches testées ont été utilisées pour construire un arbre phylogénétique, en leurs associant des séquences d'ARNr 16S de souches apparentées caractérisées. L'alignement multiple des séquences homologues, a pour objectif de faire apparaître les identités ou similitudes. Il constitue la première étape dans

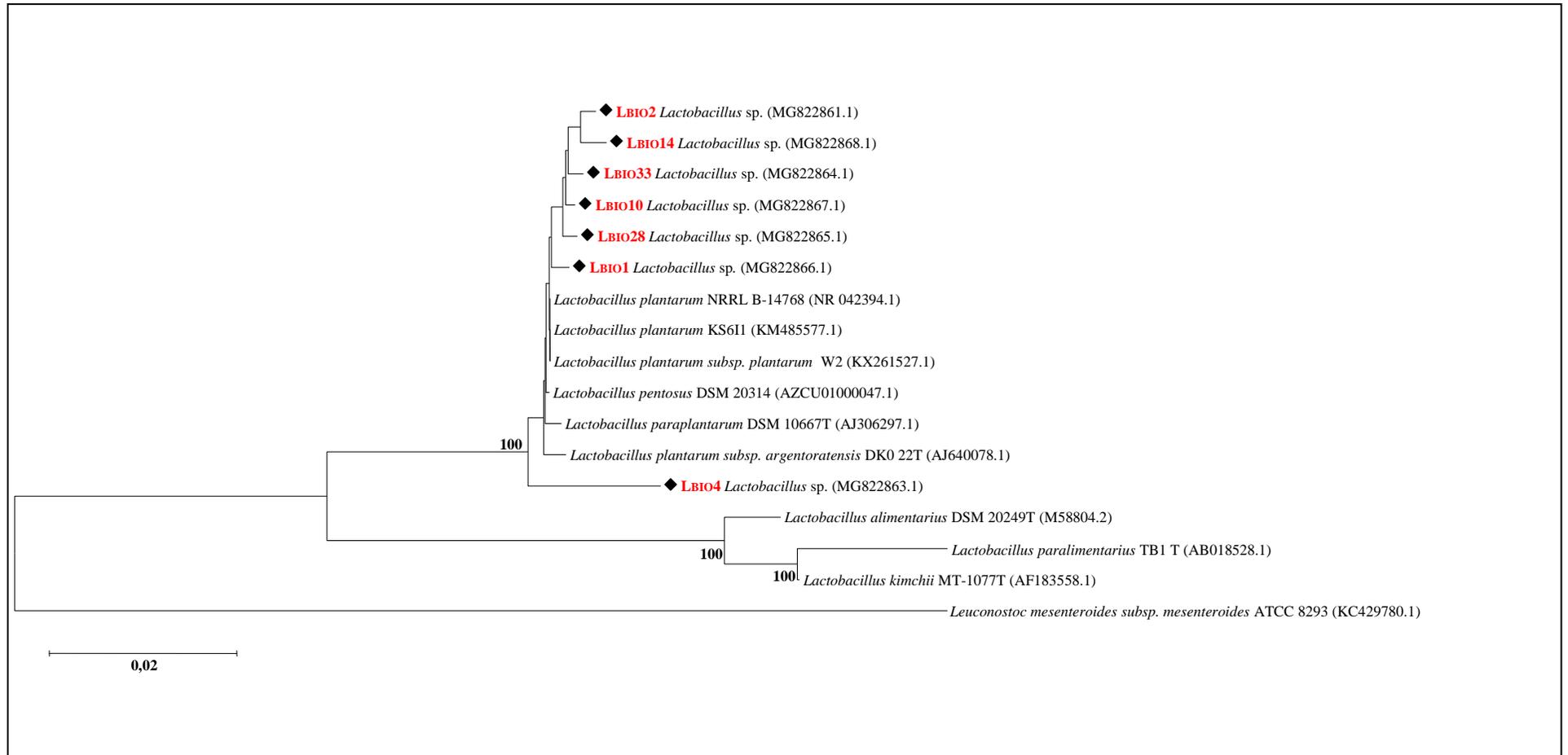


Figure 27. Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes de l'ARNr 16S des 07 isolats (gras et rouge) et de 09 souches de *Lactobacillus*. Les numéros d'accès des séquences sur ENA/Genbank/DDBJ sont notés entre parenthèses. L'*outgroup* est représenté par la souche *Lc. mesenteroides* ATCC 8293. La barre d'échelle indique 2 substitutions pour 100 nucléotides.

l'établissement du phylogramme et permet de déterminer les relations d'homologie entre les séquences considérées (Deléage et Gouy, 2013). La topologie de l'arbre est présentée en **figure 27**, seules les valeurs du *Bootstrap* supérieures à 70 % sont indiquées au-dessus des nœuds. Le groupe externe qui est aussi la racine de l'arbre, est représenté par la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293. Ont été également rajoutées 9 séquences d'ARNr 16S de souches affiliées aux espèces *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. alimentarius*.

L'arbre comporte deux branches internes portant les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) d'intérêt notées en rouge, avec une valeur de soutien de *bootstrap* de 100 % sur le premier nœud. Ce dernier confirme l'existence d'une forte homologie des séquences de l'ARNr 16S d'intérêt, avec les séquences de références des souches apparentées de l'espèce *Lb. plantarum*.

4.4 Comparaison par analyse *in silico* des gènes de l'ARNr 16S des souches sélectionnées

La structure secondaire d'une séquence d'ARNr16S résulte de son repliement sur elle-même, par les appariements de ses nucléotides G et C, A et U de type Watson-Crick dits canoniques ou plus rarement de type Wobble entre les bases nucléotidique G et U. La structure secondaire des 7 séquences du gène de l'ARNr 16S, a été prédite *in silico* par l'approche thermodynamique basée sur la méthode de minimisation de l'énergie libre, en utilisant l'algorithme RNAalifold version 2.4.13, qui permet la prédiction de la structure biologiquement la plus probable (Gruber *et al.*, 2008).

La prédiction des structures secondaires des sept séquences analysées a révélé que l'ensemble des structures présentent une stabilité thermodynamique, du fait que leurs énergies libres soient fortement négatives (**tableau 12**). Ces dernières sont équivalentes à la somme des contributions de l'énergie libre de tous les motifs (boucles et hélices) formant la structure (Lorenz *et al.*, 2016).

Les valeurs d'énergie libre enregistrées à 37°C pour les sept structures sont distinctes, la plus faible énergie libre est notée pour la séquence de l'isolat LBIO28, alors que, celle de l'isolat LBIO2 a montré la plus forte valeur.

D'autre part, la prédiction *in silico* des sites de restriction, ainsi que la teneur en bases nucléotidiques GC% et AT% des séquences du gène de l'ARNr 16S des 7 souches, ont été analysés à l'aide du programme NEBcutter version 2.0 (Vincze *et al.*, 2003). Les résultats ont révélé que le pourcentage des bases guanine et cytosine était majoritairement plus élevé que

celui des bases adénine et thymine (**tableau 12**). Le nombre d'enzymes de restrictions, capables de couper à l'intérieur des séquences du gène de l'ARNr 16S est aussi différent. L'analyse des séquences *in silico* a donc mis en évidence des différences dans la structure secondaire et dans le nombre de sites de restrictions théoriques des 7 séquences du gène de l'ARNr 16S, suggérant que les sept isolats sont génétiquement différents (Imran *et al.*, 2016).

Tableau 12. Analyse comparative réalisée *in silico* des séquences du gène de l'ARNr 16S des souches sélectionnées

Code Souche	Numéro d'accès	Analyse de la structure secondaire Energie libre minimale (Kcal/mol)	Analyse des sites de restriction		
			GC%	AT%	Nombre d'enzymes de restriction
LBIO1	MG822866	-513,20	51	49	57
LBIO2	MG822861	-497,90	51	49	53
LBIO4	MG822863	-506,00	51	49	52
LBIO10	MG822867	-507,30	51	49	55
LBIO28	MG822865	-520,50	52	48	56
LBIO33	MG822864	-512,10	51	49	58
LBIO14*	MG822868	-503,30	50	50	51

(*) : souche témoin.

4.5 Analyse des profils d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

Après extraction et purification de l'ADN génomique, un contrôle de sa qualité et de sa quantité s'est révélé être positif, suite auquel la technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) a été réalisée pour les trois isolats retenus lors de la seconde sélection, après caractérisation des gels lactiques.

Les profils RAPD générés par les quatre amorces sont montrés en **figure 28**.

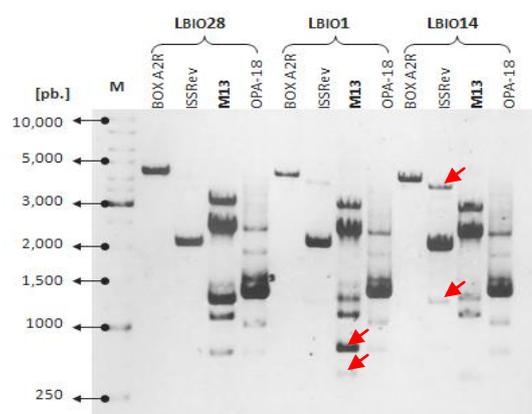


Figure 28. Profils RAPD des trois souches sélectionnées.
Les flèches indiquent les bandes discriminantes entre les trois souches.
M : marqueur de poids moléculaire 10 000-250 pb.

L'examen des bandes électrophorétiques par le logiciel PyElph1.4 s'est appuyé sur la position et l'intensité des produits RAPD (**annexe 7**), et a révélé que les trois souches ne présentaient pas de similitude.

L'examen du gel RAPD à 1 % d'agarose révèle que l'amorce BOXA2R a généré une seule bande électrophorétique d'intensité différente entre les trois souches testées ; celle-ci possède une taille d'environ 5000 pb selon le marqueur de poids moléculaire utilisé.

La seconde amorce ISSRev, a donné trois bandes visibles sur le gel pour la souche LBIO14, la première bande possède une taille d'environ 1200 pb, elle est absente chez les deux autres souches. La seconde bande a une taille d'environ 2000 pb, elle est plus intense chez la souche LBIO14. La troisième bande électrophorétique possède quant à elle une taille de 3500 pb, qui est moins intense chez la souche LBIO1 et absente chez LBIO28.

La troisième amorce M13 a donné plusieurs bandes de tailles moléculaires allant de 300 à 3000 pb, d'intensité variable entre les trois souches, certaines d'entre elles indiquées dans la figure sont parfois même absentes.

La quatrième amorce OPA-18 a également généré plusieurs bandes de poids moléculaire situé entre 800 et 2500 pb, mais le profil électrophorétique reste peu discriminatoire.

Ces observations confortent les résultats de l'analyse comparative des séquences des gènes de l'ARNr 16S précédemment réalisée *in silico*, et confirment que les trois souches sont génétiquement différentes.

1. Fermentation des laits supplémentés en hydrolysats de caséines (SMC) en mode Batch

Durant la réalisation de la seconde partie du travail expérimental, les fermentations en mode batch, ont concerné les 6 isolats LBIO1, LBIO2, LBIO4, LBIO10, LBIO28, LBIO33 affiliés à l'espèce *Lb. plantarum* les plus stables en termes de production des EPS, et la souche témoin négatif LBIO14. Il est important de rappeler que, les sept souches sélectionnées proviennent d'échantillons différents, et que l'analyse comparative des séquences du gène de l'ARNr 16S effectuée *in silico*, a révélé l'existence d'une différence génétique entre elles.

Le lait écrémé utilisé en tant que milieu de culture (SMC) a été supplémenté par des hydrolysats enzymatiques de caséine à 1 % (p/v), en raison de l'absence d'activité caséinolytique extracellulaire chez toutes les souches de *Lb. plantarum* retenues (révélée par des tests préliminaires). Le système protéolytique des BL est connu pour être peu actif, particulièrement chez les lactobacilles, qui sont auxotrophes pour un grand nombre d'acides aminés qui se trouvent en très faibles quantités dans le lait. Par conséquent, la présence d'une protéase de paroi (Prt) capable de dégrader les caséines en oligopeptides assimilables par la bactérie est indispensable à sa croissance (Lopez-Kleine et Monnet, 2011). Les travaux de Di Cagno *et al.* (2003), utilisant plusieurs extraits de protéases de BL ainsi que différentes compositions en acides aminés du milieu de culture ont mis en évidence l'absence de protéase chez la souche *Lb. plantarum* DPC2741 ainsi que son auxotrophie vis-à-vis de la valine, l'isoleucine et la glutamine.

D'autre part, l'analyse du génome de la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1 a également révélé l'absence du gène codant la protéase extracellulaire (Prt), seulement des systèmes de transport des oligo et des dipeptides (Opp et Dtp) ont été identifiés chez cette souche, qui après internalisation sont hydrolysés par une variété de peptidases codées par 19 gènes (Kleerebezem *et al.*, 2003). Nos isolats ne semblent pas posséder une protéase de paroi mais disposent de systèmes de transport leur permettant d'utiliser ultérieurement pour leur croissance les peptides de caséines.

1.1 Croissance bactérienne et acidification du milieu SMC par les isolats sélectionnés

La croissance à 30°C des 7 isolats inoculés à 2 % (v/v) dans le milieu SMC, a été évaluée par dénombrement des unités formant colonies et par mesure du pH toutes les 30 minutes durant 24 h (**figure 29**) (**annexe 8**). L'abaissement du pH enregistré est dû à la production d'acide lactique, ce processus d'acidification chez les BL, est étroitement associé à la croissance, ensemble ils définissent le phénomène « croissance-acidification » (Bevilacqua *et al.*, 2008).

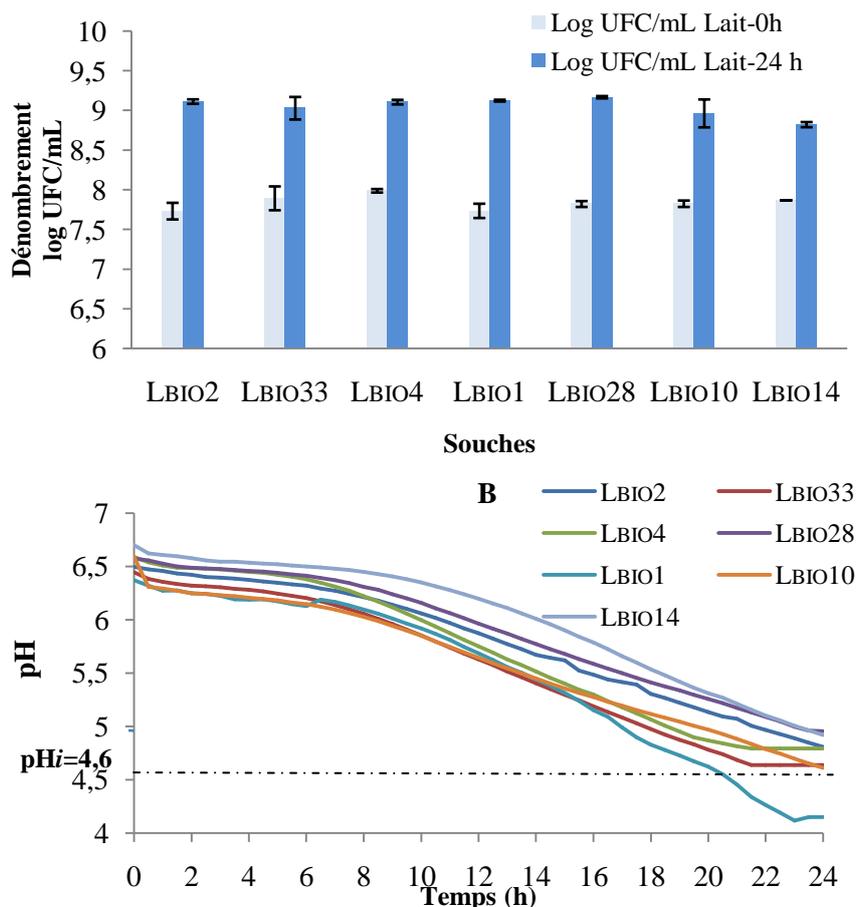


Figure 29. Evolution de la croissance bactérienne des 7 isolats sélectionnés (A) et de l'acidification (B) des SMC à 30°C durant 24 h. pH_i : pH isoélectrique des caséines. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types.

Tableau 13. Caractéristiques de la croissance et de l'acidification des SMC par les souches sélectionnées.

Souches	log UFC/mL ± ET t = 24h	Δlog UFC/mL t = 24h	ΔpH après t = 6h	pH ± ET t = 24h
LBIO 1	9,12 ± 0,01 ^c	1,39	0,25	4,15 ± 0,4
LBIO 2	9,11 ± 0,02 ^c	1,38	0,18	4,80 ± 0,014
LBIO 4	9,10 ± 0,03 ^c	1,12	0,21	4,79 ± 0,021
LBIO 10	8,96 ± 0,17 ^{ab}	1,24	0,4	4,61 ± 0,024
LBIO 28	9,16 ± 0,14 ^c	1,34	0,16	4,95 ± 0,020
LBIO 33	9,02 ± 0,14 ^{ab}	1,13	0,24	4,61 ± 0,02
LBIO 14*	8,82 ± 0,03 ^a	0,95	0,2	4,91 ± 0,02

UFC : unité formant colonie ; ET : écart type ; * : souche témoin ; t : temps de fermentation ; Δ pH: gradient de variation du pH. Les souches qui ne partagent pas une lettre commune sont significativement différentes (p ≤ 0,05).

Selon la **figure 29A**, il y a une évolution de la biomasse des sept isolats en moyenne de l'ordre de 1,2 log UFC/mL, au cours des 24 h de fermentation. Par contre, elle est significativement différente entre les souches testées ($p \leq 0,05$), malgré l'utilisation d'un inoculum de même taille (10^7 UFC/mL) (**tableau 13**). Il est bien connu, que la croissance dépend des facteurs environnementaux, mais aussi, des caractéristiques spécifiques de la souche, tels que les systèmes de transport des glucides et des peptides ainsi que de l'activité de la β -galactosidase (Salazar *et al.*, 2009). Celle-ci est en effet, étroitement liée au métabolisme du lactose chez l'espèce *Lb. plantarum* (Herreros *et al.*, 2003). D'autres auteurs, ont par ailleurs rapporté que, la présence des EPS autour des cellules rendait la membrane moins perméable au passage des nutriments, ce qui freinait la croissance bactérienne ainsi que, les différents processus métaboliques (Purwandari *et al.*, 2007).

Dans le même milieu de fermentation, Briggiler-Marcó *et al.* (2007) ont rapporté que deux souches de l'espèce *Lb. plantarum* n'ont pas pu se développer, et de ce fait aucune acidification n'a été enregistrée. En revanche, Li *et al.* (2017) pour la même espèce ont obtenu une coagulation du lait écrémé, mais seulement en l'additionnant d'une source d'azote.

Dans du lait de chèvre, une augmentation en biomasse de 2 log a été enregistrée par Chen *et al.* (2018) pour la souche *Lb. plantarum* L69. Par contre, pour ce même milieu de culture, la souche *Lb. plantarum* TJA26B, s'est développée modérément en affichant une évolution de 1 log (Cho *et al.*, 2018).

Dans un milieu synthétique, Wang *et al.* (2014) ont enregistré pour la souche *Lb. plantarum* 70810, une augmentation de la biomasse de l'ordre de 3 log après 24 h de fermentation. Selon, Bevilacqua *et al.* (2008) et Schmidt *et al.* (2016), l'évolution de la population bactérienne est fortement corrélée à la composition du milieu de culture et à la souche utilisée. Généralement, l'espèce *Lb. plantarum* a l'avantage de pouvoir atteindre des densités cellulaires élevées, ce qui est souhaitable pour des applications industrielles (Bindhumol et Nampoothiri, 2010).

Les courbes d'acidification des 7 souches sélectionnées présentées en **figure 29B**, affichent un profil d'acidification lent, caractérisé par une forme de courbe en plateau reflétant une faible réduction du pH, dont la différence, d'après l'analyse statistique, n'est pas significative ($p > 0,05$). En effet, l'espèce *Lb. plantarum* est connue pour être peu acidifiante, elle fait partie des cultures secondaires (NSLB) qui dominent la flore, lorsque l'environnement devient plus sélectif (faible teneur en sucre, diminution du pH et de l'activité de l'eau ainsi que l'augmentation de la teneur en NaCl) (Ciocia *et al.*, 2013).

Selon toujours le **tableau 13**, durant les 6 premières h de fermentation, la réduction du pH (Δ pH) du milieu de fermentation est inférieure à 0,2 unité, à l'exception de la souche LBIO10 pour laquelle le Δ pH est de 0,4. Certains auteurs considèrent, qu'au-delà d'un abaissement de pH de 0,3 unité en 6 h de fermentation, la souche peut être utilisée en tant que culture starter (Partovi *et al.*, 2018). Alors que d'autres, classent les cultures acidifiantes comme étant celles capables d'abaisser le pH de 0,4 en 3 h (Nieto-Arribas *et al.*, 2009). De même Cibik *et al.* (2010), estiment que les cultures lactiques à faible pouvoir acidifiant, sont celles réduisant le pH à 5,5 et 6 après 8 h de fermentation du lait, cas de nos souches.

Après 24 h de fermentation, seuls 3 isolats LBIO1, LBIO10, et LBIO33 ont abaissé le pH du milieu à la valeur 4,6, pH_i (isoélectrique) des caséines qui est aussi la valeur à laquelle le lait coagule. Par contre, les valeurs de pH des SMC fermentés par les autres isolats fluctuent entre 4,79 et 4,95.

Les résultats d'acidification obtenus, rejoignent ceux rapportés par Ngoufack *et al.* (2005) et Omafuvbe et Enyioha (2011), pour les souches *Lb. plantarum* 162RM et *Lb. plantarum* 3I₂, montrant une réduction du pH du lait inférieure à 0,2 unité après 6 h de fermentation. Nieto-Arribas *et al.* (2009), ont également enregistré de faibles variations de pH (0,4 à 0,98), pour la même espèce après 24 h de fermentation.

Ce faible potentiel d'acidification des souches testées n'est pas un inconvénient pour leur emploi comme cultures auxiliaires, car celles-ci ne doivent pas nécessairement contribuer à l'acidification, leur rôle est surtout lié au développement des attributs sensoriels (Briggiler-Marcó *et al.*, 2007 ; Zotta *et al.*, 2008 ; Ciocia *et al.*, 2013). Par exemple, lors de l'affinage du fromage, le profil d'acidification lent est particulièrement recherché, car une forte activité acidifiante, entraîne une baisse de l'humidité du caillé lactique, en raison d'une exsudation excessive (Briggiler-Marcó *et al.*, 2007; Delbès-Paus *et al.*, 2015 ; Domingos-Lopes *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2018), ont constaté que l'utilisation du *Lb. plantarum*, comme culture auxiliaire, seul ou en combinaison avec d'autres lactobacilles, pour la production du Cheddar améliore significativement les propriétés organoleptiques et fonctionnelles de ce dernier.

1.2 Caractérisation macroscopique des gels lactiques obtenus

Les gels lactiques générés par les souches sélectionnées après fermentation dans les mêmes conditions décrites en section 1.1., ont été caractérisés sur la base de leurs aspects macroscopiques.

Ainsi, 5 critères physiques ont été évalués à savoir : la texture évaluée selon 2 aspects granuleux ou fin, la synérèse naturelle notée par la présence ou l'absence de lactosérum en

surface du gel, la fermeté du gel évaluée par la fracture ou non du coagulum après retournement des tubes, la viscosité définie par le type d'écoulement (lent, rapide) et enfin la présence ou l'absence de l'aspect filant dans le lait.

Les résultats des caractéristiques macroscopiques des gels lactiques obtenus, ont été soumis à une analyse factorielle des correspondances (AFC), afin de sélectionner les souches productrices d'EPS générant des gels lactiques avec les meilleurs attributs physiques (annexe 9).

En figure 30 sont présentés les résultats de l'analyse selon deux axes factoriels.

D'après les résultats de l'AFC, les deux axes factoriels expriment 88,6 % d'inertie totale des données ; cela signifie que la variabilité totale du nuage des individus (ou des variables) est représentée dans ce plan. Les points variables et individus, sont projetés en fonction de leurs coordonnées sur le plan formé par les deux premiers axes.

Le premier axe est celui qui enregistre le taux le plus élevé d'inertie, soit 79,39 %. Cet axe oppose les deux paramètres viscosité (V) et synérèse (S), cela est lié au fait que, la présence des EPS entraîne une augmentation de la viscosité et une réduction de la synérèse (Zhang *et al.*, 2018 ; Ripari, 2019). Il affiche également les plus fortes valeurs de viscosité pour les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28. En revanche, la synérèse en surface est plus importante pour le gel SMCLBIO10. Toujours selon le même axe, les deux paramètres viscosité et texture semblent être liés. Cette corrélation, est souvent retrouvée dans les produits laitiers fermentés contenant des EPS (Feldmane *et al.*, 2013 ; Yilmaz *et al.*, 2015 ; Tarazanova *et al.*, 2018).

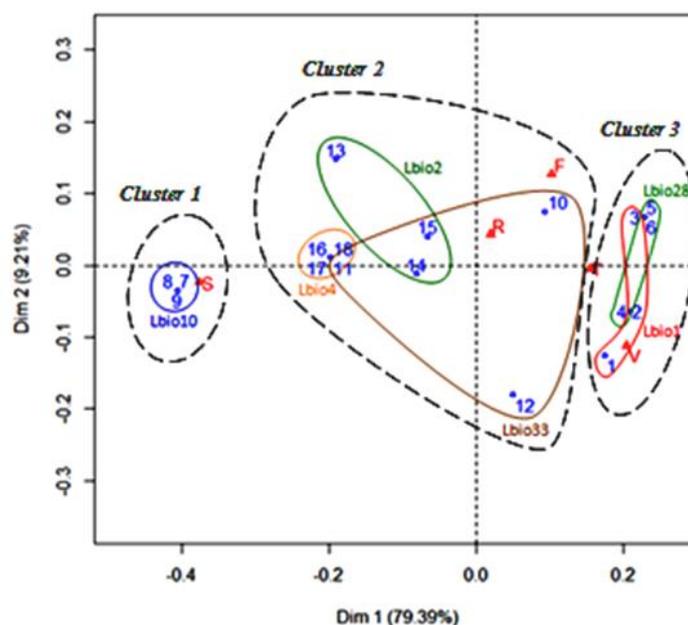


Figure 30. Analyse factorielle des correspondances (AFC) des caractéristiques qualitatives des 6 gels lactiques. (V : viscosité ; T : texture ; R : ropy ou filant ; F : fermeté ; S : synérèse).

Le deuxième axe, présentant seulement 9,21 % d'inertie, il oppose les deux paramètres fermeté (F) et viscosité (V). D'après Toba *et al.* (1990) et Hassan (2008), la présence de certains EPS dans le gel lactique améliore la viscosité, mais réduit les interactions entre les agrégats de protéines en l'occurrence les caséines, ce qui entraîne une diminution de la fermeté des gels lactiques. Bien que, d'autres travaux aient signalé une augmentation de la fermeté en présence d'EPS, cela reste dépendant des caractéristiques du polymère considéré et de sa cinétique de production (Berthold-Pluta et Garbowska, 2019 ; Ripari, 2019).

Cet axe montre également une hétérogénéité des réplicats des gels les plus visqueux SMCLBIO1 et SMCLBIO28. Cela peut s'expliquer par la variabilité de la production des EPS même si le dénombrement bactérien n'était pas significativement différent, entraînant une différence du comportement rhéologique. Quelques auteurs, ont rapporté des coefficients de variation de la production des EPS assez importants atteignant même les 30 % (van Marle et Zoon, 1995 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a ; Vaningelgem *et al.*, 2004), qui ont été justifiés par une instabilité du caractère de production (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Ryan *et al.*, 2015 ; Sanalibaba et Cakmak, 2016).

Selon le premier axe, trois *clusters* distincts rassemblent les souches lactiques en tenant compte des trois réplicats. Le premier *cluster* comprend la souche LBIO10, pour laquelle le niveau de synérèse est le plus élevé. Le deuxième *cluster* est formé par les souches LBIO2, LBIO33 et LBIO4, dont les gels lactiques présentent plus d'hétérogénéité par rapport aux variables définissant l'axe. Le troisième *cluster* est formé par les deux souches LBIO1 et LBIO28, qui ont généré des laits fermentés lisses, visqueux et crémeux.

Les résultats plus en détails notés en **tableau 14**, montrent que la texture fine a été enregistrée pour les 4 gels SMCLBIO1, SMCLBIO2, SMCLBIO10 et SMCLBIO28, le critère sélectif entre eux était le niveau de synérèse pour lequel les deux souches LBIO1 et LBIO28 ont généré des caillés lactiques avec très peu d'expulsion de lactosérum.

Pour certains gels lactiques, la présence de lactosérum a été observée à l'intérieur du caillé rendant ce dernier très friable, c'est le cas des SMC fermentés par les souches LBIO4, LBIO10, LBIO33 et de la souche témoin LBIO14 dont le gel est aussi friable et granuleux.

Par contre, les deux autres gels lactiques SMCLBIO1, et SMCLBIO28 sont fermes ou rigides et présentent une résistance à la fissure provoquée par le retournement des tubes, avec un gel sans exsudation interne de lactosérum. Ces deux souches rassemblées dans le premier *cluster*, et présentant les meilleurs attributs physiques des gels lactiques, ont donc été retenues pour la

suite du travail, après une analyse discriminatoire de leurs profils d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) voir section 4 du chapitre 1.

Tableau 14. Caractérisation préliminaire macroscopique des gels lactiques de SMC inoculés à 2 % par les souches de *Lb. plantarum* sélectionnées

Souche	SMC fermenté				
	Synérèse en surface	Filant	Viscosité	Fermeté	Texture
LBIO1	+/-	+	++	Semi-dur	Fine
LBIO2	+	+	++	Semi-dur	Fine
LBIO4	+/-	-	-	Friable	Granuleuse
LBIO10	+	-	+	Friable	Fine
LBIO28	+/-	+	++	Semi-dur	Fine
LBIO33	-	-	+	Friable	Granuleuse
LBIO14*	+	-	-	Friable	Granuleuse

Interprétations. Synérèse : + présence de lactosérum en surface du gel ; +/- peu de lactosérum en surface du gel ; - absence ; Filant : + présence ; - absence ; Viscosité : ++ résistance très élevée à l'écoulement ; + résistance élevée ; - faible résistance ; Fermeté du gel : Semi-dure : ne se brise pas ; friable : se brise facilement ; Texture: fine gel lisse ; granulé : grumeleux. (*) : souche témoin.

2. Croissance bactérienne, acidification et dosage des exopolysaccharides produits

De nouvelles fermentations ont été conduites dans le SMC en utilisant les deux souches précédemment sélectionnées LBIO1, LBIO28 et la souche témoin LBIO14. Les milieux ont été inoculés à raison de 5 % (v/v). La taille de l'inoculum a été réajustée à ce taux, en raison du faible potentiel d'acidification des souches.

Les fermentations ont été suivies pendant 48 h, durant lesquelles cinq prélèvements à 0 h, 14 h, 20 h, 24 h et 48 h ont été effectués. Les résultats des dénombrements des colonies sur gélose MRS et des mesures du pH enregistrées sont présentés en **figure 31**.

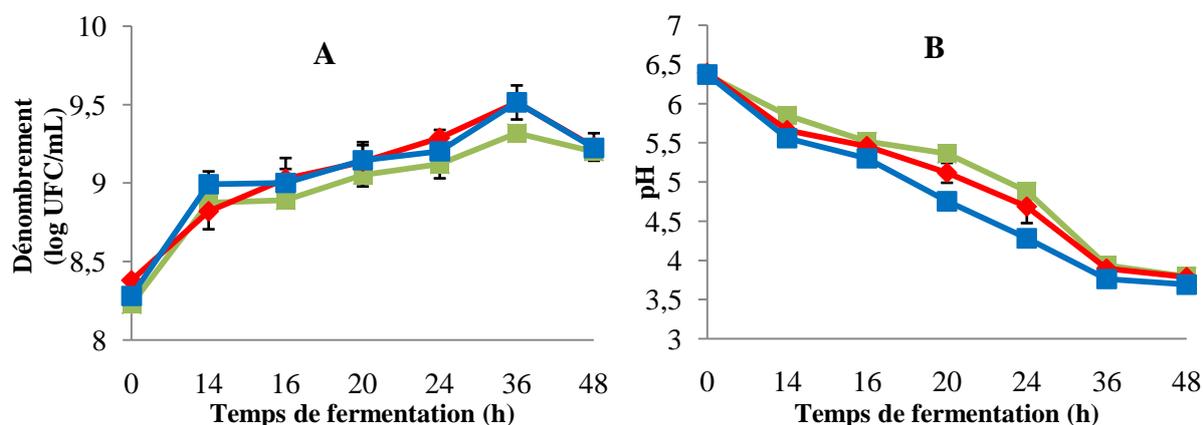


Figure 31. Cinétique de croissance (A) et d'acidification (B) des souches sélectionnées. LBIO1 (rouge), LBIO28 (bleu) et souche témoin LBIO14 (vert). Barres d'erreurs indiquent les écarts types.

Les résultats des dénombrements des colonies montrent que la biomasse des trois souches évolue au cours du temps avec la même allure, enregistrant une valeur moyenne maximale de 9,4 log UFC/mL, au bout de 36 h de fermentation. En outre, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été relevée dans les trois dénombrements bactériens au bout de 48 h.

En parallèle, les nouvelles données d'acidification indiquent toujours un faible pouvoir acidifiant, en dépit d'une augmentation du taux d'inoculation du milieu de fermentation SMC par les souches testées.

L'évolution du pH jusqu'à 20 h de fermentation, ne montre aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les trois SMC. Par contre au delà de 20 h, la souche LBIO28 paraît significativement ($p \leq 0,001$) plus acidifiante que les souches LBIO1 et LBIO14 pour une même charge bactérienne ($p > 0,05$). Après 48 h de fermentation, le pH des trois gels SMCLBIO1, SMCLBIO14 et SMCLBIO28 a atteint des valeurs inférieures à 4, avec une acidité significativement ($p \leq 0,001$) plus importante pour le dernier gel.

Au cours de la fermentation, le processus d'acidification entraîne une déstabilisation des micelles de caséines puis leur agrégation, en un réseau stable de protéines. Dans le cas étudié, il s'agit d'une coagulation lactique (en référence aux souches lactique), l'acidification déclenche la libération du calcium des micelles de caséine en fonction du pH, avec des réarrangement structurels ultérieurs (Mende *et al.*, 2020). Il est aussi important de souligner que, la texture dépend de la vitesse d'acidification, si elle est lente, le gel laitier sera lisse et homogène, par contre, s'il elle est rapide, cela favorisera l'obtention d'un gel laitier moins homogène (Haque *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les lyophilisats d'EPS ont été obtenus après extraction des EPS de 40 g du milieu de culture SMC par précipitation des protéines au TCA, dialyse des surnageants (seuil de coupure 12-14 kDa) et lyophilisation (**annexe 10**). D'après la **figure 32A**, les poids des lyophilisats d'EPS des deux souches LBIO1 et LBIO28 ont augmenté tout au long de la fermentation, et une importante fluctuation a été enregistrée entre les réplicats, particulièrement ceux de LBIO1 où, le coefficient de variation a atteint 20,2 % contre 13 % pour la seconde souche. Comme précédemment discuté en section 1.2 de ce chapitre, ces variations ont été également signalées par d'autres auteurs (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a).

Concernant la souche témoin LBIO14 le poids du lyophilisat semble être stable durant les 48 h, ce qui suggère que le polymère n'a pas été produit. Selon Ruas-Madiedo et Zoon (2003), certains témoins négatifs synthétisent d'infimes quantités d'EPS en dessous de

5 mg/L, de telles quantités ne sont pas détectables et n'ont pas d'effet sur la viscosité, ils sont donc considérés comme non producteurs.

La **figure 32B**, représente les poids des protéines résiduelles des lyophilisats (**annexe 11**). La purification partielle des EPS par précipitation au TCA, n'élimine pas en totalité les protéines du lait (Pachekrepapol *et al.*, 2017).

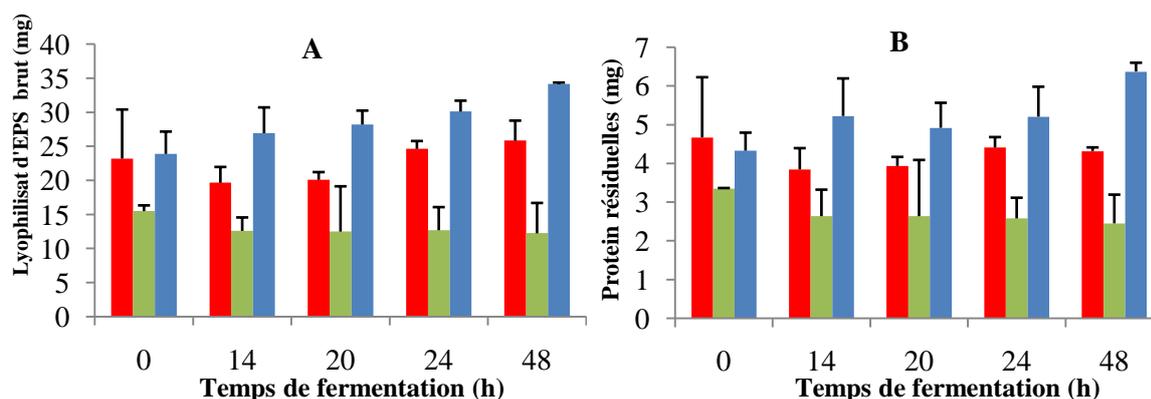


Figure 32. Poids des lyophilisats d'EPS bruts extraits à partir de 40 g de SMC fermenté (A) et des protéines résiduelles (B) obtenus aux différents temps de fermentation du milieu SMC par les souches sélectionnées LBIO28 (bleue), LBIO1 (rouge) et souche témoin LBIO14 (verte).
Barres d'erreurs indiquent les écarts types.

Selon la même figure, la production des EPS par les deux souches LBIO1 et LBIO28 est enregistrée tout au long de la fermentation, et semble être associée à la croissance bactérienne. Cette cinétique de production déjà décrite pour les EPS, notamment ceux de l'espèce *Lb. plantarum* est celle des métabolites primaires (Wang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2018 ; Zehir Şentürk *et al.*, 2019). Elle est donc favorisée par des conditions optimales de croissance (température, pH et ratio carbone/azote) (Pham *et al.*, 2000).

La plus grande quantité de polymère produite par les deux souches LBIO1 et LBIO28, a eu lieu au cours des 24 premières heures. Elle se poursuit après jusqu'à la fin de la fermentation à 48 h, mais les quantités synthétisées sont plutôt minimes. Cela est sans doute lié au faible taux de croissance des souches enregistré entre 36 h et 48 h (**figure 31A**).

Ces mêmes observations ont été rapportées par Wang *et al.* (2015), pour la souche *Lb. plantarum* YW11 cultivée sur bouillon SDM, où la synthèse du polymère s'est légèrement maintenue jusqu'à 56 h de fermentation. La souche *Lb. plantarum* EP56 affiche également la même cinétique de production du polymère (Tallon *et al.*, 2003).

De nombreuses études, ont en revanche noté la dégradation du polymère lors des fermentations prolongées (au-delà de 30 h), par des glycohydrolases libérées lors de la lyse

cellulaire (Yang *et al.*, 2010 ; Tang *et al.*, 2017 ; Abid *et al.*, 2018). Ces enzymes libèrent des sucres réducteurs à partir des polymères, et ont donc un effet négatif sur le rendement en EPS, ainsi que sur ses propriétés viscosifiantes (Zannini *et al.*, 2016).

D'après Pham *et al.* (2000), l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu de culture entraîne l'activation des glycohydrolases, les deux fractions caractérisées par ces mêmes auteurs α -D-glucosidase et β -D-glucuronidase produites par la souche *Lb. rhamnosus* R ont montré une très forte activité catalytique à pH inférieur à 5 et une température supérieure à 30°C. De même De Vuyst *et al.* (1998), ont confirmé que l'activité de ces enzymes est fortement influencée par le pH et la température du milieu. Amatayakul *et al.* (2006), ont proposé un abaissement de la température à 4°C afin de bloquer l'activité des glycohydrolases. L'étude réalisée par Li *et al.* (2014), a démontré cet effet sur l'EPS produit par la souche *Lb. plantarum* 70810 dans le lait de soja. Selon De Vuyst *et al.* (1998) et Zhang *et al.* (2013), la non dégradation des EPS, observée dans notre cas, serait liée à l'absence d'activité de la glycohydrolase dans le milieu de culture qui dépend à la fois des conditions physico-chimiques du milieu de culture et de la souche utilisée. D'après Petry *et al.* (2003), la présence des caséines dans le milieu protégerait le polymère de la dégradation. Par contre, très peu d'auteurs évoquent son utilisation comme substrat (Purwandari *et al.*, 2007).

Les rendements en EPS des deux souches LBIO1 et LBIO28 dans le SMC en 24 h de fermentation, ont été estimés à 42,36 mg PDM/L et 133,08 mg PDM/L, respectivement. En fin de fermentation soit à 48 h, les deux souches ont enregistré une production de 74 mg PDM/L et 205,18 mg PDM/L dans le même ordre. Il est à rappeler que, les rendements ont été établis après déduction des quantités résiduelles des protéines et des poids des lyophilisats à temps 0 h.

Pour des souches de la même espèce *Lb. plantarum* cultivées en bouillon MRS, Zotta *et al.* (2008) ont rapporté des rendements en EPS variant entre 140 et 297 mg/L. Sur ce même milieu Jiang *et al.* (2016), ont obtenu une production de 426 mg/L par la souche *Lb. plantarum* WLPL04. Par contre, sur du lactosérum les rendements en EPS rapportés sont plus bas. En effet, Wang *et al.* (2010) et Tsuda et Miyamoto (2010), ont obtenu des rendements de 75,57 mg/L et 74 mg/L produits par *Lb. plantarum* KF5 et par une souche mutante *Lb. plantarum* 301102S, respectivement. Alors qu'en optimisant les conditions de culture et de production, Zehir Şentürk *et al.* (2019), ont enregistré des rendements allant de 120 à 400 mg/L. La comparaison entre ces différents niveaux de production d'EPS reste toutefois relative, car les rendements dépendent de la souche productrice, des conditions de

culture (pH, température, composition du milieu), mais aussi de la méthode utilisée pour isoler et quantifier le polymère (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005 ; Notararigo *et al.*, 2013 ; London *et al.*, 2015 ; Schmidt *et al.*, 2016). En général, les quantités d'EPS produites dans le lait, sont en dessous de 1 g/L en condition non optimisées (Imran *et al.*, 2016 ; Pachekrepapol *et al.*, 2017). Bien que, ces rendements soient faibles, ils influencent considérablement la rhéologie des produits laitiers fermentés, ce qui les rend intéressants pour des applications industrielles (Duboc et Mollet, 2001).

Par ailleurs, la structure finale d'un produit laitier fermenté par des souches productrices d'EPS, dépend aussi des interactions du polymère avec le réseau de caséines. La formation du gel débute au point de gélification, c'est-à-dire, dès l'initiation de l'agrégation des micelles de caséines, soit à pH 5,2-5,4 pour une fermentation conduite à 30°C (Ruas-Madiedo et Zoon, 2003 ; Lee et Lucey, 2010).

Cet intervalle de pH a été atteint par les deux souches LBIO28 et LBIO1 entre 16 h et 18 h de fermentation (voir **figure 31B**) sans aucune différence significative ($p > 0,05$), ce qui indique qu'au moment de la prise du gel le seul facteur pouvant influencer la texture était la présence d'EPS. En associant les résultats du dosage gravimétrique des EPS, de la biomasse et de l'acidification du SMC (**figures 31 et 32**), après 20 h de fermentation la souche LBIO28 a produit significativement ($p \leq 0,05$) plus de polymère, comparativement à la souche LBIO1, en ayant le même dénombrement ($p > 0,05$), et avec des valeurs de pH similaires ($p > 0,05$). Quant à la souche témoin LBIO14, elle a affiché le même niveau de biomasse, mais avec une activité acidifiante moindre ($p \leq 0,05$).

En revanche, à 24 h de fermentation du SMC, la souche LBIO28 a présenté une activité acidifiante significativement plus intense ($p \leq 0,05$) par rapport à celle de la souche LBIO1 pour un même niveau de biomasse ($p > 0,05$), la synthèse du polymère est aussi plus importante ($p \leq 0,001$). Ces résultats suggèrent que les deux activités métaboliques, à savoir l'acidification et la biosynthèse du polymère sont liées, ce qui est assez logique étant donné qu'elles utilisent les mêmes ressources en carbone, mais elles restent dépendantes de la souche utilisée (Yilmaz *et al.*, 2015).

Concernant la souche témoin LBIO14, celle-ci semble avoir un pouvoir d'acidification moins important du milieu SMC, tout en enregistrant le même niveau de biomasse que les deux autres souches.

En fin de fermentation soit à 48 h, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'apparaît dans les dénombrements bactériens des trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14 (témoin), par contre

les valeurs de pH des milieux SMC sont significativement différentes ($p \leq 0,001$). La souche LBIO28 s'est révélée être la plus acidifiante, elle a également synthétisé plus de polymère que la souche LBIO1.

Il est important de souligner que l'accumulation de l'EPS dans un produit laitier est essentielle à l'amélioration de sa viscosité et de sa texture, bien que d'autres caractéristiques chimiques du polymère telles que sa masse molaire et sa ramification soient aussi à considérer (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b).

3. Analyses par chromatographie d'exclusion SEC-MALLS des lyophilisats d'EPS

3.1 Quantification des exopolysaccharides

La chromatographie d'exclusion (SEC-MALLS) a été également employée afin de quantifier les EPS synthétisés par les deux souches lors de la fermentation du SMC. Cette même analyse a aussi concerné la souche témoin LBIO14, pour les raisons précédemment évoquées (témoin produisant des quantités infimes).

Selon les résultats de l'analyse chromatographique présentés en **figure 33**, les polymères glucidiques ont été détectés par le réfractomètre en début de fermentation et ce tout au long de la croissance bactérienne pour les deux souches LBIO1 et LBIO28. La biosynthèse du polymère est donc associée à la croissance bactérienne, et affiche une cinétique d'un métabolite primaire, ce qui est en adéquation avec les précédents résultats. Par contre, dans le lyophilisat de la souche témoin LBIO14, aucune présence d'EPS n'a été enregistrée par le détecteur RI (réfractomètre).

Selon toujours les mêmes données, la souche LBIO28 a produit en 24 h de fermentation dans le SMC plus de polymère que la souche LBIO1. Autour du point de gélification, soit à 20 h de fermentation environ 43,6 % d'EPS (rapporté au total produit en 48 h) sont produits par LBIO28, contre 32,3 % pour la souche LBIO1. Cela signifie, qu'en plus d'une concentration en polymère plus élevée, ce dernier était probablement mieux réparti, en raison de sa facilité de diffusion avant la prise du gel. À 24 h, la quantité d'EPS produite a atteint 88 % pour la souche LBIO28, contre 66 % pour LBIO1 pour des valeurs de pH de $4,26 \pm 0,03$ et $4,6 \pm 0,2$, respectivement.

Au-delà de 24 h et jusqu'à 48 h de fermentation, la synthèse des polymères se poursuit mais lentement pour les deux souches, due au ralentissement de la croissance bactérienne enregistrée pour des valeurs de pH situées autour de 3,9 - 3,76. Ce dernier, peut être dû à l'effet inhibiteur qu'exerce les acides organiques particulièrement l'acide lactique issus du métabolisme du lactose sur la croissance bactérienne, soit à l'épuisement des nutriments dans

le milieu (Imran *et al.*, 2016 ; Singhvi *et al.*, 2018). Les travaux d’Ermis *et al.* (2020), axés sur l’optimisation de la production des EPS, suggèrent que le pH optimal du milieu de production devrait être proche de la neutralité, soit aux alentours de pH \approx 6,5. De telles observations ont été également rapportées auparavant par d’autres auteurs avec des valeurs comprises entre 5,7 et 6,38 (Sánchez *et al.*, 2006 ; Haj-Mustafa *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2017).

À 48 h (fin de fermentation), les quantités de polymères synthétisées par les deux souches ne présentaient pas de différence significative ($p > 0,05$).

Par ailleurs, l’abondance relative du polymère, représente la concentration de celui-ci rapportée au total des concentrations des pics détectés dans le lyophilisat d’EPS brut. Selon la même figure, ces valeurs augmentent au cours de la fermentation, atteignant une valeur maximale de 8 % au bout de 48 h. Cela signifie que le lyophilisat d’EPS contient une fraction importante de contaminants, essentiellement des protéines du lait, qui interfèrent avec les EPS lors du dosage. Bennama *et al.* (2012), ont également évoqué un taux de contaminants après analyse chromatographique atteignant 96 %. L’extraction du polymère à partir de milieux complexes comme le lait, présente en général un taux de contaminants assez important (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).

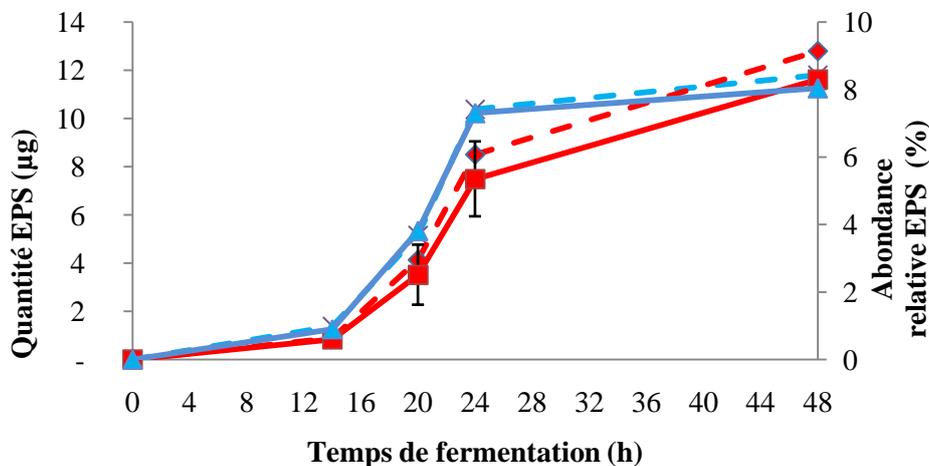


Figure 33. Quantification par SEC-MALLS des EPS produits par les deux souches cultivées sur SMC LBIO1 (rouge) et LBIO28 (bleu). Ligne continue : quantité d’EPS ; ligne discontinue : abondance relative. Barres d’erreurs indiquent les écarts types.

L’estimation du rendement en EPS par la méthode gravimétrique, a donc été nettement révisée à la baisse après l’analyse par SEC-MALLS des lyophilisats d’EPS bruts. Pour la souche LBIO28, le rendement de production est passé de 133,08 à 31 mg PDM/L, tandis que pour la souche LBIO1 de 42,36 à 21 mg PDM/L en 24 h de fermentation.

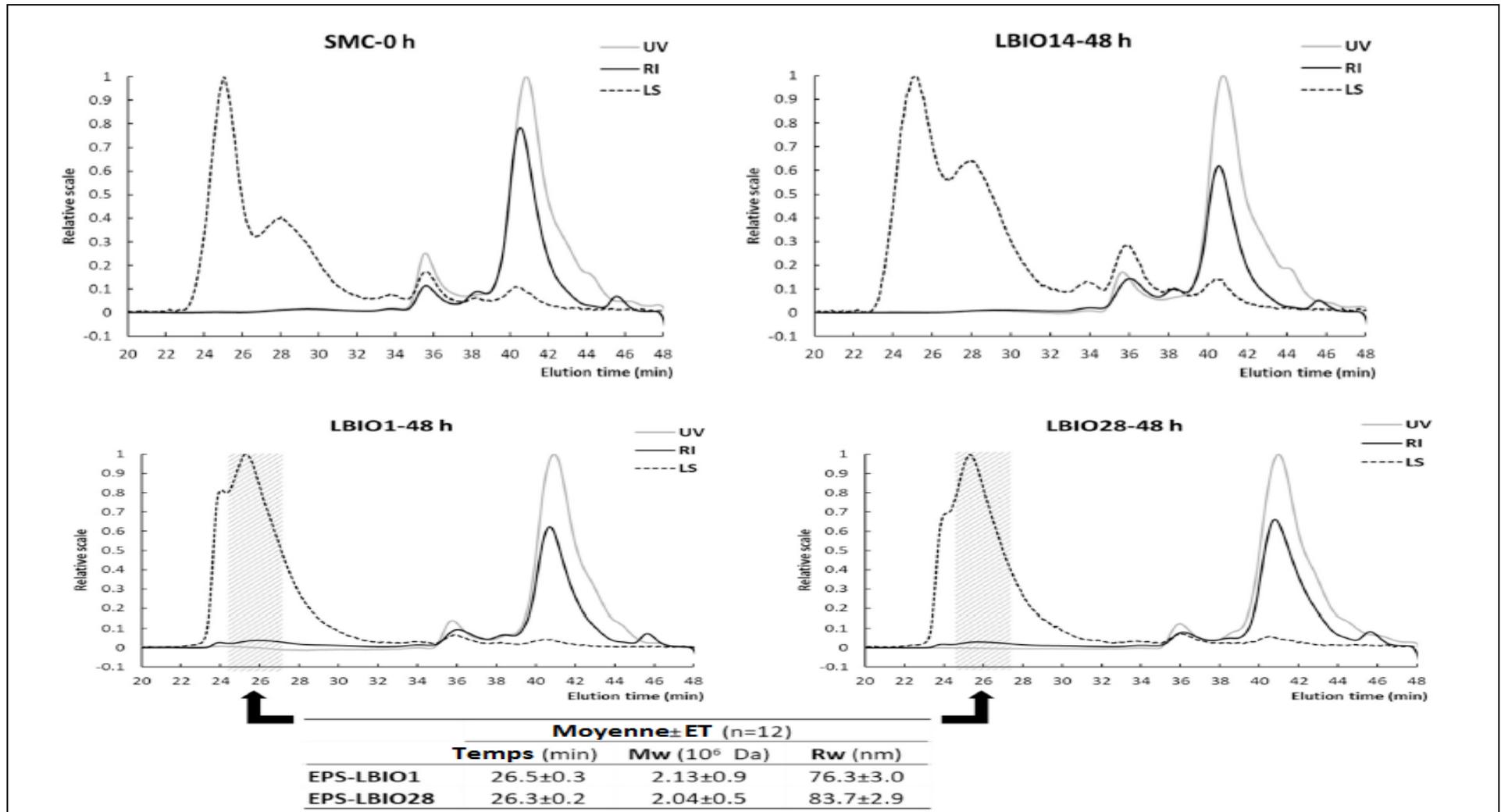


Figure 34. Chromatogrammes de la SEC-MALLS des lyophilisats d’EPS extraits des SMCLBIO1, SMCLBIO28 et SMCLBIO14 (témoin) après 48 h de fermentation. Le chromatogramme SMC non inoculé à t= 0 h a été utilisé comme référence. LS : diffusion de la lumière, RI : indice de réfraction, UV : ultraviolet 280 nm.

Des quantifications d'EPS par analyse SEC-MALLS rapportées par Burns *et al.* (2011), ont également indiqué des valeurs du même ordre de grandeur pour la souche *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193 avec 24 mg/L dans le lait. De même, Bennama *et al.* (2012) ont signalé une baisse importante des rendements gravimétriques en EPS de la souche *Streptococcus thermophilus* BN1, de 5 à 10 fois, par rapport aux rendements chromatographiques (SEC-MALLS).

3.2 Détermination des poids moléculaires des exopolysaccharides

Les chromatogrammes montrés en **figure 34**, représentent les résultats de l'analyse par SEC-MALLS des lyophilisats bruts d'EPS des deux souches LBIO1, LBIO28, et de la souche témoin LBIO14 obtenus après 48 h de fermentation du SMC. Un chromatogramme de SMC non inoculé, a été utilisé comme référence.

L'analyse des chromatogrammes révèle, que les lyophilisats contiennent en plus des EPS, des protéines provenant du lait. Ces dernières, ont été signalées par le détecteur à barrettes de diodes PDA à 280 nm, par contre les EPS ont été identifiés par le détecteur à indice de réfraction RI (Khanal et Lucey, 2018).

D'après la même figure, le profil du chromatogramme du lyophilisat de la souche témoin LBIO14 à 48 h, est similaire à celui du SMC non inoculé. Cela confirme à nouveau l'incapacité de la souche de contrôle LBIO14 à produire des EPS.

En revanche, la séparation par fractionnement des constituants des lyophilisats bruts d'EPS des souches LBIO1 et LBIO28, a permis de déceler la présence de pics détectés par le signal RI du réfractomètre, et non pas, par le détecteur à protéines PDA. Ces pics, correspondent bien aux EPS synthétisés au cours de la fermentation par les deux souches. Ils ont été enregistrés, pour des temps d'élution situés autour des 26 min (zones hachurées sur la figure 34), et ce, pour les trois répétitions des cinq prélèvements analysés aux temps 0 h, 14 h, 20 h, 24 h et 48 h. Cela signifie, que le poids moléculaire des polymères détectés, est resté constant tout au long de la fermentation.

Les poids moléculaires moyens des polymères glucidiques synthétisés par les deux souches LBIO1 et LBIO28, ont été estimés par une moyenne de 12 répétitions à $2,13 \pm 0,9 \cdot 10^6$ Da et $2,04 \pm 0,5 \cdot 10^6$ Da, avec un rayon de giration de $76,3 \pm 3,0$ nm et $83,7 \pm 2,9$ nm, respectivement. Ce dernier renseigne sur la taille ou encore la longueur du polymère glucidique, il dépend de son poids moléculaire et de la flexibilité de sa chaîne. Ces valeurs correspondent à des polymères de haut poids moléculaires synthétisés par le genre *Lactobacillus*. Liu *et al.* (2017), ont rapporté que les polymères de poids moléculaire élevés

améliorent non seulement la texture du lait fermenté mais semblent avoir une activité anti-tumorale plus importante que ceux de faible poids. La plupart des travaux ont rapportés des valeurs de poids moléculaires des EPS de l'espèce *Lb. plantarum* inférieurs à 10^6 Da (Mozzi *et al.*, 2006), tels que l'EPS116 produit par la souche *Lb. plantarum* NCU116 estimé à $3,84.10^5$ Da (Zhou *et al.*, 2017), celui produit par la souche *Lb. plantarum* YW11 à $1,1.10^5$ Da (Zhang *et al.*, 2017), l'EPS de *Lb. plantarum* MTCC 9510 à $2,83.10^5$ Da (Bindhumol et Nampoothiri, 2013) ou encore le polymère de la souche *Lb. plantarum* C88 à $1,15.10^6$ Da (Zhang *et al.*, 2013). D'autres espèces du genre *Lactobacillus*, excrètent des polymères de poids moléculaires similaires mais rarement supérieurs à ceux rapportés dans la présente étude, cas des deux EPS produits par les souches *Lb. paraplantarum* BGCG11 ($2,2.10^6$ Da) (Nikolic *et al.*, 2012) et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 ($5,0.10^6$ Da) (Van Calsteren *et al.*, 2015).

D'autre part, un deuxième pic a été enregistré par le détecteur RI pour les deux lyophilisats EPSLBIO28 et EPSLBIO1, au temps d'élution situé entre 34 et 38 minutes. Ce dernier peut être assimilé à un second polymère de poids moléculaire évalué entre 10^4 et 10^5 Da. Mais en raison de la présence d'un autre pic identifié au même temps d'élution par le détecteur de protéines PDA à 280 nm, la présence d'un second polymère ne peut être confirmée avec certitude.

La production de deux polymères différents, chez les BL est une caractéristique relativement courante. Plusieurs auteurs l'ont déjà signalé, lesquels peuvent être différents soit par leurs composition chimique (Dertli *et al.*, 2013 ; Mayer *et al.*, 2020), ou par leurs types capsulaire ou libre (Tallon *et al.*, 2003). Mais dans certains cas, le second polysaccharide identifié peut résulter de l'hydrolyse partielle du même polymère lors d'une fermentation prolongée (Salazar *et al.*, 2009).

4. Analyse des acides organiques produits après fermentation du milieu par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) des acides organiques, produits par les trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14 dans le SMC après une fermentation de 36 h à 30°C, a révélé que l'acide lactique est le principal produit du métabolisme du lactose. Des quantités infimes d'acides organiques volatils sont aussi formées, il s'agit de l'acide acétique et de l'acide formique **tableau 15**.

Ces résultats concordent avec la caractérisation biochimique (section 3- chapitre1) et confirment que les trois isolats sont des hétérofermentaires facultatifs, qui utilisent les

hexoses *via* la voie homolactique (glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof- Parnas). Ils sont aussi capables de coder une phosphocétolase inductible, leur permettant de fermenter les pentoses avec production d'autres acides organiques en plus de l'acide lactique (Baglio, 2014). Selon toujours le **tableau 15**, la quantité d'acide lactique produite par la souche LBIO14 après 36 h de fermentation du SMC est plus faible ($p \leq 0,05$), c'est donc l'isolat le moins acidifiant, ce qui est en accord avec les résultats de la section 3 de ce chapitre.

La faculté des BL à produire des acides organiques, principalement de l'acide lactique, exerce un effet inhibiteur sur les microorganismes pathogènes et d'altérations assurant une meilleure conservation des aliments (Galle et Arendt, 2011). À faible pH, ces acides sous leur forme non dissociée (dépend du pKa de l'acide) sont liposolubles, ce qui leur permet de diffuser passivement à travers la membrane cellulaire et d'atteindre le cytoplasme des agents pathogènes. Ils se dissocient ensuite au niveau du cytoplasme et libèrent des protons provoquant une chute du pH interne qui inhibe les principaux processus métaboliques et altère la perméabilité membranaire des bactéries cibles (Privat et Thonart, 2011; Özcelik *et al.*, 2016).

Tableau 15. Production d'acides organiques (mM) dans le SMC après 36 h de fermentation par les souches LBIO1 et LBIO28 productrices des EPS et la souche LBIO14 témoin.

Souches	Moyenne \pm ET (n=6)		
	Acide lactique**	Acide formique	Acide acétique
LBIO1	280,1 \pm 15,4 ^b	0,52 \pm 0,14	14,2 \pm 3,7
LBIO28	277,3 \pm 4,94 ^b	0,54 \pm 0,10	15,6 \pm 3,4
LBIO14*	252,7 \pm 14,9 ^a	0,43 \pm 0,11	15,1 \pm 2,0

* : souche témoin ; n : nombre de réplicats. ET : écart type.

Les moyennes qui ne partagent pas une lettre commune sont significativement différentes (**p < 0,01).

D'autre part d'un point de vue sensoriel, la production d'acides confère aux produits fermentés le goût, qui résulte d'un équilibre entre les différents composants métaboliques générés. La production par les trois isolats de faibles quantités d'acide acétique en comparaison à l'acide lactique est une autre caractéristique souhaitable qui permet de préserver les propriétés organoleptiques du lait fermenté, car des niveaux élevés de cet acide confèrent un goût vinaigré, non apprécié par les consommateurs (Chen *et al.*, 2017).

En général, la composition en acides organiques produits dans le SMC se rapproche de celle rapportée par Salazar *et al.* (2009) pour des souches de la même espèce. En revanche, la production d'acide lactique par la souche *Lb. plantarum* ZDY2013 est plus importante sur

bouillon MRS. Cela peut être attribué, à la composition du milieu de culture et à son abondance en peptides, comparativement au SMC (Zhao *et al.*, 2018). Cependant, Khalil *et al.* (2018) ont signalé des niveaux presque équivalents de production des acides lactique et acétique par les deux souches codées *Lb. plantarum* DUR5 et DUR8, en plus de quantités minimales d'acide butyrique, d'acide isobutyrique, d'acide caproïque et d'acide propionique. Özcelik *et al.* (2016), en utilisant différents bouillons de culture en plus du MRS, ont démontré que la production d'acides organiques par les BL dépendait à la fois de la composition du milieu de culture et de la souche employée.

5. Viscosité apparente des gels lactiques SMC brassés

Les fermentations du milieu SMC en mode batch par les trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14, ont été réalisées avec un taux d'inoculation de 5 % jusqu'à atteinte du pH $4,5 \pm 0,1$. Les mesures de viscosité des SMC fermentés et brassés ont été réalisées à 4°C, à l'aide de l'entonnoir Posthumus montré en **figure 35**.



Figure 35. Photographie montrant l'aspect du gel brassé à l'intérieur de l'entonnoir Posthumus. Gel lisse produit par la souche LBIO28 (droite), gel rugueux produit par la souche témoin LBIO14 (gauche).

Les viscosités apparentes des trois SMC fermentés et brassés sont significativement différentes ($p \leq 0,05$) (**figure 36**). La viscosité apparente du gel SMCLBIO28 est significativement plus élevée ($p \leq 0,05$), que celles des gels SMCLBIO14 et SMCLBIO1. Bien que ce dernier, soit plus visqueux, par rapport au gel témoin SMCLBIO14 (**annexe 12**). Selon plusieurs auteurs, l'emploi de souches productrices d'EPS améliore considérablement les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés notamment leurs viscosités (Behare *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2014 ; Ikeda *et al.*, 2019).

D'après les résultats de la section 3, la souche LBIO28 produit plus d'EPS, que la souche LBIO1 après 24 h de fermentation. Cette différence pourrait être à l'origine d'une viscosité plus importante enregistrée pour le gel SMCLBIO28. Les travaux antérieurs de

London *et al.* (2015), de Han *et al.* (2016), et de Bancalari *et al.* (2020), ont pu établir une corrélation positive entre la viscosité et les concentrations en EPS des yaourts. D'après Ali *et al.* (2019), la présence d'une quantité plus importante d'EPS induirait plus d'interactions avec les protéines du lait, ce qui augmenterait sa viscosité. Seulement, cette corrélation n'a pas toujours été retrouvée, elle reste dépendante des caractéristiques chimiques du polymère considéré, et de ses interactions moléculaires avec les composants du milieu de culture, principalement avec les protéines (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a ; Zotta *et al.*, 2008 ; Feldmane *et al.*, 2013 ; Mende *et al.*, 2013 ; Schmidt *et al.*, 2016 ; Oleksy et Klewicka, 2018). En effet, les polymères produits par les deux souches filantes avaient le même poids moléculaire, mais le rayon de giration du polymère produit par LBIO28 (83 nm) était plus grand que celui de la souche LBIO1 (76 nm). Cela peut bien expliquer la viscosité plus élevée du gel brassé SMCLBIO28, étant donné que ce paramètre physique est corrélé au rayon de giration et au poids moléculaire du polymère (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).

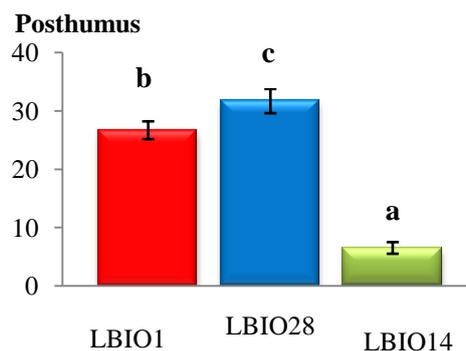


Figure 36. Viscosité apparente des SMC fermentés et brassés par les trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14 (témoin) mesurée par l'entonnoir Posthumus. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p \leq 0,05$). Barres d'erreurs indiquent les écarts types.

La viscosité des gels lactiques brassés, est en fait assez complexe à interpréter étant donné que ce sont des solutions non newtoniennes. De plus, elle n'est pas seulement influencée par l'EPS libéré, mais aussi par d'autres produits métaboliques excrétés dans le milieu de culture, comme les acides organiques, en particulier l'acide lactique qui est aussi un facteur déterminant des caractéristiques rhéologiques du produit (Cerning, 1990). L'étude menée par Zehir Şentürk *et al.* (2019) sur l'effet de plusieurs facteurs sur la viscosité du bouillon MRS inoculé par des souches de l'espèce *Lb. plantarum*, a conclu que la viscosité était généralement plus élevée en milieu acide qu'en milieu neutre, ce qui est important pour les propriétés physicochimiques des produits fermentés.

Par ailleurs, le brassage des SMC fermentés par des cultures filantes déstructure le réseau protéique, créant ainsi un nouveau réseau constitué par des protéines enchevêtrées. Seulement l'agitation n'induit pas un mélange entre les caséines (protéines du lait) et les EPS, mais plutôt une ségrégation de ces deux composants (Hassan *et al.*, 2002). Les EPS contenus dans les pores, sont libérés par l'agitation et interagissent plus dans la phase sérique (Surber *et al.*, 2019). Il en résulte une amélioration des propriétés de liaison à l'eau, de la consistance et de la viscosité du produit (Elbanna *et al.*, 2015 ; Guénard-Lampron *et al.*, 2019). Le type d'EPS produit influe également sur la viscosité des gels brassés. Faber *et al.* (1998), ont démontré que la viscosité Posthumus des gels brassés générés par des cultures filantes était plus importante que celle des cultures mucoïdes. Selon Cirrincione *et al.* (2018), la présence de lactose dans le milieu de culture favoriserait la production de polymère filant.

La macrostructure des gels obtenus présentée en **figure 37** montre un aspect lisse, fin et homogène des gels lactiques brassés SMCLBIO1 et SMCLBIO28. Par contre, le gel de la souche témoin SMCLBIO14 présente un aspect granuleux, avec une nette séparation du lactosérum.



Figure 37. Aspect macroscopique des SMC fermentés et brassés. SMCLBIO28 filant (gauche), SMCLBIO1 aspect lisse et homogène (haut à droite), SMCLBIO14 granuleux (bas à droite).

6. Viscosité apparente des gels lactiques SMC fermes (non brassés)

Les résultats de la viscosité des gels lactiques SMC non brassés mesurée à 25°C en fonction du gradient de cisaillement (moyenne de trois répétitions) sont présentés en **figure 38**.

D'après ce graphe, deux régions sont distinguées, la première région est caractérisée par une évolution de la viscosité apparente qui est inversement proportionnelle à la vitesse de cisaillement. Ce comportement rhéologique est caractéristique des fluides rhéofluidifiant ou pseudoplastiques obéissant à la loi de Ostwald de Waele (*power law*) donnée par la formule suivante (Kasapis et Bannikova, 2017) :

$$\tau = K\dot{\gamma}^n$$

Où : τ est la contrainte de cisaillement (Pa), K est l'indice de consistance (Pa s^n), $\dot{\gamma}$ est la vitesse de cisaillement (s^{-1}) et n l'indice d'écoulement (sans dimension).

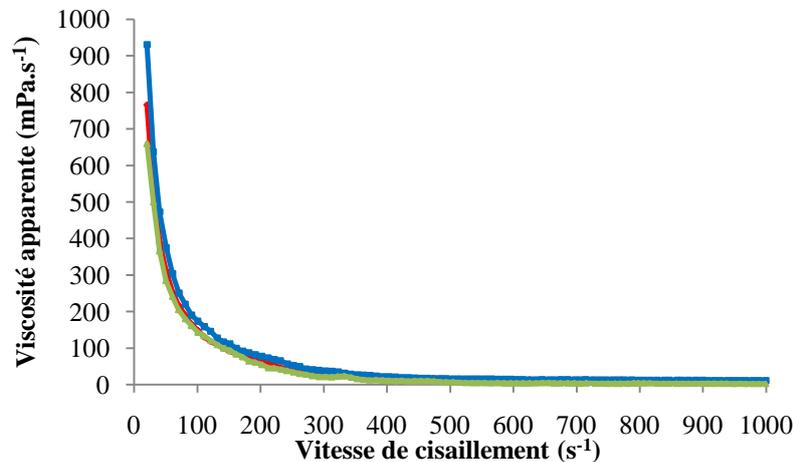


Figure 38. Viscosité apparente mesurée à 25°C en fonction de la vitesse de cisaillement des SMCLBIO1 (rouge), SMCLBIO28 (bleu) et SMCLBIO14 témoin (vert). Les résultats correspondent à la moyenne de trois répétitions.

La seconde région est observée pour des taux de cisaillement élevés (supérieurs à 300 s^{-1}), où le profil rhéologique du gel pseudoplastique, tend vers un comportement newtonien. La viscosité devient alors constante avec un segment de la courbe en forme de plateau, ce qui est commun pour de nombreux fluides pseudoplastiques. En effet, plusieurs auteurs, Charchoghlyan *et al.* (2017), Radhouani *et al.* (2018), Vukic *et al.* (2018) et Miao *et al.* (2015), ont rapporté les mêmes observations indiquant que la viscosité des gels lactiques diminue très faiblement à des taux de cisaillement élevés.

La fermentation des SMC par les souches lactiques a en effet, entraîné d'importants changements dans la texture du milieu, en raison de l'acidification et de la production de polysaccharides filants (Folkenberg *et al.*, 2006). Ces deux processus modifient le comportement rhéologique de la matrice laitière, c'est-à-dire son aptitude à la déformation et à l'écoulement.

Lorsque le gel lactique est soumis au cisaillement, il y a une déstructuration progressive et irréversible du réseau protéique, jusqu'à destruction complète du réseau tridimensionnel.

À faibles vitesses de cisaillement, il y a d'abord une rupture entre les chaînes de caséines non associées aux EPS, lesquelles se déplacent dans la même direction et glissent les unes sur les

autres (Surber *et al.*, 2019). À mesure que le cisaillement se poursuit et s'intensifie, les EPS sont alors séparés des cellules bactériennes, ce qui entraîne la formation de nouvelles extrémités collantes entre les brins d'EPS, ralentissant ainsi la dégradation structurelle. Lorsque le cisaillement devient plus important, l'énergie est suffisante pour briser la partie du réseau de caséine qui est associée aux EPS (Hess *et al.*, 1997 ; Sodini *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la vitesse de cisaillement de 300 s^{-1} , a été retenue comme seuil de comparaison de la viscosité apparente de la présente étude, en se référant aux travaux de Hamet *et al.* (2015) sur la même espèce *Lb. plantarum* cultivée dans les mêmes conditions. Il est aussi important de rappeler, que les mesures de viscosité ont été réalisées à la même température de 25°C . Il est bien connu que, l'augmentation de la température favorise le désenchevêtrement des macromolécules, d'où une diminution de la viscosité (Kasapis et Bannikova, 2017).

Les résultats du test Post-hoc Dunnett indiquent, une différence hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les viscosités apparentes des deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28 et de celle du gel de la souche témoin SMCLBIO14.

Les gels des deux souches filantes sont en effet plus visqueux, et ont donc plus de structure qui peut être détruite lors du cisaillement (Surber et Jaros, 2019). Le rôle du polymère glucidique dans ce cas précis, est de prévenir la rupture du réseau protéique grâce aux interactions EPS-protéines (Hess *et al.*, 1997).

Selon le **tableau 16**, à la vitesse de cisaillement de 300 s^{-1} , les viscosités des trois gels SMC sont significativement différentes ($p \leq 0,001$). Le gel SMCLBIO14, possédait une très faible viscosité ($19,05 \pm 6,17 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$), comparativement à celles des deux autres gels lactiques. En effet, la viscosité apparente du SMCLBIO1 était de $38,17 \pm 1,05 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$, se rapprochant des valeurs de viscosités rapportées par Hamet *et al.* (2015) situées entre 26 et $38 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ pour l'espèce *Lb. plantarum*. En revanche, le SMCLBIO28 présentait une viscosité plus élevée, estimée à $50,42 \pm 5,83 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$.

D'après les résultats de la section 3.2, les polymères produits par les deux souches LBIO1 et LBIO28 analysés par la SEC-MALLS, sont de haut poids moléculaire dépassant 10^6 Da . Alors que Hamet *et al.* (2015), ont rapporté des poids moléculaires inférieurs à 10^6 Da pour 14 souches de la même espèce, ce qui pourrait bien expliquer les viscosités importantes enregistrées particulièrement celle du gel SMCLBIO28. Cette corrélation positive entre le poids moléculaire et la viscosité du milieu, a été déjà démontrée par de nombreux auteurs (Faber *et al.*, 1998 ; Ruas-Madiedo et Zoon, 2003 ; Folkenberg *et al.*, 2006 ; Hamet *et al.*, 2015).

Toujours selon le **tableau 16**, les indices d'écoulement (sans dimension) des trois SMC fermentés, se situaient entre 0,159 et 0,26, ce qui confirme bien le comportement rhéologique pseudoplastique ou rhéofluidifiant des gels lactiques ($0 < n < 1$) (Tiwari *et al.*, 2019 ; 2020). À noter que la plupart des études réalisées sur la rhéologie des gels lactiques contenant des EPS de BL, ont décrit le même type de comportement rhéologique indépendamment des souches lactiques utilisées (Kök-Taş *et al.*, 2013 ; Yilmaz *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2015 ; Bancalari *et al.*, 2020).

La différence entre les paramètres rhéologiques des trois gels lactiques est de plus hautement significative ($p \leq 0,001$) (**annexe 13**). Le gel SMCLBIO28 présente l'indice d'écoulement le plus faible, ce qui signifie qu'il est moins susceptible à la rupture, probablement en raison d'un plus grand nombre d'interactions protéines-EPS (Ali *et al.*, 2019).

Tableau 16. Paramètres rhéologiques du model Ostwald des SMC fermentés par les souches étudiées.

Souches	Viscosité (mPa.s ⁻¹)	Contrainte de cisaillement (Pa)	Vitesse de cisaillement (s ⁻¹)	Indice de consistance (K) (Pa s ⁿ)	Indice d'écoulement (n)
LBIO28	50,42±5,83 ^c	16,81±1,94 ^c		6,23±1,09 ^c	0,156±0,011 ^a
LBIO1	38,17±1,05 ^b	12,72±0,35 ^b	300,00	3,95±0,24 ^b	0,187±0,005 ^b
LBIO14*	19,05±6,17 ^a	6,35±2,05 ^a		1,31±0,46 ^a	0,26±0,02 ^c

* souche témoin ; les résultats correspondent à la moyenne de trois répétitions; les valeurs ayant différentes lettres en exposant sont significativement différentes ($p \leq 0,001$).

Les valeurs de l'indice de consistance (K) sont significativement plus importantes pour les gels filants SMCLBIO1 et SMCLBIO28 par rapport au gel témoin SMCLBIO14 ; elles sont aussi proportionnelles aux viscosités et aux contraintes de cisaillement enregistrées mais inversement liées aux valeurs de l'indice d'écoulement. La présence des EPS synthétisés par les deux souches filantes au cours de la fermentation des SMC, a donc entraîné une amélioration de la consistance par rapport à l'échantillon témoin SMCLBIO14.

Selon Canquil *et al.* (2007) et Yilmaz *et al.* (2015), les deux indices de consistance et d'écoulement seraient dépendants de la souche utilisée, de la concentration en EPS et des conditions de fermentation tels que le pH, la température et le temps de fermentation.

Hassan *et al.* (2003), Doleyres *et al.* (2005), et Ale *et al.* (2016), ont observé les mêmes effets des EPS sur la consistance et la viscosité des yaourts. De même, Elbanna *et al.* (2015), ont noté qu'en plus d'une meilleure viscosité enregistrée, d'autres propriétés rhéologiques des gels fermentés sont également améliorées comme la texture, l'élasticité et la cohésion grâce à l'emploi de cultures filantes de lactobacilles.

7. Macrostructure des gels lactiques SMC

7.1 Perméabilité des gels lactiques SMC

Les viscosités cinématiques des lactosérums recueillis après centrifugation des SMC fermentés par les trois isolats LBIO1, LBIO28 et LBIO14, sont montrées en **figure 39A**. D'après l'analyse statistique, les sérums issus des SMC fermentés par les deux souches filantes sont significativement plus visqueux, que celui de la souche témoin ($p \leq 0,05$), mais ils ne présentent aucune différence entre eux (**annexe 14**).

Les résultats de la perméabilité des gels SMC sont exprimés en indice de perméabilité B_t (m^2), obtenus par une moyenne de 12 mesures (**figure 39B**). Cet indice renseigne sur la porosité du réseau protéique (Lee et Lucey, 2010).

D'après les résultats de l'Anova, la différence de perméabilité entre les trois SMC fermentés est hautement significative ($p \leq 0,001$). En outre, le test post-hoc de Dunnett confirme que les SMC fermentés par les deux souches filantes LBIO1 et LBIO28, sont significativement différents de celui de la souche témoin LBIO14. Etant donné que les viscosités cinématiques des sérums SMCLBIO1 et SMCLBIO28 sont égales, cela suggère que la porosité du gel et les interactions EPS-protéines, sont les seuls facteurs influençant les valeurs du coefficient de perméabilité.

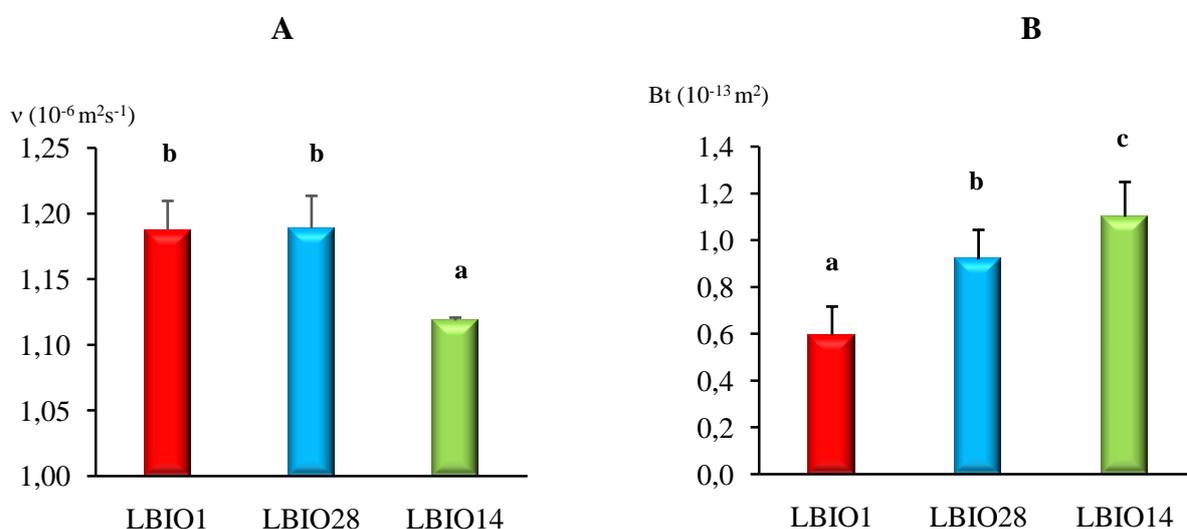


Figure 39. A. Viscosité cinématique des lactosérums à 25°C des trois SMC LBIO1, LBIO28 LBIO14. **B.** Perméabilité des SMC fermentés par les trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14 (souche témoin) mesurée à 20°C. Barres d'erreurs indiquent les écarts types. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p \leq 0,001$).

Le SMCLBIO1 possède l'indice de perméabilité statistiquement le plus faible $0,59 \pm 0,12 \cdot 10^{-13} m^2$, comparativement aux deux autres gels lactiques. Cela suggère que, le

réseau protéique formé était plus dense, avec des pores plus petits. Quant à la souche L_{BIO}28, elle a généré un gel avec un indice de perméabilité plus élevé de l'ordre de $0,91 \pm 0,12 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$, ce qui suppose que le gel formé était plus poreux, mais moins perméable que celui formé par la souche témoin L_{BIO}14.

Ces résultats peuvent être interprétés, en considérant les deux cinétiques des deux processus, celle de l'acidification des SMC et celle de la synthèse des EPS. La structure finale du gel lactique formé étant le résultat d'un l'équilibre entre les vitesses des deux processus (Stieger et Van de Velde, 2013). L'hypothèse émise repose sur la distribution des EPS, elle suppose que si plus de polymère est synthétisé avant l'agrégation des micelles de caséine (coagulation du lait), il serait alors réparti de manière homogène dans la matrice laitière. Par contre, s'il est synthétisé en plus grande quantité après le début de l'agrégation des caséines, et en raison d'une diffusion limitée, celui-ci sera principalement concentré autour des cellules bactériennes dans les pores du gel (Ruas-Madiedo et Zoon, 2003). Par conséquent, la diffusion du lactosérum à travers les mailles du gel sera réduite, d'où une valeur de coefficient de perméabilité plus faible.

Dans le cas du SMCL_{BIO}1, le polymère a été synthétisé, principalement après le point de gélification situé à pH 5,2 pour une fermentation conduite à 30°C (voir section 2). À cette valeur de pH, les micelles de caséines se contractent (en rapport avec la charge électrique) des cellules bactériennes, créant ainsi des pores où seront contenus les bactéries et les EPS faisant augmenter la viscosité de la phase sérique (Hassan, 2008). De ce fait, le flux du lactosérum à travers les mailles du gel est atténué en raison de la captation des molécules d'eau par le polysaccharide (Purohit *et al.*, 2009). Dans ces conditions, les propriétés d'écoulement du sérum dans la matrice qui est un système poreux, sont significativement affectées par les caractéristiques physicochimiques de l'EPS produit notamment par sa solubilité ainsi que, par le gradient de pression exercée dans le réseau protéique (Lee et Lucey, 2010; Mc Sweeney et Mahony, 2016; Xu *et al.*, 2019).

En revanche, dans le gel SMCL_{BIO}28 une plus grande quantité d'EPS a été produite avant la gélification, le polymère était donc probablement dispersé dans la matrice associé aux protéines et autour des bactéries. De ce fait, les pores du gel étaient moins obstrués par le polymère glucidique, d'où un écoulement plus rapide du lactosérum.

En parallèle, la vitesse d'acidification joue un rôle crucial dans la structuration du gel lactique. Selon Lucey *et al.* (1998), elle affecte la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal, la dissociation des caséines, la vitesse d'agrégation et la durée du réarrangement des

protéines. En effet, lorsque le pH du milieu se situe entre 5,2 et 4,6, il y a d'abord gélification des protéines du lactosérum, puis celle des caséines, entraînant des réarrangements dans le réseau protéique (Morell *et al.*, 2015). Lesquels seront plus importants lorsque le gel enregistre un pH situé autour du point isoélectrique durant un intervalle de temps assez long (Lucey *et al.*, 1998). Mais en atteignant le pH 4,6, le réseau protéique se stabilise ainsi que son indice de perméabilité B_t (Lee et Lucey, 2010).

Comme précédemment discuté en section 2 de ce chapitre, la cinétique d'acidification du milieu SMC a montré une différence significative au-delà de 20 h de fermentation, la souche LBIO28 étant la plus acidifiante. Par conséquent, le temps de prise des SMCLBIO1 et SMCLBIO14 était plus long et aurait donc induit plus de réarrangements des caséines après la gélification à pH 5,2. Selon Peng *et al.* (2009), l'instabilité du réseau protéique gélifié due aux réarrangements des caséines, augmenteraient la porosité du gel lactique et par là, sa perméabilité.

Ceci a été observé pour le gel SMCLBIO14, dont l'indice de perméabilité était élevé. À l'opposé, le gel SMCLBIO1 malgré une plus longue phase de gélification, comparativement au gel SMCLBIO28, celui-ci présentait tout de même, l'indice de perméabilité le plus faible.

Ce résultat rejoint l'hypothèse précédente et suggère que dans le cas du gel SMCLBIO1, la porosité était importante après les réarrangements des caséines, mais elle a été contrée par la présence d'EPS dans les pores du gel, ce qui aurait ralenti le flux à travers le réseau du gel (Hassan, 2008 ; Costa *et al.*, 2012).

D'autres auteurs se sont basés sur l'hypothèse de la charge du polymère, et ont avancé que les EPS liés au réseau protéique seraient chargés, tandis que ceux accumulés dans le lactosérum seraient neutres et présenteraient en même temps des incompatibilités thermodynamiques avec les protéines (Hamet *et al.*, 2015 ; van de Velde *et al.*, 2015 ; Oleksy et Klewicka, 2018). Sanchez *et al.* (2000), ont évoqué la présence d'une séparation de phases ségréгатives due aux interactions répulsives entre les polysaccharides neutres et les caséines chargées positivement lorsque le pH du milieu est inférieur au pH isoélectrique des caséines de 4,6.

Selon ces résultats, les deux systèmes laitiers semblent avoir une structure interne différente, bien que les deux polymères glucidiques soient filants et de poids moléculaire similaire. En comparaison avec d'autres indices de perméabilité obtenus, nos résultats semblent être assez proches. En utilisant des souches filantes Faber *et al.* (1998), ont obtenu des indices de perméabilité estimés à $1,1-1,3 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$, tandis que Ruas Madiedo et Zoon (2003), ont rapporté des indices de perméabilité qui varient entre $1,1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$ et $0,51 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$. En revanche, avec

des cultures non productrices d'EPS Castillo *et al.* (2006), ont obtenus des indices de perméabilité élevés atteignant $4,17 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$.

7.2 Synérèse des gels lactiques SMC

La synérèse est un défaut de la texture, elle est due à la contraction du gel suivie de l'expulsion du lactosérum à la surface des gels lactiques.

Les résultats de la synérèse provoquée par les différentes vitesses de centrifugation sont présentés en **figure 40**.

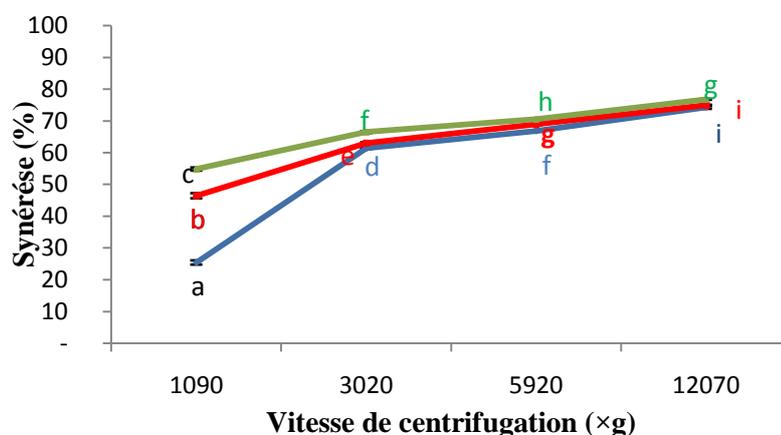


Figure 40. Pourcentage de synérèse en fonction des vitesses de centrifugation (xg) à 4°C. LBIO1 (rouge), LBIO28 (bleu), et souche témoin LBIO14 (vert). Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p \leq 0,001$). Barres d'erreurs indiquent les écarts types.

La quantité de lactosérum libérée augmente avec l'élévation de la force centrifuge ; cependant elle est sensiblement différente entre les trois SMC fermentés (**annexe 15**). En effet, les résultats du test Anova à deux facteurs (souche et vitesses de centrifugation) indiquent que la synérèse diffère significativement ($p \leq 0,001$) selon la souche utilisée pour la fermentation du SMC, mais également selon la vitesse de centrifugation appliquée ($p \leq 0,001$).

Selon la même **figure 40**, les gels lactiques générés par les deux souches filantes LBIO1 et LBIO28 sont moins susceptibles à la synérèse que celui de la souche témoin LBIO14. Plusieurs auteurs ont relaté, la capacité des EPS de BL produits *in situ* au cours de la fermentation des laits à retenir l'eau en diminuant la synérèse (Amatayakul *et al.*, 2006 ; Güler-Akin *et al.*, 2009 ; Elbanna *et al.*, 2015 ; Guénard-Lampron *et al.*, 2019 ; Madhubasani *et al.*, 2019).

Les résultats du test post-hoc Dunnett, ont en outre montré que, les SMC fermentés par les deux souches filantes LBIO1 et LBIO28, étaient significativement différents de celui de la souche témoin LBIO14. Les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28 présentaient des taux de

synérèse plus faibles, et ce pour toutes les vitesses de centrifugation testées. Bien que, le dernier gel, ait tendance à retenir plus de lactosérum, pour les trois vitesses de centrifugation 1090×g, 3020×g et 5920×g. Cette rétention sérique est d'autant plus importante aux faibles vitesses de centrifugation testées.

À la première vitesse de centrifugation (1090 × g), le gel SMCLBIO28 a retenu deux fois plus de sérum par rapport au témoin SMCLBIO14, et un peu plus que le gel SMCLBIO1. En revanche, pour la dernière vitesse de centrifugation testée 12070 × g, aucune différence significative n'est enregistrée entre les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28.

D'après les résultats des sections 5 et 6, les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28 sont significativement ($p \leq 0,05$), plus visqueux par rapport au gel témoin SMCLBIO14, et ce quelque soit le système laitier considéré brassé ou ferme. De nombreuses études ont démontré une corrélation positive entre la réduction de la synérèse et l'amélioration de la viscosité grâce aux EPS, indépendamment de la technique de mesure de la synérèse utilisée (naturelle, par centrifugation ou par drainage) (Folkenberg *et al.*, 2006 ; Güler-Akin *et al.*, 2009 ; Costa *et al.*, 2012 ; Mende *et al.*, 2016).

Selon les résultats de la section 2, les EPS synthétisés par les deux souches LBIO1 et LBIO28 sont filants et de haut poids moléculaire. Selon Saravanan et Shetty (2016) et Yan *et al.* (2018), les grands polymères ont une très forte capacité de rétention d'eau *via* les liaisons hydrogène, ce qui a pour effet de réduire la synérèse, et d'augmenter la fermeté du réseau de caséines. Ali *et al.* (2019), ont souligné que ces propriétés de liaisons à l'eau seraient influencées par le type de polymère (CPS ou EPS), sa concentration, sa distribution et son interaction avec le réseau protéique. Amatayakul *et al.* (2006), ont pu démontrer que les EPS filants, ont une plus grande capacité de rétention du sérum par rapport aux EPS mucoïde ou capsulaire.

Selon les résultats de la section 7.1, le gel SMCLBIO14 a présenté une perméabilité mais aussi une synérèse élevée. En revanche, le SMCLBIO1 a montré une faible perméabilité, par rapport au SMCLBIO28 seulement les niveaux de synérèse provoquée étaient plus importants pour le SMCLBIO1. Castillo *et al.* (2006), ont noté des corrélations positives entre l'indice de perméabilité et la synérèse, contrairement à notre étude. Cela peut se rapporter au type de synérèse mesurée. Dans l'étude de ces auteurs, il s'agit d'une synérèse naturelle due à la contraction naturelle du gel, contrairement au cas présent, où la synérèse a été provoquée par une action mécanique.

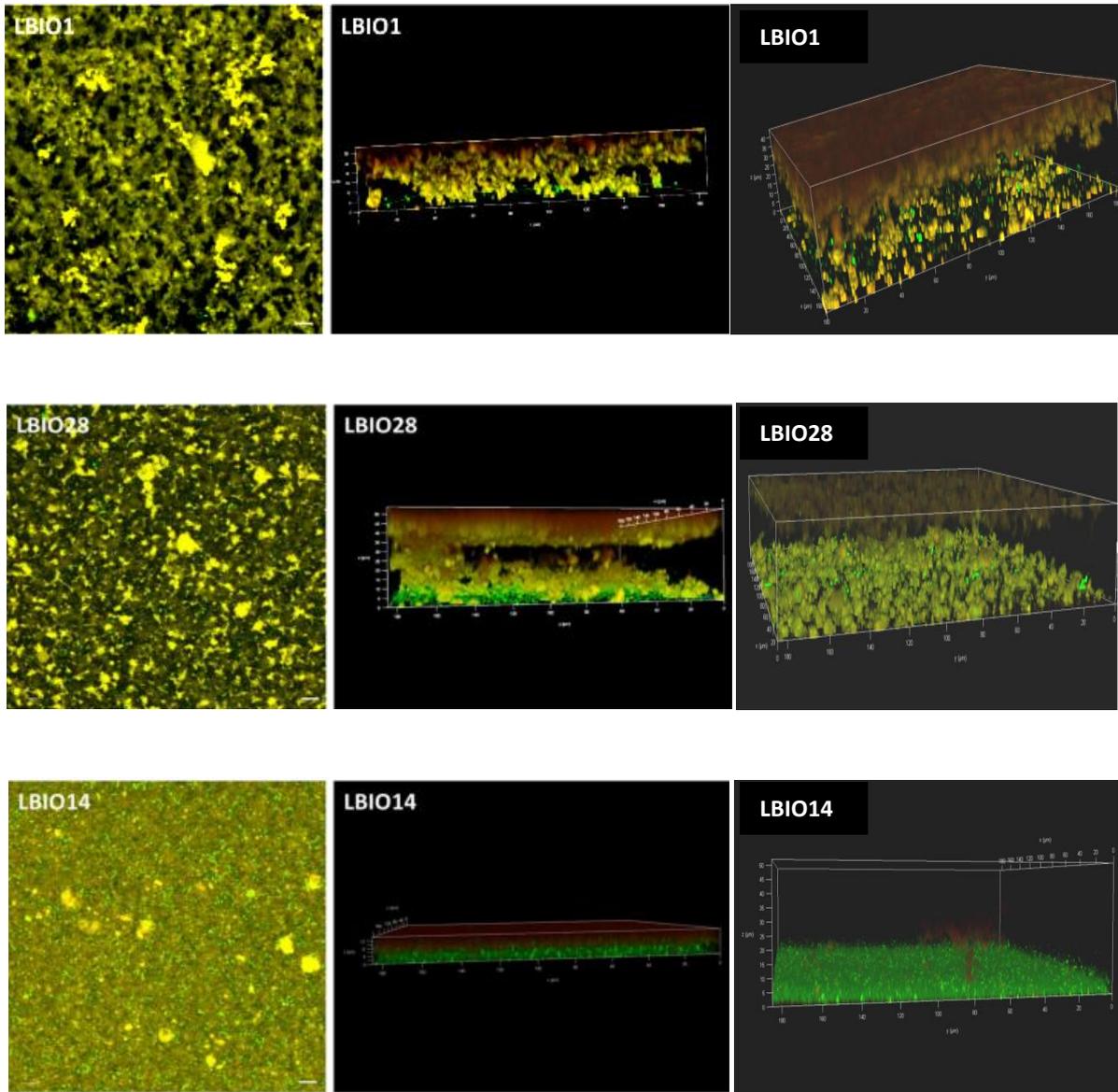


Figure 41. Microstructures (1D et 3D) observées par microscopie confocale à balayage laser des SMC fermentés à 30°C par les souches sélectionnées productrices d’EPS filants LBIO1 et LBIO28 et la souche LBIO14 témoin. Réseau protéique apparaît jaune, les bactéries en vert tandis que les pores sont foncés. Barre 10µm. Profondeur de balayage 15µm.

Selon Lucey et Singh (1997), le niveau de synérèse provoquée dépend de la rigidité du réseau protéique du gel, et donc de sa capacité à résister aux forces externes importantes. D'après ces résultats, l'hypothèse de la distribution des EPS dans la matrice laitière, semble se maintenir. En effet, les EPS de la souche LBIO1 présents dans les pores du réseau interagiraient plus avec les molécules d'eau de la phase sérique. Par contre, ceux synthétisés par LBIO28 distribués dans la matrice, seraient probablement liés aux caséines provoquant un resserrement du réseau protéique plus résistant à l'action mécanique (Bullard, 2011 ; Berthold-pluta et Garbowska, 2019). Par conséquent la capacité du gel SMCLBIO28 à retenir le sérum sous l'effet d'une action mécanique comme la centrifugation est plus importante comparativement au gel SMCLBIO1. La présence de tels polymères glucidiques est, particulièrement intéressante pour la fabrication de yaourt brassé, car il diminue significativement la susceptibilité du gel à la synérèse, due aux différentes opérations mécaniques tels que le pompage, le brassage et le remplissage (Behare *et al.*, 2009).

8. Microstructure des gels lactiques SMC

Les micrographies illustrées dans la **figure 41** réalisées par microscopie confocale à balayage laser (CLSM), contribuent à la compréhension des résultats de perméabilité et de synérèse en explorant la microstructure des gels lactiques. En effet, les propriétés texturales de la matrice laitière sont régies par sa microstructure, en raison des interactions physicochimiques entre ses différents composants (De Oliveira, 2018).

Selon la même figure, les trois gels SMC présentent une microstructure différente. Le gel SMCLBIO1 possède une microstructure ouverte en *sponge-like*, caractérisée par la présence de larges pores sous forme de zones noires visibles à l'intérieur d'un réseau protéique dense marqué en jaune par la rhodamine. Ces pores contiennent, les cellules bactériennes marquées par l'acridine en vert, ils renferment probablement aussi, comme l'ont déjà signalé plusieurs auteurs, le lactosérum et les EPS excrétés non colorés car ils ne réfléchissent pas la lumière laser (Hassan *et al.*, 2004 ; 2008 ; Gentès *et al.*, 2011 ; Sanli *et al.*, 2013). Sur la micrographie on observe également des agrégats jaunes, qui sont des regroupements de micelles de caséines déminéralisées.

Selon Sodini *et al.* (2004), la distribution des EPS dans le gel lactique serait également influencée par le mode de regroupement des bactéries (en chaîne, ou séparées). Lorsqu'elles sont dispersées, le gel obtenu est homogène avec un nombre d'interactions EPS-protéines élevé, par contre, si elles sont regroupées en amas dans les pores, le gel est dans ce cas

hétérogène, car la majeure partie du polymère sera dissoute dans le lactosérum, induisant moins de liaisons EPS-protéine, ce qui est le cas du gel SMCLBIO1.

D'autre part Burgain *et al.* (2014), ont rapporté que la répartition des bactéries dans le gel lactique dépend des interactions que celles-ci peuvent établir avec les constituants du lait (protéines et globule gras) notamment les protéines du lactosérum, quand elles sont situées dans les pores.

Concernant le gel SMCLBIO28, il présente également un réseau caséique poreux caractéristique des gels contenant des EPS, mais il semble être plus homogène avec une porosité plus fine et une répartition régulière des bactéries (**annexe 16**). Dans ce second cas, il a été supposé que le polymère était plutôt lié aux protéines par des interactions électrostatiques, la micrographie soutient donc cette hypothèse, par l'absence d'une large porosité typique de certains EPS non chargés.

Par ailleurs, Hassan *et al.* (2003a) ont rapporté que les polymères très filants produits *in situ* dans le lait par une souche de la sous-espèce *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* comparativement à une souche de l'espèce *Streptococcus thermophilus* modérément filante, avaient généré une microstructure nettement plus dense avec des filaments d'EPS épais et enchevêtrés. Le gel SMCLBIO28 semble aussi présenter une telle structure en raison de son caractère très filant et de sa forte viscosité comparativement au premier gel SMCLBIO1. En effet selon Purwandari *et al.* (2007), la structure finale du gel lactique dépend de plusieurs propriétés du polymère tels que : son type (filant ou mucoïde), son degré de filant, sa composition en monomère et son degré de ramification.

D'autre part selon Mc Sweeney et Mahony (2016), la nature de l'interaction entre les protéines du lait et les polysaccharides dépend de nombreux facteurs, tels que les forces intermoléculaires entre les deux biopolymères (protéines-EPS), leurs concentrations ainsi que les facteurs environnementaux (pH, force ionique et teneur en calcium).

Dans un yaourt, l'EPS neutre a tendance à se séparer de la phase protéique et se dissout dans le lactosérum, tandis qu'un polysaccharide chargé négativement s'associe avec la phase protéique chargée positivement après coagulation induisant une augmentation de la fermeté du gel (Gentès, 2011a). Toba *et al.* (1990), ont démontré que dans le *viili*, un polysaccharide acide synthétisé par la souche *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495, était plus étroitement lié aux protéines par ses groupes phosphate qu'un polysaccharide neutre (van de Velde *et al.*, 2015).

Concernant le gel SMCLBIO14, sa microstructure est plus fine moins dense, ce qui est conforme aux valeurs des indices de perméabilité (B_i) et de synérèse élevés. Ces caractéristiques ont entraîné une séparation des deux phases sérique et protéique, résultant en une sédimentation des cellules bactériennes visibles en vert sur la micrographie correspondante. Il est également important de noter que le traitement thermique appliqué aux trois SMC (90 °C/ 5 min), est aussi un facteur qui agit sur la structure du gel, car il entraîne une dénaturation des protéines sériques dont une fraction se lie aux caséines par des ponts disulfures et des interactions hydrophobes améliorant la réticulation (formation) du réseau protéique (Lucey, 2002).

9. Cryo- microscopie électronique (cryo-SEM)

La microscopie électronique a été utilisée pour la première fois par Kalab (1979) pour l'observation des EPS. Seulement, les techniques de préparations des échantillons comme la déshydratation et la fixation modifient la structure du spécimen (Mende *et al.*, 2015). L'emploi du cryo-SEM offre l'avantage d'utiliser les techniques de préparation des échantillons les moins destructrices, qui n'implique que la congélation de l'échantillon dans de l'azote liquide. Par conséquent, il n'y a pas de modifications de la structure de l'EPS induites par la déshydratation des échantillons, le polymère conserve donc sa structure entièrement hydraté (Dohnalkova *et al.*, 2011).

L'observation des cellules bactériennes par *cryo-scanning electron microscopy* (Cryo-SEM), a révélé la présence de filaments denses entourant les cellules des deux souches filantes LBIO1 et LBIO28, qu'on ne retrouve pas sur la micrographie de LBIO14 (**figure 42**). Ces microfilaments sont semblables à ceux observés par Castro-Bravo *et al.* (2018), et forment un *web-like* attaché aux parois cellulaires, qui correspondrait aux polymères glucidiques excrétés dans le milieu de culture. De telles propriétés morphologiques des EPS ont été également visualisées dans des matrices alimentaires, et décrites comme responsables de l'amélioration des propriétés physicochimiques des matrices alimentaires (Hassan *et al.*, 2004 ; Ayala-Hernandez *et al.*, 2008 ; İspirli *et al.*, 2018).

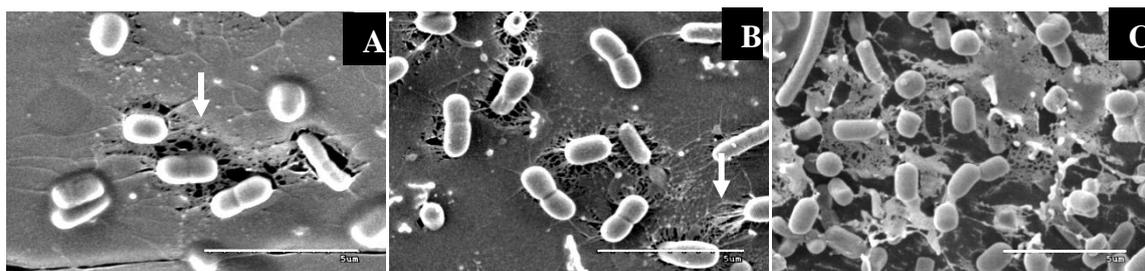


Figure 42. Micrographies électroniques des cellules des souches A : LBIO1, B : LBIO28 et C : LBIO14 réalisées par cryo-ESM. La flèche indique l'EPS. Barre 5µm.

1. Recherche de la présence de plasmide

Deux techniques ont été testées pour rechercher la présence d'éventuels plasmides contenus dans le génome des trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14. La première technique d'extraction employant le kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma), a donné des résultats peu probants car les bandes étaient très peu visibles après migration sur le gel d'agarose. Ce résultat nous a donc conduits, à opter pour une méthode conventionnelle d'extraction des plasmides.

Les extraits d'ADN plasmidiques obtenus par la seconde technique, ont été également soumis à une migration par électrophorèse horizontale (BIORAD) dans un gel d'agarose à 0,6 % (p/v). La présence des bandes électrophorétiques, a permis de conclure que les génomes des trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14 abritaient des plasmides (**figure 43**).

Par conséquent, l'approche consistant à rechercher des plasmides dans le génome bactérien, afin de confirmer par leur absence la localisation des gènes sur le chromosome bactérien, s'est avérée non concluante. Un séquençage complet des trois génomes a donc été entrepris.

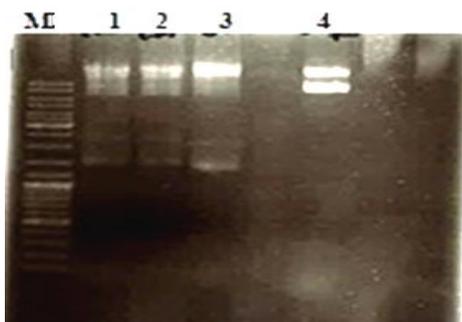


Figure 43. Produits de l'amplification de l'ADN plasmidique sur gel d'agarose à 0,6 % (p/v). MP : marqueur de taille moléculaire ; puits 1 à 4 : 1, LBIO28 ; 2, LBIO1 ; 3, LBIO14 ; 4, *Lb. plantarum* Ipla 441 témoin positif.

2. Identification des *clusters eps* par analyse génomique comparative

Les trois génomes possèdent une taille de 3,2 millions paires de bases, avec un contenu en base guanine et cytosine (G+C) de 44 % (**tableau 17**). Les régions codantes ou *coding DNA sequences* (CDSs) des génomes des souches LBIO1-LBIO28 et LBIO14 sont aux nombres de : 3113, 3108 et 3072, avec une longueur moyenne de : 844, 845 et 850 pb, respectivement. Les ARNr et les ARNt contenus dans les trois génomes sont au nombre de 9, 10 et 10 et 66, 66 et 68 dans le même ordre précédent.

Les caractéristiques générales des trois génomes sont en accord avec les données disponibles publiées pour l'espèce *Lb. plantarum* (Choi *et al.*, 2018 ; Evanovich *et al.*, 2019). À noter que jusqu'à juin 2020, selon la base de données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes>), 124 génomes de l'espèce *Lb. plantarum*

Tableau 17. Caractéristiques des génomes et localisation des gènes de production des EPS.

Souche	Numero d'accès	Taille génome (pb)	CDSs	G+C (%)	ARNr	ARNt	<i>eps</i> -locus tags	Contigs	Localisation
LBIO1	SAMN 14671341	3 186 843	3113	44,32	9	66	<i>HJQ46_11970</i>	20	Chromosomique
							<i>HJQ46_11955</i>		
							<i>HJQ46_13005</i>	21	Chromosomique
							<i>HJQ46_12965</i>		
							<i>HJQ46_12370</i>	31	Chromosomique
LBIO28	SAMN 14671401	3 187 061	3108	44,32	10	66	<i>HJQ46_12415</i>		
							<i>HIG33_14845</i>	24	Chromosomique
							<i>HIG33_14830</i>		
							<i>HIG33_12980</i>	25	Chromosomique
							<i>HIG33_12940</i>		
LBIO14	SAMN 14671394	3 155 118	3072	44,44	10	68	<i>HIG33_12345</i>	33	Chromosomique
							<i>HIG33_12390</i>		
							<i>HIF97_12335</i>	23	Chromosomique
							<i>HIF97_12295</i>		
							<i>HIF97_09330</i>	32	Chromosomique
							<i>HIF97_09375</i>		

pb : paire de base ; CDCs : *coding DNA sequences*.

ont été complètement séquencés, et de nombreux gènes fonctionnels ont été identifiés, parmi lesquels, figurent ceux responsables de la biosynthèse des EPS. La première analyse génétique effectuée a porté sur les traits de virulence et de résistance aux antibiotiques, qui pourraient compromettre l'exploitation technologique des trois souches bactériennes LBI01, LBI028 et LBI014. Ainsi, l'analyse des trois génomes réalisée *in silico* contre les bases de données CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) et ResFinder, n'a décelé aucun gène de résistance aux antibiotiques ou de présence de déterminants de virulence potentiels. Ces résultats correspondent à ceux obtenus pour d'autres souches de la même espèce, et confirment une fois de plus l'innocuité des souches lactiques, particulièrement de l'espèce *Lb. plantarum* ayant le statut GRAS (*Generally Reconized As Safe* utilisé par la *Food Drug Administration*) ou QPS (*Qualified preemption of safety* utilisé par l'Agence européenne de sécurité des aliments) (Cho *et al.*, 2018 ; Evanovich *et al.*, 2019 ; Rodrigo-Torres *et al.*, 2019). D'autres gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des vitamines telles que la riboflavine, le folate et la pyridoxine, ainsi que ceux codant pour les bactériocines ont également été identifiés dans les trois génomes. L'emploi de ces souches, contribue donc à la bioconservation et à l'enrichissement en vitamines des aliments fermentés (Zarour *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'analyse génomique a été spécialement axée sur la machinerie génétique de la biosynthèse des EPS. Ainsi, la recherche a d'abord porté sur les gènes codant les enzymes GH68 et GH70 impliquées dans la synthèse des homopolysaccharides, pour lesquels aucun résultat n'a été obtenu. Ce type de polymère est en effet rarement synthétisé par l'espèce *Lb. plantarum*, seules quelques souches telles que *Lb. plantarum* CIDCA 8327 (Gangoiti *et al.*, 2017) et *Lb. plantarum* 70810 (Wang *et al.*, 2014) ont été signalées comme productrices de glucane et de galactane, respectivement.

D'autre part, l'analyse génétique a également concerné la recherche des gènes de production d'hétéropolysaccharides. D'après les données de la littérature, les gènes responsables de la production de ce type de polymère seraient organisés en *clusters eps*. Leur structure fonctionnelle est conservée comprenant des régions codantes pour l'assemblage des unités répétitives, la détermination de la longueur de chaîne, la polymérisation, l'exportation et la régulation. Cependant, une grande variabilité dans l'organisation génétique a été observée entre les souches lactiques, les quelques homologues rencontrés sont généralement liées à la niche écologique. Chez les lactobacilles, les deux espèces *Lb. plantarum* et *Lb. paraplantarum*, sont connues pour contenir plusieurs *clusters eps* (Živković *et al.*, 2016 Jiang *et al.*, 2018 ; Deo *et al.*, 2019).

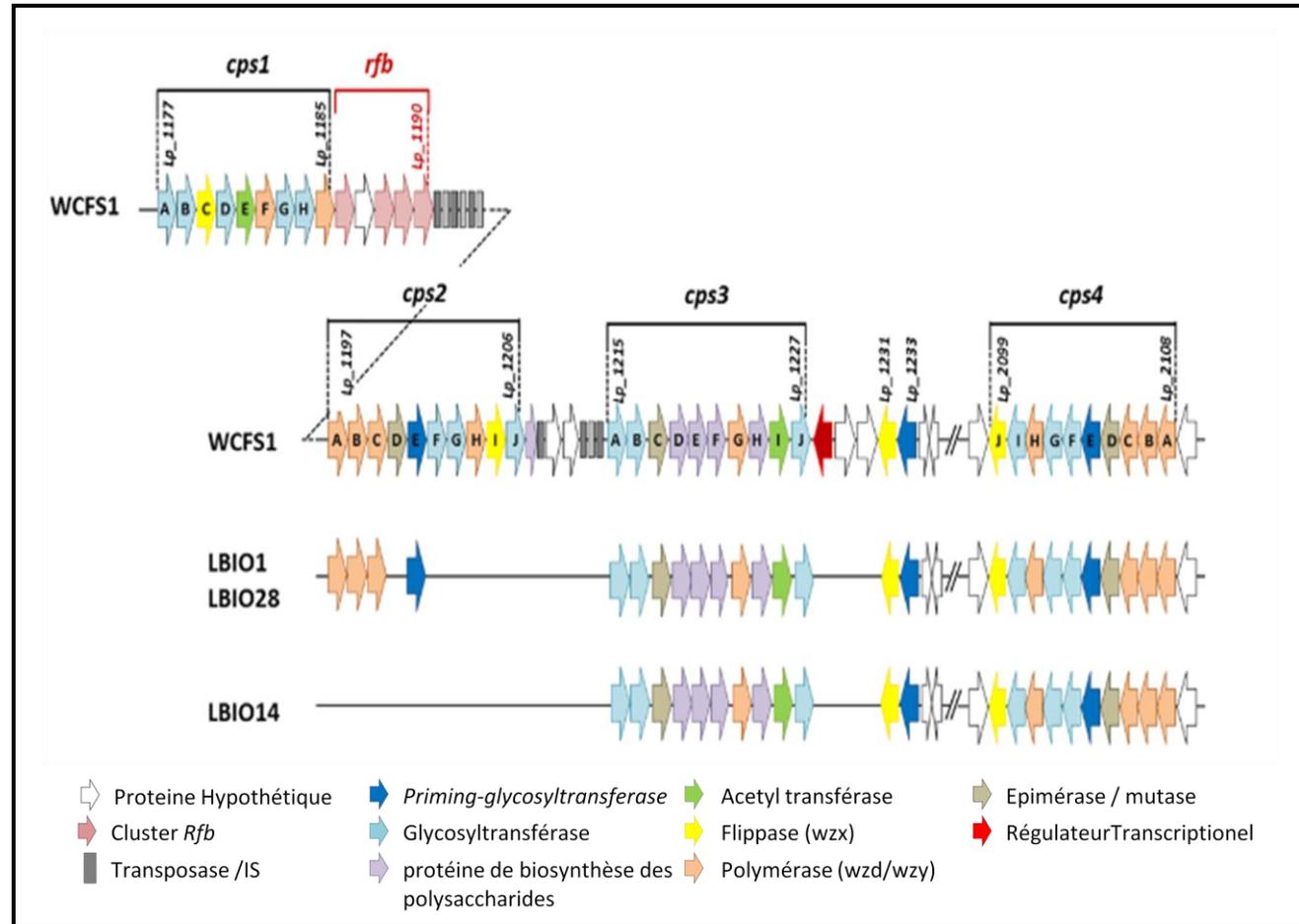


Figure 44. Cartes physiques des *clusters eps* des trois souches LBIO1, LBIO28 et LBIO14 en comparaison avec les *clusters cps* de la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1.

Concernant la première espèce, les *clusters eps* les mieux caractérisés, sont ceux de la souche *Lb. plantarum* WCFS1. Cette souche est utilisée en tant que culture starter, ou probiotique en industrie alimentaire (Kleerebezem *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2016 ; Vastano *et al.*, 2016). Son génome possède 4 *clusters cps*, localisés au niveau de deux régions du chromosome, la première région d'une taille de 49 kb contient 3 *clusters cps* consécutifs, *cps1*, *csp2* et *cps3* ; par contre, la seconde, de plus petite taille de 14 kb contient le quatrième *cluster cps* 4 (Siezen *et al.*, 2011 ; Remus *et al.*, 2012). Ces régions sont flanquées par des séquences d'insertion (SI) qui codent des transposases. Ces éléments génétiques mobiles sont des segments d'ADN, qui peuvent se déplacer à l'intérieur des bactéries et entre elles. Leur présence est fréquente et a déjà été rapportée par plusieurs auteurs, ils seraient responsables de la diversité génétique des *clusters eps* (Živković *et al.*, 2016 ; Zeidan *et al.*, 2017 ; Jiang et Yang, 2018 ; Deo *et al.*, 2019 ; Evanovich *et al.*, 2019).

Les résultats de l'analyse comparative *in silico* des trois génomes étudiés (LBIO1, LBIO28 et LBIO14) en utilisant comme référence les gènes *cps* de la souche *Lb. plantarum* WCFS1 (Remus *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016 ; Jiang et Yang, 2018) (**annexe 17**), ont révélé l'existence de groupes de gènes putatifs, impliqués dans la biosynthèse des hétéropolymères (**tableau17**). Ces gènes sont tous localisés sur le chromosome, étant donné qu'aucune origine de répllication plasmidique n'a été décelée sur les *eps*-contigs. Pour les deux souches LBIO1 et LBIO28, ils sont au nombre de 24, identifiés sur trois contigs d'une taille de 21,6 Kpb. En revanche, pour la souche témoin LBIO14, seuls 20 gènes ont été détectés, situés sur deux contigs d'une taille de 19,4 Kpb (données analysées par l'outil graphique PLACNETw).

En général, la composition génomique des trois souches semble être assez proche, probablement en raison de leur même habitat d'origine (le lait), qui préserve la similitude des structures génomiques par transfert horizontal de gènes (Corsetti et Valmorri, 2011). En effet, la similarité retrouvée entre les groupes de gènes *cps* communs dans les trois génomes est de l'ordre de 100%. Quant à l'homologie de ces régions avec celles de la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1, elle est en moyenne de l'ordre de 94 %.

La **figure 44**, représente l'organisation génétique des *clusters eps* des trois isolats LBIO1, LBIO28 et LBIO14, en plus de celle de la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1.

L'analyse des génomes des trois isolats a révélé l'absence du premier *cluster (cps1)*, cette observation a été déjà rapportée par Siezen *et al.* (2011) pour cinq souches *Lb. plantarum* JDM1, ST-III, NC8, ATCC 14917 et KCA. Selon Remus *et al.* (2012), son absence chez la souche mutante *Lb. plantarum* WCFS1, n'a pas affecté la quantité de polymère produite, mais a entraîné une diminution de la masse molaire, une absence du rhamnose et une baisse du

galactose dans la composition du polymère produit. Par conséquent, l'annotation du gène putatif de la rhamnosyl transférase (*lp_1184*), comme étant le seul gène codant l'enzyme dans les quatre groupes de gène a été confirmée. Cela suggère, que les polymères produits par les deux souches filantes LBIO1 et LBIO28 seraient peu susceptibles de contenir du rhamnose étant donné l'absence du premier *cluster*.

Le deuxième *cluster* (*cps2*) retrouvé uniquement chez les deux souches LBIO1 et LBIO28 comprend quatre gènes (**tableau 18**), les trois premiers (*HJQ46_11960~11970*) et (*HIG33_14835~14845*) présentent un pourcentage de similitude supérieur à 94 % avec leurs homologues (*lp_1197~1199*) annotés *Wzd*, *Wze*, et *Wzh* présents chez la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1, lesquels seraient impliqués dans la régulation de la longueur de la chaîne du polymère (Jiang et Yang, 2018). Le quatrième gène identifié chez les deux souches (*HJQ46_11955*), (*HIG33_14830*), code une *priming* glycosyl transférase putative (*priming-GTF*), qui catalyse le transfert d'un monosaccharide, d'un sucre activé vers l'undécaprényl-phosphate (molécule d'ancrage C55), lors de la première étape de la synthèse des unités répétitives du polymère (Zeidan *et al.*, 2017). Cependant, ce quatrième gène ne présente que 40 % de similitude avec celui de la souche de référence situé sur le locus *lp_1201*.

Le reste des gènes du *cps2*, situés entre les locus (*lp_1200~1207*) chez la souche de référence, n'ont pas été identifiés dans les deux génomes LBIO1, LBIO28. La présence partielle de gènes, dans ce deuxième *cluster* a été également rapportée par Li *et al.* (2016) pour les deux souches *Lb. plantarum* ZJ316 et ST-III. Selon Lee *et al.* (2016), le *cps2* serait responsable du phénotype filant, et du rendement en EPS chez les deux souches *Lb. plantarum* SF2A35B et Lp90. Cependant, son absence chez la souche mutante *Lb. plantarum* WCFS1, serait responsable de la réduction de l'abondance du galactose dans la composition du polymère glucidique produit (Jiang et Yang, 2018). À noter que le polysaccharide produit par cette souche n'est pas filant (Lee *et al.*, 2016). Ces résultats, nous ont permis de découvrir que les trois gènes *cps2ABC* identifiés uniquement dans les génomes des deux souches LBIO1 et LBIO28, étant donné la faible similitude du *cps2E* jouent un rôle important dans la synthèse du polysaccharide filant de haut poids moléculaire.

Le troisième *cluster* (*cps3*) des trois isolats LBIO1, LBIO28 et LBIO14 possède le même nombre de gènes et la même organisation que le *cps3* de la souche *Lb. plantarum* WCFS1. Il regroupe chacun dix gènes (*HJQ46_12965~13005*), (*HIG33_12940~12980*) et (*HIF97_12295~12335*) respectivement, dont trois coderaient des glycosyl-transférases putatives. La similarité entre les gènes des trois isolats et ceux de la souche de référence est

Tableau 18. Résumé du BlastN des *clusters eps* des souches étudiées avec la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1

Noms des Gènes	Fonction des Gènes	LBIO1		LBIO28		LBIO14	
		ORF	% ID	ORF	% ID	ORF	% ID
<i>cps1A</i>	Glycosyltransférase						
<i>cps1B</i>	Glycosyltransférase, famille 1 (GT1)						
<i>cps1C</i> (<i>wzx</i>)	Oligosaccharide transporteur (flippase)						
<i>cps1D</i>	Glycosyltransférase						
<i>cps1E</i>	Acyltransférase/acétyltransférase						
<i>cps1F</i> (<i>wzz/wzd</i>)	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides						
<i>cps1G</i>	Glycosyltransférase, famille 1 (GT1)						
<i>cps1H</i>	Glycosyltransférase, famille 2 (GT2)						
<i>cps1I</i> (<i>wzy</i>)	Polysaccharide polymérase						
<i>cps2A</i> (<i>wzd</i>)	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides	<i>HJQ46_11970</i>	92,67	<i>HIG33_14845</i>	92,67		
<i>cps2B</i> (<i>wze</i>)	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides; tyrosine kinase	<i>HJQ46_11965</i>	96,28	<i>HIG33_14840</i>	96,28		
<i>cps2C</i> (<i>wzh</i>)	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides; tyrosine kinase	<i>HJQ46_11960</i>	91,44	<i>HIG33_14835</i>	91,44		
<i>cps2D</i>	UDP N-acétylglucosamine 4-épimérase						
<i>cps2E</i>	<i>Priming</i> glycosyltransférase, polyprényl glycosylphosphotransférase	<i>HJQ46_11955</i>	40,69	<i>HIG33_14830</i>	40,69		
<i>cps2F</i>	Glycosyltransférase, famille 1 (GT1)						
<i>cps2G</i>	Glycosyltransférase						
<i>cps2H</i> (<i>wzy</i>)	Polysaccharide polymérase						
<i>cps2I</i> (<i>wzx</i>)	Transporteur d'oligosaccharide (flippase)						
<i>cps2J</i>	Glycosyltransférase, famille 1 (GT1)						

Tableau 18. Résumé du BlastN des *clusters eps* des souches étudiées avec la souche de référence *Lb. plantarum* WCFS1 (suite).

Noms des Gènes	Fonction des Gènes	LBIO1		LBIO28		LBIO14	
		ORF	% ID	ORF	% ID	ORF	% ID
<i>cps3A</i>	Glycosyltransférase, famille 2 (GT2)	<i>HJQ46_13005</i>	70,20	<i>HIG33_12980</i>	70,20	<i>HIF97_12335</i>	70,20
<i>cps3B</i>	Glycosyltransférase, famille 2 (GT2)	<i>HJQ46_13000</i>	98,71	<i>HIG33_12975</i>	98,71	<i>HIF97_12330</i>	98,71
<i>cps3C</i>	UDP-galactopyranose mutase	<i>HJQ46_12995</i>	99,20	<i>HIG33_12970</i>	99,20	<i>HIF97_12325</i>	99,20
<i>cps3D</i>	Protéine de biosynthèse du polysaccharide	<i>HJQ46_12990</i>	99,14	<i>HIG33_12965</i>	99,14	<i>HIF97_12320</i>	99,14
<i>cps3E</i>	Protéine de biosynthèse du polysaccharide	<i>HJQ46_12985</i>	98,07	<i>HIG33_12960</i>	98,07	<i>HIF97_12315</i>	98,07
<i>cps3F (wzy)</i>	Polysaccharide polymérase	<i>HJQ46_12980</i>	98,65	<i>HIG33_12955</i>	98,65	<i>HIF97_12310</i>	98,65
<i>cps3G (wzy)</i>	Polysaccharide polymérase	<i>HJQ46_12980</i>	97,00	<i>HIG33_12955</i>	97,00	<i>HIF97_12310</i>	97,00
<i>cps3H</i>	Protéine de biosynthèse du polysaccharide	<i>HJQ46_12975</i>	97,41	<i>HIG33_12950</i>	97,41	<i>HIF97_12305</i>	97,41
<i>cps3I</i>	O-acetyltransférase	<i>HJQ46_12970</i>	97,77	<i>HIG33_12945</i>	97,77	<i>HIF97_12300</i>	97,77
<i>cps3J</i>	Glycosyltransférase	<i>HJQ46_12965</i>	99,61	<i>HIG33_12940</i>	99,61	<i>HIF97_12295</i>	99,61
<i>cps4J (wzx)</i>	Transporteur d'unité répétitive du polysaccharide (flippase)	<i>HJQ46_12370</i>	99,17	<i>HIG33_12345</i>	99,17	<i>HIF97_09330</i>	99,17
<i>cps4I</i>	Glycosyltransférase, famille 2 (GT2)	<i>HJQ46_12375</i>	98,14	<i>HIG33_12350</i>	98,14	<i>HIF97_09335</i>	98,14
<i>cps4H (wzy)</i>	Polysaccharide polymérase	<i>HJQ46_12380</i>	97,17	<i>HIG33_12355</i>	97,17	<i>HIF97_09340</i>	97,17
<i>cps4G</i>	Glycosyltransférase, famille 1 (GT1)	<i>HJQ46_12385</i>	94,40	<i>HIG33_12360</i>	94,44	<i>HIF97_09345</i>	94,44
<i>cps4F</i>	Glycosyltransférase, famille 1 (GT1)	<i>HJQ46_12390</i>	94,55	<i>HIG33_12365</i>	94,55	<i>HIF97_09350</i>	94,55
<i>cps4E</i>	<i>Priming</i> glycosyltransférase polysaccharide, polyprenyl glycosylphosphotransférase,	<i>HJQ46_12395</i>	99,55	<i>HIG33_12370</i>	99,55	<i>HIF97_09355</i>	99,55
<i>cps4D</i>	UDP N-acétylglucosamine 4-épimérase	<i>HJQ46_12400</i>	100,00	<i>HIG33_12375</i>	100,00	<i>HIF97_09360</i>	100,00
<i>cps4C (wzh)</i>	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides; tyrosine phosphatase	<i>HJQ46_12405</i>	99,62	<i>HIG33_12380</i>	99,62	<i>HIF97_09365</i>	99,62
<i>cps4B (wze)</i>	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides; tyrosine kinase	<i>HJQ46_12410</i>	98,72	<i>HIG33_12385</i>	100,00	<i>HIF97_09370</i>	98,72
<i>cps4A (wzd)</i>	Régulateur de la longueur de la chaîne des polysaccharides	<i>HJQ46_12415</i>	98,41	<i>HIG33_12390</i>	98,41	<i>HIF97_09375</i>	98,41

ORF : Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert. ; ID : identité

généralement supérieure à 97 %, seul le gène *cps3A* annoté chez les trois isolats LBIO1, LBIO28 et LBIO14 (*HJQ46_13005*, *HIG33_12980* et *HIF97_12335*) présente une homologie de 70 %. Contrairement aux deux groupes de gènes *cps2* et *cps4*, le *cps3* ne contient pas de gènes régulateurs ni ceux codant une *priming glycosyl transférase* (Remus *et al.*, 2012).

Le quatrième groupe de gènes (*cps4*) est aussi présent dans les trois génomes et comprend 10 gènes (*HJQ46_12370~12415*), (*HIG33_12345~12390*) et (*HIF97_09330~09375*). Selon Gangoiti *et al.* (2017) et Jiang et Yang (2018), la région abritant ce quatrième *cluster* est très conservée chez l'espèce *Lb. plantarum*. L'existence du *cps4*, a été déjà signalée chez la souche *Lb. plantarum* TMW 1.25 non productrice d'EPS (Precht *et al.*, 2018). De même Poulsen *et al.* (2019), ont noté la présence de *clusters eps* chez des souches de lactocoques non texturantes, et ont conclu que les gènes étaient non fonctionnels.

L'organisation du *cps4* des trois souches semble être assez proche, de celle du *cps4* de la souche *Lb. plantarum* WCFS1, avec un taux de similarité de plus de 98 %. Ce *cluster* possède tout comme le *cps2*, la même structure typique d'un groupe de gènes de biosynthèse de polymères *Wzy* (polysaccharides polymérase-dépendant) (Remus *et al.*, 2012). Cette voie de biosynthèse des hétéropolymères est la plus commune chez les bactéries lactiques, comparativement aux deux autres celles des transporteurs ABC et de la synthase décrites pour les bactéries à Gram positif (Schmid *et al.*, 2015; Zeidan *et al.*, 2017).

Le quatrième *cluster* des trois génomes comprend, en plus des gènes précédemment décrits pour le *cps2*, un gène situé sur les locus (*HJQ46_12395*), (*HIG33_12370*) et (*HIF97_09355*), codant une *priming glycosyl transférase* putative (*priming-GTF*), dont la similarité avec le *cps4E* de la souche *Lb. plantarum* WCFS1 est de plus de 99 %.

Le *cps4* chez la souche de référence comprend également un gène (*lp_2105*) codant une UDP-N-acétylglucosamine 4-épimérase putative catalysant l'interconversion entre l'UDP-N-acétyl-D-glucosamine et l'UDP-N-acétyl-D-galactosamine. Celui-ci est également retrouvé au niveau du *cps4* des trois génomes des isolats LBIO1, LBIO28 et LBIO14 situé sur les locus (*HJQ46_12400*), (*HIG33_12375*) et (*HIF97_09360*), respectivement, avec un pourcentage d'homologie de 100 %. Les gènes *cps4IGF* (*lp_2100* et *lp_2102 ~2103*) de la souche de référence, auraient en outre des séquences très similaires aux gènes de la glycosyltransférase, impliquées dans la synthèse du polysaccharide. Ces derniers, correspondent aux gènes *cps4* ayant un taux de similarité de plus de 94 %, et auxquels ont été attribués les identifiants (*HJQ46_12375* et *HJQ46_12385~12390*), (*HIG33_12345* et *HIG33_12355 ~12365*) (*HIF97_09335* et *HIF97_09345 ~09350*).

Deux gènes prédits pour coder une flippase *cps4J* (*Wzx*) et une polymérase *cps4H* (*Wzy*), ont été identifiés dans les trois *cps4* des trois génomes étudiées, les produits de ces gènes seraient potentiellement impliqués dans la translocation et la polymérisation des sous-unités EPS (De Vuyst et De Vin, 2007). L'absence du quatrième *cluster* chez la souche mutante *Lb. plantarum* WCFS1, n'a pas affecté la production et la composition du polymère glucidique (Remus *et al.*, 2012 ; Prechtel *et al.*, 2018). Cependant, l'ensemble de gènes composant les *clusters* *cps2*, *cps3* et *cps4* déterminent le rendement de la souche en EPS (Jiang et Yang, 2018).

Enfin, il est vrai que l'approche moléculaire dans l'étude et la caractérisation des gènes responsables de la production des EPS, permet une meilleure compréhension des mécanismes de biosynthèse (Ates, 2015). Cependant, il reste peu probable que l'identification des groupes de gènes permet de tirer des conclusions sur la quantité et le type de polysaccharides, ou même sur les propriétés rhéologiques, lorsqu'ils sont utilisés dans la fermentation du lait (Zeidan *et al.*, 2017).

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

L'industrie laitière est en constante évolution en mettant sur le marché des produits innovants qui répondent aux nouvelles exigences de consommation. La sélection de ferments aux propriétés multifonctionnels organoleptiques, technologiques, nutritionnelles et sanitaires à partir de ressources naturelles comme les aliments traditionnels, offre une solution de choix dans l'élaboration de produits laitiers fermentés sains avec un Biolabel.

Ce travail de thèse avait comme objectif principal, la sélection de souches lactiques productrices d'EPS viscosifiant. Au total, 30 échantillons de laitages fermentés de manière artisanale ont été collectés de plusieurs régions de l'Est algérien, à partir desquels 584 isolats ont été obtenus.

Le criblage des isolats pour la production des EPS, a été réalisé par quatre méthodes culturales, qui ont permis de sélectionner 18 isolats. Ces derniers ont été caractérisés sur le plan phénotypique, où la forme bacillaire est apparue majoritaire, avec 14 isolats hétérofermentaires facultatifs contre 4 de forme sphérique ayant un métabolisme hétérofermentaire. Ces derniers produisaient des EPS uniquement en présence de saccharose dans le milieu de culture contrairement aux autres isolats.

La caractérisation moléculaire des souches par séquençage du gène de l'ARNr 16S a complété leur identification. Les 18 souches productrices d'EPS, ont été affiliées aux deux genres de bactéries lactiques : *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, rattachées aux deux espèces *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum*. Ces espèces sont bien documentées pour la production des EPS, mais une instabilité de ce caractère a été observée lors des repiquages successifs de certains isolats, probablement due à la localisation plasmidique des gènes *eps*.

Pour cette raison, une présélection a été appliquée sur la base d'un phénotype producteur stable. Ainsi, 6 isolats ont été retenus, leurs séquences du gène de l'ARNr16S, ont été comparées *in silico* par les deux programmes *RNAfold 2.4.13*. et *Nebcutter* afin d'écarter d'éventuels clones. Ces isolats ont été utilisés pour des fermentations en batch dans un mélange laitier constitué de lait écrémé supplémenté d'une source d'azote. Un isolat de phénotype non producteur d'EPS de la même espèce *Lb. plantarum*, a été utilisé dans toutes les expérimentations comme souche témoin.

Les gels lactiques générés par les souches sélectionnées ont été caractérisés selon 5 critères macroscopiques : la synérèse, la viscosité, la fermeté, la texture et le filant. Tous ces paramètres ont été déjà corrélés à la présence des EPS dans les matrices laitières. Les données qualitatives des gels ont été traitées par une analyse factorielle des correspondances, afin de sélectionner les isolats générant les matrices laitières, ayant les meilleurs attributs physiques.

Les résultats de l'analyse statistique, ont permis de sélectionner les deux souches les plus performantes LBIO1 et LBIO28. L'étude de la production des EPS par ces deux souches, en utilisant le même milieu de fermentation, a été suivie pendant 48 heures. Les EPS ont été extraits, purifiés et quantifiés par deux méthodes : gravimétrie, et par chromatographie d'exclusion couplée à un détecteur de lumière multiangle (SEC/MALLS). Les rendements en EPS des deux souches ont montré que la souche LBIO28 produisait plus de polymère avec 133 mg/L contre 43 mg/L pour la souche LBIO1 en 24 h de fermentation. La quantité cumulée avant gélification, était aussi plus importante pour la souche LBIO28.

L'analyse par SEC/MALLS, a permis de quantifier les polymères mais aussi de définir leurs poids moléculaires. Ces derniers, seraient synthétisés tout au long de la croissance bactérienne, ce sont donc des métabolites primaires. Cependant, les niveaux de production estimés par chromatographie ont été considérablement revus à la baisse, à 31 mg/L pour LBIO28 et 21 mg/L pour LBIO1 en 24 h de fermentation. Les polymères produits par les deux isolats sont en outre de hauts poids moléculaires atteignant $2,04 \pm 0,5 \cdot 10^6$ et $2,13 \pm 0,9 \cdot 10^6$ Da, avec des rayons de giration de $83,7 \pm 2,9$ et $76,3 \pm 0,5$ nm dans le même ordre. En revanche, concernant la souche LBIO14, aucune des deux techniques n'a décelé la présence d'EPS dans le lyophilisat. Cependant, nous n'écartons pas l'éventualité de l'existence d'une fraction d'EPS de faible poids moléculaire ou produite en quantité infime, mais elle reste sans aucun effet sur la rhéologie du gel étant donné la faible viscosité enregistrée. Il serait éventuellement préférable d'utiliser des souches mutantes, où les gènes *eps* seraient supprimés du génome par la technique du *knock-out*.

L'étude du comportement rhéologique des trois gels brassés, par la mesure de leurs viscosités apparente à l'entonnoir Posthumus a montré, que les deux gels fermentés par les souches filantes LBIO1 et LBIO28 avaient une viscosité significativement plus importante, que celle du gel témoin de LBIO14. Cette observation a été également notée pour les gels non brassés (fermes), où la viscosité est apparue plus importante pour les gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28, comparativement au gel témoin SMCLBIO14. Toutefois, le second gel (SMCLBIO28) est nettement plus visqueux, ce qui peut être lié aux caractéristiques chimiques du polymère synthétisé.

L'étude de la perméabilité des gels lactiques a montré qu'il existe une différence significative entre les trois indices de perméabilité. Seulement, les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28, sont significativement moins perméables que le gel témoin SMCLBIO14. De même, les résultats de la synérèse provoquée par la force centrifuge, font état d'une différence significative entre les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28, comparativement au témoin

SMCLBIO14. Cependant, le second gel (SMCLBIO28) semble retenir plus de sérum sous l'action mécanique. L'hypothèse avancée pour expliquer ces résultats était basée sur la distribution des deux polymères glucidiques, due à une différence de cinétique d'acidification en faveur de la souche LBIO28.

Ces résultats de mesures physiques, ont été complétés par une étude microstructurale réalisée au microscope confocal à balayage laser (CLSM), qui offre une grande aide dans la compréhension des phénomènes biologique et physique. Les micrographies observées au microscope CLSM ont montré des microstructures ouvertes en *sponge-like* pour les deux gels SMCLBIO1 et SMCLBIO28, avec un réseau caséique plus dense pour le premier gel, mais une porosité plus fine et homogène pour le second (SMCLBIO28). Quant au gel SMCLBIO14, il a présenté un réseau protéique moins dense avec une sédimentation des cellules bactériennes, ce qui correspond aux données de perméabilité et de synérèse.

Les cellules bactériennes ont été également observées par cryomicroscopie électronique. Les micrographies réalisées montrent des cellules bactériennes, sous forme bacillaire entourées par un réseau très dense de filaments *web-like* EPS, qui seraient le polymère excrété et attaché aux membranes cellulaires, qu'on ne retrouve pas sur la micrographie de la souche LBIO14.

Concernant la localisation des groupes de gènes des EPS et l'étude de leur machinerie biosynthétique. Les ADN génomiques ont été extraits et séquencés en entier par la technologie de séquençage Illumina, avant d'entamer la recherche des gènes *eps in silico*. L'analyse génomique a d'abord concerné les gènes de biosynthèse des homopolysaccharides appartenant aux familles GH68 et GH70, mais leur recherche s'est révélée infructueuse. Par cette même approche, les gènes responsables de la biosynthèse des hétéropolysaccharides ont été ensuite recherchés, en utilisant comme référence la souche *Lb. plantarum* WCFS1, dont les *clusters eps* sont bien caractérisés. Les résultats de la comparaison génomique obtenus, confirment qu'il existe 2 groupes de gènes complets (*cps3* et *cps4*) dans les trois génomes des souches LBIO1 et LBIO28 et LBIO14 avec un taux de similarité de 100 %. En outre, les deux souches filantes possèdent en plus de ces deux *clusters eps*, 4 gènes appartenant au deuxième groupe de gène le *cps2*, dont 3 gènes présentent une importante similarité (94%) avec leurs homologues de la souche de référence. Cela révèle leur implication dans la synthèse du polymère filant de haut poids moléculaire, car ils n'ont pas été identifiés chez la souche LBIO14.

D'autre part, l'analyse des génomes *in silico* a concerné la recherche de gènes codant pour les facteurs de virulences et de résistance aux antibiotiques, qui pourraient compromettre l'utilisation des souches pour des fermentations alimentaires. Les résultats de cette analyse ont

confirmé l'innocuité des souches, ce qui est tout à fait en accord avec leur statut GRAS. D'autres gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des vitamines telles que la riboflavine, le folate et la pyridoxine, ainsi que ceux codant pour les bactériocines ont été également identifiés dans les trois génomes. Ces propriétés biotechnologiques sont extrêmement importantes, car elles permettent la bioconservation et l'enrichissement en vitamines des aliments fermentés.

Les deux souches LBIO1 et LBIO28 isolées au cours de cette étude ont montré une propriété technologique stable très importante, en l'occurrence la production d'EPS viscosifiants capables de conférer aux laits écrémés après fermentation une texture fine et visqueuse sans addition de saccharose au milieu, ce qui est très intéressant pour la fabrication d'un produit laitier peu calorique. Elles ont généré des matrices laitières avec deux structures différentes. Par conséquent, nous préconisons l'exploitation de la souche LBIO1 dans la fabrication d'un fromage frais ou d'un yaourt de type ferme (non brassé), car elle a tendance à retenir naturellement plus de lactosérum. Quant à la souche LBIO28, générant des gels plus visqueux, avec une plus grande rétention de lactosérum sous action mécanique. Celle-ci est plus adaptée à la fabrication de yaourts brassés ou à boire.

Enfin, plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour compléter ce travail de thèse et répondre à certaines questions concernant la transition du laboratoire à l'industrie. Est ce que ces souches conserveront-elles les mêmes aptitudes technologiques ? Quel sera leur comportement en co-cultures ?

L'étude des fonctionnalités biologiques des EPS comme les activités immunomodulatrices, anti-tumorales, ou encore anti-oxydantes, méritent également d'être explorées, elles constitueront de futurs éléments de recherche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arti, C., Khusro, A., Functional and technological properties of exopolysaccharide producing autochthonous *Lactobacillus plantarum* strain AAS3 from dry fish based fermented food. (2019). *LWT - Food Science and Technology* . <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108387>.
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., ... Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, *108*, 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155>
- Acedo-Félix, E., & Pérez-Martínez, G. (2003). Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*(1), 67–75. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02325-0>
- Adapa S, & Schmidt K.A. (1998). Physical Properties of Low-fat Sour Cream Containing Exopolysaccharide Producing. *Journal of Food Science*, *63*(5), 1–3.
- Ale, E. C., Perezlindo, M. J., Pavón, Y., Peralta, G. H., Costa, S., Sabbag, N., ... Binetti, A. G. (2016). Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a new food additive. *Food Research International*, *90*, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.045>
- Ali, K., Huzaifa, M., Muhammad, M., Iqbal, A., Masud, T., Qazalbash, M., ... Naveed, M. (2019). Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus bulgaricus* from curd. (November 2018), 1–7. <https://doi.org/10.1002/fsn3.905>
- Altieri, C., Ciuffreda, E., Maggio, B. Di, & Sinigaglia, M. (2017). Lactic acid bacteria as starter cultures. 1–15. Chapter 1 In *Starter Cultures in Food Production*, Barbara Speranza, Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo and Milena Sinigaglia. 1st Edition, John Wiley & Sons.
- 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*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.004>
- Arfaoui, L., (2014). Compréhension des effets des propriétés intrinsèques des exopolysaccharides produits in situ seuls ou en présence de polysaccharides commerciaux sur la microstructure et les propriétés rhéologiques du yogourt ferme. Thèse de Doctorat en Sciences et Technologie des Aliments. Université Laval, Quebec, Canada.
- Arndt, D.; Marcu, A.; Liang, Y.; Wishart, D.S. (2019). Review PHAST, PHASTER and 731 PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief Bioinform.* *732*, *20*, 1560-1567. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx121>
- Ates, O. (2015). Review Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Ayala-Hernandez, I., Goff, H. D., & Corredig, M. (2008). Interactions between milk proteins and exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* observed by scanning electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, *91*(7), 2583–2590. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0876>
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Hamed, F., & Shaker, R. (2018). Rheological, textural, microstructural and sensory impact of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese. *LWT - Food Science and Technology*, *87*, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.023>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Olaimat, A., Esposito, G., Itsaranuwat, P., Osaili, T., ... Liu, S. Q. (2020). Physicochemical, bioactive and rheological properties of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Pediococcus pentosaceus* M41. *Carbohydrate Polymers*, 229(August), 115462. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115462>
- Axelsson et Ahrné, (2000) Lactic Acid Bacteria. In Applied Microbial Systematics priest et Good fellow. Springer-Science business media, B.V. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4020-1>
- Axelsson L. (2004). Classification and physiology In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3^e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc., , vol. 633, 1 - 66.
- B**adel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011>
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D. E., & Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.006>
- Baglio, E. (2014). Chemistry and Technology of Yoghurt Fermentation. Springer Briefs In Molecular Science. Chemistry of Food. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07377-4>.
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., ... Park, Y. H. (2016). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(1), 1–23. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i1.23819>
- Bancalari, E., Alinovi, M., Bottari, B., Caligiani, A., Mucchetti, G., & Gatti, M. (2020). Ability of a Wild *Weissella* Strain to Modify Viscosity of Fermented Milk. *Frontiers in Microbiology*, 10(January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03086>
- Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; Pyshkin, A.V.; Sirotkin, A.V.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M.A.; Pevzner, P.A (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 19, 455-77.
- Baruah, R., Deka, B., & Kashyap, N. (2017). Dextran Utilization During Its Synthesis by *Weissella cibaria* RBA12 Can Be Overcome by Fed-Batch Fermentation in a Bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 242, 124-131. Edition Springer. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2522-4>
- Behare, P. V, Singh, R., Kumar, M., Prajapati, J. B., & Singh, R. P. (2009). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. *Journal of Food Science And Technology-Mysore*, 46(1), 1–11.
- Behare, P. V., Singh, R., Nagpal, R., & Rao, K. H. (2013). Exopolysaccharides producing *Lactobacillus fermentum* strain for enhancing rheological and sensory attributes of low-fat dahi. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1228–1232. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0999-6>
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Bekal, S., Belguesmia, Y., Drider, D., & Prevost H., (2009). Le citrate. Chapitre 1 Dans Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Drider, D. et Prevost.H, édition Economica.
- BeMiller, J. N. (2019). Carbohydrate chemistry for food scientists. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Benasla, A. (2012). Production des exopolysaccharides par des souches lactobacilles. Thèse de Magister. Université Es'Sania Oran, Algérie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bennama, R. (2012). *Streptococcus thermophilus*: Isolement et recherche systématique de souches indigène productrices d'exopolysaccharides. Thèse de Doctorat. Université Es'Sania Oran, Algérie.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Sayers, E. W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D41–D47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1094>
- Bergmaier, D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. Rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum (Vol. 2). Thèse de Doctorat en Sciences. Université Laval, Quebec, Canada.
- Berthold-pluta, A. M., & Garbowska, M. (2019). Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria – Health-Promoting Properties and Application in the Dairy Industry, *Advancements Of Microbiology*, 58, 2, 191–204. <https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.2.191>
- Bertrand, M. E., & Turgeon, S. L. (2007). Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.005>
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Mastromatteo, M., & Sinigaglia, M. (2008). Combined effects of pH, yeast extract, carbohydrates and di-ammonium hydrogen citrate on the biomass production and acidifying ability of a probiotic *Lactobacillus plantarum* strain, isolated from table olives, in a batch system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1721–1729. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9666-x>
- Bindhumol, I. & Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049–1057. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0636-y>
- Birch, J., Harðarson, H. K., Khan, S., Van Calsteren, M. R., Ipsen, R., Garrigues, C., ... Svensson, B. (2017). Effect of repeat unit structure and molecular mass of lactic acid bacteria hetero-exopolysaccharides on binding to milk proteins. *Carbohydrate Polymers*, 177, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.055>
- Birch, J., Van Calsteren, M. R., Pérez, S., & Svensson, B. (2019). The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 205, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.063>
- Björkroth, J., & Koort, J. (2016). Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 45–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00255-7>
- Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2017). Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, 101, 1–19. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>
- Boels, I. C., van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2001). Sugar Catabolism and Its Impact on the Biosynthesis and Engineering of Exopolysaccharides Production in Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 723–732
- Bourgeois, C.M., Larpent J. P., (1996). *Microbiologie Alimentaire. Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Edition Tech et Doc Lavoisier.
- Bouzar, F., Cerning, J., & Desmazeud, M. (1997). Exopolysaccharide Production and Texture-Promoting Abilities of Mixed-Strain Starter Cultures in Yogurt Production. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2310–2317. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76181-2e](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76181-2e)
- Briggiler-Marcó, M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., & Hynes, E. (2007). Nonstarter *Lactobacillus* Strains as Adjunct Cultures for Cheese Making: In Vitro Characterization and Performance in Two Model Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4532–4542. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0180>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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(2), 407–423. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73619-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73619-4)
- Bron, P. A., Marcelli, B., Mulder, J., van der Els, S., Morawska, L. P., Kuipers, O. P., ... Kleerebezem, M. (2019). Renaissance of traditional DNA transfer strategies for improvement of industrial lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.09.004>
- Bullard, J. (2011). Interactions de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides et effets sur les propriétés rhéologiques du yogourt. Mémoire de Maitrise en Sciences et Technologie des Aliments. Université Laval .Quebec, Canada.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., ... Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.09.005>
- Burns, P., Vinderola, G., Reinheimer, J., Cuesta, I., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2011). Technological characterization and survival of the exopolysaccharide-producing strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193 and its bile-resistant derivative 193+ in simulated gastric and intestinal juices . *Journal of Dairy Research*, 78(3), 357–364. <https://doi.org/10.1017/s0022029911000355>
- Canquil, N., Villarroel, M., Bravo, S., Rubilar, M., & Shene, C. (2007). Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 68(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.012>
- Castillo, M., Lucey, J. A., Wang, T., & Payne, F. A. (2006). Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, 16(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.004>
- Castro-Bravo, N., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodriguez-Carvajal, M. A., Ruas-Madiedo, P., & Margolles, A. (2017). Gene replacement and fluorescent labeling to study the functional role of exopolysaccharides in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01405>
- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2018). Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>
- Cescutti, P. (2010). Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides. In *Microbial Glycobiology* (First edit) chapter 6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-1237-4546-0.00006-7>
- Cerning, J. (1990). Exocelular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 113–130.
- Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Le Lait*, 75(4–5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/0023-7302\(96\)80129-1](https://doi.org/10.1016/0023-7302(96)80129-1)
- Chandan, R. C. (2014). Dairy - Fermented Products. In *Food Processing: Principles and Applications: Second Edition*, 9780470671, 405–436. Chapter 18. <https://doi.org/10.1002/9781118846315.ch18>
- Charchoghlyan, H., Bae, J. E., Kwon, H., & Kim, M. (2017). Rheological properties and volatile composition of fermented milk prepared by exopolysaccharide-producing *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er2 317/402 strain Narine. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(3), 327–338. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0065-8>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., & Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), S316–S330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>
- Chen, L., Zhang, Q., Ji, Z., Shu, G., & Chen, H. (2018). Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. *LWT - Food Science and Technology*, 91(February), 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.002>
- Chen, W. & Narbad, A. (2018). *Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1559-6>
- Chen, C., Wang, L., Lu, Y., Yu, H., & Tian, H. (2019). Comparative transcriptional analysis of *Lactobacillus plantarum* and its CCPA-knockout mutant under galactooligosaccharides and glucose conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01584>
- Cho, G. S., Cappello, C., Schrader, K., Fagbemigun, O., Oguntoyinbo, F. A., Csovcics, C., ... Franz, C. M. A. P. (2018). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from fermented goat milk in Tajikistan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(11), 1834–1845. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.08011>
- Choi, S., Jin, G. D., Park, J., You, I., & Kim, E. B. (2018). Pan-genomics of *Lactobacillus plantarum* revealed group-specific genomic profiles without habitat associations. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 1352–1359. <https://doi.org/10.4014/jmb.1803.03029>
- Cibik, R., Cetinkaya, F., Ersoy, M., & Yibar, A. (2010). Identification and technological characterization of *Lactococcus* isolated from traditional Turkish cheeses. *Revue Méd. Vét.*, 2010, 161, 11, 509-514
- Ciocia, F., McSweeney, P. L. H., Piraino, P., & Parente, E. (2013). Use of dairy and non-dairy *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus* strains as adjuncts in cheddar cheese. *Dairy Science and Technology*, 93(6), 623–640. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0131-8>
- Cirrincone, S., Breuer, Y., Mangiapane, E., Mazzoli, R., & Pessione, E. (2018). 'Ropy' phenotype, exopolysaccharides and metabolism: Study on food isolated potential probiotics LAB. *Microbiological Research*, 214(July), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.004>
- Corbo, M. R., Racioppo, A., Monacis, N., & Speranza, B. (2017). Commercial starters or autochthonous strains? That is the question. Chapter 10 in *Starter Cultures in Food Production*, 174–198. <https://doi.org/10.1002/9781118933794>.
- Corsetti, A., & Valmorri, S. (2011). *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 111–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00263-6>
- Costa, N. E., Wang, L., Auty, M. E., Hannon, J. A., McSweeney, P. L. H., & Beresford, T. P. (2012). Rheological, microscopic and primary chemical characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DPC6532. *Dairy Science and Technology*, 92(3), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0059-4>
- Coulibaly, I., Dubois-Dauphin, R., Danthine, S., Majad, L., Mejoub, T., Destain, J., ... Thonart, P. (2011). Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 15(2), 287–299.
- Croguennec T., Jeantet R., & Brulet G. (2008). *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*. Edition Lavoisier.
- Cunlei, Z., Jiaqi, L., Jie, W., Haitao, G., & Rihua, X. (2015). Screening and identification of exopolysaccharide-producing bifidobacteria from infant gut. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 7(9), 685–690. <https://doi.org/10.19026/ajfst.7.1628>

- D**abour, N., Kheadr, E. E., Fliss, I., & LaPointe, G. (2005). Impact of ropy and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *International Dairy Journal*, 15(5), 459–471. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.011>
- 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*, 11(9), 747–757. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00118-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00118-2)
- De Jong, A.; van Hijum, S.A.F.T.; Bijlsma, J.J.E.; Kok, J.; Kuipers, O.P. (2006). BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.*, 34, W273-W279.
- De Jong, S., & van de Velde, F. (2007). Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1172–1187. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.004>
- De Oliveira, MN. (2018). Microstructure of Dairy Products: Challenges and Future Trends. Chapter 14 In *Microstructure of Dairy Products*, El Bakry, M., Sanchez, A., Mehta, B. First Edition, Willey Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118964194>
- Delarras, C. (2014). *Pratique en Microbiologie de Laboratoire. Recherche de bactéries et de levures-moisissures.* Edition Tech et Doc, Lavoisier.
- Delbès-Paus, C., Monnet, C., & Irlinger, F. (2015). Microbial communities for the benefit of cheese quality: Diversity, adaptive and functional dynamics of indigenous populations and starters. *Innovations Agronomiques*, 44(c), 2008–2008.
- Deléage, G., & Gouy, M. (2013). *Bioinformatique: Cours et cas pratique.* 2^e Edition Dunod. www.dunod.com.
- Denis, C., Beal, C., Bouix, M., Chamba, J., Jamet, E., Ogier, J., ... Thierry, A. (2006). Congélation de microorganismes d'intérêt laitier : optimisation des conditions d'adaptation des souches avant congélation et des conditions de remise en culture après congélation. *Les Actes Du BRG*, 6, 433–448.
- Deo, D., Davray, D., & Kulkarni, R. (2019). A Diverse Repertoire of Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Clusters in *Lactobacillus* Revealed by Comparative Analysis in 106 Sequenced Genomes. *Microorganisms* 2019, 7, 444, 1-19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100444>
- De Roissart, H., Luquet, F.M. (1994). *Lactic Acid Bacteria: Fundamental and Technological Aspects.* Edition, Lorica, Uriage, Lavoisier, Paris.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B., ... Narbad, A. (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31938–31951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507418>
- Dertli, E., Toker, O. S., Durak, M. Z., Yilmaz, M. T., Tatlisu, N. B., Sagdic, O., & Cankurt, H. (2016). Development of a fermented ice-cream as influenced by in situ exopolysaccharide production: Rheological, molecular, microstructural and sensory characterization. *Carbohydrate Polymers*, 136, 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.047>
- Devereux, R. y Wilkinson, S. (2004). Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3(1), 509–522. Retrieved from file:///C:/Users/sears/Downloads/9781402021763-c3.pdf

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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(6), 1059–1068. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00445.x>
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999a). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>
- De Vuyst, Luc, & Degeest, B. (1999b). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Technological bottlenecks and practical solutions. *Macromolecular Symposia*, 140, 31–41. <https://doi.org/10.1002/masy.19991400105>
- 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(9), 687–707. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00114-5)
- De Vuyst, L., & De Vin, F. (2007). Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Comprehensive Glycoscience*, 477–519. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00129-X>
- Di, W., Zhang, Y. C., Yi, H. X., Han, X., Wang, S. M., & Zhang, L. W. (2018). Research Methods for Structural Analysis of Lactic Acid Bacteria Induced Exopolysaccharides. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(6), 875–882. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(18\)61091-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61091-6)
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Minervini, F., Gallo, G., & Gobbetti, M. (2003). Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *International Dairy Journal*, 13(2–3), 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00143-7)
- Dimopoulou, M. (2013). Les polysaccharides de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, de l'élucidation de leurs structures et voies de biosynthèse à leur valorisation technologique. Thèse de Doctorat en Sciences, Technologie et santé. Université de Bordeaux 2
- Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Arey, B. W., Williams, K. H., Buck, E. C., & Fredrickson, J. K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: Comparative analysis by electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1254–1262. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-10>
- Doleyres, Y., Schaub, L., & Lacroix, C. (2005). Comparison of the Functionality of Exopolysaccharides Produced In Situ or Added as Bioingredients on Yogurt Properties. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4146–4156. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73100-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73100-3)
- Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>
- Domingos-Lopes, M. F. P., Lamosa, P., Stanton, C., Ross, R. P., & Silva, C. C. G. (2018). Isolation and characterization of an exopolysaccharide-producing *Leuconostoc citreum* strain from artisanal cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 0–3. <https://doi.org/10.1111/lam.13073>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>
- Douillard, F. P., & de Vos, W. M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: From food to health. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8>
- Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759–768. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00119-4)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dubois, M., Gilles, K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A. & Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28,3,350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dupont I. (1998). Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches.Mémoire de master.Université Laval, Quebec, Canada.
- E**lbanna, K., Metry, W., & Elgarhy, H. (2015). Exopolysaccharide from *Lactobacillus pentosus* Strain H2 and Its Impact on Rheological Properties and the Sensory Evaluation of Low Fat Yoghurt and UF-Soft Cheese. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(5), 555. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20150405.17>
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, 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(19), 7843–7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>
- Ennadir, J., Hassikou, R., Al Askari, G., Arahou, M., Bouazza, F., Amallah, L., ... Khedid, K. (2014). Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(4), 1125–1132.
- Ermis, E., Dertli, E., & Yilmaz, M. T. (2020). Optimization of exopolysaccharide production of *Lactobacillus brevis* E25 using RSM and characterization. *Sakarya University Journal of Science*, 24(1), 151-160. <https://doi.org/10.16984/aufenbilder.545929>
- Espeche, M. C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., & Nader-Macías, M. E. F. (2012). Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*, 18(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.01.002>
- Evanovich, E., De Souza Mendonça Mattos, P. J., & Guerreiro, J. F. (2019). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: An overview. *International Journal of Genomics*. <https://doi.org/10.1155/2019/4973214>
- F**aber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. G. (1998). The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*, 310(4), 269–276. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00189-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00189-X)
- Feldmane, J., Semjonovs, P., & Ciprovica, I. (2013). Potential of Exopolysaccharides in Yoghurt Production. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7(8), 424–427.
- Flahaut, N. A. L., & de Vos, W. M. (2014). Systems biology and metabolic engineering of lactic acid bacteria for improved fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*, Holzapfel, W. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00008-6>
- Folkenberg, D. M., Dejmek, P., Skriver, A., Skov Guldager, H., & Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*, 16(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.10.013>
- Fontana, C., Li, S., Yang, Z., & Widmalm, G. (2015). Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydrate Research*, 402, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.09.003>
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., ... Franz, C. M. A. P. (2015). The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. K., & Gänzle, M. G. (2011). Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiology*, 28(3), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.006>
- Gancel, F., Novel, G., Carcano, D. Loones, A., & Ramos, P. (1988). Brevet d'invention. Demandeur société de développement et d'innovations des marchés agricoles et alimentaires. SODIMA. n° enregistrement 8808009 n° publication 2632968 République française.
- Gangoiti, M. V., Puertas, A. I., Hamet, M. F., Peruzzo, P. J., Llamas, M. G., Medrano, M., ... Abraham, A. G. (2017). *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydrate Polymers*, 170, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.053>
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764–788. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.011>
- Gentès, M.-C., St-Gelais, D., & Turgeon, S. L. (2011). Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, 91(5), 645–661. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0039-0>
- Gentès, M. (2011). Compréhension du rôle structural d' exopolysaccharides de bactéries lactiques dans des systèmes laitiers. Thèse de Doctorat. Université Laval, Quebec, Canada
- Gentès, M. C., St-Gelais, D., & Turgeon, S. L. (2013). Exopolysaccharide-milk protein interactions in a dairy model system simulating yoghurt conditions. *Dairy Science and Technology*, 93(3), 255–271. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0121-x>
- Gerwig, G. J. (2018). Structural Analysis of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. Chapter 7. In *Lactic Acid Bacteria Methods and Protocols*, Vol. 1887, 67–84, Springer Nature Switzerland AG. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_7
- Giraffa (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. Chapter 4 In *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*, Holzapfal, W., Wood, J.B. Edition Willey Blackwell.
- Goh, K. K. T., Nair, R. S., & Matia-Merino, L. (2008). Exploiting the functionality of lactic acid bacteria in ice cream. *Food Biophysics*, 3(3), 295–304. <https://doi.org/10.1007/s11483-008-9079-2>
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 70–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Guénard-Lampron, V., St-Gelais, D., Villeneuve, S., & Turgeon, S. L. (2019). Individual and sequential effects of stirring, smoothing, and cooling on the rheological properties of non fat yogurts stirred with a technical scale unit. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 190–201. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14565>
- Guiraud, J. P., (2003). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod
- Güler-Akin, M. B., Serdar Akin, M., & Korkmaz, A. (2009). Influence of different exopolysaccharide-producing strains on the physicochemical, sensory and syneresis characteristics of reduced-fat stirred yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 422–430. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00499.x>

- Haj-Mustafa, M., Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimanian-Zad, S. (2015). Statistical study on fermentation conditions in the optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* 519 in skimmed milk base media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.013>
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A., & Abraham, A. G. (2015). Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.097>
- Hammes, W. P., Hertel, C., (2009). Family I. *Lactobacillaceae*. In De Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer et W. B. Whitman., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three, The Firmicutes. Dordrecht ; New York :Springer, 2009.
- Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., & Zhang, L. (2016). Improvement of the Texture of Yogurt by Use of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7945675>
- Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. *Intech*, 515–538. <https://doi.org/10.5772/50839>
- Harwlakar, V. R., & Kalab, M. (1983). Susceptibility of yoghurt to syneresis. Comparison of centrifugation and drainage methods. *Food Research Institute, Research Branch, Agriculture Canada*, 38(9), 517–522.
- Hassan, Ashraf N., Frank, J. F., & Qvist, K. B. (2002). Direct Observation of Bacterial Exopolysaccharides in Dairy Products Using Confocal Scanning Laser Microscopy. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1705–1708. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74243-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74243-4)
- Hassan, A. N., Frank, J. F., & Elsoda, M. (2003a). Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 13(9), 755–762. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00101-8)
- Hassan, A.N., Ipsen, R., Janzen, T., & Qvist, K. B. (2003b). Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1632–1638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73748-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73748-5)
- Hassan, A. N., Corredig, M., Frank, J. F., & Elsoda, M. (2004). Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant. *Journal of Dairy Research*, 71(1), 116–120. <https://doi.org/10.1017/S0022029903006605>
- Hassan, A.N. (2008). ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and Challenges of Exopolysaccharide-Producing Lactic Cultures in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1282–1298. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0558>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. El. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 365, Issue 20, fny213. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>
- Haque, A., Richardson, R. K., & Morris, E. R. (2001). Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 593–602. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00090-X)
- Hellinga, C., Somenes, D.J., & Koenraads JPJM (1986). Viscosity of stirred yoghurt: modern techniques useful in analysing and improving routine measurements. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 40, 217–240

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Herrero, M. A., Mayo, B., Gonzalez, B., & Suárez, U. E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(5), 565–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03548.x>
- Herrerros, M. A., Fresno, J. M., González Prieto, M. J., & Tornadijo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13(6), 469–479. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00054-2)
- Hess, S. J., Roberts, R. F., & Ziegler, G. R. (1997). Rheological Properties of Nonfat Yogurt Stabilized Using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Producing Exopolysaccharide or Using Commercial Stabilizer Systems. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 252–263. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75933-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75933-2)
- Hill, H. D., & Straka, J. G. (1988). Protein Determination Using Bicinchoninic Acid in the Presence of Sulfhydryl Reagents. *Anal. Biochem.*, 170, 203–208.
- Holzapel W.H., & Wood, J.B. (1995). Lactic Acid Bacteria In Contemporary perspective. Chapter 1 In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Wood, J.B. & Holzapel W.H. Volume 2 Edition Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0>
- Holzapel W.H., & Wood, J.B. (2014). *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*. Edition Willey Blackwell.
- I**keda, S. D. Kondoh, N. P. D. Aryantini, T. Urashima, and K. F. (2018). Chapter 6. In *Lactic Acid Bacteria Methods and Protocols* (Vol. 1887, pp. 55–65). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-5558-5.00006-3>
- Ikeda, S., Murayama, D., Tsurumaki, A., Sato, S., Urashima, T., & Fukuda, K. (2019). Rheological characteristics and supramolecular structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067. *Carbohydrate Polymers*, 218, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.076>
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., ... Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007>
- İspirli, H., Sagdic, O., Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2018). Physicochemical characterisation of an α -glucan from *Lactobacillus reuteri* E81 as a potential exopolysaccharide suitable for food applications. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.015>
- J**amet, (2009). Les bactéries lactiques: une composante de l'écosystème microbien des fromages. Chapitre 5 Dans *Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, génomique et Applications industrielles*, Drider, D., Prévost, H. Edition Economica
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2002). Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1887–1891. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1887>
- Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., Shah, N. P., Wei, H., & Tao, X. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1736–1746. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10434>
- Jiang, Y., & Yang, Z. (2018). A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 47, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.060>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jiang, Y., Zhang, J., Zhao, X., Zhao, W., Yu, Z., Chen, C., & Yang, Z. (2018). Complete genome sequencing of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* k25 provides genetic evidence for the probiotic functionality and cold endurance capacity of the strain. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(7), 1225–1233. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1453293>
- Joffin, J.N & Lateral, G., (2006). Microbiologie Technique. Tom 1. Dictionnaire des Techniques. Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique.
- Josephsen & Neve, (2004). Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. In *Lactic acid Bacteria, Microbiological and functional aspects*, Edition S.Salminen, A.von Wright and A. Ouwehand.
- Joshi, S. R., & Kojam, K. (2014). Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. *National Academy Science Letters*, 37(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0203-6>
- Johnson, J. L., C. F. Phelps, C. S. Cummins, J. London, & F. Gasser. (1980). Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 3053–68.
- K**acem, M., & Kaid Harche, M. (2008). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas y Aceites*, 59(3), 218–224. <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i3.511>
- Kandler, O., (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49 (1983) 209-224.
- Kang, H.J. (2014). Etude de l'impact de la phosphorylation de la co-polymérase sur l'interaction entre les protéines du complexe de polymérisation des exopolysaccharides chez *Lactobacillus rhamnosus*. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Laval, Québec, Canada.
- Kasapis, S., & Bannikova, A. (2017). Rheology and Food Microstructure. Chapter 2 In *Advances in Food Rheology and its Applications* Ahmed, J., Ptaszek, P., Basu, S. Edition Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00002-4>
- Kazazi, H., Khodaiyan, F., Rezaei, K., Pishvaei, M., Mohammadifar, M. A., & Moieni, S. (2017). Rheology and microstructure of kefir and whey protein mixed gels. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1168–1174. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2553-4>
- Kersani, I. (2018). Production d'exopolysaccharides par des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Biotechnologie. Université Es'Senia Oran, Algérie.
- Khanal, S. N., & Lucey, J. A. (2018). Effect of fermentation temperature on the properties of exopolysaccharides and the acid gelation behavior for milk fermented by *Streptococcus thermophilus* strains DGCC7785 and St-143. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3799–3811. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13203>
- Khalisanni, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Khalil, E. S., Manap, M. Y. A., Mustafa, S., Alhelli, A. M., & Shokryazdan, P. (2018). Probiotic properties of exopolysaccharide-producing lactobacillus strains isolated from tempoyak. *Molecules*, 23(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23020398>
- Khandelwal, P., Gaspar, F., Crespo, M., & Upendra, R. (2015). Lactic Acid Bacteria: General Characteristics, Food Preservation and Health Benefits. Chapter 6 In *Fermented Foods, Part I*. Montet, D., Ramesh C. Ray. <https://doi.org/10.1201/b19872-8>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Klaubauf S. & Segers, F.J.J. (2018). Research Tools and Methods for the analysis of Microbiota in Dairy products. Chapter 2 In *Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology*, Edition IGI Global Ceren Akal, H., Budak, O, S
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Kranenburg, R. van, Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990–1995. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0337704100>
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., & De Vos, W. M. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3390–3393.
- Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Özer, B., & Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 780–789. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5753>
- König, H., & Fröhlich, J. (2009). Lactic Acid Bacteria. Chapter 1 In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 3-6.
- Kristo, E., Miao, Z., & Corredig, M. (2011). The role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in structure formation and recovery of acid milk gels. *International Dairy Journal*, 21(9), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.002>
- Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - A perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103–117. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610203>
- Kumari, R., Verma, N., Kumar, A., Ahuja, V., & Paul, J. (2015). Diversity and abundance of lactobacilli during ulcerative colitis in North Indian patients: a case control study. *Journal of Clinical Microbiology & Case Reports*. 1(1), 1–10.
- Kutter, A., Singh, J. P., Rauh, C., & Delgado, A. (2011). Improvement of the prediction of mouthfeel attributes of liquid foods by a posthumus funnel. *Journal of Texture Studies*, 42(3), 217–227. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00291.x>
- Kwon, H., Min, J., Han, K., Jung, E., Hyun, Y., & Han, M. (2016). from *Streptococcus mutans*, that induces osteoclast differentiation and promotes alveolar bone loss. *Journal of Carbohydrate Polymers*, 137, 561–569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.013>
- Lapointe, G. (2009). La production d'exopolysaccharides. Chapitre 2. Dans *Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles* Drider, D., Prévost H. Edition Economica
- Larouci, S. (2018). Recherche de gènes d'intérêt impliqués dans la caractérisation des exopolysaccharides produits par des microorganismes. Thèse de Doctorat en Génétique moléculaire, Université Ahmed Benbella d'Oran, Algérie.
- Laws, A., Gu, Y., & Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19(8), 597–625. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00084-2)
- Laws, A. P., Leivers, S., Chacon-Romero, M., & Chadha, M. J. (2009). Variation in the molecular mass of exopolysaccharides during the time course of extended fermentations of skimmed milk by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 19(12), 768–771. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.008>
- Leblond-Bourget, N., & Guedon, G. (2009). Organisation et évolution des génomes des bactéries lactiques agroalimentaires Chapitre 4 Dans *Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles* Drider, D., Prévost H. Edition Economica

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2004). Structure and Physical Properties of Yogurt Gels : Effect of Inoculation Rate and Incubation Temperature. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3153–3164. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73450-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73450-5)
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127–1136. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.05>
- Lee, I. C., Caggianiello, G., van Swam, I. I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P. A., ... Kleerebezem, M. (2016). Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3959–3970. <https://doi.org/10.1128/AEM.00306-16>
- Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., van Leeuwen, S. S., Dijkstra, B. W., Dobruchowska, J. M., & Pijning, T. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250–272. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.037>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health1. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 3229–3238. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9936>
- Li, C., Li, W., Chen, X., Feng, M., Rui, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.025>
- Li, P., Li, X., Gu, Q., Lou, X. yu, Zhang, X. mei, Song, D. feng, & Zhang, C. (2016). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 reveals its genetic adaptation and potential probiotic profiles. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 17(8), 569–579. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600176>
- Li, C., Song, J., Kwok, L. yu, Wang, J., Dong, Y., Yu, H., ... Chen, Y. (2017). Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2512–2525. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11864>
- Liu W., Pang H., Zhang H. & Yimin C. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*, Zhang, H., & Yimin, C. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0>
- Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., & Tao, X. (2017). Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6895–6905. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11944>
- Lopez-Kleine, L., & Monnet, V. (2011). Proteolytic Systems. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 49–55.
- London, L. E. E., Chaurin, V., Auty, M. A. E., Fenelon, M. A., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2015). Use of *Lactobacillus mucosae* DPC 6426, an exopolysaccharide-producing strain, positively influences the techno-functional properties of yoghurt. *International Dairy Journal*, 40, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.011>
- Lorenz, R., Wolfinger, M. T., Tanzer, A., & Hofacker, I. L. (2016). Predicting RNA secondary structures from sequence and probing data. *Methods*, 103, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.004>
- Loubiere P. & Coccagne-Bousquet M. (2009). Devenir du carbone. Chapitre1 Dans *Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles* Drider, D., Prévost H. Edition Economica
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, 30 (7), 529–542. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. *Food Research International*, 31(2), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00075-1)
- Lucey, J. A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281–294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Ludbrook, K. Russell, A. C. M., & Greig, R. I. (1997). Exopolysaccharide production from lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *Journal of Food Science*, 62(3), 597-. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04439.x>
- Ludwig, W., Schleifer K.H. & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum *Firmicutes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Second Edition. New York : Springer Science & Business Media, vol. 3 *The firmicutes*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_29
- Lynch, K. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2017). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria : Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012537>
- M**adhubasani, G. B. L., Prasanna, P. H. P., Chandrasekara, A., Gunasekara, D. C. S., Senadeera, P., Chandramali, D. V. P., & Vidanarachchi, J. K. (2019). Exopolysaccharide producing starter cultures positively influence on microbiological, physicochemical, and sensory properties of probiotic goats' milk set-yoghurt. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14361>
- Malang, S. K., Maina, N. H., Schwab, C., Tenkanen, M., & Lacroix, C. (2015). Characterization of exopolysaccharide and ropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food Microbiology*, 46, 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.022>
- Mamine, F., Montaigne, É., & Boutonnet, J.-P. (2016). Perception de la qualité des produits laitiers et comportement du consommateur algérien Perception of the quality of dairy products and behavior of the Algerian consumer. *Économie Rurale*, (355), 49–65. <https://doi.org/10.4000/economierurale.4994>
- Mäyrä-Mäkinen, A., & Bigret, M. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. Chapter 5 In *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition: Revised and Expanded, 175–198. <https://doi.org/10.1201/9780824752033>.
- Mayer, M. J., D'Amato, A., Colquhoun, I. J., Le Gall, G., & Narbad, A. (2020). Identification of genes required for glucan exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* suggests a novel mechanism of biosynthesis . *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.02808-19>
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., & Bardowsky J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Chapter 1 In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. Edition Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch1>
- Mc Sweeney, P. L. H., & O Mahony, J. A. (2016). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition*, 1–498. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2>
- Mechai, A., Debabza, M., Menasria, T., & Kirane, D. (2014). Advances in Natural and Applied Sciences Enzymatic and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Algerian Fermented Milk products. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 8(88), 141–150

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mende, S., Mentner, C., Thomas, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2012). Exopolysaccharide production by three different strains of *Streptococcus thermophilus* and its effect on physical properties of acidified milk. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 466–474. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100114>
- Mende, S., Peter, M., Bartels, K., Rohm, H., & Jaros, D. (2013). Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.011>
- Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.002>
- Mende, S., Jaros, D., & Rohm, H. (2020). Dextran modulates physical properties of rennet-induced milk gels. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1407–1415. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14288>
- Meng, Z., Zhang, L., Xin, L., Lin, K., Yi, H. X., & Han, X. (2018). Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2887–2896. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14003>
- Miao, M., Ma, Y., Huang, C., Jiang, B., Cui, S. W., & Zhang, T. (2015). Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from *Lactobacillus reuteri* SK24. 003. *Carbohydrate Polymers* 131 (20), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.066>
- Mishra, A., & Jha, B. (2013). Microbial exopolysaccharides. Chapter 5 In *The prokaryotes: Applied bacteriology and biotechnology* (4th ed., pp. 179-192), E. Rosenberg, E. F. DeLong, E. Stackebrandt, S. Lory, & F. Thompson (Eds.), Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_25
- Monedero, V., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2010). Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1003–1015. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2494-6>
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, ecile, Joucla, G., Willemot, M., & Remaud-Sim, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 675–685. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3)
- Montoya, P. M. A., Pereira, J.M.A., Marín, M.H., Castro-Ríos, K. (2019). Research Article Exopolysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus* on the Physicochemical Characteristics of Prato Type Cheeses. *Advance Journal of Food Science and Technology* 17(1): 7-12, 2019. <https://doi.org/10.19026/ajfst.17.5984>
- Monnet, C., Latrille, E., Béal, C. & Corrieu, G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques Chapitre 4 Dans bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Corrieu, G. et Luquet, F.M., Tec & Doc, Lavoisier.
- Monnet, V. (2009). Métabolisme des bactéries lactiques. Les acides aminés. Dans Drider D, Prévost, H. Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Edition Economica, Paris.
- Morell, P., Hernando, I., Llorca, E., & Fisman, S. (2015). Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: Rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International*, 70, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.024>
- 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(2), :80-82.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Mari, E., & Meulen, R. Van Der. (2006). Diversity of Heteropolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *72*(6), 4431–4435. <https://doi.org/10.1128/AEM.02780-05>
- Nayak, B. S., Badgley, B., & Harwood, V. J. (2011). Comparison of Genotypic and Phylogenetic Relationships of Environmental *Enterococcus* Isolates by BOX-PCR Typing and 16S rRNA Gene Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(14), 5050–5055. <https://doi.org/10.1128/aem.00130-11>
- Nampoothiri, K. M., Beena, D. J., Vasanthakumari, D. S., & Ismail, B. (2016). Health Benefits of Exopolysaccharides in Fermented Foods. Chapter 3 In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00003-0>
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, L., & Cabezas, L. (2009). Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, *20*(12), 1092–1098. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.001>
- Ngoufack, F. Z., El-Noda, A. N., Tchouanguep, F. M., & El-Soda, M. (2005). Effect of ropy and capsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese. *African Journal of Biotechnology*, *3*(10), 512–518. <https://doi.org/10.4314/ajb.v3i10.15009>
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., ... Ruas-Madiedo, P. (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *158*(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.015>
- Nishimura, J. (2018). Preparation of Exopolysaccharide Synthesized by Lactic Acid Bacteria. Chapter 8. In *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols*, 1887, 85–94. 2018 Springer Nature Switzerland AG. Part of Springer Nature. (Ed.). <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-960-4>
- Notararigo, S., Náchter-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M. L., de Palencia, P. F., Dueñas, M. T., ... Prieto, A. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, *93*(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.016>
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(11), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- Oleksy, M., & Klewicka, E. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(3), 450–462. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1187112>
- Omafuvbe, B. O., & Enyioha, L. C. (2011). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. *African Journal of Food Science*, *5*(6), 340–348
- O'sullivan, D. J., & Klaenhammer, T. R. (1993). Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(8), 2730–2733
- Özcelik, S., Kuley, E., & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, *73*, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pachekrepopol, U., Lucey, J. A., Gong, Y., Naran, R., & Azadi, P. (2017). Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3424–3435. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12125>
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., ... Pepe, O. (2012). Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2737–2747. <https://doi.org/10.1128/AEM.07302-11>
- Partovi, R., Gandomi, H., & Akhondzadeh Basti, A. (2018). Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Siahmazgi cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(6), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13629>
- Patel, A., & Prajapat, J. (2013). Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Advances in Dairy Research*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000107>
- Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. de J., Nascimento, R., Melo, I. S. de, ... Assis, S. A. de. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(4), 710–714. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000094>
- Pernoud, S., Fremaux, C., Sepulchre, A., Corrieu, G., & Monnet, C. (2004). Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 550–555. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73196-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73196-3)
- Peng, Y., Serra, M., Horne, D. S., & Lucey, J. A. (2009). Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *Journal of Food Science*, 74(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01350.x>
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2302–2310. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2302-2310.2000>
- Petry, S., Furlan, S., Waghorne, E., Saulnier, L., Cerning, J., & Maguin, E. (2003). Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00214-3)
- Pophaly, D.S., Chaudan, M., Lule, V., Saran, P., Tarak, J., Thakur, K., Tomar, K.S. (2018). Functional Starter Cultures for Fermented Dairy Products. Chapter 3 In *Microbial Culture and Enzymes in Dairy Technology*. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-5363-2.ch003>.
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Skrzypek, H., & Kreft, A. (2013). Production of exopolysaccharides by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus*: Biosynthesis and purification methods. *Acta Alimentaria*, 42(2), 220–228. <https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.2.9>
- Pot, B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. Chapitre 1 Dans *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*, Corrieu, G., Luquet, F.M. Edition Tec et Doc, Lavoisier.
- Poulsen, V. K., Derkx, P., & Oregaard, G. (2019). High-throughput screening for texturing *Lactococcus* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 366(2), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz001>
- Prajapat, J., & Patel, A. (2013). Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Advances in Dairy Research*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000107>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Prechtl, R. M., Wefers, D., Jakob, F., & Vogel, R. F. (2018). Structural characterization of the surface-associated heteropolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* TMW 1.1478 and genetic analysis of its putative biosynthesis cluster. *Carbohydrate Polymers*, 202, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.115>
- Privat, K., & Thonart, P. (2011). Action des cultures protectrices: Cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 15(2), 339–348.
- 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(6), 3299–3307. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3299>
- Puertas, A. I., Ibarburu, I., Elizaquivel, P., Zuriarrain, A., Berregi, I., López, P., ... Dueñas, M. T. (2018). Disclosing diversity of exopolysaccharide-producing lactobacilli from Spanish natural ciders. *LWT - Food Science and Technology*, 90(December 2017), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.048>
- Purohit, D. H., Hassan, A. N., Bhatia, E., Zhang, X., & Dwivedi, C. (2009). Rheological, sensorial, and chemopreventive properties of milk fermented with exopolysaccharide-producing lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 847–856. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1256>
- Purwandari, U., Shah, N. P., & Vasiljevic, T. (2007). Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1344–1352. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.018>
- R**adhouani, H., Gonçalves, C., Maia, F. R., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2018). Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(5), 461–478. <https://doi.org/10.1177/0883911518793914>
- Rao, M. a. (1999). *Food Engineering Series - Rheology of Fluid and Semisolid Foods - Principles and Applications*. Chapman & Hall Food Science Book, ASPEN PUBLICATION, USA.
- Rao, M. A. (2014). Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applicaitons. Retrieved from [https://www.bookdepository.com/Rheology-Fluid-Semisolid-Foods-Principles Applications -M-Rao/9781441943675](https://www.bookdepository.com/Rheology-Fluid-Semisolid-Foods-Principles%20Applications%20-M-Rao/9781441943675).
- R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>
- Remus, D. M., van Kranenburg, R., van Swam, I. I., Taverne, N., Bongers, R. S., Wels, M., ... Kleerebezem, M. (2012). Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-149>
- Renault, P. (2008). Application des bactéries lactiques génétiquement modifiées et réglementation. Dans *Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, Drider D, Prévost H., Edition Economica, Paris.
- Rendueles de la Vega, M., & Díaz Fernández, M. (2014). Industrial biotechnology. *Arbor: Ciencia, Pensamiento y Cultura*, (768), 9. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4009>
- Rincon-Delgado, M. I., Lopez-Hernandez, A., Wijaya, I., & Rankin, S. A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1128–1139. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4834>
- Ripari, V. (2019). Techno-Functional Role of Exopolysaccharides in Cereal-Based, Yogurt-Like Beverages. *Beverages*, MDPI, 5(1), 16. <https://doi.org/10.3390/beverages5010016>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Roefs, SPFM., de Groot-Mostert AEA. & Van Vliet, T. (1990) Structure of acid casein gels. 1. Formation and model of gel network. *Colloids Surf* 50:141–159
- Rodrigo-Torres, L., Yépez, A., Aznar, R., & Arahál, D. R. (2019). Genomic Insights Into Five Strains of *Lactobacillus plantarum* With Biotechnological Potential Isolated From chicha, a Traditional Maize-Based Fermented Beverage From Northwestern Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02232>
- Rossetti, L., & Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63(2), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.001>
- Roy, D., Ward, P., Vincent, D. & Mondou, F. (2000) Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Cur. Microbiol.* 40: 40–46. <https://doi.org/10.1007/s002849910008>
- Roy, D., & Lapointe, G. (2016). Introduction to the microbial ecology of foods. *Modeling the Microbial Ecology of Foods: Quantitative Microbiology in Food Processing*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118823071.ch1>
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M., & Zoon, P. (2002a). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, 12(8), 689–695.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002b). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1)
- Ruas-Madiedo, P., & Zoon, P. (2003). Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2–3), 245–253. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00517-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00517-4)
- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843–856. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8)
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C., & Salminen, S. (2006a). Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from “*viili*” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2355–2358. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72307-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72307-4)
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salminen, S. (2006b). Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection*, 69(8), 2011–2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.2011>
- Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2009). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications. Chapter 45 In *Microbial Glycobiology*, O. Holst, P. J. Brennan, & M. von Itzstein (Eds.), (Elsevier I, p. 1000). Burlington, USA
- Ruas-madiedo, P. (2014). Biosynthesis and Bioactivity of Exopolysaccharides Produced by Probiotic Bacteria. Chapter 8 In *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, First Edition, Javier, F., Moreno & Luz Sanz, M. 118–133. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00161-3)
- Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2015). Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00565>
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct.*, 6(3), 679–693. <https://doi.org/10.1039/C4FO00529E>

- Saitou et Nei, (1986). The neighbor-joining method— a new method for reconstructing phylogenetic trees. In: Japanese Journal of Genetics, vol 6. Genetics Soc Japan Natl Inst Genetics, Yata, Mishima, Shizuoka 411, Japan, pp 611–611. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- 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 of Dairy Science*, 92(9), 4158–4168. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2126>
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440–1453. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.770728>
- Sanalibaba, P., & Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Sanger, F., S. Nicklen et A. R. Coulson DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (1977). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanli, Gursel, Sanli, Acar, B. (2013). *The effect of using an exopolysaccharide-producing culture on the physicochemical properties of low-fat and reduced-fat Kasar cheeses*. 66(4). <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12071>
- Santos, F. L., & Amorim, G. M. De. (2018). Biotechnological challenges and perspectives of using exopolysaccharides. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 10–13. <https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00236>
- Sanchez, C., Zuniga-Lopez, R., Schmitt, C., Despond, S., & Hardy, J. (2000). Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *International Dairy Journal*, 10(3), 199–212. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00030-3)
- 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(12), 7495–7502. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-06>
- Saravanan, C., & Shetty, P. K. H. (2016). Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. *International Journal of Biological Macromolecules*, 90, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.007>
- Sarethy, I.P., Pan, S. & Danquah, M. K. (2014). *Modern Taxonomy for Microbial Diversity*. Chapter 3. Biodiversity- The Dynamic Balance of the Planet, Oscar Grillo, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/57407>
- Sasikumar, K., Kozhummal Vaikkath, D., Devendra, L., & Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152–1156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.075>
- Sawitzki, M. C., Fiorentini, Â. M., Brod, F. C. A., Tagliari, C., Bertol, T. M., Arisi, A. C. M., & Sant'Anna, E. S. (2007). Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 547–552. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300031>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Schleifer, K.H. (2009). Family V. *Leuconostocaceae* Firmicutes. In eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Second Edition. New York : Springer Science & Business Media, vol. 3 The firmicutes. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_29
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- Schmidt, C., Mende, S., Jaros, D., & Rohm, H. (2016). Fermented milk products: effects of lactose hydrolysis and fermentation conditions on the rheological properties. *Dairy Science and Technology*, 96(2), 199–211. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0259-9>
- Siezen, R.J., Tzeneva, V.A., Castioni, A., *et al.*, (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ. Microbiol.*, 12(3):758-773. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x>
- Siezen, R. J., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S3>
- Silva, L. A., Honorio, J., Lopes, P., & Cardarelli, H. R. (2019). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* : technological properties , biological activity , and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology, Review Article*, Springer. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Silveti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2017). Lactic acid bacteria: A cell factory for delivering functional biomolecules in dairy products. Chapter 14 In *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities*, 251–278, Poltronieri, P. Edition John Wiley & Sons Ltd and the Institute of Food Technologists. <https://doi.org/10.1002/9781119115007>
- Simpson, W.J, Tagushi, H. (1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. Chapter 5 In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Wood B.J.B, Holzapfel, W.H. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0>
- Singhvi, M., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5911–5924. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9092-4>
- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, C., & Corrieu, G. (2004). The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 113–137. <https://doi.org/10.1080/10408690490424793>
- Stanbury Peter F., Whitaker Allan, & Hall Stephen J. (2017). Design of a Fermenter. *Principles of Fermentation Technology*, (2011), 401–485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-00186-7>
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., & McAuliffe, O. (2017). Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology*, 61, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>
- Stieger, M., & Van de Velde, F. (2013). Microstructure, texture and oral processing: New ways to reduce sugar and salt in foods. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(4), 334–348. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.007>
- Stile, M.E. et Holzapfel, E. H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current applications and effects. *Meat Sci.*, 65, 953–948.
- Stingle, F., Neeser, J. R., Mollet, B., Stingle, F., & Neeser, J. (1996). Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, 178(6), 1680. <https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1680-1690.1996>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Surber, G., Jaros, D., Rohm, H. (2019). Shear and extensional rheology of acid gel suspensions with varying ropiness. *Journal of Texture Studies*, 1–9. Wiley Periodicals, Inc. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12458>
- Sun, Z., Jie Yu, Dan, T., Zhang, W., & Zhang, H. (2014). Lactic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 3–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1
- Sutherland, I. W. (1999). Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 38(4), 319–328. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00114-3)
- T**ailliez, P., Quénéée, P., & Chopin, A. (1996). Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ : Application de la RAPD à un groupe de lactobacilles. *Lait*, 76(1–2), 147–168. <https://doi.org/10.1051/lait:19961-213>
- Tailliez, P. (2001). *Ces Êtres Vivants Apparus Il Y a Près De 3 Milliards D ' Années*. 81, 1–11.
- Tailliez, P. (2001). Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait*, INRA Editions, 81 (1-2), pp.1-11
- Tallon, R., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tan, J. (2019). Overview: semisolid foods. Chapter 1 In *Rheology of Semisolid Foods*, Joyner, H, S. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27134-3_2
- Tang, Y., Dong, W., Wan, K., Zhang, L., Li, C., Zhang, L., & Liu, N. (2015). Exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* induces maturation of dendritic cells in BALB/c mice. *PLoS ONE*, 10(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143743>
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., ... Li, W. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgarius* SRFM-1. *Carbohydrate Polymers*, 173, 654–664. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.039>
- Tanganurat, W., Quinquis, B., Leelawatcharamas, V., & Bolotin, A. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. 377–385. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800185>
- Tarazonova, M., Huppertz, T., Kok, J., & Bachmann, H. (2018). Altering textural properties of fermented milk by using surface-engineered *Lactococcus lactis*. *Microbial Biotechnology*, 11(4), 770–780. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13278>
- Tatusova, T., Dicuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., ... Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Tiwari, O. N., Mondal, A., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. kanti, Jaladi, P., Oinam, G., & Indrama, T. (2019). Purification, characterization and biotechnological potential of new exopolysaccharide polymers produced by *Cyanobacterium Anabaena* sp. CCC 745. *Polymer*, 178, 121695. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.121695>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tiwari, O. N., Sasmal, S., Kataria, A. K., & Devi, I. (2020). Application of microbial extracellular carbohydrate polymeric substances in food and allied industries. *3 Biotech*, *10*(5), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02200-w>
- Toba, T., Nakajima, H., Tobitani, A., & Adachi, S. (1990). Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk. *International Journal of Food Microbiology*, *11*(3–4), 313–320. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90024-Y](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90024-Y)
- Torino, M. I., de Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JUL), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>
- Tuinier, R., van Casteren, W. H., Looijesteijn, P. J., Schols, H. a, Voragen, a G., & Zoon, P. (2001). Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers*, *59*(3), 160–166. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200109\)59:3<160::AID-BIP1015>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200109)59:3<160::AID-BIP1015>3.0.CO;2-V)
- Tsuda, H., & Miyamoto, T. (2010). Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the Prebiotic Activity of the Exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, *16*(1), 87–92. <https://doi.org/10.3136/fstr.16.87>
- V**andamme, P., De Bruyne, K. & Pot, B. (2014). Phylogenetics and systematics. Chapter 3 Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy. Holzapfel W.H. & Wood J.B. Edition Wiley Blackwell.
- Van Calsteren, M. R., Gagnon, F., Nishimura, J., & Makino, S. (2015). Structure determination of the neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Carbohydrate Research*, *413*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.05.015>
- Van de Velde, F., de Hoog, E. H. A., Oosterveld, A., & Tromp, R. H. (2015). Protein-Polysaccharide Interactions to Alter Texture. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*(1), 371–388. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015558>
- Van den Berg, D. J. C., Smits, A., Pot, B., Ledebouer, A. M., Kersters, K., Verbakel, J. M. A., & Verrips, C. T. (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnology*, *7*(3), 189–205. <https://doi.org/10.1080/08905439309549857>
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., & 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*(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.014>
- Van Dijk, H. J. M., & Walstra, P. (1986). Syneresis of curd. 2. One- dimensional syneresis of rennet curd in constant conditions. *Neth. Milk Dairy J.* *40*:3-30.
- Van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., Ten Brink, B., Smith, M. R., & Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*, 697–703. <https://doi.org/10.1007/s002530051353>
- Van Marle, M. E., & Zoon, P. (1995). Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels. *Neth. Milk Dairy J.* *49*:47–65
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & Vuyst, L. De. (2004). Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by. *Society*, *70*(2), 900–912. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.900>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vastano, V., Perrone, F., Marasco, R., Sacco, M., & Muscariello, L. (2016). Transcriptional analysis of exopolysaccharides biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Microbiology*, 198(3), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1169-1>
- Vedamuthu, E. R., & Neville J. M. (1986). Involvement of a plasmid in production of a ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied Environ. Microbiol.* 51: 677-682.
- Vielva, L., de Toro, M.; Lanza, V.F.; de la Cruz, F. (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics*, 33, 3796-3798. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx462>
- Villéger, R., Cachon, R., & Urdaci, M. C. (2017). Fermented Foods Microbiology, Biochemistry and Biotechnology. Chapter 1 In *Fermented Foods Part II: Technological Intervention*, 736–773. Ramesh C. Ray and Didier Montet (eds.) ISBN 978-1-1386-3784-9
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>
- Vukić, D. V., Vukić, V. R., Milanović, S. D., Ilić, M. D., & Kanurić, K. G. (2018). Modeling of rheological characteristics of the fermented dairy products obtained by novel and traditional starter cultures. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2180–2188. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3135-9>
- W**alker, J. M. (1994). *Methods in Molecular Biology*. In *Microbial Biofilms Methods and Protocols*, Donelli, G. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9>
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.013>
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.036>
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.003>
- Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., & Lü, X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173–1184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.118>
- Wang, J., Fang, X., Wu, T., Min, W., & Yang, Z. (2018). Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in Cheddar cheese production. *Lwt*, 97, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.011>
- Ward, L. J. H., Brown, J. C. S., & Davey, G. P. (1998). *Two methods for the genetic differentiation of Lactococcus lactis ssp. lactis and cremoris based on differences in the 16S rRNA gene sequence*. *166*(1998), 15–20.
- Wattam, A.R.; Davis, J.J.; Assaf, R.; Boisvert, S.; Brettin, T.; Bun, C.; Conrad, N.; Dietrich, E.M.; Disz, T.; Gabbard, J.L.; Gerdes, S.; Henry, C.S.; Kenyon R,W.; Machi, D.; Mao, C.; Nordberg, E.K.; Olsen, G.J.; Murphy-Olson, D.E.; Olson, R.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G.D.; Shukla, M.; Vonstein, V.; Warren, A.; Xia, F.; Yoo, H.; Stevens, R.L. (2017). Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res.*, 45(D1), D535-D542. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1017>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Review Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Welman, A. D., Maddox, I. S., & Archer, R. H. (2003). Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1200–1206. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02122.x>
- Werning, M. L. (2012). Biosynthesis , Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Chapter 5 In Food Additives, El-Samragy Y, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32412>
- Wu, Q., Tun, H. M., Leung, F. C. C., & Shah, N. P. (2014). Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Scientific Reports*, 4, 17–21. <https://doi.org/10.1038/srep04974>
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., ... Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94, 475–499. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>
- Y**an, S., Yang, B., Stanton, C., Ross, R. P., Zhao, J., & Zhang, H. (2018). Original article Ropy exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium longum* YS108R as a starter culture for fermented milk. 1–9. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13932>
- Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, Y., & Zhang, J. (2010). Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.12.010>
- Yilmaz, M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlisu, N. B., Sagdic, O., & Arici, M. (2015). Effect of *in situ* exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on fermentation kinetics. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1604–1624. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8936>
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Yousefi, M., & Jafari, S. M. (2019). Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 468–483. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.015>
- Z**ankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., Larsen, M.V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 67, 2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zarour, K., Vieco, N., Pérez-Ramos, A., Nácher-Vázquez, M., Mohedano, M. L., & López, P. (2017). Food Ingredients Synthesized by Lactic Acid Bacteria. In *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811520-6.00004-0>
- Zarour, K. (2018). Etude de la biodiversité phénotypique génotypique et aptitudes technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées localement. Thèse de Doctorat en sciences.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zehir Şentürk, D., Dertli, E., Erten, H., & Şimşek, Ö. (2019). Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. *Food Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00641-5>
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., ... Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037>
- Zhang, J., Zhao, W., Guo, X., Guo, T., Zheng, Y., Wang, Y., ... Yang, Z. (2017). Survival and Effect of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* YW11 on the Physicochemical Properties of Ice Cream. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(3), 191–200. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2017-0002>
- Zhang, H., Ren, W., Guo, Q., Xiong, Z., Wang, G., Xia, Y., ... Ai, L. (2018). Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333. *Food Hydrocolloids*, 81, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.017>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P.K., Xu, Y., Yin, Y. (2018) dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.*, 46, W95-W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>
- Zhao, K., Xie, Q., Xu, D., Guo, Y., Tao, X., Wei, H., & Wan, C. (2018). Antagonistics of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 against *Helicobacter pylori* SS1 and its infection in vitro in human gastric epithelial AGS cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(4), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.003>
- Zheng, H. (2019). Introduction: Measuring Rheological Properties of Foods. In *Rheology of semi solid foods*. Edition Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27134-3_1
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. B., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., ... Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in press, doi: 10.1099/ijsem.0.004107. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, X., Hong, T., Yu, Q., Nie, S., Gong, D., Xiong, T., & Xie, M. (2017). Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 induce c-Jun dependent Fas/FasL-mediated apoptosis via TLR2 in mouse intestinal epithelial cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14178-2>
- Zhou, Y., Cui, Y., & Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>
- Zidani, H. (2015). Les exopolysaccharides des bactéries lactiques : Optimisation et cinétique de production. Thèse de Magister.
- Živković, M., Miljković, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M. B., Veljović, K., Tolinački, M., ... Golić, N. (2016). EPS-SJ exopolysaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00286>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zotta, T., Piraino, P., Parente, E., Salzano, G., & Ricciardi, A. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for Cornetto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1785–1795. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9671-0>

ANNEXES

ANNEXES. MATERIEL ET METHODES

1. Composition des milieux de cultures

Gélose/Bouillon MRS (Man-Rogosa-Sharpe)

Extrait de viande.....	10 g
Extrait de levure	5 g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium.....	2 g
Glucose.....	20 g
MgSO ₄	0,25 g
MnSO ₄	0,05 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Tween.....	1 mL
Agar-agar	15 g (gélose)
Eau distillée.....	1000 mL
Préparation dissolution 62g/L, autoclaver pendant 20 min à 121 °C, pH= 6,2.	

Gélose hypersaccharosée

Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	3 g
Peptone	2,5 g
Saccharose	150g
K ₂ HPO ₄	2 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 mL
Autoclaver à 120°C pendant 20 min. pH=6,8	

Gélose M17

Peptone papainique de soja.....	5 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Tryptone.....	2,5 g
Extrait de viande.....	5 g
Extrait de levure.....	2,5 g
β-Glycérophosphate de sodium.....	19 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O.....	0,25 g
Acide ascorbique.....	0,50 g
Lactose.....	5 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 mL
Préparation dissolution de 57,2 g/L, autoclavage à 121°C pendant 15 min, pH= 7,2.	

Milieu ESM (Exopolysaccharide Selection Medium) (p/v)

Lait écrémé.....	9 %
Extrait de levure.....	0,35 %
Peptone.....	0,35%
Saccharose.....	1%

Milieux de culture galerie biochimique**Gélose TSI (Glucose-Lactose-Saccharose-H₂S)**

Extrait de viande de bœuf.....	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone.....	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique.....	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Lactose	10 g
Glucose.....	1 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0,05 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000mL

Autoclaver 15 min à 120°C.

Gélose Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate	1 g
Phosphate dipotassique	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate de Sodium	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Bleu de Bromothymol	0,08 g
Agar.....	15 g
Eau distillée	1000 mL

Autoclaver à 121°C pendant 15min. pH=7,1

Milieu Clarck et Lubs

Peptone tryptique	5 g
Glucose.....	2 g
Phosphate bipotassique.....	10 g
Eau distillée	1000 mL

Autoclaver à 121 pendant 20 min °C. pH=6,8

Milieu Mannitol Mobilité

Peptone	20 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1 g
Gélose	4 g
Mannitol	2 g
Eau distillée	1000 mL

Autoclaver à 120 °C pendant 15 min. pH=7,6

Tampon PBS

Phosphate de sodium	0,02 mol/L
NaCl	0,15 mol/L

pH = 7

2. Electrophorèse pour migration d'ADN génomique et plasmidique

Préparation solution TAE 1X

La solution comprend : 40 mM (4,844 g/L) Tris, 20 mM (1,21 mL/L) acide acétique, 1 mM (0,372 g/L) Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA à pH 8).

Préparation du gel d'agarose à 1% et à 0,6%

- Mélanger 0,8 g (0,6g pour 0,6%) d'agarose à 100 mL de tampon TBE 1X.
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes ou au bain marie. Agiter pour homogénéiser.
- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue.
- Positionner le peigne dans la cuve à 1mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal
- Couler un gel de 3 à 5 mm d'épaisseur
- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

Composition Tampon de charge 6X

La solution comprend : 0,03% de bleu de bromophénol, 0,03% de xylène cyanol FF, 60 mM EDTA, pH 7,6, et 60% de glycérol dans de l'eau de qualité biologique moléculaire.

3. Dosage des protéines résiduelles

Le dosage des protéines dans les lyophilisats d'exopolysaccharides, est précédé par l'établissement de la courbe d'étalonnage. Pour ce faire, une gamme étalon est préparée en utilisant des solutions de concentration connue de la protéine de référence l'albumine de sérum bovin (BSA).

Un poids de 5 mg/mL de chaque lyophilisat d'EPS, est dissout dans une solution de nitrate de sodium à 0,1M (NaNO₃). Au total 40 volumes destinés au dosage des protéines résiduelles, sont préparés pour les trois souches (5 prélèvements x 3 répétitions x 3 souches), le dosage pour la souche témoin a été répété 2 fois par manque de lyophilisat (quantité extraite infime).

En parallèle, la solution C du kit est préparée selon les instructions du fournisseur en additionnant 50 parts de la solution A avec 01 part de la solution B.

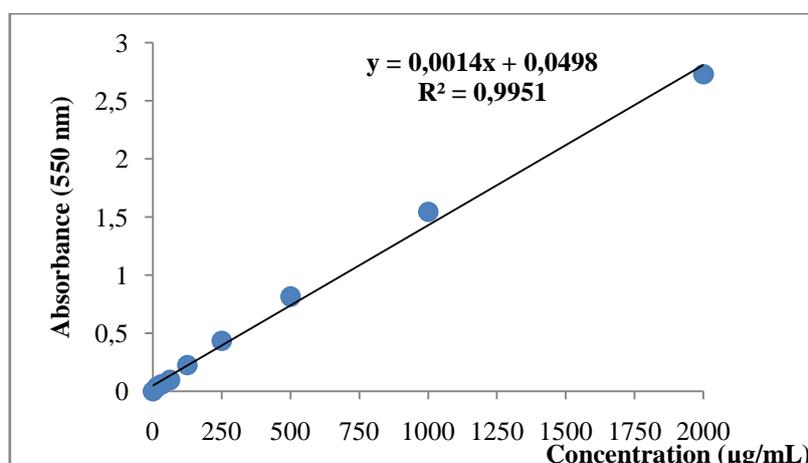
Le blanc = 1mL de la solution C + 50µL de NaNO₃+ azide de sodium

Le 1^{er} échantillon = 1mL de la solution C + 50µL de l'échantillon E1

Le 2^{ème} échantillon = 1mL de la solution C + 50µL de l'échantillon E2 de même pour les autres échantillons.

Incubation des mélanges à 37°C pendant 30 minutes. La lecture est effectuée à 550nm.

Les solutions sont diluées par de l'eau distillée avec un facteur de 2.



Courbe d'étalonnage de la protéine de référence l'albumine de sérum bovin (BSA) utilisée pour le dosage des protéines résiduelles des lyophilisats d'exopolysaccharides.

4. Photographies de quelques matériels utilisés

- Ustensile de brassage



-Viscosimètre Ubbelohd



ANNEXES. RESULTATS ET DISCUSSION

5. Séquences générées par les amorces Y1Y2

>Lbio28 (645pb) *Lactobacillus plantarum*
GGTAGCTAATTGGAAGCTGACGGATGTATGGTAAGGAACGGTGTGCGCAAATGAGCCAATCCGAGTGAG
TGGCGAACTGGTGAGTAACAGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGAGAACACCTGGAAACAGAGGCT
AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGAT
GGTCCCGCGGCGTATAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGA
GAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGAGCCACCCAATTAGGGAGT
TTGGGCCCTGTCTCATTCCCAATGTGGCCAATTACCCTCTCAGGTCGGCACTTATCATTGCCTTGGTG
AGCCTTCCCACCATCTGCTAAACCCCGGGACATCAAAGTGATGCCAACCTCTTTCAGCTGGACAGCGG
TCAGTTGTTATGCGGTATTAGCACTTTTCGGTTTTATCCCCCTTCTGGCGGTTTCCAGTGTATCACA
TTTCCCTATCAATTTAATTAGAACCAGCCATTATACAAAATTTGTTTACTGCAGTT
TTAGGCGCCCCCTTTTCCCAAAAAAAACTTTTGGGGGCATCCT

>Lbio10 (655pb) *Lactobacillus plantarum*
GGGTTGCTAATTGGACAGCAGAAAGAACTTTGGTAGTGAGTGGTGCTTGATCATGATTTCCATTCTGA
GTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACA
GATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCC
GACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGAGCCACCCCATT
AGGAGTTTGGGCCGTGTCTAATCCCATGTGGCCGATTCCCTCTCAGTCGGCTCCTATCATTGCCTGGT
GAGCCGTTCCCCCATCTGCTAAAACCCCGGGACATCCAAAGTGATAGCAAAGCTCTTTCAACTGGGA
CAGGCGGTCAGTTTGTAGCGGTATTACATCTTTTTTCGGTGTATCCCGCTTCTGGGCGGGTTTCCAC
GTGTTATCACACTTCCCTCATCAATTTAATTAGGATGCAGCCCAATAATAACAATTTCTTCACTTGA
GGTATAGGCACCCCGCTTTTCTCCGAACAAAACTGGGGCTC

>Lbio33 (785pb) *Lactobacillus plantarum*
GGAAGCAACTAGTAAGTCAGAAGAACTCTGGTTTTTGTATTTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTTG
AGTTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAA
CAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCAC
TTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAG
CCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGGCCAGCCCC
AGTTAGGAAGGTTTGGGGCCGTGTCTCATTCCCAATGTGGCCAATTACCCTCTCAGGTCGGCTACTAT
CATTGCCATGGGTAAGCCGTTACCCACCATCTGCTAAACCCCGGGGACCATCCAAAAGTTGAATAG
CCCAAACCTCTTTTCAAACCTCGGGACCAGGCGGTTCCAGGTTTGTTTTATGCGGTATTTAGCCATCTT
TTTTTCCGGGTTTTTATCCCCCGCCTTCATGGGGCCGGGTTTTCCACGGTGTTTTACTTCACCAAT
TTTTCGCCCCCTCATTCAAATTTTTTAAATTTAAGGGAATGCCAGGCCACCCACTTCAATTAACCCAA
AAAATTTTGTTTTGAACCTTTGGCAAGGTTATTTAAGGGCAGCCCCCCCCCGCCCGTTTTCTTTT
CCCGGAAACAAAAAAAAGGGGGGTTTTGTTGGGGT

>Lbio41 (633pb) *Lactobacillus plantarum*
AGGCTGCTAAGTGAAGCAGAAAGAACCTTGGAGTGAGTGGTGTGCGCATATGAGTACATTTTGGAGTGA
GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATG
CTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
ATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACC
TGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCACGGAGCAGCCCAGTAGGAGTT
TGGGCCGTGTCTAATCCCATGTGCCAATTACCTCTAGGTCGGCACTTATATTCCTGGTGACCGTTCC
CCCCTGCTAAACCCCGGGACATCAAAGTGATGCCAACCTCTTTAACTGGACAGCGGTGAGTTGTTAGC
GGTATTACACTTTTTTCGGTGTTCCTCGCTCTGGGCGGTTTTAGTGTATCCATTCCTCTCAATTTAA
TAAGAAGCCGCCATTATACAAAATTTTTTCACTTGGGTTAAAGCCCCCTTTTAAAAAAAATGGTG
TGGGGGGGGGGCAGGGGGG

>Lbio43 (629pb) *Lactobacillus plantarum*

GGTAGTCACAAGGAAGCAGAAAGAACTCTGGAGTGATCGGTGCTTGCATATGATTTACATTTTGAGTG
AGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGAT
GCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTG
GATGGTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGAGCACCAGTAGGGA
GTTGGGCGTGTCTATTCATGTGGCAATTCCCTCTAGGTTCGGCTCTTATATTGCCTGGTGACCGTTCC
CCCCCTGCTAAAACCCCGGGACATCAAAGTGATGCCAAACCTCTTTCAACTGGACAGCGGTACAGTTG
TTAGCGGTATTACACTGTTTTCGGTGTTTTCCCGCTTCGGGCGGTTCAGTGTATCCAGTTCCTCC
ATGTTAATAGGATCCGGCCATAATACAAATTTTTTCATTGAGGTATAGGCGCCCCGCTTTTTTCAGAA
AAAAACCGGGCTTTT

>Lbio1 (662pb) *Lactobacillus plantarum*

GGTTGCTAACTAGTCAGCAGAAGAAGCTCTGGTATTGAGTGGTGCTTTGCATCATGATTTACATTTTGA
GTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACA
GATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
TTGGATGGTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCC
GACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGCAACCCCAT
TAGGAGTTTGGGCCGTGTCTAATCCCATGTGGCCAATTACCTCTAGGTGGCACCTATATTGCCTGGTG
AGCGTTCCCCCACTGCTAAACCCCGGGACATCAAAGTGATGCCAAACCTCTTTCAACTGGACAGGCG
CTCAGTTTGTATGCGGTATTACATCTTTTTTCGGTTTTATCCCGCTTCTGGGCGGGTTTTCCAGGTGTTA
TCACACTTCCCCTCATCAATTTAATTAAGGATCCAGCCCCAATAATAAAAAATTTCTTTCACTTGCA
GGTATAAGGCACCCCCCGCTTTCGTCCGAAAAAAAACCTAAAAGATCGA

>Lbio2 (655pb) *Lactobacillus plantarum*

GGTTTGTATTTGGAAGCAAAGGAACCTTGGAAAGTGAGTGGTGTCGCATATGAGTAATCATGAGTGAGT
GGCGAACTGGTGAGTAAACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTA
ATACCGCATAACAATTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATG
GTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGA
GAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGAGCCAGCCATTAGGAGGT
TTGGGCCGTGTCTATTCGAATGTGGCCAATTACCTCTAGGTTCGGCACTTATCATGCCTGGTGAGCCTT
CCCACATCTGCTTAAACCCCGGGACATCAAAGTGATAGCAAACCTCTTTCAACTGGAACAGCGGTGAG
TTGTTTAGCGGTATTACATCTTTTTTCGGGTGTTATCCCGCTTCTGGGCGGGTTTTCCCGTGTATACAA
TTCCCTCCCAAATTTAATTAAGGATCCAGCCCCAATAATAAAAAATTTCTTCTATTGAATTTAAGACGC
CCCCCTTAAAAAACAGGGGGGAAAGAGGGGGGGGGGGGG

>Lbio3 (691pb) *Lactobacillus plantarum*

CTGAAGCTATCTGCAGTCGACGACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
GTGGCGAACTGGTGAGTAAACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATG
CTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
TGGTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCT
GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGGCAGTAGGAA
GTTTGGGCCGTGTCTCACTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTTCGGCTACGTATCGTTGCCATG
GTGAGCCGTTACCCACCATCTGGCTAATACACCGGGGGACCATCCAAAGTGATAGCCAAAGCCTCTT
TCAACTGGAACAGGCGATCAATTTTTTATGCGGTATTAACATCTGTTTCCGGGTGTTATCCCCGCTTC
TGGGCGGGTTTTCCAGGTGTTACTACCAATTTCCCCTCACCAGAGTTAATTCGGAATCCAGCCCCTA
TAAAAACAAAATTTCTTTCAACTTGCAGGTATAAGGCACCCCCCGCTTTCATCAAAAACAAGGGGGG
GGGGGGGGGG

>Lbio22 (772pb) *Lactobacillus plantarum*

GGTTGCTAATTAGAAAGTCAGAAGAAGCTCTGGTTTTTTGATTTGGTGCTTGCATCATGATTTTACATTT
TTGAGTTGAGTTGGCGAACTGGTGAGTAAACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTG
GAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTA
TCACTTTTGGATGGTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATAC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGCAG
CCCAAGTAGGAGGTTTGGGCCGTGTCTCACTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTTCGGCTACGT

ATCATTGCCGTGGTGAGCCGTTCCCCACATCTGCTTAAACCCCGGGACATCCAAAGTGATAGCCAAAG
 CTCTTTCAACTGGACATGCGGTCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCGGTGTATCCCGCTT
 CTGGGCGGGTTTCCACGTGTTCTCACATTTCCCCTCATCAATGTTAATTAGGATGCAGCACATTAATA
 CAAAATTCGTTCAATTGCAGGTATTAGGCAGCCCCGCTTTTTCCAAAAAAGGGGG

>Lbio13 (723pb) *Leuconostoc mesenteroides*

CAGGGCGGCATGCTATACATGCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGC
 GAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAAT
 ACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATC
 CGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGA
 CTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCC
 ACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAGCACTG
 TTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGG
 CTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
 GCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAA
 CTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG
 GAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGA

>Lbio5 (793pb) *Leuconostoc mesenteroides*

GGGGAAGGAGGTGCTATACATGCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGG
 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAA
 TACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGAT
 CCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAG
 ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTC
 CACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAGCACT
 GTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACG
 GCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
 AGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAA
 ACTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATAT
 GGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGA

>Lbio4 (669pb) *Lactobacillus plantarum*

GGATGCTAATTAGGTAAGTTGAAGAACTCTGGTATTGATTTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTTG
 AGTTGAGTTGGCGAACTGGTGAAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAA
 ACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAAGATGGCTTCGGCTATCA
 CTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCTCACCATGGCAATGATACGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGGGCAAGCC
 AGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTAGTCCCATGTGGCCGATTACCTCTAGGTCGGCTAGTATATTGCCTG
 GTGAGCGTTCCCCACATCTGCTAAAACCCCGGGACATCAAAGTGATAGCAAAGCCTCTTTAAACTGGA
 CAGGCGGTCAGGTTGTTATGGGGTATTACATCTGTTTCGGGTGTTATCCCGCTTCTGGGCGGGTTTCC
 CGTTTTATCACAATCCCTCCCAAGGTTAAATAGGATGCAGCCCCATATTACAAAATTTTTCAATTT
 GAGGTATTAGGCACCCCCTCTTTTATCAAAAAAATTTGGGGGGGGGGGGGGGGGG

>Lbio32 (798pb) *Leuconostoc mesenteroides*

CGCAGGGGCCTATACATGCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAA
 CGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACC
 GAATAAACTTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGC
 GGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTG
 ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACA
 ATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAGCACTGTTG
 TATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTA
 AATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG
 AGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTG
 GTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA

GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGT

>Lbio34 (679 pb) *Lactobacillus plantarum*

GGGCTGCCAACTAGACCAGTCTAGAACGCAAGCTTCTGGTAATGAATGGTGCTTGCATCATGATTTAC
ATTTTGGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCT
GGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCT
ATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATA
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGGCAA
CCCCATTAGGGAGTTTGGGCCGTGTCTATTCCAATGTGGCCAATTCCTCTCAGTCGGCTCTTATCAT
TGCCCTGGTGAGCCGTTCCCCCATCTGCTTAAACCCCGGGACATCAAAGTTATAGCCAACCTCTTTCA
ACTGGACAGGCGGTCAGTTTGTATGCGGTATTAGCATCTTTTCCGGTGTTATCCCGCTTCTGGGCG
GGTTTCCCGTGTATCACATTTCCCTCTCCAATGTTAATTAGGATGCAGCCCCATTATACCAATTTGT
TCACTTGCAGTTATTAGGCACCCCCCTTTTTTCCAAACAAAAGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

>Lbio29 (656pb) *Lactobacillus plantarum*

TGGGTGAAAGTGGCGGCAGAGGAAGTTTGGTCCGAAGGTGCTTGCATATGATTACATTTTGGAGTGAG
TGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGTAAACACCTGGAAACAGATGC
TAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
TGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATCGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCACCT
GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGGCCGCCCATTAGGAA
ATTTGGGCCGTGTCTAAATCCCAATATGGCCAATAACCTCTCAGGTCCGCTCCATATCAATGCCTTG
GTCAGCCCTTCCCCCCTGCTGAAACCCCGGACCTCCAAAGTGATGGCCAAACCTCTTTCAGACTG
AACAGGCGGTCGGTTGTTATGCGGTATTAGCACCTTTTTTCCGGTTTTATCCCGCTTCTGGGCGGTTTCC
CGTGTTATCACATTTGCCCTCTCAATTTTAATTAGGATCCAGCCCCATTATACCAAATTTGTTTGACTG
CAGTTTTAAGCCGCCCCCCCTTTAAAAAAGGGGGC

>Lbio27 (746pb) *Lc.mesenteroides*

GTATGTGGGCCTATACATGCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATAC
CGAATAAACTTAGTGTGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCG
CGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACT
GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTT
GTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTACGGTACCATAACAGAAAGGGACGGCT
AAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC
GAGCGCAGACGGTTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACT
GGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATAT

>Lbio11 (670pb) *Lactobacillus plantarum*

TGGTTCTAATTGGAAGCAGAAAGAATCTTGGTAGTGTATGGTGCTTGATCATGATTCAATCTGAGTG
AGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGA
TGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTT
GGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGAGCCACCCATTAG
GAAGTTTGGGCCGTGTCTCATTCCAATGTGGCCAATTACCCTCTCAGGTCCGCACTTATCATTGCCTT
GGTGAGCCGTTCCCCACATCTGCTAAAACCCCGGGACATCCAAAGTGATAGCCAAACCTCTTTAAAC
TGGACAGGCGGTCAGGTTGTATGCGGTATTAGCATCTTTTCCGGTGTTATCCCGCTTCTGGGCGGG
TTTCCACGTGTTATCACATTTCCCTCTCAAATGTTAATTAGGATGCAGCACCATCAATACAAAAATCT
TCACTTGCAGGTATTAGGCCGCCCGCGTTTTTTTCGCAAAAAAAGCGGGGGAA

>Lbio7 (659pb) *Lactobacillus plantarum*

TGTAGCTAACTTGCAAGTTCGAACGAACCTCTGGTTTTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTTACATTTT
TGAGTTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGA
AACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATC
ACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT

AGCCAACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGAGCCGCC
AATTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTATTTCCCATGTGGCCAATACCCTCTAGGTGGGCCACGTACAGTGC
CTGGTGAGCCGTTCCCCCATCTGCTAGACCCCGGGACATCCAAAGTGATACCAAAGCTCTTTCAACT
GGAACAGCGGTGAGTTGTTATGCGGTATTACATCTTTTTTCGGTTTTATCCCGCTTCGGGCGGGTTTCC
AGTGTATCACATTTGCCTTTCCATTTTATTAGGATCCGCCCTTTAACCAAATTTTTTAATTGAGTT
AAAGGCGCCCCCTTTTCCAGAAAAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

>Lbio14 (678pb) *Lactobacillus plantarum*
GGTTCCAATTGGAAGCCAAGGAACCTTGGAAAGTGAGTGGTGTAGCATATGAGTCCTCCGAGTGAGTGG
CGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
TACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGG
TCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAG
AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGAGCAGCCCCATAAGGAGGTT
TGGGCCGTGTCTCACTCCAATGTGGCCAATTACCCTCTCAGGTCCGCTACTTATCATTGCCATGGTGA
GCCGTTCCCCCATCTGCTAAACCCCGGGACATCCAAAGTGATAGCCAAACCTCTTTCAACTGGAAC
AGGCGGTGAGGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTTTTTTCGGTGTATCCCGCTTCTGGGCGGGTTTCC
ACGTGTTATCACACTTCCCCTCTCAATGTTAATTAGGATGCCGCCCCATAATAAAAATTTTTTCACT
TGAGGTATTAAGCCCCCGCTTTTTCTCAAAAAAAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGT

6. Séquences obtenues par les amorces pA et pH

> Sequence_BIOQUAL001 **Lbio2**
TGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAA
CTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACC
GCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC
GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCAACCTGAGAGGG
TAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA
CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGT
TGTTAAAGAAGAACATATCTAAGAGTAACTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC
TGGGAAACTTGAGTGCAGAAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATTTATGG
AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTAAGGCTCGAAAGTATGGGTAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAAGGTTTCCGC
CCTTCAGTGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTT
ACCAGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT
TATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAG
TTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG
CCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAAC
CAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAG

> Sequence_BIOQUAL003 **Lbio4**
TATAATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCACGATTTACATTTTCACTGAGTGG
CGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCGCGGAGCGGGGATAACACGTGGTAACGGATGCTTA
TACTGCGTAACAACCTTGTACTGCCTGGCTTGAGTTTGAAAGACGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGG

TCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATCCGTAGGCAACCTGAG
 AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
 TCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAAC
 CTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGG
 AAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
 ATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTTAGGCTCGAAAGTATGGG
 TAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTT
 CCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCTACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAA
 CGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA
 CTCGCCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAG
 GAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTTAACCCTAA

> Sequence_BIOQUAL004 **Lbio33**

CTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
 GTGGCGAACTGGTGAAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATG
 CTAATACCGCATAACAACCTTGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
 ATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACC
 TGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAA
 AACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTAAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG
 GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCA
 TCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 ATTTATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTTAGGCTCGAAAGTA
 TGGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGAAGG
 GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGA
 AGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGA
 TACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
 AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGT
 ACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
 GCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTT
 TTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAATGTGTAGCGCT

> Sequence_BIOQUAL005 **Lbio28**

GCGGGGGGGTGTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACA
 TTTGAGTGAAGTGGCGAACTGGTGAAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGG
 AAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTAT

CACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTC
GGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGA
AGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGATTTTATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTTAGGC
TCGAAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAG
TGTGGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA
GCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGG
GGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
ACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGGA
TTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGG
GGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGGAACAAGAGCGG
GCC

> Sequence_BIOQUAL006 **Lbio1**

GCTATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGTCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATG
CTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
ATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACC
TGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAA
AACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTAAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG
GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCA
TCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTA
TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGG
GTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCTACCCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGA
TACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCA
ACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGT
ACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTTGATGGCT
GCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTT
TTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGTGGAGAGGCC

> Sequence_BIOQUAL007 **Lbio10**

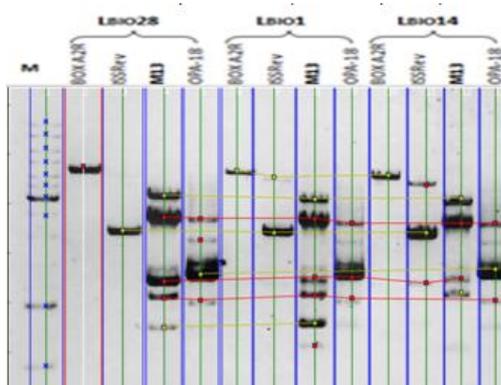
GTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGTCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
GGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCT

AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGAT
GGTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTG
AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAA
CTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTAAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATC
GGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
TTATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTTAGGCTCGAAAGTATG
GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC
AACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGC
AACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTT
AGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTAAAGTCGAACAAGTACTAGGC

> Sequence_BIOQUAL008 **Lbio14**

CTATACATGCAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGTGTCATCATGATTTACATTTGAGTGAGT
GGCGAACTGGTGGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCT
AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGAT
GGTCCC CGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCAACCTG
AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAA
CTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTAAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATC
GGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTAAGGCTCGAAAGTATG
GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC
AACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGC
AACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTT
AGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGTACAGATGATTAGGGTAAAGTCGTACAACCTGACTAGGCT

7. Résultats de *clustérisation* des profils RAPD par logiciel PyElph 1.4



8. Evolution de la croissance bactérienne (log/mL) et de l'acidification des 7 isolats sélectionnés inoculés 2% dans le milieu SMC

A- Croissance bactérienne sur bouillon MRS et milieu SMC

	MRS-24h	SMC-0h	SMC-24 h
LBIO2			
M±ET	9,56±0,076	7,73±0,10	9,11±0,028
LBIO33			
M±ET	9,82±0,004	7,89±0,15	9,029±0,142
LBIO4			
M±ET	9,60±0,12	7,98±0,022	9,106±0,028
LBIO1			
M±ET	9,54±0,043	7,73±0,089	9,12±0,011
LBIO28			
M±ET	9,51±0,047	7,82±0,036	9,16±0,014
LBIO10			
M±ET	9,41±0,084	7,82±0,040	8,96±0,17
LBIO14			
M±ET	9,40±0,041	7,86±0	8,8±0,032

B. Cinétique d'acidification des SMC fermentés et inoculés à 2 %

Temps(h)	LBIO2	ET	%Cv	LBIO33	ET	%Cv	LBIO4	ET	%Cv	LBIO28	ET	%Cv	LBIO1	ET	%Cv	LBIO10	ET	%Cv	LBIO14	ET	%Cv
0	6,50	0,11	1,76	6,45	0,17	2,70	6,59	0,09	1,42	6,58	0,03	0,41	6,37	0,01	0,18	6,57	0,02	0,38	6,61	0,12	1,85
1	6,46	0,12	1,93	6,36	0,15	2,41	6,51	0,02	0,35	6,53	0,03	0,48	6,27	0,09	1,41	6,36	0,10	1,54	6,55	0,08	1,19
2	6,42	0,13	2,03	6,32	0,14	2,27	6,49	0,03	0,43	6,49	0,05	0,75	6,25	0,04	0,61	6,28	0,04	0,71	6,52	0,08	1,24
3	6,40	0,15	2,28	6,31	0,15	2,40	6,47	0,03	0,48	6,48	0,05	0,76	6,23	0,04	0,64	6,21	0,03	0,46	6,50	0,06	0,97
4	6,38	0,15	2,31	6,28	0,16	2,49	6,45	0,03	0,53	6,46	0,05	0,76	6,19	0,05	0,88	6,20	0,10	1,54	6,49	0,07	1,02
5	6,35	0,14	2,28	6,25	0,17	2,75	6,42	0,04	0,59	6,44	0,05	0,74	6,18	0,04	0,71	6,18	0,15	2,47	6,48	0,06	0,95
6	6,32	0,14	2,27	6,20	0,19	3,11	6,38	0,04	0,61	6,41	0,05	0,71	6,13	0,07	1,17	6,17	0,21	3,32	6,42	0,07	1,02
7	6,27	0,13	2,01	6,14	0,23	3,70	6,31	0,05	0,78	6,37	0,04	0,59	6,17	0,04	0,64	5,93	0,24	4,06	6,41	0,07	1,11
8	6,21	0,11	1,79	6,06	0,27	4,39	6,22	0,06	0,95	6,31	0,03	0,46	6,10	0,00	0,08	5,85	0,25	4,33	6,40	0,07	1,15
9	6,14	0,09	1,54	5,96	0,30	5,09	6,12	0,07	1,06	6,24	0,02	0,32	6,01	0,03	0,45	5,76	0,27	4,66	6,35	0,08	1,25
10	6,06	0,08	1,32	5,85	0,35	5,91	6,00	0,07	1,14	6,16	0,01	0,14	5,92	0,05	0,86	5,67	0,26	4,58	6,29	0,08	1,32
11	5,97	0,07	1,13	5,74	0,38	6,64	5,87	0,07	1,24	6,06	0,00	0,07	5,81	0,09	1,47	5,79	0,06	1,03	6,22	0,09	1,43
12	5,87	0,06	1,02	5,63	0,41	7,31	5,75	0,07	1,29	5,96	0,00	0,04	5,69	0,13	2,29	5,93	0,41	6,92	6,13	0,10	1,62
13	5,77	0,05	0,94	5,52	0,43	7,87	5,63	0,08	1,34	5,87	0,01	0,13	5,56	0,18	3,26	5,89	0,48	8,17	6,04	0,10	1,70
14	5,67	0,05	0,96	5,41	0,46	8,45	5,52	0,08	1,49	5,77	0,01	0,17	5,45	0,21	3,77	5,30	0,22	4,17	5,95	0,09	1,47
15	5,62	0,02	0,35	5,30	0,48	8,98	5,40	0,08	1,54	5,68	0,01	0,24	5,32	0,27	4,99	5,36	0,22	4,12	5,85	0,07	1,15
16	5,49	0,03	0,57	5,19	0,50	9,58	5,30	0,08	1,47	5,59	0,01	0,23	5,16	0,37	7,16	5,28	0,22	4,18	5,76	0,04	0,75
17	5,42	0,00	0,08	5,08	0,52	10,28	5,18	0,09	1,73	5,50	0,02	0,33	4,99	0,48	9,59	5,19	0,22	4,25	5,66	0,00	0,05
18	5,31	0,03	0,56	4,98	0,54	10,84	5,07	0,09	1,84	5,42	0,02	0,39	4,83	0,59	12,28	5,12	0,22	4,31	5,56	0,04	0,69
19	5,22	0,02	0,32	4,87	0,56	11,52	4,95	0,11	2,14	5,34	0,02	0,37	4,73	0,62	13,15	5,05	0,22	4,37	5,47	0,07	1,36
20	5,14	0,01	0,19	4,78	0,58	12,07	4,87	0,15	3,14	5,26	0,03	0,52	4,62	0,66	14,24	4,97	0,22	4,44	5,39	0,11	1,96
21	5,07	0,03	0,52	4,69	0,02	0,36	4,82	0,23	4,70	5,18	0,03	0,56	4,46	0,78	17,61	4,88	0,22	4,52	5,21	0,08	1,53
22	4,97	0,01	0,19	4,64	0,02	0,37	4,79	0,02	0,44	5,09	0,04	0,71	4,27	0,94	22,11	4,79	0,22	4,61	5,10	0,07	1,37
23	4,89	0,01	0,30	4,64	0,02	0,37	4,79	0,02	0,44	5,00	0,05	0,96	4,12	0,60	14,57	4,70	0,22	4,69	5,01	0,03	0,60
24	4,81	0,01	0,31	4,61	0,02	0,43	4,79	0,02	0,44	4,96	0,02	0,40	4,15	0,40	9,64	4,61	0,02	0,52	4,92	0,02	0,41

ET : écart type ; CV : coefficient de variation.

NB. Tableau résumé en heure.

9. Analyses statistique ACP

Souches	Caractère filant		
	-	+	Total
LBIO1	0	3	3
LBIO28	0	3	3
LBIO10	0	3	3
LBIO33	0	3	3
LBIO2	0	3	3
LBIO4	3	0	3
p-value = 0.007353			

Souches	Synérèse			
	-	+/-	+	Total
LBIO1	0	3	0	3
LBIO28	0	3	0	3
LBIO10	0	0	3	3
LBIO33	1	2	0	3
LBIO2	0	0	3	3
LBIO4	0	3	0	3
p-value = 0.000808				

Souches	Viscosité			
	-	+	++	Total
LBIO1	0	0	3	3
LBIO28	0	0	3	3
LBIO10	3	0	0	3
LBIO33	2	1	0	3
LBIO2	1	2	0	3
LBIO4	3	0	0	3
p-value = 0.001469				

Souches	Force du gel			
	Friable	Fort	Très fort	Total
LBIO1	0	2	1	3
LBIO28	0	1	2	3
LBIO10	3	0	0	3
LBIO33	3	0	0	3
LBIO2	0	3	0	3
LBIO4	3	0	0	3
p-value = 0.001469				

Strain	Texture			
	Granuleux	Fin	Très fin	Total
LBIO1	0	1	2	3
LBIO28	0	0	3	3
LBIO10	3	0	0	3
LBIO33	2	1	0	3
LBIO2	0	3	0	3
LBIO4	3	0	0	3
p-value = 0.0008815				

10. Evolution de la croissance, de l'acidification et de la production des EPS au cours de la fermentation. Expérimentation réalisée en triplicata taille de l inoculum 5 %.

A. Croissance en log UFC/mL

Souche	Temps De Fermentation						
	0	14	16	20	24	36	48
LBIO28							
M±ET	8,28±0,034	8,99±0,026	9,00±0,017	9,14±0,044	9,2±0,0128	9,51±0,10	9,22±0,078
LBIO1							
M±ET	8,38±0,015	8,81±0,11	9,02±0,13	9,13±0,12	9,28±0,051	9,51±0,10	9,23±0,087
LBIO14							
M±ET	8,228±0,041	8,87±0,008	8,89±0,0019	9,05±0,073	9,12±0,09	9,31±0,005	9,20±0,030

M : moyenne ; ET : écart type.

B- Acidification

Temps	LBIO28		LBIO1		LBIO14	
	pH	Ecart Type	pH	Ecart Type	pH	Ecart Type
0	6,37	0,017	6,39	0,020	6,365	0,021
14	5,56	0,080	5,66	0,12	5,85	0,056
16	5,30	0,08	5,45	0,10	5,515	0,091
20	4,75	0,096	5,12	0,12	5,36	0,056
24	4,28	0,04	4,69	0,21	4,88	0,028
36	3,76	0,02	3,90	0,046	3,935	0,035
48	3,69	0,01	3,79	0,015	3,795	0,007

C-Dosage par la méthode gravimétrique des exopolysaccharides au cours de la fermentation des SMC

	Fermentation (h)	mg EPS / 40g SMC	Ecart type	mg EPS / 1000g SMC	Ecart type	Rendement mg/L
LBIO28	0	19,57	2,82	489,34	2,82	0,00
	14	21,71	2,87	542,82	2,87	53,48
	20	23,28	1,94	582,10	1,94	92,76
	24	24,90	1,45	622,42	1,45	133,08
	48	27,78	0,01	694,52	0,01	205,18
LBIO1	0	18,53	5,66	463,3	5,66	NC
	14	15,81	1,78	395,21	1,78	NC
	20	16,17	0,90	404,18	0,90	NC
	24	20,23	0,96	505,65	0,96	42,36
	48	21,52	3,05	537,93	3,05	74,64
LBIO14	0	12,15	0,83	303,78	0,83	0,00
	14	9,96	1,30	249,06	1,30	0,00
	20	9,86	5,20	246,57	5,20	0,00
	24	10,12	2,86	253,02	2,86	0,00
	48	9,80	3,71	244,97	3,71	0,00

NC : non calculé

11. Résultats du dosage des protéines à DO 550nm.

Souche	Essai	Fermentation time (h)	Code	Absorb. A550nm	mg/mL diluée au (1/2)	(mg/mL)*2	g protéine/mL
LBIO28	1	0	1	0,713	473,7	947,4	0,95
	1	14	2	0,675	446,6	893,1	0,89
	1	20	3	0,573	373,7	747,4	0,75
	1	24	4	0,568	370,1	740,3	0,74
	1	48	5	0,689	456,6	913,1	0,91
	2	0	6	0,676	447,3	894,6	0,89
	2	14	7	0,756	504,4	1008,9	1,01
	2	20	8	0,68	450,1	900,3	0,90
	2	24	9	0,672	444,4	888,9	0,89
	2	48	10	0,587	383,7	767,4	0,77
	3	0	11	0,667	440,9	881,7	0,88
	3	14	12	0,747	498,0	996,0	1,00
	3	20	13	0,73	485,9	971,7	0,97
	3	24	14	0,724	481,6	963,1	0,96
3	48	15	0,716	475,9	951,7	0,95	
LBIO1	1	0	16	0,763	509,4	1018,9	1,02
	1	14	17	0,721	479,4	958,9	0,96
	1	20	18	0,736	490,1	980,3	0,98
	1	24	19	0,652	430,1	860,3	0,86
	1	48	20	0,554	360,1	720,3	0,72
	2	0	21	0,418	263,0	526,0	0,53
	2	14	22	0,503	323,7	647,4	0,65
	2	20	23	0,733	488,0	976,0	0,98
	2	24	24	0,7	464,4	928,9	0,93
	2	48	25	0,67	443,0	886,0	0,89
	3	0	26	0,74	493,0	986,0	0,99
	3	14	27	0,745	496,6	993,1	0,99
	3	20	28	0,718	477,3	954,6	0,95
	3	24	29	0,676	447,3	894,6	0,89
3	48	30	0,697	462,3	924,6	0,92	
LBIO14	1	0	31	0,78	521,6	1043,1	1,04
	1	14	32	0,723	480,9	961,7	0,96
	1	20	33	0,795	532,3	1064,6	1,06
	1	24	34	0,735	489,4	978,9	0,98
	1	48	35	0,726	483,0	966,0	0,97
	2	0	36	0,834	560,1	1120,3	1,12
	2	14	37	0,83	557,3	1114,6	1,11
	2	20	38	0,773	516,6	1033,1	1,03
	2	24	39	0,798	534,4	1068,9	1,07
	2	48	40	0,791	529,4	1058,9	1,06

12. Viscosité apparente Posthumus des gels fermentés SMC

Souche	Viscosité Posthumus (s)
LBIO1-1	28
LBIO1-2	27
LBIO1-3	25
M	26,66
ET	1,52
LBIO28-1	31
LBIO28-2	30
LBIO28-3	34
M	31,66
ET	2,08
LBIO14-1	7
LBIO14-2	6
LBIO14-3	7
M	6.66
ET	0,6

M : moyenne ; ET : écart type

13. Paramètres du model rhéologique des trois gels lactiques SMC

Souches	Viscosité (mPa, s-1)	Contrainte de cisaillement (Pa)	Vitesse de cisaillement (s ⁻¹)	Indice d'écoulement	Indice de consistance (K) (Pa s ⁿ)		
LBIO28	50,42±5,83	16,81±1,94	300	0,156±0.011	6,23±1,09		
	43,68	14,56		0,17	4,97		
	53,79	17,93		0,15	6,86		
	53,79	17,93		0,15	6,86		
LBIO1	38,17±1,05	12,72±0,35		300	0,187±0,005	3,95±0,24	
	39,36	13,12			0,18	4,23	
	37,33	12,44			0,19	3,79	
	37,83	12,61			0,19	3,84	
LBIO14	19,05±6,17	6,35±2,05			300	0,26±0,02	1,31±0,46
	13,49	4,5				0,28	0,82
	25,7	8,57				0,26	1,75
	17,95	5,98				0,24	1,37

14. Données de perméabilité enregistrées pour les trois gels SMC.

	Souches	Moyenne \pm ET
Perméabilité Bt (10^{-13}) (m^2)	LBIO1	0.59 \pm 0.12 ^a
	LBIO28	0.92 \pm 0.13 ^b
	LBIO14	1.10 \pm 0.15 ^c
		p < 0.001
Viscosité cinématique ν (10^{-6}) (mm^2s^{-1})	LBIO1	1.19 \pm 0.018 ^b
	LBIO28	1.19 \pm 0.018 ^b
	LBIO14	1.12 \pm 0.002 ^a
		p < 0.01

15. Résultats de la centrifugation des gels SMC

A- Photographie des gels après centrifugation (5000 \times g)

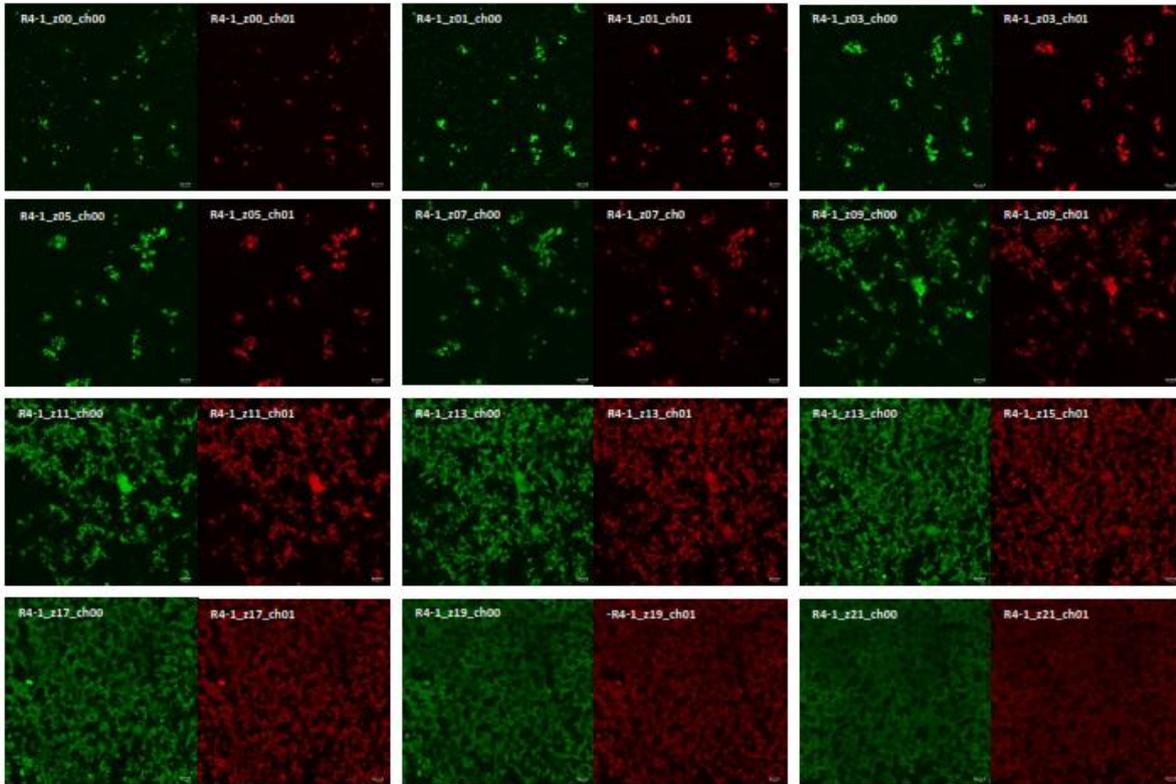


B- Synérèse provoquée par la force centrifuge des SMC exprimée en pourcentage

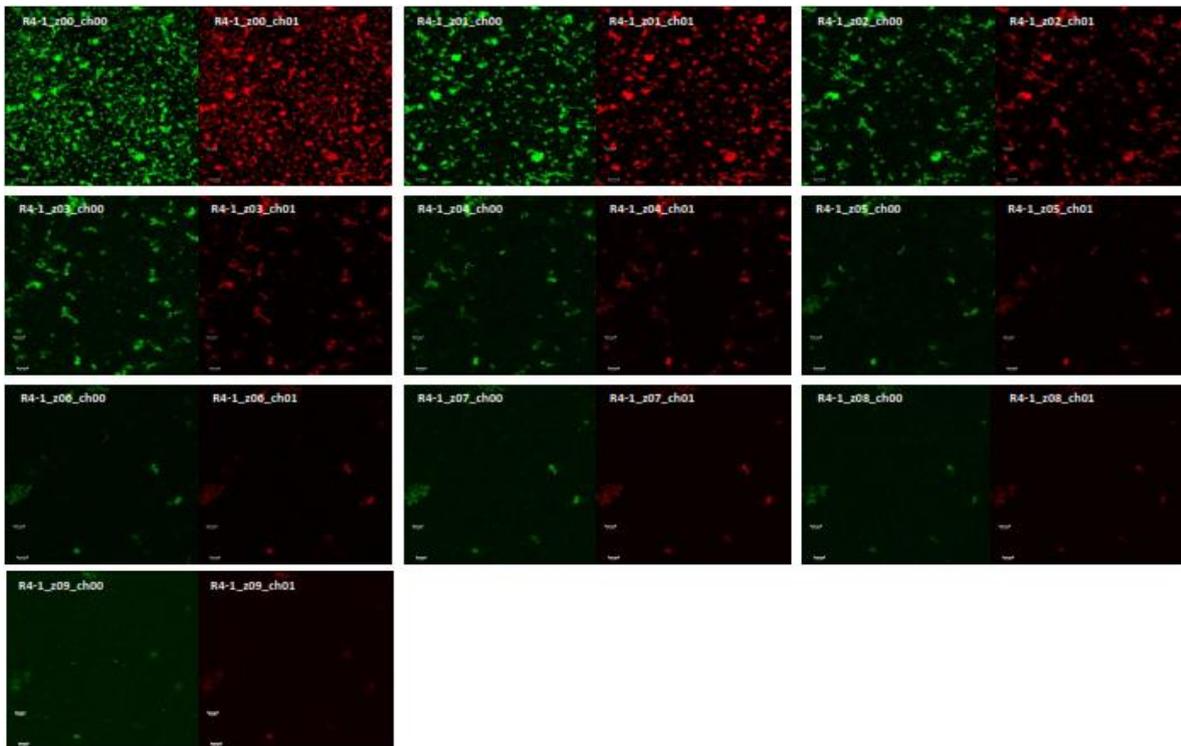
Force centrifuge	Souches	Moyenne \pm SD (%)
1090xg	LBIO1	46,44 \pm 0,99 ^b
	LBIO14	54,86 \pm 0,59 ^c
	LBIO28	25,44 \pm 0,81 ^a
		p < 0,001
3020xg	LBIO1	63,3 \pm 0,30 ^e
	LBIO14	66,48 \pm 0,38 ^f
	LBIO28	61,41 \pm 0,33 ^d
		p < 0,001
5920xg	LBIO1	68,89 \pm 0,35 ^g
	LBIO14	70,49 \pm 0,23 ^h
	LBIO28	66,77 \pm 0,18 ^f
		p = 0,001
12070xg	LBIO1	74,95 \pm 0,16 ⁱ
	LBIO14	76,81 \pm 0,16 ^g
	LBIO28	74,27 \pm 0,57 ⁱ
		p < 0,001

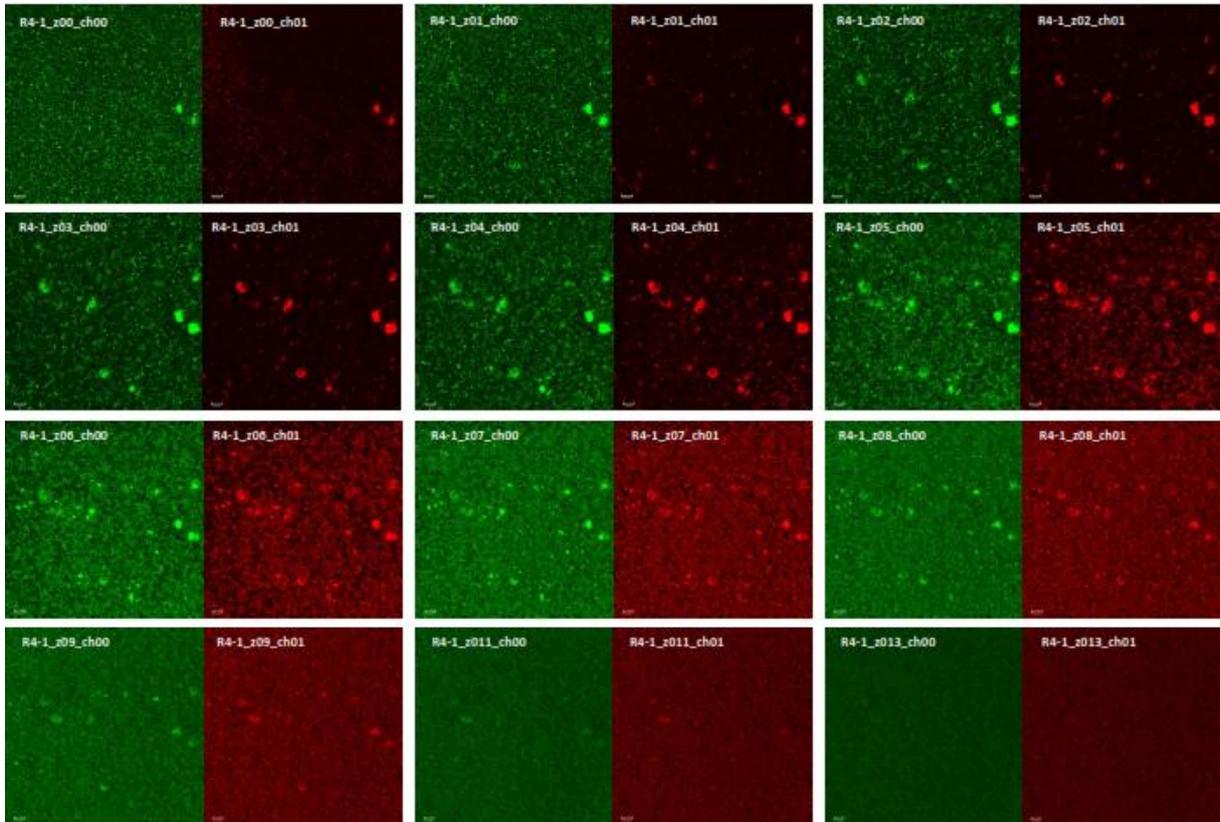
16. Micrographies réalisées au microscope confocal à balayage laser (CLSM) des SMC fermentés par les trois souche LBIO1, LBIO28 et LBIO14 (axes-Z)

LBIO1 Profondeur de balayage 0 à 21 μ m



LBIO28 Profondeur de balayage 0 à 13 μ m



LBIO14 Profondeur de balayage 0 à 13 μ m

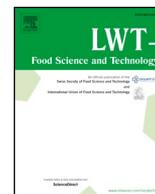
17. L'organisation des *clusters cps* chez la souche *Lb. plantarum* WCFS1 selon Remus *et al.* (2012)

WCFS1	ORF	Gene name(s)	Gene function
<i>cps1 A-I</i>	<i>lp_1177</i>	<i>cps1A</i>	Glycosyltransferase
	<i>lp_1178</i>	<i>cps1B</i>	glycosyltransferase, family 1 (GT1)
	<i>lp_1179</i>	<i>cps1C</i>	<i>wzx</i> oligosaccharide transporter (flippase)
	<i>lp_1180</i>	<i>cps1D</i>	Glycosyltransferase
	<i>lp_1181</i>	<i>cps1E</i>	acyltransferase/acetyltransferase
	<i>lp_1182</i>	<i>cps1F</i>	<i>wzz/wzd</i> polysaccharide biosynthesis protein, chain length regulator
	<i>lp_1183</i>	<i>cps1G</i>	glycosyltransferase, family 1 (GT1)
	<i>lp_1184</i>	<i>cps1H</i>	glycosyltransferase, family 2 (GT2)
	<i>lp_1185</i>	<i>cps1I</i>	<i>wzy</i> polysaccharide polymerase
<i>rfb A-D</i>	<i>lp_1186</i>	<i>rfbA</i>	glucose-1-phosphate thymidyltransferase
	<i>lp_1187</i>		glycosyl hydrolase
	<i>lp_1188</i>	<i>rfbC</i>	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase
	<i>lp_1189</i>	<i>rfbB</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
	<i>lp_1190</i>	<i>rfbD</i>	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
	<i>lp_1191</i>		transposase, fragment
	<i>lp_1192</i>		transposase, fragment
	<i>lp_1193</i>		transposase, fragment
	<i>lp_1194</i>		transposase, fragment
	<i>lp_1195</i>		transposase, fragment
	<i>lp_1196</i>		integrase/recombinase
	<i>cps2 A-J</i>	<i>lp_1197</i>	<i>cps2A</i>
<i>lp_1198</i>		<i>cps2B</i>	<i>wze</i> polysaccharide chain-length regulator; tyrosine kinase
<i>lp_1199</i>		<i>cps2C</i>	<i>wzh</i> polysaccharide chain-length regulator; tyrosine phosphatase
<i>lp_1200</i>		<i>cps2D</i>	UDP N-acetylglucosamine 4-epimerase, NAD dependent
<i>lp_1201</i>		<i>cps2E</i>	priming glycosyltransferase, polyprenyl glycosylphosphotransferase
<i>lp_1202</i>		<i>cps2F</i>	glycosyltransferase, family 1 (GT1)
<i>lp_1203</i>		<i>cps2G</i>	Glycosyltransferase
<i>lp_1204</i>		<i>cps2H</i>	<i>wzy</i> polysaccharide polymerase
<i>lp_1205</i>		<i>cps2I</i>	<i>wzx</i> oligosaccharide transporter (flippase)
<i>lp_1206</i>		<i>cps2J</i>	glycosyltransferase, family 1 (GT1)
<i>lp_1207</i>		<i>cps2K</i>	polysaccharide biosynthesis protein
<i>lp_1210</i>			hypothetical protein
<i>lp_1211</i>			hypothetical protein
<i>lp_1213</i>			transposase, fragment
<i>lp_1214</i>		transposase, fragment	
<i>cps3 A-J</i>	<i>lp_1215</i>	<i>cps3A</i>	glycosyltransferase, family 2 (GT2)
	<i>lp_1216</i>	<i>cps3B</i>	glycosyltransferase, family 2 (GT2)
	<i>lp_1219</i>	<i>glf</i>	UDP-galactopyranose mutase
	<i>lp_1220</i>	<i>cps3D</i>	polysaccharide biosynthesis protein
	<i>lp_1221</i>	<i>cps3E</i>	polysaccharide biosynthesis protein; putative protein kinase
	<i>lp_1222</i>	<i>cps3F</i>	<i>wzy</i> polysaccharide biosynthesis membrane protein
	<i>lp_1224</i>	<i>cps3G</i>	<i>wzy</i> polysaccharide polymerase, partial
	<i>lp_1225</i>	<i>cps3H</i>	polysaccharide biosynthesis protein

	<i>lp_1226 cps3I</i>		O-acetyltransferase
	<i>lp_1227 cps3J</i>		Glycosyltransferase
	<i>lp_1228</i>		transcription regulator, AraC family
	<i>lp_1229</i>		mannose-specific adhesin, LPXTG-motif cell wall anchor
	<i>lp_1230</i>		transcription regulator, MarR family
	<i>lp_1231</i>		oligosaccharide transporter (flippase)
	<i>lp_1233</i>		priming glycosyltransferase, undecaprenyl-phosphate beta-glucosephosphotransferase
	<i>lp_1234</i>		hypothetical protein
	<i>lp_1235</i>		hypothetical protein
<i>cps4 J-A</i>	<i>lp_2099 cps4J</i>	<i>wzx</i>	polysaccharide repeat unit transporter (flippase)
	<i>lp_2100 cps4I</i>		glycosyltransferase, family 2 (GT2)
	<i>lp_2101 cps4H</i>	<i>wzy</i>	polysaccharide polymerase
	<i>lp_2102 cps4G</i>		glycosyltransferase, family 1 (GT1)
	<i>lp_2103 cps4F</i>		glycosyltransferase, family 1 (GT1)
	<i>lp_2104 cps4E</i>		polysaccharide biosynthesis polyprenyl glycosylphosphotransferase, priming glycosyltransferase
	<i>lp_2105 cps4D</i>		UDP N-acetylglucosamine 4-epimerase, NAD dependent
	<i>lp_2106 cps4C</i>	<i>wzh</i>	polysaccharide chain-length regulator; tyrosine phosphatase
	<i>lp_2107 cps4B</i>	<i>wze</i>	polysaccharide chain-length regulator; tyrosine kinase
	<i>lp_2108 cps4A</i>	<i>wzd</i>	polysaccharide chain-length regulator

Les couleurs employées correspondent à celles de la carte physique des *clusters cps*

Annexe 18. Production Scientifique



Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations

Nadia Bachtarzi^{a,b}, Karima Kharroub^b, Patricia Ruas-Madiedo^{a,*}

^a Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300, Villaviciosa, Asturias, Spain

^b Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Route de Ain El Bey, 25000, Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Exopolysaccharide
Dairy fermented product
Lactic acid bacteria
Texture
Viscosity

ABSTRACT

Exopolysaccharide (EPS)-producing lactic acid bacteria are used in the dairy industry to obtain products with appropriate sensorial properties. Specific EPS act as stabilizers, thickeners, and/or fat-replacers, and are considered as natural biopolymers. The autochthonous microbiota of foods provides a rich reservoir of biodiversity to find biopolymers for novel applications. In this study, a collection of LAB isolated from homemade Algerian dairy products was screened for a rational selection of EPS-producing strains. Six isolates, identified as *Lactobacillus plantarum*, presented a stable mucoid/ropy phenotype after several sub-cultivations and they were used to ferment skimmed milk. Those fermented with strains L BIO1 and L BIO28 had higher viscosity, a smooth/creamy texture and presented lower syneresis. The kinetics of growth and EPS-production, followed for 48 h, showed that both strains had similar behaviour, the molar mass (about 2×10^6 Da) and radius of gyration (about 80 nm) of the polymers being also similar. However, L BIO28 was able to increase the apparent viscosity of the fermented milk to a higher extent than L BIO1, which could be related with the earlier accumulation of EPS in the first strain in relation to the gelation point. Thus, these two ropy EPS-producing strains are suitable for different applications in dairy fermentations.

1. Introduction

From ancient times it has been known that fermentation is a natural process to preserve and maintain raw materials for longer periods, lactic acid bacteria (LAB) being one of the main microbial groups involved in this transformation. In fact, the long history shared between LAB and humans favoured the adaptation of these bacteria to food processing (Douillard & de Vos, 2014). In Algeria traditional fermented dairy products, following artisanal practices, have been consumed for a long time in relation to ethnic Berber traditions. Cheeses (“Klila”, “Bouhezza”, “Kamaria”, and “Jben”), fermented milks (“Lben”, “Raib” or “Rayeb”) and some fat-based products (“Smen” and butter) are mostly homemade in the rural areas of Algeria (Bendimerad, Kihal, & Berthier, 2012; Mechai, Debabza, & Kirane, 2014; Medjoudj, Aouar, Zidoune, & Hayaloglu, 2018).

LAB producing exopolysaccharides (EPS) are chosen for their capability to enhance the physical properties of dairy products. These surface carbohydrate polymers can be released into the environment (as “slime”), or be more tightly attached to the extracellular envelope

forming a capsule (Castro-Bravo, Wells, Margolles, & Ruas-Madiedo, 2018). In dairy manufacturing the benefits of using EPS-producing LAB is well known; polymers synthesized *in situ* during milk fermentations act as effective stabilizers and/or thickeners, as well as fat-replacers improving the viscosity, texture and structure of the fermented products and reducing syneresis (Mende, Rohm, & Jaros, 2016). The increasing demand by consumers for natural ingredients allows the food industry to favor a reduced cost application of these biopolymers, the use of EPS-producing LAB cultures being the most affordable strategy and, a current practice in dairy food manufacturing (Duboc & Mollet, 2001). Therefore, the screening for new EPS-producing strains is a very valuable tool to maintain biodiversity and to find new biopolymers of interest, for both industry and research purposes (Zeidan et al., 2017). Fermented foods obtained from the spontaneous activity of the autochthonous microbiota, as well as autochthonous LAB present in raw vegetable or animal feedstock (Motato et al., 2017; Tamang, Watanabe, & Holzapfel, 2016), still remain a natural and rich reservoir of biodiversity to search for “novel” strains with technological and functional properties. The aim of the present study was to screen a large number of

* Corresponding author. IPLA-CSIC, Paseo Río Linares s/n, 33300, Villaviciosa, Asturias. Spain.
E-mail address: ruas-madiedo@ipla.csic.es (P. Ruas-Madiedo).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.005>

Received 28 November 2018; Received in revised form 28 January 2019; Accepted 1 March 2019

Available online 06 March 2019

0023-6438/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Characteristics of traditional Algerian fermented dairy products used to isolate nineteen exopolysaccharide (EPS)-producing lactic acid bacteria (LAB), of which, ten maintained a stable phenotype after subsequent cultivations.

Product name	Dairy product type	Number of samples	Animal	Region	Origin	Ripening time	Number of putative EPS-producing LAB (strains with stable phenotype)
"Rayeb" ^a	Fermented milk	6	Bovine	Bordj El Ghadir	Farm	1 day	5 (LBIO10, LBIO28, LBIO33, LBIO41, LBIO43)
		6	Goat	Tebessa	Farm	1 day	0
		2	Goat	Touggourt	Household	1 day	2 (LBIO4)
		1	Camel	Hassi Messaoud	Breeder	15 days	0
		1	Camel	Ain Mlila	Nomadic	10 days	0
"Lben"	Stirred fermented milk	8	Bovine	Constantine	Market	1 day	5
"Klila"	Cheese (mild ripened)	2	Bovine	Batna	Household	10 days	3 (control strain LBIO14) ^d
"Bouhezza"	Cheese (fresh)	3	Bovine	Batna, Khechela	Market	ND	4 (LBIO1, LBIO2, LBIO3, LBIO22)
		1 (spicy) ^b					
"Kamaria"	Cheese (ripened)	1	Goat	Touggourt	Household	> 60 days	0
"Zebda"	Fermented butter	1	Bovine	Constantine	Market	2 days	0
"Smen"	Clarified butter ^c	2	Ovine	El Kantra Biskra	Household	60 days	0

ND: no determined.

^a This product was made at laboratory (fermentation temperature 20–25 °C) using milk obtained from different animal/geographical locations.

^b With hot paprika "kalb el serdouk".

^c With *Artemisia herba-alba*.

^d Non-EPS phenotype (control) strain.

LAB isolates from traditional Algerian dairy products to search for those able to produce EPS with the optimal technological aptitude to be applied in the dairy industry.

2. Material and methods

2.1. Sampling and isolation of LAB

Samples of traditional Algerian dairy products (spontaneous fermentations under ambient temperature) and of raw milk from different animals and geographical locations (see [supplementary Fig. S1](#)) were collected over three years (2015–2017, [Table 1](#)). Products (10 g) were homogenised with 90 ml of buffered peptone water (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), before serial dilutions were made that were surface plated on agar-MRS, agar-M17-lactose and agar-MSE (all media from Biokar). After incubation at 30 °C for 48 h, several colonies of different morphology were selected and purified by successive streaking on an appropriate medium. Those Gram-positive, catalase-negative and non-spore forming bacteria were selected.

2.2. Screening of EPS-producing LAB

This collection of LAB was screened to search for EPS-producing phenotype using different methods previously described ([Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005](#)): i) detection of "ropy" phenotype (formation of an unbreakable strand when the colony is touched with an inoculation loop) and "mucoide non-ropy" phenotype (glistening, smooth and slimy appearance without occurrence of filament); ii) detection of ropy/mucoid colonies growing in media supplemented with 50 g/L of sucrose (for homopolysaccharide production); iii) ruthenium-red staining; iv) viscosity of liquid cultures using "exopolysaccharide selection medium" (ESM: 90 g skimmed milk, 3.5 g yeast extract, 3.5 g peptone and 10 g glucose per litre). Nineteen EPS-producing bacteria were obtained which were successively cultivated (at least 5 times) to select those that maintained a stable phenotype. Finally, 10 EPS-producing LAB with stable phenotype were sent to IPLA-CSIC (Spain) for further characterisation ([supplementary Fig. S2](#)). From those, 7 isolates were selected according to their different origin (animal and/or geographical location, [supplementary Fig. S2](#)) and stored at –80 °C in MRS with 30% glycerol.

2.3. Identification, characterisation and selection of EPS-producing LAB

Identification of the 7 selected strains was approached by partially sequencing the gene coding for the 16S rRNA. Genomic DNA was extracted with the GenElute kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's recommendations, but adding an additional step of enzymatic lysis with lysozyme (45 mg/mL) (Merck, Darmstadt, Germany), proteinase K and mutanolysin (5U, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The PCR was performed using a pair of primers pA-Forward (5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') and pH-reverse (5'AAG GAG GTG ATC CAG CG CA3'). Amplicon's sequencing was made at Macrogen (Seoul, Republic of Korea) and the BLAST tool was used for comparison. The sequences of the 7 strains, all belonging to genus *Lactobacillus plantarum*, were held in the Genbank database (accession numbers collected in [Table 2](#)).

The 7 lactobacilli were used to ferment skimmed milk in order to select those with the best technological properties. Skimmed milk (Difco, Thermo-Fisher Scientific, Spain) was reconstituted (11% w/v) and supplemented 1% (w/w) with pancreatic casein hydrolysate (Sigma-Aldrich) to obtain SMC (skimmed milk-casein). The SMC was pasteurised in a water bath at 90 °C for 5 min, kept at room temperature overnight, and pasteurised again before cooling-down to the incubation temperature. Standardised cultures were made as follows: stocks (–80 °C) were seeded on the surface of agar-MRS (grown at 30 °C for 48 h), a single colony was picked to inoculate fresh MRS broth (cultivated overnight) and this culture was used to inoculate (1%) fresh MRS broth (grown for 24 h). These cultures were washed once with PBS and used to inoculate (2%) pasteurised SMC. Fermentations were carried out in triplicate in a thermostatic bath (Julabo TW20 GmbH, Germany) at 30 °C for 24 h and the acidification curves were followed in real-time using the pHmeter ORION™ Versa Star™ (Thermo Scientific Inc., USA). The initial and final counts of the strains growing in SMC, as well as several final qualitative physical attributes (syneresis, ropiness, viscosity, coagulum firmness and texture) were determined ([Table 2](#)). Following this approach, 2 ropy strains (LBIO1 and LBIO28), selected as those able to confer good sensorial attributes to the fermented SMC, and 1 non-ropy strain (LBIO14), unable to confer them, were chosen for further experiments.

2.4. Milk fermentations with selected EPS-producing LAB

Standardised and washed cultures of strains LBIO1, LBIO14 and

Table 2

Preliminary characterisation of different *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Algerian fermented milks growing (inoculated at 2%) in skim milk (re-constituted at 11%) supplemented with 1% of pancreatic casein hydrolysate (SMC) at 30 °C for 24 h. The correspondence factorial analysis of the qualitative data is represented in Fig. 1.

Strains	Gene bank accession No.	Origin	Fermented SMC						
			Log CFU/ml	Δ Log CFU/ml	Syneresis ^a	Ropiness ^b	Viscosity ^c	Coagulum firmness ^d	Texture ^e
LBIO1	MG822866	“Bouhezza”	9.12 ± 0.01	1.39	+/-	+	++	Semi-hard	Smooth
LBIO2	MG822861	“Bouhezza”	9.11 ± 0.02	1.38	+	+	++	Semi-hard	Smooth
LBIO4	MG822863	“Rayeb” goat	9.10 ± 0.03	1.12	+/-	-	-	Soft	Granulated
LBIO10	MG822867	“Rayeb” cow	8.96 ± 0.17	1.24	+	-	+	Soft	Smooth
LBIO14	MG822868	“Klila”	8.82 ± 0.03	0.95	+	-	-	Very-soft	Granulated
LBIO28	MG822865	“Rayeb” cow	9.16 ± .014	1.34	+/-	+	++	Semi-hard	Smooth
LBIO33	MG822864	“Rayeb” cow	9.02 ± .014	1.13	-	-	+	Soft	Granulated

^a + means presence of whey on top of the gel, +/- means few of whey on top of the gel, and - means absence.

^b + means occurrence of the “ropy” strand, and - means absence.

^c ++ means very high resistance (more time is needed) of the stirred fermented milk to flow, + means high resistance of the stirred fermented milk to flow, and - means low resistance.

^d Semi-hard means that is necessary to shake the coagulum more vigorously to be broken than the soft one.

^e Smooth means creamy appearance and granulated has a lumpy appearance.

LBIO28 were used to inoculate (5%) SMC, carrying out fermentations (in triplicate) at 30 °C for 24 or 48 h according to the type of experiment.

2.4.1. Kinetic of growth and EPS production

SMC (400 ml) was inoculated, divided into 8 tubes (50 ml each) and incubated for 48 h at 30 °C in a water bath. Sampling points (0, 14, 16, 20, 24, 36 and 48 h) were taken to enumerate the bacteria using 5 g of fermented SMC [homogenised in 45 mL of sterile 2% (w/v) sodium citrate before serial dilutions were made in Ringer ¼ solution]; the remaining sample was used to measure the pH (pHmeter Crison, Hach Lange S.L.U., Barcelona, Spain) before being frozen for the isolation of EPS. Additionally, after the 36-h fermentation one sample was frozen for quantification of organic acids.

Frozen samples collected at 0, 14, 20, 24 and 48 h were used for the isolation of EPS (Burns et al., 2011). In short, 40 g of fermented SMC was mixed with 8 ml of 60% TCA and vigorously stirred for 45 min at room temperature. After centrifugation (10,000 × g, 4 °C, 30 min), the pH of the supernatants was increased to 5.0 ± 0.5, before being intensively dialysed against ultra-pure water (4 °C, for 3 days, daily change of water) using cellulose membranes of 12–14 kDa MWCO (Sigma). Dialyzed samples were finally freeze-dried in a Freezmobile 12 EL lyophilizer (VirTis, Gardiner NY, USA). The lyophilised powder was weighed to obtain the EPS-crude yield and its protein content determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Thermo-Fisher, Rockford, IL, USA).

The EPS-crude powder was analysed by means of size exclusion chromatography coupled with multiangle laser light scattering (SEC-MALLS) to quantify the EPS amount, its molar mass and the radius of gyration. For that, 5 mg of lyophilized powder was dissolved overnight in 1 ml of 0.1 M NaNO₃ and centrifuged. Two columns TSK-Gel (G3000 PW_{XL} + G5000 PW_{XL}) placed in series and protected with a TSK-Gel guard column (Supelco-Sigma) were used for SEC-MALLS. Separation was carried out with 0.1 M NaNO₃ at 40 °C, at flow rate of 0.45 ml/min, using an HPLC system composed of the Alliance 2690 module injector, the Photodiode Array (PDA) 996 detector, the refractive index (RI) 2414 detector and the Empower software (Waters, Milford, MA, USA), coupled with the MALLS detector Dawn Heleos II (Wyatt Europe GmbH, Dembach, Germany) and its software Astra 3.5. After separation, peaks giving a signal in the RI detector but not in the PDA detector (set at 280 nm, which denotes the presence of protein) corresponded with the EPS. Then, the EPS amount was quantified from the signal of the RI detector using linear regression equations from different concentrations of dextran standards (Fluka-Sigma), whereas the weighted average molar mass (M_w) and the weighted average radius of gyration (R_w)

were directly given by the MALLS detector (Burns et al., 2011).

2.4.2. Organic acid production

The concentration (g/100 g) of lactic, formic, and acetic acids present in the fermented SMC was quantified by ion-exchange HPLC, as previously reported, using the ICsep ION-300 ion-exchange column (Transgenomic, San Jose, CA, USA) with 8.5 mN H₂SO₄ (as the mobile phase) at 65 °C, with a flow rate of 0.4 mL/min (Salazar et al., 2009). The organic acids were detected with the PDA detector (set at 210 nm) and, for quantification, regression equations from different concentrations of the corresponding standards (Fluka-Sigma) were used.

2.4.3. Apparent viscosity of stirred fermented milks

The apparent viscosity of stirred fermented SMC was determined by means of the Posthumus funnel method (Salazar et al., 2009). For that, 500 ml of SMC were inoculated (separately) with the three strains and fermented at 30 °C to reach a final pH of 4.6; then, the fermented SMC were immediately cooled down to 14 °C and stored at 4 °C for 24 h. Afterwards, the samples were stirred in a standardised way (20 times with a special spoon) to obtain the stirred-fermented SMC. A Posthumus funnel, placed in a cold chamber (at 4 °C), with an opening size (diameter × length) of 8.0 × 6.0 mm was filled with approximately 450 ml of the stirred fermented SMC; the time (s) needed to pass the mark inside the funnel was the measure of the apparent viscosity of the sample.

2.5. Statistical analyses

A correspondence factorial analysis (Teil, 1975) of the qualitative data obtained for the six ropy EPS-producing strains was performed using the free software statistical computing R version 3.3. For that, the qualitative data of the fermented SMC attributes were categorized in numeric values (from 0 to 3, as indicated in Table 2) to select the best performing strains (p < 0.05). Quantitative data were analysed by means of one-way ANOVA to determine differences among strains (LBIO1, LBIO14 and LBIO28). The mean comparison test SNK (Student–Newman–Keuls) was applied to find which the differing (p < 0.05) strains were.

3. Results and discussion

3.1. Selection of EPS-producing strains with stable phenotype

In this work, we report the search for LAB with an EPS-production phenotype using traditional Algerian dairy products as the source of

isolation. Among the 584 Gram-positive, non-spore forming, catalase negative isolates, nineteen had a ropy or a mucoid character, of which ten kept a stable phenotype after sub-cultivations (Table 1, supplementary Fig. S2). A final selection of six ropy/mucoid strains, together with one strain in which this character was absent, were identified as *L. plantarum* (Table 2). This versatile species can be found in many natural fermented foods, including dairy products, as well as different human niches (Hamet, Piermaria, & Abraham, 2015; Ribeiro, Stanton, Yang, Ross, & Silva, 2018). It could also be used as an adjunct culture for cheese manufacturing (Ayyash, Abu-Jdayil, Hamed, & Shaker, 2018; Wang, Fang, Wu, Min, & Yang, 2018), or for other vegetable-based fermented foods (Russo et al., 2016). Besides, strains belonging to this species might present health-promoting properties and they could be used for the formulation of functional dairy foods (Linares et al., 2017).

Further characterisation of the seven *L. plantarum* isolates from Algerian dairy products was focused at evaluating their technological aptitude to improve the viscosity, texture and structure of fermented skimmed milk (Table 2). In spite of the presence of an available nitrogen source (pancreatic hydrolysed casein) in the SMC, only 3 (LBIO1, LBIO10 and LBIO33) out of 7 strains were able to reach a final pH below or equal to 4.6 after 24 h at 30 °C, those remaining having pH values of between 4.79 and 4.95 (Fig. 1A). The acidification rate was slow for all strains, which is agreement with data previously reported, supporting the fact that *L. plantarum* is a nonstarter adjunct culture (Briggiler-Marcó et al., 2007). All strains were able to grow in milk, increasing by at least one logarithmic unit the number of cells after 24 h of fermentation. The physical properties of the seven acidified SMC gels were different; gels obtained with strains LBIO1, LBIO2 and LBIO28 had high viscosity (ropiness), smooth/creamy texture and all, except LBIO2, presented lower syneresis. The remaining strains, including the non-ropy/mucoid control (LBIO14), gave SMC gels with a granulated structure, low viscosity and high whey-release from the milk coagulum (Table 2). After the correspondence factorial analysis performed with this qualitative data, the strains showing the best performance (LBIO1 and LBIO28) clustered together ($p < 0.05$) and separately from the other strains (Fig. 1B). These results suggest that these two strains synthesize EPS which are able to confer desirable physical attributes to the fermented milk (Hamet et al., 2015). The physical-chemical properties of the polymers, such as composition, structure, presence of charges, molar mass, as well their interaction with milk constituents are the key factors involved in this improvement (Han et al., 2016; Ruas-Madiedo, Hugenholtz, & Zoon, 2002a). Therefore, strains LBIO1 and LBIO28 were selected to study the EPS-production during SMC

Table 3

Production of organic acids (g/100 g) of skim milk (supplemented with 1% pancreatic casein hydrolysate) fermented for 36 h with the EPS-producing *L. plantarum* LBIO1 and LBIO28 strains and the non-EPS producer LBIO14 strain. One-way ANOVA test was used to compare values among strains (** $p < 0.01$) and, when necessary, the SNK mean comparison test was performed, in this case those strains that does not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

	Mean ± SD (n = 6)		
	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid
LBIO1	280.1 ± 15.4 ^b	0.52 ± 0.14	14.2 ± 3.7
LBIO14	252.7 ± 14.9 ^a	0.43 ± 0.11	15.1 ± 2.0
LBIO28	277.3 ± 4.94 ^b	0.54 ± 0.10	15.6 ± 3.4

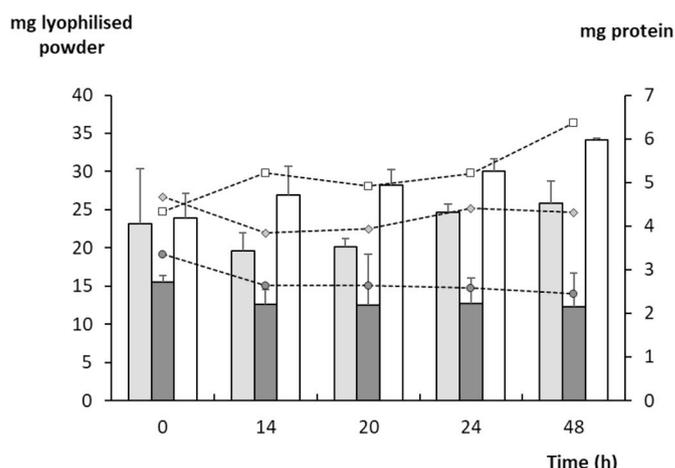


Fig. 2. Yield of lyophilised powder (or crude EPS) and amount of protein obtained following the EPS- purification procedure in different sampling points during the SMC (11% skim milk supplemented with 1% pancreatic casein hydrolysate) fermentation (at 30 °C for 48 h) by the ropy” EPS-producing *Lactobacillus plantarum* LBIO1 (grey bar/symbol) and LBIO28 (white bar/symbol) and by the non-ropy strain LBIO14 (black bar/symbol). The statistical differences (ANOVA and SNK mean test) among the three strains are showed in supplementary Table S1.

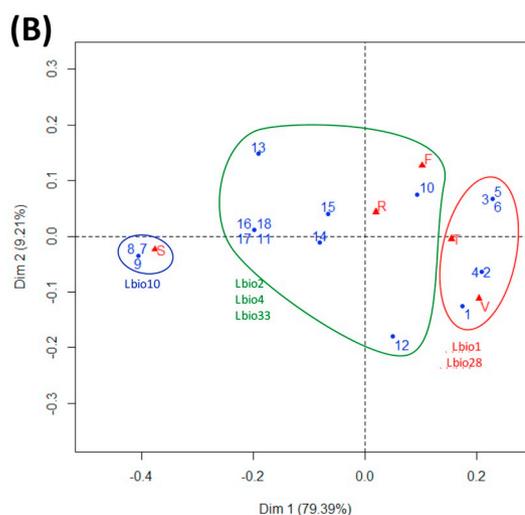
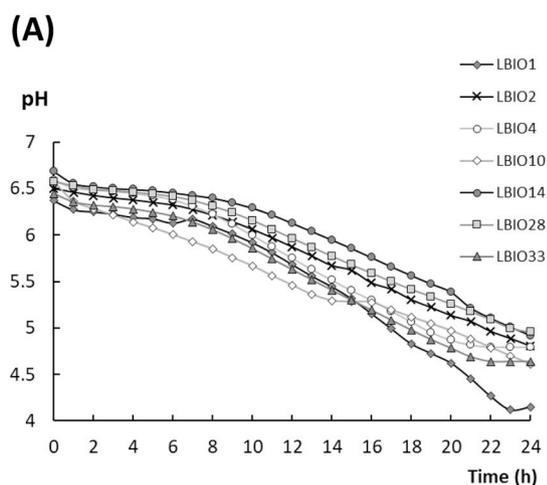


Fig. 1. Acidification of SMC (11% skim milk supplemented with 1% pancreatic casein hydrolysate) by six “ropy” EPS-producing *Lactobacillus plantarum* strains and one non-ropy strain, selected according to their different (animal and geographical location, see Table 2) origin, incubated at 30 °C for 24 h (A). Correspondence analysis (conceptually similar to principal component analysis) of the qualitative data from Table 2 showing three clusters of strains (B).

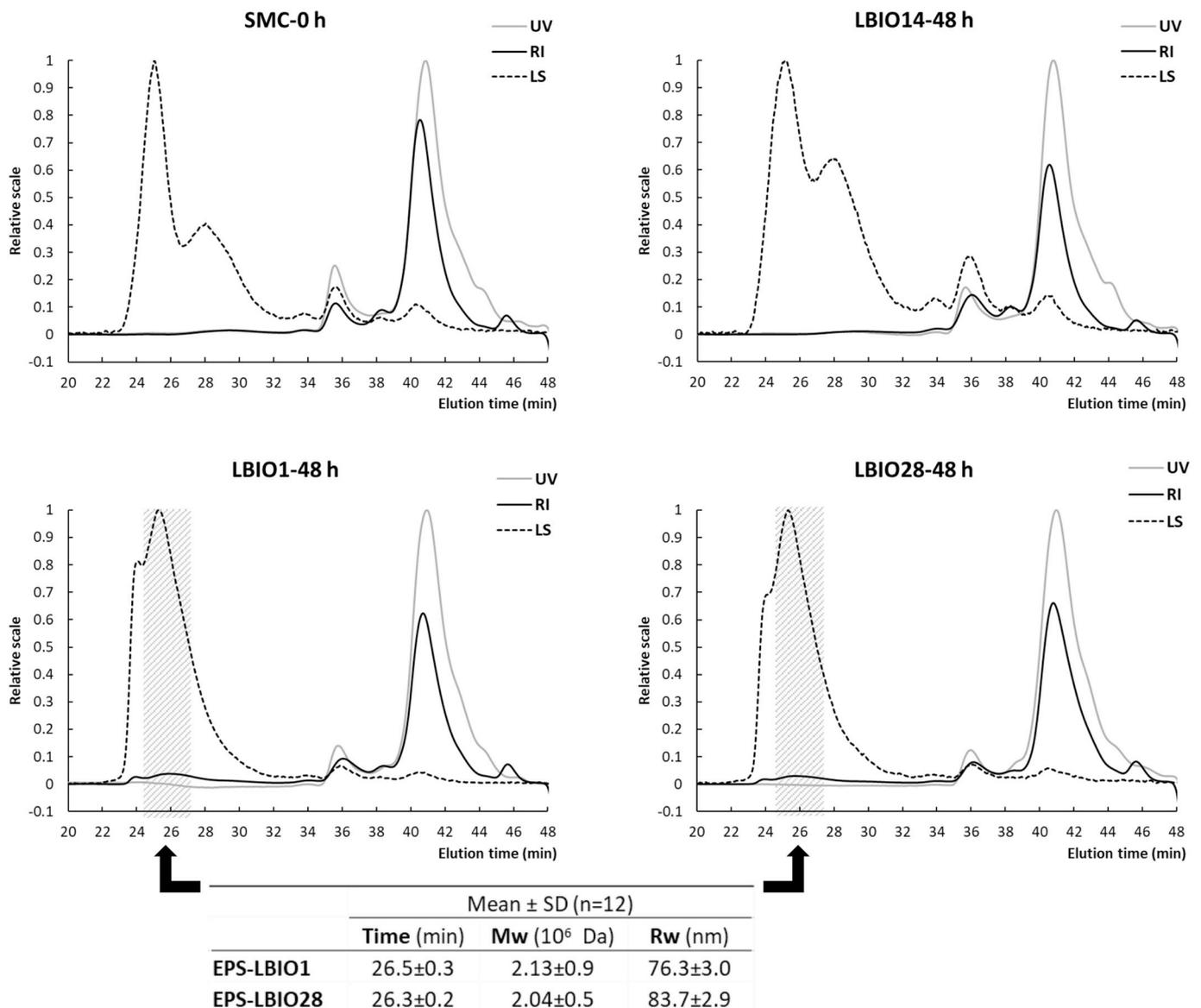


Fig. 3. Representative chromatograms of SEC-MALLS (size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering detection) analysis of the lyophilised powder obtained from SMC (11% skim milk supplemented with 1% pancreatic casein hydrolysate) after 48 h fermentation at 30 °C by the “ropy” EPS-producing *Lactobacillus plantarum* LBIO1 and LBIO28 strains and by the non-ropy strain LBIO14; the chromatogram of the lyophilised powder obtained from the unfermented SMC is also shown. A peak of high molar mass (detector LS-90 °C of the MALLS) giving also signal in the refraction index (RI) detector, but no in the photodiode array (PDA) detector in the ultraviolet way length (UV, 280 nm), was detected in samples from the ropy strains LBIO1 and LBIO28 but was absent in the samples from strain LBIO14 or SMC; thus we consider that this peak corresponds with the EPS fraction. The table shows the means and standard deviation (n = 12) of the elution time, molar mass and radius of gyration of the EPS fraction corresponding with 4 sampling points (14, 20, 24 and 48 h) of the three independent replicates of SMC fermentations carried out with the two “ropy” EPS-producing strains; the data were analysed together since no statistical variations for these parameters were detected along the fermentation time (see [supplementary Table S1](#)).

fermentations, using the strain LBIO14 as a negative control.

3.2. Characterization of milks fermented with selected EPS-producing strains

New batch fermentations were carried out with monocultures of the three strains increasing the inoculum rate by 5% following incubation for 48 h ([supplementary Fig. S3](#) and [Table S1](#)). The final pH after 48 h decreased to below 4.0 and the number of bacteria reached the maximum value for all strains around 36 h, slightly declining afterwards. The ropy LBIO28 showed (from 20 to 48 h, $p < 0.05$) pH values lower than LBIO1 and LBIO14, whereas there were no statistical differences in the counts among the three strains ($p \geq 0.05$). Finally, the three strains produced lactic acid as a major organic acid during milk fermentation

([Table 3](#)), thus showing homolactic fermentation corresponding with this facultative heterofermentative lactobacilli ([Kleerebezem et al., 2003](#)).

Regarding EPS production, the EPS-crude (lyophilized powder) yield obtained for strain LBIO14 was always lower ($p < 0.05$) than that of LBIO1 and LBIO28 and remained constant during the fermentation period, suggesting that EPS was not synthesised in appreciable amounts by this strain in SMC ([Fig. 2](#), statistical analysis in [supplementary Table S1](#)). The weight of lyophilised powder increased with the fermentation time for the two ropy strains, and the highest production was obtained for LBIO28 at all sampling points. On the contrary, the amount of protein present in the lyophilised powder remained, in general, constant during the fermentations made with the three strains, suggesting that this protein comes from milk and it was

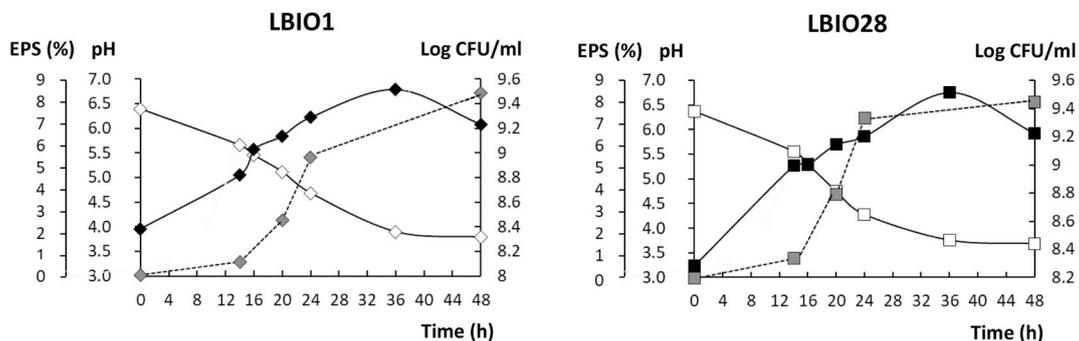


Fig. 4. Kinetics of EPS production (grey symbols), counts (black symbols) and pH evolution (white symbols) of two “ropy” EPS-producing *Lactobacillus plantarum* (LBIO1 and LBIO28) strains growing in SMC (11% skim milk supplemented with 1% pancreatic casein hydrolysate) at 30 °C for 48 h. The EPS production was calculated using the data of SEC-MALLS analysis and the % of EPS (% of relative abundance showed in Table S1) corresponds with the amount (μg) of the EPS-peak respect the total peaks (μg) present in the sample (see Fig. 3). The statistical differences (ANOVA and SNK mean test) among the three strains are showed in supplementary Table S1.

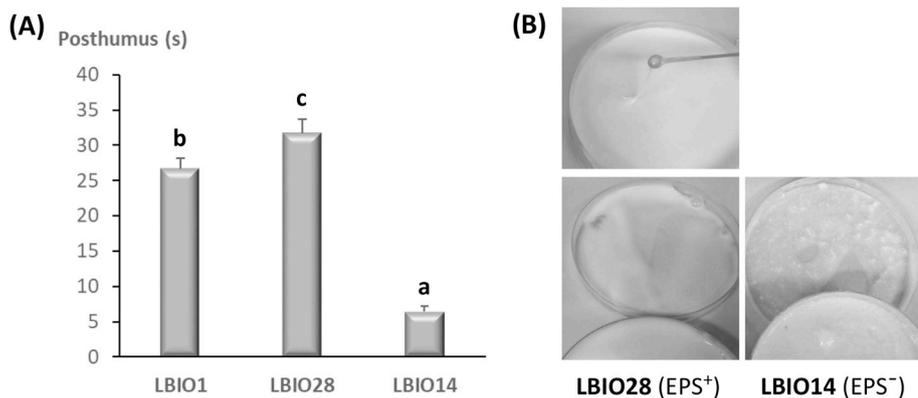


Fig. 5. Apparent viscosity, determined by Posthumus method, of the stirred fermented SMC (11% skim milk supplemented with 1% pancreatic casein hydrolysate) at 30 °C for 24 h by the “ropy” EPS-producing *Lactobacillus plantarum* LBIO1 and LBIO28 strains and by the non-ropy strain LBIO14 (A). Ropy filament (up, photography on the left) and smooth/glistening appearance (bottom, photography on the left) of the SMC fermented by LBIO28 and granular/lumpy appearance (bottom, photography on the right) of the SMC fermented by LBIO14 (B).

co-precipitated with the EPS. Some authors have used the weight of the lyophilized powder as a rough indication of the EPS yield, but the presence of other non-EPS molecules don't make this parameter very accurate (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005). Therefore, in order to detect and quantify the carbohydrate polymer in this lyophilized powder a SEC-MALLS analysis was performed. The chromatogram profile of the unfermented (0 h) SMC and LBIO14-fermented milk (after 48 h) was very similar (Fig. 3), which corresponded with the absence of yield-increase in the last sample (shown in Fig. 2), supporting the lack of EPS production. On the contrary, the RI detector indicates the presence of a high molar mass peak (shadow bar) in the EPS-crude obtained from milks fermented with LBIO1 and LBIO28, which does not give a signal in the PDA detector (set at 280 nm for protein detection), allowing us to identify this peak as the EPS present in the lyophilised powder (Fig. 3). The elution time of this peak was similar at the 4 sampling points (14, 20, 24 and 48 h), collected in three replicated fermentations carried out with each strain; this indicates that the molar mass of the EPS remained constant during fermentation. Then, the average molar mass (M_w) and the average radius of gyration (R_w), given by the MALLS detector, were calculated from data obtained in the twelve samples analysed for each strain. The EPS synthesised for strains LBIO1 and LBIO28 had similar molar masses (around 2×10^6 Da) and radius of gyration (around 80 nm) (Fig. 3). These values correspond with high molar mass polymers reported in literature for EPS synthesised by lactobacilli (Burns et al., 2011; Miao et al., 2015) including also *L. plantarum* (Das & Goyal, 2014). However, polymers with a smaller molar mass have been described as well for this species (Gangoiti et al., 2017; Wang, Zhao, Tian, Yang, & Yang, 2015) and other species (Shao et al., 2015). So, we cannot discard the presence of a second fraction of smaller molar mass in the three strains under study (between 10^4 - 10^5 Da, corresponding with an elution time 34–38 min

observed with dextran standards of these molar masses). However, the high signal obtained with the PDA detector at this elution range indicates the presence of protein in the same peak (Fig. 3), thus not allowing us to obtain a conclusive result about the presence of a smaller molar mass EPS-fraction. In this regard, there has also been reported the presence of more than one EPS-fraction differing in their molar masses in the polymer produced by a given lactobacilli strain (Hamet et al., 2015; Salazar et al., 2009; Tallon, Bressollier, & Urdaci, 2003).

Once the EPS peak was identified, the area of the peak obtained with the RI detector was used to quantify the amount [% relative abundance = 100 (μg of the EPS-peak/ μg the total peaks)] of EPS produced by LBIO1 and LBIO28 during the fermentation period (Salazar et al., 2009). These data were used to analyse the kinetic of EPS production showing that EPS synthesis was coupled with growth in both strains (Fig. 4, supplementary Table S1) and both reached a similar amount of EPS (12.8 ± 2.00 and 11.8 ± 2.01 μg for LBIO1 and LBIO28) after 48 h of fermentation. It has been reported that EPS synthesised by LAB are primary metabolites (Abid et al., 2018), but this characteristic is dependent on the strain and on the optimal or sub-optimal growth conditions (Vera Pingitore, Pessione, Fontana, Mazzoli, & Pessione, 2016), as well as on the composition of the medium, the growth conditions and the genetics of the producing strain (Moizzi et al., 2006). Regarding EPS synthesised by *L. plantarum*, variable yields have been reported, for example, *L. plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk produced 426 mg/L EPS in MRS after 24 h (Jiang et al., 2016); *L. plantarum* KF5 isolated from Tibet kefir produced 95.68 mg/L under optimized conditions in a whey-based medium (Wang et al., 2010); or *L. plantarum* NTMI05 and NTMI20 isolated from milk synthesised 197 mg/L and 187 mg/L, respectively, in MRS (Imran et al., 2016). It is worth mentioning again that, behind the fermentation conditions, the method used for isolation and quantification of EPS also

has a strong influence on polymer yield, which makes comparing the strains reported in literature difficult (Notarigo et al., 2013; Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005).

The accumulation of EPS in a dairy product is pivotal for the improvement of viscosity and texture, although other characteristics of the polymer also count (Ruas-Madiedo et al., 2002a). The moment of EPS production in relation to the gelation point (at 30 °C the micelles of casein initiate the aggregation at about pH 5.2) is also relevant for the interaction of the EPS with the casein network and for the final structure of the dairy product (Ruas-Madiedo & Zoon, 2003). The strain LBIO28 started the production of EPS earlier than LBIO1 (supplementary Table S1); at the gelation point (after 20 h fermentation, corresponding with middle-exponential phase) the amount of polymer accumulated in milks fermented with LBIO28 was 43.6%, slightly higher than the 32.3% produced by LBIO1 (Fig. 4). This fact could affect the final rheological and structural properties of the fermented products. Indeed, the apparent viscosity determined by the Posthumus funnel method of milks fermented with both ropy strains was significantly different ($p < 0.05$) and strongly differed from that obtained with the non-ropy LBIO14 strain (Fig. 5A). Similarly, this last strain produced a lumpy, non-homogeneous fermented milk, whereas the milk fermented with the LBIO28 strain presented a smooth and homogeneous structure (Fig. 5B). Differences in Posthumus viscosity among milks fermented with ropy and non-ropy EPS producing strains have been previously reported (Ruas-Madiedo, Tuinier, Kanning, & Zoon, 2002b). Additionally, differences in the apparent viscosity of EPS in aqueous solution, tested at the same concentration, but having different physicochemical characteristics, were reported to have a strong influence on the viscosity and texture formation of the final fermented dairy product (De Vuyst et al., 2003).

In conclusion, a rational selection procedure was followed to identify novel LAB strains, obtained from natural sources, suitable for application in the manufacturing of dairy products as adjunct cultures, due to their capability to synthesise EPS with appropriate technological aptitude. The strains *L. plantarum* LBIO1 and LBIO28 were able to produce polymers in skimmed milk, supplemented with an available nitrogen source, conferring optimal viscosity and texture to the fermented product. Although the amount, molar mass and radius of gyration of EPS produced by both strains was rather similar, the strain LBIO28 was able to significantly increase the apparent viscosity of the fermented milk to a greater extent than LBIO1. This could be related with the differences in the kinetic of EPS production and the amount of EPS accumulated around the gelation point detected between both strains. Therefore, these strains could have a range of different applications depending on the physical characteristics demanded for the final fermented product which, of course, must be always accepted by the end consumer after the corresponding sensorial evaluation.

Acknowledgements

This work was financed by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and FEDER European Union funds through the project AGL2015-64901-R. N. Bachtarzi thanks the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for the predoctoral fellowship that allowed her short stay at IPLA-CSIC in Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.005>.

References

Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzett, R., Corsaro, M. M., et al. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108,

- 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155>.
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Hamed, F., & Shaker, R. (2018). Rheological, textural, microstructural and sensory impact of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie - Food Science and Technology*, 87, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.023>.
- Bendimerad, N., Kihal, M., & Berthier, F. (2012). Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostoc and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Science & Technology*, 92, 249–264. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0063-8>.
- Briggiler-Marcó, M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., & Hynes, E. (2007). Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: In vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal of Dairy Science*, 90, 4532–4542. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0180>.
- Burns, P., Vinderola, G., Reinheimer, J., Cuesta, I., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2011). Technological characterization and survival of the exopolysaccharide-producing strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193 and its bile-resistant derivative 193+ in simulated gastric and intestinal juices. *Journal of Dairy Research*, 78, 357–364. <https://doi.org/10.1017/S0022029911000355>.
- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2018). Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>.
- Das, D., & Goyal, A. (2014). Characterization and biocompatibility of glucan: A safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 683–690. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6305>.
- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adrianya, T., Marshall, V., Degeest, B., et al. (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, 13, 707–717. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00105-5).
- Douillard, F. P., & de Vos, W. M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: From food to health. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8>.
- Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759–768. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00119-4).
- Gangoiti, M. V., Puertas, A. I., Hamet, M. F., Peruzzo, P. J., Llamas, M. G., Medrano, M., et al. (2017). *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydrate Polymers*, 170, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.053>.
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A., & Abraham, A. G. (2015). Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie - Food Science and Technology*, 63, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.097>.
- Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., et al. (2016). Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *BioMed Research International*, 2016, 7945675. <https://doi.org/10.1155/2016/7945675>.
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., et al. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007>.
- Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., Shah, N. P., Wei, H., et al. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPLO4 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science*, 99, 1736–1746. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10434>.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1990–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>.
- Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadajo, M. E., Ross, R. P., et al. (2017). Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural bio-functional health-promoting dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, 8, 846. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00846>.
- Mechai, A., Debabza, M., & Kirane, D. (2014). Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*, 21, 2451–2457.
- Medjoudj, H., Aouar, L., Zidoune, M. N., & Hayaloglu, A. A. (2018). Proteolysis, microbiology, volatiles and sensory evaluation of Algerian traditional cheese Bouhezza made using goat's raw milk. *International Journal of Food Properties*, 20, S3246–S3265. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1375515>.
- Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.002>.
- Miao, M., Ma, Y., Huang, C., Jiang, B., Cui, S. W., & Zhang, T. (2015). Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from *Lactobacillus reuteri* SK24.003. *Carbohydrate Polymers*, 131, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.066>.
- Motato, K. E., Milani, C., Ventura, M., Elena, F., Ruas-madiedo, P., & Delgado, S. (2017). Bacterial diversity of the Colombian fermented milk “ Suero Coste n assessed by culturing and high-throughput sequencing and DGGE analysis of 16S rRNA gene amplicons. *Food Microbiology*, 68, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.011>.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van der Meulen, R., Foulquié-Moreno, M. R., Font de Valdez, G., et al. (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*,

- 72, 4431–4435. <https://doi.org/10.1128/AEM.02780-05>.
- Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M. A., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M. T., et al. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 93, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.016>.
- Ribeiro, S. C., Stanton, C., Yang, B., Ross, R. P., & Silva, C. G. (2018). Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 90, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.065>.
- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, G. C. (2005). Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88, 843–856. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8).
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002a). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1).
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M., & Zoon, P. (2002b). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, 12, 689–695. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00161-3).
- Ruas-Madiedo, P., & Zoon, P. (2003). Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213, 245–253.
- Russo, P., de Chiara, M. L. V., Capozzi, V., Arena, M. P., Amodio, M. L., Rascón, A., et al. (2016). *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 68, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.040>.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de los Reyes-Gavilán, C. G., et al. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 4158–4168. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2126>.
- Shao, L., Wu, Z., Tian, F., Zhang, H., Liu, Z., Chen, W., et al. (2015). Molecular characteristics of an exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KF5 in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1429–1434. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.015>.
- Tallon, R., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>.
- Teil, H. (1975). Correspondence factor analysis: An outline of its method. *Mathematical Geology*, 7, 3–12. <https://doi.org/10.1007/BF02080630>.
- Vera Pingitore, E., Pessione, A., Fontana, C., Mazzoli, R., & Pessione, E. (2016). Comparative proteomic analyses for elucidating metabolic changes during EPS production under different fermentation temperatures by *Lactobacillus plantarum* Q823. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.010>.
- Wang, J., Fang, X., Wu, T., Min, W., & Yang, Z. (2018). Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in Cheddar cheese production. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 97, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.011>.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82, 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.013>.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.003>.
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., et al. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>.



Article

Selection of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus Plantarum* (*Lactiplantibacillus Plantarum*) Isolated from Algerian Fermented Foods for the Manufacture of Skim-Milk Fermented Products

Nadia Bachtarzi ^{1,2}, Immacolata Speciale ³, Karima Kharroub ², Cristina De Castro ⁴, Lorena Ruiz ^{1,5} and Patricia Ruas-Madiedo ^{1,5,*}

¹ Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain; bachtarzi.nadia@gmail.com (N.B.); lorena.ruiz@ipla.csic.es (L.R.)

² Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Constantine 25017, Algeria; k_inata@yahoo.fr

³ Department of Sciences, University of Naples Federico II, 80126 Napoli, Italy; immacolata.speciale@unina.it

⁴ Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, 80055 Portici, Italy; decastro@unina.it

⁵ Group Functionality and Ecology of Beneficial Microbes, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Asturias, Spain

* Correspondence: ruas-madiedo@ipla.csic.es

Received: 25 June 2020; Accepted: 21 July 2020; Published: 23 July 2020

Abstract: The exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus plantarum* (renamed as *Lactiplantibacillus plantarum*) LBIO1, LBIO14 and LBIO28 strains, isolated from fermented dairy products typical from Algeria, were characterized to evaluate the impact of the polymers in milk fermentations. Their genomes revealed the presence of two complete *eps* clusters of the four described for the reference strain WCFS1. Besides, the three strains presented identical sequences of *eps3* and *eps4* clusters, but LBIO1 and LBIO28 harbour three genes belonging to *eps2* which are absent in the LBIO14 genome. The EPS purified from fermented skim-milks manufactured with the strains showed identical nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and size exclusion chromatography coupled with a multiangle laser light scattering detector (SEC-MALLS) profiles for polymers LBIO1 and LBIO28, whereas LBIO14 EPS was different due to the lack of the high-molecular weight (HMW)-EPS and the absence of specific monosaccharide's peaks in the anomeric region of its proton NMR spectrum. The presence of the HMW-EPS correlated with optimal sensorial-physical characteristics of the fermented skim-milks (ropy phenotype). Their microstructures, studied by confocal scanning laser microscopy (CSLM), also showed differences in the organization of the casein-network and the distribution of the bacteria inside this matrix. Therefore, the strain LBIO1 can be proposed for the manufacture of dairy products that require high whey retention capability, whereas LBIO28 could be applied to increase the viscosity.

Keywords: exopolysaccharide; dairy fermented product; lactic acid bacteria; permeability; viscosity; microstructure

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are a key group of microorganisms playing a pivotal role in food fermentation, being responsible for the quality, safety and nutritional value of the final product [1]. Rural communities have maintained in their heritage traditional uses for food preservation, which has driven to the “domestication” and the selection of strains very well adapted to a specific food environment. However, this practice conducted to a microbial biodiversity loss [2]. Therefore, exploring novel strategies to improve the performance of LAB for industrial application is the focus of research [3], although the natural reservoirs of novel bacteria must be also taken into account for the selection of strains targeted for a potential biotechnological exploitation such as food cultures. Indeed, many LAB have been isolated from traditional fermented products worldwide, including dairy foods [4,5].

The selection of the most suitable LAB for dairy manufacturing involves the search for a series of functional characteristics, among others, the synthesis of exopolysaccharides (EPSs) [6–8]. EPSs produced in situ, during milk fermentations, play a pivotal role in the improvement of the sensorial properties of the final product. In fact, they can act as natural bio-thickeners and are efficient viscosifying agents, thus improving the viscosity and texture of low-fat stirred yogurts. Besides, due to their hydrocolloid properties they are effective at retaining water avoiding syneresis in set-type yogurts or increasing the cheese yield [6–8]. In addition, these polymers have also attracted interest because they are key molecules linked in the interaction of specific bacteria with the host, thus triggering some of the health benefits induced by the EPS-producing strains [9,10]. Both technological and functional effects on health promotion are due to the extracellular location of EPSs, since they are surface molecules of carbohydrate nature that can be loosely attached to the cell envelope forming a slimy layer, or covalently linked forming a capsule (CPS). In the context of dairy foods, the interaction of the EPS-bacterial layer with the milk matrix, mainly caseins, has a profound impact on the physical-chemical characteristics of the products fermented with EPS-producing LAB [8]. Depending on the chemical composition and the way of synthesis, two main EPS groups, homopolysaccharides and heteropolysaccharides, are distinguishable. The homopolysaccharides are polymerized by means of glycosyl hydrolases (GH) of families GH68 (fructansucrases) and GH70 (glucansucrases) which render β -fructans and α -glucans, respectively [11]. β -linked glucans are intracellularly synthesized by means of a glucosyltransferase which has several membrane segments that facilitate the homopolymer export [12]. The heteropolysaccharides are built from repeating units of monosaccharides (mainly, D-glucose, D-galactose and L-rhamnose) that can be decorated with other sugar and non-sugar monomers. Their synthesis requires clusters of *eps* (or *cps*) genes which, in the case of LAB-EPSs, have a conserved structural organization [9,13]. The chemical composition, size and structure of the EPS molecules are directly linked with their biological functions and technological properties. Generalizing, polymers having negative charge and/or high molecular weight (HMW) are able to modify the viscosity and texture of dairy products [14], or to modulate the immune response in the host [9]. In this regard, the production of a HMW-EPS has been associated with the occurrence of a ropy phenotype in the producing bacterium [15]. This phenotype is denoted by the formation of a long filament when the bacterial colony growing in the surface of an agar-plate is touched with an inoculation loop or, similarly, when a liquid culture is poured forming a strand that remains for some time. The ropy strains are linked to the manufacture of fermented milks with optimal sensorial characteristics, which is dependent on the degree of ropiness desired in the final product [16].

In a previous work, a collection of EPS-producing *Lactobacillus plantarum* (recently reclassified as *Lactiplantibacillus plantarum*, [17]) strains were isolated from traditional Algerian dairy products, identified and preliminarily characterized [18]. In the current work, three of these strains were further studied in order to find their potential application in controlled milk fermentations. To this end, the in silico analysis of their genomes, together with the characterization of the purified EPSs, gave us some clues to understand the physical properties measured in fermented skim-milks manufactured with these strains.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial Strains

The strains *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 and LBIO28 were isolated from traditional Algerian dairy foods and were selected for this study based on theirropy character, present in LBIO1 and LBIO28 and absent in LBIO14 [18]. In order to obtain standardized cultures, stocks stored at -80 °C were streaked on the surface of agar-MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and incubated under aerobic conditions (at 30 °C for 48 h). Afterwards, a single colony was picked up to inoculate 10 mL MRS broth, which was cultivated overnight and used to inoculate (2%) appropriate volumes of fresh MRS that were further incubated for 22 ± 2 h under the same conditions before using them for the different experimental procedures.

For cryo-scanning electron microscopy (SEM), standardized cultures were centrifuged ($7,780 \times g$, 10 min) and 10 times concentrated in Ringer $\frac{1}{4}$ solution (Merck, Darmstadt, Germany). Finally, these bacterial suspensions were quickly frozen by immersion in liquid N₂ and sent into dry-ice for microscopic analysis. These bacterial suspensions were visualized by cryo-SEM at the “Electron Microscopy Service” of the Institute of Marine Sciences (ICM-SCIS, Barcelona, Spain). Samples were placed on a cryo-stub, immediately plunged into liquid nitrogen and transferred to the cryo-preparation chamber Quorum PP3000T (Quorum Technologies, Sussex, UK), attached to the microscope. The frozen samples were fractured, sublimed at -90 °C for 5 min, sputter coated with Pt for 30 s and transferred to the Hitachi S-3500N (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) SEM. Observation of samples, kept at -135 °C, was made at an acceleration voltage of 4 kV.

2.2. Genome Analysis

For genome sequencing analysis, total DNA was isolated from overnight grown cultures prepared as previously described. Then cells from 5 mL of each culture were collected by centrifugation ($12,070 \times g$, 4 °C, 10 min) and DNA was isolated by using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genome sequencing was performed using 250–290 paired-end libraries in a MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) at GenProbio SRL (Parma, Italy). Genome assemblies were conducted with the PATRIC 3.5.23 online resource (<https://www.patricbrc.org/app/Assembly>, accessed on June 2019) [19] by using the SPAdes assembler (v. 3.10.0) [20]. Automatic annotation of the open reading frames (ORF) were conducted with RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) [21] and the NCBI (National Center for Biotechnology Information) Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [22]. Deduced nucleotide and protein sequences of interest within the assembled and annotated genomes were individually located through BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool Protein homology searches employing, as query, the corresponding protein sequences from the clusters *cps1*, *cps2*, *cps3* and *cps4* annotated in the reference genome *L. plantarum* WCFS1 [23]. Similar approach was used to search for genes of GH68 and GH70 enzymes described from lactobacilli sequences in the NCIB gene database. Besides, carbohydrate metabolic enzymes of the genomes were also annotated through the dbcan tool [24] and comparison against the CAZyme database (<http://www.cazy.org> accessed on March 2020). RAST annotation was surveyed to search for vitamins biosynthetic pathways. Bacteriocin encoding clusters were screened for with the BAGEL4 web tool [25]. Antibiotic resistance determinants were predicted through homology searches against CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (<http://arpcard.mcmaster.ca/> accessed on March 2020) [26] and the RESfinder online tool was used to predict acquired antimicrobial resistance genes or point mutations likely conferring antibiotic resistances [27]. To identify plasmid-associated sequences, raw sequencing reads were analyzed using PLACNETw, a graph-based tool to reconstruct plasmids from next generation sequence pair-end datasets, via the creation of a network of contig interactions [28]. Genomic assembled data were submitted to the GenBank database, under the accession numbers SAMN14671341, SAMN14671394 and SAMN14671401.

2.3. Milk Fermentations

Skimmed milk (Difco, Thermo-Fisher Scientific, Madrid, Spain) was reconstituted (11% *w/v*) and supplemented with 1% (*w/w*) pancreatic casein hydrolysate (Sigma, St. Louis, MO, USA) to obtain SMC (skimmed milk-casein) which was pasteurized as previously described [18]. Variable volumes of pasteurized SMC were inoculated (5%) with the standardized MRS cultures previously washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Fermentations were carried out in a thermostatic bath (Julabo TW20 GmbH, Seelbach, Germany) at 30 °C for variable times, as specified in each section.

2.4. Exopolysaccharide (EPS) Purification and Analysis

The EPSs of milks fermented for 48 h were isolated following a procedure previously reported [29]. In a first step, 100 g of fermented milk were mixed with trichloroacetic acid (TCA, 12% final concentration), vigorously stirred for 45 min at room temperature and centrifuged (15,880× *g*, 4 °C, 30 min). The pH of the supernatant was raised to 5.0±0.5 and dialyzed, for 3 days against ultrapure water (dialysis tubes 12–14 kDa MWCO, Sigma, St. Louis, MO, USA), before being freeze-dried. In a second step, 5 mg/mL of the EPS lyophilised powder was dissolved in a buffer containing DNase type I (2.5 µg/mL final concentration, Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C for 6 h. Later, pronase E from *Streptomyces griseus* (50 µg/mL final concentration, Sigma, St. Louis, MO, USA) was added and the mixture incubated at 37 °C for 18 h. Finally, the same first procedure (starting from the TCA peptide precipitation) was followed to get the purified EPS fraction. The protein content of this fraction was determined by the BCA protein assay protocol (Pierce, Rockford, IL, USA).

The molar mass distribution of the EPS was analysed by size exclusion chromatography (SEC) coupled with a multiangle laser light scattering detector (MALLS; Dawn Heleos II, Wyatt Europe GmbH, Dembach, Germany) as previously described [18]. In short, samples dissolved at 5 mg/mL in 0.1 M NaNO₃ were separated in two TSK-Gel columns (G3000 PWXL + G5000 PWXL), protected with TSK-Gel guard column (Supelco-Sigma, St. Louis, MO, USA), at 40 °C and 0.45 mL/min flow rate. In addition to MALLS detector for average molecular weight (M_w) and radius of gyration (R_g) determination, a PDA (photodiode array) 996 detector (set at 280 nm) and a RI (refractive index) 2414 detector (Waters, Milford, MA, USA) were used to check the presence of proteins and to quantify the amount (µg) of EPS-peaks (using dextran standards for calibration), respectively. The relative abundance of each peak was calculated with respect to the total sum of the peaks.

Proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker DRX-600 MHz spectrometer (Bruker, Mannheim, Germany) equipped with a cryogenic probe at 298 K. Samples (2–3 mg) were solved in D₂O (500 µL), spectra were acquired with 16 scans each, 16 K points in resolution, and calibrated on the signal of the residual water signal, set at 4.7 ppm. Standard Bruker Topspin (Topspin 3.5, Bruker) program was used to process the data.

The chemical composition of the polymers was determined analysing the acetylated methyl glycosides (AMG) by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) obtained as follows. To favour EPS dephosphorylation, samples (0.5 mg) were dissolved in 50 µL of 50% aqueous hydrofluoric acid (HF), for 6 h at 25 °C. Then, they were dried in a stream of air and washed with water and methanol, before carrying out their derivatization as peracetylated O-methyl glycosides [30]. Derivatives were then analyzed on Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) gas chromatograph 7872A coupled with a mass selective detector 5977B and equipped with a Zebron ZB-5 capillary column (Phenomenex, Torrance, CA, USA, 30 m × 0.25 mm internal diameter × 0.25 µm, flow rate 1 mL/min, He as carrier gas). Electron impact mass spectra were recorded with an ionization energy of 70 eV and an ionizing current of 0.2 mA. The following temperature program was employed: 150 °C for 5 min, 150 to 280 °C at 3 °C/min, and 300 °C for 5 min.

2.5. Viscosity of Fermented Milks

The dynamic viscosity (η) of SMC fermented until pH 4.5 ± 0.1 (around 24 h) with three strains LBIO1, LBIO14 and LBIO28 was measured at 25 °C using a rheoviscosimeter Haake VT550 (Haake™

Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). For that, 10 g of fermented milks samples were carefully placed between the cone and plate (with angle 0.5°) and sheared at shear rate sweeps from 0.1 to 1000 s^{-1} in 180 s, under controlled temperature ($25\text{ }^\circ\text{C}$) by the Haake K115 bath connected to the viscometer. The collected data were analysed with the VT1.x0s 550 software (Haake). The flow behaviour of the SMC-fermented samples was described by the Ostwald-de Waele model (power law; equation $\tau = K\gamma^n$, where τ is the shear stress (Pa), K is the consistency index (Pa s^n), γ is the shear rate (s^{-1}), and n is the dimensionless flow behaviour index). SMC fermentations were carried out in triplicate for each strain to determine viscosity values.

2.6. Macrostructure of Fermented Milks

The permeability (B_i) of the fermented SMC gels, i.e., the measurement of the flux rate of the aqueous phase (whey) through the casein matrix (milk-gel) giving an indication of the porosity of the fermented milk, was determined as previously reported [31]. As a first step, 4 L (per strain) of fermented SMC (at $30\text{ }^\circ\text{C}$, for 24, to reach $\text{pH } 4.5 \pm 0.1$) were manufactured for obtaining the whey by means of centrifugation ($15,880\times g$, 30 min, $5\text{ }^\circ\text{C}$) and filtration through filter paper (Whatman filter paper for technical use, Grade 1574 $\frac{1}{2}$, Sigma, St. Louis, MO, USA). The kinematic viscosity (ν) of the whey was measured at $20\text{ }^\circ\text{C}$ in a capillary Ubbelodhe type 0C (SI Analytics GmbH, Mainz, Germany). In addition, 1 L (per strain) of pasteurised SMC was inoculated (5%) with strains LBIO1, LBIO14 or LBIO28 and 12 graduated glass-tubes (25 cm length, graduation mark 1 mm, internal diameter 4 mm; Pobel, Barcelona, Spain) open in both ends, were carefully introduced into the inoculated milk. The flasks, with tubes (filled with about 11 cm inoculated milk) inside, were incubated at $30\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. Afterwards, gel-tubes were cleaned and placed in a rack, together with 3 empty reference-tubes, which was introduced in a transparent vat filled with the fermented whey corresponding to each strain. The permeability measurements were performed at $20\text{ }^\circ\text{C}$. With intervals of 1 h (along 8 h) the increase in the level of whey in each tube was annotated and the B_i for each tube was calculated using the corresponding formula [31,32]. Finally, the B_i of a given fermented milk was calculated from the average values measured in all tubes. This experimental procedure was carried out, at least, two times per strain measuring, at least, 8 tubes in each replicate.

To determine the capability of the fermented milk gels to retain the aqueous phase, the amount of whey released after applying differential centrifugal forces was quantified [31]. For that, 200 mL of pasteurized SMC were inoculated (5%) with the standardized (PBS-washed) cultures and divided in 4 tubes of 50 ml each, which were incubated in the water bath at $30\text{ }^\circ\text{C}$ until $\text{pH } 4.5 \pm 0.1$ (24 h). Fermentations were carried out in triplicate for each strain. Afterwards, the tubes were centrifuged at $4\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min at four different speeds ranging from 1430 to $15,880\times g$ in a fixed-angle conical tube rotor. The quantity of whey released, expressed as a percentage, was calculated by the ratio between the weight of whey recovered and the weight of the initial fermented milk sample.

2.7. Microstructure of Fermented Milks

The microscopic structure of milks fermented with the three strains was visualized using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and fluorescent dyes [16,31]. For that, the SMC was centrifuged ($10,160\times g$, 30 min, $5\text{ }^\circ\text{C}$) to remove most non-dissolved milk particles before pasteurization. Then, after pasteurization, two dyes were added: rhodamine B (Sigma, St. Louis, MO, USA) and acridine orange (Sigma) at final concentrations of 0.001% (w/v) and 0.002%, (w/v) respectively. Rhodamine B dyes proteins and acridine orange bacterial nucleic acids. After proper homogenisation, stained milk was inoculated (5%) with the PBS-washed MRS cultures and 2 mL were carefully placed into high-optical quality plastic 2-wells μ -slides (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) for direct CSLM analysis. The μ -slides were incubated at $30\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h (to a pH about 4.5) to ensure the formation of the milk-gel. The confocal microscope Ultra-Spectral Leica TCS AOBS SP2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) located in the University of Oviedo facilities (Oviedo, Asturias, Spain) was used. Bacteria dyed with acridine orange were visualized with the laser 488 nm ion argon/krypton (green), and proteins (mainly caseins) dyed with rhodamine B were visualized with the laser 543 nm He/Ne (red), but also with the laser 488 nm. Thus, after image treatment

with the program LCS (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), bacteria were visualized in green and the casein matrix in yellow (combination red and green). Z-stack images were obtained using a 63×/1.40NA oil objective (1.58 zoom) and the 3D reconstruction was performed using the Leica LCS and the Confocal Uniovi Image J software.

2.8. Statistical Analysis

The IBM-SPSS statistics for Window version 25.0 (IBM Corp., Armonk NY, USA) was used to analyse the quantitative data. One-way analysis of variance (ANOVA) and the SNK (Student–Newman–Keuls) mean comparison tests were used to assess the differences ($p < 0.05$) among the three strains used in this study.

3. Results and discussion

3.1. Insight into the Genomes of *L. Plantarum* Strains: Focus on *eps* Cluster Analysis

The *L. plantarum* strains used in this study had different origins, as they were isolated from different dairy fermented products manufactured from cow milk in different geographical areas. The strain LBIO1 was isolated from the soft-ripened cheese “Bouhezza” and LBIO14 from the fresh cheese “Klila” both in the region of Batna, whereas LBIO28 was obtained from the fermented milk “Rayeb” in the region of Bordj El Ghadir [5,18]. The strains were selected based on the presence (LBIO1 and LBIO28) or absence (LBIO14) of the ropy character [33]. Since the ropy character is directly linked to the synthesis of certain type of EPS, our first approach to characterize these strains was the visualization of the bacterial surface using cryo-SEM. This is one of the less destructive electron microscopy techniques that only involve freezing the sample in liquid N₂ and is thus, highly recommended to avoid changes on EPS structure induced by dehydration of samples [34]. Surprisingly, the three lactobacilli strains presented an EPS-like structure around their surface (Figure 1), but that of the ropy LBIO1 and LBIO28 strains was much more dense and compact than observed for the non-ropy LBIO14. This suggests that the last one produces less polymer and/or produces an EPS having different length (molecular weight), whereas the ropy strains produced a slimy polymer able to establish a compact network entrapping and connecting inside several cells. As far as we could find, there are no reports in literature regarding visualization of EPS-producing LAB under cryo-SEM. Nevertheless, the structure observed for LBIO1 and LBIO28 EPSs resembles that found with the same technique for ropy EPS-producing bifidobacteria [10]. The use of SEM for the visualization of some EPS-producing lactobacilli, which involves different fixation steps prior to coating, gives similar homogeneous sheet-like structures [35]. However, more open-loose (porous) structures, such as the ones detected for LBIO14 EPS, were also reported [36]. In our study, the three EPS-producing lactobacilli were not submitted to dehydration, so the structure differences detected among the strains must be due to intrinsic differences of their polymers.

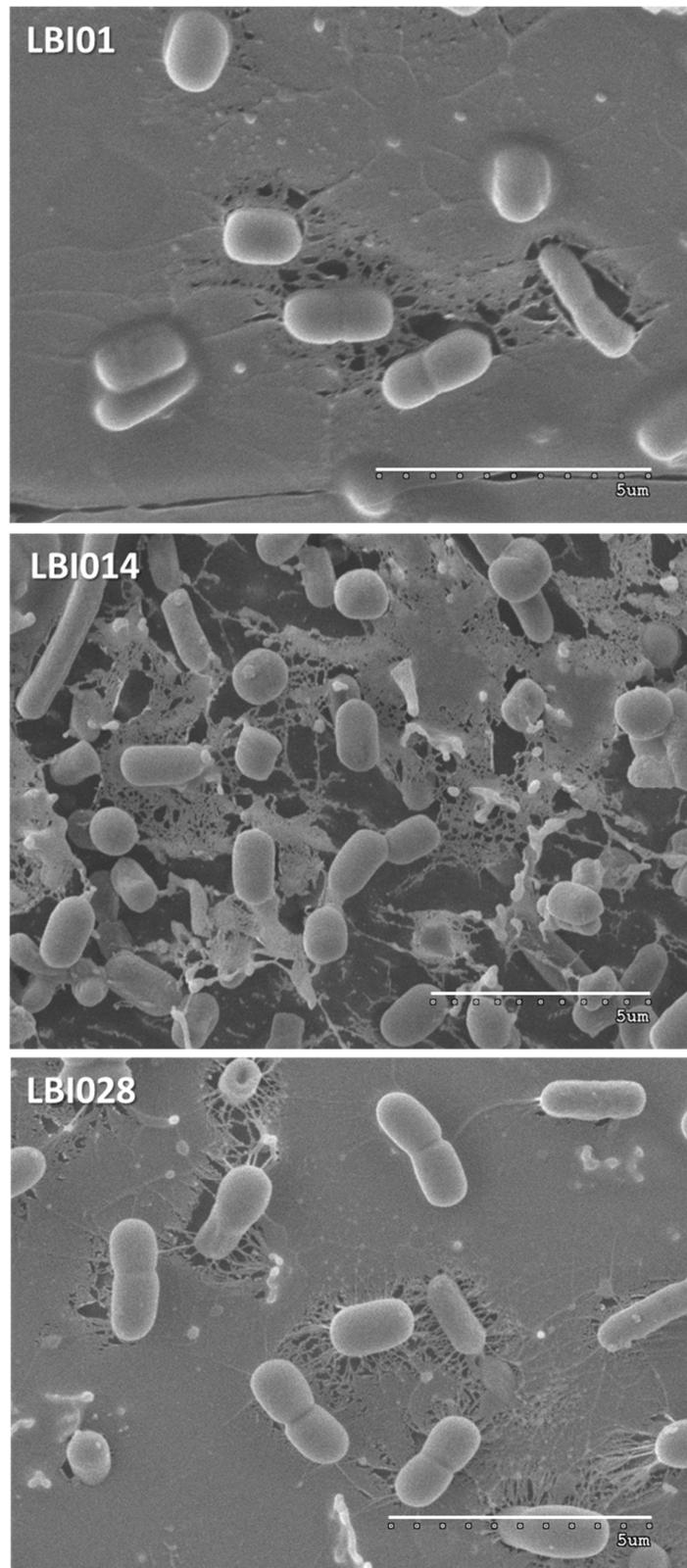


Figure 1. Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) of bacterial biomass collected from 24 h MRS broth cultures of the exopolysaccharide (EPS)-producing *L. plantarum* strains LBI01, LBI014 and LBI028. The EPSs are the matrix surrounding the bacterial surface. Bar 5 µm.

In a further bacterial characterization, the genetic fingerprinting obtained by RAPD-PCR amplification showed that only the primer M13, a probe designed from the bacteriophage M13 of *Escherichia coli*, allowed the identification of distinctive band patterns among the three strains (see results and methodology details for this analysis in supplementary Figure S1), as previously reported for other LAB [37]. This likely suggests that the *L. plantarum* isolates under study represent different strains. In order to better characterize their genetic background, the genomes of LBIO1, LBIO14 and LBIO28 were sequenced and their sequences held in the NCIB GeneBank database (Table 1).

Table 1. Some features of the genomes from the *L. plantarum* strains used in this study. The LBIO1, LBIO14 and LBIO28 genome sequences are available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nih.gov/genbank>).

	Genome					
	Accession No.	Length (bp)	CDSs	%G + C	rRNA	tRNA
LBIO1 (Ropy)	SAMN14671341	3,186,843	3,113	44.32	9	66
LBIO14 (non-ropy)	SAMN14671394	3,155,118	3,072	44.44	10	68
LBIO28 (Ropy)	SAMN14671401	3,187,061	3,108	44.32	10	66

Overall, the three draft genomes were 3.19, 3.15 and 3.18 Mbp length, respectively, an average GC content ranging from 44.32 % (LBIO1 and LBIO28) to 44.44 % (LBIO14), and a total of 3113, 3072 and 3108 ORFs which could be predicted and annotated. These general values are in agreement with the available data for other reported *L. plantarum* genomes [38,39]. Some genome-encoded potential traits of these strains, that could provide additional functional (health promoting) or technological benefits for their application into the elaboration of fermented milks, were screened through RAST annotation and in silico homology searches. For instance, the genomes of the three strains included genes involved in the pathways for riboflavin, folate and pyridoxin biosynthesis, while the machinery required to synthesize other vitamins, such as thiamine and biotin, are incomplete, as previously described in other *L. plantarum* strains. Indeed, the vitamin-producing strains could help produce fortified fermented foods, aiding to prevent nutritional deficiencies in target populations [23,39]. On the other hand, a search against the BAGEL4 database identified putative bacteriocin encoding gene clusters in the three strains, trait that was previously reported for others and could have potential applications to extend the product shelf-life, conferring protection against spoilage and foodborne pathogens [40]. In relation to genetic encoded traits which may impede the technological exploitation of microbial strains, such as the presence of antibiotic resistance genes or virulence factors, it is worth remarking that no potential antibiotic resistance or virulence determinants were detected in any of the three genomes, accordingly with results from other strains of the same species [39].

In agreement with the aim of this work, the genome analysis of these strains was focused to the genes involved in the EPS-synthesis. None of the approaches applied to search for genes involved in the production of β -fructans and α -glucans revealed any significant hit, suggesting that the three genomes did not harbor genes coding for GH68 and GH70 enzymes. The production of these type of homopolysaccharides was demonstrated only for very few *L. plantarum* strains, such as the α -glucans synthesized by the strains DM5 [41] and CIDCA 8327 [42]. A closer look at the genetic determinants linked to the synthesis of heteropolymer-like EPSs revealed the presence of two complete *eps* clusters (*eps/cps3* and *cps4*), of the four described for the strain *L. plantarum* WCFS1 [43], in the three strains of this study (Figure 2, supplementary file 1). The *cps1* cluster was absent, whereas three (*cps2ABC*) out of the 10 genes belonging the WCFS1 *cps2A-J* cluster were detected only in the ropy LBIO1 and LBIO28 strains. The gene *cps2E* (in WCFS1) encoding a priming-glycosyltransferase (p-GTF) showed a very low degree of homology (40%, supplementary file 1), thus we consider that was not present in LBIO1 and LBIO28 clusters.

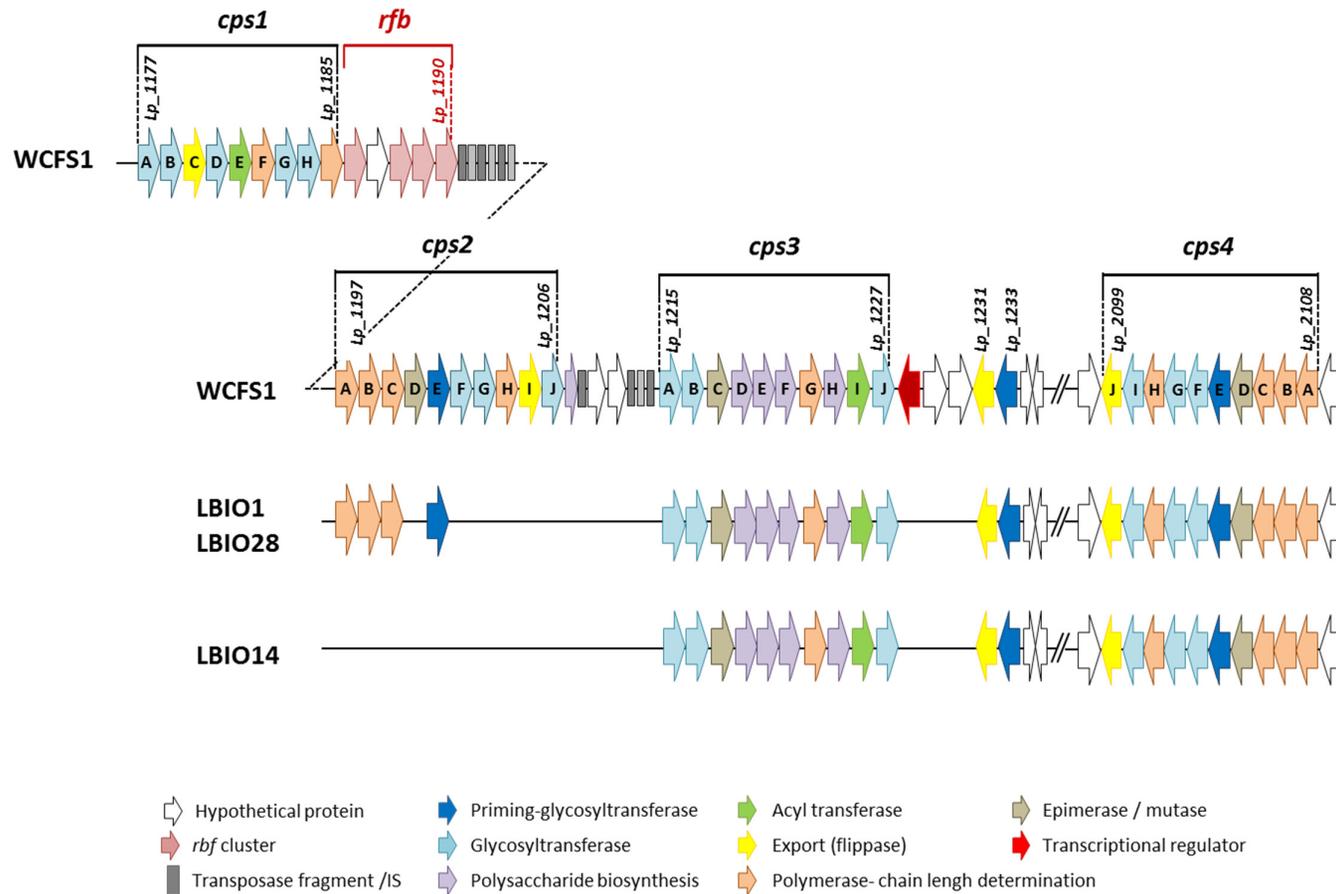


Figure 2. Physical maps of the biosynthetic *eps* clusters found in the genome (chromosome) of the strains *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 and LBIO28 in comparison with the reference strain WCFS1. The length of the arrow is not proportional to the length of the predicted open reading frame (ORF). For detailed description of the genes and percentages of homology, see supplementary file 1.

The absence of these three *cps2* genes in LBIO14 was the only difference found among the three Algerian origin lactobacilli, since the homology (% of genetic identity) of these genetic regions was 100% among them). Therefore, taking into account the pattern obtained from the comparison of 43 *L. plantarum* genomes [44], the LBIO1 and LBIO28 strains fit in the type B pattern (complete *eps/cps3* and *cps4* and partial *cps2*) whereas LBIO14 fit into type C pattern (two clusters, in this case *cps3* and *cps4*). Apparently, the *eps* clusters from our strains are not harboured in plasmids, as suggested using the in silico PLACNET search network analysis tool, which revealed that the *eps* genes are not included in contigs displaying homology to plasmid replication proteins. The homology of our *eps* genes in comparison with those of WCFS1 strain was, in general, higher than 94%. Only the GTF *cps3A* presented lower homologies, around 70%, in our strains (supplementary file 1). The *cps4* cluster seems to be present in all *L. plantarum* strains currently analyzed and is located in a chromosomal region separated from that containing the other three clusters, as is the case in our genomes. However, *cps1* seems to be present in only a few strains [44]. As previously described by Remus and co-workers in WCFS1 strain [43], *cps2A-J* and *cps4A-J* have the complete “consensus” functional structure required for the synthesis of EPS. That is, both harbour genetic elements involved in polymerization/ chain-length determination, a core of GTFs starting with the p-GTF, and genes related to polymerisation/(flippase-type) export, all flanked with mobile elements and keeping the same gene order and orientation within the *eps*-encoding clusters [9]. In general, the p-GTF initiates the intracellular synthesis of the EPS repeating units after being linked to a lipid membrane carrier. Latter the GTFs catalyzes the addition of different monosaccharides to form the repeat unit which is translocated across the membrane by means of a flippase-system. Finally, the polymerization of the repeating units takes place extracellularly by means of a polymerase, and other proteins are involved in the determination of the chain length of the polymer. The presence of transposases and insertion sequences flanking *eps* clusters is a common characteristic among bacteria, which would facilitate the horizontal transfer of *eps* genes among different bacteria that occupy a common habitat [9]. Genes involved in regulation seemed no to be present inside the *cps* loci coding for EPS biosynthesis in *L. plantarum* WFS1 [43], as is the case for other LAB [13,45]. The WCFS1 *cps1* and *cps3* clusters lack some key-genes for EPS production, such as the p-GTF that initiates the intracellular synthesis of the repeating units. However, these clusters were required for the synthesis of the capsular EPS in this strain, as it was demonstrated by the construction of several gene-deletion and cluster-deletion mutants [43]. The EPS produced by the mutant Δ *cps1A-J* genes has modified the molecular weight and lacks rhamnose, whereas mutations in the other three individual cluster deletions, or the quadruple-deletion, resulted in a reduction of the amount of polymer synthesised. Later, by means of transcriptional analysis it was found that the four *cps* loci of WCFS1 were organized in five operons, three of them under the control of the global regulator CcpA [46]. It is worth noting that *L. plantarum* WCFS1 does not have a ropy phenotype, which was present in the strains SF2A35B and Lp90 [47]. The genomic comparison among these strains revealed that Lp90 harbors the four *cps* clusters and SF2A35B lacks *cps1*, as is the case of the ropy LBIO1 and LBIO28 reported here. Moreover, *cps2* seemed to be the most variable among WCFS1, SF2A35B and Lp90 strains since additional (not orthologs) genes are present in the last two ropy-strains [47]. These authors conclude that the set of genes present in SF2A35B and Lp90 *cps2* is involved in the occurrence of the ropy phenotype since their deletion causes the loss of this character. In our case, the differences between the ropy LBIO1 and LBIO28 *L. plantarum* strains and the non-ropy LBIO14 were also located in *cps2*, which was not present in the last one. However, in our case LBIO1 and LBIO28 *cps2* had a reduced (not increased) number of genes with respect to WCFS1. Nevertheless, the three genes present in these strains are related with the polymerization and chain length regulation (see supplementary file 1). This finding suggests that the *cps2ABC* found in LBIO1 and LBIO28 might play a relevant role in the synthesis of the HMW-EPS responsible for the synthesis of a ropy polymer.

3.2. Characterization of EPS Purified from Fermented Milks

To determine whether differences among the three polymers could be detected in milk products fermented with either of the strains under study, the purified EPS fractions obtained from milks

fermented with the three *L. plantarum* strains were analysed by means of SEC-MALLS. The SEC profile shows the presence of three major peaks differing in size, showing average retention times about 27, 38 and 42 min. The ropy LBIO1 and LBIO28 EPSs presented the three peaks whereas the non-ropy LBIO14 lacks that corresponding with the biggest polymer fraction (Figure S2; [18]). It is worth noting that in the smallest peak (42 min) the ultraviolet (UV)-detector signal (set at 280 nm) was very intense in the three purified EPS, with denotes the presence of protein in all the polymer fractions. This was supported by the results obtained with the BCA-protein assay that showed a protein content of 31.8, 98.5 and 38.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for the EPS fractions purified from LBIO1, LBIO14 and LBIO28 fermented milks, respectively. Given that in this work an additional treatment with DNase and pronase E, followed by 12%-TCA precipitation, was performed for EPS purification, this suggests that proteins could be strongly linked to the surface structures extracted. In this regard, some authors have reported that proteins could form part of cell-wall polysaccharides [48], although other surface structures (such as teichoic acids) could have co-precipitated with the polysaccharides [49,50]. Nevertheless, most authors do not report checking the presence of proteins in the EPS they have characterized. In our EPS fractions, the peak 3 has an average molecular weight (M_w) of 4 to 9 kDa, depending on the strain, and it is the most abundant in the three EPS fractions (Table 2). Thus, we cannot discard the presence of a smaller EPS fraction in this peak [51,52]. As indicated above, the most noticeable finding in the SEC-MALLS analysis was the presence of the high M_w peak (about 1.2×10^6 Da) in LBIO1 and LBIO28 strains, with a relative abundance of 16% in both cases. The presence of this high-molecular weight (HMW) peak could explain the ropy character of these strains [15,53], whereas its absence could explain the non-ropy phenotype in the LBIO14 strain.

Table 2. Analysis of the average molecular weight (M_w) and radius of gyration (R_w) determined by size exclusion chromatography coupled with multiangle laser light scattering (SEC-MALL) of EPSs purified from skim-milks fermented for 48 h with the *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 or LBIO28 strains. The supplementary Figure S2 shows the SEC-MALLS (LS detector 90°) chromatograms.

Strain	Parameters	Mean \pm standard deviation (SD)		
		Peak 1	Peak 2	Peak 3
LBIO1 (Ropy)	Retention time (min)	26.83 \pm 0.01	37.61 \pm 7.40	41.52 \pm 0.01
	M_w ($\times 10^3$ g/mol)	1,154.5 \pm 16.26	19.9 \pm 0.07	4.41 \pm 0.47
	R_w (nm)	74.6 \pm 2.26	34.8 \pm 11.9	68.9 \pm 1.34
	% relative abundance	15.8 \pm 0.1	15.3 \pm 0.2	68.2 \pm 0.2
LBIO14 (No-ropy)	Retention time (min)		37.80 \pm 0.01	41.54 \pm 0.01
	M_w ($\times 10^3$ g/mol)	ND	20.3 \pm 1.57	8.81 \pm 3.61
	R_w (nm)		39.0 \pm 8.9	137.1 \pm 42.0
	% relative abundance		14.6 \pm 0.0	85.0 \pm 0.1
LBIO28 (Ropy)	Retention time (min)	26.73 \pm 0.01	37.63 \pm 0.01	41.53 \pm 0.01
	M_w ($\times 10^3$ g/mol)	1,183.5 \pm 43.13	22.4 \pm 0.08	9.90 \pm 0.11
	R_w (nm)	74.7 \pm 0.50	45.9 \pm 0.7	143.1 \pm 0.56
	% relative abundance	15.9 \pm 0.5	15.2 \pm 0.2	68.0 \pm 0.3

ND: no detected.

The purified EPS fractions were also examined via proton NMR (Figure 3). The three spectra profiles were rather similar and denoted that the carbohydrate-related material was co-extracted with lipid-like substances and/or proteins resistant to the purification treatment, as inferred from the signals at 3.0–0.5 ppm. As for the carbohydrate component, the three spectra had a crowded anomeric region, with signals representative of monosaccharide residues both α (5.5–4.8 ppm) and β (4.65–4.3 ppm) configured to the anomeric centre. Moreover, some differences were noted in the 5.5–4.8 ppm region, where all samples shared two main signals at 5.21 and 5.04 ppm, representative of α -configured monosaccharides, in agreement also with their small coupling constant value ($^3J_{\text{H1H2}}$ 2.95 and 3.41 Hz, respectively). However, the two ropy strains, LBIO1 and LBIO28, had two additional peaks at 5.44 and 4.86 ppm, of lower intensity, which seem to be related to the EPS, as they are absent in LBIO14, the non-ropy strain.

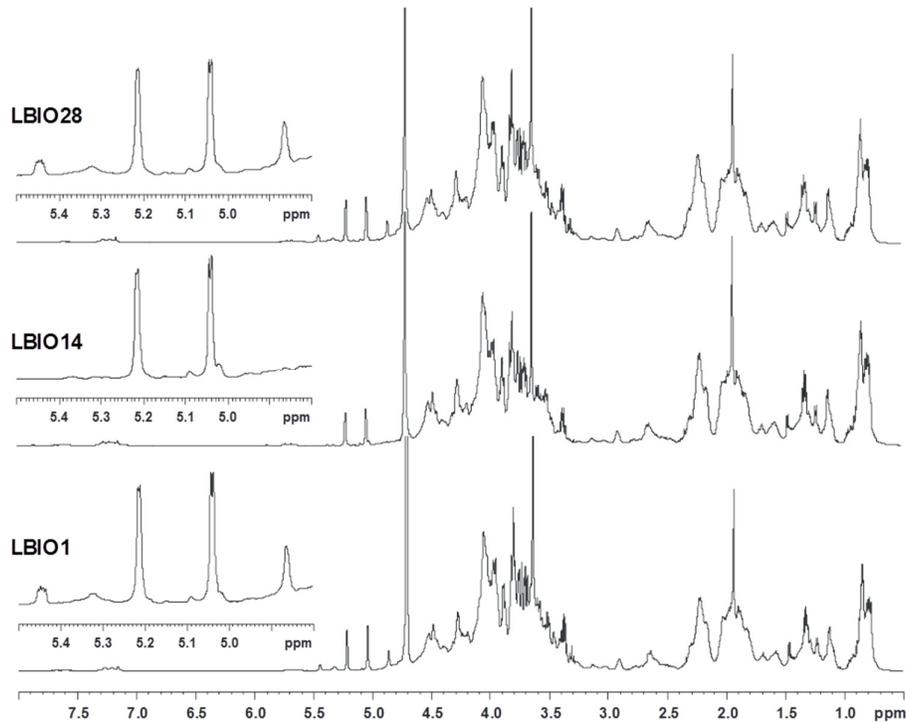


Figure 3. Proton spectra measured by nuclear magnetic resonance (+H-NMR) for the EPSs purified from milks fermented with *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 or LBIO28. The anomeric region corresponding with EPSs is enlarged in the left corner of the spectra (amplified range 5.5–4.8 ppm).

This finding was also confirmed by preliminary data performed on the same strains collected from the biomass obtained from agar-MRS grown plates. Regarding the structure of the EPSs, their repeating unit likely presents a phosphodiester linkage, as suggested by the peculiar shape of the signal at 5.44 ppm that is representative of a sugar in the α -configuration attached to a phosphate group. This finding is not unusual since there are several cases in LAB strains in which these non-carbohydrate substituents are part of EPS/CPS structures [14,54,55] or where two repeating units are joined by a phosphodiester linkage [50].

The monosaccharide analysis of the LBIO1, LBIO14 and LBIO28 polymers obtained from fermented milks has been performed with dephosphorylated samples to appreciate the presence of teichoic acids. The three samples had glucose as the main component, followed from galactose (about 35 % of the glucose), along with traces of mannose, hexosamines and neuraminic acid (Table 3). The latter has already been found as component of lactobacilli polymers, including *L. plantarum* [56]. Importantly, this analysis disclosed the presence of glycerol and ribitol, the two polyols related to teichoic acid (supplementary Figure S3). This finding indicated that teichoic acids were co-extracted together with EPS, and also that they were more abundant in LBIO14 (Table 3) compared to LBIO1 and LBIO28 polymers. Accordingly, LBIO1 and LBIO28 have higher proportions of other carbohydrate molecules, the EPS, which we suppose related to the ropy phenotype of the two strains.

Table 3. Monomer composition, as ratio referred to glucose or as percentage (in brackets), of acetylated methyl glycosides (AMG), after dephosphorylation with aqueous hydrofluoric acid (HF), of EPSs purified from skim-milks fermented for 48 h with the *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 or LBIO28 strains. The supplementary Figure S3 shows the GC-MS (gas chromatography coupled with mass spectrometry) chromatograms.

EPSs	Monomer ¹ ratio / (%)							
	Glycerol	Ribitol	Man	Gal	Glc	GalN	GlcN	NeuA
LBIO1	0.06 (3.2)	0.19 (10.1)	0.07 (3.7)	0.38 (20.1)	1.00 (52.9)	0.05 (2.6)	0.07 (3.7)	0.07 (3.7)
LBIO14	0.12 (5.4)	0.31 (13.8)	0.14 (6.3)	0.33 (14.7)	1.00 (44.6)	0.09 (4.0)	0.12 (5.4)	0.13 (5.8)
LBIO28	0.06 (3.4)	0.16 (8.9)	0.08 (4.5)	0.36 (20.1)	1.00 (55.9)	0.03 (1.7)	0.05 (2.8)	0.05 (2.8)

¹ Man: mannose, Gal: galactose, Glc: glucose, GalN: galactosamine, GlcN: glucosamine, NeuA: neuraminic acid.

A preliminary purification by ion exchange chromatography failed in the isolation of the EPS-related material from the polymeric material obtained from the fermented milks. Thus, purification and structural studies of EPS from LBIO1, LBIO14 and LBIO28 strains will be the object of further work. The physical-chemical properties of EPSs purified from different *L. plantarum* strains have been characterized and all of them presented glucose and galactose in their composition [8,44], such as we have denoted in our polymers. Very often, these monosaccharides are combined with other monomers such as mannose [8], fructose [57], N-acetyl-galactosamine [58], galactosamine, glucosamine [47], rhamnose [50], glucuronic acid [59] and/or glycerol [50,58], among others. The physical-chemical characteristics of the EPS are of special relevance for their functional and technological characteristics [14,60].

3.3. Characterization of Skim Milks Fermented with the EPS-Producing *L. Plantarum*

The flow behaviour and viscosity of milks fermented with the three strains were analysed using a rotational viscometer. At low shear rate, the apparent viscosity decreased when increasing the shear rate in all cases (Figure 4). This flow is a typical shear-thinning and non-Newtonian behaviour, characteristic of pseudoplastic fluids, as reported by several authors for milks fermented with EPS-producing and non-producing LAB [61,62]. At higher shear rates, the viscosity decreased and remained without noticeable changes, then behaving as a Newtonian fluid [63].

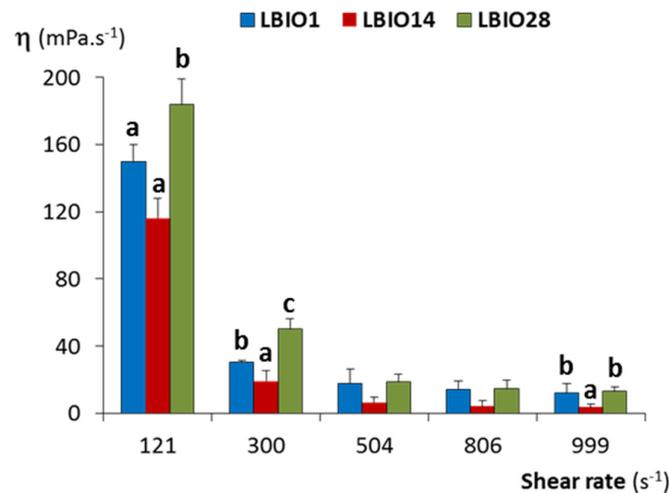


Figure 4. Dynamic viscosity (η) at different shear rates of stirred fermented milks obtained after fermentation for 24 h of skim-milk with the EPS-producing strains *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 or LBIO28. Within each shear rate, bars that do not share a common letter are significantly different according to analysis of variance (ANOVA) and Student–Newman–Keuls (SNK) ($p < 0.05$) mean comparison test.

The flow parameters obtained at shear rate of 300 s^{-1} (supplementary Table S1) showed that the value of the flow behaviour index “ n ” was lower than 1 for the three fermented milks, which confirmed this shear-dependent behaviour [61]. The “ n ” index, as well as the consistency coefficient “ K ”, were significantly different ($p < 0.05$) among the three fermented milks; those fermented with the strain LBIO28 presented the higher K and lower n values. In agreement with this, different viscosity was observed among the three fermented milks ($p < 0.05$). LBIO28-fermented milks had values higher than those fermented with LBIO1 or LBIO14 strains and, as it could be expected, the non-ropy one presented the lowest viscosity. This fact is in agreement with the well-known statement that the capability to modify the viscosity of fermented milks is a strain and/or EPS-dependent feature [64]. It seems that LBIO28-fermented milks had a consistent structure that is more difficult to breakdown during shearing which, presumably, could be linked to the degree of ropiness of its EPS [65]. It seems that the role of this polymer is slowing the breakdown of the casein network through establishing strong EPS-protein interactions [66]. At this time, we cannot explain the influence of specific chemical or structural features exclusive of the LBIO28 EPS on viscosity and casein-interactions.

The structure of a fermented skim-milk gel is formed along the acidification due to the bacterial metabolism of lactose to (mainly) lactic acid, which generates a casein-network that encloses the aqueous (whey components) phase into pores. The flow properties of this matrix is related to the porosity degree of the casein aggregates, as well as to the viscosity of the whey, and it can be determined by measuring the coefficient of permeability over time (B_t) [67]. The three milk gels fermented with the lactobacilli strains under study showed B_t coefficients between 0.6 to $1.1 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ (Figure 5A). The B_t value obtained for the non-ropy LBIO14 strain ($1.10 \pm 0.15 \times 10^{-13} \text{ m}^2$) fitted into the range reported for milk gels acidified at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ with glucono- δ -lactone ($1\text{--}2 \times 10^{-13} \text{ m}^2$; [67]). Whereas, those of milk gels obtained with the ropy-strains were lower (0.59 ± 0.12 and $0.92 \pm 0.13 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, for LBIO1 and LBIO28 milk-gels, respectively). In fact, statistical differences ($p < 0.05$) were found among the B_t coefficients of the three strains (Figure 5A). LBIO14 gels were the most permeable as it was previously reported for gels formed with non-EPS producing LAB strains [31]. This is related with the lowest viscosity of the LBIO14 whey ($1.12 \pm 0.002 \times 10^{-6} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) that flowed through the casein network, as it was detected by measuring the kinematic viscosity (ν) of the three whey samples obtained from the fermented milks (Figure 5B). The lowest viscosity of the non-ropy LBIO14 whey is linked to the absence of the HMW-EPS fraction. As expected, the ν values obtained for the ropy LBIO1 and LBIO28 whey were higher than for LBIO14, but were equal between them ($1.19 \pm 0.02 \times 10^{-6} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$). This suggests that the porosity of the casein network, or the EPS–casein matrix interactions, accounted for the variations in the B_t coefficient detected between these two strains [66]. No significant differences in the capability to retain whey between LBIO1 and LBIO28 milk gels were detected after applying different centrifugal forces (Figure 5C), although these strains were able to hold more whey ($p < 0.05$) than the non-ropy LBIO14 (Figure 5C). This was due to the presence of the HMW-EPS, as previously reported for other EPS-producing LAB [68].

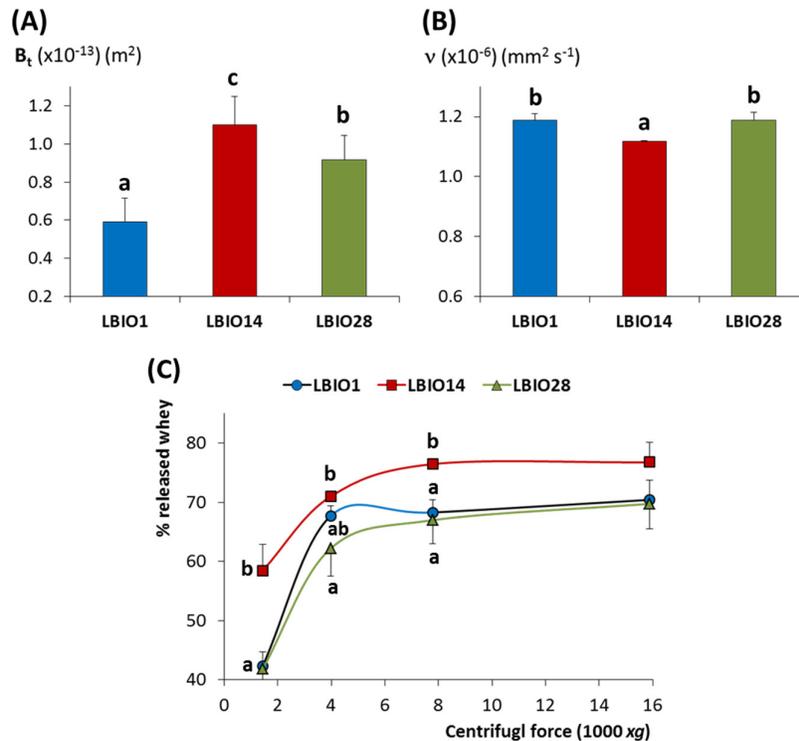


Figure 5. Physical parameters of skim milks fermented with the EPS-producing strains *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 or LBIO28. (A) Mean permeability coefficient (B_i) of the fermented milk-gels; (B) Kinematic viscosity (v) obtained by Ubbelohde measurement of the whey used to measure the permeability coefficient. (C) Amount of whey separation (% w/w) as a function of centrifugal force of fermented milk-gels. Bars or symbols (within each centrifugal force) that do not share a common letter are significantly different according to ANOVA and SNK ($p < 0.05$) mean comparison test.

On this point, it is worth noting that the acidification rate and the increase in the number of bacteria during fermentation were different among the strains (supplementary Table S2; [18]). The strain LBIO28 was able to drop the pH faster and to accumulate more EPS around the gelation point than LBIO1 [18], both parameters influencing the gel permeability. It seems that the formation of LBIO1 gels, that is the casein aggregates enclosing pores, took place before the highest accumulation of EPS. Then, the polymer surrounding the bacteria mostly occupies the pores, partially blocking the flow through them (reducing permeability). In the case of LBIO28 gels, the acidification and synthesis of the highest amount of polymer runs parallel, thus the EPS tended to be distributed between the casein network and the pores, which were not totally blocked with EPS (higher permeability). Similar findings were previously reported [31,69], and they can be supported with the microstructure of the three fermented milks visualized under CLSM (Figure 6). In fact, the more permeable gel obtained with the non-ropy LBIO14 strain showed a coarse and dense protein network with non-distinguishable pores and the bacteria precipitated in the bottom (green sediment in the 3D-rotated micrograph), because the acidification rate was the slowest (supplementary Table S2). On the contrary, “black” pores or “void” spaces were detected into the casein-aggregates network of the ropy LBIO1 and LBIO28 gels. In the first type of gel, the pores were more regularly distributed and the casein structure, with the bacteria and their polymers entrapped inside, was more homogeneous than that of LBIO28 gel. In the latter, the EPS more equally distributed into the protein matrix could be linked to caseins, causing a tightening of the protein network that is more resistant to mechanical action. Thus, the permeability and microstructure of the casein aggregates formed during bacterial milk fermentation were depending on the strain used, that determined the acidification rate, as well as the type of polymer produced that might have influenced the interactions EPS-casein network [31,70,71].

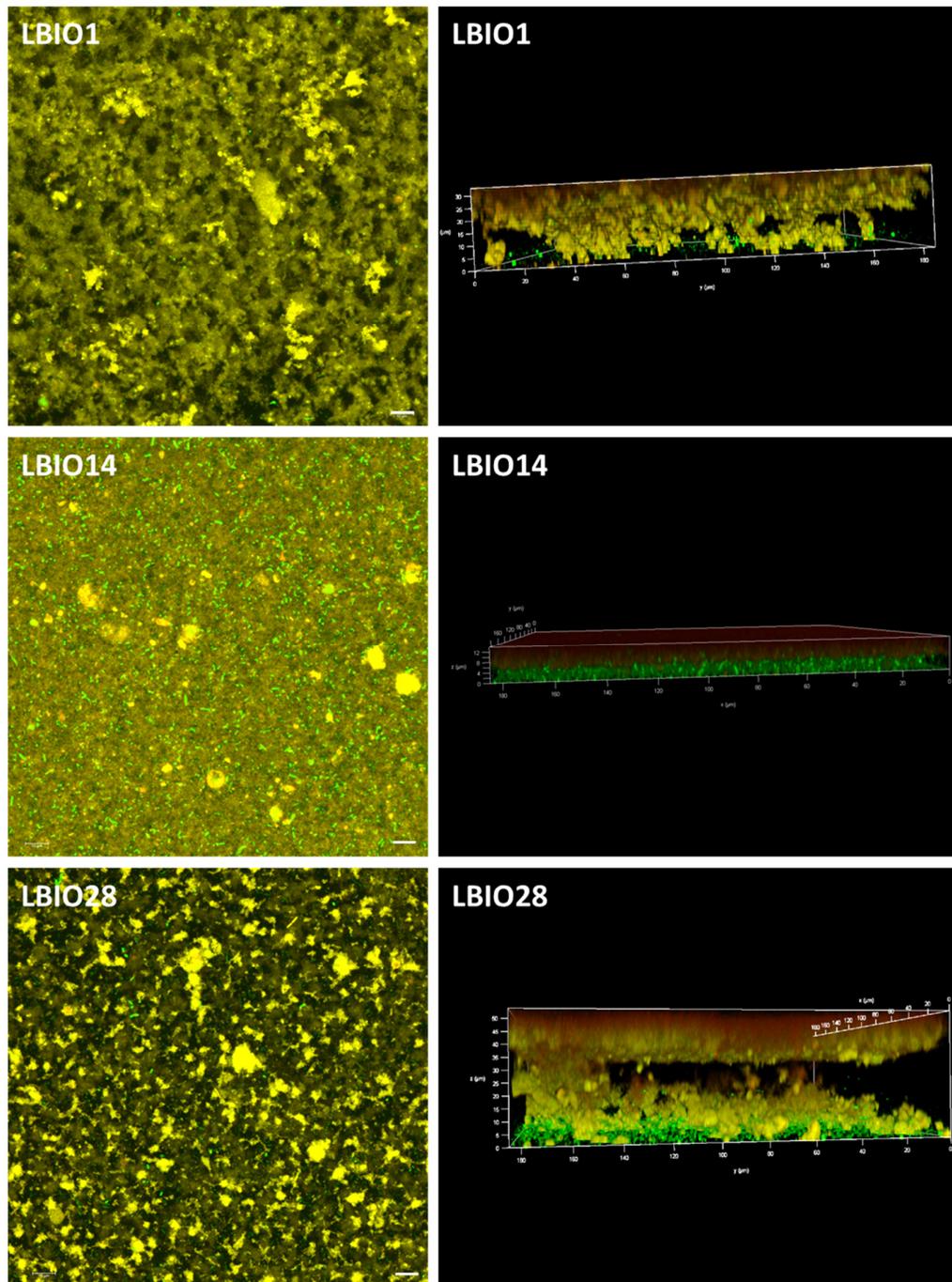


Figure 6. Three-dimensional microstructure of skim-milk gels (casein network stained in yellow) fermented with the EPS-producing strains *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 or LBIO28 (stained in green). Left microphotographs (bar 10 μm): 3D projection (visualized in XY axes) of several Z-stack images obtained using a 63 \times /1.40NA oil objective on an inverted Ultra-Spectral Leica TCS AOBSP2 confocal microscope. Right microphotographs: rotation of the 3D Z-stack images, to see the projection in the three axes (XYZ).

4. Conclusions

Summarizing, in this work we have found that the three *L. plantarum* strains isolated from traditional Algerian fermented milks have EPS surrounding their surface but showing different structure. This is probably due to the presence of a HMW-EPS detected only in the ropy LBIO1 and

LBIO28 strains but absent in the non-ropy LBIO14. Although the genomes of the strains were quite similar, the main difference among the strains, in comparison with *L. plantarum* WCFS1, was denoted in the *cps2* cluster which was only present in the ropy strains. This points to its implication in the synthesis of the HMW-EPS and thereby, in the occurrence of the ropy phenotype. Following, the physical characterization of skim-milks fermented with the three strains allowed us to propose the technological applications of the ropy EPS-producing strains. *L. plantarum* LBIO1 produced milk gels with a less permeable structure, and thus this strain could be used for the manufacture of dairy products to avoid syneresis and/or to increase the water retention. Milks fermented with *L. plantarum* LBIO28 presented the highest viscosity, indicating that the polymer produced in situ can be used as a natural fat replacer to improve the rheological properties of less caloric products.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1101/s1, **Figure S1:** genetic fingerprinting obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification of different genomic regions from *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 and LBIO28 DNA. **Figure S2:** SEC-MALLS chromatograms of the EPS-fraction extracted from milks fermented with the *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 and LBIO28 strains. **Table S1:** rheological parameters of milks fermented with *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 and LBIO28 strains. **Table S2:** acidification rate and increase of bacterial counts of milks fermented with *L. plantarum* LBIO1, LBIO14 and LBIO28 strains. **Supplementary File 1:** ORF location, gene function, and % of identity of genes included in the *eps* clusters found in LBIO1, LBIO14 and LBIO28 *L. plantarum* genomes in comparison to that of the strain WCFS1.

Author Contributions: Conceptualization, L.R. and P.R.M.; Methodology, C.D.C., L.R. and P.R.M.; Software, L.R.; Formal Analysis, L.R.; Investigation, N.B. and I.S.; Resources, C.D.C. and P.R.M.; Data Curation, L.R.; Writing – Original Draft Preparation, P.R.M.; Writing – Review and Editing, all authors; Supervision, K.K., C.D.C. and P.R.N. All authors have approved the submitted version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the grants RTI2018-096339-B-I00 (funded by MCIU/AEI/FEDER, UE), RTI2018-095021-J-I00 (funded by MCIU/AEI/FEDER, UE), and IDI/2018/000236 (funded by PCTI Gobierno del Principado de Asturias/ FEDER, UE).

Acknowledgments: We acknowledge to Isabel Cuesta (IPLA-CSIC), Marta Alonso Guervós (University of Oviedo) and Jose Manuel Fortuño (ICM-CSIC), for their excellent technical assistant in the SEC-MALLS, CSLM, and cryo-SEM analyses, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Carminati, D.; Meucci, A.; Tidona, F.; Zago, M.; Giraffa, G. Multifunctional lactic acid bacteria cultures to improve quality and nutritional benefits in dairy products. In *Advances in Food Biotechnology*; Ravishankar, R.V., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2016; Chapter 15, pp. 263–276.
2. Gibbons, J.G.; Rinker, D.C. The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **2015**, *35*, 1–8.
3. Bron, P.A.; Marcelli, B.; Mulder, J.; van der Els, S.; Morawska, L.P.; Kuipers, O.P.; Kok, J.; Kleerebezem, M. Renaissance of traditional DNA transfer strategies for improvement of industrial lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* **2019**, *56*, 61–68.
4. Tamang, J.P.; Watanabe, K.; Holzapfel, W.H. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 377.
5. Leksir, C.; Boudalia, S.; Moujahed, N.; Chemmam, M. Traditional dairy products in Algeria: Case of Klila cheese. *J. Ethn. Foods* **2019**, *6*, 7.
6. Zeidan, A.A.; Poulsen, V.K.; Janzen, T.; Buldo, P.; Derkx, P.M.F.; Øregaard, G.; Neves, A.R. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, S168–S200.
7. Lynch, K.M.; Zannini, E.; Coffey, A.; Arendt, E.K. Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *9*, 155–176.

8. Xu, X.; Cui, Y.; Yue, F.; Liu, L.; Shan, Y.; Liu, B.; Zhou, Y.; Lü, X. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocol.* **2019**, *94*, 475–499.
9. Hidalgo-Cantabrana, C.; Sánchez, B.; Milani, C.; Ventura, M.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 9–18.
10. Castro-Bravo, N.; Wells, J.M.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2426.
11. van Hijum, S.A.F.T.; Kralj, S.; Ozimek, L.K.; Dijkhuizen, L.; van Geel-Schutten, I.G.H. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 157–176.
12. Werning, M.L.; Ibarburu, I.; Dueñas, M.T.; Irastorza, A.; Navas, J.; López, P. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *J. Food Proct.* **2006**, *69*, 161–169.
13. Caggianiello, G.; Kleerebezem, M.; Spano, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 3877–3886.
14. Ruas-Madiedo, P.; Hugenholtz, J.; Zoon, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 163–171.
15. Hidalgo-Cantabrana, C.; Sánchez, B.; Álvarez-Martín, P.; López, P.; Martínez-Álvarez, N.; Delley, M.; Martí, M.; Varela, E.; Suárez, A.; Antolín, M.; et al. A Single mutation in the gene responsible for the mucoid phenotype of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* confers surface and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 7960–7968.
16. Hassan, A.N. Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 1282–1298.
17. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.A.P.; Harris, H.M.B.; Mattarelli, P.; O'Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858.
18. Bachtarzi, N.; Kharroub, K.; Ruas-Madiedo, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *LWT Food Sci. Technol.* **2019**, *107*, 117–124.
19. Wattam, A.R.; Davis, J.J.; Assaf, R.; Boisvert, S.; Brettin, T.; Bun, C.; Conrad, N.; Dietrich, E.M.; Disz, T.; Gabbard, J.L.; et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D535–D542.
20. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477.
21. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 1–15.
22. Tatusova, T.; DiCuccio, M.; Badretin, A.; Chetvermin, V.; Nawrocki, E.P.; Zaslavsky, L.; Lomsadze, A.; Pruitt, K.D.; Borodovsky, M.; Ostell, J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6614–6624.
23. Kleerebezem, M.; Boekhorst, J.; van Kranenburg, R.; Molenaar, D.; Kuipers, O.P.; Leer, R.; Turchini, R.; Peters, S.A.; Sandbrink, H.M.; Fiers, M.W.; et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1990–1995.
24. Zhang, H.; Yohe, T.; Huang, L.; Entwistle, S.; Wu, P.; Yang, Z.; Busk, P.K.; Xu, Y.; Yin, Y. dbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W95–W101.
25. de Jong, A.; van Hijum, S.A.F.T.; Bijlsma, J.J.E.; Kok, J.; Kuipers, O.P. BAGEL: A web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W273–W279.
26. Arndt, D.; Marcu, A.; Liang, Y.; Wishart, D.S. Review PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief. Bioinform.* **2019**, *20*, 1560–1567.
27. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644.

28. Vielva, L.; de Toro, M.; Lanza, V.F.; de la Cruz, F. PLACNETw: A web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3796–3798.
29. Burns, P.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Cuesta, I.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Ruas-Madiedo, P. Technological characterization and survival of the exopolysaccharide-producing strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193 and its bile-resistant derivative 193+ in simulated gastric and intestinal juices. *J. Dairy Res.* **2011**, *78*, 357–364.
30. De Castro, C.; Parrilli, M.; Holst, O.; Molinaro, A. Microbe-associated molecular patterns in innate immunity: Extraction and chemical analysis of gram-negative bacterial lipopolysaccharides. *Method. Enzymol.* **2010**, *480*, 89–115.
31. Ruas-Madiedo, P.; Zoon, P. Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *213*, 245–253.
32. Lee, W.J.; Lucey, J.A. Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2010**, *23*, 1127–1136.
33. Ruas-Madiedo, P.; de los Reyes-Gavilán, C.G. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 843–856.
34. Dohnalkova, A.C.; Marshall, M.J.; Arey, B.W.; Williams, K.H.; Buck, E.C.; Fredrickson, J.K. Imaging hydrated microbial extracellular polymers: Comparative analysis by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1254–1262.
35. Wei, Y.; Li, F.; Li, L.; Huang, L.; Li, Q. Genetic and biochemical characterization of an exopolysaccharide with in vitro antitumoral activity produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2898.
36. Wang, K.; Niu, M.; Song, D.; Song, X.; Zhao, J.; Wu, Y.; Lu, B.; Niu, G. Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1. *J. Biosci. Bioeng.* **2020**, *129*, 206–214.
37. Rossetti, L.; Giraffa, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *63*, 135–144.
38. Choi, S.; Jin, G.D.; Park, J.; You, I.; Kim, E.B. Pan-Genomics of *Lactobacillus plantarum* revealed group-specific genomic profiles without habitat association. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 1352–1359.
39. Evanovich, E.; Mendonça Mattos, P.J.S.; Guerreiro, J.F. Comparative Genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: An overview. *Int. J. Genom.* **2019**, Article ID 4973214.
40. Jia, F.F.; Zhang, L.J.; Pang, X.H.; Gua, X.X.; Abdelazez, A.; Liang, Y.; Sun, S.R.; Meng, X.C. Complete genome sequence of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391, a probiotic strain with gastrointestinal tract resistance and adhesion to the intestinal epithelial cells. *Genomics* **2017**, *109*, 432–437.
41. Das, D.; Goyal, A. Characterization and biocompatibility of glucan: A safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 683–690.
42. Gangoiiti, M.V.; Puertas, A.I.; Hamet, M.F.; Peruzzo, P.J.; Llamas, M.G.; Medrano, M.; Prieto, A.; Dueñas, M.T.; Abraham, A.G. *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *170*, 52–59.
43. Remus, D.M.; van Kranenburg, R.; van Swam, I.I.; Taverne, N.; Bongers, R.S.; Wels, M.; Wells, J.M.; Bron, P.A.; Kleerebezem, M. Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 1–10.
44. Jiang, Y.; Yang, Z. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Funct. Foods* **2018**, *47*, 229–240.
45. Ryan, P.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Caplice, N.M.; Stanton, C. Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct.* **2015**, *6*, 679–693.
46. Vastano, V.; Perrone, F.; Marasco, R.; Sacco, M.; Muscariello, L. Transcriptional analysis of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Microbiol.* **2016**, *198*, 295–300.
47. Lee, I.C.; Caggianiello, G.; van Swam, I.I.; Taverne, N.; Meijerink, M.; Bron, P.A.; Spano, G.; Kleerebezem, M. Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 3959–3970.
48. Nagaoka, M.; Muto, M.; Yokokura, T.; Mutai, M. Structure of 6-deoxytalose-containing polysaccharide from the cell wall of *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Biochem.* **1988**, *103*, 618–621.
49. Vinogradov, E.; Sadovskaya, I.; Grard, T.; Chapot-Chartier, M.P. Structural studies of the rhamnose-rich cell wall polysaccharide of *Lactobacillus casei* BL23. *Carboh. Res.* **2016**, *435*, 156–161.

50. Garcia-Vello, P.; Sharma, G.; Speciale, I.; Molinaro, A.; Im, S.-H.; De Castro, C. Structural features and immunological perception of the cell surface glycans of *Lactobacillus plantarum*: A novel rhamnose-rich polysaccharide and teichoic acids. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *233*, 115857, doi:10.1016/j.carbpol.2020.115857.
51. Degeest, B.; Vaningelgem, F.; De Vuyst, L. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 747–757.
52. Laws, A.P.; Leivers, S.; Chacon-Romero, M.; Chadha, M.J. Variation in the molecular mass of exopolysaccharides during the time course of extended fermentations of skimmed milk by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 768–771.
53. Zivkovic, M.; Miljkovic, M.; Ruas-Madiedo, P.; Strahinic, I.; Tolinacki, M.; Golic, N.; Kojic, M. Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1387–1396.
54. van Casteren, W.H.M.; Dijkem, C.; Schols, H.A.; Beldman, G.; Voragen, A.G.J. Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydr. Polym.* **1998**, *37*, 123–130.
55. Uemura, J.; Itoh, T.; Kasneko, T.; Noda, K. Chemical characterization of extracellular polysaccharide from *Lactobacillus belbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Milchwissenschaft* **1998**, *53*, 443–446.
56. Sakellaris, G.; Kolisis, F.N.; Evangelopoulos, A.E. Presence of sialic acids in *Lactobacillus plantarum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *155*, 126–1132.
57. Senturk, D.Z.; Dertli, E.; Erten, H.; Simsek, O. Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. *Food Sci. Biotechnol.* **2020**, *29*, 121–129.
58. Tallon, R.; Bressollier, P.; Urdaci, M.C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* **2003**, *154*, 705–712.
59. Liu, T.; Zhou, K.; Yin, S.; Liu, S.; Zhu, Y.; Yang, Y.; Wang, C. Purification and characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HY isolated from home-made Sichuan Pickle. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *134*, 516–526.
60. Mende, S.; Rohm, H.; Jaros, D. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *Int. Dairy J.* **2016**, *52*, 57–71.
61. Vukic, D.V.; Vukic, V.R.; Milanovic, S.D.; Ilicic, M.D.; Kanuric, K.G. Modeling of rheological characteristics of the fermented dairy products obtained by novel and traditional starter cultures. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 2180–2188.
62. Bancalari, E.; Alinovi, M.; Bottari, B.; Caligiani, A.; Muchetti, G.; Gatti, M. Ability of a wild *Weissella* strain to modify viscosity of fermented milk. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3086.
63. Radhouani, H.; Gonçalves, C.; Maia, F.R.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2018**, *33*, 461–478.
64. Hamet, M.F.; Piermaria, J.A.; Abraham, A.G. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 129–135.
65. Surber, G.; Mende, S.; Jaros, D.; Rohm, H. Clustering of *Streptococcus thermophilus* strains to establish a relation between exopolysaccharide characteristics and gel properties of acidified milk. *Foods* **2019**, *8*, 146.
66. Gentès, M.C.; St-Gelais, D.; Turgeon, S.L. Exopolysaccharide–milk protein interactions in a dairy model system simulating yoghurt conditions. *Dairy Sci. Technol.* **2013**, *93*, 255–271.
67. Lucey, J.A. Acid coagulation of milk. In *Advanced Dairy Chemistry-1B: Proteins: Applied Aspects*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., Eds.; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2016; Chapter 12; pp. 309–328.
68. Lluís-Arroyo, D.; Flores-Nájera, A.; Cruz-Guerrero, A.; Gallardo-Escamilla, F.; Lobato-Calleros, C.; Jiménez-Guzmán, J.; García-Garibay, M. Effect of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* on the yield and texture of Mexican Manchego-type cheese. *Int. J. Food Prop.* **2014**, *17*, 1680–1693.
69. Girard, M.; Schaffer-Lequart, C. Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 666–673.

70. Gentès, M.C.; St-Gelais, D.; Turgeon, S.L. Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Sci. Technol.* **2011**, *91*, 645–661.
71. Yang, T.; Wu, K.; Wang, F.; Liang, X.; Liu, Q.; Li, G.; Li, Q. Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt. *Int. Dairy J.* **2014**, *34*, 252–256.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RÉSUMÉS

تعد منتجات الألبان المخمرة طبيعيًا مصدرًا مثيرًا للاهتمام للحصول على سلالات جديدة من بكتيريا حمض اللاكتيك ذات الإمكانيات التكنولوجية المثبتة، إذ أن البعض منها قادر على توليف السكريات الخارجية أثناء التخمر، و التي تلعب دورا هاما في تحسين الخصائص الريولوجية لمنتجات الألبان.

تهدف هذه الأطروحة إلى عزل بكتيريا حمض اللاكتيك المنتجة للسكريات الخارجية ابتداء من منتجات الألبان المحلية المخمرة حرفيا، حيث تم جمع 30 عينة في شرق الجزائر و التي استعملت لتحصيل 584 عزلة، من بينها 18 عزلة تبين أنها تملك خاصية تصنيع و فرز السكريات المركبة في الوسط الخارجي. ليتم تصنيفها عن طريق التقنيات الفيزيولوجية، البيوكيميائية و الجزيئية الى نوعان هما لوكنوستوك ميزنتيرويداس و لاكتوبسيلوس بلانتروم.

بعد ذلك قمنا باختيار السلالات المتميزة باستقرار طابع إنتاج السكريات، و الذي من خلاله احتفظنا بستة سلالات بالإضافة إلى سلالة ذات النمط الظاهري الغير منتج استعملت كشاهد ، كلها تنتمي إلى النوع الثاني لاكتوبسيلوس بلانتروم. أتاح التوصيف الماكروسكوبي للهلام اللبني المنتج بواسطة هاته السلالات لانتقاء السلالتين LBIO1 و LBIO28، اللتان تنتجان بوليمرات سكرية تعطي لزوجة لمنتجات الألبان . كشفت دراسة إنتاجها من طرف السلالات عن طريق قياسات وزنية و كروماتوجرافية أن البوليمرات السكرية هي منتجات الألبان ذات الوزن الجزيئي العالي.

في موازاة ذلك، مكننا التوصيف الماكروسكوبي و البنية المجهرية بواسطة مجهر مسح ليزر متحد البؤر للهلامين البناني SMCLBIO1 و SMCLBIO28، مقارنة مع الهلام الشاهد السلبي SMCLBIO14 ، إلى أن البوليمرات المنتجة من قبل السلالتين ساهما بشكل كبير في تحسين السمات البنيوية للألبان. من ناحية أخرى، أظهرت صور المجهر الإلكتروني وجود شبكات كثيفة متصلة بخلايا السلالتين LBIO1 و LBIO28 على عكس السلالة LBIO14 .

من جهة اخرى، أكد التسلسل الكامل للجينومات الثلاثة متبوعًا بتحليل جينومي في الحاسوب، أن الثلاث سلالات لا تحتوي على جينات الضراوة، مع وجود جينات ترميز للفيتامينات و البكتريوسين. كما أظهرت دراسة آلية التصنيع الحيوي للبوليميرات السكرية الجينية، مقارنة مع سلالة مرجعية من نفس النوع لاكتوبسيلوس بلانتروم WCFS1 تواجد مجموعتين كاملتين لجينات الترميز في الثلاث جينومات على مستوى الكروموسوم مع تشابه بنسبة 100%. تحتوي السلالتين LBIO1 و LBIO28 على جينات ترميز اضافية التي تنتمي الى المجموعة الجينية 2 ، والتي يعتقد أنها مسؤولة عن تركيب البوليميرات ذات الوزن الجزيئي العالي.

وبالتالي يمكن استغلال كلا السلالتين LBIO1 و LBIO28 في تخمير منتجات الألبان ، بناءً على الخصائص التقنية الوظيفية لبوليمراتها ، و التي تساهم في تحسين الخصائص الريولوجية للهلامات اللبني المنتجة.

The naturally fermented dairy products are an interesting source of new strains of lactic acid bacteria (LAB) with proven technological potential. Some of them are capable of synthesizing exopolysaccharides (EPS) during fermentation, which improve the rheological properties of dairy matrices.

This thesis work focuses on the selection of LAB producing EPS from local fermented dairy products. A total of 30 samples were collected in Eastern Algeria, from which 584 presumptive isolates of LAB were tested for the production of EPS. Only 18 isolates presented a productive phenotype, their polyphasic characterization confirmed that they belong to two species: *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*.

A preselection based on the stability of EPS production character made it possible to retain 6 strains in addition to a control strain, all affiliated to the *Lactobacillus plantarum* species. Then macroscopic characterization of their lactic gels allowed to select two strains LBIO1 and LBIO28 producing viscosifying EPS in a dairy matrix. The study of their production revealed that the polymers produced are primary metabolites, with a high molecular weight. In parallel, a characterization of the macro and microstructure under confocal laser scanning microscopy of the two gels SMCLBIO1 and SMCLBIO28, compared to the control gel SMCLBIO14, concluded that the EPS of the two ropy strains contribute significantly to the improvement of the physical attributes of lactic gels.

Furthermore, micrographs made by cryo-electron microscopy showed the existence of a dense web-like EPS attached to the cells for both ropy strains, which is not observed for LBIO14.

Finally, a complete sequencing of the three genomes followed by an *in silico* genomic analysis confirmed the safety of the strains and the existence of genes coding for bacteriocins and vitamins. The study of the biosynthetic machinery of EPS in comparison with the reference strain *Lactobacillus plantarum* WCF1 revealed the presence of 2 complete *eps* clusters *cps3* and *cps4* in the three genomes with 100% similarity between them, all chromosomal. However, the two strains LBIO1 and LBIO28 have in addition genes belonging to *cps2*, which would therefore be involved in the synthesis of the ropy polymer with high molecular weight.

The two ropy strains LBIO1 and LBIO28 can therefore be exploited in dairy fermentation, based on the techno-functional properties of their polymers, which contribute to the improvement of the rheological characteristics of the matrices generated.

Résumé

Les produits laitiers naturellement fermentés constituent une source intéressante de nouvelles souches de bactéries lactiques (BL) au potentiel technologique avéré. Certaines d'entre elles, sont susceptibles de synthétiser des exopolysaccharides (EPS) au cours de la fermentation, qui améliorent les propriétés rhéologiques des matrices laitières.

Ce travail de thèse porte sur la sélection de BL productrices d'EPS, à partir de produits laitiers fermentés locaux. Au total, 30 échantillons ont été collectés dans l'Est de l'Algérie, à partir desquels 584 isolats présumés des BL ont été testés pour la production des EPS. Seuls 18 isolats ont présenté un phénotype producteur, dont la caractérisation polyphasique a confirmé leur appartenance aux deux espèces : *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum*.

Une présélection basée sur la stabilité du caractère de production d'EPS a permis de retenir 6 souches en plus d'une souche témoin de phénotype non producteur, toutes affiliées à l'espèce *Lactobacillus plantarum*. La caractérisation macroscopique de leurs gels lactiques, a permis ensuite de sélectionner deux souches L BIO1 et L BIO28 produisant des EPS viscosifiants en milieu laitier. L'étude de leurs productions par les méthodes gravimétriques et chromatographiques a révélé que les polymères produits sont des métabolites primaires, de haut poids moléculaire. En parallèle, une caractérisation de la macro et microstructure au microscope confocale à balayage laser des deux gels lactiques SMCLBIO1 et SMCLBIO28, comparativement au gel témoin de SMCLBIO14, a conclu que les EPS des deux souches filantes ont contribué significativement à l'amélioration des attributs physiques des matrices laitières. D'autre part, les micrographies réalisées par cryo-microscopie électronique ont montré l'existence d'un *web-like* EPS dense attaché aux cellules des deux souches filantes contrairement à celle de L BIO14.

Enfin, un séquençage complet des trois génomes suivi d'une analyse génomique *in silico* a confirmé l'innocuité des souches, l'existence de gènes codant des bactériocines et des vitamines. L'étude de la machinerie biosynthétique des EPS en comparaison avec la souche de référence *Lactobacillus plantarum* WCF1, a révélé la présence de 2 *clusters eps* complets, les *cps3* et *cps4*, dans les trois génomes avec une similitude de 100 % entre eux, tous chromosomiques. Seulement, les deux souches filantes L BIO1 et L BIO28 possèdent en plus des gènes appartenant au *cps2*, qui seraient donc impliqués dans la synthèse du polymère filant de haut poids moléculaire.

Les deux souches filantes L BIO1 et L BIO28 peuvent ainsi être exploitées en fermentation laitière, grâce aux propriétés techno-fonctionnelles de leurs polymères qui contribuent à l'amélioration des caractéristiques rhéologiques des matrices générées.

Mots clés : produits laitiers fermentés, bactéries lactiques, exopolysaccharides, structure, viscosité.