

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU
 UNITE de FORMATION et de
 RECHERCHE en SCIENCES de la
 VIE et de la TERRE (UFR/SVT)

DEPARTEMENT de BIOCHIMIE
 MICROBIOLOGIE (DBM)

CENTRE de RECHERCHE en SCIENCES
 BIOLOGIQUES, ALIMENTAIRES
 et NUTRITIONNELLES (CRSBAN)



BURKINA FASO

Unité -Progrès -Justice

THESE UNIQUE

Présentée

A L'UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

UFR/SVT

Pour l'obtention du

DU GRADE DE DOCTEUR

ES

SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

SPECIALITE

BIOCHIMIE ET BIOTECHNOLOGIE

par

Aly SAVADOGO

Maître ès Sciences

*Caractérisation Biochimique et Moléculaire des Bactéries
 Lactiques Productrices d'exopolysaccharides isolées à partir
 d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso*

Soutenue publiquement le 11 Novembre 2004

Devant la commission d'examen

Président : Pr Comlan DE SOUZA, Professeur titulaire, Université de Lomé, Lomé (*rapporteur*)

Membres : Pr. Alfred S. TRAORE , Professeur titulaire, Université de Ouagadougou

Pr. Joseph D HOUNHOUIGAN, Professeur titulaire , Université du Bénin (*rapporteur*)

Pr. Jean Pierre GUYOT, Directeur de Recherche IRD Montpellier, Montpellier(*rapporteur*)

Dr. Cheik A. T. OUATTARA, Maître Assistant, Université de Ouagadougou

Dr. Nicolas BARRO, Maître Assistant, Université de Ouagadougou

Table des Matières

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique	4
1. Les bactéries lactiques	4
1.1 Définition	4
1.2 Origine phylogénétique	5
1.3 Les genres	6
1.4 Caractéristiques générales	7
1.4.1 Utilisation des sources azotées	11
1.4.2 Métabolisme du citrate et d'autres substrats carbonés	12
1.4.3 Métabolisme de l'oxygène	13
1.5 Utilisation des bactéries lactiques	14
1.5.1. Les principales utilisations des bactéries lactiques en alimentation humaine	14
1.5.2. Les rôles bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé humaine	20
2. LES EXOPOLYSACCHARIDES	26
2.1 Les exopolysaccharides des bactéries lactiques	26
2.1.1. Classification	26
2.1.2. Biosynthèse et génétique	30
3. La PCR	31
3.1 Principe de la PCR	31
3.2 La réaction :	32
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	34
2.1 Isolement, caractéristiques morphologiques et biochimiques	34
2.1.1 Matériel Biologique	34
2.1.2 Isolement et Purification des souches	34
2.1.3 Caractéristiques biochimique et morphologique des souches	35
2.1.3.1 Examen microscopique	35
2.1.3.2 Biochimie des souches	35
2.1.3.3 Effet du lysosyme sur les bactéries lactiques productrices d'EPS	35
2.1.3.4 Etude de la sensibilité des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides aux antibiotiques	36
2.1.3.5 Le test d'oxydation -fermentation	36
2.1.3.6 Le test de l'indole	36
2.1.3.7 Le test de l'uréase	37
2.1.3.8 Le test de l'oxydase	37
2.1.3.9 Le test d'hydrolyse de l'esculine	37
2.1.3.10 Formation de peroxyde d'hydrogène	38
2.2. Etude des Exopolysaccharides	38
2.2.1 Détermination de la Composition des EPS par HPLC	38
2.2.2 Mesure de l'activité de la β -glucuronidase promoteur des EPS	39
2.2.3 Dosages des sucres totaux des EPS	39
2.2.4 Dosage des protéines dans les EPS	39
2.2.5 Mesure des poids secs bactériens	40
2.3 Etude des bactériocines et Fermentation des sucres	40
2.3.1 Isolement de bactériocines	40
2.3.2 Test d'inhibition des bactériocines isolées sur des souches de références	41
2.3.3 Hydrolyse enzymatique des bactériocines isolées	41
2.3.4 Cinétique d'acidification et production d'acide	41
2.3.5 Mesures de pH.	42

2.3.6 Dosage de l'acide lactique	42
2.4 Caractérisation moléculaire des souches isolées	42
2.4.1 Identification des bactéries et recherche des gènes d'EPS	42
2.4.1.1.Extraction d'ADN	42
2.4.1.2.La PCR	45
2.4.1.3 Electrophorèse des amplicons sur gel d'Agarose	47
Chapitre 3 : Résultats et Discussion	49
1 . Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des souches isolées	49
2. Etude de la production des Exopolysaccharides	58
2.1 Les protéines dans les EPS	59
2.2 Composition monomérique des EPS par HPLC	62
2.3 Mesure de l'activité de la β -glucuronidase	64
2.4. Les Variations de pH	65
Article 1	
Article 2	
Article 3	
Article 4	
Article 5	
Chapitre 4 : Discussion générale	80
Conclusion générale	84
Références bibliographiques	86

DEDICACE

A la mémoire de mon très cher et regretté oncle

Moïse Tinga OVEDRAOGO, qui nous a quitté prématurément

Très cher oncle je fais miens ces mots de BIRAOGO DIOP.

« Les morts ne sont pas morts , ils sont dans l'air , ils sont dans le vent , ils sont autour de nous.... »

A toute ma famille pour le soutien moral et matériel

Remerciements

Les travaux qui font l'objet de cette thèse ont été menés au Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles sous la direction Scientifique du professeur Alfred S. TRAORE, Directeur du CRSBAN et Directeur de cette Thèse

Monsieur le professeur Alfred S. TRAORE, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accordé votre confiance et accueilli dans votre centre.

Je vous suis très reconnaissant pour avoir guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche scientifique et surtout pour vos conseils et votre disponibilité. Je voudrais également vous exprimer toute ma reconnaissance pour la tolérance dont vous avez fait preuve à mon égard et surtout pour m'avoir appris la rigueur et la patience scientifiques.

Je tiens particulièrement à remercier mon maître de stage Docteur Cheik Amadou Tidiane OUARTARA pour avoir accepté de m'encadrer à la paillasse. Je vous remercie pour vos multiples conseils et votre assistance permanente tant pour la conception que pour la rédaction de ce travail. Si cette thèse présente quelque mérite que ce soit, tout l'honneur vous revient. Je suis très heureux de pouvoir vous exprimer ma gratitude.

Soyez assuré de ma gratitude pour votre participation à la commission d'examen.

Je remercie le Professeur Comlan DE SOUZA qui nous fait un grand honneur, malgré ses multiples occupations de présider le Jury, et aussi pour avoir accepté d'instruire ce document en tant que rapporteur. Recevez toute ma gratitude.

Je remercie de tout cœur le Professeur Jean Pierre GUYOT Directeur de Recherche à l'IRD Montpellier pour avoir accepté d'instruire ce document en tant que rapporteur, et aussi avoir accepté de juger ce travail. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer ici toute ma gratitude et mon amitié. Soyez assurée de ma gratitude pour l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail.

Je Souhaite exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur Joseph D. HOUNHOUGAN pour avoir accepté instruire ce document en tant que rapporteur, et aussi avoir accepté de juger ce travail. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer ici toute ma gratitude et mon amitié. Soyez assurée de ma gratitude pour l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail.

Je rends un hommage particulier au Docteur Nicolas BARRO sa disponibilité son aide ses conseils, pour avoir accepté corriger cette thèse et dont j'apprécie la riche pratique de la recherche scientifique, l'enthousiasme scientifique, les qualités d'enseignant et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qu'il soit vivement remercié.

J'exprime ma reconnaissance à toute l'équipe du CRSBAN

Au Professeur AboubaKar Sidiki OUARTARA pour sa disponibilité et ses conseils.

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude aux Docteurs Philippe NIKIEMA , Mamoudou H DICKO , Marcel BENGALY , Paul W. SAWADOGO , Yves TRAORE , André Jules ILBOUDO pour leur apport scientifique à ce travail , leur critiques et suggestions et pour leur cordialité.

Mes remerciements s'adressent aux techniciens et chauffeurs du CRSBAN Moussa SANOGO , KAGAMBEGA Paul, Patrice KINDA, Aziz Z. TRAORE , Daouda TRAORE , Abdoulaye TRAORE , Ibrahlim SANOU , Dieudonné KABORE , Saidou TRAORE pour leur compréhension et leur disponibilité permanente.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire de Biologie Moléculaire du Centre Muraz : Olivier MANIGART , Yves TRAORE , Oumar SANOU , Diane VALEA , Thérèse KOMI , Aurora DE OLIVIERA , Didier DJABARE , Antoinette KABORE. Pour leur accueil et leur gentillesse. Mention spéciale à Oumar SANOU pour son encadrement en PCR et HMA.

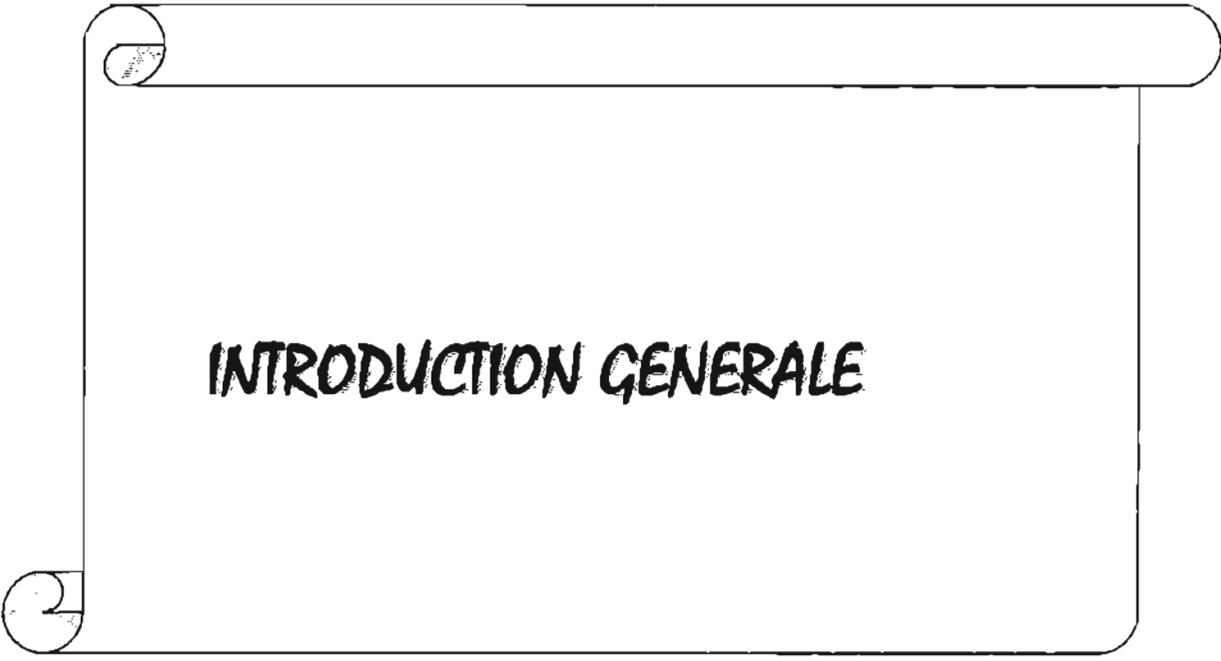
Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à feu madame OUEDRAOGO née SAWADOGO Rahamatou. Je la remercie particulièrement pour avoir toujours bénéficié tant de son aide matériel que de son expérience et surtout de ses conseils. Je garde un souvenir émouvant et inoubliable.

Je rends un hommage particulier à mes collègues du CRSBAN Imaël Henri Nestor BASSOLE, Constance NANA, Yaya BAYANE, Charles DABONE, Dia Evariste SANOU, Fatoumata KABORE, Christelle NADEMBEGA, André Linn OUEDRAOGO, Souleymane SANON, Simplex KAROU , Donatien KABORE , Fatoumata HAMA, Bertine DABIRE et à mes collègues de thèse et amis Ousmane SAWADOGO , Youssouf ZERBO , Balé BAYALA, Tiganadaba LODUN, Mme SOUGOTI Née Marie laure

GUISSOU, Hamidou FALALOU, Charles Eloge LAMIEU, Hermann SORGHU, Aline MEDA, Martin TIENDREBEOGO, Issouf TRAORE, Olivier GNANKINE, Malick BA, Athanase BADOLO, Amadé OUEDRAOGO et Saran TRAORE pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail et pour leurs critiques constructives. Je leur suis gré de leur cordialité.

Je voudrais exprimer particulièrement ma gratitude à mon collègue et ami Dr Imaél Henri Nestor BASSOLE pour avoir participé à la conception et à la mise forme de ce travail. Je lui suis redevable de son amitié et de son soutien moral.

Je ne saurais terminer sans rendre un hommage particulier à Lamine SAVADOGO, Youssouf SAVADOGO, Adama SAVADOGO, Sarata SAVADOGO, Isis P. OUEDRAOGO, Madame TAMINI née SAWADOGO Mariam, à tous ceux dont j'ai omis involontairement le nom. Sans leur soutien, je ne pourrais venir à bout de ce travail quelle que soit ma détermination et ma bonne volonté.

A hand-drawn scroll graphic with a title inside. The scroll is rectangular with rounded corners and a small circular detail at the top left and bottom left corners, suggesting it is unrolled. The text is centered within the scroll.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le lait et ses produits dérivés (yaourt, fromage, lait caillé) sont beaucoup prisés au Burkina Faso. La production du lait devient de plus en plus importante, liée au développement de l'élevage. On assiste aujourd'hui à une éclosion de petites et moyennes entreprises de production et de transformation de lait. Il se pose un problème d'assurance qualité pour toutes ces nouvelles structures qui utilisent des moyens et matériel modestes.

Cependant, les recherches antérieures réalisées sur les bactéries lactiques ont montré que celles-ci, si elles sont bien exploitées pourraient contribuer à l'amélioration de la qualité et de la conservation des produits fermentés en général et des produits laitiers en particulier

Le contrôle de la production des aliments fermentés à travers l'utilisation de starters de microorganismes est un facteur important dans l'amélioration de sa stabilité et de sa qualité nutritionnelle et hygiénique.

Les bactéries lactiques (BL) sont largement impliquées dans la fabrication de produits laitiers fermentés du fait de leurs activités métaboliques particulières. La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés (PLF) et leur confère une saveur typique. L'acidification, la production d'acides organiques et d'autres composés antimicrobiens, telles les bactériocines, jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes pathogènes ou des contaminants (Desmazeaud, 1996 ; Cherl-Ho, 1997 ; Oyewole, 1997 ; Daly and Davis, 1998 ; Ouwehand, 1998). La transformation du lactose par les ferments lactiques améliore la digestibilité du produit. Les BL contribuent, par leur métabolisme et leurs activités enzymatiques variées, à la production de composés volatils qui participent au développement de l'arôme, de la saveur et de la texture des produits fermentés (Cherl-Ho, 1997 ; Oyewole, 1997). Certaines espèces de bactéries lactiques sont capables au cours de leur métabolisme de produire des exopolysaccharides (EPS) et les libérer dans le milieu de culture (Topisirovic, 1994 ; Cerning, 1990,1995 ; Champagne, 1998 ; Cerning *et al.*, 1994 ; Grobber *et al.*, 1995 ; Dupont, 1998 ; Gamar-Nourani *et al.*, 1998 ; De Vuyst et

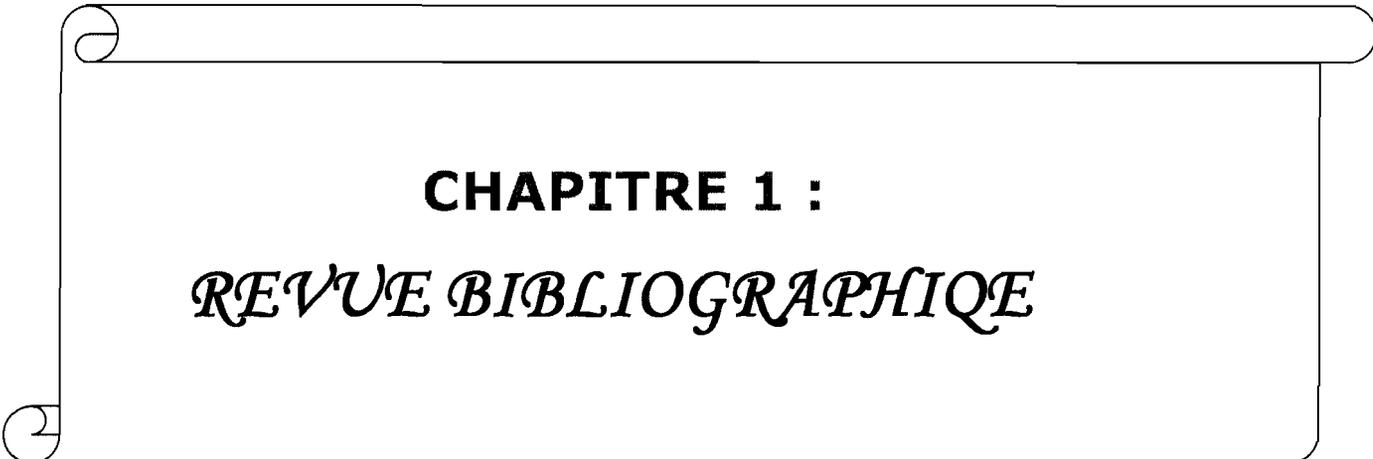
Degeest, 1999). Les exopolysaccharides interviennent non seulement dans le maintien des propriétés physico-chimiques du lait (texture, viscosité, arômes etc.) mais présentent aussi des effets curatifs dans les traitements de certaines maladies gastro-intestinales (Hove *et al.*, 1994 ; Heyman, 2000 ; Simakachorn *et al.*, 2000 ; Isolauri, 2001 ; Soomro et Kiran, 2002). De plus les exopolysaccharides jouent un rôle dans la symbiose, dans la protection des cellules contre la dessiccation, les antibiotiques, substances toxiques, les stress environnementaux. Ils facilitent l'adhérence des bactéries aux différentes surfaces (Leigh et coplin, 1992 , Whitfield et Valvano, 1993), interviennent dans la séquestration des cations essentiels (Weiner *et al.*, 1995), et dans l'abaissement du taux de cholestérol (Nakajima *et al.*, 1992) comme immuno modulateur (Kitazawa *et al.*, 1993 ; Hosono *et al.*, 1997). Enfin, ils sont utilisés en médecine en industrie pharmaceutique et en industrie agroalimentaire.

Les bactéries lactiques ont longtemps été utilisées pour la conservation et la fabrication des aliments (Tailliez, 2001 ; Soomro et Kiran, 2002). Le concept d'amélioration des bilans nutritionnel et sanitaire par addition de bactéries bénéfiques (probiotiques) à l'aliment a fait l'objet de recherches approfondies. Le rôle propice des probiotiques en tant que facteur d'équilibre sur la microflore intestinale et en particulier leur action vis-à-vis d'une population microbienne indésirable a été démontrée (Ouwehand, 1998 ; Sanni *et al.*, 1999 ; Yang, 2000 ; Soomro et Kiran, 2002).

Etant donné l'importance des bactéries lactiques et de leur exopolysaccharides dans l'alimentation humaine et pour les bio-industries et dans le souci de résoudre le problème de qualité, de conservation de nos denrées qui sont de plus en plus produites en quantité importante on se propose d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso. L'isolement et la caractérisation constituent des étapes importantes pour la mise en place des starters.

L'isolement a été réalisé par des techniques standards et la caractérisation notamment par l'identification biochimique et moléculaire par PCR des souches et la recherche des plasmides responsables de la biosynthèse des EPS par PCR.

Le corps de cette thèse comporte quatre chapitres : le premier chapitre intitulé Revue de littérature donne une vue d'ensemble des connaissances actuelles sur les bactéries lactiques et leur exopolysaccharides. Le chapitre 2 donne la méthodologie et le matériel utilisés pour la réalisation de ce travail. Le chapitre 3 expose les résultats et les discussions à travers des articles scientifiques publiés ou en cour de publication . Le Chapitre 4 fait une discussion générale de tout les résultats obtenus.



CHAPITRE 1 :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Les bactéries lactiques

1.1 Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, jamais sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles (Tailliez, 2001). Les bactéries lactiques encore appelées bactéries de l'acide lactique sont caractérisées par leur aptitude à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (D(-), L(+) ou DL) en utilisant les voies cataboliques d'Embden Meyerhof Parnas (EMP), de Dickens-Horecker et d'Entner Doudoroff.

Le mot « fermenter » vient du latin ou il peut être traduit comme « levures » ou « bouillir ». Le principe général de la fermentation est de créer un environnement favorisant la croissance d'un ou de plusieurs microorganismes spécifiques et désirables qui aura un effet bénéfique sur l'aliment plutôt que de l'altérer.

Les bactéries lactiques sont dites homofermentaires lorsque l'acide lactique est le seul produit formé; par contre elles sont hétérofermentaires lorsque d'autres composés comme l'éthanol et le CO₂ sont produits en même temps. Les bactéries lactiques sont des microorganismes anaérobies qui tolèrent l'oxygène dans une certaine mesure. L'oxygène affecte leur métabolisme mais aussi leur croissance, leur survie et l'intégrité de leur ADN. Les bactéries lactiques possèdent deux types d'oxydases à NADH, ces enzymes catalysent la réduction de O₂ en H₂O₂ ou de O₂ en H₂O.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver certains aliments. Elles pourraient avoir vu le jour il y a près de 3 milliards d'années (Tailliez, 2001) ; leur faible adaptation à la vie en aérobiose concourt à penser qu'elles se seraient plutôt développées au cours d'une période de transition entre un monde

anaérobie et un monde micro-aérobie (Tailliez, 2001). L'essor des bactéries lactiques a bénéficié de celui des grands mammifères, producteurs de lait, commencé il y a 65 millions d'années (Schopf, 1999). Il s'est accentué lorsque l'homme est passé du statut de chasseur-cueilleur à celui d'éleveur, il y a quelques 8000 ans avant Jésus Christ

1.2 Origine phylogénétique

La phylogénie basée sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomique et sur l'analyse de séquences signatures dans les protéines très conservées suggère dans l'évolution une position ancestrale des bactéries Gram positif à bas taux de guanine et cytosine (GC %), dont les bactéries lactiques. Ces bactéries seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques. Les cyanobactéries photosynthétiques ayant laissé des traces fossiles datées d'au moins 2,75 milliards d'années, les bactéries lactiques pourraient donc avoir vu le jour il y a près de 3 milliards d'années (Tailliez, 2001).

Le monde bactérien comprend onze principaux phylums ; celui des bactéries à Gram-positif comprend deux subdivisions : la subdivision '*Clostridium* et apparentés qui regroupe les bactéries de bas GC % (≤ 50) (figure 1), c'est dans cette subdivision que l'on retrouve la plupart des bactéries lactiques; la subdivision « Actinomycètes » et apparentés' qui regroupe les bactéries à Gram positif et à GC % élevé.

Elles ont été regroupées pour la première fois en 1919 par Orla-Jensen. Selon le Bergey (1994) onze genres bactériens peuvent être considérés comme des bactéries lactiques; ce sont : *Aerococcus* , *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (figure 2)

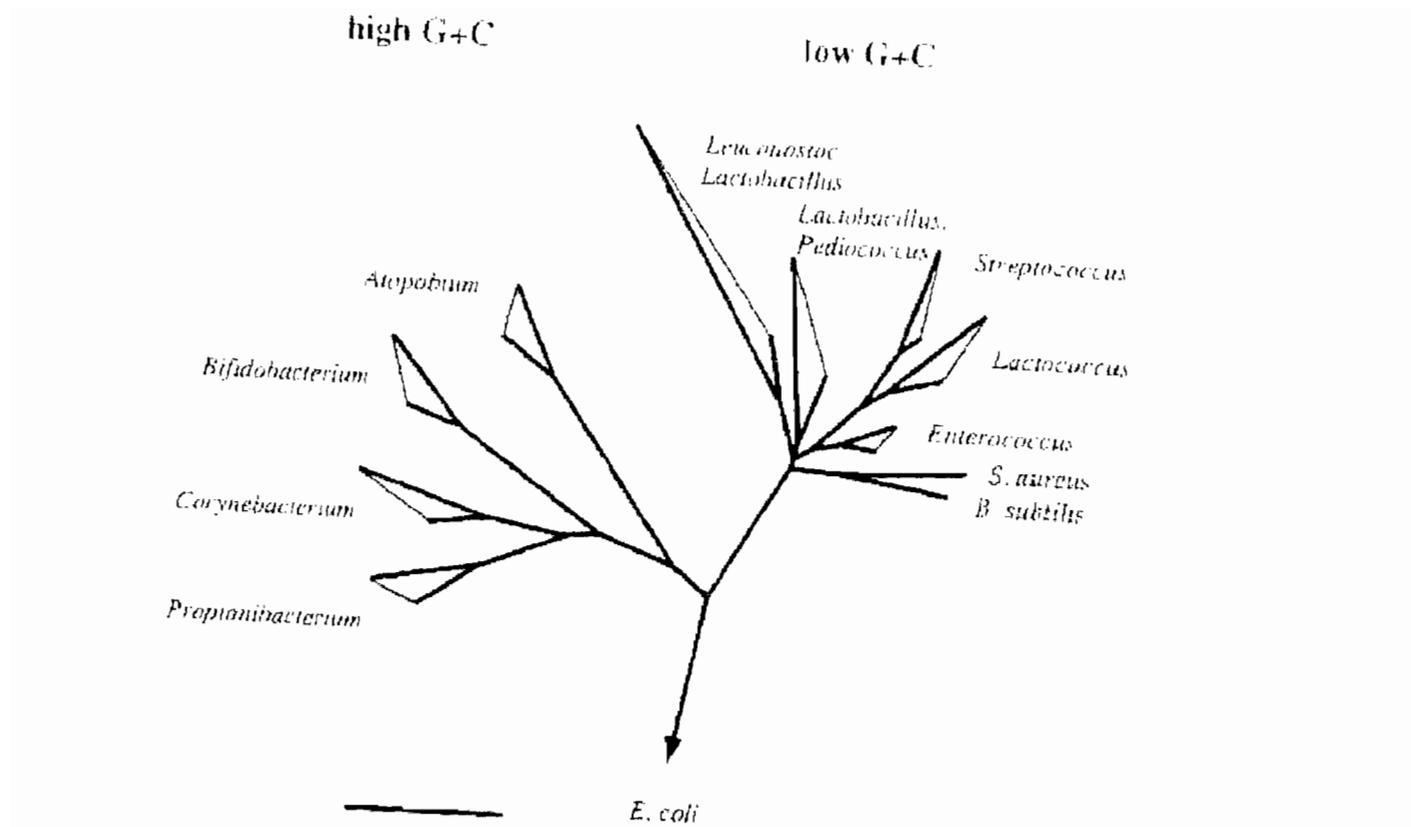


Fig 1 : Arbre Phylogénétique des bactéries Gram positives (Schleifer and Ludwig , 1995)

1.3 Les genres

Les différents genres qui forment le groupe des bactéries lactiques, sont des cellules en forme de coque et de bacilles.

Ce sont :

Aerococcus, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*

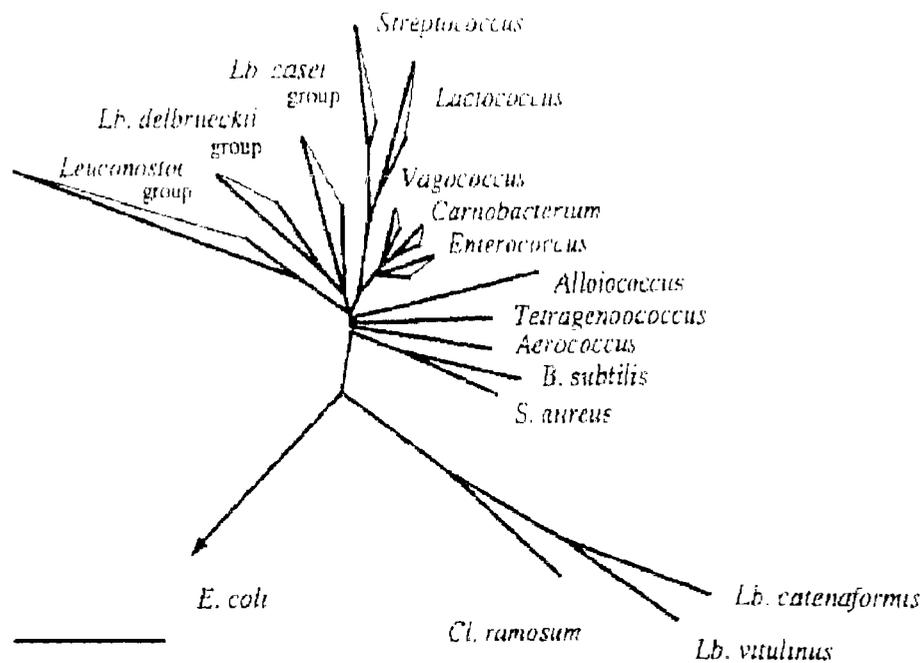


Fig 2: Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et d'autres bactéries apparentées (Schleifer and Ludwig , 1995)

1.4 Caractéristiques générales

Le métabolisme des bactéries lactiques

La conversion des sucres en acide lactique utilise deux voies :

- la voie homofermentaire ou glycolyse qui donne deux molécules de lactate par molécules de glucose (Figure 3).
- la voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates donnant un lactate, un acétate et une molécule de CO₂ par molécule de glucose (Figure 4).

Le glucose est transformé principalement en lactate après la glycolyse. Les bactéries lactiques sont très dépendantes des sucres comme source d'énergie, elles acidifient donc le milieu très

rapidement, en raison de la transformation de ces sucres en acides organiques. Ainsi, dans des conditions d'anaérobiose stricte, 95 % du glucose est transformé en lactate, le reste se retrouvant dans les parois et les lipides. La conversion des sucres en acide lactique est la principale voie métabolique fournissant l'énergie aux bactéries lactiques. Cette conversion est également impliquée dans la production d'une grande quantité de molécules conférant des propriétés organoleptiques particulières aux produits finaux (Cherl-Ho , 1997 ; Daly and Davis , 1998). Le métabolisme des sucres va conduire, à la production de l'acide lactique et à un fort abaissement du pH, ce qui est recherché pour la fabrication de certains produits alimentaires. Ce processus est avant tout indispensable aux bactéries elles-mêmes, car il leur fournit l'énergie dont elles ont besoin.

Les bactéries lactiques homofermentaires convertissent en excès quantitativement le glucose en acide lactique (>90%). Le glucose (ou le lactose dans le cas du lait) est transporté par un système actif et selon les espèces il peut être phosphorylé lors du transport à travers la membrane cellulaire. Dans ce cas, par exemple, les lactocoques mettent en jeu un système phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle le sucre aux dépens du phospho-énoypyruvate (PEP). Le PEP est à la fois un produit et un réactif de la fermentation des sucres. C'est également un donneur de haute énergie phosphorylé qui joue un rôle-clé dans les étapes du transport et du métabolisme des sucres. Chez, par exemple, les lactocoques et certains lactobacilles, le lactose du lait apparaît dans la cellule sous forme de glucosyl- β -(1, 4)-galactoside-6-P (ou lactose-P). Il est donc prêt à être hydrolysé par une β -D-phosphogalactosidase. A l'opposé, les streptocoques thermophiles, des lactobacilles et des leuconostocs transportent le lactose sous forme libre, par l'intermédiaire d'un système perméase, puisque la présence systématique d'une β -galactosidase a été démontrée. Le glucose ou le glucose-phosphate en résultant est alors dégradé suivant la voie glycolytique de Embden-Meyerhof-Parnas (voie EMP). Le galactose-6-phosphate est catabolisé selon la voie du D-tagatose-6-phosphate. Les germes homofermentaires utilisant la voie EMP dans

la dernière étape de la glycolyse convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du NAD⁺ à partir du NADH. C'est précisément cette étape-clé qui permet au cycle de fonctionner. Toutes les bactéries lactiques possèdent donc une lactate-déshydrogénase.

Les germes hétérofermentaires utilisent les voies du tagatose-6-phosphate, de la glycolyse, et des pentoses-phosphate. La fermentation lactique des hétérofermentaires conduit à la formation de quantités équimoléculaires de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique avec dans certains cas une production de formiate et d'acétate en aérobiose.

Les bifidobactéries métabolisent le glucose en 1 mole de lactate et 1,5 moles d'acétate sans formation de CO₂. Elles sont caractérisées par l'absence d'aldolase, des taux très faibles de phosphofructokinase, et par la présence de la fructose-6-phosphate phosphocétolase.

La conséquence pratique, pour le produit alimentaire siège d'une fermentation lactique, est que les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans l'inhibition des flores nuisibles à la technologie ou dans celle des flores pathogènes. Deux facteurs principaux, parfois difficilement dissociables, doivent être pris en compte : le pH et les acides (lactique et acétique produits). Parmi les bactéries non lactiques, rares sont celles qui peuvent croître à des valeurs de pH inférieures à celles obtenues avec les germes lactiques. Ainsi, une bonne acidification lactique entraîne une inhibition de la croissance de *Escherichia coli*, des *Pseudomonas*, des *Salmonella*, des *Clostridia* ou de *Listeria monocytogenes*. En général, c'est la forme moléculaire (non dissociée) de l'acide lactique qui est le facteur toxique pour les bactéries indésirables. Par comparaison, l'acide acétique est beaucoup plus toxique que l'acide lactique. En milieu faiblement tamponné, les deux acides agissent en synergie: l'acide lactique contribue à diminuer le pH du milieu, augmentant ainsi la toxicité de l'acide acétique vis à vis des autres bactéries.

La sensibilité des bactéries aux acides dépend des autres paramètres du milieu : teneur en sel, activité de l'eau, potentiel d'oxydo-réduction, sécrétion d'une bactériocine par les bactéries lactiques elles-mêmes.

Les principales propriétés métaboliques des bactéries lactiques ayant des conséquences dans les produits alimentaires sont principalement : l'utilisation des sucres, l'utilisation des sources azotées, le métabolisme de l'oxygène, la production de bactériocines.

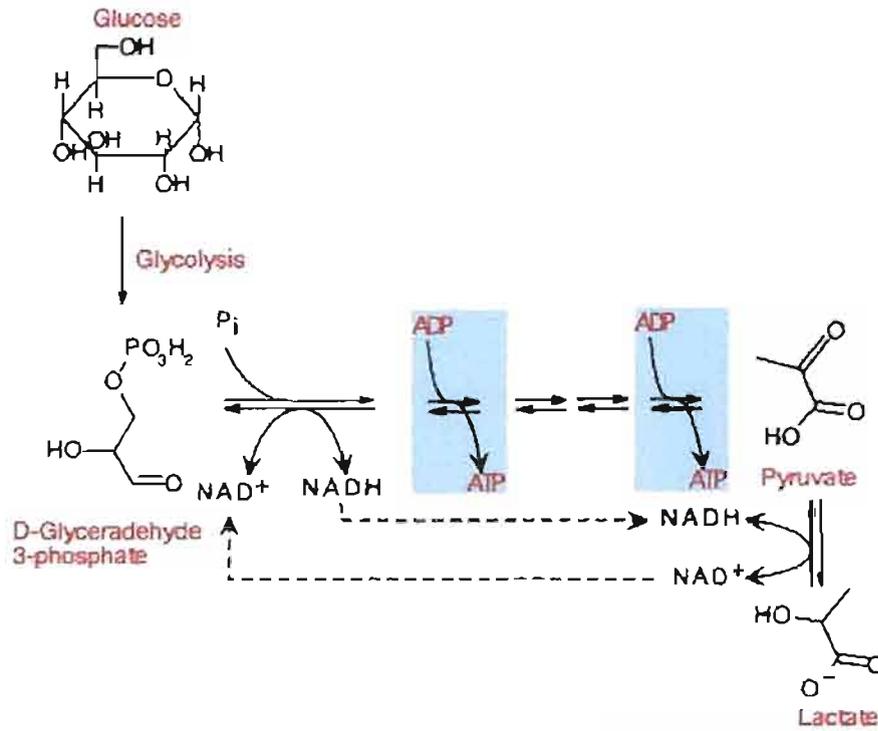


Fig 3 : Voie Homofermentaire ou Glycolyse

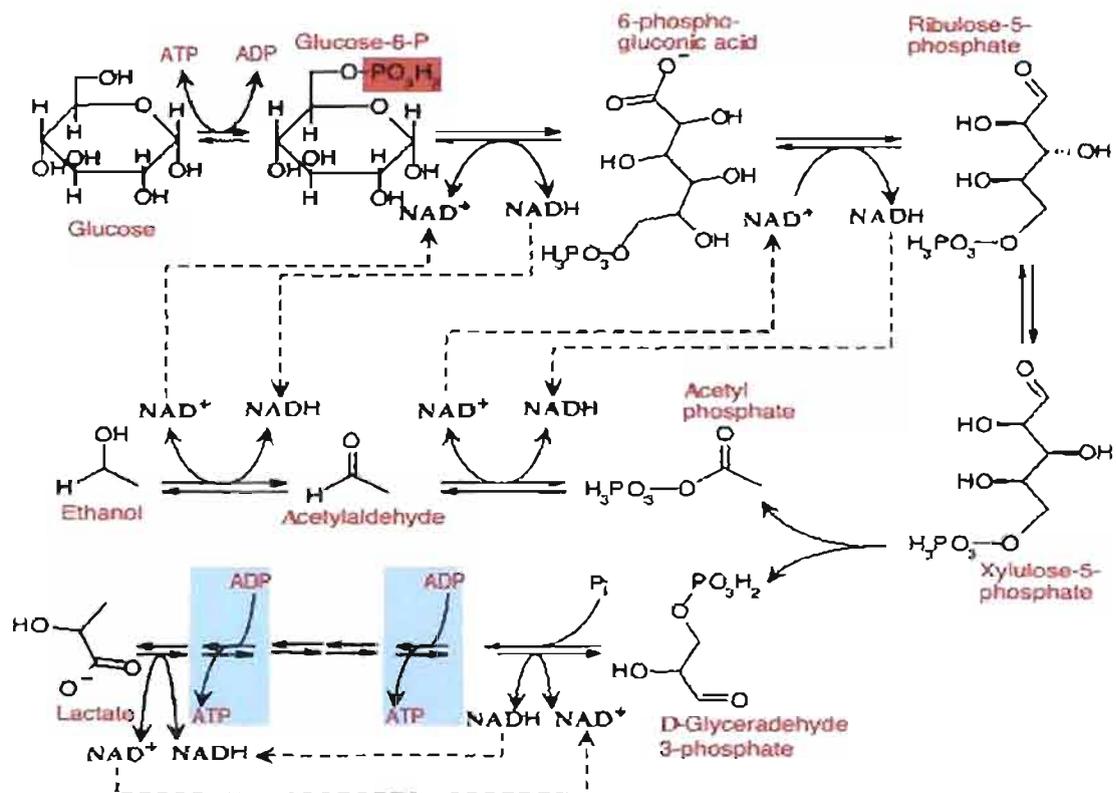


Figure 4 : Voie Hétérofermentaire ou Voie des pentoses phosphates

1.4.1 Utilisation des sources azotées

Les bactéries lactiques exigent la fourniture exogène d'acides aminés pour leur croissance, car elles sont en général, incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée minérale simple. Selon les matières premières considérées, les bactéries lactiques ne satisferont qu'une partie de leurs besoins par les acides aminés libres, elles utiliseront aussi les peptides courts (De Roissart et Luquet , 1994).

Le problème que rencontrent alors les souches est celui du transport de ces acides aminés et peptides, à travers les enveloppes bactériennes. Ce transport est un système, dépendant de l'énergie et de la température, pouvant être facilement saturé. Une dépendance vis-à-vis du pH et de la concentration en sels a également été démontrée (De Roissart et Luquet , 1994).

Dans certaines matières premières toute la fraction contenant les acides aminés libres et les peptides de bas poids moléculaire sont utilisés par la bactérie lactique. Les concentrations en acides aminés seraient encore trop faibles pour assurer la croissance optimum de cette dernière, qui doit mettre en œuvre des enzymes protéolytiques pour se procurer des peptides lui fournissant des nutriments supplémentaires. Chez différents genres de bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*), c'est une protéase, liée aux enveloppes cellulaires grâce aux ions calcium, qui réalise la première étape du processus de dégradation des protéines. C'est à ce niveau que certaines souches peuvent avoir des problèmes de croissance dans un milieu complexe. Certaines souches de bactéries lactiques produisent, avec une fréquence élevée, des variants «lents» qui ne se développent qu'à une densité de protéines très inférieure à celle de la souche mère. L'arrêt de la croissance de ces variants est en effet lié à l'épuisement rapide des faibles quantités d'acides aminés libres et de peptides courts présentes dans la matière première (Champagne , 1998). Ces variants, désignés protéases négatives (prt^-), résultent de la perte de leur protéase de paroi, ce qui les rend incapables d'utiliser les protéines du milieu de culture et de bénéficier de nutriments peptidiques supplémentaires. En général, ceci résulte de la perte d'un

plasmide codant pour la synthèse de cette protéase «de paroi». Ensuite, les peptides résultant de cette protéolyse seront hydrolysés jusqu'au stade d'acides aminés par différentes peptidases membranaires et cytoplasmiques, après leur transport dans le cytoplasme.

De plus, grâce à ces différentes enzymes, les bactéries lactiques pourront participer à la maturation de certains produits alimentaires.

1.4.2. Métabolisme du citrate et d'autres substrats carbonés

Les bactéries lactiques, en plus de leur pouvoir fondamental d'acidification et d'assainissement, sont aussi utilisées pour leur capacité à produire des composés aromatisants. Les milieux naturels des bactéries lactiques renferment souvent de l'acide citrique, mais aussi, pour certains végétaux, de l'acide malique, tartrique ou du glycérol. L'acide citrique peut être utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* pour la production d'arôme.

Dans les produits laitiers fermentés, le co-métabolisme, sucre fermentescible/acide citrique est considéré comme le principal précurseur de l'arôme du beurre (le diacétyle). En œnologie, on attribue aussi la formation d'acétate, d'acétoïne et de diacétyle au catabolisme de l'acide citrique (De Roissart et Luquet, 1994).

Par ailleurs, le pyruvate peut aussi être hydrolysé par la pyruvate formiate lyase en acétate et formiate *Bifidobacterium*. *Pediococcus halophilus* produit uniquement de l'acide formique et de l'acide acétique à partir du pyruvate. L'acide citrique est aussi métabolisé par cette voie par *Lactobacillus brevis*, *Lb. casei* et *Lb. plantarum*.

Un petit nombre de bactéries lactiques fermentent le glycérol. C'est le cas de *Pediococcus halophilus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lb. helveticus* ou *Lb. reuteri*. Ce dernier dégrade le glycérol en formant des quantités égales de triméthylène glycol et d'acide β -hydroxypropionique. Ce schéma métabolique, en présence d'une forte concentration de glycérol, peut conduire à la production d'une substance antimicrobienne, la reutérine, actuellement

commercialisée pour lutter contre les bactéries pathogènes dans certains produits alimentaires.

1.4.3. Métabolisme de l'oxygène

Les bactéries lactiques sont souvent appelées bactéries anaérobies facultatives. Certaines sont très sensibles à l'oxygène (*Bifidobacterium sp.*), d'autres beaucoup moins sensibles (*Lactobacillus plantarum*). Généralement, les chaînes transportant les électrons ne fonctionnent pas, mais des étapes d'oxydo-réduction du NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) interviennent. Dans les conditions d'aérobiose, chez la plupart des bactéries lactiques, les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou une molécule d'eau (H_2O) grâce à des NADH : H_2O_2 ou NADH : H_2O oxydases. De plus, diverses enzymes conduisent généralement à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène qui est plus ou moins toxique pour la bactérie lactique productrice. Notamment dans le cas du lait, le peroxyde d'hydrogène est le constituant d'un système inhibiteur naturel devant comporter aussi une peroxydase et du thiocyanate comme accepteur d'électrons. La peroxydase du lait est la lactoperoxydase, enzyme assez thermorésistante, trouvée à environ 70 mg/litre. Le thiocyanate vient de la catalyse, dans le foie, de thiosulfate ou de glucosides particuliers de l'alimentation des vaches laitières, notamment ceux des crucifères ou de certaines légumineuses. Si le lait contient de l'oxygène dissous, le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques dans ces conditions va activer l'oxydation du thiocyanate par la lactoperoxydase, en un intermédiaire oxydé : l'hypothiocyanate. Ce composé est un inhibiteur de la croissance microbienne car il bloque le fonctionnement de certaines enzymes-clés intervenant dans la glycolyse, comme l'hexokinase. L'action bactériostatique de ce système entraîne des irrégularités d'acidification par les bactéries lactiques, qui peuvent ainsi s'autoinhiber car ils y sont sensibles. Cependant, on peut sélectionner les bactéries lactiques qui y sont résistants. Mais, comme il peut être bactéricide pour certaines bactéries de contamination, voire pathogènes, la Fédération internationale de laiterie a proposé d'utiliser les propriétés de ce système inhibiteur pour améliorer la conservation temporaire du lait

cru dans les pays chauds dépourvus d'équipement de réfrigération. En effet, il est possible d'activer le système lactoperoxydase du lait cru en le supplémentant par 8 à 9 ppm de H₂O₂ et par 10 ppm de thiocyanate, pour pallier les variations naturelles des concentrations de thiocyanate dans la matière première ou de production de H₂O₂ par les bactéries. Cette addition entraîne la formation *in situ* du système antimicrobien. Le procédé est d'autant plus intéressant que les produits actifs de l'oxydation du thiocyanate sont instables et sont aussi détruits par la pasteurisation. Il a été prouvé qu'il n'y avait aucun risque toxicologique aux doses de thiocyanate utilisées. Ainsi, le système lactoperoxydase activé est beaucoup plus spécifique que l'oxydation générale qui pouvait être obtenue par addition de 300 à 800 ppm de H₂O₂ dans le procédé approuvé par la FAO.

1.5 Utilisation des bactéries lactiques

1.5.1. Les principales utilisations des bactéries lactiques en alimentation humaine

De très nombreux produits alimentaires subissent une fermentation lactique avant leur consommation. Celle-ci leur assure des caractéristiques bien particulières d'arôme et de texture, mais aussi une bonne sécurité alimentaire par rapport aux bactéries indésirables grâce aux acides organiques produits. Les bactéries qui en sont responsables sont toutes regroupées sous la même appellation de "bactéries lactiques" bien que ce terme concerne des germes très différents (Novel, 1993 ; Roissart et Luquet, 1994 ; Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Soomro et Kiran, 2002).

Dans un certain nombre de cas, la fermentation lactique est spontanée et la qualité des produits finaux obtenus est très variable. Aussi, au fur et à mesure de l'industrialisation de certaines fabrications, les technologues ont bien connu ces bactéries et les utilisent dans des conditions définies. Après sélection de souches spécialement adaptées aux fabrications, les technologues cherchent actuellement à leur appliquer les techniques récentes du génie génétique afin de mieux les exploiter (Gasson, 1993).

Ainsi, tous les types de produits alimentaires sont concernés. Au niveau des produits animaux, le lait est transformé en fromages, crèmes et beurre, yaourts et autres laits fermentés. La viande est transformée en des saucisses fermentées ou en des produits saumurés secs, le poisson est utilisé dans différentes préparations. Dans de nombreux pays, les produits végétaux subissent aussi une fermentation lactique pour la production de boissons (vins, bières, cidres), des pains, dans la transformation du soja, du chou en choucroute ou de différents végétaux ou fruits (Roissart et Luquet, 1994 ; Daly et Davis, 1998 ; Soomro et Kiran, 2002).

L'utilisation prolongée des bactéries lactiques dans les techniques traditionnelles et leur consommation à forte dose dans certains produits connus de tous temps, sans qu'aucune toxicité n'ait été démontrée, militent naturellement pour leur innocuité. Cependant, certaines espèces sont pathogènes (germes causant des mammites) et sont donc rejetées des fabrications alimentaires. Des cas particuliers d'infections cliniques par des souches de genres normalement non pathogènes ont été rapportés (Gasser, 1994). De nouveaux produits sont développés notamment dans le secteur laitier compte tenu du fait que certaines souches de bactéries lactiques peuvent jouer un rôle bénéfique pour la santé humaine (Sanders, 1993 ; Gasser, 1994 ; Heyman, 2000 ; Meydani et Ha, 2000 ; Drouault et Carthier, 2001; Marteau *et al.*, 2001 ; Solis *et al.*, 2002).

Cas particulier de l'utilisation des bactéries lactiques au niveau des produits laitiers

Les bactéries lactiques sont à la base de la fabrication des fromages, des yaourts, des laits fermentés et du kéfir.

Selon les types de fromages considérés, la coagulation du lait est obtenue par les actions conjuguées des enzymes coagulantes et des bactéries lactiques (lactocoques essentiellement et/ou leuconostocs pour les fromages à pâte molle ou à pâte pressée; streptocoques thermophiles et lactobacilles thermophiles pour les fromages à pâte pressée cuite). Le rôle principal de ces bactéries est l'abaissement du pH du lait ou des caillés, selon des cinétiques spécifiques à chaque

fabrication. La production d'acide lactique, responsable de la chute du pH, se fait aux dépens du lactose du lait et du caillé.

Il existe dans le monde une très grande variété de types de yaourts et de laits fermentés obtenus à partir de lait de vache, de brebis, de chèvre, de jument, de bufflesse, d'ânesse ou de chamelle. On utilisera selon les cas, les streptocoques thermophiles, les lactobacilles thermophiles, les lactocoques, les leuconostocs et les lactobacilles mésophiles, bactéries lactiques associées à des levures (dans le cas du kéfir) ou à des bifidobactéries. Le yaourt constitue un bon exemple de produit de grande consommation qui a connu un essor industriel sans précédent au cours des trois dernières décennies dans le monde. La fermentation lactique est due essentiellement à la culture associée de deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. La maîtrise de la croissance et des métabolismes de cette culture mixte qu'est le yaourt a une conséquence dans la régularité des qualités finales. Cette maîtrise dépend des interactions (stimulation ou inhibition) entre les espèces qui perturbent la stabilité des équilibres bactériens. La dégradation du lactose, sucre du lait, est le fait marquant de la transformation du lait en yaourt. L'activité de *S. thermophilus* conduit à de l'acide lactique de forme L(+) tandis que *Lb. bulgaricus* conduit à l'acide lactique D(-). Comme ces bactéries métabolisent plutôt la moitié du glucose du lactose, le galactose est rejeté hors de la cellule et s'accumule dans le yaourt. Le pH atteint variant entre 4,35 et 4,50, le complexe calcium-caséines-phosphate est déstabilisé car les caséines sont proches de leur point iso-électrique (pH= 4,6). Ceci entraîne la prise en masse du produit et la formation d'un coagulum assez fragile.

On attribue classiquement un rôle de premier plan à l'acétaldéhyde dans la perception de l'arôme du yaourt, encore qu'un certain nombre d'autres produits aromatiques figurent parmi les nombreux composés volatils que révèlent les techniques d'analyse fine. Un rapport acétaldéhyde/acétone voisin de 2,8 est par exemple considéré comme optimum. La voie importante de production d'acétaldéhyde par les bactéries thermophiles du yaourt ne provient pas

du métabolisme du lactose mais passe par la dégradation de la thréonine par une thréonine-aldolase ; les produits de la réaction étant l'acétaldéhyde et la glycine. Selon les conditions de culture, on attribue une activité thréonine-aldolase plus importante aux lactobacilles qu'aux streptocoques (Daly et Davis , 1998 ; Caplice et Fitzgerald , 1999).

Pour la fabrication des yaourts brassés, on constate que l'onctuosité du produit pourrait être améliorée en utilisant des souches particulières produisant un épaissement du lait supérieur à celui obtenu par la simple prise en gel du lait sous l'effet de l'acidification. Ces souches épaisissantes sont intéressantes car elles améliorent la texture du yaourt . Elles évitent ainsi au cours des différentes étapes de fabrication du yaourt brassé et de son stockage, une séparation du lacto sérum et des caséines coagulées. Comme elles augmentent l'onctuosité du produit, elles diminuent les quantités de poudre de lait additionnée, ce qui permet de réaliser des économies appréciables au niveau industriel et de structurer les produits par une méthode naturelle car dans la plupart des pays, l'utilisation d'agents texturants exogènes est interdite dans les yaourts. Actuellement il est démontré que des polysaccharides interviennent dans la création de la viscosité. Chez *Lb. bulgaricus*, les filaments de polysaccharides lient les cellules les unes aux autres structurant la micro-colonie. Ils connectent aussi les cellules bactériennes qui les produisent à la matrice du yaourt constituée des caséines précipitées par l'acidification.

Le kéfir lacté fabriqué avec des «grains» stabilisés contient une microflore variée car les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles sont associées dans la masse de polysaccharide du grain avec des bactéries acétiques et des levures. Ce sont les lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. brevis* et *Lb. kefir*) qui sont les plus représentés mais les kéfirs contiennent aussi des lactobacilles homofermentaires thermophiles (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*) ou mésophiles (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*) et des leuconostocs.

Produits carnés

Les saucisses fermentées semi-séchées se caractérisent par une fermentation souvent rapide à des températures relativement élevées (21 à 46 °C): les pH finaux sont souvent inférieurs à 5,3. Les saucisses fermentées séchées ou les saucissons secs subissent une fermentation lente pendant plusieurs jours à des températures relativement basses de 11 à 23°C avant d'être séchées pendant plusieurs semaines en chambre froide. Leur teneur en eau est faible. En prenant en exemple le saucisson sec français, on constate que les bactéries à Gram négatif disparaissent au cours de l'étuvage, les bactéries à Gram positif *Brochothrix* et *Enterococcus* se multiplient pendant la phase d'étuvage, mais leur croissance s'arrête dès le début du séchage alors que les Micrococcaceae se multiplient. Les lactobacilles ont quant à eux un développement rapide. Au début de l'étuvage se développent *Carnobacterium divergens* et *Cb. piscicola*. Ces espèces disparaissent en cours de maturation pour laisser la place à *Lactobacillus curvatus* et *Lb. sake*.

Pour obtenir des produits de qualité constante, on utilise en Europe des ferments sélectionnés composés de souches de *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Lactobacillus*. La dégradation des lipides par les lactobacilles est faible dans les produits carnés fermentés. En revanche, on recherche une certaine protéolyse parce que les peptides et les acides aminés sont des précurseurs d'arômes dans ces produits. Par ailleurs, les lactobacilles produisent des peroxydes et de l'eau oxygénée qui s'accumulent dans le milieu malgré la présence des catalases tissulaires et microbiennes. Ces composés ont une action antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas*. Les lactobacilles produisent aussi des bactériocines actives contre les germes potentiellement pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, les pedicoques produisent la pédiocine, *Lb. plantarum* sécrète deux plantaricines et *Lb. sake* synthétise la sakacine.

Produits de la pêche

La plupart de ces produits sont obtenus par des pratiques ancestrales empiriques, notamment en Asie où les bactéries lactiques n'interviennent pas seules mais associées à d'autres

fermentations, à des hydrolyses enzymatiques, voire à des réactions purement chimiques. Dans les pays scandinaves, le hareng est mis en tonneaux avec 15 à 17% de sel, du sucre et des épices. On obtient les *gaffelbitar* ou *tibbits* où *Pediococcus halophilus* est le plus fréquent avec *Lactobacillus buchneri*, *Lb. brevis* et *Leuconostoc mesenteroides*. Les sauces obtenues à partir de poissons (notamment *nuoc-nam* vietnamien, *nam pla* thaïlandais, *pathis* philippin, *teuk-trei* cambodgien et *budu* malais) représentent des volumes consommés considérables. Si la plupart des phénomènes sont dus à des activités protéolytiques dans le poisson, on attribue aussi un rôle au développement de *Pediococcus halophilus*. De même dans les pâtes de poisson asiatiques, on met en avant l'activité fermentaire de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus* ou *Pd. halophilus* et *Leuconostoc mesenteroides*.

Produits végétaux

On sait favoriser empiriquement la conservation des végétaux en réalisant sous l'action des bactéries lactiques, la production d'acide lactique inhibant les fermentations indésirables. En général cette opération est conjuguée avec un salage ou un saumurage dans les conditions les plus anaérobies possibles. En Europe, le chou est fermenté en choucroute, différents légumes et végétaux donnent les pickles aux États-Unis, le *kimchi* en Corée, le *miso* au Japon ou le *gari* en Afrique. La fermentation lactique des végétaux (choux, manioc, concombres, olives, betteraves rouges, carottes, navets, haricots verts, céleris, oignons, tomates vertes) est une technique largement utilisée dans les pays ne bénéficiant pas d'une structure industrielle, car elle peut être effectuée avec des moyens locaux très simples (Cooke *et al.*, 1987). Dans nombre de cas au départ après lavage de la matière première, les bactéries lactiques sont peu nombreuses. Elles appartiennent essentiellement aux espèces *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus damnosus*. Sous l'influence de l'acidité, *Lb. plantarum* arrête sa croissance en premier, *Lb. brevis* continuant la fermentation en utilisant les sucres résiduels comme les pentoses. Les olives vertes peuvent aussi être conservées après une phase de

fermentation en saumure. Avant cette étape, on débarrasse les olives de l'oleuropéine, glycoside très amer par un traitement à la soude. Ensuite, il faut réensemencer par *Lactobacillus plantarum* en présence de sel. Si au départ on a un développement de différents genres (*Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), il ne subsiste à la fin pratiquement que les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. En œnologie on recherche pour certains vins, en particulier les vins rouges, une désacidification par transformation de l'acide L-malique en acide L-lactique et en gaz carbonique. Il s'agit de la fermentation malolactique. La bactérie qui a été la plus étudiée est *Leuconostoc oenos* (nouveau nom proposé *Oenococcus oeni*) qui possède une enzyme malolactique et qui est dépourvue d'activité lactate déshydrogénase. Par ailleurs, on peut isoler du vin des lactobacilles homofermentaires et des coques hétérofermentaires pouvant utiliser les citrates. Ils conduisent donc à des facteurs d'arôme. Habituellement, on considérait que la fermentation malolactique se déclenchait spontanément mais pour en assurer une plus grande régularité, on a étudié les possibilités d'induction de cette fermentation par addition de bactéries. Les échecs rencontrés dans cette technique de réensemencement peuvent provenir des problèmes de sélection de souches qui doivent être capables de résister à des pH acides, à l'éthanol produit par les levures et éventuellement au SO₂ ajouté. De plus les températures de conservation sont en général basses, ce qui rend la fermentation malolactique difficile à maîtriser dans le vin.

1.5.2. Les rôles bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé humaine

C'est vraisemblablement Metchnikoff qui, le premier vers 1908, a suggéré d'utiliser les laits fermentés contenant une souche de lactobacilles, capables de vivre dans le tractus intestinal, comme composants d'une alimentation utile à la santé humaine.

Les effets bénéfiques des bactéries lactiques pour la santé des consommateurs sont reconnus depuis longtemps. Le zoologiste microbiologiste Ukrainien Ilia Ilitch (1845-1916) a mis en rapport la longévité de certains peuples, dont les Bulgares et la protection de l'organisme contre plusieurs

maladies par consommation de laits fermentés et ainsi l'ingestion de grandes quantités de bactéries lactiques

Pour que les bactéries lactiques puissent avoir un rôle bénéfique sur la santé humaine, il faut qu'elles gardent une certaine activité, voire une viabilité lors du transit intestinal. Ainsi, les bactéries elles-mêmes ou les enzymes doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires. Aussi, de nombreux auteurs (Wood, 1992 ; Meydani et Ha, 2000 ; Marteau *et al.*, 2001 ; Soomro et Kiran, 2002 ; Solis *et al.*, 2002) se sont intéressés, d'une part, à l'influence d'une alimentation à base de produits riches en cultures de micro-organismes sur l'écologie du tube digestif et, d'autre part à l'influence sur la santé d'une alimentation avec des produits laitiers contenant des cultures de micro-organismes.

Actuellement ce sont le yaourt et ses ferments vivants (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) et les laits fermentés contenant des bifidobactéries (Tamime *et al.*, 1995) et *Lactobacillus acidophilus* ou *Lb. casei* qui ont fait l'objet des recherches les plus approfondies. Les bactéries lactiques peuvent prévenir les maladies gastro-intestinales, les diarrhées (Marteau *et al.*, 1998). Guandalini et ses collaborateurs en 2000 ont obtenu une guérison rapide des diarrhées à rotavirus de 287 enfants âgés de 1 à 36 mois administrés avec *Lactobacillus rhamnosus* GG comparés à ceux qui avaient reçu un placebo.

Effets sur le transit et sur la flore intestinale

Souvent, les laits acidifiés ou le yaourt sont utilisés pour lutter contre les diarrhées, notamment chez les jeunes enfants, en particulier ceux qui seraient, de plus, mal nourris. L'ingestion de ferments lactiques peut contrer les effets d'une prolifération de certaines souches pathogènes d'*Escherichia coli* par divers mécanismes: (a) production de substances (H_2O_2 , acides lactique et acétique) directement inhibitrices de *E. coli* ; (b) abaissement du pH par les acides produits; (c) détoxification par dégradation des entérotoxines ;(d)prévention de la synthèse d'amines toxiques ; (e) fixation sur le tube digestif empêchant la colonisation de pathogènes, ou

effet barrière par compétition métabolique s'il n'y a pas d'attachement. *Lactobacillus bulgaricus* ne s'implante pas dans le tube digestif et y survit difficilement à cause de sa faible tolérance aux sels biliaires, de son peu de résistance aux pH acides. En revanche, *Streptococcus thermophilus*, et surtout *Lb. acidophilus*, survivent beaucoup mieux dans l'intestin. Ce dernier germe a fait l'objet de développements industriels récents car il a été montré qu'il pouvait s'opposer à la prolifération de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium*, de *E. coli* entéropathogène ou de *Clostridium perfringens*. Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés: d'une part, certaines souches de *Lb. acidophilus* produisent du peroxyde d'hydrogène et, d'autre part, elles peuvent sécréter des substances peptidiques de type bactériocines dénommées «lactacin B», «lactocidin» ou «lactacin F». Un autre aspect intéressant est l'effet des bactéries lactiques sur le métabolisme de la flore intestinale normale. Elles peuvent abaisser les quantités de certaines enzymes (β -glucuronidase, azoréductase ou nitroréductase) formées par cette flore. La réduction des activités de ces trois enzymes de la flore intestinale est intéressante, car elles sont associées à la formation de carcinogènes. Des souches de *Bifidobacterium bifidum* possèdent aussi des capacités d'inhibition de flore pathogène comme *Clostridium difficile*.

Amélioration de l'intolérance au lactose et Amélioration de la digestion du lactose

L'apparition de symptômes digestifs après ingestion de lait peut être liée au lactose notamment par l'incapacité de le digérer par manque de lactase de la muqueuse intestinale. Chez les adultes, les symptômes digestifs d'intolérance au lactose sont principalement des douleurs abdominales, crampes, flatulences. Chez le jeune enfant, l'importance clinique de l'intolérance au lactose est plus grande, avec diarrhées acides et selles contenant des sucres réducteurs. Il a été clairement démontré que le yaourt permet l'absorption du lactose chez les sujets déficients en lactase et qu'il améliore les symptômes digestifs d'intolérance au lactose. Il faut noter que ces effets bénéfiques disparaissent lorsque le yaourt a subi un traitement thermique. Ceci signifie que l'action

favorable n'existe que si les bactéries sont vivantes et leur lactase (β -galactosidase) actives. Un chauffage rapide du yaourt inhibe les bactéries lactiques et la lactase. Les *Bifidobacterium* ont un type fermentaire acétique-lactique-formique intéressant du fait que l'acide lactique formé est de forme L(+). Or, on sait que cette forme L(+) est totalement métabolisée et qu'il ne faut pas craindre, chez les jeunes enfants, certains inconvénients qui peuvent être observés avec les formes DL ou D(-) produites par les lactobacilles.

La production d'acide lactique, la lipolyse et la protéolyse effectuées par les bactéries lactiques stimulerait la digestion des aliments. L'intolérance au lactose observée chez certaines personnes peut être combattue par l'utilisation des laits fermentés comme le yaourt dans lequel le lactose est dégradé en acide lactique mais aussi à cause de l'apport en β -galactosidase. La flore intestinale endogène exerce de nombreuses fonctions physiologiques, telles que des métabolismes (fermentation...) et un effet de barrière s'opposant à la colonisation par des microorganismes pathogènes. La résultante pour l'hôte est souvent bénéfique mais parfois néfaste.

Activité hypocholestérolémiante

Trois observations principales expliquent l'activité hypocholestérolémiante des probiotiques :

- (a) La première observation date de 1974, lorsque Mann et Spoerry (1974) démontrèrent que chez les tribus Masai, qui pratiquent l'élevage du bétail, le taux bas de cholestérol dans le sang s'explique par la consommation journalière de lait fermenté par des souches sauvages de bactéries lactiques.
- (b) La deuxième observation est de Eyssen (1973) qui a montré par des expériences menées sur des animaux « axéniques » que la microflore intestinale a un effet direct sur la teneur en cholestérol du sang.

(c) La troisième observation est de Gilliland (1985) qui a montré que certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol.

Les probiotiques semblent également posséder une action anticholestérolémiante. En effet, certaines bactéries lactiques inhiberaient la conversion de l'acétate en cholestérol. L'ingestion de *Lb acidophilus* diminue le taux de cholestérol dans le sérum sanguin de la rate.

Action anticarcinogène et action sur le système immunitaire

Les bactéries lactiques semblent provoquer des réactions immunitaires in vivo. Une réaction spécifique est obtenue avec une espèce de *Lb casei* qui provoque une stimulation contre une infection à *Salmonella typhimurium*. Le yaourt peut servir de produit préventif contre les diarrhées à *Salmonella* et à *E. coli*. Les probiotiques stimuleraient la production d'immunoglobuline (Production d'Ig G2 chez des souris suite à l'ingestion de yaourt). Le yaourt aurait un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses en culture.

Plusieurs études ont démontré que les EPS ont une activité anti-cancérogène.

Kitazawa et ses collaborateurs (1991) ont postulé que l'EPS produit par *Lactococcus lactis ssp. cremoris* KVS 20 est responsable d'un effet anti-tumoral de cette souche. Ceci a été observé lors d'injections intrapéritonéales chez des souris. Dans une étude subséquente, Kitazawa et ses collaborateurs (1996) ont attribué à un exopolysaccharide produit par cette souche une activation des macrophages et l'induction de la production de cytokine.

Les mêmes auteurs ont fractionné l'EPS produit par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL 1073R-1 en un polysaccharide neutre et un polysaccharide acide. La fraction acide composée de glucose, galactose et phosphate a démontré une activité mitogénique sur les lymphocytes B, dirigée par le groupement phosphate. Une activité mitogénique a aussi été observée in vitro pour un polysaccharide d'une taille de $1,5 \times 10^6$ Da produit par *Bifidobacterium adolescentis* M101-4 (Hosono *et al.* 1997). Un effet anti-cancérogène a été trouvé in vitro et in vivo pour les

polysaccharides capsulaires de *Bifidobacterium breve* YIT4014 et 4043 et *Bifidobacterium bifidum* YIT 4007 (Nagaoka *et al.*, 1994). Ces polysaccharides étaient composés principalement de rhamnose. Il a été montré que les polysaccharides contenant plus de 60% de rhamnose se sont montrés plus efficaces pour le traitement du cancer gastro-intestinal. Tous les travaux mentionnés jusqu'ici ont été fait in vitro ou par injection de l'EPS à des rats ou des souris. Très peu d'expériences ont été réalisées in vivo avec administration orale de l'EPS. Zubillaga *et al.* (2001) ont administré l'EPS KGF-C oralement. Les auteurs ont observé un retardement de la croissance des cellules cancéreuses par cet EPS soluble dans l'eau et extrait de grains de kéfir.

Les probiotiques et prebiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes ingérés vivants capables d'exercer des effets bénéfiques sur leur hôte. Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans les aliments notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des médicaments et volontiers sous forme lyophilisées (Marteau, 1998). Les genres bactériens les plus utilisés sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Saccharomyces*.

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui ont des effets bénéfiques sur leur hôte en stimulant de façon sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou plusieurs bactéries présentes dans le côlon. Les prébiotiques favorisent le développement des probiotiques dans l'intestin.

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes...) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif. Les critères de sélection des bactéries pour la constitution des probiotiques sont : non cariogénique , non pathogène , résistante aux enzymes digestives buccales et gastriques, au pH acide de l'estomac aux sels biliaires , avoir une capacité d'adhérence aux cellules intestinales pour coloniser le tractus intestinal sans perturber la flore intestinale normale.

La consommation du lait à *Lactobacillus acidophilus* faciliterait le transit intestinal et combattrait la constipation. L'équilibre de la flore intestinale peut être rétabli par une consommation régulière du lait ou de yaourt à *Lb acidophilus* suite aux troubles causés par des antibiotiques. Les *Lb acidophilus* auraient cette aptitude à coloniser l'intestin et diminuent le nombre de Clostridies.

Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Certaines espèces de bactéries lactiques comme les *Lb brevis*, *Lb plantarum*, *Lb acidophilus*, *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus* produisent des antibiotiques actifs contre les bactéries Gram positives (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*) ou Gram négatives (*Pseudomonas*, *Escherichia* , *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, *Vibrio*).

L'élimination de bactéries pathogènes intervient suite à la production de bactériocines, à une acidification du milieu qui entraîne une inhibition du métabolisme oxydatif et une diminution de pH intracellulaire.

2. LES EXOPOLYSACCHARIDES

2.1 Les exopolysaccharides des bactéries lactiques

Les exopolysaccharides sont des polymères de sucres et de leur dérivés. Ils sont synthétisés soit au niveau de la membrane cellulaire, soit dans le cytoplasme soit dans le milieu extérieur à la cellule.

Un certain nombre de bactéries lactiques utilisent plus de 70 % de leur énergie pour la production d'EPS dans le but d'obtenir des avantages sur leur environnement (Weiner *et al.*, 1995).

Tableau I: quelques exemples de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides

Genres	Exemples d'espèces
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> <i>Ln. mesenteroides ssp. cremoris</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbruekii ssp. bulgaricus</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. casei</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pc. damnosus</i>

2.1.1. Classification

Selon la composition en monomères des exopolysaccharides, on peut les classer en deux grands groupes qui sont : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides.

Les exopolysaccharides ne sont pas le produit direct de l'expression de gènes mais sont synthétisés de façon séquentielle par des enzymes : les glycosyltransférases. Ces enzymes catalysent le transfert d'un monosaccharide activé (généralement sous forme d'un nucléotide-sucre) sur un accepteur.

- Les homopolysaccharides qui sont composés par la répétition d'un seul type de monomère.

Les homopolysaccharides regroupent :

- les α D-glucanes qui sont constitués de D-glucose avec des liaisons

α -[1-6], α -[1-2], α -[1-3].

- les β D-glucanes qui sont constitués de D-glucose, ces unités sont liées par des liaisons, β (1-2), β (1-3).
- les fructanes qui sont constitués d'unités de fructose, ces unités sont liées par des liaisons β (2-1)
- les polygalactanes, constitués d'unités de galactose.

Plusieurs espèces de bactéries lactiques sont capables d'utiliser le sucre comme substrat pour la production de dextrane, de mutane et de levane (Sutherland, 1972). Les dextranes sont une classe de glucanes extracellulaires produit par les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*.

Les dextranes sont synthétisés hors de la cellule par une dextrane sucrase selon la réaction :



Leuconostoc mesenteroides et *Leuconostoc dextranicum* produisent des dextranes avec un pourcentage élevé (95%) de liaisons α -[1-6] et un faible pourcentage (5%) de liaisons α -[1-2], α -[1-3], α -[1-4].

Les gènes d'enzymes responsables de la formation d'homopolysaccharides ne font pas partie d'opérons. Ces enzymes sont extracellulaires ou localisées sur la face externe de la membrane cytoplasmique.

- Les hétéropolysaccharides, qui sont composés pour la plupart de différents types de monomères : Glucose, Galactose, Rhamnose, Fructose, Arabinose, Mannose et les Galactosamines (Cerning, 1990 ; Van den Berg *et al.*, 1995 ; De Vuyst et Degeest, 1999 ; Cerning et Marshall, 1999).

Les hétéropolysaccharides sont synthétisés dans la cellule au niveau de la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire des précurseurs nucléotidiques (Fig 5).

Les systèmes enzymatiques impliqués sont complexes. Les gènes déterminant les enzymes participants à la synthèse d'EPS et de polysaccharides capsulaires sont organisés en opéron eps, cps ou cap (Van kranenburg *et al.*, 1999). Une région centrale occupée par des gènes de glycosyltransférases est encadrée par les gènes nécessaires à la régulation, la polymérisation et l'export du polysaccharide (fig 6). Cet opéron peut être soit chromosomique, soit porté par un plasmide. Ainsi l'opéron eps de *Lactococcus lactis* NIZO B40 (Van kranenburg *et al.*, 1999b) est localisé sur un plasmide de 40 Kb comprenant également quatre replicons fonctionnels, des gènes de mobilisation et trois origines de transfert.

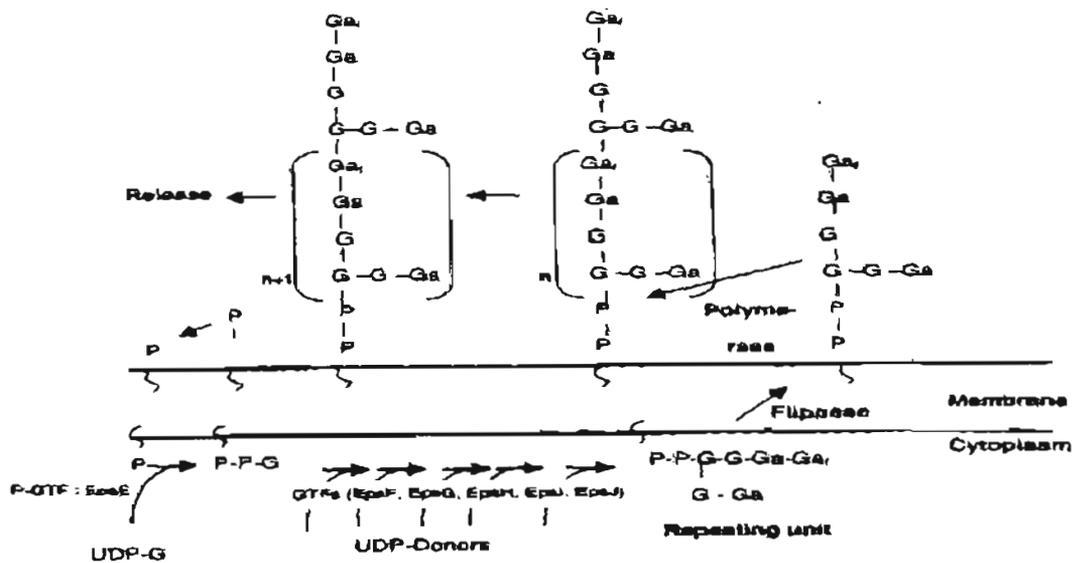


Fig 5 : Modèle de biosynthèse d'exopolysaccharides Chez *Lb. Helveticus* NCC2745 (Jolly , 2001 ; 2002a b)

Tableau II : Exemples d'homopolysaccharides bactériens (Lamothe, 2000)

Nom	Type de polysaccharide	Souche productrice
Cellulose	β -glucane	<i>Acetobacter xylinum</i>
Dextrane	α -glucane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Mutane	α -glucane	<i>Streptococcus mutans</i>
Puffulane	α -glucane	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Inuline	β -frutane	<i>Streptococcus mutans</i>
Levane	β -frutane	<i>Streptococcus salivarius</i>
Polygalactane	Autre	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>

Tableau III : Exemples d'hétéropolysaccharides bactériens

Polysaccharides	Souche productrice
Acetane	<i>Acetobacter xylinum</i>
Alginate	<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Gellane	<i>Pseudomonas elodea</i>
Acide hyaluronique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus sp.</i> Groupes A et C
Succinoglycane	<i>Rhizobium meliloti</i>
Xanthane	<i>Xanthomonas campestris</i>
CPSs	<i>Erwinia sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Haemophilus sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus sp.</i> Etc.
EPSs	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , etc.

2.1.2. Biosynthèse et génétique

Biosynthèse

Chez les bactéries lactiques productrices d'EPS d'une manière générale une région contenant 11 gènes (eps ABCDEFGHIJK) est responsable de la biosynthèse des exopolysaccharides, des polysaccharides capsulaires et des lipopolysaccharides. L'organisation des gènes responsables de la biosynthèse de différentes espèces de bactéries lactiques a été élucidée (Stingele, 1996) (figures 6, 7)

Ces figures donnent l'organisation des gènes responsables de la biosynthèse des EPS, de *Lactococcus lactis*, de *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (Stingele, 1996), *Lactobacillus bulgaricus* Lfi5 (van Kranenburg *et al.*, 1997)

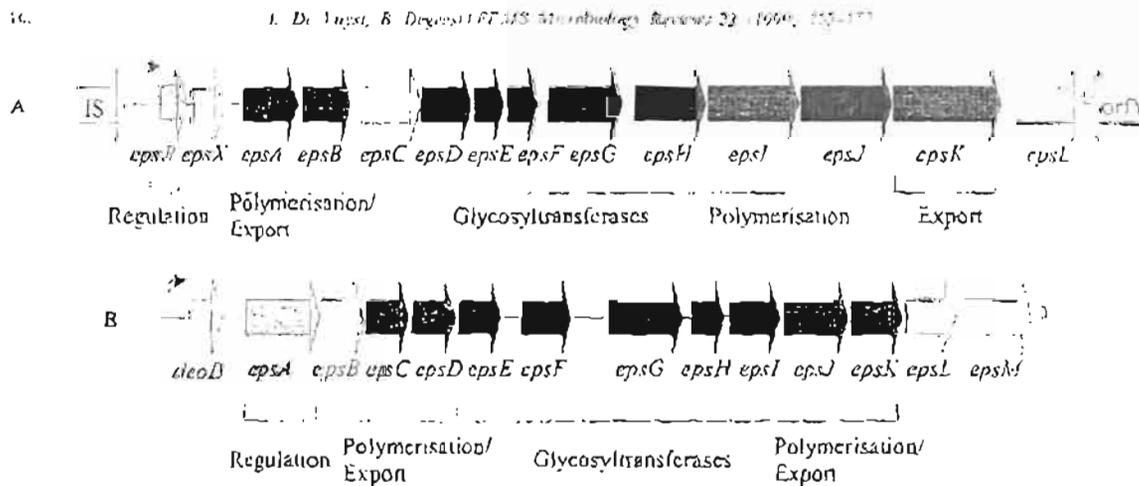


Fig 6 : Organisation génétique des groupes de gènes d'EPS de différentes bactéries lactiques . *S. thermophilus* Sfi6 , *S. thermophilus* Sfi39 , *S. thermophilus* NCFN2393 , *S. macedonicus* Sc136 , *L.b. Delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Lfi5 , *Lb. Helvencus* NCC2745 and *L.lactis* NIZO B40(Stingele , 1996) .

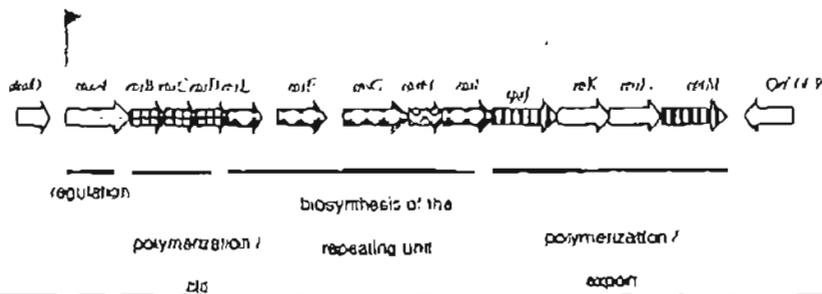


Fig 7 : Organisation des groupes de gènes de *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (Stingele, 1996)

3. La PCR

La PCR est une technique de Biologie Moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis. C'est une technique d'amplification génique, c'est à dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement.

Auparavant, une telle opération passait nécessairement par le clonage de la séquence, son isolement, son amplification dans une cellule hôte et sa purification. Cette méthode extrêmement lourde et longue a été abandonnée au profit de la PCR qui a certainement connu un développement spectaculaire et plus rapide dans l'histoire de la Biologie.

En effet à moins de 3 ans après sa mise au point, tous les laboratoires de biologie moléculaire l'utilisaient.

3.1 Principe de la PCR

Le principe de la PCR est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

Les « acteurs » qui interviennent en PCR sont :

1- l'ADN généralement sous forme double-brin, contenant le fragment à amplifier

2- **deux amorces, sens et anti-sens** : ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

3- **une enzyme** : la *Taq* Polymerase (*Taq Pol*), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C ; ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

4- **les 4 nucléotides** : dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés globalement **dNTPs**

(DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates) qui sont les éléments de bases utilisés par la *Taq Pol* pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

3.2 La réaction :

Une réaction de **PCR** correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun **3 étapes** :

1. dénaturation

2. hybridation

3. élongation

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur

Que se passe-t-il à chaque étape?

1. dénaturation : le tube est chauffé quelques secondes à 94°C. Les doubles-brins d'ADN se séparent. On dit alors que l'ADN est dénaturé.

2. hybridation : la température est rapidement abaissée à 55°C. Les amorces

"reconnaissent" leurs séquences complémentaires sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur son brin respectif. Cette étape dure une minute pour laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement. L'ADN total étant plus long, n'aura pas le temps de se réhybrider.

3. **élongation** : La température du tube est ensuite augmentée à 72°C ce qui permet à la *Taq* Polymerase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides ne sont pas incorporés de façon aléatoire mais en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire). Cette étape dure une minute. Un nouveau brin d'ADN dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.

Que se passe-t-il à chaque cycle?

Le premier cycle a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

Au deuxième cycle, la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les deux amorces, font leur apparition.

Au 3ème cycle apparaissent les premiers amplicons, ADN double-brins bornés par les amorces, correspondants au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 paires de bases (pb) à 2 kilobases (Kb).

Au fil des cycles la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle. On obtient en théorie 2^n copies pour n cycles. Dans la pratique, pour un rendement classique de 85%, une PCR de 30 cycles produit environ 10^6 copies (amplicons de taille attendue).

CHAPITRE 2 :

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 2 . Matériel et Méthodes

2.1 Isolement, caractéristiques morphologiques et biochimiques

2.1.1 Matériel Biologique

Le matériel biologique est constitué de trente deux (32) échantillons de lait fermenté collectés dans des flacons stériles de 100 ml dans la région de Dori (province du Séno). Ces échantillons ont été conservés au congélateur à -20°C en attente d'analyses.

2.1.2 Isolement et Purification des souches

Dix millilitres de lait ont été prélevés de façon stérile et introduits dans 90 ml d'eau peptonnée et le mélange a été homogénéisé. Des séries de dilutions ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-9}) et 1 ml de la dilution appropriée est directementensemencé en triplet sur les milieux de culture suivants :

- (a) MRS agar (Fluka Biochemika 69966) incubé à 42°C pendant 48 heures en anaérobiose pour l'isolement des *Lactobacilli et Streptococci* thermophiles. MRS agar est aussi incubé à 35°C pendant 48 heures en anaérobiose pour l'isolement des *Leuconostoc* mésophiles.
- (b) M17 agar (Difco) incubé à 30°C pendant 48 heures en aérobie pour l'isolement des Lactococci.
- (c) Rogosa agar (Difco) incubé à 35°C pendant 48 heures en anaérobiose pour l'isolement des lactobacilles

Des jarres anaérobies contenant des kits générateurs de CO_2 ont été utilisées pour les incubations en anaérobiose.

Après croissance sur ces milieux spécifiques, des colonies bien individualisées et visqueuses (productrices d'exopolysaccharides) (Smitinont *et al.*, 1999) ont été sélectionnées. Après avoir testé ces colonies dans du bouillon MRS selon leur capacité à produire l'acide lactique et des exopolysaccharides, nous avons retenu parmi une centaine de colonies 20 souches productrices d'EPS. Ces souches ont été repiquées dans du bouillon MRS et après croissance, le bouillon est

centrifugé pour éliminer les cellules bactériennes, ensuite 1 ml d'éthanol est ajouté à 1 ml du surnageant obtenu. La présence de polysaccharides se traduit par la formation d'un anneau opaque à l'interface.

2.1.3 Caractérisation biochimique et morphologique des souches

2.1.3.1 Examen microscopique

L'étude morphologique a été réalisée en prélevant quelques gouttes de chaque suspension bactérienne de 18 heures et en les étalant sur une lame. Cette préparation a été ensuite colorée au bleu de méthylène et observée au microscope optique en contraste de phase.

2.1.3.2 Biochimie des souches

Les tests de coloration Gram, de catalase, d'oxydase, de sporulation ont été réalisés par des méthodes standard classiques. La sensibilité au NaCl est testée dans un bouillon MRS contenant 4%, 6%, 8%, 10%, (p/v) de NaCl et incubé à 37°C pendant 48 heures. La croissance aux températures de 10°C, 15°C et 45°C a été testée dans un bouillon MRS.

2.1.3.3 Effet du lysosyme sur les bactéries lactiques productrices d'EPS

Le lysozyme est une enzyme qui lyse la paroi des cellules bactériennes. Le lysozyme est introduit à une concentration de 1g l⁻¹ dans des bouillons MRS. Ces bouillons ont été ensemencés avec les souches productrices et incubés pendant 24 à 48 heures à 37°C qui est la température optimale de l'activité de l'enzyme. Après cette incubation, les souches qui croissent sont résistantes au lysosyme.

2.1.3.4 Etude de la sensibilité des bactéries lactiques productrices

d'exopolysaccharides aux antibiotiques

L'étude est réalisée par la technique des disques. Des disques des différents antibiotiques à tester sont déposés sur des boîtes de pétri ensemencées avec les différentes souches. La sensibilité aux antibiotiques est estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition observée autour des

disques (double de la distance en mm allant du bord du disque jusqu'au point où se termine l'inhibition de la croissance).

2.1.3.5 Le test d'oxydation -fermentation

Ce test détermine si un organisme a recourt à un métabolisme oxydatif (respiratoire) ou à un métabolisme de fermentation pour utiliser un hydrate de carbone. Deux tubes à essai ont été remplis sur une hauteur de 8 cm environ avec de la gélose peptonée contenant l'hydrate de carbone et un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui rend le milieu vert (pH 7,1). Un des deux tubes est chauffé à la vapeur (pour en éliminer l'oxygène dissous) et est refroidi rapidement juste avant l'utilisation.

Chaque tube a été alors inoculé par piqûre en gélose profonde (section) jusqu'à 5 cm environ, avec l'organisme à tester.

Dans le tube chauffé, le milieu a été immédiatement recouvert d'une couche de paraffine liquide stérile, environ 1cm d'épaisseur. Par la suite ces deux tubes sont incubés et examinés après 1 à 14 jours. Le jaunissement de l'indicateur de pH indique l'utilisation de l'hydrate de carbone (Singleton, 1994).

2.1.3.6 Le test de l'indole

Ce test met en évidence la production d'indole à partir de tryptophane. Les souches ont étéensemencées dans l'eau peptonée et incubées pendant 48 heures. On ajoute ensuite à la culture du réactif de l'indole de Kovacs (0,5 ml pour 5 ml de culture) et le récipient fermé est agité légèrement.

Si le test est positif, l'indole présent dans la culture se dissout dans le réactif qui devient rose ou rouge et forme une couche à la surface du milieu (Singleton, 1994).

2.1.3.7 Le test de l'uréase

Les uréases sont des enzymes qui hydrolysent l'urée $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ en dioxyde de carbone et ammoniac. Les souches ont étéensemencées sur la gélose à l'urée de Christensen (milieu

tamponné au phosphate, contenant du glucose, de la peptone, de l'urée et le rouge de phénol à pH 8,4). Sur ce milieu, les souches "uréase-positives" libèrent de l'ammoniac qui élève le pH et fait virer l'indicateur au rouge (Singleton, 1994).

2.1.3.8 Le test de l'oxydase

Ce test détecte un type particulier de chaîne respiratoire qui comporte en fin de chaîne un cytochrome C et l'oxydase associée.

Une petite surface de papier filtre est humectée avec quelques gouttes de réactif de l'oxydase de Kovacs et on y étale une petite quantité de cellules bactériennes. Les espèces oxydase-positives donnent une coloration violette immédiatement ou dans les 10 secondes (Singleton, 1994).

2.1.3.9 Le test d'hydrolyse de l'esculine

Au milieu composé de (Trypticase 30 g, extrait de levure 20 g, chlorure de cystéine 1 g, eau 1000 ml pH 7,4 ± 0,2) ; on ajoute de l'esculine à la concentration 1%, ce milieu estensemencé et incubé à 37°C pendant 24 heures. On ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution à 1% de citrate de fer ammoniacal, une coloration noire indique une réaction positive.

2.1.3.10 Formation de peroxyde d'hydrogène

Le milieu à base de glucose est coulé sur boîte de pétri puis recouvert par une fine couche de gélose contenant 4% de dioxyde de manganèse. Ce milieu a étéensemencé par stries. Après un à 3 jours d'incubation à 30°C, des zones claires autour des colonies indiquent la production de H₂O₂.

2.2. Etude des Exopolysaccharides

2.2.1 Détermination de la Composition des EPS par HPLC

L'isolement d'exopolysaccharides a été réalisé dans un flacon de 200 ml contenant 100 ml de milieu de culture. Dans un premier temps le milieu de culture est centrifugé à 10000 g à 10°C pour collecter les cellules bactériennes (ces cellules sont lavées, séchées et pesées pour avoir le poids sec des bactéries). Par la suite on élimine les protéines du milieu de culture par

précipitation avec un volume d'acide trichloroacétique 20% suivi d'une centrifugation des cellules et protéines à 25000 g pendant 20 minutes à 4°C (De Vuyst *et al.*, 1998). Le surnageant obtenu est précipité avec un même volume d'acétone toute une nuit, suivi d'une centrifugation du précipité à 25000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le précipité obtenu est dissout dans de l'eau distillée filtrée (Filtre 2 µm) et 1 ml de cette solution a été hydrolysé avec l'acide trifluoroacétique 6N pendant 4 heures à 100°C dans des tubes sellés. L'hydrolysate a été neutralisé avec l'oxyde de baryum (Ba(OH)₂), puis centrifugé pour récupérer le surnageant. Ce surnageant est filtré (filtre 0,20 µm). Les monomères sont identifiés par HPLC à l'aide d'une pompe Jasco pv-980 et d'un détecteur à indice de réfraction différentielle spectra system RI-150. La colonne Corogel 87C est éluée avec de l'eau distillée filtrée (filtre 0, 20µm) avec un débit de 0,400 ml /minute. Des sucres standards (0,05 mg/ml) couramment rencontrés dans les exopolysaccharides ont été utilisés pour l'étalonnage. Ces sucres sont : le D-glucose (RT=5,52), le D-galactose (RT=6,02), le D-mannose (RT=6,99), le D-fructose (RT=9,44), le D-ribose (RT= 13,2) , L-rhamnose (RT=8,41), L-arabinose (RT=14,5).

2.2.2 Mesure de l'activité de la β-glucuronidase promoteur des EPS

L'activité de la β-glucuronidase a été déterminée avec 950 µl de tampon GUS (50 mM de NaHPO₄ pH 7, 10 mM de β-mercaptoethanol, 1mM de EDTA, 0,1% de TritonX-100) et 40 µl de cellules bactériennes. La réaction démarre en additionnant 10 µl de 100 mM de l'acide paranitro-β-D-phenyl-glucuronique. L'augmentation de la DO à 405 nm indiquant l'activité mesurée à 37°C (Looijesteijn *et al.*, 1999).

2.2.3 Dosages des sucres totaux des EPS

Les sucres totaux des extraits d'EPS à l'acétone ont été dosés par la méthode de Dubois *et al.*, 1956. On introduit 1ml d'extrait à l'acétone puis 1ml de solution de phénol 5%(p/v). Ce mélange est vortexé, puis 5ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Après une agitation rapide au vortex, le mélange est maintenu pendant 5 minutes au bain-marie réglé à 100°C. Le mélange ainsi traité est placé à l'obscurité pendant 30 minutes avant les mesures d'absorbance à 492 nm.

Ensuite on détermine la concentration des sucres totaux à l'aide d'une courbe étalon. Le mélange glucose+galactose+rhamnose a été utilisé comme sucre de référence

2.2.4 Dosage des protéines dans les EPS

Les protéines des extraits d'EPS à l'acétone ont été dosées par la méthode de Sedmak et Grossberg (1997).

1 ml d'extrait a été additionné à 1 ml de NaOH 1 M et porté à 80°C pendant deux minutes. 0,1 ml de l'échantillon ainsi traité est additionné à 0,1 ml de réactif et laissé à incubation pendant une heure suivi de la lecture des DO (Densité Optique) à 465 nm et 620 nm. Le rapport A_{620} / A_{465nm} est calculé pour chaque échantillon. La concentration en protéines des échantillons a été calculée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec le Serum Albumine Bovine (BSA) (Sigma A-9418 Sigma chemical, St-Louis Mo 63178 USA 314-771-5750).

2.2.5 Mesure des poids secs bactériens

Après fermentation 100 ml de milieu de culture ont été centrifugés à 10000 g à 10 °C pour collecter les cellules bactériennes. Ces cellules ont séchées à l'étuve à 60° C pendant 5 heures, et le poids sec a été mesuré à l'aide d'une balance de précision.

2.3 Etude des bactériocines et Fermentation des sucres

2.3.1 Isolement de bactériocines

Le milieu de culture a été centrifugé à 10000 g éliminer les cellules bactériennes, le surnageant est ajusté à un pH≈6,5. Ce surnageant a été ensuite précipité au sulfate d'ammonium (40% saturation) pendant une nuit à 4°C. Une pellicule flottante se forme. Après une seconde centrifugation, cette pellicule a été collectée et dissoute dans 15 ml de tampon phosphate (pH 6,5) et extrait avec 15 volumes d'une mixture de chloroforme/méthanol (2/1) (v/v). Après une heure à 4 °C, le précipité blanc est recueilli par centrifugation à 13 000 x g et resuspendu dans 3 ml d'eau pure (Anderssen *et al.*,1998). Toutes les souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides ont été utilisées pour la recherche de bactériocines.

2.3.2 Test d'inhibition des bactériocines isolées sur des souches de références

Ce test a été réalisé par la technique des disques. Des disques imbibés des différentes bactériocines à tester ont été déposés sur des boîtes de Pétriensemencées avec les différentes souches pathogènes de référence. La sensibilité aux bactériocines est estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques (double de la distance en mm allant du bord du disque jusqu'au point où se termine l'inhibition de la croissance). Les souches pathogènes de référence utilisées sont : Les Gram positives (*Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Listeria innocua* LMG 13568) et les Gram négatives (*Escherichia coli* 105182 CIP, *Salmonella enterica* 1051150 CIP, *Shigella dysenteriae* 5451 CIP).

2.3.3 Hydrolyse enzymatique des bactériocines isolées

Les bactériocines isolées ont été traitées par différentes enzymes : Trypsine

(14 U/ml), Chymotrypsine (350 U/ml), Pronase E (8,8 U/ml), Pepsine (91 U/ml), lipase (4,2 U/ml), α -amylase (0,6 U/ml), Catalase (2600 U/ml). Tous les échantillons ont été ajustés à pH 7 par addition de NaOH 1M, sauf dans le cas du traitement par la pepsine (pH 2, ajusté par HCl 37%), filtrés (filtre 0,45 μ m) et incubés pendant une heure à 37°C. Lors du traitement par la pronase E, la pepsine et la lipase et à 25°C lors du traitement par les autres enzymes. Les bactériocines traitées ou non traitées ont été ensuite testées par la méthode des disques. La sensibilité d'une bactériocine donnée est appréciée en déterminant l'activité résiduelle par mesure du diamètre de zone d'inhibition.

2.3.4 Cinétique d'acidification et production d'acide

Fermentation et fermentescibilité de différents sucres

L'étude de la fermentation des sucres a été effectuée dans des tubes à vis contenant des bouillons MRS avec différents sucres. Les solutions de sucres ont été ajoutées dans les tubes de

manière à obtenir une concentration en sucre de 20 g/l pour la fermentation et 3g/l pour la fermentescibilité à l'aide des filtres (0,22µm). Deux souches présentant de bonnes cinétiques ont été retenues pour cette étude : il s'agit de la souche MR 18 et M3.

2.3.5 Mesures de pH.

Les mesures de pH ont été réalisées à la fin de la croissance avec un pHmètre (pH526 WTW TFK325/HC) dans du bouillon MRS contenant le sucre à tester avec un pH initial de 6,2.

2.3.6 Dosage de l'acide lactique

Des bouillons MRS contenant différents sucres à étudier ont étéensemencés à 1% avec des cultures bactériennes de 24 heures ($DO_{630nm}=0,90$). Après 24 heures de croissance, 5 ml de chaque bouillon de culture ont été prélevés et dilués deux fois avec de l'eau distillée. Cette solution diluée est titrée avec du NaOH 0,1M en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur coloré (Zvauya *et al.*, 1997).

Le pourcentage d'acide lactique est obtenu en appliquant la formule ci-dessous :

$\% \text{ acide lactique} = (V \times N \times M) / 10 \times V'$, dans laquelle V représente le volume de NaOH 0,1 M (ml), N représente la normalité de NaOH, M représente la masse molaire de l'acide lactique et V' représente le volume d'échantillon (bouillon MRS dilué).

2.4 Caractérisation moléculaire des souches isolées

2.4.1 Identification des bactéries et recherche des gènes d'EPS

2.4.1.1.Extraction d'ADN

Pour optimiser l'extraction d'ADN totale, la lyse cellulaire est effectuée suivant une combinaison des méthodes de Mamur (1961) et de Kampfer (1995)

Préparation des échantillons

- production de biomasse cellulaire et récolte des cellules

Toutes les souches sont repiquées dans 50 ml de bouillon MRS et incubé à 37°C pendant 24 heures. Pour la récolte des cellules, 50 ml de la culture bactérienne sont centrifugés

à 10 000 g pendant 10 minutes dans un tube Falcon stérile, afin de culotter les cellules. Les cellules ainsi récoltées ont été lavées avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) stérile, puis récoltées par centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes (cette opération est répétée 3 fois afin d'obtenir des cellules propres).

■ La lyse des cellules

Cette étape est sans doute la plus importante dans l'extraction des acides nucléiques des bactéries car elle est intimement liée aux propriétés morphologiques et physiologiques des cellules cibles. Les cellules récoltées après centrifugation et lavage sont complétées avec 2 ml de solution de lysosyme pH6 (Sigma) à 15 mg/ml (le lysosyme catalyse l'hydrolyse des liaisons $\beta(1-4)$ glucosidiques des peptidoglycanes , entre l'acide N-acetylmuramique et la N-acetylglucosamine , donnant lieu à la rupture des parois cellulaires). Ensuite 100 μ l de solution enzymatique de mutanolysine pH6 (Sigma) à 1000 U/ml sont ajoutés à la suspension cellulaire (Hydrolyse des polysaccharides des parois cellulaires) et on laisse l'ensemble à 37°C sous agitation pendant deux heures. Le traitement enzymatique est achevé par l'addition de 10 μ l de protéinase K pH 7,4 à 20mg/ml et 0,5 ml de SDS à 10 %. Ces échantillons sont ensuite placés dans un bain en agitation à 37°C pendant une heure.

■ Extraction et purification des acides nucléiques

Extraction

L'ADN bactérien est extrait avec un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1). Pour la réalisation de cette extraction, on ajoute 5 ml de chloroforme/alcool isoamylique aux lysats, qu'on mélange vigoureusement par retournement pendant 3 minutes à température ambiante. Ensuite on effectue une centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes à la température ambiante. Après centrifugation, on récupère la phase supérieure en évitant de toucher l'interface (constitué de débris protéiques) avec une pipette. Cette étape d'extraction au chloroforme/alcool isoamylique est effectuée au moins deux fois pour arriver à une bonne élimination des débris organiques.

Précipitation d'ADN extrait

Au surnageant de l'extraction au chloroforme/alcool isoamylique on ajoute 1/10 de volume d'acétate de sodium 3N pH8 (soit 0,5ml) et 2 volumes d'éthanol 100% froid à -20°C (soit 10 ml) et on mélange doucement par inversion 4 à 5 fois. Les tubes sont laissés au repos à 4°C jusqu'à ce qu'on observe des précipités d'acides nucléiques (cette attente dure quelques minutes). Les extraits sont enfin centrifugés à 10000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante pour faire culotter l'ADN.

Purification de l'ADN

L'ADN précipité a été rincé avec l'éthanol 70%, ce rinçage est effectué rapidement en évitant de décoller les acides nucléiques précipités. Avant de procéder au séchage, on élimine le restant d'éthanol à la micropipette.

L'ADN extrait est séché sous vide au sped vac avant d'être dissout dans un volume approprié de tampon TBE.

Evaluation de la qualité et de la quantité des extraits d'ADN

On détermine par spectrophotométrie le taux de contamination des extraits d'ADN par les protéines, mais aussi la quantité d'ADN extrait.

La densité optique a été lue dans l'UV à 260 nm pour l'ADN puis à 280 nm pour les protéines. Le degré de pureté est donné par le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} . Pour une bonne extraction ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. La concentration en ADN est estimée par absorbance à 260 nm. Pour l'ADN double brin, une unité de DO correspond à 50 µg/ml.

2.4.1.2. La PCR

Préparation des mélanges d'amplification

L'amplification est réalisée avec des couples d'amorces spécifiques pour les bactéries lactiques et pour les plasmides responsables de la biosynthèse des EPS. Ces amorces utilisées ont été fabriquées par la firme Qbiogène Research Services (France), ce sont :

Pour les plasmides des EPS (Lamothe, 2000)

1. 5'TTGTTCTCGAGATGGATATGGGATATAGC 3'

1'. 5' TATTCCCCTTTATTAATCTGATATGCCAAGG 3'

Pour tous les Lactobacillus spp. (Heilig et al., 2002)

2. 5'GTAAGG TGGCGATGTGTACCTCAAG 3'

2'. 5' CACCGCTACACATGGAG3'

Pour tous les Pediococcus spp. (Heilig et al., 2002)

3. 5'GTAAAGTGGCGTGT GTACCTCAAG 3'

3'. 5' CACCGCTACACATGGAG3'

Pour tous les Lactococcus (Ampe et al. , 1999)

4. 5'CTTTGAGTGATGCAATTGCATC 3'

4'. 5' CACCGCTACACATGGAG 3'

Pour tous les Leuconostoc (Ampe et al. , 1999)

5. 5' GATCCATCTCTAGGTGACGCCG 3'

5'. 5' CACCGCTACACATGGAG 3'

Pour Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides (Moschetti et al.,2000)

6.LMMf 5' CCGTTACCCCTAAACCCCGAC 3'

6'. LMMr 5' GACCAAATACAATAGGTTGCG 3'

Pour Lactobacillus fermentum (Walter et al.,2000)

7. Lfpr 5' GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT 3'

7'.FermII 5' TTACCTAACGGTAAATGCGA 3'

Pour Lactobacillus acidophilus (tilsala-timisjarvi, Alatosava, 1997)

8.Aci I 5'TCTAAGGAAGCGAAGGAT 3'

8'.Aci II 5'CTCTTCTCGGTCGCTCTA 3'

Pour Lactobacillus paracasei / rhamnosus (tilsala-timisjarvi, Alatosava, 1997)

9. Pr I 5' CAGACTGAAAGTCTGACGG 3'

9'. Pr II 5' ACGGATGGATGGAGAGCAG 3'

Pour Lactobacillus delbrueckii (tilsala-timisjarvi, Alatossava, 1997)

10. Del I 5' ACGGATGGATGGAGAGCAG 3'

10'. Del II 5' GCAAGTTTGTTCCTTTCGAACTC 3'

Pour Streptococcus thermophilus (Tilsala-Timisjarvi, Alatossava, 1997)

11. Thr I 5' ACGGAATGTACTTGAGTTTC 3'

11'. Thr II 5' TTTGGCCTTTCGACCTAAC 3'

Composition des mélanges réactionnels de PCR

Les réactions de PCR sont effectuées dans des tubes de 0,25 ml, les mélanges réactionnels de 50 µl chacun sont constitués de :

- 29,7 µl d'eau distillée stérile
- 5 µl de Tampon Taq 10X (Sigma)
- 5 µl de dNTPs 1mM (Sigma)
- 3 µl de solution de MgCl₂ 25mM (Sigma)
- 2 µl d'amorce de chaque couple
- 0,3 µl de la solution de Taq polymérase (5U/µl) (Sigma)
- 5 µl de la solution d'ADN cible

Réactions d'amplification

La réaction PCR pour l'identification est réalisée selon la programmation suivante :

- a- Dénaturation initiale de l'ADN à 92°C pendant 2 minutes
- b- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- c- Hybridation à 55°C pendant 30 secondes
- d- Extension à 72°C pendant 30 secondes
- e- Extension finale à 72°C pendant 7 minutes

f- Conservation des amplicons à 4°C à la fin des réaction

Les étapes b, c, d sont effectuées en 30 cycles

La réaction PCR pour la recherche des plasmides responsables de biosynthèse des EPS est réalisée selon la programmation suivante :

g- Dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 5 minutes

h- Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes

i- Hybridation à 56°C pendant 40 secondes

j- Extension à 68°C pendant 40 secondes

k- Extension finale à 72°C pendant 7 minutes

l- Conservation des amplicons à 4°C à la fin des réactions

Les étapes h, i, j sont effectuées en 30 cycles

2.4.1.3 Electrophorèse des amplicons sur gel d'Agarose

- *Préparation du gel d'Agarose 0,7%*

0,7 g d'Agarose sont mis en solution dans 100 ml de tampon TBE 0,5X (composition en annexe) dans un erlen meyer de 250 ml. La solution est chauffée sur une plaque chauffante, ou au four micro-onde pour faire dissoudre le gel. On laisse refroidir la solution d'Agarose à la température ambiante puis on y ajoute 5 µl de solution de bromure d'ethidium à 10 mg/ml. Le gel a été coulé dans une cuve horizontale et laissé à température ambiante pour solidification.

- *Electrophorèse*

Après avoir retiré les peignes, les cales de la cuve et la rempli avec du tampon TBE 0,5X on charge les puits avec 5 µl d'échantillon additionné de bleu de charge et 2 µl de marqueur de poids moléculaire (puits extrêmes).

L'électrophorèse des amplicons sur gel d'Agarose est réalisée à 120 volts. Les migrations des amplicons sont arrêtées après une heure. Le profil électrophorétique est visualisé et photographié (appareil photo numérique) sur une table UV (TFX-20-C) à 100%.

CHAPITRE 3 :

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Caractéristiques morphologique, biochimique et physiologique des souches isolées

Au total une vingtaine de souches de bactéries lactiques productrices d'EPS ont été retenues sur une centaine de souches de bactéries lactiques isolées sur les différents milieux de cultures (photo 1 à photo 19). Les souches retenues sont celles qui ont donné des réactions positives aux tests préliminaires de production d'EPS (colonies visqueuses, formation d'anneau en présence d'éthanol...). Toutes les souches retenues (tableau IV) sont de morphologies variables (on rencontre des formes coques et des formes bâtonnets). Elles sont Gram positives non sporulantes, oxydase-positives et produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), uréase négative (tableau V et tableau VI). Dix-neuf souches sont catalase négatives.

Parmi ces dix-neuf souches, dix-sept ne métabolisent pas le citrate (deux souches seulement métabolisent le citrate), trois sont catalases positives (présence de pseudo-catalase). Quatorze souches sont négatives sur le test de mannitol mobilité, les huit autres souches sont positives. Ceci indique que la plupart des souches isolées, sont immobiles. Parmi toutes les souches isolées quatre seulement ne métabolisent pas l'esculine. Les souches sont capables de fermentation et /ou d'oxydation.

Neuf (09) souches sont indoles positifs.

Au regard de la définition et des caractéristiques des bactéries lactiques (Feresu, Muzondo, 1990 ; Axelsson, 1993 ; De Roissart, Luquet, 1994 ; Champagne, 1998 ; Tailliez, 2001) citées ci-dessus, les souches que nous avons isolées seraient des bactéries lactiques. Ce résultat montre que les bactéries lactiques sont présentes et seraient responsables de la fermentation des échantillons de laits. D'une manière générale les bactéries lactiques constituent la flore bactérienne dominante des laits fermentés traditionnellement, au Burkina (Savadogo *et al.*, 2001), au Maroc (Hamama, 1992), en Indonésie (Yodoamijoyo *et al.*, 1983 ; Hosono *et al.*, 1989), au Zimbabwe (Feresu, Muzondo, 1990), en Afrique du Sud (Keller, Jordan, 1990 ; Beukes *et al.*, 2001), en Tanzanie (Isono *et al.*, 1994).

D'après la littérature les bactéries lactiques sont dépourvues de cytochromes. Elles sont inaptes à toute respiration aérobie ou anaérobie. L'oxydation observée chez certaines de nos souches est une fermentation en aérobiose. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé au cours du métabolisme de nos souches est un agent antimicrobien. Il agit soit directement sur la cellule soit indirectement par l'intermédiaire du système lactoperoxydase-thiocyanate. L'activité inhibitrice s'exerce surtout sur des germes dépourvus de catalase ou de pseudo-catalase capable de dégrader le composé toxique. La production de H_2O_2 chez les bactéries lactiques est sans doute liée à la présence des oxydases. Cette production est d'autant plus

importante que si les bactéries lactiques sont en culture aérobie. Ceci s'explique par le fait qu'en aérobiose les bactéries lactiques ont une grande capacité à former du H_2O_2 qu'à l'éliminer (Codon, 1987 ; De Roissart et Luquet, 1994 ; Tailliez, 2001). La plupart de nos souches sont relativement aérotoles. Les bactéries lactiques sont les seules bactéries à Gram positif aérotoles à ne pas posséder de système respiratoire. Le peroxyde d'hydrogène est toxique à une certaine concentration pour les bactéries lactiques que pour les non lactiques. Price et Lee en 1970 ont montré que le H_2O_2 produit par le *Lb plantarum* inhibait *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Proteus*, *Staphylococcus aureus*.

Les différents genres qui forment le groupe des bactéries lactiques, sont des cellules en forme de coques et de bacilles. Les coques sont généralement les *Streptococcus*, les *Lactococcus*, les *Enterococcus*, les *Leuconostoc*, les *Pediococcus*. La forme bacille est représentée par les *Lactobacillus*.

Les espèces du genre *Leuconostoc* peuvent produire du diacétyle à partir du citrate (Piard, Desmazeaud, 1991). Le diacétyle possède une fonction inhibitrice sur les bactéries Gram négatif à partir d'une concentration de 200 $\mu g/ml$, il est bactériostatique pour les bactéries Gram positif (Jay, 1982).

Le peroxyde d'hydrogène est toxique à une certaine concentration pour les bactéries lactiques que pour les non lactiques. Le peroxyde d'hydrogène produit par *Lb. Plantarum* inhibe *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Proteus* (Vandenbergh, 1993). Une inhibition de *Staphylococcus aureus* par du peroxyde d'hydrogène de *Lactobacillus* a été décrite par Dahiya et Speck (1968).

Le peroxyde d'hydrogène associé au système lactoperoxydase thiocyanate, catalyse la formation de produits inhibiteurs bactériostatiques pour la flore lactiques et bactéricides pour les bactéries Gram-négatif. L'effet bactéricide du peroxyde d'hydrogène résulte de l'oxydation des groupes sulfhydryl provoquant ainsi la dénaturation de plusieurs enzymes et la perméabilité membranaire (Kong and Davison, 1980).

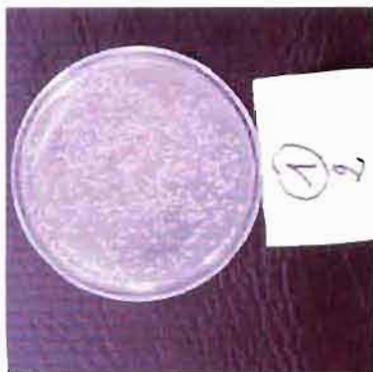


Photo 1 : souche MR 19



Photo 2 : souche MR 11

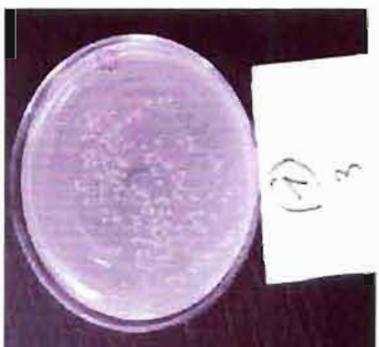


Photo 3 : souche MR 4



Photo 4 : souche MR MR 16

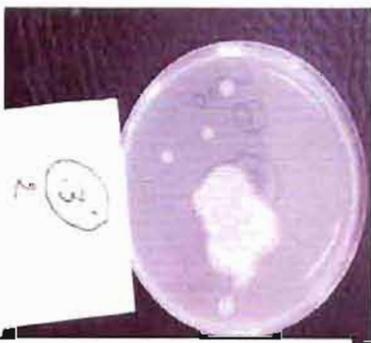


Photo 5 : souche MR 15



Photo 6 : souche MR MR 12



Photo 7 : souche MR 2



Photo 8 : souche MR 17

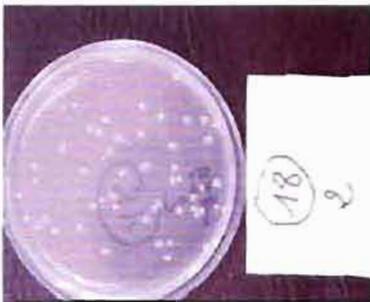


Photo 9 : souche M3



Photo 10 : souche MR 14



Photo 11 : souche MR 4



Photo 12 : souche MR 18

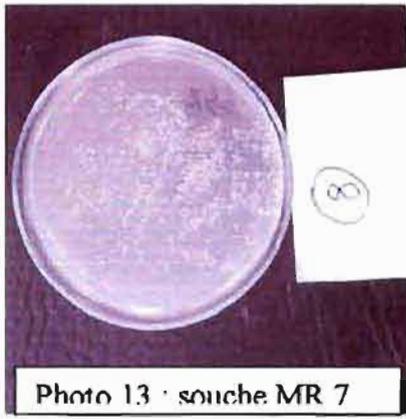


Photo 13 · souche MR 7

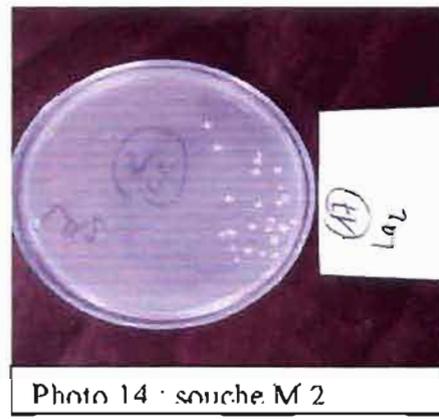


Photo 14 · souche M 2

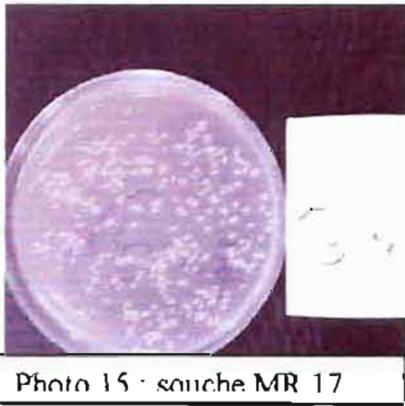


Photo 15 · souche MR 17

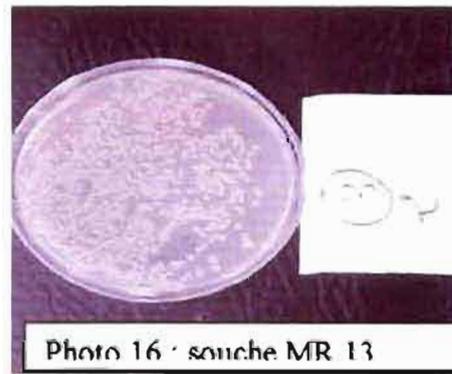


Photo 16 · souche MR 13



Photo 17 · souche MR



Photo 18 · souche MR 5

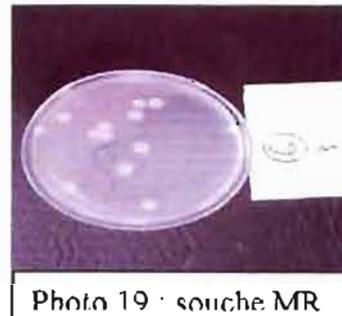


Photo 19 · souche MR

Tableau IV: Caractéristiques morphologiques des souches isolées

Souches	Formes	Mode de regroupement	Milieu et température d'isolement
MR1	coccobacilles	Isolées, chaînettes	MRS (35°C)
MR2	coccobacilles	Isolées, chaînettes	MRS (35°C)
MR3	bâtonnets	chaînettes	Rogosa (35°C)
MR4	coques	Isolées, chaînettes, chaîne	M17 (30°C)
MR5	coccobacilles	Isolées, chaînettes	Rogosa (35°C)
MR6	coccobacilles	Isolées, chaînettes	MRS (35°C)
MR7	coques	Isolée	M17 (30°C)
MR8	coques	Isolées	M17 (30°C)
MR9	bâtonnets	Isolées, chaînettes	MRS (35°C)
MR10	sphériques	Paires, chaînettes	MRS (42°C)
MR11	coccobacilles	Isolées, chaînettes	MRS (35°C)
MR12	bâtonnets	chaînettes	Rogosa (35°C)
MR13	coques	Isolées, chaînes	M17 (30°C)
MR14	sphériques	Paires, tétrades	MRS (35°C)
MR15	sphériques	Paires, chaînes	MRS (35°C)
MR16	ovoïdes	Paires, tétrades	MRS (35°C)
MR17	ovoïdes	Paires, tétrades	MRS (35°C)
MR18	coques	Isolées, chaînettes	MRS (35°C)
M19	coques	Isolées, chaînettes	M17 (30°C)
M1	coques	Isolées, chaînes	M17 (30°C)
M2	coques	Isolées, chaînes	MRS (35°C)

Tableau V : Caractéristiques Biochimiques et physiologiques des souches isolées

Souches	Gram	Catalase	Oxydase	Indole	Citrate	Mannitol mobilité	Uréase	Esculine	Oxydation Fermentation	H ₂ O ₂
MR1	+	-	+	+	-	-	-	+	O+ F-	+
MR2	+	-	+	+	-	-	-	-	O+ F-	+
MR3	+	-	+	±	-	+	-	+	O+ F+	+
MR4	+	-	+		-	-	-	+	O- F+	+
MR5	+	-	+	+	-	-	-	+	O+ F-	+
MR6	+	-	+		-	-	-	-	O- F+	+
MR7	+	-	+		-	-	-	+	O- F+	+
MR8	+	-	+	+	-	+	-	+	O+ F-	+
MR9	+	-	+	-	-	+	-	-	O+ F-	+
MR10	+	-	+	-	-	-	-	+	O- F+	+
MR11	+	-	+	+	-	-	-	+	O+ F+	+
MR12	+	-	+	-	-	+	-	-	O+ F+	+
MR13	+	-	+	-	-	-	-	+	O- F+	+
MR14	+	-	+	+	+	+	-	+	O+ F+	+
MR15	+	-	+	+	-	+	-	+	O+ F+	+
MR16	+	-	+	+	-	-	-	+	O+ F+	+
MR17	+	-	+	+	+	-	-	+	O+ F-	+
MR18	+	-	+	-	-	-	-	+	O- F+	+
M19	+	-	+	-	-	+	-	+	O+ F+	+
M1	+	+	+	-	-	-	-	+	O- F+	+
M2	+	+	+	-	-	-	-	+	O+ F-	+
M3	+	+	+	-	-	+	-	+	O+ F+	+

+ = réaction positive

- = réaction négative

O+ = oxydation positive

O- = oxydation négative

F+ = Fermentation

F- = Pas de Fermentation

Sensibilité à la lysosyme

Dix souches ont présenté une résistance à la lysosyme (tableau VI) il s'agit des souches MR2, MR3, MR5, MR8, MR11, MR12, MR15, MR16, MR17, M1. Le lysosyme est une enzyme qui lyse les parois bactériennes au niveau des liaisons glucosidiques $\beta(1-4)$ et les ponts entre les acides N-acetyl-D-muramique et les N-acetyl-D-glucosamine des peptidoglycanes. Les EPS autour des parois cellulaires pourraient expliquer la non sensibilité de certaines de nos souches à cette enzyme. Les EPS sont responsables et protègent les cellules bactériennes contre l'action de la lysosyme (Looijesteijn *et al.*, 2001). Le rôle des

EPS pour la cellule le plus souvent proposé est de nature protectrice vis à vis de son environnement. La capacité de s'enrober dans une couche d'EPS avec un forte teneur en eau rend la cellule bactérienne plus résistante à la dessiccation, à la déprédation des protozoaires, et aux substances chimiques. Ainsi, des agents anti-microbiens peuvent plus difficilement l'atteindre (Whitfield, 1988) La production d'EPS a conféré à une souche de *Lactococcus lactis* une tolérance augmentée envers le cuivre, la nisine et le lysozyme (Looijesteijn *et al.* 2001).

Sensibilité aux antibiotiques

Toutes les souches isolées sont sensibles à fortes concentrations d'ampicilline, de la gentamycine et de la lincomycine.

La sensibilité aux antibiotiques est considérée comme un caractère distinctif, parce qu'elle peut être de degré variable selon les espèces et les souches. L'utilisation de fortes concentrations d'antibiotiques pour l'étude de la sensibilité pourrait s'expliquer par le fait que les souches sont productrices d'exopolysaccharides. Ces exopolysaccharides joueraient un rôle protecteur.

D'une manière générale les espèces de bactéries lactiques les plus sensibles sont les *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus delbruekii ssp. bulgaricus* qui sont souvent utilisées comme des souches témoins pour dépister la présence d'antibiotique dans le lait. Aussi le caractère de résistance aux antibiotiques peut être lié à l'emploi d'antibiotiques sur le traitement des mammites des vaches laitières par exemple.

Sensibilité des souches isolées aux différentes concentrations de NaCl

Le tableau VI donne les résultats de l'étude de la sensibilité des souches isolées aux différentes concentrations de NaCl. Aucune souche ne croit à des concentrations de NaCl de 8 % et de 10 %. A la concentration de NaCl égale à 4 % seulement deux souches sont sensibles, il n'y a pas eu de croissance, il s'agit des souches MR7 et M3. Quant à la concentration de NaCl égale à 6 % trois souches sont sensibles (MR7, MR14, M3).

Parmi les bactéries lactiques les *Streptococcus* sont connus avoir une forte sensibilité au NaCl. La teneur en NaCl peut influencer la croissance des bactéries lactiques et provoquer un découplage entre la croissance et l'acidification. Chez certains lactocoques, l'ajout du sel inhibe l'activité des systèmes de transport des acides aminés et des peptides. En général les lactocoques diffèrent quant à leur sensibilité au sel ; *Lactococcus cremoris* est plus sensible que *Lactococcus lactis*.

Tableau VI : Sporulation, Sensibilité des souches isolées aux différentes concentrations de NaCl et à l'enzyme lysosyme

Souches	NaCl 4%	NaCl 6%	NaCl 8%	NaCl 10%	Lysosyme	Sporulation
MR1	+	+	-	-	-	-
MR2	+	+	-	-	+	-
MR3	+	+	-	-	+	-
MR4	+	+	-	-	-	-
MR5	+	+	-	-	+	-
MR6	+	+	-	-	-	-
MR7	-	-	-	-	-	-
MR8	+	+	-	-	+	-
MR9	+	+	-	-	-	-
MR10	+	+	-	-	-	-
MR11	+	-	-	-	+	-
MR12	+	+	-	-	+	-
MR13	+	+	-	-	-	-
MR14	+	-	-	-	-	-
MR15	+	+	-	-	+	-
MR16	+	+	-	-	+	-
MR17	+	+	-	-	+	-
MR18	+	+	-	-	-	-
M19	+	+	-	-	-	-
M1	+	+	-	-	+	-
M2	+	+	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-

+ = Croissance ; - = Pas de croissance

2. Etude de la production des Exopolysaccharides

Les taux des sucres totaux des différentes souches sont compris entre 181 mg/l et 814 mg/l (Figure 6). La souche MR10 (814 mg/l) possède un taux élevé de sucres par rapport à la souche MR12 qui a un taux de (181mg/l). Le pourcentage de sucre dans les EPS produits par les souches varie entre 9,92 (souche MR12) et 48,6 (MR10) (figure 7). Ces taux sont supérieurs à ceux obtenus par Cerning et ses collaborateurs en 1988 qui ont obtenu un taux de sucres variant de 50 mg/l à 350 mg/l avec *Streptococcus thermophilus*. Par contre ces taux sont similaires à ceux obtenus par ces mêmes auteurs en 1992 (80mg/l à 800mg/l). Cerning et ses collaborateurs en 1992 ont montré que le meilleur substrat pour la production d'EPS chez *Lactobacillus casei* est le glucose. L'importance de ces valeurs pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des souches isolées. Aussi la production d'exopolysaccharides dépend de plusieurs conditions : la température, le pH, le substrat carboné, la souche, la nature du milieu de culture (Grobben *et al.*, 2000 ; De vuyst *et al.* , 1998 ; Degeest et De vuyst, 1999 ; Ramos *et al.*, 2001 ; Yang, 2000).

Van den berg et ses collaborateurs en 1995 ont obtenu un taux d'EPS de 1400mg/l avec *Lactobacillus sake0-1*. De Vuyst et ses collaborateurs 1998 ont obtenu un taux d'EPS de 546 mg/l. D'une manière générale les quantités de polysaccharides produites par les bactéries lactiques sont inférieures à celles des polymères produits par d'autres bactéries non lactiques. La source de carbone a une influence majeure sur la production des EPS par les bactéries lactiques. En plus du type de monosaccharide ou de disaccharide (glucose, galactose, lactose, mannose, fructose ...), la concentration de ces sucres peut avoir un effet stimulant sur la production (Cerning *et al.*, 1992 ; Cerning *et al.* , 1994 ; Gamar *et al.*, 1997).

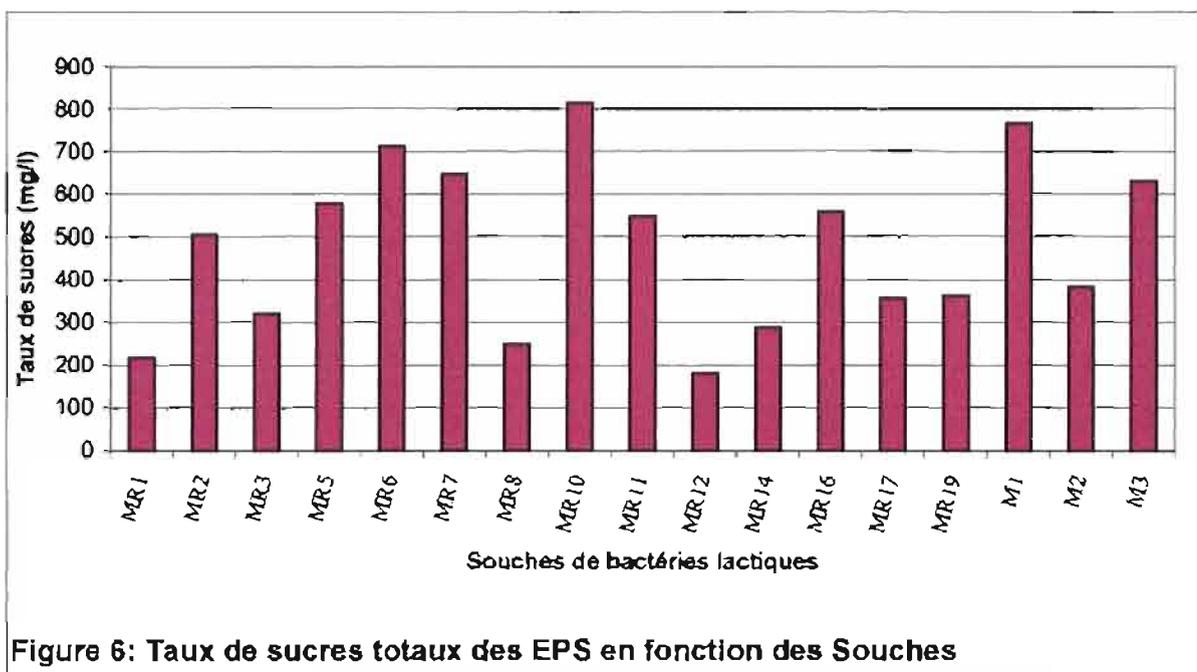


Figure 6: Taux de sucres totaux des EPS en fonction des Souches

2.1 Les protéines dans les EPS

Le taux de protéines (figure 9) dans les EPS des différentes souches est compris entre 0,17 mg/l (0,11 % de protéines) et 6,35mg/l (2,08 % de protéines). Le pourcentage de ces protéines dans les EPS est compris 0,11 (souche MR17) et 2,81 (souche M2). Ces taux sont nettement faibles comparativement à ceux des sucres totaux qui sont compris entre 181 mg/l (9,92% de sucres) et 814 mg/l (48,60% de sucres) (figure 6, 7). Les pourcentages de protéines dans les EPS de nos souches sont nettement inférieurs à ceux obtenus par Bejar et ses collaborateurs (1996) ; pourcentage variant entre 8,8 et 14,1.

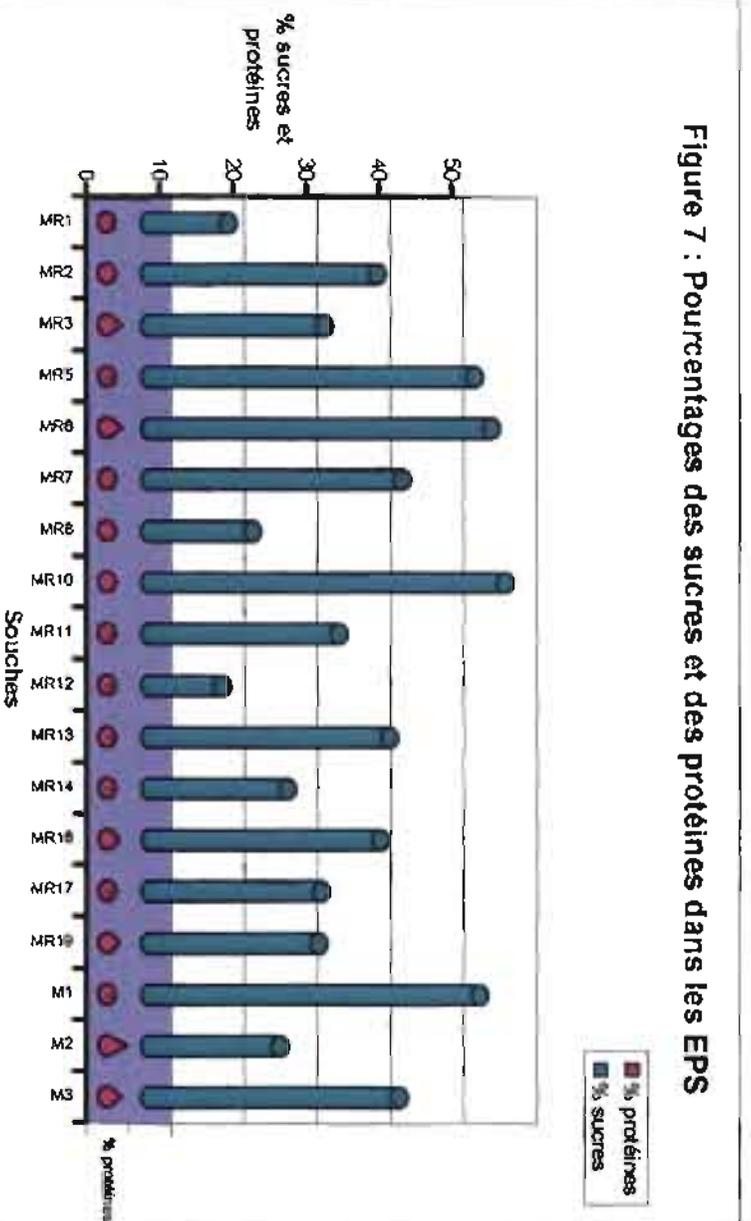


Figure 7 : Pourcentages des sucres et des protéines dans les EPS

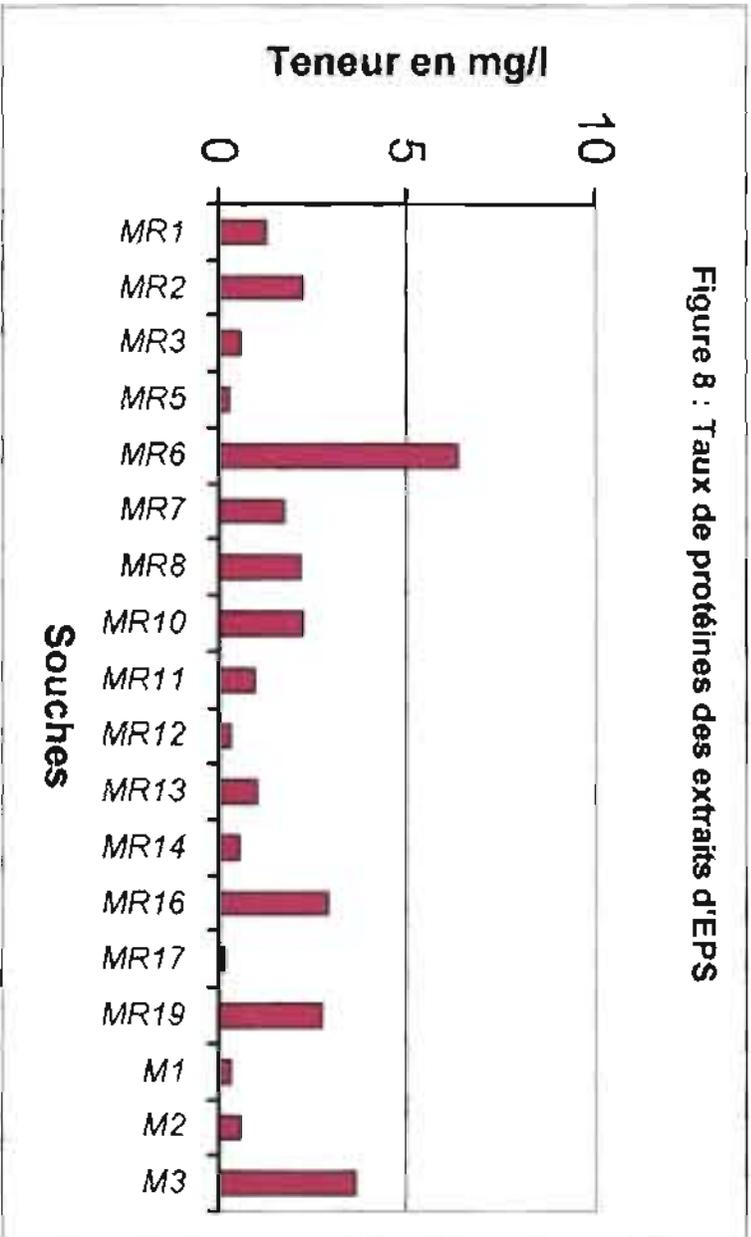
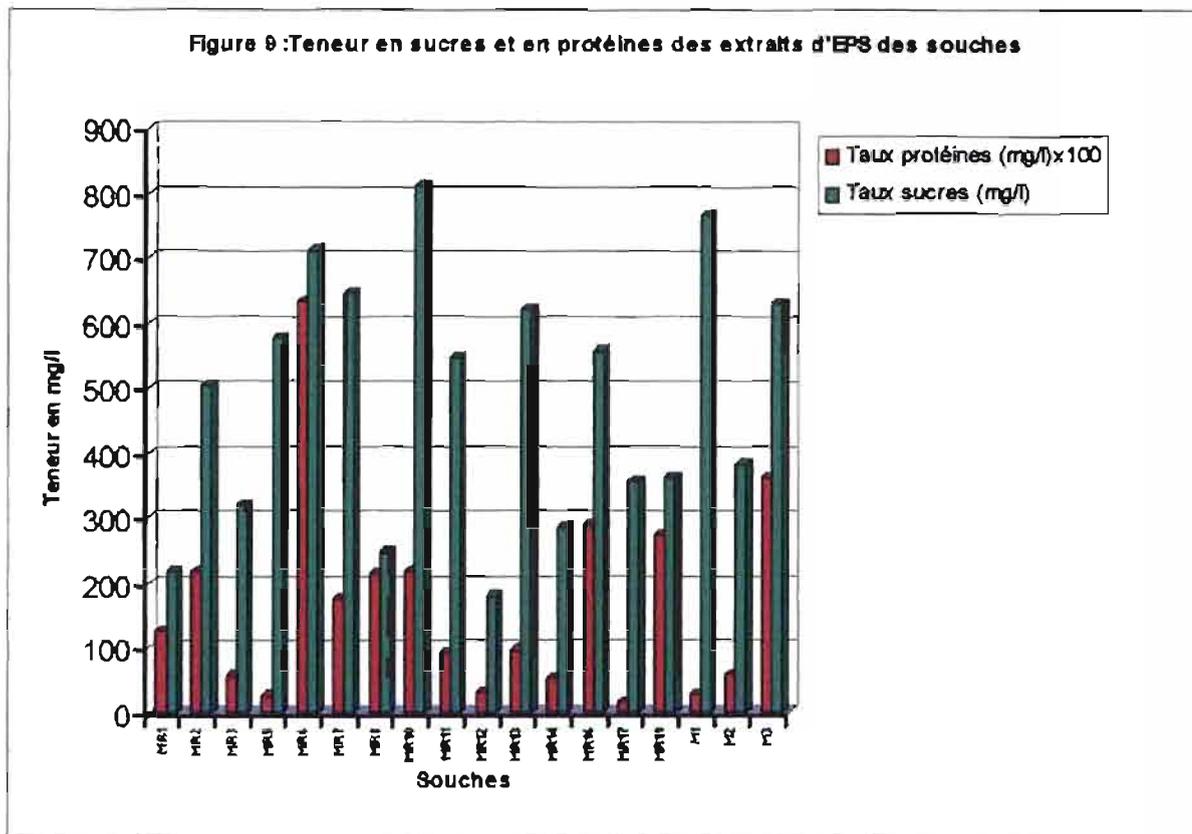
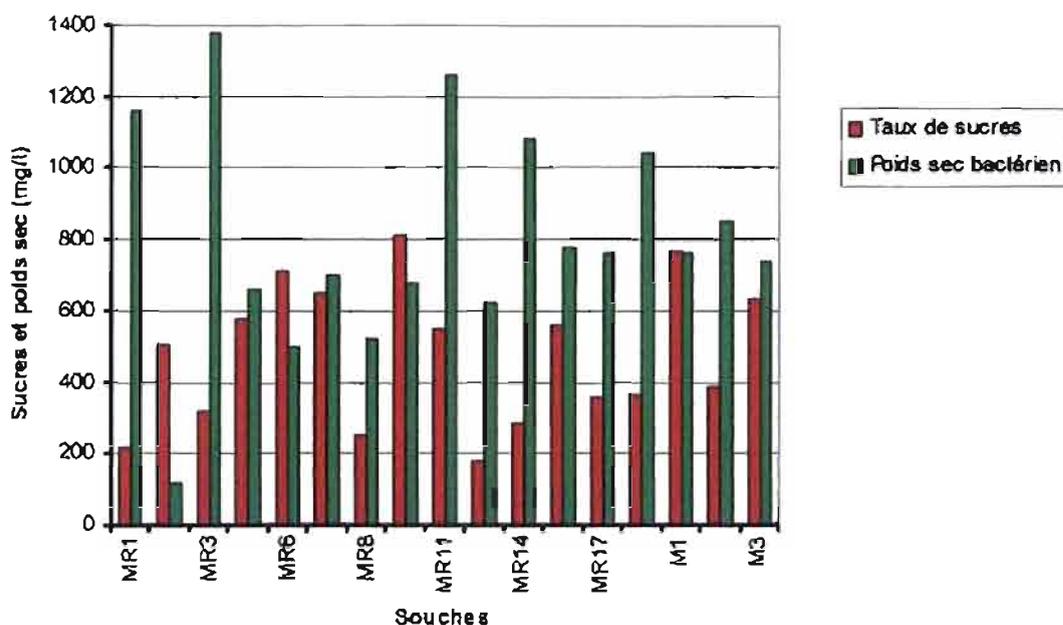


Figure 8 : Taux de protéines des extraits d'EPS



Les poids secs bactériens varient entre 120 à 1380 mg/l (Figure 7). La souche M2 possède le plus petit poids bactérien, tandis que la souche M3 possède le poids sec bactérien le plus élevé. Ces résultats montrent que les taux de sucres dans les EPS ne sont pas dépendants des poids sec bactériens. La souche M3 qui a le poids sec bactérien le plus élevé ne possède pas le taux de sucres le plus élevé dans les EPS aussi la souche M2 qui a le plus petit poids bactérien ne possède pas le plus petit taux de sucres dans les EPS. En effet la production d'EPS a lieu en fin de phase exponentielle en début de la phase stationnaire de croissance.

Figure 10 : Relation taux de sucres dans les EPS et poids sec bactérien



2.2 Composition monomérique des EPS par HPLC

L'ensemble des résultats (tableau VII) montrent que le glucose (RT=5,52), le galactose (RT=6,02), le rahnose (RT=8,41) sont les monomères les plus rencontrés dans les exopolysaccharides produits par nos souches.

Les souches MR1, MR14 produisent des homopolysaccharides et les souches MR3, MR4, MR6, MR9, MR11, MR12, MR13, MR16, MR17, MR19 produisent des hétéropolysaccharides. Il ressort de ces résultats que les échantillons de lait contiennent et /ou des souches capables de produire des homopolysaccharides ou des hétéropolysaccharides. Les souches productrices d'hétéropolysaccharides sont les plus rencontrées dans nos échantillons.

Les homopolysaccharides sont généralement synthétisés par les *Leuconostoc mesenteroides* (dextranes), les *Streptococcus mitans* (mutanes) et les *Streptococcus salivarius* (levanes).

Les hétéropolysaccharides sont produits par les bactéries lactiques mésophiles, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus casei* et certaines thermophiles, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*.

Les homopolysaccharides sont synthétisés en dehors de la cellule productrice grâce à ses enzymes excrétés ; la production du dextrane par exemple est rendue possible grâce à l'existence d'une enzyme nommée dextranesucrase. Cette enzyme est spécifique pour la

sucrose et l'énergie de polymérisation provient de son hydrolyse. Elle peut être produite à partir de cultures cellulaires de *Leuconostoc mesenteroides* ou de préparations enzymatiques sans cellules vivantes, éventuellement immobilisées (Cerning, 1990).

Quant à la synthèse des hétéropolysaccharides par les bactéries lactiques, plusieurs enzymes en sont responsables comme par exemple, l'UDP-glucose déshydrogénase, la glucosyl-transférase et la galactosyl-transférase. Ces enzymes ne sont pas seulement actives dans la biosynthèse des EPS, mais elles sont impliquées dans d'autres activités métaboliques.

Les monomères généralement rencontrés dans les EPS produits par les bactéries lactiques sont le glucose et le galactose. Le galactose est le plus important monomère (Cerning, 1990). On rencontre aussi du rhamnose (Cerning *et al.*, 1986 ; 1988 ; Nakajima *et al.*, 1990, 1992 ; Gruter *et al.*, 1993 ; Grobber *et al.*, 1995), du mannose (Petit *et al.*, 1991), du fructose (Manca de Nadra *et al.*, 1985) de l'arabinose, du xylose (Cerning *et al.*, 1988, 1992), des sucres dérivés comme le N-acetylgalactosamine (Doco *et al.*, 1990 ; Petit *et al.*, 1991), le N-acetylglucosamine (Cerning *et al.*, 1994). La fonction des EPS est liée à leur structure primaire (Sutherland, 1994).

En outre les conditions de croissance comme la composition du milieu de culture, la température, le pH, la tension d'oxygène et la vitesse d'agitation peuvent influencer la quantité mais aussi la composition et la taille de l'EPS. Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés concernant l'influence de ces paramètres sur la production des EPS. Au début des recherches sur la production d'EPS par les bactéries lactiques, aucune production n'a été observée dans les milieux semi-définis comme le MRS. Ainsi, plusieurs travaux ont été réalisés dans le lait (Cerning *et al.*, 1986, 1988 ; Cerning *et al.*, 1990, 1992 ; De vuyst *et al.*, 1998 ; Garcia-Garibay et Marshall, 1991) ou dans un milieu à base du lactosérum (Gassem *et al.*, 1997 ; Macedo *et al.*, 2002a ; Macedo *et al.*, 2002b).

Seulement récemment des milieux semi-synthétiques et synthétiques ont été utilisés (Cerning *et al.*, 1994 ; Dupont *et al.*, 2000 ; Grobber *et al.*, 2000 ; Grobber *et al.*, 1995 ; Grobber *et al.*, 1996 ; Grobber *et al.*, 1997 ; Kimmel et Rolerts, 1998 ; Petry *et al.*, 2000 ; Pham *et al.*, 2000, Van den Berg *et al.*, 1995).

La source de carbone a une influence majeure sur la biosynthèse des EPS par les LAB. En plus du type de sucre (Glucose, galactose, lactose, mannose, fructose) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production (Cerning *et al.*, 1992 ; Cerning *et al.*, 1994 ; Gamar *et al.*, 1997). La production d'EPS par *Lb.delbrueckii ssp. bulgaricus* a été plus grande dans un milieu avec du glucose ou du lactose que dans un

milieu avec du fructose, tandis que la supplémentation en mannose a résulté en une croissance et une production d'EPS faible (Grobben *et al.*, 1995 , Grobben *et al.*, 1996).

Tableau VII. Composition monomérique en pourcentage en sucres des EPS des souches isolées

Sucres	Glucose	Galactose	Mannose	Rhamnose	Fructose	Pentose	Autres
MR1	100 %						
MR3		99,18%	0,80%				
MR4	29,06%					64,06%	6,85%
MR6	2,95%					97,04%	
MR9		99,97%					
MR11	47,41%			52,57			
MR12	81,95%					18,01%	
MR13	34,55%	8,22%	26,34%			30,86%	
MR14	100%						
MR16	93,92%				1,35%	5,27%	
MR17			32,58%	36,42%	30,41		
MR19		11,49%	13,41%				75,05%

2.3 Mesure de l'activité de la β -glucuronidase

Toutes les souches testées pour l'activité de la β -glucuronidase ont des DO à 405 nm qui augment au bout de deux heures d'incubation. Après six heures de croissance, toutes les DO sont négatives (fig 11), ce qui peut s'expliquer par la diminution de substrat qui est l'acide paranitro- β -D-phenyl glucuronique ; justifiant ainsi l'existence de l'enzyme β -glucuronidase.

Les systèmes enzymatiques impliqués dans la production d'EPS sont complexes. Les gènes déterminant les enzymes participant à la synthèse d'EPS et de polysaccharides capsulaires sont organisés en un opéron eps, cps ou cap (Van Kranenburg *et al.* , 1999). Une région centrale occupée par des gènes de glucosyltransférases est encadrée par les gènes nécessaires à la régulation, la polymérisation et à l'export des polysaccharides (Lamothe, 2000).

Anas Ramos et collaborateurs (2001) ont montré que chez la souche de *Lactococcus lactis* productrice d'EPS l'activité de la 6-phosphofructokinase est de 820 nmol / mg de protéine et par minute alors que chez la même souche non productrice d'EPS cette activité était de 1,07 ce qui montre l'importance de cette enzyme dans la production d'EPS.

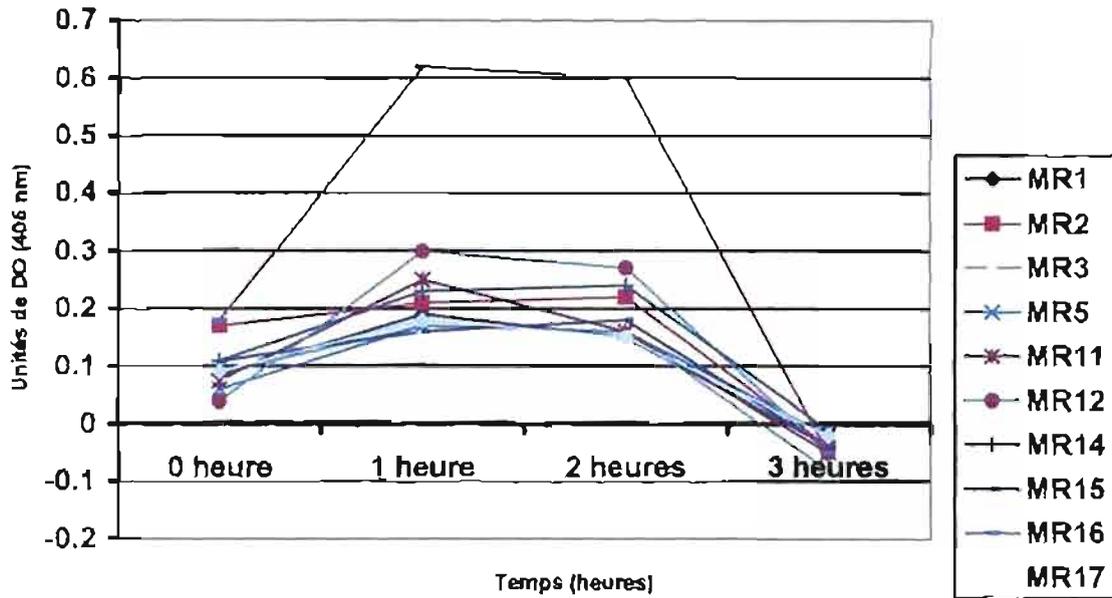
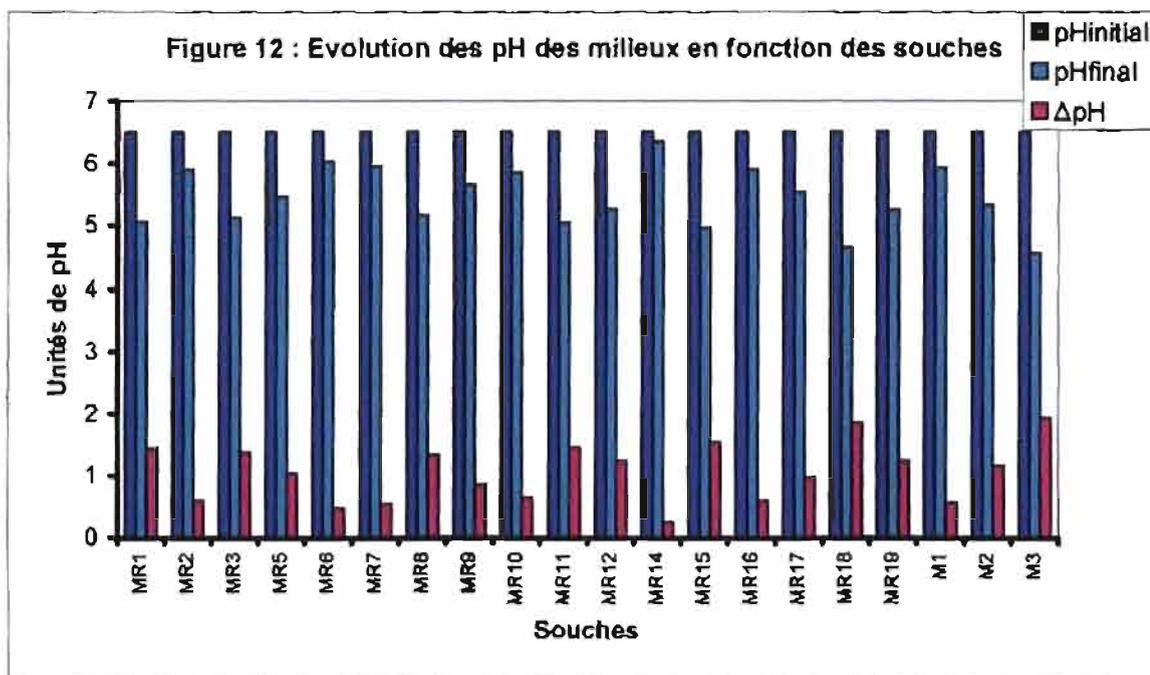


Figure11 : Mesure de l'activité de la β -glucuronidase

2.4. Les Variations de pH

Les pH finaux varient entre 4,56 (souche M3) et 6,35 (souche MR14). Les variations de pH (Δ pH) sont de l'ordre 0,25 (Souche MR14) à 1,94 (souche M3). Les souches M3 et M18 ont les plus bas pH finaux respectivement 4,56 et 4.65 (figure 12).

Les souches M3 et MR 18 semblent acidifier plus leur milieu de culture.



Isolement et caractérisation de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides à partir de laits du Burkina Faso

Aly Savadogo¹, Cheik Amadou Tidiane Ouattara²,
Aboubakar Sidiki Ouattara¹ et Alfred S. Traoré³

Résumé

Dix souches de bactéries lactiques capables de produire des exopolysaccharides (EPS) ont été isolées et caractérisées à partir des échantillons de lait prélevés à Dori (province du Séno, région où le lait est beaucoup consommé). Six souches ont la forme coque et les quatre autres sont des bâtonnets. La production d'EPS lorsque du lait entier est utilisé varie de 232 mg/l à 1144 mg/l selon les souches. Deux souches ont donné des productions importantes : il s'agit de la souche 1 (916 mg/l) et de la souche 7 (1144 mg/l) ; la caractérisation de ces deux souches a montré que la souche 1 est homofermentaire et la souche 7 hétérofermentaire. Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques ont révélé que la souche 1 appartient au genre *Lactococcus* et la souche 7 au genre *Leuconostoc*. Ces deux souches présentent de bonnes aptitudes pour leur utilisation en technologie alimentaire et en médecine.

Mots-clés : Lait, fermentation, bactéries lactiques, exopolysaccharides (EPS), Burkina Faso.

Isolation and characterisation of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Burkina Faso milks

Abstract

Ten strains of exopolysaccharides (EPS) producing lactic acid bacteria were isolated from milk samples taken in Dori (province of Séno). Six strains have cocci form and four have rod form. The EPS production rate on fresh milk varied from 232 mg/l to 1144 mg/l. Two strains gave significant production of EPS : strain 1 (916mg/l) and the strain 7 (1144mg/l). These strains have been characterised ; strain 1 is homofermentaire and strain 7 is heterofermentaire. Morphological, physiological and biochemical characteristics showed that strain 1 belongs to *Lactococcus* genus and the strain 7 to *Leuconostoc* genus. These two strains present good aptitudes for their use in food technology and medicine.

Key-words: Milk , fermentation , Lactic acid bacteria , Exopolysaccharides (EPS), Burkina Faso.

¹ Doctorant au CRSBAN (Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles) DBM / UFR-SVT / Université de Ouagadougou / Burkina Faso 03 B P 7131 Ouagadougou 03, e-mail : aly.savadogo@univ-ouaga.bf

² Maître-Assistant au Département de Biochimie-microbiologie UFR/SVT Université de Ouagadougou, Burkina Faso CRSBAN 03 BP 7131 Ouagadougou 03 Tél/Fax : (226) 33 73 73

³ Maître de Conférences au Département de Biochimie-microbiologie UFR/SVT Université de Ouagadougou, Burkina Faso, CRSBAN, 03 B P. 7131 Ouagadougou 03. Tél/Fax : (226) 33 73 73

⁴ Professeur au Département de Biochimie-microbiologie UFR/SVT et Directeur du CRSBAN 03 B P 7131 Ouagadougou, Burkina Faso 03 Tél/Fax : (226) 33 73 73

Introduction

Le Burkina Faso est un pays d'élevage avec un potentiel animal estimé en 1998 à 4 611 900 bovins et 14 544 000 petits ruminants (ovins et caprins). La production nationale était estimée en cette même année à 37 392 tonnes de lait commercial (Réseau Documentaire d'Élevage au Burkina Faso, 1998). Ce lait est consommé sous forme de lait cru, de lait caillé, de yaourt, de fromage et de beurre.

Eu égard à l'importance de la production laitière, des initiatives de transformation par des procédés traditionnels ou par des petites et moyennes entreprises se développent de plus en plus. Il se pose alors le problème de maîtrise de la technologie de fabrication et d'assurance de la qualité des sous-produits.

Les bactéries lactiques jouent un rôle capital dans la transformation par fermentation du lait. Les exopolysaccharides (EPS) produits par certaines bactéries lactiques dans les sous-produits fermentés à partir de lait assurent des propriétés rhéologiques (texture, viscosité, formation de gel) (CERNING *et al.*, 1986 ; CERNING, 1990) et physico-chimiques (arôme, goût, saveur) (CERNING, 1990 ; DESMAZEAUD, 1996). Ainsi, dans les villes scandinaves les souches productrices d'EPS sont utilisées dans les laits fermentés tels que le « viili » et le « Lonfil ».

Les EPS ont des activités anti-tumeur (DOCO *et al.*, 1990) ; en outre, ils protègent les cellules contre la dessiccation, la phagocytose et participent à l'utilisation des ions métalliques (CERNING, 1990). Ils sont aussi utilisés dans le traitement de certaines maladies gastro-intestinales.

Les bactéries lactiques et les EPS présentent un grand intérêt pour l'alimentation humaine. A notre connaissance à nos jours, aucune étude n'a été réalisée sur la production d'EPS par des bactéries lactiques de lait du Burkina, et/ou sur la préparation de starters locaux. Pour ce faire, l'objectif de cette étude est de contribuer à l'amélioration de la qualité des sous-produits dérivés de la fermentation lactique du lait, par l'isolement et à la caractérisation de souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides. Ce travail rapporte l'isolement et la caractérisation des souches de bactéries lactiques productrices d'EPS à partir de lait et sur milieu synthétique (milieu de culture reconstitué).

L'isolement des bactéries lactiques à partir de laits locaux est une étape de la préparation de starters locaux adaptés et performants. L'exploitation de ces starters dans les petites et moyennes entreprises contribuera certainement à l'assurance de la qualité totale.

Matériel et méthodes

Trente deux échantillons de lait fermenté ont été collectés dans des flacons stériles de 100 ml dans la région de Dori (province du Séno). Ces échantillons ont été transportés et conservés au laboratoire à + 4 °C en attente d'analyse.

Isolement de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides

Les expériences ont été réalisées en aérobiose de la façon suivante : dans chaque échantillon de lait conservé à + 4 °C, 1 ml a été prélevé et introduit dans 9 ml d'eau physiologique (NaCl 9 ‰). Une dilution en cascade a été réalisée jusqu'à la dilution 10⁻⁹. Ces dilutions ont été utilisées pour l'ensemencement des milieux de cultures sélectifs. Une numération a été réalisée pour chaque

milieu de culture sélectif pour avoir une idée de l'importance des genres bactériens présents dans les échantillons. Ensuite à partir des dilutions les plus élevées des colonies bien individualisées et visqueuses ont été prélevées et étalées sur les boîtes de Pétri. Ces colonies isolées ont été prélevées une seconde fois et un repiquage par stries a été réalisé sur des boîtes de Pétri pour la purification. La pureté des souches isolées a été confirmée ensuite par des études morphologiques, physiologiques et biochimiques. C'est après tous ces tests que nous avons réalisé le test de production d'EPS.

Les milieux d'isolement et de culture

Les milieux sélectifs utilisés sont : le milieu de Chalmers (ROISSART et LUQUET, 1994) pour l'isolement des lactocoques, deux milieux de ROISSART et LUQUET (1994) pour les *Leuconostoc* et les streptocoques, le milieu MRS pour l'isolement des lactobacilles, le milieu de base (MB) pour l'étude de la fermentescibilité des sucres (COMBET-BLANC, 1995) et le milieu de KIMMEL *et al.* (1998) pour la production de polysaccharides.

La température de stérilisation de tous les milieux a été de 120 °C pendant vingt minutes, sauf pour le milieu de base (MB) qui a été stérilisé à 110 °C.

Caractérisation des souches

L'étude morphologique a été réalisée en prélevant quelques gouttes de chaque suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle et en les étalant sur une lame, cette préparation a été colorée au bleu de méthylène et observée au microscope.

La croissance des souches bactériennes a été suivie en mesurant directement la turbidité de la suspension bactérienne par la lecture de la densité optique (DO) des tubes à 650 nm toutes les 30 minutes.

L'étude de l'effet de la température sur la croissance bactérienne a été réalisée aux températures de 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C et 45 °C. Les DO ont été mesurées à des intervalles de 30 minutes pendant 24 heures, puis les taux de croissance ont été calculés.

Le test de sporulation a été effectué selon la méthode du choc thermique.

La recherche de la catalase a été effectuée à l'aide d'eau oxygénée (3%).

Le test de l'oxydase a été effectué avec le réactif de Kovacs (dihydrochlorure de tétraméthyl-P-phénylènediamine).

L'étude de la fermentescibilité des sucres a été effectuée dans des tubes à vis contenant le milieu de base (MB). Les solutions de sucres stérilisées par filtration à l'aide des filtres millipores de diamètre 0,22 µm ont été ajoutées dans les tubes de manière à obtenir une concentration finale en sucre de 3 g/l (COMBET-BLANC, 1995).

Pour l'identification des souches, une clé dichotomique a été utilisée (CHAMPAGNE, 1998).

Test de production d'exopolysaccharides

Les cultures bactériennes de 24 heures sont centrifugées pendant 10 minutes à 5 000 g ; 1 ml d'éthanol a été rajouté à 1 ml de surnageant de milieu de culture ; la présence de polysaccharides se traduit par la formation d'un anneau opaque à l'interface (ROISSART et LUQUET, 1994).

Isolement des exopolysaccharides

Au stade de fermentation, les cultures bactériennes ont été chauffées dans un bain-marie à 100 °C pendant 15 minutes pour inactiver les éventuelles exopolysaccharidases (CERNING *et al.*, 1992, KIMMEL *et al.*, 1998). Les cellules bactériennes et les protéines ont été éliminées par centrifugation à 8 000 g pendant 20 minutes à une température de 4 °C. Les polysaccharides ont été précipités par addition de 3 volumes d'éthanol ; le précipité a été récupéré par centrifugation à 12 000 g pendant 20 minutes à 4 °C dans de l'eau distillée. Une dialyse de ce précipité a été effectuée dans un tube à dialyse de mailles comprises entre 6 000 et 8 000 Da pendant 48 heures contre de l'eau distillée (KIMMEL *et al.*, 1998).

Dosage des exopolysaccharides

Le dialysât obtenu après 48 heures a été divisé en trois parts égales. La première part a été utilisée pour doser les carbohydrates totaux qui représentent les EPS par la méthode au phénol sulfurique (DUBOIS *et al.*, 1956). Le taux de sucres réducteurs a été déterminé par la méthode au Dinitro-salicylate (DNS) avant hydrolyse (seconde part) et après hydrolyse à l'acide trifluoroacétique 2M (troisième part).

Résultats

Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées

Le test de production d'EPS a permis de retenir 10 souches (tableau I) sur un ensemble de 50 souches isolées. Ces résultats montrent que les échantillons de lait sont riches en bactéries lactiques parmi lesquelles on peut trouver des bactéries productrices d'EPS.

Toutes les 10 souches retenues sont Gram positif, non sporulantes, immobiles, catalase négative, oxydase positive. Parmi ces 10 souches, 6 ont la forme de coque et 4 ont la forme de bâtonnet. Les 6 souches en forme de coque se subdivisent en 4 groupes selon leur mode de regroupement (tableau I) : le premier groupe est formé de coques isolées et en courtes chaînettes (souches 1 et 3) ; le second groupe est formé de coques en paires et en courtes chaînettes (souches 2 et 6) ; le troisième groupe est formé de coques isolées et en longues chaînettes (souche 4) ; le quatrième groupe est composé de coques en paires et en longues chaînettes (souche 7).

Quant aux 4 souches en forme de bâtonnet elles se subdivisent en 3 groupes selon leur mode de regroupement : le premier groupe est formé de bâtonnets en paires et en courtes chaînettes (souche 5) ; le second groupe est formé de bâtonnets isolés (souches 8 et 10) ; le troisième est formé de bâtonnets en paires (souche 9).

Les souches 1 et 3 sont isolées sur le milieu Chalmers, les souches 2 et 6 sont isolées sur le milieu sélectif pour les *Streptococcus*, les souches 4 et 7 sont isolées sur le milieu sélectif pour les *Leuconostoc*. Quant aux quatre autres souches (5, 8, 9, 10) elles ont été isolées sur le milieu MRS.

L'utilisation de milieux de culture sélectifs d'une clé d'identification dichotomique ainsi que l'étude de la fermentescibilité des sucres et le type de fermentation ont permis de déterminer les genres des souches isolées. Ainsi parmi les quatre coques isolées les souches 1 et 3 sont de genre *Lactococcus*, les souches 2 et 6 sont des *Streptococcus* et les souches 4 et 7 sont des *Leuconostoc*. Les bâtonnets (5, 8, 9 et 10) appartiennent au genre *Lactobacillus*.

Tableau I. Caractères morphologiques et physiologiques des souches productrices d'exopolysaccharides isolées à partir des échantillons de lait

Caractères	Souches									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Morphologie	coques	coques	coques	coques	bâtonnet	coques	coques	bâtonnet	bâtonnet	bâtonnet
Mode de regroupement	Isolées C.C	Paires C.C	Isolées C.C	Isolées L.C	Paires C.C	Paires C.C	Paires L.C	Isolés	Paires	Isolés
Sporulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coloration Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : test positif ; - : test négatif ; C.C : Courtes chaînettes ; L.C : Longues chaînettes

Production d'EPS

Les 10 souches de bactéries lactiques isolées ont donné des résultats positifs pour la production d'EPS. Ces résultats montrent que la production d'EPS varie d'une souche à l'autre (tableau II). Les productions obtenues dans les cultures sur le lait varient de 232 mg/l à 1 144 mg/l. Deux souches offrent les plus fortes productions : il s'agit des souches 1 (*Lactococcus*) (916 mg/ml) et 7 (*Leuconostoc*) (1 144 mg/ml) ; les souches 2 ; 5 ; 6 ; 8 ; 9 et 10 ont une production moyenne de 758 ; 440 ; 474 ; 724 ; 586 et 678 mg/ml respectivement ; les taux de production d'EPS obtenus avec les souches 3 et 4 sont relativement faibles (234 mg/l pour la souche 3 et 232 mg/l pour la souche 4).

Par ailleurs, en culture sur les milieux synthétiques la souche 8 est la plus performante avec une production d'EPS de 1065 mg/l. A l'exception de cette souche, on constate aussi que pour toutes les autres souches les taux de production d'EPS en culture sur le lait sont nettement supérieurs à ceux obtenus en culture sur le milieu synthétique.

Tableau II. Taux de production des exopolysaccharides en mg/l de 10 souches sur du lait et sur un milieu synthétique après 24 heures d'incubation à 37 °C.

Support	Souches									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lait	916	758	234	232	440	474	1 144	724	586	678
Milieu synthétique	745	510	190	172	220	210	540	1 065	316	360

Concentration en sucres réducteurs des EPS

Les résultats (tableau III) montrent que le taux de sucres réducteurs de tous les échantillons analysés augmente après hydrolyse. En effet, les augmentations en pourcentage (%) des concentrations des sucres réducteurs d'exopolysaccharides après hydrolyse pour les souches 1, 2, 7, 8 sont respectivement de 168,44 ; 4,13 ; 30,28 ; 4,28 mg/ml.

Tableau III. Concentration des sucres réducteurs en mg/ml d'exopolysaccharides produits par les souches 1, 2 7 et 8 avant et après hydrolyse à l'acide trifluoroacétique 2M.

Concentration mesurée	Souche			
	1	2	7	8
avant hydrolyse	9,693	8,495	13,386	10,740
après hydrolyse	26,020	8,846	17,440	11,200

Fermentescibilité et type de fermentation

Les résultats de la fermentescibilité des sucres diffèrent selon les souches (tableau IV).

La souche 1 fait fermenter tous les sucres testés, exceptés le mélibiose et l'amidon. Quant à la souche 7 elle fait fermenter tous les neuf sucres testés (glucose, galactose, saccharose, lactose, maltose, rhamnose, mélibiose, raffinose, amidon).

Les résultats montrent également que seule la souche 7 (*Leuconostoc*) produit du gaz au cours de son métabolisme.

Tableau IV. Paramètres de croissance et de fermentation des sucres et production de gaz par les souches 1 et 7.

Paramètre	Souche 1	Souche 7
Croissance		
Temps de latence (h)	1	4
μ_{max} (h ⁻¹)	0,80	0,58
Température optimale de croissance (°C)	32-33	20,22
Fermentation des sucres, production de gaz		
D(+) Galactose	+ (gaz-)	+ (gaz+)
D(+) Glucose	+ (gaz-)	+ (gaz+)
D(+) Melibiose	- (gaz-)	+ (gaz+)
D(+) Lactose	+ (gaz-)	+ (gaz+)
Amidon	- (gaz-)	+ (gaz+)
L(+) Rhamnose	+ (gaz-)	+ (gaz+)
D(+) Raffinose	+ (gaz-)	+ (gaz+)
D(+) Saccharose	+ (gaz±)	+ (gaz+)
Maltose	+ (gaz-)	+ (gaz+)

+ : Fermentation, - : Pas de fermentation ; gaz+ : Production de gaz faible, gaz- : Pas de production de gaz.

Cinétique de la croissance

Les deux souches 1 et 7, au regard de leur taux de production d'EPS sur le lait (les souches 1 et 7) ont été retenues pour l'étude physiologique.

Le temps de latence de la souche 1 est de 1 heure et celui de la souche 7 de 4 heures (tableau IV) la phase de latence de la souche 1 est plus réduite que celle de la souche 7. La souche 1 (avec un temps de génération égal à 1 heure) atteint la phase stationnaire de croissance au bout de 7 heures et la souche 7 (avec un temps de génération égal à 1,5 heure) atteint la phase stationnaire de croissance au bout de 10 heures de croissance. Les résultats de la croissance de la souche 1 en fonction de la température (figure 1) montrent que sa température optimale de croissance est comprise entre 32 - 33 °C et un μ_{max} de 0,80 h⁻¹ (tableau IV). Elle ne croît pratiquement pas à 45 °C.

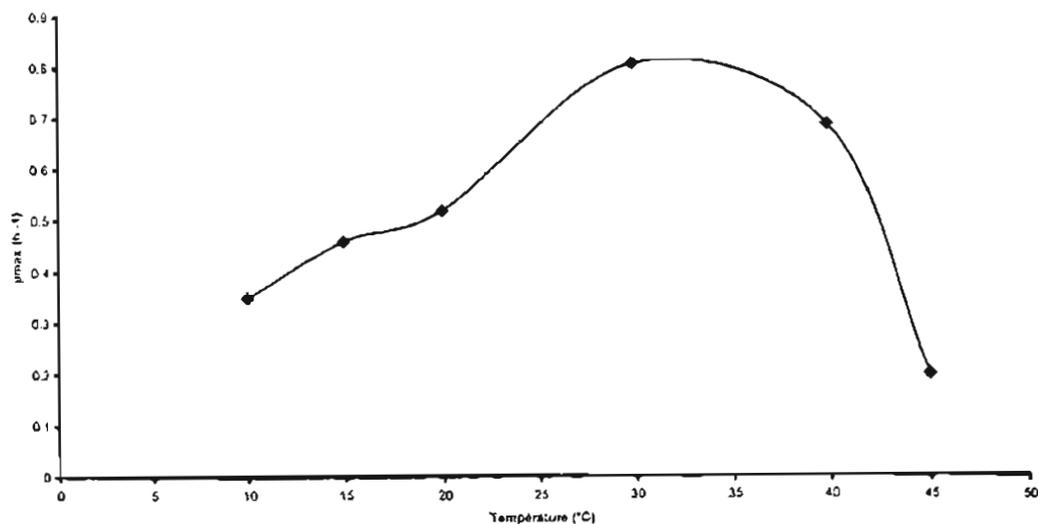


Figure 1. Croissance de la souche 1 en fonction de la température.

La croissance de la souche 7 (figure 2) en fonction de la température montre que sa température optimale de croissance est comprise entre 20 et 22 °C et un μ_{max} de 0,58 h⁻¹ (tableau IV). Une croissance a été observée à 45 °C.

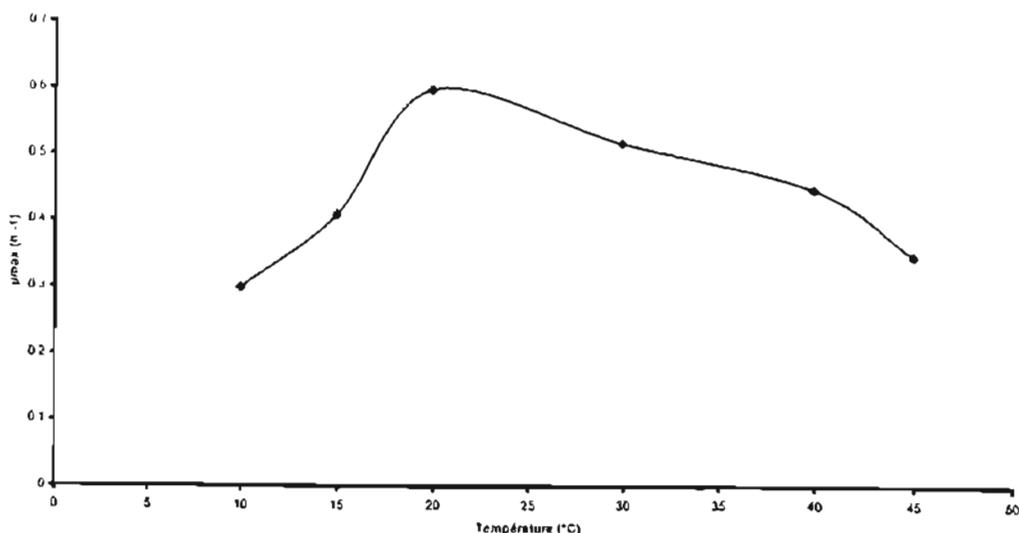


Figure 2. Croissance de la souche 7 en fonction de la température.

Discussion

Les résultats des caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches (Gram, incapacité à former des spores, mobilité, catalase, oxydase) montrent qu'elles appartiennent au groupe des bactéries lactiques (KANDLER et WEISS, 1986 ; SCHLEIFER, 1986 ; FERESU et MUZONDO, 1990). Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par ISONO *et al.* (1994) qui ont travaillé sur la caractérisation et l'identification de bactéries lactiques isolées de laits fermentés du Nord de la Tanzanie et qui ont montré que les laits fermentés traditionnellement sont riches en plusieurs genres de bactéries lactiques productrices d'EPS. Les travaux de SMITNONT *et al.* (1999) réalisés sur des souches productrices d'exopolysaccharides de produits fermentés de thaï ont montré des caractéristiques morphologiques et biochimiques similaires à celles de notre étude.

Les bactéries lactiques produisent du peroxyde d'hydrogène au cours de leur métabolisme ; le test de catalase étant négatif pour nos souches, elles devraient être tuées par le peroxyde d'hydrogène qui se formerait, car ne possédant pas de catalase, enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau. Toutefois, la plupart des bactéries possèdent leurs propres moyens de défense contre la toxicité de l'oxygène soit en produisant une peroxydase flavinique, soit en intervenant par une pseudo-catalase non hémique, soit en accumulant des ions Mn^{2+} . Les bactéries lactiques sont anaérobies facultatives, micro-aérophiles capables de fermentation en anaérobiose comme en aérobiose.

Tous les genres que nous avons identifiés dans nos échantillons font partie de la flore habituelle des laits et de leurs sous-produits fermentés (CERNING *et al.*, 1991 ; DESMAZEAUD, 1996). Ils jouent un rôle capital dans la transformation par fermentation du lait en assurant la texture, la

flaveur, la salubrité et la conservation par la production d'EPS, d'acide lactique et quelquefois de bactériocines (DESMAZEAUD, 1996).

Les valeurs de taux de production d'EPS obtenues au cours de cette étude sont du même ordre que celles obtenues par CERNING *et al.* (1988 ; 1992) et par DOCO *et al.* (1990). En effet, les travaux que ces auteurs ont réalisés avec *S. thermophilus* ont indiqué des taux de production d'EPS variant de 50 à 350 mg/l de lait. Ceux réalisés avec *L. lactis* subsp *Cremoris* ont donné des taux de production d'EPS plus élevés, variant de 80 à 800 mg/l de lait. Deux de nos souches (souches let 7) ont des taux de production plus importants que les souches de la littérature, ce qui nous permet de dire qu'elles sont performantes. De plus, plusieurs auteurs ont déjà montré que la composition du milieu de culture a une influence sur la quantité et la composition en monosaccharides des EPS produits (BEJAR *et al.*, 1998 ; CERNING, 1990 ; CERNING *et al.*, 1992 ; CERNING, 1995 ; DE VUYST et DEGEEST, 1999). En effet, le lait est un milieu naturel riche qui couvre en excès les besoins en sources de carbone, sources d'énergie et de facteurs de croissance des bactéries lactiques (milieu enrichi) ; tandis que les milieux synthétiques ont une composition définie quantitativement et qualitativement pour couvrir les besoins de croissance (milieu minimum) ; ce qui justifie cette différence de rendement sur les deux milieux. On sait que la production d'EPS requiert une source riche en carbone, en facteurs de croissance et en oligo-éléments qui sont plus disponibles dans le lait que dans le milieu synthétique (VAN NIEL et HAHN-HAGERDAL, 1999).

L'augmentation du taux (tableau III) de sucres réducteurs après hydrolyse acide de tous les échantillons analysés peut s'expliquer par le fait que l'acide trifluoroacétique rompt les liaisons entre les oses. En effet les oses qui composent les EPS produits par les bactéries comportent des liaisons α (1-2), α (1-3), α (1-6), β (1-2), β (1-3) (BEJAR *et al.*, 1998 ; DE VUYST et DEGEEST, 1999) ; l'hydrolyse acide rompt ces liaisons, ce qui justifie l'augmentation du taux de sucres réducteurs après l'opération.

La production de gaz par la souche 7 (*Leuconostoc*) et la fermentation de différents sucres conduisant à la production d'acide signifient que cette souche est hétérofermentaire ; quant à la souche 1 (*Lactococcus*) aucune production de gaz n'a été observée en plus de la fermentation des sucres, elle est homofermentaire. En effet, de nos jours parmi les streptocoques lactiques, seules les espèces du genre *Leuconostoc* sont reconnues pour leur aptitude à effectuer une fermentation hétérolactique. Les autres genres (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, etc.) sont en général homofermentaires.

La souche 1 a une température optimale de croissance comprise entre 32 et 33 °C, cet intervalle de températures cardinales la classe parmi les mésophiles (ISONO *et al.*, 1994 ; HOFVENDAHL *et al.*, 1999). Quant à la souche 7 sa température optimale de croissance est comprise entre 20 et 22°C. Nous pouvons la classer dans le groupe des mésophiles (HOFVENDAHL *et al.*, 1999 ; ROISSART et LUQUET, 1994).

La synthèse maximale des EPS est souvent observée à des températures inférieures aux températures optimales de croissance (WOOD et HOLZAPFEL, 1995). Ainsi, la production d'EPS augmente chez *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* incubées à des températures comprises entre 32 et 37 °C au lieu de 42 °C.

Conclusion

Il ressort de cette étude que les échantillons de lait de Dori contiennent des bactéries lactiques productrices d'EPS. La production a été possible sur du lait et aussi sur un milieu synthétique utilisé à cet effet. Les bactéries lactiques isolées produisent plus d'EPS sur le lait qui est leur milieu naturel de croissance que sur le milieu synthétique que nous avons utilisé.

Deux souches se sont révélées performantes : la souche 1 a montré une croissance optimale à 32 - 33 °C ; quant à la souche 7 sa croissance optimale est observée entre 20 et 22 °C.

Si nous considérons les cinétiques de croissance, la souche 1 croît beaucoup plus vite que la souche 7. L'ensemble des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ont permis d'identifier la souche 1 comme appartenant au genre *Lactococcus* et la souche 7 au genre *Leuconostoc*. Il est assez intéressant de connaître les monomères et les types de liaisons qui forment ces EPS produits, d'identifier les plasmides responsables de leur synthèse, ce qui pourrait, après des études complémentaires de pathogénicité de ces souches, contribuer à l'amélioration de l'alimentation. Ces deux souches pourraient à ce moment être utilisées en technologie laitière (fromage, yaourt) et en médecine (probiotique). □

Références citées

- BEJAR V., LLAMAS I., CALVO C. and QUESADA E., 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of Biotechnology*, (61) : 135-141.
- CERNING J., 1990. Exocellular 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*. *Abs. fre.* (75) : 463-472.
- CERNING J., BOUILLANNE CH., DESMAZEAUD M. J., and LONDON M., 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology letter*, (8) : 625-628.
- CERNING J., BOUILLANNE CH., LONDON M., and DESMAZEAUD M. J., 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letter*, 10 : 255-260.
- CERNING J., BOUILLANNE CH., LONDON M., and DESMAZEAUD M. J., 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sciences des Aliments*, (10) : 443-445.
- CERNING J., RENARD C. M. G. C., THIBAUT J.F., BOUILLANNE C., LONDON M., PIARD J.C. and DESMAZEAUD M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, (71) : 525-541.
- CERNING J., BOUILLANNE CH., LONDON M., and DESMAZEAUD M. J., 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, (75) : 692-699.
- CHAMPAGNE P. C., 1998. Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. ISBN : 2-89130-171-4 (EDISEM), Canada, 210 p.
- COMBET-BLANC Y., 1995. Caractérisation et étude physiologique d'une nouvelle bactérie lactique thermophile, *Bacillus thermoamylovorans* isolée du vin de palme. Thèse. Université de Provence, Aix-Marseille I. 104 p.
- DESMAZEAUD M., 1996. Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, (5) : 331-343.
- DE VUYST L. and DEGEEST B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, (23) : 153-177.

- DOCIO T., WIERUSZESKI J.M., FOURNET B., CARCANO D., RAMOS P. and LOONES A., 1990. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Res.*, (198): 313-322.
- DUBOIS M. A., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., and SMITH F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, (28) : 350-356.
- FERESU B. S. and MUZONDO I. M., 1990. Identification of some lactic acid bacteria from two Zimbabwean fermented milk products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (6) : 178-186.
- HOFVENDAHL K., VAN NIEL J. W. E., and HAHN-HAGERDAL, 1999. Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (51) : 669-672.
- ISONO Y., SHINGU I., and SHIMIZU S., 1994. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from masai fermented milk in northern Tanzania. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (58) : 660-664.
- KANDLER O., and WEISS N., 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, (2) : 1208-1234.
- KIMNIEL S. A., ROBERTS R.F. and ZIEGLER G.R., 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a Semi-defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, (64) : 659-664
- RESEAU DOCUMENTAIRE D'ELEVAGE AU BURKINA FASO, 1997. Revue de Presse sur l'élevage au Burkina Faso. Juillet 1997-décembre 1998. *Syfia Bulletin de Presse*.
- ROISSART H., et LUQUET F. M., 1994. Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques. ISBN : 2-9507477-0-1. Lorica, (1) : 605 p.
- SCHLEIFER H. K., 1986. Gram-Positive cocci. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, (2) : 999-1080.
- SMITINONT T., TANSAKUL C., TANASUPAWAT S., KEERATIPIBUL S., NAVARINI L., BOSCO M., and CESCOTTI P., 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods : Isolation, identification and exopolysaccharides characterization. *International Journal of Food Microbiology*, (51) : 105-111.
- VAN NIEL J. W. E., and HAHN-HAGERDAL, 1999. Nutrient requirements of *Lactococci* in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (52) : 617-627.
- WOOD B. J. B., HOLZAPFEL W. H., 1995. The genera of lactic acid bacteria. *Blackit Academic and Professional*, (2) : 398 p.

Résumé Article 2

Trente échantillons de lait fermenté traditionnellement ont été collectés dans des ménages Peulh au Nord du Burkina. L'analyse microbiologique a été faite par les méthodes standard et avec le système d'identification API 50 CH. La flore microbienne prédominante était des bactéries d'acide lactique, appartenant aux genres *Lactobacillus* (32%), *Leuconostoc* (30%), *Lactococcus* (20%), de *Leuconostoc/Beta-Bacterium* (10%), *Streptococcus* (6%), *Enterococcus* (2%). Des levures, des moisissures et des entérobactéries ont été également isolées.

Vingt souches de bactéries lactiques ont été identifiées au niveau espèce. Ces espèces étaient *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis*

Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso

Aly Savadogo^{1*}, C.A.T. Ouattara¹, P.W. Savadogo², A.S. Ouattara¹, N. Barro¹ and A.S. Traore¹
¹Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie - Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN)-Département de Biochimie-Microbiologie (DBM)-Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT),
Université de Ouagadougou, 03BP 7131 Burkina Faso
²Institut de l'Environnement et de la Recherche Agricole (INERA), Ouaga, Burkina Faso
E-mail: aly.savadogo@univ-ouaga.bf

Abstract: Thirty samples of traditional fermented milk were collected in northern Burkina from Fulani individual household. Microbial analysis was done by standard methods and with API 50 CH identification system. The predominant microflora was lactic acid bacteria, belonging to the genus *Lactobacillus* (32%), following by *Leuconostoc* (30%), *Lactococcus* (20%), *Leuconostoc/β-bacterium* (10%), *Streptococcus* (6%) and *Enterococcus* (2%) genus. Yeasts, molds and Enterobacteria were also isolated. Twenty representative lactic acid bacteria strains were identified to species level belonging to species *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis*.

Key words: Traditional fermented milk, Fulani, lactic acid bacteria, Burkina Faso

Introduction

One of people development factor is the ability to produce and store large amount of foods. For many peoples engaged in stock farming, cultured dairy products are important as foods. Milk has been preserved since early times by fermentation. Many traditional fermented milk products were made in Asia, Africa, the Middle East, and northern and eastern Europe. The microbiological characteristics of several fermented milk have been studied in Indonesia (Yodoamijoyo *et al.*, 1983; Hosono *et al.*, 1989), in Zimbabwe (Feresu and Muzondo, 1990), in South Africa (Keller and Jordan, 1990; Beukes *et al.*, 2001), in Morocco (Hamama, 1992), in Tanzania (Isono *et al.*, 1994). Some of the major fermentation processes are based on the use of lactic acid bacteria, which produce organic acids. The presence of fermentative lactic acid bacteria is crucial to the intrinsic properties of fermented food products (Thomas, 1985; Tamine and Robinson, 1988; McKay and Baldwin, 1990; Soomro *et al.*, 2002; Ehrmann *et al.*, 2002).

The nature of fermented products is different from one region to another. Thus is depending on the local indigenous microflora, which in turn reflected the climatic conditions of the area. Thus traditional fermented milk in regions with a cold temperature climate contained mesophilic bacteria such as *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp., whilst thermophilic bacteria, which include mostly *Lactobacillus* and *Streptococcus*, prevailed in regions with a hot, subtropical or tropical climate (Thomas, 1985; Tamine and Robinson, 1988; Kurmann, 1994).

Burkina Faso milk production was estimated to 37 392

tons of commercialized milk in 1998 (Réseau Documentaire d'Elevage, 1998). The Fulani of Burkina Faso, ferment their milk in calabashes, gourds, clay pots. These containers need to be seeded with a natural microbial inoculum before it could be use for the production of fermented milk. Containers filled with milk fresh milk are covered and placed in house. The milk are coagulated, the whey and proteins were homogenized. Their fermented milk contained important lactic acid bacteria (e.g. exopolysaccharides producing bacteria) (Savadogo *et al.*, 2001).

In Burkina Faso the rural population still produce unpasteurized fermented milk by traditional methods, since such milk product still enjoy loyal following in rural communities. Calabashes and gourds filled with fresh milk were covered and placed in the hut or house. The art of making traditional fermented milk will handed down from one generation to the next.

To our knowledge, few information exists on the traditional fermentative microflora that Fulani tribe used to produce fermented milk in Burkina Faso. The objectives of this study were to collect traditional fermented milk samples in rural areas, to determine the predominant microbial groups.

This paper deals with isolation and identification of microorganisms from Fulani fermented milk.

Materials and Methods

Fermented milk sampling: Fermented milk from thirty goat's and cow's were collected from individual households of rural areas in northern Burkina from July 1999 to January 2000. Samples were collected in sterile small bottles and stored in laboratory under refrigeration

at 5°C until they were used in experiments.

Enumeration and isolation of microorganisms: Ten milliliters of each sample were aseptically added into 90 ml of sterile 0.9% NaCl solution and mixed thoroughly. Serial dilutions (10^{-1} to 10^{-9}) were performed and 1 ml aliquots of the appropriate dilutions were directly inoculated in triplicate on the following media:

(a) Plate count agar (Fluka Biochemika 70152) incubated at 30°C for 72 h for enumeration of total aerobic mesophilic bacteria. (b) MRS agar (De Man *et al.*, 1960) (Fluka Biochemika 69966) incubated anaerobically at 42°C for 48 h for enumeration of thermophilic *Lactobacilli* and *Streptococci*. MRS agar plates were also incubated anaerobically at 35°C for 48 h for enumeration of mesophilic *Lactobacilli* and *Leuconostoc*. (c) M17 agar (Therzaghi and Sandine, 1975) (Difco) incubated aerobically at 30°C for 48 h for enumeration of *Lactococci*. (d) Rogosa agar (Rogosa *et al.*, 1951) incubated anaerobically at 35°C for 48 h for enumeration of *Lactobacilli*. (e) Violet Red Bile agar (VRBG) (Fluka Biochemika 70189) incubated aerobically at 37°C for 24 h for enumeration of enterobacteria. (f) YGC agar (Fluka Biochemika 95765) incubated aerobically at 25°C for 96 h for enumeration of yeast plus moulds. (g) *Salmonella* and *Shigella* agar (SS) (Fluka Biochemika 85640) was used for *Salmonella* and *Shigella* detection. The plates were incubated at 37°C for 48 h. Anaerobic jars (Biolab) with gas generating kits (Genbox CO₂, Biomeieux 96126) were used for incubation under anaerobic conditions.

Twenty-five colonies were picked randomly from plates of MRS (35°C), MRS (42°C), M17 (30°C), Rogosa (35°C). Isolates (100) were cultivated in MRS broth. Purity was checked by streaking on MRS agar. These pure isolates were cultivated in MRS broth at 30°C for 18 h. Cells were harvested by centrifugation at 3000 x g for 15 min and washed twice with a sterile 0.9% NaCl solution. The washed whole cells were lyophilized and kept in refrigerator until use.

Identification of the lactic acid bacteria to genus level: Gram-positive, catalase-negative, isolates from MRS agar, Rogosa agar, and M17 agar were assigned to a genus on basis of key characteristics and tests of table 1 (Harrigan and McCance, 1976; Garvie, 1984; Garvie, 1986; Hammes *et al.*, 1992; Holzapfel and Schillingner, 1992; Teuber *et al.*, 1992; Weiss, 1992; Axelsson, 1993; Dicks *et al.*, 1993). Morphological and arrangement of cells were examined according to the standard method. Growth at 10, 15 and 45°C in broth was determined by visual turbidity after 72 h incubation. Gas production from glucose was assessed in sugar basal medium (SBM) broth containing 2% (w/v) glucose dispensed in test tubes containing inverted Durham tubes. The inoculated tubes were examined for the production of gas after 3

days's incubation.

Indole production from tryptone was assessed in 10 ml medium containing per litre 10 g tryptone and 5 g NaCl. After inoculation and incubation for 3 days, the cultures were tested for the presence of indole by method 2 of Cowan (Cowan, 1974).

Arginine deamination was detected in SBM supplemented with 1% (w/v) arginine monochloride, 0.3% (w/v) Bacto-agar and 0.01% (w/v) phenol red, pH 7.2. After inoculation the medium was incubated in anaerobic jars for 3 days. Arginine hydrolysis was observed by the culture turning yellow.

The salt tolerance test was done using MRS broth, containing 6.5 (w/v) NaCl with incubation time of 4 days at 37°C.

Identification of the lactic acid bacteria to the species level: Twenty representative isolates of MRS (35°C, 42°C), M17 (30°C) and Rogosa (35°C) were selected for identification to species level using the API 50 CH galleries and API 50 CHL medium (bio Mérieux Sa).

Tests were performed according to the manufacturer's instructions. The APILAB PLUS database (bio Mérieux Sa) was used to interpret the result.

Results

pH of the samples: The pH of the 30 samples ranged from 4.00 to 5.86 with an average of 4.70.

Enumeration of microorganisms: The Table 2 summarizes the microbial counts obtained from traditional fermented milks from Northern of Burkina. The total microflora and specific group of organisms were enumerated by using eight (8) different culture media (Table 2).

Mean counts on MRS agar (35°C) and M17 agar were 7.80×10^7 and 7.75×10^7 cfu ml⁻¹ respectively, and were higher than the mean total plate count (6.71×10^7 cfu ml⁻¹), indicating the predominance of lactic acid bacteria. These mean counts also exceeded counts obtained on Rogosa agar (24.44×10^6 cfu ml⁻¹).

The mean count of thermophilic bacteria (42°C) on MRS agar 8.04×10^5 cfu ml⁻¹ was less than the mean mesophilic count (35°C) 7.80×10^7 cfu ml⁻¹.

The mean count of coliforms was 0.98×10^4 cfu ml⁻¹ for 25 samples.

The mean count on YGC agar were 2.6×10^4 cfu ml⁻¹ for 25 samples, this mean count is lower than the count on MRS (35 and 42°C), plate count agar, Rogosa agar, M17 agar and VRBGA agar.

Characteristics and Identification of lactic acid bacteria: The greatest part of the number of isolates from MRS (35 and 42°C), Rogosa, M17 was Gram-positive and catalase -negative. One hundred (100) isolates could be identified (according to the

Savadogo *et al.*: Microorganisms in Burkina Faso fermented milk

Table 1: Characteristics of lactic acid bacteria (Harrigan and McCance, 1976; Garvie, 1984; Garvie, 1986; Hammes *et al.*, 1992; Holzapfel and Schillinger, 1992; Teuber *et al.*, 1992; Weiss, 1992; Axelsson, 1993; Dicks *et al.*, 1993)

Characteristics	<i>Leuconostocs</i>	<i>Streptococci</i> <i>Pyogenes Viridans Lactic</i>			<i>Enterococci</i>	<i>Pediococci</i>	<i>Lactobacilli</i> <i>Strepto Thermo Beta</i>		
Cell form	Spherical but often lenticular	Spherical or ovoid			Spherical	Spherical	Rods/Cocobacilli		
Cellular arrangement	Pairs and chains	Chain and pairs			Mainly in pairs, short chains	Pairs,tetrads, clusters, single cells are rare, no chains	Chain formation common		
Growth									
At 10°C	+	-	-	+	+	±	ND	ND	ND
At 45°C	-	-	+	-	+	+	±	+	+
At 15°C	+						+		+
NH from arginine	-	+	-	±	+	+	-	+	-
Gas from glucose	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 6.5% NaC	±	-	-	-	+	±	±	±	±
Reaction in litmus milk	Comparatively inactive. Few strains capable of producing acid. Very few strains capable of clotting the milk. No strains giving reduction	No Reduction of litmus Before Clotting of milk	No Reduction of litmus Before Clotting of milk	ARC	Comparatively Inactive. Rarely Produce sufficient acid to cause clotting		Various reactions depending on the species		

+ = positive, - = negative, ± = response varies between species, ARC = acid reduction clot, ND = no data

Table 2: Microbiological profile of the traditional fermented milks from northern Burkina

Medium	Ranges of counts (CFU ml ⁻¹) for all samples	Mean Counts (CFU ml ⁻¹) For all samples
Total plate count agar (aerobic mesophilic bacteria)	8.12x10 ⁵ -3.6x10 ⁶	6.71x10 ⁷
MRS agar (42°C) (<i>Thermophilic Lactobacilli</i> and <i>Streptococci</i>)	2.4x10 ⁴ -5.3x10 ⁶	8.04x10 ⁵
MRS agar (35°C)(<i>Mesophilic Lactobacilli</i> and <i>Leuconostoc</i>)	4.23x10 ⁵ -3.9x10 ⁶	7.80x10 ⁶
Rogosa agar (<i>Lactobacilli</i>)	0.30x10 ⁶ -1x10 ⁸	24.44x10 ⁶
M17 (<i>Lactococci</i>)	3.72x10 ⁵ -2.51x10 ⁷	7.75x10 ⁷
VRBG (violet red bile agar) (<i>Enterobacteria</i>)	0.25x10 ² -3.5x10 ⁴ n=18	0.98x10 ⁴
YGC (<i>Yeast and moulds</i>)	1.83x10 ³ -3.7x10 ⁶ n=25	2.6x10 ⁴ n=25

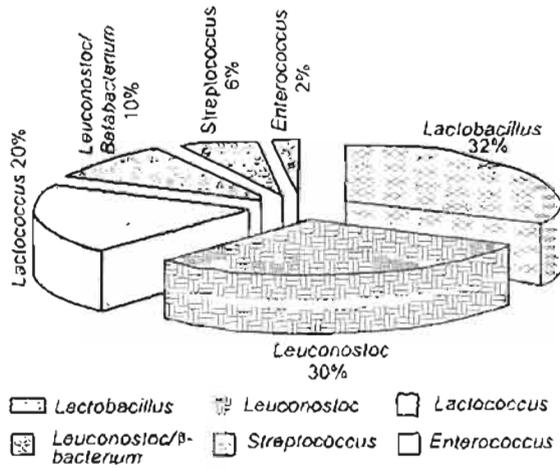


Fig. 1: Percentage distribution of the 100 isolates (MRS, Rogosa, M17) from traditional fermented milks of northern Burkina (Dori)

characteristics of Table 1) and were divided into six genera: *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc/β-betabacterium* and *Streptococcus* (Fig. 1).

Ten isolates were assigned to the *Leuconostoc/β-betabacterium* group, which could either belong to the genus *Leuconostoc* or *Lactobacillus*.

Thirty-two isolates were rod-shaped and could be identified as *Streptobacterium* (22 isolates) or *Betabacterium* (10 isolates) (Harrigan and McCance, 1976).

The ability to produce gas was an important characteristic for distinguishing the *Leuconostoc* (Garvie, 1984). Thirty isolates belonged to the genus *Leuconostoc*, twenty isolates to the genus *Lactococcus*, 6 isolates to *Streptococcus* and 2 isolates to *Enterococcus*.

Identification of lactic acid bacteria to species level: From the 20 isolates of lactic acid bacteria identified with API 50 CH identification system, six belonged to the species *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, four belonged to the species *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, two belonged to *Lactobacillus confusus*, three belonged to *Lactobacillus delbrueckii* subsp., two belonged to *Lactobacillus plantarum*, one belonged to *Leuconostoc citreum*, and two belonged to *Leuconostoc lactis*.

Pathogens detection: Little numbers of *Salmonella* and *Shigella* species were detected in two samples (5-20 cfu ml⁻¹).

Discussion

Lactic acid bacteria predominated the total microflora, their numbers between 2.4x10⁷ and 3.9x10⁶ cfu ml⁻¹ were

recorded with mean values on MRS (35°C), M17 and Rogosa agar. Similar results were reported in Tanzania (Isono et al., 1994), in Zimbabwe (Feresu and Muzondo, 1990), in South Africa (Beukes et al., 2001). Earliest investigation (3,8,13) has reported that traditional fermented milks in regions with a cold climate containing mesophilic bacteria such as *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. Whereas, in warm regions, thermophilic bacteria like *Lactobacillus* and *Streptococcus* prevailed. The dominance of mesophilic bacteria in our samples could be explained by the fact that our samples were collected in the cooler month in Burkina (December, January, February) and the ambient temperature at which the natural fermentation took place probably. This result supports the theory that traditionally fermented milks depend on the microorganisms found in a particular climatic region. The distribution of lactic acid bacteria depend of nature of fermented milk or fermented food.

The Enterobactera, yeasts and molds formed the minority groups, these population may not be essential microorganisms in Burkina fermented milk samples, and the level of sample's pH cannot favorise their growth. The presence of yeasts may be influenced by the age of our samples as well as the containers and processing methods used. Also several species of yeasts are used in kefir and koumiss, and contribute to the characteristic aromas and tastes.

The number of coliforms in some samples was high. Similar results have been reported with Moroccan traditional fermented dairy products like 'Lben' and 'Jben' which showed high number of indicator microorganisms (coliforms and Enterococci) and pathogens such as *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* (Hamama, 1992). All these results can be explained by the fact that the methods of production of the various traditional foods are usually primitive (Isono et al., 1994; Dirar, 1997) and the major risk enhancing factors are the use of contaminated raw materials, lack of pasteurization, use of poorly controlled natural fermentations and inadequate storage and maturation conditions (Noul, 1994).

The number of yeast (2.6 x 10⁴ cfu ml⁻¹) was lower than mean count for lactic acid bacteria. Other researchers investigating on fermented milk product reported highest number (1.1 x 10⁷ cfu ml⁻¹) (Hosono et al., 1989).

The fifteen (15) isolates from YGC, were identified as *Saccharomyces* spp. on a base of morphological and biochemical characteristics (multilateral budding, formed pseudohyphae and asci containing one to four globose ascospores, fermented glucose, galactose and maltose, did not assimilate lactose and nitrate; and their cells were globose to subglobose or ellipsoide to cylindrical).

Generally, the species identified in the present study, were in good agreement with other studies. *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* and *Leuconostoc citreum* were identified in South African traditional fermented milks (Beukes *et al.*, 2001). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* were identified in Zimbabwean fermented milk (Feresu and Muzondo, 1990). *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus confusus* were identified in Masai fermented milk in Northern Tanzania (Isono *et al.*, 1994). All these species cited were identified in Fulani fermented milk. This fact explain the diversity of lactic acid bacteria species in Fulani fermented milk.

It is known that aseptically drawn milk contains no Lactobacilli when it leaves the udder, but contamination with these organisms rapidly occurs from dairy utensils, dust and feedstuffs (Sharpe, 1981). Since unpasteurized milk was used for traditional fermentation in this study, it can be assumed that the isolates originated from such contamination.

All these species identified can contribute to the quality of Fulani traditional fermented milk by acid, flavour and aroma production.

Conclusion: One hundred strains of lactic acid bacteria were isolated from the following fermented milks. They were biochemically characterized and classified into six genera. The distribution of dominant lactic acid bacteria identified were investigated in the present study. These researches are all vital in the sense that functional properties in lactic acid bacteria improve preservative effect and add flavor and taste (Daly and Davis, 1998; Soomro *et al.*, 2002).

Lactic acid bacteria have an essential role in most food and beverage fermentation processes, one of the earliest known food preservation of fermented foods and beverage belong to the following genera: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium*. The main role of lactic acid bacteria in food manufacturing is to acidify raw materials by producing of lactic acid from energy sources (carbon hydrates).

This study on traditional fermented milk from northern Burkina (Dori) showed that lactic acid bacteria are the dominant microflora. The microbiological composition of lactic acid bacteria found in our samples coincided with that of commercial mesophilic starter cultures. Identifies species from Fulani fermented milk can be use as starters for our small scale dairy industries. The further studies will be focus the molecular characterization of bacteria species.

References

- Axellsson, L.T., 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., A. Von Wright (Eds.). Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, New York, p: 1-64.
- Beukes, E.M., B.H. Bester and J.F. Mostert, 2001. The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 63 : 189-197.
- Cowan, S.T., 1974. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed., Cambridge University press, Cambridge.
- Daly, C. and R. Davis, 1998. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agri. Food Sci. in Finland*, 7: 251-264.
- De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe, 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.
- Dicks, L.M.T., L. Fantuzzi, F.C. Gonzales, M. Du Toit and F. Dellaglio, 1993. *Leuconostoc argentinum* sp. nov isolated from argentine raw milk. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 347-351.
- Dirar, H.A., 1997. Introduction. In: Dirar H.A. (Ed.). Food processing technology for Africa. United Nations Industrial Development Organization, Vienna, p: 1-10.
- Ehrmann, M.A., P. Kurzak, J. Bauerr and R.F. Vogel, 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 966-975.
- Feresu, S.B. and M.I. Muzondo, 1990. Identification of some lactic acid bacteria from two Zimbabwean fermented milk products. *Word J. Microbiol. and Biotech.*, 6: 178-186.
- Garvie, E.I., 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. In: Bergan T. (Ed.). *Methods in microbiology*. Academic press, London, p: 147-178.
- Garvie, E.I., 1986. Genus *Leuconostoc*. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, p: 1071-1075.
- Hamama, A., 1992. Moroccan traditional fermented dairy products. In: Ruskin, F.R. (Ed.). *Applications of biotechnology to traditional fermented foods*. National Academy press, Washington DC, p: 75-79.
- Hammes, W.P., N. Weiss and W.H. Holzapfel, 1992. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Barlows A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Ed.). *The prokaryotes*. Springer, Berlin, p: 1534-1593.

Savadogo et al.: Microorganisms in Burkina Faso fermented milk

- Harrigan, W.F. and M.E. McCance, 1976. Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology, Academic press, London.
- Holzappel, W.H. and V. Schillinger, 1992. The genus *Leuconostoc*. In: Barlows A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (Eds.). The prokaryotes. Springer, Berlin, p: 1509-1534.
- Hosono, A., R. Wardoyo and H. Otani, 1989. Microbial flora in *Dadih*, a traditional fermented milk in Indonesia. *Lebensm Wiss Tec.*, 22: 20-24.
- Isono, Y., I. Shingu and S. Shimizu, 1994. Identification and Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Masai fermented milk in Northern Tanzania. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 660-664.
- Keller, J.J. and I. Jordan, 1990. Fermented milks for the South African market. *S. Afr. J. Dairy Sci.*, 22: 47-49.
- Kurmann, J.A., 1994. The production of fermented milk in the world: aspects of the production of fermented milks. *Int. Dairy Federation Bull.*, 179: 16-26.
- Mckay, L.L. and K.A. Baldwin, 1990. Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 3-14.
- Nout M.J.R., 1994. Fermented foods and food safety. *Food Res. Int.*, 27: 291-298.
- Réseau Documentaire d'Élevage au Burkina Faso, (Juillet, 1997-décembre, 1998). *Revue de presse sur l'élevage au Burkina Faso*, Syfia Bull. de presse, Paris.
- Rogosa, M., J.A. Mitchell and R.F. Wiseman, 1951. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.*, 62: 132-133.
- Savadogo, A., C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara and A.S. Traoré, 2001. Isolement et Caractérisation de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides à partir de laits du Burkina Faso. *Revue Sci. et Tech., Séries Sci. Nat. et Agro.*, 25: 75-85.
- Sharpe, M. E., 1981. The genus *Lactobacillus*. In: Starr M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel (Eds.). *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer, New York, p: 1653-1679.
- Soomro, A.H., T. Masud and K. Anwaar, 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and Human health. *Pak. J. Nutr.*, 1: 20-24.
- Tamine, A.Y. and R.K. Robinson, 1988. Fermented milks and their future trends: technological aspects. *J. Dairy Res.*, 55: 281-307.
- Teuber, N., A. Geis and H. Neve, 1992. The genus *Lactococcus*. In: Barlows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (Eds.). *The prokaryotes*. Springer, Berlin, p: 148-150.
- Therzaghi, B.E. and W.E. Sandine, 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29: 807-813.
- Thomas, T.D., 1985. Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better fermented animal products. *New Zealand J. Dairy Sci. Tec.*, 20: 1-10.
- Weiss, N., 1992. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: Barlows A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Eds.). *The prokaryotes*. Springer, Berlin, p: 1502-1507.
- Yodoamijoyo, R.M., Z. Tirza, S.R. Herastuti, A. Tomomatsu, A. Matsuyama and A. Hosono, 1983. Microbiological aspects of Dadih in Indonesia. *J. Dairy Food Sci.*, 32: 7-14.

Résumé Article 3

Huit souches de bactéries lactiques produisant des bactériocines ont été isolées dans les échantillons de lait fermentés du Nord Burkina. Ces souches ont été identifiées au niveau espèce : *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Lactococcus*.

Les bactériocines isolées ont donné des activités antibactériennes contre les pathogènes suivants : *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP

Les diamètres d'inhibition obtenus avec de la bactériocine sont compris entre 8 mm et 12 mm. Les bactéries pathogènes indicatrices Gram positives étaient les plus sensibles. Les activités des bactériocines ont été perdues après traitement avec toutes les enzymes protéolytiques (α -chymotrypsine, trypsine, pesine), tandis que le traitement avec de la lipase, catalase, α -amylase n'a pas affecté l'activité des bactériocine.

Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk

Aly Savadogo*, Cheik A.T. Ouattara, Imael. H.N. Bassole, Alfred S. Traore
Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie - Centre de Recherche en Sciences Biologiques,
Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN)-Département de Biochimie-Microbiologie (DBM)-Unité de
Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT),
Université de Ouagadougou, Burkina Faso
E-mail: aly.savadogo@univ-ouaga.bf

Abstract: Eight strains of lactic acid bacteria producing bacteriocin were isolated from Burkina Faso fermented milk samples. These strains were identified to species: *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Lactococcus*. Isolated bacteriocin exhibited antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP using the agar drop diffusion test. The inhibition diameters obtained with bacteriocin are between 8 mm and 12 mm. Gram-positive indicator bacteria were most inhibited. The activities of the bacteriocin were lost after treatment with all the proteolytic enzymes (\bullet - chymotrypsin, trypsin, pepsin), whereas treatment with lipase, catalase, \bullet -amylase did not affect the activity of the bacteriocin.

Key words: Bacteriocin, lactic acid bacteria, fermented milk

Introduction

Lactic acid bacteria produce various compounds such as organic acids, diacetyl, hydrogen peroxide, and bacteriocin or bactericidal proteins during lactic fermentations (Talarico and Dobrogosz, 1989; Lindgren and Dobrogosz, 1990; Piard and Desmazeaud, 1991; Anderssen *et al.*, 1998; Sholeva *et al.*, 1998; Ouwehand, 1998; Zhennai, 2000; Oyetayo *et al.*, 2003).

The bacteriocins from the generally recognized as safe (GRAS) lactic acid bacteria (LAB) have arisen a great deal of attention as a novel approach to control pathogens in food-stuffs.

Bacteriocins are antimicrobial proteinaceous compounds that are inhibitory towards sensitive strains and are produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Tagg *et al.*, 1976).

The antimicrobial effect of lactic acid bacteria has been appreciated by man for more than 10000 years and has enabled him to extend the shelf life of many foods through fermentation processes.

Innovative approaches have been tried as alternative to antibiotics in treating gastrointestinal diseases and these include using live biotherapeutic agent such as bacterial isolates (Daly and Davis, 1998; Soomro *et al.*, 2002; Oyetayo *et al.*, 2003)

Lactic acid bacteria exert strong antagonistic activity against many microorganisms, including food spoilage organisms and pathogens. In addition, some strains may contribute to the preservation of fermented foods by producing bacteriocins (Brink *et al.*, 1994).

Research on Bacteriocins from lactic acid bacteria has expanded during the last decades, to include the use of

bacteriocins or the producer organisms as natural food preservatives.

The lactic acid fermentation, which these bacteria perform has long been known and applied by the humans for making different food stuffs.

The rural people in Burkina Faso still produce unpasteurized fermented milk by traditional methods, since such milk products still enjoy loyal following in rural communities.

Fermented milk play important role in the diet of low income and the majority of people living in the rural areas of Burkina Faso; fermented milk still produced using primitive utensils.

To our knowledge information does not exist on the traditional fermentative micro flora producing antibacterial substances that Fulani tribe used to produce fermented milk in Burkina Faso.

The aim of this study was the screening of antimicrobial activities among lactic acid bacteria from fermented milk.

Materials and Methods

Bacteria strains and media: The eight strains of lactic acid bacteria were isolated from Burkina Faso fermented milk samples (Savadogo *et al.*, 2004a). Fermented milk samples from thirty cow's and goat's were collected from individual households of rural areas in northern Burkina from July 1999 to January 2000.

The strains were stored at - 80°C in MRS (De Man *et al.*, 1960) broth medium containing 250 ml glycerol / L.

Before experimental use the cultures were propagated twice in MRS at 37°C the transfer inoculum was 1% (v/v) of 16 h culture grown in fresh medium.

Savadogo *et al.*: Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains

Table 1: Inhibition of various indicator organisms by bacteriocin produced by our lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria strains	Indicator organisms Inhibited	Diameter of inhibition (mm)
S1	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	12
S2	<i>Bacillus cereus</i> 13569 LMG	10
S3	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	9
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	9
	<i>Escherichia coli</i> 105182 CIP	9
S4	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	10
S5	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	8
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25293	10
	<i>Escherichia coli</i> 105182 CIP	8
S6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	9
S7	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	9
S8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	10

Table 2: Morphological, cultural and physiological characteristics of isolated strains (Savadogo *et al.*, 2004a)

Strains	Cell form	Cellular arrangement	Growth in 6.5% NaCl	Gram	Catalase	Gas from glucose and sporulation
S1	Cocobacilli	single and chains	-	+	-	-
S2	Ovoid	single	-	+	-	-
S3	Cocobacilli	Single and chains	-	+	-	-
S4	Spherical	Pairs and tetrad	-	+	-	-
S5	Spherical	Pairs and chains	-	+	-	-
S6	Ovoid	Pairs and tetrad	-	+	-	-
S7	Spherical	single and chains	-	+	-	-
S8	Rods	single and chains	-	+	-	-

+ = positive, - = negative

Indicator bacteria strains: The microorganisms used were: *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP.

Extraction of bacteriocins: The lactic acid bacteria strains were propagated each in 1000 ml MRS broth (pH 7.0). For extraction of bacteriocin, a cell-free solution was obtained by centrifuging (10,000 rpm for 20 min, at 4°C) the culture and was adjusted to pH 7.0 by means of 1M NaOH to exclude antimicrobial effect of organic acid. The cell-free solution obtained was precipitated with ammonium sulphate (40% saturation). The mixture was stirred for 2 h at 4°C and later centrifuged at 20,000 rpm for 1 h for 4°C. The precipitates were resuspended in 25 ml of 0.05 M potassium phosphate buffer (pH7.0). The new precipitate were collected and used in a disk diffusion assay.

Determination of bacteriocin activity: A disk diffusion assay procedure was used (Tagg and McGiven, 1971). Aliquot of 50µl from each (extract) were placed on the disk. The plates were incubated overnight at 37°C (aerobically) for the indicators pathogens bacteria (Table 1).

All the tests were performed in Mueller-Hinton agar (Becton Dickinson, USA). Mueller-Hinton agar was inoculated (inundation method) with pathogen indicator

bacteria (5X10⁶ CFU/ml). Overnight cultures of each indicator strain were used. The agar inoculated was incubated aerobically at 30°C (Gram-negative) or 37°C (Gram-positive) for 24 h.

The diameters of the inhibition zone were measured (Rammelsberg and Radler, 1990).

Enzyme treatments: Bacteriocin was asked for its sensitivity to various enzymes.

Enzymes (all obtained from sigma) and their respective buffers were lipase (8.6 U/mg) in 0.05 Tris hydrochloride (pH 8.0) 0.01 M CaCl₂; • -chymotrypsin (47 U/mg) in 0.05 M tris hydrochloride (pH 8.0) 0.01M CaCl₂; trypsin (Type x, 15000 U/mg), in 0.05 M Tris Hydrochloride (pH 8.0); Pepsin (3.2 U/ml) in 0.2M citrate (pH 6.0); Catalase (2.0 U/mg) in 10 mM potassium phosphate (pH 7.0); • -amylase (1000 U/mg) in 1N NaOH (pH 6.5). Samples of bacteriocins (500 µl) were incubated with 500 µg of each enzymes per ml for 60 min at 37°C except for samples containing trypsin, • -chymotrypsin and catalase which were incubated at 25°C.

Results and Discussion

Isolated strains characteristics: The characteristics of all the strains are noted in Table 2 (Savadogo *et al.*, 2004a). These characteristics are common to lactic acid bacteria ones (Axellsson, 1993; Krieg, 1984 ; Roissart and Luquet, 1994).

Savadoغو *et al.*: Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains

Table 3 : Diamètres d'inhibition après hydrolyse enzymatic

LAB strains	Indicators strains	Trypsin	Chymotrypsin	Pepsin	Lipase	Amylase	Catalase
S1	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	0	0	0	12	11	11
S2	<i>Bacillus cereus</i> 13569 LMG	0	0	0	10	10	10
S3	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	0	0	0	9	9	9
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	0	0	0	9	9	9
	<i>Escherichia coli</i> 105182 CIP	0	0	0	8	9	8
S4	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	0	0	0	10	9	9
S5	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	0	0	0	8	7	8
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	0	0	0	9	9	9
	<i>Escherichia coli</i> 105182 CIP	0	0	0	8	8	7
S6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293		0	0	9	9	9
S7	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP		0	0	9	9	9
S8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293		0	0	10	9	10

LAB: Lactic Acid Bacteria

Strains S1 and S3 were identified as *Lactobacillus fermentum*, Strains S2, S4, S6 were identified as *Pediococcus spp.*, the strain S5 was identified as *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*. Strains S7, S8 were identified as *Lactococcus sp.* (Savadoغو *et al.*, 2004a).

These results show a certain heterogeneousness of fermented milk of Burkina. Savadoغو *et al.* (2004ab) showed that fermented milk of Burkina Faso were rich in various genus of EPS producing lactic bacteria among which we can quote *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

The heterogeneousness of the lactic bacteria in fermented milk was also observed by the other authors who one worked on fermented milk, notably Yodoamijoyo *et al.* (1983) in Idonesle, Hamama (1992) in Morocco, Isono and his co-workers (1994) in Tanzania, Beukes *et al.* (2001) in South Africa. In a general way the genus usually met in traditional fermented milk are *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*.

The heterogeneousness of the lactic bacteria observed would contribute to the hygienic quality and organoleptic of the milk fermented traditionally, that justifies the importance of his consumption .

Production of bacteriocin by isolated strains: The extracts of eight strains of lactic acid bacteria gave zones of inhibition onto the indicator pathogenic strains tested. The Table 1 gives the results of Inhibition (inhibition diameter), indicators strains inhibited are *Escherichia coli* 105182 CIP *Enterococcus faecalis* 103907CIP, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Bacillus cereus* 13569 LMG. The diameters of inhibition are included between 8 mm and 12 mm. The biggest diameter of 12 mm inhibition [photo 1] is obtained with the extract of strain S1 (*Lactobacillus fermentum*) on *Enterococcus faecalis*, as for the smallest diameter is obtained with the extract of strain S5 (*Leuconostoc mesenteroides*) on

the same indicator strain *Enterococcus faecalis*. The most inhibited indicators strains are the most part of gram positive bacteria (*Enterococcus faecalis* 103907CIP, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Bacillus cereus* 13569 LMG [photo 2]), a single gram negative indicator bacteria (*Escherichia coli* 105182 CIP) was inhibited by the extracts of bacteriocins. Gram positive indicator bacteria is much more sensitive to bacteriocin of our lactic acid bacteria strains than gram negatif indicator bacteria.

These results indicate us that some of our lactic acid bacteria strains are capable of synthesizing inhibitive substances of pathogenic bacteria, also these inhibitive substances produced by our lactic acid bacteria strains act differently on the pathogenic reference indicators trans. Inhibitive substances produced by the lactic acid bacteria can be generally protein (Klaenhammer, 1993; Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Vandenberg, 1993).

However the importance of the inhibition effect varies according to serotypes. The gram positive pathogenic bacteria are the most sensitive to the bacteriocin produced by the lactic acid bacteria. The resistance of gram negative bacteria is attributed to the particular nature of their cellular envelope, the mechanisms of action described for bacteriocin bringing in a phenomenon of adsorption. According to Bhunia *et al.* (1991) the pediocin (bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*) interacts with lipoteichoic acids absent in gram negative bacteria. These molecules would play the role of site of necessary not specific reception to produce the bactericidal effect. Earlier reports (Tagg *et al.*, 1976; Daeschel and Klaenhammer, 1985; Muriana and Klaenhammer, 1991; Sanni *et al.*, 1999) have shown that some bacteriocins produced by gram-positive bacteria have a broad spectrum of activity. These variations of sensibility are due to the characteristics of indicators strains (presence or absence of receiving sites or immunoprotein) and thus in level of hurts caused by the inhibitive factor.

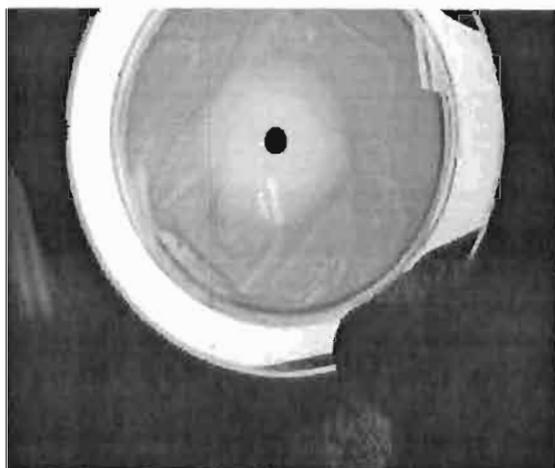


Photo 1: Inhibition of *Enterococcus faecalis* 103907 CIP by strain S1 bacteriocin



Photo 2: Inhibition of *Bacillus cereus* 13569 LMG by strain S2 bacteriocin

The known bacteriocin (nisin for example) does not still act on the sorts taxonomic close.

Nisin has an inhibitory effect against a wide variety of gram-positive food-borne pathogens and spoilage microorganisms (Rodriguez, 1996) and can also act on several gram-negative bacteria when the integrity of their outer membranes is disrupted (Kordel and Sahl, 1986; Stevens et al., 1991). The use of nisin as a food preservative dates back to 1956, when nisin was proposed to control growth and spore formation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* in cheese (Mallick and Hirsch, 1956). Nisin is the only bacteriocin that has been approved by the World Health Organization as a preservative in food (Vandenbergh, 1993), and Nisalpin, the commercial product containing 2.5% pure nisin A, is being legally used in more than 50 countries for specific food applications (Delves-Broughton and Fris, 1998). However, the loss of nisin activity from the commercial form has been reported for several food products during storage (Delves-Broughton, 1990). Moreover, the use of nisin in its free form in cheese can be expensive and results in inhibitory effects against the suitable acidifying or aroma-producing starter cultures, decreasing growth and acidification (Roberts, 1991). An alternative to the addition of free nisin to fermented food systems is the use of nisin-producing strains during fermentation processes (Maisner-Patin et al., 1992; Roberts et al., 1992). However, bacteriocin-producing organisms in cheese making can cause alterations in the cheese-making process, such as delayed acidification of the curd with a concomitant increase in residual lactose (Fox et al., 1996; Roberts, 1991).

Diameters of inhibition after enzymatic hydrolysis: The

results of the Table 3 show that antibacterial compounds produced are inactive by all the proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, chymotrypsin), indicating that the inhibitory compounds are proteinaceous nature, a general characteristic of bacteriocin. No zone of inhibition was discovered after stake in the presence of our extracts with these various enzymes, knowing that our initial extracts produced zones of inhibition on some tested pathogenic indicators strains.

Inhibitive substances of our lactic acid bacteria strains could be proteinaceous antibacterial compounds. So the haste in the sulfate of ammonium during the extraction was steered against protein substances, the enzymatic action comes to confirm so the specificity of the haste in the sulfate of ammonium.

On the other hand no inactivation is noticed in the presence of amylase, catalase and lipase. This report can explain by the fact that molecules responsible for the inhibition cannot glucidique or lipidique or still the inhibition results of peroxide of hydrogen. Our extracts (substances) are thus of protein nature, some molecules of sugars, or lipids could join to these proteins; whatever these molecules glucidiques and lipidiques are not indispensable for the inhibition.

Following the works on colicines (bacteriocin from Gram negative bacteria), Tagg et al. (1978) quote five required criteria so that a chemical substance is called bacteriocin: the presence of a biologically active part of protein nature, a spectrum of inhibitive activity narrow and centred on the homologues, a mode of bacteriocidal action, the adsorption to specific receptors and nature pro-morphic genetic determiners coding for the production of the bacteriocin and for the immunity in this one.

The studies realized by Klaenhammer (1993) on *Lb. brewis* DSM9296 on one hand looked 9 mm of

Savadogo et al.: Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains

diameter of inhibition with *E. faecalis*, 16 mm of diameter of inhibition with *Streptococcus xyloso*; on the other hand on *Lc. lactis* 99 looked 15 mm of diameter of inhibition with *Bacillus linens* SR3, 10 mm of diameter of inhibition with *Streptococcus xyloso*, 4 mm onto *Staphylococcus aureus*.

Jimenez-Diaz et al. (1993) showed that the activity antibacterial of the floating of *Lb. Plantarum* LP co10 was not only eliminated by the action of proteases but also by the action of enzymes glycolytic and lipolytic.

Conclusion: The cell-free supernatants from eight strains of lactic acid bacteria exhibited antimicrobial activity. The potential application of bacteriocins as consumer friendly biopreservatives either the form of protective cultures are as additives is significant besides being less potentially toxic or carcinogenic than current antimicrobial agents, lactic acid bacteria and their byproducts have been shown to be more effective and flexible in several applications. Many bacteriocins of LAB are safe and effective natural inhibitors of pathogenic and food spoilage bacteria in various foods. Antimicrobial compounds produced by LAB have provided these organisms with a competitive advantage over other microorganisms.

These researches are all vital in the sense that functional properties in lactic acid bacteria improve preservative effect and add flavor and taste.

Lactic acid bacteria have an essential role in most food and beverage fermentation processes, one of the earliest known food preservation of fermented foods and beverage.

These isolated strains can positively have impact on their use as starter cultures for traditional fermented foods, with a view to improving the hygiene and safety of fermented milk so produced.

The further studies will be focused on the characterization of amino acid and nucleotide sequences of these antibacterial compounds.

Acknowledgement

The author want to thank Moussa SANOGO and Aziz TRAORE, Ya Arifou Tidjani for their help during the experiments.

References

- Anderssen, E.L., D.B. Diep, I.F. Nes, V.G.H. Eijsink and J. Nissen-Meyer, 1998. Antagonistic of *Lactobacillus plantarum* C1: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 64: 2269-2272.
- Axelsson, L.T., 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., Von Wright A. (Ed.), *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, New York, 1-64.
- Beukes, E.M., B.H. Bester and J.F. Mostert, 2001. The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 63: 189-197.
- Bhunja, A.K., M.C. Johnson, B. Ray and N. Kalchayanand, 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 25-30.
- Brink ten, B., M. Minekns, J.M.B.M. Vander Vossen, R.J. Leer and J.H.J. Huis in't Veld, 1994. Anti microbial activity of *lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 140-148.
- Daeschel, M.A. and T.R. Klaenhamner, 1985. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin acidity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1538-1541.
- Daly, C. and R. Davis, 1998. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health, *Agri. and Food Sci., Finland*, 7: 251-264.
- De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe, 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.
- Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Tec.*, 43: 73-76.
- Delves-Broughton, J. and M. Friis, 1998. Nisin preparation-production, specification and assay procedure, in the use of nisin in cheese making, p. 18-19. International Dairy Federation document no. 329. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Fox, P.F., J.M. Wallace, S. Morgan, C.M. Lynch, E.J. Niland and J. Tobin, 1996. Acceleration of cheese ripening. *Antonie Leeuwenhoek*, 70: 271-297.
- Hamama, A., 1992. Moroccan traditional fermented dairy products. In: Ruskin, F.R. (Ed.), *Applications of biotechnology to traditional fermented foods*. National Academy press, Washington DC, 75-79.
- Isono, Y., I. Shingu and S. Shimizu, 1994. Identification and Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Masai fermented milk in Northern Tanzania, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 660-664.
- Jimenez-Diaz, R., R.M. Rios-Sanchez, M. Desmazeaud, J.L. Ruiz-Barba and J.C. Piard, 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1416-1424.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.
- Kordel, M. and H.G. Sahl, 1986. Susceptibility of bacterial eucaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34: 139-144.
- Krieg, N., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, 2. Williams and Wilkins: Baltimore.

Savadogo et al.: Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains

- Lindgren, S.W. and W.J. Dobrogosz, 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 149-164.
- Maisner-Patin, S., N. Deschamps, S.R. Tatini and J. Richard, 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with nisin-producing starter, *Lait*, 72: 249-263.
- Mattick, A.T. and A. Hirsch, 1956. Manufacture and preservation of cheese. U.S. patent, 2: 744-827.
- Muriana, P.M. and T.R. Klaenhamer, 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 114-121.
- Ouwehand, A.C., 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S. and Von Wright A. (Ed.), *lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, 2nd edition (edited by). Marcel Dekker Inc, New York. 139-159.
- Oyetayo, V.O., F.C. Adetuyi and F.A. Akinyosoye, 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*, *Afr. J. Biotech.* 2: 448-452.
- Piard, J.C. and M. Desmazeaud, 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism en-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Rammelsberg, M. and F. Radler, 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 177-184.
- Roberts, R.F., 1991. Development of a nisin-producing starter culture for use during Cheddar cheese manufacture to inhibit spoilage in high-moisture pasteurized process cheese spreads. Ph.D. thesis. University of Minnesota, Minneapolis.
- Roberts, R.F., E.A. Zottola and L.L. McKay, 1992. Use of nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.*, 75: 2353-2363.
- Rodriguez, J.M., 1996. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Sci. Tec.*, 2: 61-68.
- Roissart, H. and F.M. Luquet, 1994. *Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques (tome1)*. Paris, Loriga, 605.
- Sanni, A.I., A.A. Onilude, S.T. Ogunbanwo and S.I. Smith, 1999. Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from Ogi, an indigenous fermented food. *J. Basic Microbiol.*, 39: 189-195.
- Savadogo, A., A.T. Ouattara Cheik, W. Savadogo Paul, Baro Nicolas, Ouattara, S. Aboubacar and S. Traore Alfred, 2004a. Identification of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria strains from Burkina Faso fermented milk samples by specific primers, *Afr. J. Biotechnol.*, 3: 189-194.
- Savadogo, A., A.T. Ouattara Cheik, W. Savadogo Paul, Baro Nicolas, Ouattara, S. Aboubacar and S. Traore Alfred, 2004b. Microorganism involved in Fulani fermented milk in Burkina Faso, *Pak. J. Nutr.*, 3: 134-139.
- Sholeva, Z., S. Stefanova and V. Chipeva, 1998. Screening of antimicrobial activities among Bulgarian *lactobacilli* strains. *J. Culture Collections*, 2: 15-20.
- Soomro, A.H., T. Masud and K. Anwaar, 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and Human health. *Pak. J. Nutr.*, 1: 20-24.
- Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer, 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3613-3615.
- Tagg, J.R. and A.R. McGiven, 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, 21:943.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker, 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria, *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Talarico, T.L. and W.J. Dobrogosz, 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 33: 674-679.
- Vandenberg, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbio. Rev.*, 12: 221-238.
- Yodoamijoyo, R.M., Z. Tirza, S.R. Herastuti, A. Tomomatsu, A. Matsuyama and A. Hosono, 1983. Microbiological aspects of Dadih in Indonesia. *J. Dairy Food Sci.*, 32: 7-14.
- Zhennai, Y., 2000. Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology, University of Helsinki, 61.

Résumé Article 4

Treize souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides isolée des laits fermentés du Nord Burkina ont été identifiées par PCR en utilisant des primers spécifiques.

Les espèces identifiées étaient : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus spp.* *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*. Les *Lactobacillus* constituaient le groupe prédominant.

Les gènes responsables de la production d'exopolysaccharides ont été aussi amplifiés . Ils avaient un poids moléculaire compris entre 2000 Pb et 4000 Pb.

Le taux de production d'exopolysaccharide était compris entre 181mg/l et 814 mg/l.

L'analyse des exopolysaccharides a montré que le glucose et le galactose étaient les sucres dominants.

Full Length Research paper

Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples

Aly Savadogo^{1*}, Cheik A. T. Ouattara¹, Paul W. Savadogo², Nicolas Barro¹, Aboubacar S. Ouattara¹, Alfred S. Traoré¹

Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie, Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) UFR/SVT Université de Ouagadougou Burkina Faso 03 BP 7131.

²Institut de l'Environnement et de la Recherche Agricole (INERA) 01BP476 Ouagadougou, Burkina Faso.

Accepted 31 December 2003

Spacer region between 16S and 23 S rRNA genes of thirteen lactic acid bacteria strains from Burkina Faso fermented milk samples were amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* were identified. The *Lactobacillus* group was the predominant bacteria. Plasmids identified ranged between 2000 and 4000 bp. Exopolysaccharides (EPS) production varied from 181 mg/l and 814 mg/l, monomer analysis showed that glucose and galactose were predominant.

Key words: Lactic acid bacteria, fermented milk, PCR, exopolysaccharides.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) are widely employed in traditional fermented milk, in industrial fermentation processes and as starter cultures in the dairy industry. Some strains of lactic acid bacteria have importance in general health, providing a beneficial microflora in the intestinal tract (Salminen et al., 1993) and are able to synthesize exopolysaccharides (EPS) (Ceming, 1990; Sikkema, Oba, 1998; Ceming, Marshall, 1999; De Vuyst, Degeest, 1999; Ricciardi, Clementi, 2000).

Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria have gained increasing attention over the last few years because of their contribution to the rheology and texture of food products (Ceming and Marshall, 1999).

Lactic acid bacteria play an important role in food fermentation, as the products obtained with their aid are characterized by hygienic safety, storage stability and attractive sensory properties.

Detecting and identifying various species of LAB with molecular methods are powerful alternatives to the

traditional differentiation of bacteria. It is also important for quality control of dairy products. Previously, there have been several reports on species-specific probes for different LAB derived from ribosomal RNA (rRNA), especially 16S and 23S rRNA sequences (Hensiek et al., 1992; Hertel et al., 1993; Ehrmann et al., 1994). Barry et al., 1991 have shown that the ribosomal intergenic regions are more variable between bacteria species compared to 16S and 23 S rRNA genes.

The nature of fermented products is different from one region to another. This depends on the local indigenous microflora, which in turn reflected the climatic conditions of the area. Thus traditional fermented milk in region with a cold temperature climate contained mesophilic bacteria such as *Lactococcus* and *Leuconostoc spp.*, whilst thermophilic bacteria, which include mostly *Lactobacillus* and *Streptococcus*, prevailed in regions with a hot, subtropical or tropical climate (Thomas, 1985; Tamine and Robinson, 1988; Kurmann, 1994).

Burkina Faso milk production was estimated at 37392 tons of commercialised milk in 1998 (Réseau Documentaire d'Élevage, 1998). The Fulani of Burkina Faso, ferment their milk in calabashes, gourds, and clay pots. Burkina Faso population still produce unpasteurized

*Corresponding author. E-mail: aly.savadogo@univ-ouaga.bf.
Tel/Fax: (226) 33 73 73.

fermented milk by traditional methods, since such milk product still enjoy loyal following in the communities.

To our knowledge, information does not exist on the Burkina traditional fermentative microflora. Thus we focus our study on the isolation and identification of exopolysaccharides producing LAB using DNA-based specific detection system by PCR and EPS analysis by HPLC.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Thirty samples of fermented milk were obtained from individual households in rural areas in northern Burkina. Samples were collected in sterile small bottles and stored in laboratory under refrigeration at 4°C until they were used in experiments.

Isolation of lactic acid bacteria

Serial dilutions of homogenized fermented milk samples in 0.1% peptone saline were used for microbial isolation with the following media: (a) MRS agar (De Man et al. 1960) (Fluka Biochemika 69966) incubated anaerobically for 48 h at 42°C for isolation of thermophilic *Lactobacilli* and *Streptococci*, (b) MRS agar incubated anaerobically for 48 h at 35°C for isolation of mesophilic *Lactobacilli* and *Leuconostoc*, (c) M17 agar (Terzaghi and Sandine, 1975) (Difco) incubated aerobically for 48 h at 30°C for isolation of *Lactococci*, (d) Rogosa agar (Rogosa et al., 1951) (Difco) incubated anaerobically for 48 h at 35°C for isolation of *Lactobacilli*.

Fifty isolates were obtained by random selection of slimy (exopolysaccharides producer) colonies (Smitinont et al., 1999) from all media used. These isolates were tested for exopolysaccharides production in modified MRS broth.

Phenotypic and biochemical characterization of selected isolates

Gram staining, catalase activity, gas production from glucose, growth in NaCl 6.5% was determined according to methods for lactic acid bacteria (Roissart Luquet, 1994). Cells morphology was determined with cells grown in MRS broth for 35°C at 20 h by using phase-contrast microscopy.

Isolation, purification, and quantification of EPS

Selected isolates were grown in modified MRS broth (glucose 20 g/l was replaced by lactose 75 g/l), cells were harvested by centrifugation for 10 min at 11 000 x g. Two volumes of cold ethanol were added to culture supernatants and stored overnight at 4°C. Precipitated material was collected by centrifugation (20 min at 2 500 x g) resuspended in demineralised water, and mixed with 2 volumes of cold ethanol. Samples were centrifuged 2500 x g and the pellets were dried at 100°C. The total carbohydrate content of the EPS was determined using the phenol-sulfuric acid procedure of Dubois et al. (1956).

Monosaccharides analysis

After complete hydrolysis of EPS (2 h in 1 M H₂SO₄ at 100°C in a sealed recipient) monosaccharide composition of the hydrolysate

was determined by HPLC (using corogel 87C column, and RI detector) with flow rate 0.6 ml/min (using Jasco pump PU-980) and the relative proportion of the peak (using Integrator SP4290) areas calculated to estimate the monomer composition.

Extraction of bacterial total DNA

Total DNA was extracted from 10 ml of harvested cultures in the mid-log phase (OD₆₀₀ of 0.5 -1). Cells were collected by centrifugation (3000 x g, 10 min, 4°C) and frozen for at least 1 h at -20°C. The thawed pellet was washed in 1 ml TES buffer (6.7% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) and resuspended in 300 µl STET buffer (8% sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA). Seventy-five microliters of lysis buffer (TES containing 1330 U ml⁻¹ mutanolysine and 40 mg ml⁻¹ lysosyme) was added and the suspension incubated at 37°C for 1 h. After addition of 40 µl preheated (37°C) 20% SDS in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) and glass beads, cells were vortexed for 60 s and incubated at 37°C for 10 min, followed by 10 min incubation at 65°C. One hundred microliters of TE buffer was added and the lysate was extracted with 1 volume phenol/chloroform/isoamyl alcohol (49:49:1). Phase was separated by centrifugation (18000 x g, 5 min) using phase lock gel tubes (Eppendorf). The aqueous phase was carefully mixed with 70 µl 5M NaCl, 1 ml isopropanol, and DNA precipitated on ice for least 15 min. DNA was collected by centrifugation (20000 x g, 30 min, 4°C) and the pellet washed in ice-cold 70% ethanol. DNA was dried with DNA speed vac and resuspended in 100 µl TE. This DNA solution obtained was stored at 4°C.

PCR amplifications

PCR was performed in a DNA thermal cycler (Perkin Elmer cetus) with Sigma polymerase kit. A typical reaction mixture (50 µl) for PCR of the 16S-23S rRNA gene spacer region consisted of reaction buffer (end concentration 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton), 200 µM each dNTP, 1 µM of each specific primer pair (Table1), 50 ng of bacterial DNA and 0.6 U of sigma DNA polymerase. The reaction tubes were overlaid with drops of mineral oil (Sigma). The amplification profile was 95°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s. This was repeated for 35 cycles. The program also included a preincubation at 92°C for 2 min before the first cycle and incubation at 72°C followed by a cooling step down to 4°C after the last cycle.

The presence of specific PCR products was determined by gel electrophoresis in 0.7% agarose gel containing ethidium bromide. Electrophoresis in Tris-borate-EDTA was performed at 100 volts for 30 min, and photographed under ultraviolet light illumination. DNA of references strains was included.

RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical and morphological characteristics of LAB strains

Thirteen strains were selected and identified as exopolysaccharides producers. All the strains were Gram-positive, catalase negative. One strain produced gas from glucose, nine strains did not grow in 6.5% NaCl. Three strains were rods, five were coccobacilli, four were spherical and one was ovoid (Table 2).

Table 1. Specific primer used in this study.

Primer	Species	Sequence 5'-3'	References
1	All <i>Lactobacillus</i> spp.	GTAAGG TGGCGATGTGTACCTCAAG	Heilig et al., 2002
2		CACCGCTACACATGGAG	
Lpr FermII	<i>Lb. fermentum</i>	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT TTACCTAACGGTAAATGCGA	Walter et al., 2000
Aci I	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	TCTAAGGAAGCGAAGGAT	(Tilsala-Timisjarvi,
Aci II		CTTTCTCGGTCGCTCTA	Alatossava, 1997)
Del I	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	ACGGATGGATGGAGAGCAG	(Tilsala-Timisjarvi,
Del II		GCAAGTTTGTCTTTCGAACTC	Alatossava, 1997)
	<i>Pediococcus</i> spp	GTAAGTGGCGTGT GTACCTCAAG CACCGCTACACATGGAG	(Heilig et al., 2002)
	<i>Lactococcus</i>	CTTTGAGTGATGCAATTGCATC CACCGCTACACATGGAG	Ampe et al., 1999
Thr I	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ACGGAATGTACTTGAGTTTC	(Tilsala-timisjarvi,
ThrII		TTTGGCCTTTCGACCTAAC	Alatossava, 1997)
	<i>Leuconostoc</i>	GATCCATCTCTAGGTGACGCCG CACCGCTACACATGGAG	Ampe et al., 1999
LMMf	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CCGTTACCCCTAAACCCCGAC	Moschetti et al., 2000
LMMr	subsp. <i>mesenteroides</i>	GACCAAATACAATAGGTTGCG	
	EPS plasmid	TTGTTCTCGAGATGGATATGGGATATAGC TATTCCCCTTTATTAATCTGATATGCCAAGG	Lamothe, 2000

Table 2. Biochemical and morphological characteristics of lactic acid bacteria strains from Burkina Faso fermented milk samples.

Strains	Cell form	Cellular arrangement	Growth in 6.5% NaCl	Gram	Catalase	Gas from glucose
1 MR1	Rods	Chains and pairs	-	+	-	-
2 MR2	Cocobacilli	Pairs and chains	-	+	-	-
3 MR3	Cocobacilli	Chains	-	+	-	-
4 MR5	Cocobacilli	Chains	-	+	-	-
5 MR6	Cocobacilli	pairs	-	+	-	-
6 MR9	Rods	Chains and pairs	-	+	-	-
7 MR10	Ovoid	Chain and pairs	-	+	-	-
8 MR11	Rods	Chains and pairs	-	+	-	-
9 MR12	Cocobacilli	Chains and pair	-	+	-	-
10 MR14	Spherical	pairs	±	+	-	-
11 MR15	Spherical	chains	±	+	-	+
12 MR16	Spherical	pairs	±	+	-	-
13 MR17	Spherical	pairs	±	+	-	-

+ = positive, - = negative, ± = little response.

With PCR reaction, the lactic acid bacteria (Figure 1) can be identified. Using the specific primers in Table 1, strains MR1, MR9, MR12 were identified as *Lactobacillus acidophilus*, while strains MR6, MR3, MR11 were identified as *Lactobacillus fermentum* (Figures not

shown). The strain MR10 was identified as *Streptococcus thermophilus*, and strains MR14, MR16, MR17 were identified as *Pediococcus* spp. The strain MR15 was identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Figures not shown).

Table 3. Carbohydrates concentration, monomer composition of exopolysaccharides.

Exopolysaccharides producing strains	Carbohydrates (mg/l)	Monomer composition
1 MR1	219	100 % glucose
2 MR2	506	nd
3 MR3	322	99.18% galactose, 0.80% glucose
4 MR5	474	nd
5 MR6	713	2.95% glucose, 97.04% pentose
6 MR9	512	99.97% galactose, 0.03% pentose
7 MR10	814	nd
8 MR11	549	47.41% glucose, 52.57% rhamnose
9 MR12	181	81.95% glucose, 18.01% pentose
10 MR14	288	100%glucose
11 MR15	615	nd
12 MR16	559	93.92% glucose, 1.35% fructose, 5.27% pentose
13 MR17	357	32.58% mannose, 36.42% rhamnose, 30.41%fructose

nd: not determined.

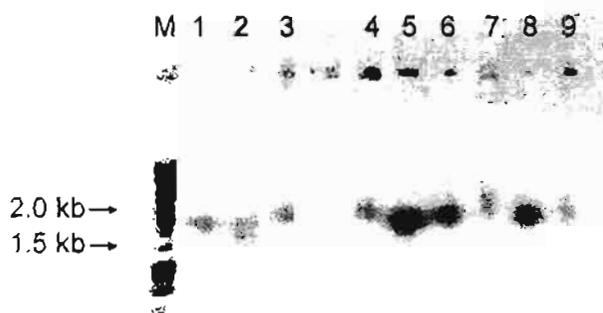


Figure 1. PCR products of amplified 16S-23S RNA gene spacer regions different LAB using primers for *Lactobacillus* group. Lanes: M. molecular weight marker, 1. MR1; 2. MR2; 3. MR3; 4. MR5, 5. MR6; 6. MR9; 7. MR11; 8. MR12)

Among the 13 isolates, 11 had EPS plasmids using the EPS-specific primers in PCR reaction. The carbohydrates concentrations of EPS (Table 3) were between 814 mg/l for strain MR10 and 181 mg/l for strain MR12.

The major monosaccharide (carbohydrate) resulting from acid hydrolysis of the strains EPS was glucose. Other peaks of galactose, rhamnose on the HPLC chromatogram were obtained (Table 3)

The strains isolation and identification showed diversity of lactic acid bacteria group in Burkina fermented milk. *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* were isolated from the fermented milk. Among the strains characterized, *Lactobacillus* genus was the dominant, consisting of *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. delrueckii*. These bacteria have been previously been isolated from fermented food (Hammes and Vogel, 1995) *L. fermentum* produces both

isomers of lactic acid (Kandler and Weiss, 1986) *Lactobacillus plantarum* was isolated in Zimbabwe fermented milk (Mutukumira, 1996), in Tanzania fermented milk (Isono et al., 1994) in Cameroon fermented milk (Jiwoua and Millière, 1990)

Generally the EPS genes are encoded on large plasmids (>20 kb) that can be transferred from one strain to another one. (Van Kranenburg et al., 1997, 1998, 2000). *Lactococcus lactis* NIZO B40 strain produces a phosphopolysaccharide, 12 kb gene cluster contains 14 coordinately expressed genes, RXABCDEFGHIJKL, localised on a 40 kb plasmid is specific for EPS production (Van Kranenburg et al., 1997).

Carbohydrates concentration are high compare with results obtained by Cerning et al., 1988; Cerning, 1990 of EPS with *L. lactis* subsp. *lactis* (100-600 mg/l). Other authors obtained higher concentrations of EPS high than those obtained in this study (Van de Berg et al., 1995; De Vuyst and Degeest, 1999).

After hydrolysis HPLC analysis showed that dominant neutral sugars were galactose and glucose (Table 3). Our results were similar to those of several authors who demonstrated that galactose and glucose were the neutral sugars occurring frequently in bacteria exopolysaccharides (De Vuyst et al., 1998; Cerning, 1990, 1995, Nakajima et al., 1990; Grobber et al., 1995; Gruter et al., 1993).

The monosaccharides occurring most frequently in the various exopolysaccharides from lactic acid bacteria are glucose and galactose (Cerning, 1990, 1995), but rhamnose (Cerning et al., 1986, 1988; Nakajima et al., 1990, 1992; Gruter et al., 1993; Grobber et al., 1995), mannose (Petit et al., 1991) fructose (Manca de Nadra et al., 1985) arabinose and xylose (Cerning et al., 1988, 1992) or sugar derivatives such as N-acetylgalactosamine (Doco et al., 1990; Petit et al., 1991)

and N-acetylglucosamine (Cerning et al., 1994) are also found.

Lactic acid bacteria play an important role in food fermentation, as the products obtained with their aid are characterized by hygienic safety, storage stability and attractive sensory properties. Since starter cultures are blended empirically for the desired characteristics of the final product, maintenance of the optimal strain balance throughout the fermentation process is important.

–EPS in their natural environment are thought to play a role in the protection of the microbial cell against desiccation, phagocytosis, phage attack, antibiotics or toxic compounds, predation by protozoans, osmotic stress, adhesion to solid surfaces, and in cellular recognition. In food industry, microbial exopolysaccharides are used as thickeners or viscosifiers, stabilizing or emulsifying agents, and as gelling and water-binding agents or texturizers (Sutherland, 1994). The functional properties of exopolysaccharides are influenced by their primary structure (Sutherland, 1994).

Our results demonstrate the diversity of lactic acid bacteria in traditional fermented milk in Burkina Faso. The milk samples contained several species lactic acid bacteria and PCR specific primers were able to identify them. These strains can be use as starter culture with predictable characteristics and contribute to the development of small-scale and commercial production of fermented milk with stable, consistent quality.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Moussa Sanogo and Dr Ismael H N Bassolé for help in DNA extraction, PCR, and electrophoresis.

REFERENCES

- Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 65: 5464-73.
- Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican IK, Gannon F (1991) The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1: 51-58.
- Cerning J, Bouillanne C, Desmazeaud M, Landon M (1986). Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.* 8: 625-628.
- Cerning J, Bouillanne C, Desmazeaud MJ, Landon M, (1988). Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus* *Biotechnol. Lett.* 10: 255-260.
- Cerning J (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 113-130.
- Cerning J (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* 75: 463-472.
- Cerning J, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M (1992) Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 75: 692-699.
- Cerning J, Marshall VME (1999). Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Results and Developments in Microbiol.* 3: 195-209.
- Cerning J, Renard CMGC, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M, Topisirovic L (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 3914-3919.
- De Man JC, Rogosa M, Scharpe ME (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- 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. *J. of Appl. Micobiol.* 84: 1059-1068.
- De Vuyst L, Degeest B (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- Doco T, Wieruszewski JM, Fournet B (1990). Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.* 198: 313-321.
- Dubois MA, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-358.
- Ehrmann M, Ludwig W, Schleifer KH (1994). Reverse dot blot: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol. Lett.* 117: 143-150.
- Grobben GJ, Sikkema J, Smith MR, De Bont JAM (1995). Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *J. Appl. Bacteriol* 79: 103-107.
- Grueter M, Leeflang BR, Kuiper J, Kamerling JP, Vliegenthart JFG. (1993). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* rr grown in skimmed milk. *Carbohydr. Res.* 239: 209-226.
- Hammes WP, and Vogel RF (1995). The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB and Holzappel WH (eds) *The genera of Lactic Acid Bacteria*. Chapman and Hall, London, UK, pp 19-54.
- Heilig Hans GHJ, Zoetendal Erwin G, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, De Vos Willen M (2002). Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 114-123.
- Hensiek R, Krupp G, Stackebrandt E (1992). Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *Systm. Appl. Microbiol* 15: 123-128.
- Hertel C, Ludwig W, Pot B, Kersters K, Schleifer KH (1993). Differentiation of *Lactobacilli* occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles System. *Appl. Microbiol* 16: 463-467.
- Isono Y, Shingu I, Shimizu S (1994). Identification and Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Masai fermented milk in Northern Tanzania. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 660-664.
- Jiwoua C, Millière JB (1990). Lactic flora and enterococcus in cultured milk (Pindiam) manufacture in Adamoua, Cameroon. *Lait* 70: 475-486.
- Kandler O, Weiss N (1986). Regular, non-sporing Gram-positive rods. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp1209-1234.
- Kurmann JA (1994). The production of fermented milk in the world: aspects of the production of fermented milks. *Int. Dairy Federation Bull.* 179: 16-26.
- Lamonthe GT (2000). Molecular characterisation of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de L'Université de Lausanne, Suisse. p.163.
- Manca De Nadra MC, Strasser De Saad AM, Pesce de Ruiz Holgado AA and Olivier G (1985). Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft* 40: 409-411
- Moschetti G, Blaiotta G, Villani F, Coppola S (2000). Specific Detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* with DNA Primers Identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 422-424.
- Mulukumira AN (1996). Investigation of some prospects for the development of starter culture for industrial production of traditional fermented milk in Zimbabwe. Doctor Scientiarum Thesis, Department

- of food Science, Agricultural University of Norway.
- Nakajima H, Hirota T, Toba T, Itoh T, Adachi S (1992). Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Res.* 224: 245-253.
- Nakajima H, Toyoda S, Toba T, Itoh T, Mukai T, Kitazawa H, Adachi S (1990). A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495. *J Dairy Sci.* 73: 1472-1477.
- Petit C, Grill JP, Maazouzi N, Marczak R (1991). Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fedbatch cultures. *Appl. Microbiol Biotechnol* 36: 216-221.
- Réseau Documentaire d'Élevage au Burkina Faso (Juillet 1997 - décembre 1998). Revue de presse sur l'élevage au Burkina Faso. *Syfia Bull. de presse.*
- Ricciardi A, Clementi F (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian J food Sci.* 1. 23-45.
- Rogosa M, Mitchell JA and Wiseman, R F (1951). A selective medium for the isolation of oral and fecal *Lactobacilli*. *J. Bacteriol.* 62: 132-133.
- Roissart H, Luquet FM. (1994). Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Urlage, Lorica*, p. 605.
- Sikkema J, Oba T (1998) Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow Brand R&D Reports* 107: 1-31.
- Smitnont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Navarin L, Bosco M, Cescutti P (1999) Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharides characterization. *Inter.J. Microbiol.* 51: 105-111.
- Sutherland IW (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 12: 393-448
- Tamine AY and Robinson RK (1988). Fermented milks and their future trends: technological aspects. *J. Dairy Res.* 55: 281-307.
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975). Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 29: 807-813.
- Thomas TD (1985). Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better-fermented animal products. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 20: 1-10.
- Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 35: 49-56.
- Van den Berg DJC, Robijn GW, Janssen AC, Giuseppin MLF, Vreeker R, Kamerling JP, Vliegthart JFG, Ledebroer AM, Verrips CT (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2840-2844.
- Van Kranenburg R, Marugg JD, Van Swan II, Willem NJ, De Vos WM (1997). Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 24: 387-397.
- Van Kranenburg R, Van Swan II, Kleerebezem M, De Vos WM (1998). Expression, disruption, and complementation of eps genes essential for exopolysaccharide biosynthesis in *L. lactis*. *ASM Conference on Streptococcal Genetics*, Vichy, France, pp 45-46.
- Van Kranenburg R, Kleerebezem M, de Vos WM (2000). Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000. *Plasmid* 43: 130-136.
- Waller J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava T (2000). Detection and identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and species-specific PCR Primers. *Appl Environ. Microbiol.* 66: 297-303.

Etude de la fermentation de différents sucres par deux souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait du Burkina Faso.

(Article soumis dans African Journal Food and Nutritional Sciences)

Aly SAVADOGO¹, Cheik A T OUATTARA¹, Nicolas BARRO¹, Aboubacar S OUATTARA¹ et Alfred S TRAORE¹

¹Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie - Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN)-Département de Biochimie-Microbiologie (DBM)-Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT)- Université de Ouagadougou – 03BP 7131 BURKINA FASO

Abstract

Two strains (table 1) of producing exopolysaccharide lactic acid bacteria isolate by the standard methods from milk samples taking from Dori in Séno province, give good fermentation kinetic of different carbohydrates. Good acid rate (figure 1, 2) was observed for the two strains (4,86 % for BLL strain with glucose, and 1,95 % for BLLc strain with lactose). Strain BLL were isolated on M17 medium and strain BLLc on LEU medium.

Species generally used in the preparation of fermented food belong to the following genera: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* and sometimes *Carnobacterium*, *Enterococcus* and *Bifidobacterium*.

Glucose fermentation ending pH with strain BLL is 4,71 (figure 4) and lactose fermentation ending pH with strain BLLc is 5,53 (Figure 14). The main role of lactic acid bacteria in food manufacturing is to acidify raw materials by producing large of lactic acid or acetic acid from carbohydrates.

At the end of the growth protein analysis through that acid production depend of bacteria growth. These two strains with very good acidification of different carbohydrates; can be use in special yogourt, fermented milk production, with knowing acid quantity and bacteria. It will contribute to improve people health. Several potential health and nutritional benefits are possible through some lactic bacteria species, including: improved nutritional value for food, control of intestinal infections, improved lactose digestion, control of some types of cancer and control of mineralization and serum cholesterol levels.

Keywords : Milk ; lactic acid bacteria ; lactic acid ; fermentation ; carbohydrates

Résumé

Deux souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides ayant de bonnes cinétiques de fermentation de différents sucres ont été isolées par les techniques

standards d'échantillons de lait provenant de Dori, une ville moyenne du Burkina. Une production importante d'acide lactique a été observée avec ces deux souches (4,86 % pour la souche BLL avec le glucose ; 1,95 % pour la souche BLLc avec le lactose). En présence du glucose les pH finaux sont de 4,71 et 5,04 respectivement pour BLL et BLLc. Les pH finaux en présence de lactose sont de 5,04 et 5,53 respectivement pour BLL et BLLc.

La production d'acide et la croissance des souches BLL et BLLc évoluent dans le même sens ; ceci est montré par le dosage des protéines et de l'acide lactique à la fin de la croissance.

On note une bonne cinétique d'acidification, et une bonne capacité de production d'acide avec les souches BLL et BLLc pour tous les sucres testés ; les souches BLL et BLLc pourraient être utilisées pour la production de yaourts, de laits fermentés spéciaux avec des quantités d'acide et de bactéries bien adaptées. Toute chose qui peut contribuer à l'amélioration de la santé des consommateurs.

Mots clés : Lait ; bactéries lactiques ; acide lactique ; fermentation ; carbohydrates.

Introduction

Le Burkina Faso est un pays d'élevage, son potentiel animal en 1998 était estimé à 4 611 900 bovins et 14 544 000 petits ruminants. Dans cette même année la production de lait commerciale était estimée à 37 392 tonnes selon le Réseau Documentaire d'élevage au Burkina de 1998 [1]. Ce lait est consommé sous forme de lait cru, de lait caillé, de yaourt, de fromage et de beurre. Les populations burkinabé utilisent des procédés traditionnels pour le traitement du lait et ses dérivés. Il se pose alors un problème d'assurance qualité.

Dans la majorité des dérivés du lait les bactéries lactiques assurent la transformation nécessaire et la qualité. Les bactéries lactiques sont utilisées partout dans le monde en particulier dans les laitages fermentés comme le yaourt, le fromage, le beurre, le kéfir, le koumiss. Elles appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques et produisent de l'acide lactique comme principal produit final du processus de fermentation. La fermentation des aliments par les bactéries lactiques assure non seulement à ces aliments des caractéristiques bien particulières d'arômes et de texture mais aussi une sécurité du point de vue hygiénique grâce aux acides organiques qui y sont produits [2-4]. C'est principalement l'acide lactique qui donne aux laitages fermentés cette saveur légèrement aigrelette caractéristique [2]. Au cours de ces dernières années le concept d'amélioration des bilans nutritionnel et sanitaire a

fait l'objet de recherches approfondies. Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme. Notamment à travers l'amélioration des valeurs nutritionnelles et sanitaires des produits fermentés en général, le contrôle des infections intestinales et l'augmentation de la digestion du lactose diminuant ainsi l'intolérance au lactose) [3-8]. A notre connaissance aucune étude sur l'isolement de souches bactériennes locales utilisables pour l'amélioration des procédés traditionnels de fermentation lactique n'a été réalisée.

Ce présent travail rapporte les résultats d'isolement de souches de bactéries lactiques ayant un bon pouvoir acidifiant à partir d'échantillons de lait du Burkina Faso ; ces souches pourront être utilisées en alimentation et contribuer à l'amélioration de la qualité des sous produits du lait consommés au Burkina Faso.

Matériels et méthodes

Echantillons de lait et Isolement des souches

Des échantillons de lait fermenté ont été collectés dans des flacons stériles de 100 ml dans la région de Dori (province du Séno). Dix millilitres de lait sont prélevés stérilement et introduits dans 90 ml d'eau physiologique (NaCl 0,9%) et le mélange est homogénéisé. Des séries de dilutions sont réalisées (10^{-1} à 10^{-9}) et 1 ml de la dilution appropriée est directementensemencé en triplet sur les milieux de culture.

Les souches (BLL = *Lactococcus* et BLLc = *Leuconostoc*) ont été isolées en micro anaérobiose sur deux milieux de culture : le milieu M17[9] incubé à 30°C pendant 48 heures pour les Lactocoques et le milieu LEU [10] incubé à 35°C pendant 48 heures pour les *Leuconostoc*).

Des jarres anaérobies contenant des kits générateurs de CO₂ ont été utilisées pour l'incubation.

Après croissance sur les milieux spécifiques, des colonies bien individualisées et visqueuses (productrices d'exopolysaccharides) [11] ont été sélectionnées. Après avoir testé ces colonies dans du bouillon MRS selon leur capacité à produire l'acide lactique et des exopolysaccharides, nous avons retenu parmi une vingtaine de colonies deux souches performantes notées BLL et BLLc.

Morphologie et caractéristiques biochimiques des souches

Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches BLL et BLLc ont été étudiées selon les méthodes d'études des bactéries lactiques décrites par Harrigan et Mc lance (1976)[12]; Garvie (1984)[13], (1986)[14] ; Hammes *et al.* (1992)[15]; Hozapfel et

Schillinger (1992)[16]; Teuber *et al.* (1992)[17]; Weiss (1992)[18]; Axelsson (1993) [19]; Dicks *et al.*,1993) [20] .

Ainsi la morphologie a été déterminée par observations au microscope optique en contraste de phase.

Les tests de coloration Gram, de catalase, d'oxydase, de sporulation ont été réalisés par des méthodes standard classiques.

La production de gaz à partir du glucose a été testée dans un milieu de base contenant 2% (p/v) de glucose et distribué dans des tubes avec des cloches de Durham inversées. Ces tubes ensemencés sont incubés à 30°C pendant 3 jours.

La production d'indole à partir du tryptone est examinée dans 10 ml d'un milieu contenant par litre (10 g de tryptone et 5 g de NaCl). Après ensemencement et incubation à 30°C pendant 3 jours, la culture est testée pour la présence d'indole selon la méthode de Cowan (1974) [21].

La désamination de l'arginine est testée dans un milieu de base contenant 1% (p/v) d'arginine monochloride, 0,3% (p/v) de bacto-agar et 0,01%(p/v) de rouge de phénol à un pH 7,2. Après ensemencement et incubation à 30°C pendant 3 jours. L'hydrolyse de l'arginine est détectée par le changement de couleur du milieu qui passe du rouge au jaune.

La sensibilité au NaCl est testée dans un bouillon MRS contenant 6,5%(p/v) de NaCl et incubé à 4°C pendant 4 jours.

La croissance aux températures 10°C, 15°C, 45°C a été testée dans un bouillon MRS.

Dosage de l'acide lactique

Des bouillons MRS contenant différents sucres à étudier ont été ensemencés à 1% avec des cultures bactériennes de 24 heures ($DO_{650nm}=0,90$). Après 24 heures de croissance, 5 ml de chaque bouillon de culture ont été prélevés et dilués deux fois avec de l'eau distillée. Cette solution diluée est titrée avec du NaOH 0,1M en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur coloré [22] .

Le pourcentage d'acide lactique est obtenu en appliquant la formule ci-dessous :

$\% \text{ acide lactique} = (V \times N \times M) / 10 \times V'$, dans laquelle V représente le volume de NaOH 0,1 M (ml), N représente la normalité de NaOH, M représente la masse molaire de l'acide lactique et V' représente le volume d'échantillon (bouillon MRS dilué).

Mesures de pH.

Les mesures de pH ont été réalisées à chaque heure avec un pHmètre (pH526 WTW TFK325/HC) dans du bouillon MRS contenant le sucre à tester avec un pH initial de 6,2.

Dosage des protéines

Il a été fait selon la méthode de SEDMAK et GROSSBERG (1997) [23].

1ml de culture (bouillon MRS après 24 heures de croissance) est additionné à 1 ml de NaOH 1 M et porté à 80°C pendant deux minutes. L'échantillon ainsi traité (0,1ml) est additionné à 0,1ml de réactif et laissé à incubation pendant une heure suivi de la lecture des DO (Densité Optique) à 465 nm et 620 nm. Le rapport A620 /A465nm est calculé pour chaque échantillon. A l'aide d'une courbe étalon réalisée avec le BSA (Sigma A-9418 Sigma chemical, St-Louis Mo 63178 USA 314-771-5750) la concentration en protéine des échantillons a été déterminée.

Résultats et discussion

L'analyse des caractéristiques morphologiques et biochimiques montrent que les souches BLL et BLLc sont des bactéries lactiques (tableau 1). Les bactéries lactiques sont généralement anaérobies ou anaérobies facultatives, catalase négatives, oxydase positives, asporulantes, Gram positif [8,24,25,26]. L'ensemble de ces résultats obtenus montrent bien que les souches (BLL et BLLc) sont des bactéries lactiques.

Le taux de protéines de la souche BLL est supérieur à celui de la souche BLLc, ceci peut s'expliquer par le fait que la souche BLL utilise mieux son substrat pour la production de sa biomasse

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des deux souches

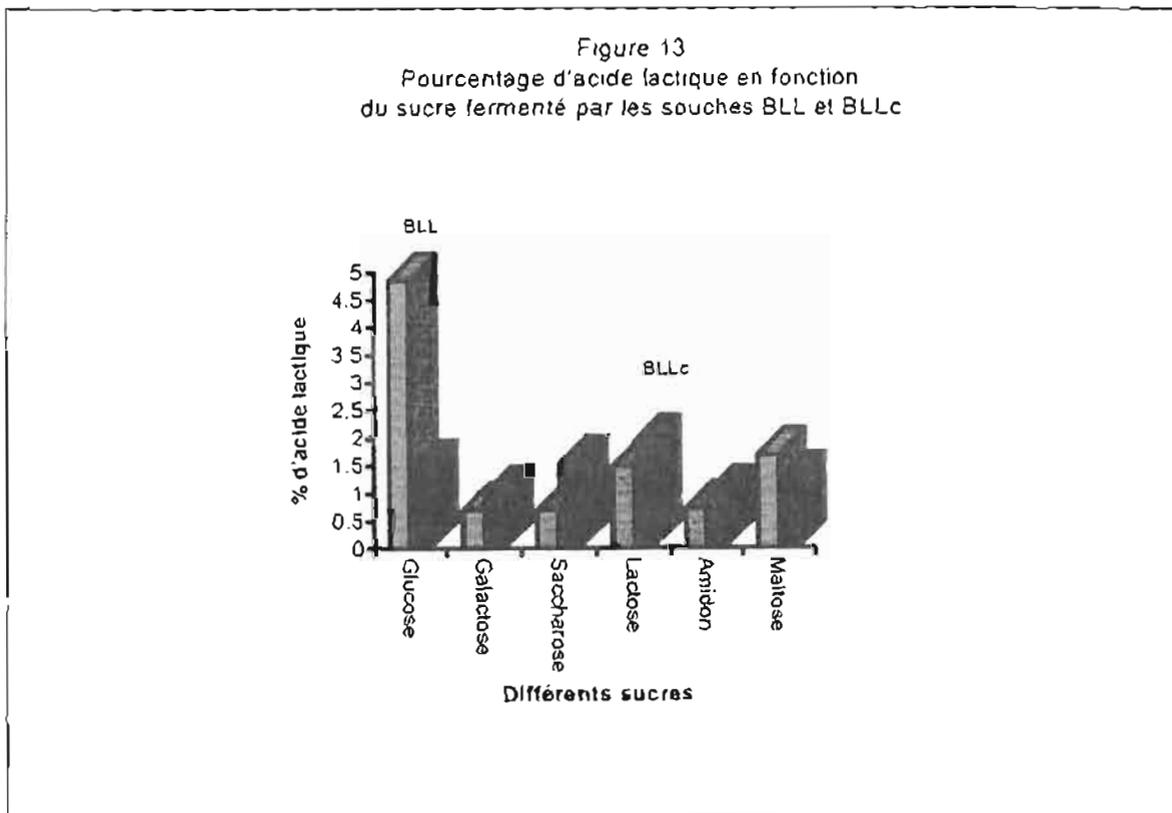
Caractéristiques	Souches	
	BLL	BLLc
Morphologie	Cocci (ovoïdes)	Cocci (sphériques)
Mode de regroupement	paires, courtes chaînettes	Paires, longues chaînettes
Coloration de Gram	+	+
Sporulation	-	-
Catalase	-	-
Oxydase	+	+
Croissance à 10°C	+	+
Croissance à 15°C	+	+
Croissance à 45°C	-	-
Desamination de l'arginine	+	-
Croissance dans 6,5% NaCl	-	-
Production de gaz à partir du glucose	-	+

+ : réaction positive, - : réaction négative

Table 1 : Morphological and biochemical characteristics of the two strains

Le suivi de la production des acides par les souches (BLL et BLLc) , sur différents sucres montre une variation de la quantité de ces acides (figure 11). Cette variation est fonction du sucre et de la souche. Ainsi il apparaît qu'avec la souche M3 le glucose est le sucre qui donne le plus grand pourcentage d'acide (4,86%), suivent dans l'ordre le maltose et le lactose.

Le glucose est le sucre qui donne le plus grand pourcentage d'acide (4,86%), suivent dans l'ordre le maltose et le lactose (figure 11) Le galactose et le saccharose ont un pourcentage d'acide inférieur à 1%. Un constat majeur est que le glucose est le sucre le plus métabolisé par la souche BLL qu'elle fait fermenter alors qu'elle ne fait pas fermenter l'amidon (figure11). Cela peut s'expliquer par le fait que le glucose est un monomère du lactose.



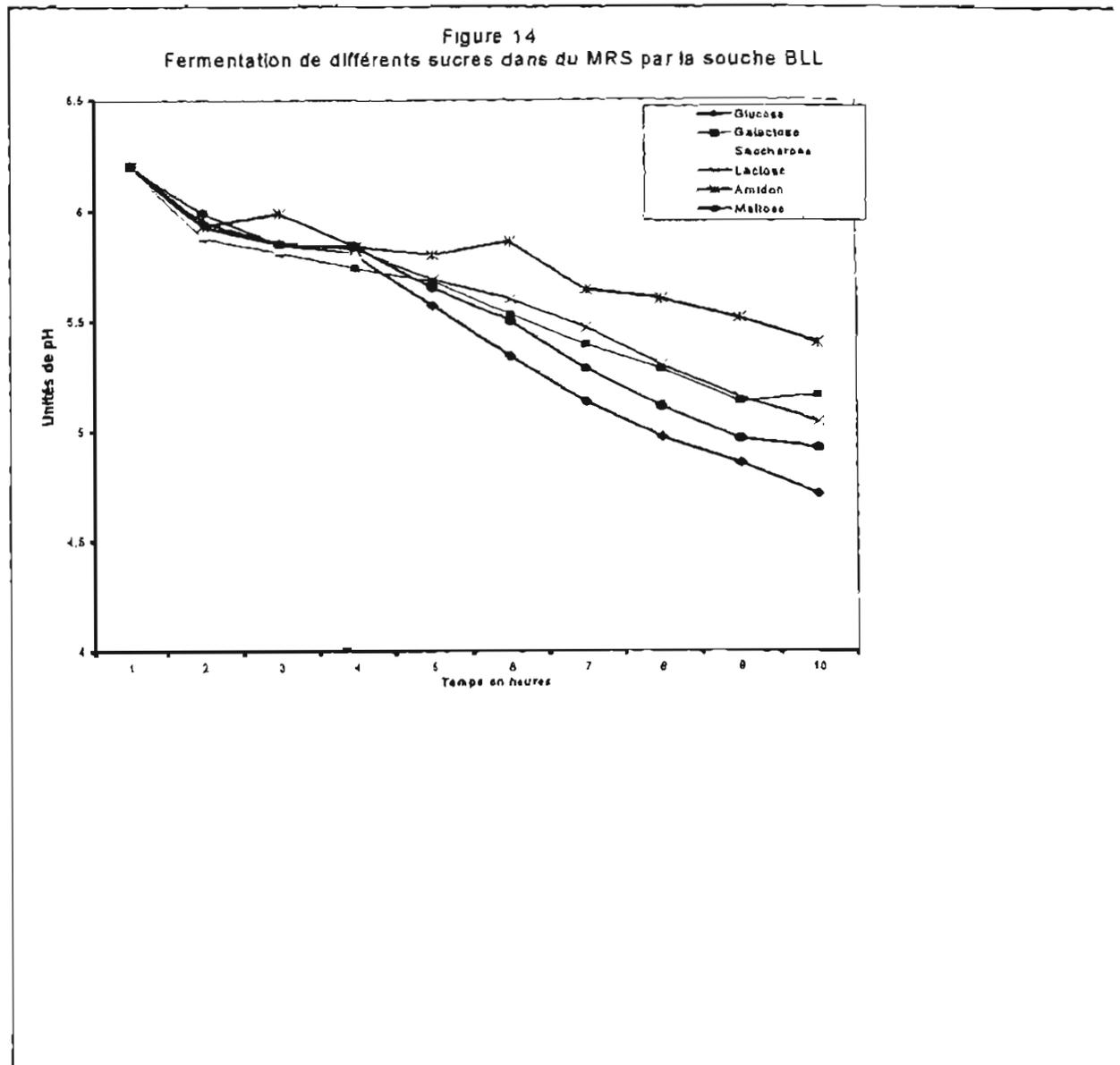
d'équipement enzymatique. Ainsi la mauvaise utilisation de l'amidon peut être liée à ce phénomène ou par le non transport de celui-ci à l'intérieur de la cellule.

Par ailleurs les lactocoques sont fermentaires et tirent leur énergie métabolique uniquement des processus de phosphorylation de substrats et des processus chimiosmotiques générateurs d'énergie. Les lactocoques dégradent les sucres par la voie de la glycolyse. Le principal système de transport du glucose des lactocoques est formé par la glucose phosphotransférase [8,26]. Les lactocoques en croissance sur du maltose sont capables de produire un mélange d'acide (acide lactique, acide formique, acide acétique) sur du maltose. Ces souches peuvent

consommer tout le maltose au bout de 8 heures de croissance et on obtient un pH final voisin de 5 [27].

Par contre avec la souche BLLc sur du lactose on observe un grand pourcentage d'acide lactique (1,95%) (figure 11) ensuite viennent dans l'ordre le saccharose, le glucose et le maltose. Quant à la production d'acide à partir du galactose et à l'amidon elle a donné un faible pourcentage inférieur à 1%.

Si on considère la cinétique d'évolution du pH (figure 12) en fonction du sucre métabolisé par la souche M3 on constate que le glucose a le plus faible pH (4,71 au bout de neuf heures) viennent ensuite en ordre, le maltose le lactose, le galactose, l'amidon, et le saccharose

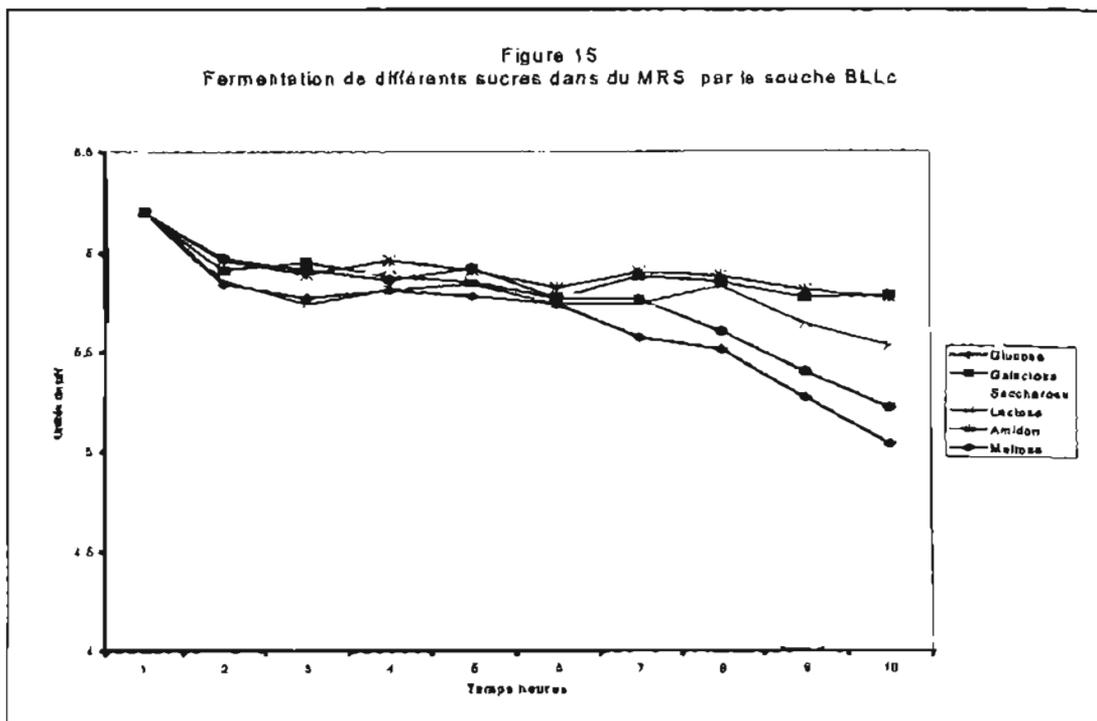


Avec le glucose, le pH du milieu baisse plus rapidement et atteint une valeur qui est inférieure à celles du maltose, du lactose, du galactose, de l'amidon, et du saccharose.

Avec la souche BLL on obtient après 24 heures de fermentation (Figure 14) en présence de glucose la plus faible valeur de pH (4,14), suivent le maltose, galactose, lactose, l'amidon et le saccharose avec des pH finaux respectifs de 4,34 ; 4,40 ; 4,44 ; 5,19 ; 5,55.

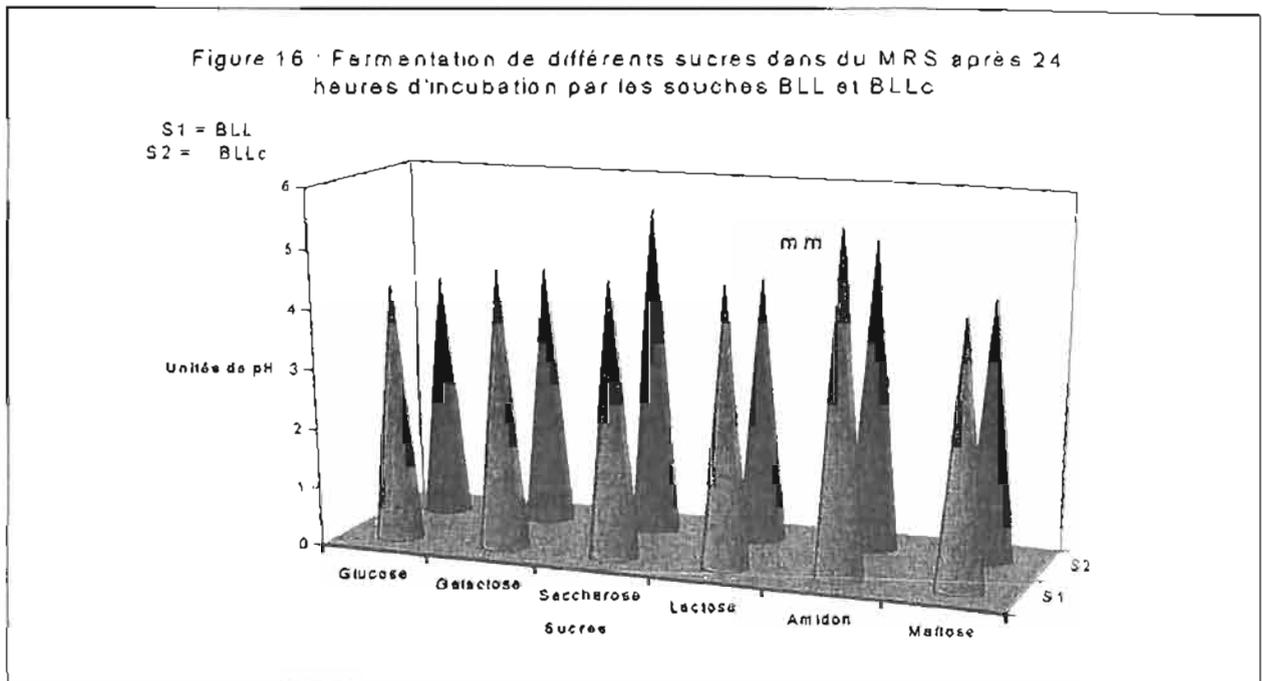
L'obtention des faibles valeurs de pH pourrait être intéressante dans le cas de certains aliments fermentés si cette souche est utilisée dans la fermentation alimentaire. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté l'inhibition de la croissance des bactéries indésirables par les milieux acides [2-6,8].

En considérant la cinétique d'abaissement du pH par la souche BLLc, on constate pour l'ensemble des courbes (figure 15) qu'au bout de neuf heures, on note le plus faible pH 5,04 avec le glucose puis suivent en ordre le maltose, le saccharose, le lactose, l'amidon, le galactose. La souche BLLc utilise plus facilement et plus rapidement le glucose (figure 15). Le glucose (ou le lactose) est transporté par un système actif et selon les espèces peut être phosphorylé lors du transport à travers la membrane cellulaire.



D'une manière générale les lactocoques mettent en jeu un système phosphotransférase qui phosphoryle le sucre aux dépens du phospho-enol pyruvate (PEP) [8].

Après une croissance pendant 24 heures de la souche BLLc sur les différents sucres, la plus faible valeur de pH (4,32) a été observée avec le glucose suivent ensuite le maltose pH (4,37), le saccharose pH (4,62), le lactose pH (4,66), le galactose pH (4,68), l'amidon pH (5,66) (figure 16).



Avec le glucose les valeurs de pH les plus basses sont obtenues aussi bien avec la souche BLL qu'avec la souche BLLc (figures 14 et 15).

L'importance des bactéries lactiques tant dans le domaine industriel que médical, réside dans leur capacité à fermenter rapidement les sucres en acide lactique et d'autres acides organiques. Il a été montré que la croissance bactérienne est généralement couplée à une utilisation des sucres et à une libération d'énergie. Le type de sucre ainsi que le milieu de croissance des bactéries influenceraient la composition et la concentration des produits terminaux d'une fermentation donnée. Le métabolisme des sucres conduit notamment à la production de l'acide lactique et à un fort abaissement du pH, propriétés recherchées dans la fabrication des produits alimentaires fermentés [2-7].

Les bactéries homofermentaires utilisent la voie EMP (Embden-Meyerhof-Parnas). Le lactose du lait apparaît dans la cellule sous forme de glucosyl β -(1-4) galactoside 6-phosphate ou (lactose-phosphate). Il est donc prêt à être hydrolysé par une β -D-phosphogalactosidase (lactocoques, lactobacilles).

Les bactéries hétérofermentaires utilisent les voies du tagatose-6-phosphate et de la glycolyse mais aussi celle des pentoses phosphates (De Roissart et Luquet, 1994).

Les lactocoques sont connus pour leur capacité à produire un mélange d'acide à partir du maltose. A pH 6 et à une température comprise entre 15 et 30 degrés, *Lactococcus lactis ssp.lactis* ATCC19435 consomme tout le maltose au bout de 8 heures. De l'acide lactique, de l'acide formique, de l'acide acétique et de l'éthanol sont produits et le pH final est voisin de 5,00.

Dans un milieu contenant un mélange de glucose, de lactose et de galactose, le glucose et le lactose sont immédiatement métabolisés, tandis que le métabolisme du galactose n'apparaît pas jusqu'à ce que les deux autres sucres aient été dégradés. Ce phénomène est appelé diauxie.

Les plus fortes quantités d'acide lactique sont produites par les lactobacilles thermophiles. La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière. Cet acide organique permet de concentrer la matière sèche du lait en intervenant comme coagulant et antibactérien. La vitesse et le niveau maximum de production diffèrent entre germes et espèces et même entre les souches d'une même espèce de bactéries lactiques (Konings *et al.*, 1999).

Les bactéries lactiques possèdent deux mécanismes différents en ce qui concerne le transport du lactose ; il s'agit d'un système perméase et d'un système PEP-PTS (phosphoénolpyruvate-phosphotransférase). Le système perméase est présent chez les bactéries lactiques thermophiles et les *Leuconostoc*, quant au système PEP-PTS il est présent dans les streptocoques du groupe N.

Les lactocoques fermentent rapidement le lactose en utilisant uniquement le système PEP-PTS pour le transport et l'assimilation des sucres.

Conclusion

L'étude a montré que les deux souches de bactéries lactiques (M3 et MR18) sont capables de produire de l'acide lactique avec différents carbohydrates, contribuant ainsi à l'abaissement du pH du milieu de culture. L'abaissement de pH dus à la production d'acide lactique peut contribuer à l'hygiène des laits fermentés qui seront issus de ces souches, par un phénomène d'inhibition des bactéries pathogènes. La conséquence pratique de la production d'acide pour le produit alimentaire siège de la fermentation lactique, est que les bactéries lactiques interviennent dans l'inhibition des flores nuisibles, ou celles des flores pathogènes.

Le pH, les acides lactiques et acétiques produits sont les principaux responsables de cette inhibition.

Parmi les bactéries non lactiques rares sont celles qui peuvent croître à des valeurs de pH inférieures à celles qu'on obtiendrait avec les germes lactiques.

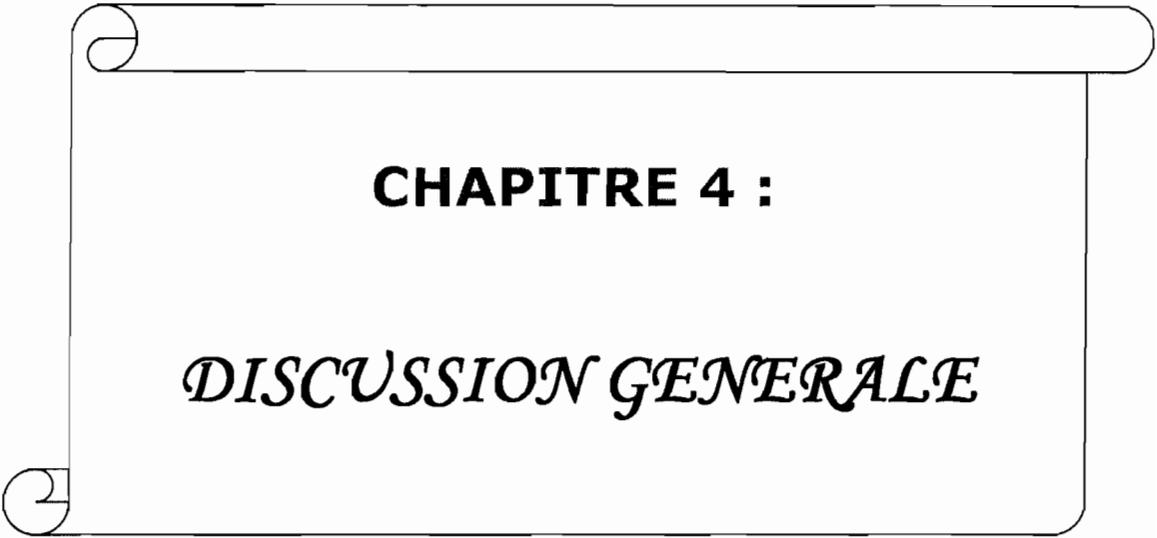
Une bonne acidification lactique inhibe la croissance de *E. coli*, des *Pseudomonas*, des *Salmonella*, des *Clostridia*, ou de *Listeria monocytogenes*.

REFERENCES

1. Réseau Documentaire D'élevage Au Burkina Revue de presse sur l'élevage au Burkina Faso. *Syfia Bulletin de presse* juillet 1997-décembre 1998
2. Desmazeaud M Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers Agric.* 1996 ; 5 : 331-343
3. Daly C And Davis R The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agric. and food Sci.* 1998 ; 7 (2): 251-264
4. Soomro A H, Masud T and Anwaar Kiran Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and Human health. A Review. *Pakistan J. of Nutri.* 2002 ; 1(1): 20-24
5. Piard JC, Desmazeaud M Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 1991 ; 71: 525-541
6. Piard J C, Desmazeaud M Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 1992 ; 72 : 113-142
7. Marteau P, Rambaud J C Probiotiques en gastroentérologie : bases rationnelles, effets démontrés et perspectives. *Hepato-Gastro.* 1998 ; 5: 1-9
8. De Roissart H, Luquet F M. *Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques (tome I)*. Loriga, Paris. 1994 : 605 p
9. Therzaghi B E, Sandine W E Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 1975 ; 29 : 807-813
10. Garvie E I The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. of Dairy Res.* 1960 ; 27 : 283-292
11. Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S , Navarini L , Bosco M and Cescutti P Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. of Food Microbiol.* 1999 ; 51: 105-111
12. Harrigan W F And Mc Cance M E. *Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic press, London. 1976

13. Garvie E I Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria. In : Bergan T Methods in microbiology. London : Academic press , 1984 , 147-178
14. Garvie E I Genus *Leuconostoc* . In : Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E and Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore : Williams and Wilkins, 1986 ; 1071-1075
15. Hammes W P, Weiss N, Holzapfel W H The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In : Barlows A, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H *The prokaryotes*. Berlin : Springer, 1992 ; 1534-1593
16. Holzapfel W H, Schillinger V The genus *Leuconostoc*. In : Barlows A, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H *The prokaryotes*. Berlin : Springer, 1992 ; 1509-1534
17. Teuber N, Geis A, Neve H The genus *Lactococcus* . In : Barlows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K-H *The prokaryotes*. Berlin : Springer, 1992; 1482-1501
18. Weiss N The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In : Barlows A, Trüper H G, Dworkin, M, Harder W, Schleifer K-H *The prokaryotes*. Berlin : Springer, 1992 ; 1502-1507
19. Axelsson L T Lactic acid bacteria : classification and physiology. In : Salminen S, Von Wright A *Lactic acid bacteria*. New York : Marcel Dekker, 1993 ; 1-64
20. Dicks L M T, Fantuzzi L, Gonzales F C, Du Toit M and Dellaglio F *Leuconostoc argentinum* sp.nov. , isolated from argentine raw milk. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 1993 ; **43** : 347-351
21. Cowan S T. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edn. Cambridge University press, Cambridge. 1974
22. Zvauya R, Mygochi T, Parawira W Microbial and biochemical changes occurring during production of masvusvu and mangisi, traditional Zimbabwean beverages. *Plant Foods for Human Nutri.* 1997 ; **51** : 43-51
23. Sedmack J J, Grossberg S E A rapid sensitive assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochem.* 1997 ; **76** : 544-552
24. Desmazeaud M L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait* 1998 ; **63** : 267-316
25. Demain A L Microbial secondary metabolism : a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. Microbial secondary metabolism for academia and industry. *Ciba Foundation Symposium* 1999 ; **171** : 3-23

26. Champagne P C. Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. EDISEM, Canada. 1998 : 210 p
27. Van Niel J W E And Hahn-Hagerdal Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Appl. Microbio. and Biotechnol.* 1999 ; **52** : 617-627
28. Konings W N, Kuipers O P, Huis In' Veld J H J Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999 ; **76** : 1-4
29. Desmons S, Krhouz H, Evrard P, Thonart P Improvement of Lactic Cell Production. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 1998 ; **72** : 513-526



CHAPITRE 4 :

DISCUSSION GENERALE

Chapitre 4 : Discussion générale

Les résultats des caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches productrices (Gram, incapacité à former des spores, mobilité, catalase, oxydase, urée indole) montrent qu'elles appartiennent au groupe des bactéries lactiques (Kandler et Weiss, 1986 ; Schleifer, 1986 ; Feresu et Muzondo, 1990 ; Axellsson, 1993 ; Wood *et al.*, 1995 ; Tailliez, 2001). Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Isono *et al.*, (1994) qui ont travaillé sur la caractérisation et l'identification de bactéries lactiques isolées de laits fermentés du Nord de la Tanzanie, et qui ont montré que les laits fermentés traditionnellement sont riches en plusieurs genres de bactéries lactiques productrices d'EPS. Les travaux de Smitinont *et al.*, (1999) réalisés sur des souches productrices d'exopolysaccharides de produits fermentés de thaï ont montré des caractéristiques morphologiques et biochimiques similaires à celles de notre étude. La flore lactique de nos échantillons de lait fermenté est comparable à celles obtenue en Afrique du Sud (Beukes *et al.*, 2001), au Maroc (Hamama, 1992), au Zimbabwe (Feresu and Muzondo, 1990).

L'acide lactique produit par les souches de bactéries lactiques joue un rôle dans les propriétés organoleptiques et rhéologiques des produits fermentés, la fermentation lactique confère aux produits des caractéristiques bien particulières : arôme, texture, et sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits. D'une manière générale les bactéries lactiques interviennent dans : le maintien d'une flore intestinale normale par la production d'inhibiteurs et la stimulation du système immunitaire de l'hôte ; l'atténuation des problèmes d'intolérance au lactose par une diminution du lactose dans le produit, due à une auto-digestion du lactose, par les β -galactosidases produits ; l'activité anticarcinogènes (par l'élimination de certains procarcinogènes) stimulation du système de défense immunitaire, la réduction de la teneur sérique en cholestérol par l'hydrolyse intestinale du cholestérol ; l'amélioration de la valeur nutritionnelle par la synthèse de vitamines de complexe B, par l'absorption accrue du calcium ; l'atténuation des effets de certains problèmes rénaux (par la diminution des niveaux d'amines toxiques), l'amélioration des bilans nutritionnels et sanitaires par addition des bactéries bénéfiques à l'aliment comme probiotique (Soomro *et al.*, 2002).

L'identification moléculaire a révélée la présence de *Pediococcus spp*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* parmi nos souches productrices d'EPS. Ces résultats montrent une certaine hétérogénéité des espèces des laits fermentés du Burkina. Savadogo et ses collaborateurs ont montrés (2001) que les laits fermentés du Burkina Faso

étaient riches en différents genres de bactéries lactiques productrices d'EPS parmi lesquels on peut citer les *Lactobacillus*, les *Leuconostoc*, les *Streptococcus*, les *Lactococcus*.

L'hétérogénéité des espèces des bactéries lactiques a été aussi observée par d'autres auteurs qui ont travaillé sur des laits fermentés, notamment Yodoamijoyo et ses collaborateurs (1983) en Indonésie, Hamama (1992) au Maroc, Isono et ses collaborateurs (1994) en Tanzanie, Beukes et ses collaborateurs (2001) en Afrique du sud. D'une manière générale les genres couramment rencontrés dans les laits fermentés traditionnels sont les *Lactobacillus*, les *Leuconostoc*, les *Lactococcus*, les *Streptococcus*, les *Pediococcus*.

L'hétérogénéité des bactéries lactiques observée contribuerait à la qualité hygiénique et organoleptique des laits fermentés traditionnellement, ce qui justifie l'importance de la consommation de ces laits.

Les méthodes classiques basées sur la reconnaissance des bactéries par leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques sont lourdes et imprécises.

La détection et l'identification des bactéries lactiques par les méthodes moléculaires sont de très bonnes alternatives aux méthodes traditionnelles d'identification. Plusieurs travaux sur l'utilisation de primers spécifiques dérivant du RNA ribosomal 16S et 23S, rRNA pour des espèces de bactéries lactiques sont bien connus (Hensiek *et al.*, 1992 ; Hertel *et al.*, 1993 ; Ehrman *et al.*, 1994). Barry *et al.*, 1991 ont montré que les régions itergéniques ribosomales des espèces bactériennes étaient variables comparées aux gènes des rRNA 16S et 23S.

Sur l'ensemble des souches testées en PCR pour la recherche des régions responsables de la biosynthèse des EPS, onze souches ont donné des réactions positives (MR1, MR3, MR5, MR6, MR10, MR11, MR12, MR17, MR15, MR16, MR17). Les bandes obtenues ont une taille comprise entre 2000 pb et 2500 pb et ont la même taille approximativement. Les neuf autres souches n'ont pas donné de bandes détectables, pourtant elles produisent des exopolysaccharides, ceci peut s'expliquer par le fait que ces souches auraient perdu leur plasmides au cours des repiquages successifs. Van kranenburg et ses collaborateurs en 1999a ont montré que *Lactococcus lactis* NIZO B40 possède un plasmide de 40 Kb responsable de la production d'exopolysaccharides

Walling et ses collaborateurs (2001) ont travaillé sur des *Pediococcus* productrices d'EPS isolées du vin, ces bactéries lactiques possèdent un plasmide responsable de la biosynthèse d'EPS de 5500 pb environ.

Les produits des gènes epsDEFGH et eps J sont supposés agir comme glycosyltransférases avec comme première enzyme le epsD qui commence avec la construction de la chaîne

glucidique de l'unité répétitive en attachant une molécule de glucose de l'UDP-glucose à un transporteur lipidique (Vankranenburg *et al.*, 1997, Vankranenburg *et al.*, 1999b). En suite les autres glycosyltransférases Eos E, epsf, EpsG continuent à construire l'épine dorsale de l'unité répétitive. EpsH et EpsJ sont supposés être impliqués dans l'attachement des molécules de ramification, le rhamnose et le galactose-P. EpsI et EpsK sont homologues à des protéines de polymérisation et d'exportation.

Toutes les souches bactériennes qui ont été identifiées dans nos échantillons font partie de la flore habituelle des laits et de leurs sous produits fermentés (Cerning *et al.*, 1991 ; Kurmann, 1994 ; Desmazeaud, 1996 ; Daly et Davis, 1998 ; Beukes *et al.*, 2001). Ils jouent un rôle capital dans la transformation par fermentation du lait en assurant la texture, la flaveur, la salubrité et la conservation par la production d'EPS, d'acide lactique et quelques fois des bactériocines (Talarico et Dobrogosz, 1989 ; Desmazeaud, 1996 ; Brink *et al.*, 1994 ; Ouwehand, 1998 ; Sholeva *et al.*, 1998 ; Yang, 2000). *Lactobacillus plantarum* par exemple est généralement utilisé comme starter dans les produits à base de céréales, à base de lait et d'autres produits végétaux animaux. Il constitue par contre un microorganisme indésirable dans les jus, fromages (Hammes *et al.*, 1991).

Les valeurs de taux de production d'EPS obtenues au cours de cette étude sont du même ordre que celles obtenues par Cerning *et al.* (1988 ; 1992), par Cerning (1995) par Doco *et al.*, (1990) , par Marshall *et al.* (1995). En effet les travaux que ces auteurs ont réalisés avec *S. thermophilus* ont indiqué des taux de production d'EPS variant de 50 à 350 mg/l de lait. Ceux réalisés avec *L. lactis subsp Cremoris* ont donné des taux de production d'EPS plus élevés, variant de 80 à 800 mg/l de lait.

L'étude de la composition en monomères des exopolysaccharides a montré que les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés dans les divers exopolysaccharides des bactéries d'acide lactique sont le glucose et le galactose, dont le galactose est le plus important (Cerning, 1990, 1995). Mais on rencontre aussi du rhamnose (Cerning *et al.*, 1986, 1988 ; Nakajima *et al.*, 1990, 1992 ; Gruter *et al.*, 1993 ; Grobber *et al.*, 1995), de du mannose (Petit *et al.*, 1991) du fructose (Manca de Nadra *et al.*, 1985) de l'arabinose et du xylose (de Cerning *et al.*, 1988, 1992) ou des dérivés de sucre tels que le N-acetylgalactosamine (Doco *et al.*, 1990 ; Petit *et al.*, 1991) et le N-acetylglucosamine (Cerning *et al.*, 1994). Nos résultats sont similaires à ceux décrits par ces auteurs cités.

De plus, plusieurs auteurs ont déjà montré que la composition du milieu de culture a une influence sur la quantité et la composition en monosaccharides des EPS produits (Bejar *et al.*, 1998 ; Cerning, 1990 ; Cerning *et al.*, 1992 ; Cerning, 1995 ; DE Vuyst et Degeest, 1999). La

production d'exopolysaccharides dans du lait comme milieu de culture est assez importante. En effet, le lait est un milieu naturel riche qui couvre en excès les besoins en sources de carbone, sources d'énergie et de facteurs de croissance des bactéries lactiques (milieu enrichi) ; tandis que les milieux synthétiques ont une composition définie quantitativement et qualitativement pour couvrir les besoins de croissance (milieu minimum) ; ce qui justifie cette différence de rendement sur les deux milieux. On sait que la production d'EPS requiert une source riche en carbone, en facteurs de croissance et en oligo-éléments qui sont plus disponibles dans le lait que dans le milieu synthétique (Van Niel et Hahn-Hagerdal, 1999).

Parmi toutes les souches isolées huit (8) produisent des bactériocines qui inhibent aussi bien les bactéries pathogènes Gram négatif que les bactéries Gram positif. La présence des souches productrices de bactériocines dans nos échantillons leur confère une qualité hygiénique réduisant ainsi les risques d'intoxication liés à la consommation de lait fermenté.

L'importance de l'effet antibactérien varie suivant les sérotypes. Les souches de bactéries pathogènes Gram positif sont les plus sensibles aux bactériocines des bactéries lactiques. La résistance des bactéries Gram négatif est attribuée à la nature particulière de leur enveloppe cellulaire, les mécanismes d'action décrits pour les bactériocines faisant intervenir un phénomène d'adsorption. Selon Bhunia et ses collaborateurs (1991) la pédiocine (bactériocine produite par *Pediococcus acidilactici*) interagit avec les acides lipotéichoïques, absents chez les bactéries Gram négatif. Ces molécules joueraient le rôle de site de réception non spécifique nécessaire pour produire l'effet bactéricide.

En effet, la sensibilité d'une souche dépend du genre, de l'espèce et même du sérotype à l'intérieur de la même espèce. Ces variations de sensibilité sont dues aux caractéristiques des souches (présence ou absence de sites récepteurs ou d'immunoprotéines) et donc aux niveaux de lésions occasionnées par le facteur inhibiteur.

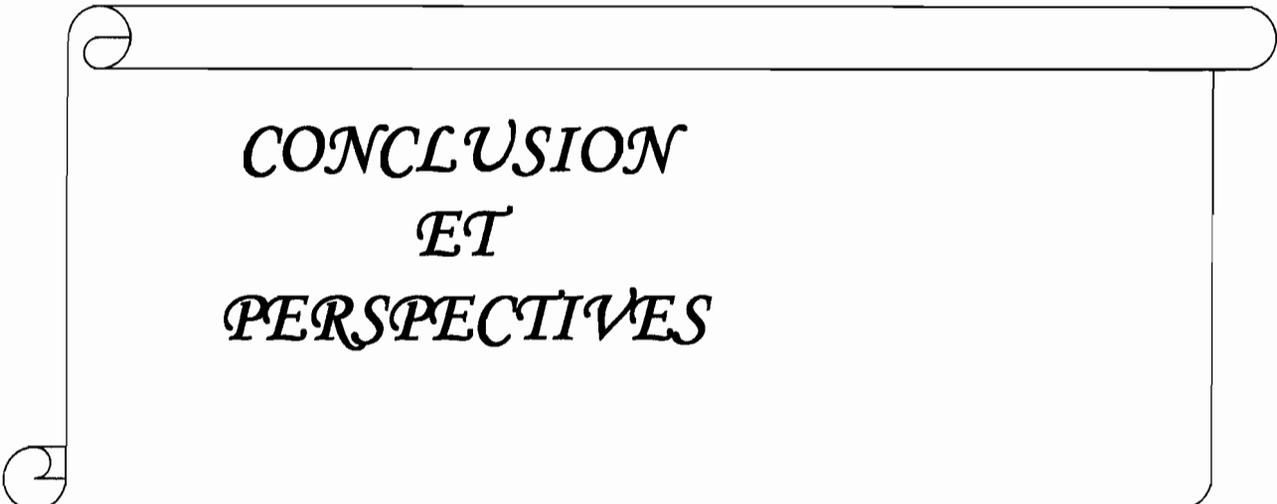
Les bactériocines connues (nisine par exemple) n'agissent pas toujours sur les espèces taxonomiquement proches.

A la suite des travaux sur les colicines (bactériocines des bactéries Gram-), Tagg et ses collaborateurs (1976) citent 5 critères requis pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine : la présence d'une partie biologiquement active de nature protéique, un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les homologues, un mode d'action bactéricide, l'adsorption à des récepteurs spécifiques et nature plasmidique des déterminants génétiques codant pour la production de la bactériocine et pour l'immunité à celle-ci.

Les études réalisées en 1993 par Klaenhammer sur *Lb. brevis* DSM9296 d'une part ont données 9 mm de diamètre d'inhibition avec *E. faecalis*, 16 mm de diamètre d'inhibition avec

Streptococcus xylosum ; d'autre part sur *Lc. lactis 99* ont données 15 mm de diamètre d'inhibition avec *Bacillus linens SR3* , 10 mm de diamètre d'inhibition avec *Streptococcus xylosum* , 4 mm sur *Staphylococcus aureus*.

Timenez-Diaz et ses collaborateurs (1993) ont montré que l'activité antibactérien des surnageant de *Lb. Plantarum LP co10* était éliminée non seulement par l'action des protéases et aussi par l'action des enzymes glycolytique et lipolytique.



*CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES*

Conclusion générale

Au terme de ce travail nous avons pu faire une identification et une caractérisation biochimique et moléculaire de différentes souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides des laits fermentés du Burkina. Ces souches de bactéries lactiques ont donné des taux de production d'exopolysaccharides assez intéressants. Le glucose, le galactose et le rhamnose sont les sucres les plus rencontrés dans les exopolysaccharides de ces souches.

Certaines de ces souches ont aussi montré une activité antibactérienne importante contre *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Listeria innocua* LMG 13568), *Escherichia coli* 105182 CIP, *Salmonella enterica* 1051150 CIP, *Shigella dysenteriae* 5451 CIP.

Les bactéries lactiques sont parmi les bactéries à Gram-positif les plus étudiées sur le plan génétique et moléculaire après *Bacillus subtilis* en particulier à cause de leur importance dans l'industrie agro-alimentaire. Les bactéries lactiques sont dépendantes des sucres comme source d'énergie ; cette source de carbone est transformée principalement en lactate.

Les bactéries lactiques, en raison de leurs caractères technologiques, nutritionnels et éventuellement thérapeutiques, jouent un rôle central dans le traitement du lait pour obtenir des produits fermentés comme les fromages et les Yaourts. Par la fermentation, les bactéries lactiques confèrent les propriétés organoleptiques et rhéologiques particulières aux produits laitiers fermentés.

Le groupe d'EPS de bactéries lactiques le plus large et le plus diversifié est le groupe des hétéropolysaccharides qui se composent de plusieurs types d'oses.

La production d'hétéropolysaccharides est très fréquente parmi les microorganismes et on y trouve aussi bien des souches productrices non lactiques d'un intérêt médical comme *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* ou *Enterobacter spp.* que des bactéries lactiques.

La capacité de production d'EPS constitue une réponse directe et logique aux pressions sélectives de l'environnement. L'anabolisme d'EPS demande beaucoup d'énergie, il est donc improbable qu'une bactérie utilise autant d'énergie et de substrat sans en tirer un avantage.

L'importance des EPS pour la cellule ne semble pas être très grande si on considère les bactéries *in vitro*. Par contre, sous des conditions naturelles, ce qui signifie des conditions fortement concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage compétitif et leur permettre de se maintenir dans leur environnement.

Les polysaccharides d'origines microbiennes généralement reconnus comme hygiéniques sont toujours en compétition dans les applications (industrielles, biotechnologiques et médicinales) avec d'autres polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les propriétés physiques et écologiques de leur EPS sont supérieures mais les polysaccharides d'autres origines sont presque toujours meilleur marché à produire. C'est pourquoi les EPS doivent avoir un avantage majeur, comme par exemple un bénéfice pour la santé du consommateur, afin d'arriver à percer sur le marché. En général, les polymères d'origine microbienne sont des produits uniformes et purs. Dans le cas de la cellulose bactérienne, produite par exemple par *Acetobacter xylinum*, ces caractéristiques sont assez intéressantes de telle manière que ce polymère remporte avec succès la concurrence de la cellulose végétale.

Vu l'importance des bactéries lactiques nous nous proposons dans la suite d'étudier la possibilité d'utilisation des bactéries lactiques comme vaccins oraux. Il serait assez intéressant de pouvoir caractériser les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'exopolysaccharides, les protéines responsables de l'incorporation des différents sucres et donc la formation d'une unité répétitive afin d'élucider les mécanismes de synthèse moléculaire des EPS, et d'isoler les gènes codant pour ces protéines. Pour assurer la qualité et la sécurité des produits laitiers fermentés il sera intéressant d'approfondir le travail sur les bactériocines des bactéries lactiques à travers leur caractérisation biochimique.

Références bibliographiques

- Ampe F., Ben Omar N., Moizan C., Wachter C., and Guyot J.P., 1999.** Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Env. Microbiol.*, 65 (12), 5464-73.
- Anderssen E. L., Diep D. B., Nes I. F., Eijsink V.G.H., and Nissen-Meyer J., 1998.** Antagonistic of *Lactobacillus plantarum* C1: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Env. Microbiol.*, 64, 2269-2272.
- Axelsson L. T., 1993.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., Von Wright A. (eds). *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekka, New york, pp.1-64.
- Barry T., Colleran G., Glennon M., Dunican I.K., and Gannon F., 1991.** The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.*, 1, 51-56.
- Bejar V., Llamas I., Calvo C. and Quesada E., 1998.** Characterization of exopolysaccharides produced by halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.*, 61, 135-141
- Beukes E. M., Bester B. H. and Mostert J. F. 2001.** The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 189-197.
- Bhunja A. K., Johnson M.C., Ray B., and Kalchayanand N. , 1991.** Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70 , 25-30.
- Brink Ten B., Minekns M., Vander Vossen J. M. B. M., Leer R. J. and Huis in't Veld J. H. J., 1994.** Antimicrobial activity of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 140-148.
- Caplice E. and Fitzgerald G.F., 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131-149.
- Cerning J., 1990.** Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Rev.*, 87, 113-130.
- Cerning J., 1995.** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 463-472.
- Cerning J., Bouillanne C. H., Landon M., and Desmazeaud M. J., 1992.** Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. dairy Sci.*, 75, 692-699.

- Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M. J. and Landon M., 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.*, 8, 625-628.
- Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M. J. and Landon M., 1988. Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.*, 10, 255-260.
- Cerning J., Bouillanne M., Landon M. And Desmazeaud M.J., 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sci. Aliments*, 10, 443-451.
- Cerning J., Bouillanne C., Landon M. and Desmazeaud M., 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 75, 692-699.
- Cerning J. and Marshall V.M., 1999. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Res. Devel. Microbiol.*, 3, 195-209.
- Cerning J., Renard C. M. G. C. , Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Piard J.C. , and Desmazeaud M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 525-541.
- Cerning J., Renard C. M. G. C., Thibault J. F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M., and Topisirovic L. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3914-3919.
- Champagne P. C., 1998. *Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière*. Canada: EDISEM, 210 p.
- Cherl-Ho Lee, 1997. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control*, 8, 259-269.
- Condon S., 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 269-280.
- Cooke R. D., Twiddy D. R. and Reilly P.J.A., 1987. Lactic-acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *FEMS Microbiol. Rev.* , 46, 369-79.
- Dahiya R. S. et Speck M. L. , 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Dairy Sci.*, 51, 1568-1572.
- Daly C and Davis R, 1998. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agri. food Sci. Finland*, 7, 251-264.
- De De Roissart H, and Luquet F. M., 1994. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage: *Lorica*, 605 p.

- De Vuyst L. and Vandamme E. J., 1994.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Microbiology Genetics and applications*. London, Blackie Academic and Professional. ISBN 0-75140174-9.
- De Vuyst L. and Degeest B., 1999.** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153-177.
- De Vuyst L., Vanderveken F., Van De Ven S. and Degeest B., 1998.** Production and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 1059-1068.
- Degeest B. and De Vuyst L., 1999.** Indication that the Nitrogen Source Influences Both Amount and Size of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex Medium. *Appl. Env. Microbiol.*, 65, 2863-2870.
- Delves-Broughton Blackburn J.P., Evans R.J. and Hugenholtz J., 1996.** Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 193-202.
- Desmazeaud M., 1996.** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, 331-343.
- Doco T., Wieruszkeski J.M. and Fournet B., 1990.** Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.*, 198, 313-321.
- Drouault S. and Corthier G., 2001.** Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. *Vet. Res.*, 32, 101-117.
- Dubois M. A., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Dupont L., 1998.** *Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches.* Thèse, Université Laval, Canada.
- Ehrmann M. Ludwig W. and Chleifer K.H., 1994.** Reverse dot blot: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol. Lett.*, 117, 143-150.
- Eyssen H.J., Parmentier G.G., Compennolle F.C., De Pauw G., and Piessens-Denef M., 1973.** Biohydrogenation of sterols by Eubacterium ATCC 21,408--Nova species. *Eur. J. Biochem.*, 36, 411-421.

- Faber E. J., Zoon P., Kamerling J. P. and 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. *Carbohydr. Res.*, 310, 269-276.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants and toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. Geneva: WHO, WHO Food Additives series (N° 1 to N° 36).
- Feresu B. S. and Muzondo I. M., 1990. Identification of some lactic acid bacteria from two Zimbabwean fermented milk products. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 178-186.
- Gamar L., Blonreau K. and Simonet J.M., 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 281-287.
- Gamar-Nourani L., Blondeau K. and Simonet J.M., 1998. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 664-672.
- Garcia-Garibay M. and Marshall V.M.E., 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 325-328.
- Gasser F., 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur*, 92, 45-67.
- Gasson M.J., 1993. Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 3-20.
- Grobben G. J., Sikkema J., Smith M.R. and De Bond J. A. M., 1995. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 103-107.
- Grobben Gert J., Boels Ingeborg C., Sikkema J., Smith Mark R., De Bont Jan A. M., 2000. Influence of ions on growth and production of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* NCFB 2772. *J. Dairy Research*, 67, 131-135.
- Gruter M., Leeftang B. R., Kuiper J., Kamerling J.P. and Vliegthart J.F.G., 1993. Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown in skimmed milk. *Carbohydr. Res.*, 239, 209-226.
- Guandalini S., Pensabene L., Zikri M.A., Dias J.A., Casali L.G., Hoekstra H., Kolacek S, Massar K., Micetic-Turk D., Papadopoulou A. De Souza J.S., Sandhu B., Szajewska H. and Weizman Z., 2000. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration

solution to children with acute diarrhea: a multicenter European, trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30, 54-60.

- Hammes W.P., Weiss N. and Holzapfel W., 1991.** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. -H. The Prokaryotes, vol. 2, 2nd edition. Springer-Verlag, New York, 1535-1594.
- Hamama A., 1992.** Moroccan traditional fermented dairy products. In: Ruskin, F.R. (Eds.) Applications of biotechnology to traditional fermented foods. National Academy press, Washington, DC; pp. 75-79.
- Heilig Hans G. H. J., Zoetendal Erwin G., Vaughan E. E., Marteau P., Akkermans A. D. L. and De Vos Willen M., 2002.** Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Appl. and Env. Microbiol.*, 68, 114-123.
- Hensiek R., Krupp G. and Stackebrandt E., 1992.** Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 123 -128.
- Hertel C., Ludwig W., Obst M., Vogel R. F., Hammes W.P. and Schleifer K.H., 1991.** 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes for rapid identification of meat lactobacilli. *Syst. Appl. Microbiol.*, 14, 173-177.
- Heyman M., 2000.** Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* , 19 137-146.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., and Williams S.T., 1994.** Bergey Manual of Determinative Bacteriology. Eds. Williams & Wilkins, Baltimore, 787 p.
- Holzapfel W.H., Geisen R. and Schillinger V., 1995.** Biological preservation of foods with reference to protective cultures bacteriocins and food. Grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* , 24, 343-362.
- Hosono, A., Wardoyo, R., and Otani, H., 1989.** Microbial flora in «*Dadih*», a traditional fermented milk in Indonesia. *Lebensm Wiss, Technol.*, 22, 20-24.
- Hosono A., Lee J., Ametani A., Natsume M., Hirayama M., Adachi T., Kaminogawa S., 1997.** Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 312-316.
- Hove H., Nordgaard-Andersen I. and Brobech Mortensen P., 1994.** Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am. J. of Clin. Nutr.*, 59, 74-79.

- Isolauri E., 2001** Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 1142-1146.
- Isono Y., Shingu I. and Shimizu S., 1994.** Identification and Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Masai fermented milk in Northern Tanzania. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 (4), 660-664.
- Jay J. M., 1982** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Env. Microbiol.* 44, 525-532.
- Jimenez-Diaz R, Rios-Sanchez R. M. , Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L. and Piard J.C. , 1993.** Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1416-1424.
- Jolly Laure and Stinglele Francesca, 2001.** Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 733-745.
- Jolly L., Vincent S. J. F., Duboc P. and Neeser J-R, 2002a.** Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 367-374.
- Jolly L., Newell J., Porcelli I., Vincent S. J. F. and Stinglele F., 2002b.** *Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis. *Glycobiology*, 5, 319-327.
- Kampfer P.1995.** An efficient method for preparation of extracts from gram-positive bacteria for comparison of cellular patterns. *J. microbiological Methods*, 21, 55-60.
- Kandler O., and Weiss N., 1986.** Regular, nonsporing gram-positive rods. *Bergey's manuel of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins*, 2, 1208-1234.
- Keller J.J. and Jordan I., 1990.** Fermented milks for the South African market. *S. Afr. J. Dairy Sci.*, 22, 47-49.
- Kitazawa H., Toba T., Itoh T., Kumano N., Adachi S. and Yamaguchi T., 1991.** Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, "viili". *Anim. Sci. Technol.*, 62, 277-283.
- Kitazawa H., Yamaguchi T., Miura M., Saito T & Itoh H., 1993.** B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* isolated from ropy sour milk, viili. *J. Dairy. Sci.* 76, 1514-1519.
- Kitazawa H., Itoh T., Tomioka Y., Mizagaki M. and Yamaguchi T., 1996.** Induction of IFN-gamma and IL-1alpha production in macrophages stimulates with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Int. J. Food Microbiol.*, 31, 99-106.

- Kitazawa H., Harata T., Uemura J., Saito T., Kaneko T. and Itoh T., 1998.** Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 169-175
- Klaenhammer T. R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol., Rev.*, 12, 39-86.
- Kleerebezem M., Van Kranenburg R., Tuinier R., Boels I. C., Zoon P., Looijesteijn E., Hugenholtz J. and De vos W. M., 1999.** Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* : from genetic engineering to improved rheological properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 357-365.
- Kong S. and Davison A. J., 1980.** The role of interactions between O₂, H₂, OH, e⁻ and O₂⁻, in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, 204, 13-29.
- Konings W. N., Kuipers O. P. and Huis In' Veld J. H. J., 1999.** Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 1-4.
- Kurmann J. A., 1994.** The production of fermented milk in the world: aspects of the production of fermented milks. *Int. Dairy Federation Bull.*, 179, 16-26.
- Lamothe G. T., 2000.** *Molecular characterisation of exopolysaccharide biosynthesis by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.* Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, 164 p.
- Leigh J.A. and Coplin D.L., 1992.** Exopolysaccharides in Plant-Bacterial *Interactions Annual Review of Microbiology*, 46, 307p.
- Lemoine J., Chirat F., Wieruszkeski J.M., Strecker G., Favre N. and Neeser J. R., 1997.** Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi39 and Sfi12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3512-3518.
- Liao C.C., Yuosef A.E., Chism E.R., Richter E. R., 1994.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* in buffer culture media and foods by lacidin A, a bacteriocin produced by *Lb. acidophilus* OSU 133. *J. Food Safety*, 14, 87-101.
- Looijesteijn P. J., Boels L. C., Kleerebezem M. L and Hugenholtz J., 1999.** Regulation of Exopolysaccharide Production by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* by the Sugar Source. *Applied and Env. Microbiol.* 65, 5003-5008.
- Looijesteijn P. J., Trapet L., De Vries E. Abee Tjakko and Hugenholtz J., 2001.** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. of Food Microbiol.*, 64, 71-80.

- Macedo M.G., 2001.** *Étude de la production d'exopolysaccharides par Lactobacillus rhamnosus RW-9595M dans un milieu à base de perméat de lactosérumpages.* Thèse Ph.D. *Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation.* Université Laval, Québec, PQ, Canada.
- Manca de Nadra M. C. , Strasser de Saad A. M.,Pesce de Ruiz Holgado A. A. and Oliver G. , 1985.** Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft*, 40, 409-411.
- Mann G.V. and Spoerry A., 1974.** Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 353-359. 23.
- Marmur J.,1961.A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218.
- Marshall V.M., Cowie E.N. and Moreton R.S., 1995.** Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* LC330. *J. of Dairy Research*, 62, 621-628.
- Marteau P. and Rambaud J. C., 1998.** Probiotiques en gastroentérologie : bases rationnelles, effets démontrés et perspectives. *Hepato-Gastro*, 5, 1-9.
- Marteau P. R., De Vrese M., Cellier C. J., and Schrezenmeir J., 2001.** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutri.* , 73, 430-436.
- Meydani S.H. and Ha W.K., 2000.** Immunologic effects of yogurt. *Am.J. Clin. Nutr.*, 71, 861-872.
- Moschetti G., Blaiotta G., Villani F., Coppola S., 2000.** Specific Detection of *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* with DNA Primers Identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl. and Env. Microbiol.*, 66, 422-424.
- Nagaoka M., Hashimoto S., Watanabe T., Yokokura T. and Mori Y., 1994.** Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol., Pharm., Bull.*, 17, 1012-1017.
- Nakajima H., Toyoda S. , Toba T. , Itoh T. , Mukai T. , Kitazawa H. and Adachi S.,1990.** A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis ssp.cremoris* SBT 0495. *J.Dairy Sci.*, 73, 1472-1477.
- Nakajima H., Hirota T., Toba T., Itoth T., Adachi S., 1992.** Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis subsp. cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Res.*, 224, 245-253.
- Nettles C.G. and Barefoot S.F., 1993.** Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 56, 338-356.

- Novel G., 1993.** Les bactéries lactiques. In : Leveau J.Y., Bouix M (éds). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel Paris: Tec & Doc, pp.169-374.
- Orla-Jensen S.** The lactic acid bacteria. Host A.F.& Son Ed. Copenhagen.
- Ouwehand A.C., 1998** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In : Salminen S., Von Wright A. Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects, 2 nd edition, 139-159. Marcel Dekker Inc., New York
- Oyetayo V. O., Adetuyi F. C., Akinyosoye F.A., 20003.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr.J. of Biotechnol.*, 2, 448-452.
- Oyewole O. B., 1997.** Lactic fermented food in Africa and their benefits. *Food control*, 8, 289-297.
- Petit C., Grill J. P., Maazouzi N. and Marczak R., 1991.** Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fedbatch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36 , 216-221.
- Piard J.C. and Desmazeaud M., 1991.** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1.Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 525-541.
- Piard J. C. and Desmazeaud M., 1992.** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113-142.
- Price R.J. and Lee J.S., 1970.** Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Technol.*, 33, 13-18.
- Ramos A., Boels I. C., De Vos Willem M. and Santos H., 2001.** Relationship between Glycolysis and Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environ. Microbiol.*, 67, 34-41.
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. and Zoon P., 2002.** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 163-171.
- Sanders M.E., 1993.** Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. *J. Dairy Sci.*, 76, 19-28.
- Sanni A.I., Onilude A.A., Ogunbanwo S.T. and Smith S.I. , 1999.** Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from Ogi , an indigenous fermented food. *J. Basic Microbiol.*, 39 , 189-195.
- Savadogo A., Ouattara C.A.T., Ouattara A. S. et Traoré A. S. 2001.** Isolement et Caractérisation de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides à partir de laits du Burkina Faso. *Revue Sci. et Tech., Séries Sci. Nat. et Agro.*, 25 (2), 75-85.

- Schleifer H. K., 1986.** *Gram-Positive cocci. Bergey's manual of systematic bacteriology*, 999-1080.
- Schleifer K. H. and Ludwig W., 1995.** Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: *The genera of lactic acid bacteria*. Wood B. J. B., Holzapfel W. H. (eds). Glasgow: Blackie Academic and Professional, pp.7-18.
- Schopf J. W., 1999.** Metabolic memories of the earliest cells in: Schopf J.W. (ed) *Cradle of life. The discovery of Earth's earliest fossils*. Princeton, *University Press*. Princeton, New Jersey, USA, pp.139-163.
- Sedmack J. J. and Grossberg S E, 1997.** A rapid sensitive assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry*, 76, 544-552.
- Sholeva Z., Stefanova S. and Chipeva V., 1998.** Screening of antimicrobial activities among Bulgarian lactobacilli strains. *Journal of Culture Collections*, 2, 15-20.
- Simakachorn N., Pichaipat V., Rithipornpaisarn P., Kongkaew C., Tongpradit P. and Varavithya W., 2000.** Clinical evaluation of the addition of lyophilised, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* , 30, 68-72.
- Singleton P., 1994.** *Bactériologie*. Masson, 2è édition, 231 p.
- Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M. and Cescutti P., 1999.** Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. of Food Microbiol.*, 51, 105-111.
- Solis B., Samartin S., Gomez S., Nova E., De la Rosa B. and Marcos A., 2002.** Probiotics as a help in children suffering from malnutrition and diarrhoea. *European J. Clin. Nutr.*, 56, 57-59.
- Soomro A. H., Masud T. and Anwaar Kiran, 2002.** Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and Human health. A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.
- Stiles M. and Holzapfel, 1997.** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 26, 1-29.
- Stingle F, Neeser JR and Mollet B, 1996.** Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.*, 178, 1680-1690.
- Sutherland I. W., 1972.** Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, 8, 143-212.

- Sutherland I. W. ,1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnological Advances*, 12, 393-448.
- Tagg J R, Dajani A S and Wannamaker L.,1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
- Tailliez P., 2001. Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, 81, 1-11.
- Talarico T. L. and Dobrogosz W.J., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents chemother*, 33, 674-679.
- Tamime AY, Marshall VME and Robinson RK., 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J Dairy Res.*, 62, 151-87.
- Tilsala-Timisjarvi A. and Alatossava T., 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 35, 49-56.
- Topisirovic L., 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei CG11* and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3914-3919.
- Van den Berg D. J. C., Robijn G. W., Janssen A. C., Giuseppin M. L. F., Vreeker R., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G., Ledebouer A. M. and Verrips C. T., 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake 0-1* and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2840-2844.
- Van den Bergh P. A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 221-238.
- Van Kranenburg R., Marugg J.D, Van S. II, Willem N. J. and De vos W. M., 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, 24 : 387-397.
- Van Kranenburg R., Van Swam I. I. , Marugg J. D., Kleerebezem M. and De vos W. M., 1999a. Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40 : functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *J. Bacteriol.*, 181, 338-340.
- Van Kranenburg R., Vos H. R., Van S II, Kleerebezem M. and De vos W. M., 1999b. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.* 181, 6347-6353.
- Van Niel J W E and Hahn-Hagerdal, 1999. Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 52, 617-627.

- Walling E., Gindreau E. et Lonvaud-Funel A., 2001.** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point d'outils moléculaires de détection. *Lait*, 81, 289-300.
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K. and Alatosava T., 2000.** Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and species-Specific PCR Primers. *Applied and Env. Microbiol.*, 66, 297-303.
- Weiner R., Langille S. and Quintero E., 1995.** Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J. Ind. Microbiol.*, 15, 339-346.
- Whitfield C., 1988.** Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.*, 34, 415-420.
- Whitfield C. and Valvano M. A., 1993.** Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 35, 135-246.
- Wood B. J. B., Holzapfel W. H., 1995.** *The genera of lactic acid bacteria. Blackil Academic and Professional*, 398 p.
- Wood B.J.B., 1992.** The lactic acid bacteria. Vol. I. The lactic acid bacteria in health and disease. London, New York: *Elsevier Applied Science*, 485 p.
- Yang Z., 2000.** *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties.* Academic dissertation, department of food technology, University of Helsinki, 1-61.
- Yodoamijoyo R. M., Tirza Z., Herastuti S. R., Tomomatsu A., Matsuyama A. and Hosono, A., 1983.** Microbiological aspects of Dadih in Indonesia. *J. Dairy Food Sci.*, 32, 7-14.
- Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R. and Boccio J. 2001.** Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Res.*, 21, 569-579.
- Zvauya R., Mygochi T. and Parawira W, 1997.** Microbial and biochemical changes occurring during production of masvusvu and mangisi, traditional Zimbabwean beverages. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51, 43-51.

RESUME

Les bactéries lactiques sont largement impliquées dans la production des produits laitiers fermentés et les produits fermentés en général du fait de leurs activités métaboliques particulières, qui confèrent aux produits leurs caractéristiques texturales, organoleptiques et de conservation. Certains de ces microorganismes produisent des exopolysaccharides (EPS) importants dans l'alimentation et en santé.

Ce travail de thèse rapporte l'isolement, la caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactiques productrices à partir d'échantillons de lait du Burkina Faso. Plusieurs genres de bactéries lactiques ont été isolés, il s'agit principalement de *Lactobacillus*, de *Streptococcus*, de *Leuconostoc* et de *Pediococcus*. Ces résultats montrent une diversité de genres de bactéries lactiques qui participent à la flore des laits fermentés du Burkina Faso. Le genre *Lactobacillus* est dominant dans nos échantillons.

La production d'exopolysaccharides par les souches isolées et caractérisées variait entre 181mg/l et 814 mg /l.

Les monomères saccharidiques identifiés dans ces exopolysaccharides sont le glucose, le galactose et le rhamnose.

Certaines de ces souches productrices d'exopolysaccharides ont donné des bactériocines capables d'inhiber des souches pathogènes de références (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*).

L'ensemble de nos souches ont donné une acidification assez bonne avec différentes sources de carbone.

ABSTRACT

The lactic acid bacteria are largely implied in the production of the fermented dairy products and the products in general fermented because of their particular metabolic activities, which gave products their textural, organoleptic and of conservation characteristics. Some of these microorganisms produce exopolysaccharides (EPS) important in human alimentation and health.

This thesis work deal with isolation, biochemical and molecular characterization of the producing lactic acid bacteria from Burkina Faso milk samples. Several kinds of lactic bacteria genera were isolated, it was principally *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. These results show a diversity of lactic acid bacteria genera which take part in the Burkina Faso fermented milk samples flora. The *Lactobacillus* genus was dominant in our samples.

The exopolysaccharides production by the characterized strains varied between 181mg/l and 814 mg/l the saccharidic monomer identified in these exopolysaccharides are glucose, galactose and rhamnose.

Some of these exopolysaccharides producing strains gave bacteriocin able to inhibit pathogenic references strains (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*). All of strains gave a rather good acidification with various sources of carbon.