

N° d'ordre : 418

50376
1989
251

50376
1989
251

THÈSE

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Thierry DOCO



**LES EXOPOLYSACCHARIDES DES
BACTERIES LACTIQUES :**
**ISOLEMENT, STRUCTURE ET PROPRIETES DE
L'EXOPOLYSACCHARIDE EXCRETE DANS UN MILIEU LACTE
PAR *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS***



030 024132 8

Présentée le 25 Septembre 1989 devant la Commission d'Examen

Président :	J.	MONTREUIL
Rapporteur :	J.F.	THIBAUT
Rapporteur :	G.	STRECKER
Examineur :	A.	LOONES
Examineur :	P.	RAMOS
Examineur :	B.	FOURNET

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur B. FOURNET, dans le laboratoire de Chimie Biologique de L'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Mixte du CNRS n°111 : Relations structure-fonctions des constituants membranaires. Directeur : Monsieur le Professeur J. MONTREUIL).

A Hélène,

A mes Parents.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, où j'ai pu réaliser ce travail. Malgré vos nombreuses occupations, vous me faites l'insigne honneur de présider le jury de cette thèse.

Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur B. FOURNET,

Qu'il me soit permis de vous remercier de m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche. Au cours de ces années de travail, votre expérience et votre optimisme, l'ambiance chaleureuse et la bonne humeur que vous faites régner m'ont permis de mener à bien mes travaux.

Je tiens à vous en remercier encore et vous assurer de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur A. LOONES,

Je voudrais vous remercier vivement de m'avoir proposé ce travail et de m'avoir permis de le mener à bien. Au cours de mes passages au Centre International de Recherche, j'ai pu apprécier votre dynamisme, votre compétence scientifique et la chaleur de votre accueil.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur J.F. THIBAUT,

Vous avez accepté avec beaucoup d'amabilité de juger ce travail, en prenant la responsabilité d'être rapporteur. Je vous en suis très reconnaissant et je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements.

A Monsieur G. STRECKER,

Ta présence dans ce jury témoigne de l'intérêt que tu as bien voulu accorder à mes recherches. Je t'en suis reconnaissant et je tiens à t'exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

A Madame P. RAMOS,

Je vous remercie de m'avoir proposé ce travail et d'avoir bien voulu nous accorder votre confiance. Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements vont également à tout le 107 : **Calliope, Ossarath, Yves, Tim, P'tit Thierry, Franck, Zhu**, et aux deux petits derniers **Odile et Jérôme**, pour m'avoir supporté le temps d'un DEA et d'une thèse. Je tiens à leur exprimer ma plus vive amitié.

Mes remerciements s'adressent également à **Catherine** pour ses conseils et sa disponibilité permanente. Je t'en remercie beaucoup.

J'adresse mes remerciements à **Madame CELEN** pour son aide au cours de ces quatre années passées au Cg.

Merci à **Jacqueline et Jeannine** pour leur aide et leur sourire.

Que tous ceux qui ont contribué à ce travail soient assurés de ma reconnaissance la plus sincère.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

<u>I. LE YAOURT BRASSE.</u>	4
<u>A. INTRODUCTION.</u>	4
<u>B. DEFINITION LEGALE DU YAOURT EN FRANCE.</u>	5
<u>C. PROCEDE DE FABRICATION DU YAOURT BRASSE.</u>	6
<u>D. ELEMENTS STRUCTURAUX INTERVENANT DANS LA TEXTURE DU YAOURT.</u>	8
<u>E. ASPECT NUTRITIONNEL ET THERAPEUTIQUE DU YAOURT.</u>	9
1. <u>Contenu nutritif des produits renfermant des cultures</u> <u>de micro-organismes.</u>	9
2. <u>Effets thérapeutiques des bactéries lactiques.</u>	12
a) <i>Production d'antibiotiques.</i>	12
b) <i>Effets antitumoraux.</i>	14

<u>II. LES BACTERIES LACTIQUES.</u>	17
<u>A. INTRODUCTION.</u>	17
<u>B. STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.</u>	17
1. <u>Morphologie.</u>	17
2. <u>Caractères nutritionnels et physiologiques.</u>	18
<u>C. LACTOBACILLUS BULGARICUS.</u>	18
1. <u>Morphologie.</u>	18
2. <u>Caractères nutritionnels, physiologiques et biochimiques.</u>	18
<u>D. L'ASSOCIATION STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS ET LACTOBACILLUS BULGARICUS.</u>	20
<u>III. LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS.</u>	23
<u>A. INTRODUCTION.</u>	23
<u>B. LES ENVELOPPES BACTERIENNES.</u>	24
<u>C. COMPOSITION ET STRUCTURE DES POLYSACCHARIDES.</u>	25
1. <u>Composition chimique.</u>	25
2. <u>Structure primaire des exopolysaccharides.</u>	28

<u>D. BIOSYNTHESE ET EXTRACTION DES POLYSACCHARIDES.</u>	33
1. <u>Biosynthèse extracellulaire.</u>	33
2. <u>Biosynthèse intracellulaire.</u>	34
3. <u>Autres systèmes de biosynthèse.</u>	40
4. <u>Contrôle et régulation de la biosynthèse.</u>	40
<u>E. ROLE DES EXOPOLYSACCHARIDES.</u>	42
1. <u>Barrière générale.</u>	42
2. <u>Interactions ioniques.</u>	43
3. <u>Rôle de reconnaissance.</u>	43
4. <u>Rôle dans l'absorption.</u>	44
5. <u>Importance des polysaccharides dans la virulence des bactéries.</u>	45
6. <u>Rôle dans l'adsorption des bactériophages.</u>	45
<u>IV. LES POLYSACCHARIDES DES BACTERIES LACTIQUES.</u>	47
<u>A. INTRODUCTION.</u>	47
<u>B. POLYSACCHARIDE DE LACTOBACILLUS BULGARICUS.</u>	48
<u>C. POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.</u>	50

TRAVAUX PERSONNELS

<u>I. ISOLEMENT ET STRUCTURE DU POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</u>	56
<u>A. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE.</u>	56
<u>B. ETUDE STRUCTURALE DU POLYSACCHARIDE EXTRAIT DU YAOURT.</u>	57
<u>II. IDENTIFICATION, DOSAGE ET PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</u>	80
<u>A. IDENTIFICATION PAR HPLC DU POLYSACCHARIDE</u>	80
<u>B. ETUDE DES RELATIONS ENTRE QUANTITE DE POLYSACCHARIDES EXCRETES PAR STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS ET POUVOIR TEXTURANT.</u>	91
1. <u>Matériels</u>	92
2. <u>Préparation de l'échantillon et chromatographie liquide haute pression.</u>	92
3. <u>Résultats</u>	93
<u>C. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS EXTRAIT DU YAOURT</u>	96
1. <u>Méthodes d'obtention du polysaccharide.</u>	96

2. <u>Détermination de ses propriétés texturantes dans</u>	
<u>un solvant aqueux</u>	96
a. <u>Matériels.</u>	97
b. <u>Résultats.</u>	99
c. <u>Conclusions.</u>	99
3. <u>Détermination de ses propriétés texturantes dans</u>	
<u>un yaourt à boire</u>	102
a. <u>Matériels.</u>	102
b. <u>Résultats.</u>	103
c. <u>Conclusions.</u>	103
<u>D. CONCLUSIONS.</u>	103
<u>III. MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ISOLEMENT EN GRANDE</u>	
<u>QUANTITE DU POLYSACCHARIDE EXCRETE DANS LE MILIEU</u>	
<u>LACTE PAR STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.</u>	106
<u>IV. MISE EN EVIDENCE DE PROPRIETES ANTITUMORALES DU</u>	
<u>POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</u>	111
1. <u>Matériels.</u>	112
2. <u>Discussion.</u>	115

CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES ABREVIATIONS

HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance
L.	: <i>Lactobacillus</i>
Glc.	: Glucose
Gal	: Galactose
GalNAc	: N-Acétylgalactosamine
GlcA	: Acide Glucuronique
Man	: Mannose
Fru	: Fructose
Rha	: Rhamnose
Ara	: Arabinose
Xyl	: Xylose
PEP	: Phospho-énol-pyruvate
PYR	: Pyruvate
Kb	: KiloBase
DNA	: Acide désoxyribonucléique
mPa.s	: millipascal par seconde
µ g	: microgramme
mg	: milligramme
UV	: Ultraviolet
Cp	: Centipoise
C	: Cellule
dl/g	: decilitre par gramme

I N T R O D U C T I O N

Certaines bactéries, organismes vivants présents dans un grand nombre de milieux naturels, ont la propriété de synthétiser une capsule de nature polysaccharidique. L'intérêt de ces polymères n'est plus à démontrer. En effet, certains exopolysaccharides présentent des propriétés particulières de viscosité qui en font des substances de choix pour des applications industrielles diverses.

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique utilisée dans l'industrie laitière en association avec *Lactobacillus bulgaricus* dans la fabrication du yaourt. A ce titre, nos travaux, réalisés en collaboration avec le Centre de Recherche International SODIMA, entrent dans le cadre d'une recherche sur l'amélioration de la qualité des yaourts et, en particulier, l'étude des facteurs influençant la texture de ces derniers.

Parmi ces facteurs, la production et la structure des exopolysaccharides excrétés par les bactéries lactiques dans le milieu interviennent dans la texture du coagulum à la fin de la fermentation. C'est ainsi que certaines souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* possèdent des caractères épaississants marqués.

L'objectif de ce travail concerne donc la connaissance des macromolécules glucidiques excrétées par les bactéries lactiques, en particulier *Streptococcus thermophilus* cultivé sur milieu lacté, responsable du caractère épaississant, voire filant du yaourt.

Après avoir résumé l'état actuel de nos connaissances dans le chapitre "généralités", sur le yaourt, les bactéries lactiques, les polysaccharides bactériens et, plus particulièrement, sur les polysaccharides excrétés par les bactéries lactiques, nous avons développé notre étude en quatre points:

- Dans un premier chapitre, nous décrivons l'isolement et la structure primaire du polysaccharide excrété par *Streptococcus thermophilus* sur milieu lacté. Cette première étude biochimique a nécessité l'utilisation des techniques fines de séquençage des monosaccharides, en particulier la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

- Dans un second chapitre, nous avons étudié les propriétés du polysaccharide comme agent texturant du yaourt. Ce travail a pu être mené grâce à la mise au point d'une technique rapide de dosage des polysaccharides dans le yaourt.

- La nécessité de produire de grandes quantités de polysaccharides à partir de *Streptococcus thermophilus* ensemencé sur lait pour les études rhéologiques et pharmacologiques nous a conduit à décrire, dans un troisième chapitre, une méthode d'hydrolyse en continu des protéines du lait à l'aide d'un réacteur enzymatique couplé à des membranes d'ultrafiltration, qui permet la concentration des macromolécules.

- Enfin, nous présentons dans un dernier chapitre les premiers résultats concernant les propriétés antitumorales de l'hydrocolloïde excrété par *Streptococcus thermophilus*.

Ces travaux ont fait l'objet

I. Des brevets suivants:

1- Procédé d'épaississement d'un produit de type lait fermenté notamment de yaourt et nouveau polysaccharides utile pour la mise en oeuvre de ce procédé.

INVENTION: T. DOCO; B. FOURNET; D. CARCANO; P. RAMOS and A. LOONES.

BREVET n°8802405, 26 février 1988.

2- Polysaccharide, application comme agent épaississant et comme agent antitumoral.

INVENTION: T. DOCO; J.M. PIOT; D. GUILLOCHON; D. CARCANO; P. RAMOS; A. LOONES and B FOURNET.

BREVET EUROPEEN n° 89400525.5, 24 février 1989.

II. Des publications suivantes:

Article 1:

STRUCTURE OF EXOCELLULAR POLYSACCHARIDE PRODUCED BY *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*.

T. DOCO; J.M. WIERUSZESKI et B. FOURNET.

D. CARCANO; P. RAMOS et A. LOONES.

Accepté à *Carbohydrate Research*.

Article 2:

RAPID ISOLATION AND ESTIMATION OF POLYSACCHARIDE FROM FERMENTED MILK WITH *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* BY COUPLED ANION EXCHANGE AND GEL-PERMEATION HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

T. DOCO and B. FOURNET.

D. CARCANO; P. RAMOS and A. LOONES.

Soumis à *Journal of Dairy Research*.

Article 3:

PREPARATION OF POLYSACCHARIDE FROM *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* BY AN ENZYMATIC ULTRAFILTRATION REACTOR.

T. DOCO; J.M. PIOT; D. GUILLOCHON; D. CARCANO; P. RAMOS; A. LOONES and B FOURNET.

Accepté à *Biotechnology Technics*.

G E N E R A L I T E S

I. LE YAOURT BRASSE.

A. INTRODUCTION.

Depuis la dernière guerre mondiale, le yaourt a connu un remarquable essor industriel et commercial et il apparaît comme un élément extrêmement intéressant. En effet, à travers une gamme très variée de produits permettant aux consommateurs de satisfaire leurs goûts et leurs désirs de diversité, il constitue, avec le lait, une des meilleures sources de protéines d'excellente qualité et de calcium.

Bien que le yaourt soit un lait fermenté dont la préparation semble à première vue assez simple, la fabrication industrielle de ce produit n'est pas sans poser de problèmes : le yaourt est un produit laitier frais, fermenté et vivant. L'acidification du lait résulte généralement de l'action de deux bactéries lactiques: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

De ce fait, les caractéristiques technologiques peuvent varier grandement d'une souche à une autre à l'intérieur d'une espèce donnée. La principale préoccupation des industriels est d'obtenir régulièrement un produit de bonne qualité. Cet objectif implique un ajustement judicieux, de la qualité du lait mis en oeuvre, des propriétés des cultures bactériennes utilisées et de la technique de fabrication.

Ces différents facteurs affectent à des degrés divers le déroulement de la fermentation.

De nombreuses études ont été consacrées aux yaourts et elles témoignent bien de l'intérêt que suscite ce produit. Nous ne décrirons pas ici tous les composants structuraux intervenant dans le yaourt, mais nous en développerons certains jouant un rôle important dans l'épaississement ou la viscosité des laits fermentés.

B. DEFINITION LEGALE DU YAOURT EN FRANCE.

Selon la réglementation française, la dénomination yaourt ou yoghourt est réservée au lait coagulé obtenu par la fermentation lactique acide due à *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* ensemencés simultanément. Les micro-organismes doivent se trouver vivants et abondants dans le produit final (10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée) qui, au moment de la vente aux consommateurs, ne doit pas contenir moins de 0,7 g d'acide lactique pour 100 g.

Le lait de départ peut être partiellement ou totalement écrémé, plus ou moins concentré par évaporation ou par addition de lait en poudre. Les produits suivants peuvent être ajoutés à diverses étapes de la fabrication: sucres (saccharose), matières colorantes naturelles autorisées, pulpes ou jus de fruits, miel ou confiture, à la condition que le lait fermenté proprement dit entre au moins dans une proportion de 70 % en poids du produit mis en vente. Les divers yaourts consommés en France peuvent être regroupés et classés de la façon suivante:

- yaourt ferme.
- yaourt brassé.
- yaourt liquide ou à boire.

Ces trois types existent en version nature, aromatisés ou aux fruits. Dans le 1^{er} cas, la fermentation a lieu dans le pot qui va être commercialisé, les 2 autres types de yaourts sont fabriqués en cuves. (Dehoves, 1981).

C. PROCEDE DE FABRICATION DU YAOURT BRASSE.

Deux ouvrages sur l'origine, la diversité des procédés de fabrication et des produits laitiers font référence dans l'industrie laitière. (Rasic et Kurman, 1978; Tanime et Robinson, 1985).

Le diagramme de production du yaourt brassé présenté sur la Figure 1 p.7 est tiré du second (Tanime et Robinson, 1985).

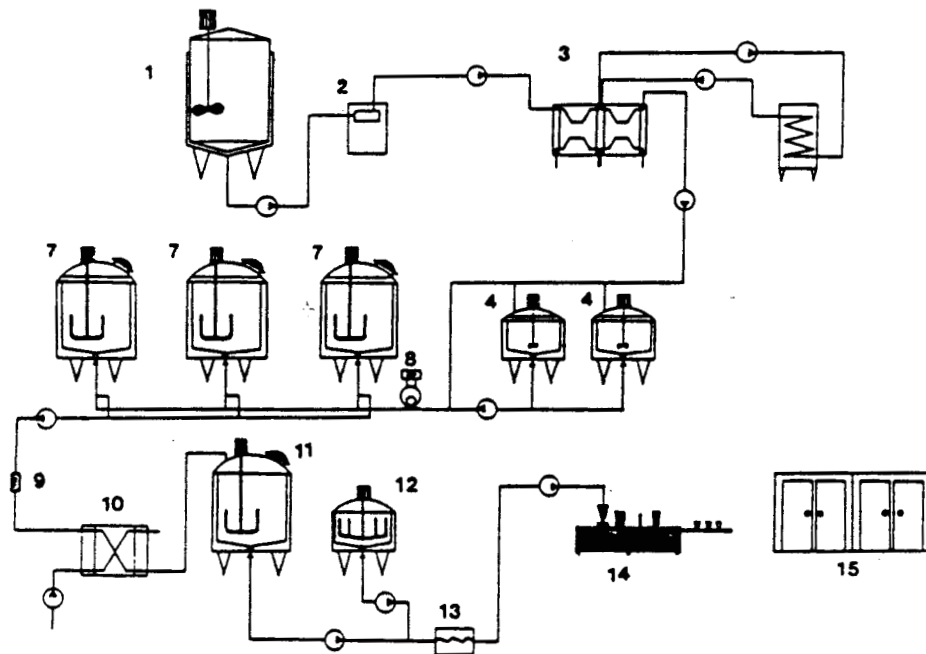
La production peut être divisée en trois grandes étapes (Carcano, 1988):

- La préparation des matières premières et leur traitement avant fermentation.

- La phase de fermentation en cuve après ensemencement par les bactéries lactiques.

- Les opérations technologiques post-fermentaires de brassage, soutirage, prérefroidissement puis stockage.

Le yaourt ainsi obtenu est destiné à la vente aux consommateurs.



1. Cuve de Préparation de la base laitière.
2. Homogénéisateur.
3. Pasteurisateur à plaques.
4. Cuve de levains.
7. Cuves de Fermentation du yaourt.
8. Pompe.
9. Filtre (pour éliminer les grains de caillé).
10. Refroidisseur à plaque.
11. Cuve de stockage du yaourt.
12. Cuve de stockage des fruits.
13. Mélangeur statique.
14. Machine de conditionnement.
15. Tunnel de refroidissement et chambres froides.

FIGURE 1 : SCHEMA DE PRODUCTION DU YAOURT BRASSE
modifié d'après TAMIME et ROBINSON, 1984,

D. ELEMENTS STRUCTURAUX INTERVENANT DANS LA TEXTURE DU YAOURT.

Il faut rappeler que le yaourt est un produit laitier frais, fermenté et vivant. Il est constitué par les protéines du lait, des lipides, des glucides dont le lactose, et l'association Streptocoques/Lactobacilles. **Favier (1987)** a réalisé une étude complète sur la composition biochimique des yaourts. (TABLEAU I p. 9).

Des études récentes par microscopie électronique de balayage sur du yaourt ont montré une production de polysaccharides par *Streptococcus thermophilus* (**Schellhaas, 1983; Gancel, 1988**) et par *Lactobacillus bulgaricus* (**Schellhaas, 1983; Bottazi et Bianchi, 1986**). Les Streptocoques s'assemblent en masses sphériques tandis que les Lactobacilles forment de longs filaments.

Ces microcolonies de bactéries lactiques sont entourées d'espaces vides (**Bottazi et Bianchi, 1986**). **Schellhaas (1983)** a montré que les polysaccharides de paroi des bactéries lactiques s'attachaient aux protéines et plus particulièrement aux caséines.

Tous ces éléments forment un réseau tridimensionnel qui définit la texture du yaourt et son onctuosité.

En ce qui concerne l'onctuosité du yaourt, il apparaît que celle-ci peut être améliorée par l'utilisation de certaines souches qualifiées d'épaississantes ou de "filantes" (**Galesloot et Hassing, 1973; Chalet-Wagner, 1979**).

TABLEAU I: Composition pour 100 g de yaourt d'après Favier., 1987.

	Yaourt nature au lait entier	Yaourt nature maigre
Matière sèche (g)	12,1 - 18,9	9,5 - 14,8
Protéines (g) (Nx6,38)	3,3 - 5,0	3,5 - 5,7
Lipides (g)	3,1 - 4,1	tr - 0,5
Glucides exprimés en monosaccharides	4,5 - 4,9	4,8 - 7,7
Acide lactique (g)	0,7 - 1	1
Sodium (mg)	40 - 62	48 - 76
Potassium (mg)	144 - 190	171 - 255
Calcium (mg)	107 - 150	121 - 199
Magnésium (mg)	9 - 16	11 - 19
Phosphate (mg)	63 - 135	75 - 156
Fer (mg)	0,03 - 0,07	0,07 - 0,16
Cuivre (mg)	0 - 0,03	0,1
Zinc (mg)	0,21 - 0,59	0,64 - 0,83
Manganèse (µg)	1,3 - 4,0	-

La texture est le facteur posant le plus de problèmes en fabrication, compte-tenu de l'inexistence de capteurs fonctionnels permettant de l'apprécier. L'évaluation de la texture du yaourt brassé repose actuellement sur la mesure de la viscosité selon "Brookfield" (Carcano, 1988). Nous essaierons d'apporter d'autres éléments de réponse concernant la texture en étudiant les bactéries lactiques et leurs polysaccharides.

E. ASPECT NUTRITIONNEL ET THERAPEUTIQUE DU YAOURT.

Depuis que **Metchnikoff** a recommandé, en 1908, la consommation de lait fermenté par des Lactobacilles capables de vivre dans l'intestin grêle, en affirmant qu'un tel lait avait des effets bénéfiques sur la santé, les fondements scientifiques de cette affirmation n'ont cessé d'être controversés.

Cependant, les produits laitiers renfermant des cultures de micro-organismes connaissent toujours une grande popularité et sont, d'une manière générale, considérés comme "bons pour la santé".

1. Contenu nutritif des produits renfermant des cultures de micro-organismes.

Blanc (1981) a résumé comme suit les propriétés nutritionnelles et physiologiques des produits laitiers renfermant des cultures de micro-organismes vivants:

- La digestibilité et l'assimilation des protéines sont améliorées en raison de l'activité protéolytique des micro-organismes (Ayebo et Shahani, 1980; Alm, 1983).

- Une fine coagulation de la caséine améliore elle aussi la digestibilité (Friend et Shahani, 1984a).

- L'abaissement du pH dans l'estomac permet d'atteindre une valeur favorisant la digestion des protéines.

- Une réduction des réactions allergiques aux protéines natives est observée (Lee et Lorenz, 1979).

- Une diminution du taux de cholestérol chez des sujets ayant une alimentation à base de yaourt (Hepner et al., 1972).

- Une prédigestion du lactose par les micro-organismes (notamment *Lactobacillus bulgaricus*), le yaourt étant alors le seul aliment laitier toléré par les personnes présentant une malabsorption au lactose (Kilara et Shahani, 1976).

- Les sécrétions digestives telles salive, acides biliaires, sucs gastriques et pancréatiques sont accélérées.

- L'assimilation de calcium, de phosphates et de fer est améliorée par comparaison avec le lait.

- La quantité de vitamines hydrosolubles (B1, B2, B6, Folate...) est accrue.

La plupart des propriétés énumérées sauf l'absorption du lactose et des vitamines, resteront valables pour des produits qui subissent un chauffage après fermentation.

2. Effets thérapeutiques des bactéries lactiques.

a) Production d'antibiotiques.

Les lactobacilles synthétisent un certain nombre de substances antibactériennes comme l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide benzoïque ou encore le peroxyde d'hydrogène.

Des antibiotiques naturels associés aux lactobacilles ont été aussi identifiés (TABLEAU II p. 13)(**Friend et Shahani, 1984b**). Ces mêmes auteurs ont isolé par extraction méthanolique et acétonique suivie de chromatographie sur gel de silice, l'acidophiline de *Lactobacillus acidophilus* et le bulgaricane de *Lactobacillus bulgaricus*. Les deux antibiotiques possèdent un large spectre d'activité antibactérien contre de nombreux germes pathogènes.

Des substances antibactériennes ont également été extraites à partir de lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* (**Pulusani et al., 1979**).

TABLEAU II: Antibiotiques naturels produits par des lactobacilles.

Culture	Composé	Référence
<i>L. acidophilus</i>	Acidoline	Handam et Milolajcik., 1974.
	Acidophiline	Shahani <i>et al.</i> , 1977.
	Lactocidine	Vincent <i>et al.</i> , 1959.
<i>L. brevis</i>	Lactobacilline, (H ₂ O ₂)	Wheater <i>et al.</i> , 1951; 1952.
	Lactobrevine	Kavasnikov et Sodenko., 1967.
<i>L. bulgaricus</i>	Bulgaricane	Reddy <i>et al.</i> , 1983a.
<i>L. plantarum</i>	Lactoline	Kodama., 1952.

b) Effets antitumoraux.

Bogdanov et son équipe (1975; 1978) ont été parmi les premiers à observer que *Lactobacillus bulgaricus* possédait une activité antitumorale. Ces auteurs isolent d'une préparation brute de *Lactobacillus bulgaricus* un ensemble de glycopeptides appelés Blastolysine (**Bogdanov et al.**, 1978) possédant une activité antitumorale sur des tumeurs implantées chez la Souris, en particulier le Sarcome 180. Ces glycopeptides ont été purifiés (**Bogdanov et al.**, 1975) et trois fractions ont été obtenues par chromatographie de gel filtration sur Séphadex. Ces glycopeptides sont des fragments de peptidoglycannes de masse moléculaire comprise entre 1000 et 10.000.

Hormis les articles de **Bogdanov et al.** (1975; 1978) la plupart des travaux proviennent du Laboratoire de **Shahani** aux Etats Unis.

Dès 1973, **Reddy et al.** signalaient une diminution du développement de cellules tumorales injectées à des Souris consommant du yaourt. Depuis, de nombreux travaux ont montré l'action antitumorale des bactéries lactiques de yaourts complets ou de certaines fractions isolées du yaourt (**Friend et al.**, 1982; **Shahani et al.**, 1983; **Reddy et al.**, 1983b; **Friend et Shahani**, 1984; **Bottazzi et al.**, 1985).

Généralement, le matériel utilisé par les auteurs consistait en des tumeurs de type Sarcomes 180 ou des tumeurs d'Ehrlich implantées chez la Souris.

Certains auteurs ont tenté d'isoler le principe actif (**Ayebo et al.**, 1981; 1982) par dialyse du yaourt et chromatographie d'échange

d'ions. Le dialysat et la fraction anionique montrent une activité inhibitrice de la prolifération des tumeurs d'ascites chez la Souris.

Cependant, les molécules contenues dans ces fractions actives n'ont pas été caractérisées. Les fractions isolées de lait fermenté par *Lactobacillus bulgaricus* ont une activité plus importante que celles isolées de lait fermenté par *Streptococcus thermophilus*. Dans tous ces cas l'activité disparaît lorsque les germes sont tués par la chaleur (Shahani et Chandan, 1979; Friend et al., 1982).

Kato et al. (1981; 1985) s'intéressent quant à eux à l'activité antitumorale de *Lactobacillus casei*. Ces auteurs montrent que cette activité antitumorale est réduite chez les Souris traitées par le carraghénane. Les auteurs concluent que l'activité antitumorale de *Lactobacillus casei* est macrophage-dépendante.

Tsuchiya et al. (1981) et Oda et al. (1983) décrivent l'isolement d'un polysaccharide (MPS 80) à partir de lait fermenté par *Lactobacillus yugurti* et par *Streptococcus thermophilus*. Celui-ci possède des propriétés rhéologiques de viscosité et produit les mêmes effets sur l'inhibition de la prolifération des tumeurs d'Ehrlich et du sarcome 180 implantés chez la Souris.

A la même époque, Shackelford et al. (1983) étudient l'effet d'une alimentation enrichie en lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sur le taux de mortalité de Rats présentant des tumeurs de colons induites par un agent chimique.

Les résultats montrent, d'une part, que le taux de mortalité diminue quand les Rats sont nourris avec du lait fermenté en particulier

avec *Streptococcus thermophilus* et, d'autre part, que ce traitement induit un déplacement des tumeurs du tractus digestif vers l'anus.

Kitazawa et al. (1988) démontre que l'injection par voie intrapéritonéale de lait fermenté par des variants de lactobacilles induit une inhibition du développement de tumeur implantée de type Sarcome 180 ainsi que du développement des métastases pulmonaires.

Comme **Kato et al. (1981; 1985)**, ils constatent que l'activité antitumorale est réduite par l'administration d'un agent antimacrophagique tel que le carraghénane.

Il apparaît, à la lecture des travaux sur les activités biologiques du lait fermenté, que celui ci possède de réelles propriétés antitumorales. Les molécules responsables de ces activités n'ont pas été clairement caractérisées. Les travaux les plus avancés sur ce point concernent, d'une part, l'isolement de glycopeptides, fragments de peptido-glycannes dont on connaît par ailleurs les propriétés immunostimulantes et, d'autre part, le polysaccharide MPS-80 de **Tsuchiya et al. (1981)** excrété par les bactéries lactiques dans le lait fermenté.

Il est à noter que de nombreux exopolysaccharides bactériens ou fongiques possèdent des activités antitumorales (**Wistler et al., 1976**). Il est donc possible que la ou les molécules responsables des activités antitumorales présentes dans le lait fermentés soient de nature glucidiques macromoléculaires.

II. LES BACTERIES LACTIQUES.

A. INTRODUCTION.

Depuis la plus haute antiquité l'Homme utilise des bactéries pour fermenter les produits laitiers. Seules quelques unes se sont révélées utilisables pour l'alimentation humaine. Elles appartiennent toutes aux groupes des bactéries lactiques (Orla-Jensen, 1919). La classification du "Bergey's Manual" distingue au sein de ce groupe la famille des Streptococceae constituée de coques et celle des Lactobacilleae, bactéries en forme de bâtonnets.

Dans le yaourt ou "yoghurt" les deux bactéries *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sont largement utilisées. Elles sont plutôt employées sous forme de culture mixte dont les rapports Streptocoques/Lactobacilles sont variés: le rapport 1 est considéré comme optimal pour le maintien d'un bon équilibre entre les deux espèces bactériennes (Pette et Lolkema; 1950).

B. STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.

1. Morphologie.

Streptococcus thermophilus, dont la niche écologique est limitée au lait, se présente sous la forme de cellules sphériques ou ovoïdes (0,7 à 0,9 nm de diamètres), en paires ou en longues chaînes, selon l'état physiologique de la culture (Hardie, 1986).

2. Caractères nutritionnels et physiologiques.

Ses principales caractéristiques sont résumées dans le TABLEAU III p. 19 (d'après Accolas, 1982, dans Terré, 1986). *Streptococcus thermophilus* présente un caractère thermophile (croissance entre 10° et 45°C) et une thermorésistance à 65°C pendant 30 min. Il s'agit d'une bactérie qui dégrade préférentiellement le lactose et le saccharose, mais attaque aussi le fructose et le glucose. Elle produit essentiellement du L-lactate de façon rapide mais limitée (acidité <90°C D). En outre *Streptococcus thermophilus* produit à partir de lactose de l'acide formique qui est utilisé par *Lactobacillus bulgaricus*.

C. LACTOBACILLUS BULGARICUS.

1. Morphologie.

Lactobacillus bulgaricus se présente sous la forme de bâtonnets courts en cultures jeunes, qui peuvent donner naissance à des formes filamenteuses ramifiées.

2. Caractères nutritionnels, physiologiques et biochimiques.

Comme l'espèce précédente, *Lactobacillus bulgaricus* est fortement inféodé au lait de part sa faible aptitude à dégrader les sucres autres que le lactose. Il dégrade aussi le galactose et le glucose. La bactérie possède donc un métabolisme homofermentaire et produit lentement au cours de la fermentation du D-Lactate en quantité importante (acidité Dornic jusqu'à 300).

TABLEAU III: Principaux caractères de *Streptococcus thermophilus* d'après Accolas, 1982.

CARACTERES		OBSERVATIONS
GENOTYPE	Contenu de l'ADN en G + C	Voisine de 40 %
	Homologie des acides nucléiques	<i>S. thermophilus</i> est différent des streptocoques voisins avec celles de <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> ; oui <i>S. diacetylactis</i>
PHENOTYPE	Parenté d'enzymes iso-fonctionnelles (aldolases) de différentes souches de <i>S. thermophilus</i> .	
	Morphologie	Cellules sphériques ou ovoïdes en paires ou en longues chaînes. Polymorphisme prononcé dans les cellules âgées. Lait, produits laitiers uniquement.
	Ecologie	
	Température de croissance : culture à 10°C	-
	45°C	+
	Thermorésistance à 65°C, 30 min.	+
	Croissance en présence de NaCl, 2 %	-
	Groupe sérologique	Absence d'antigène de groupe
	Hydrolyse de l'arginine	-
	Sucres fermentés	
- fructose, glucose, lactose, sucrose	+	
- maltose, pentoses (xylose et arabinose) et raffinose	(-)	
- trehalose, inuline, glycerol, mannitol, sorbitol	-	
Action sur le lait tournesolé	Acidification rapide A Coagulation C Réduction très lente et souvent incomplète du tournesol r	
		Pas de différence nette avec les autres streptocoques Confirme le bien fondé de l'espèce <i>S. thermophilus</i> Pas de différence nette avec les streptocoques du groupe sérologique N. Le caractère thermophile accusé le différencie nettement des streptocoques lactiques du groupe sérologique N (cultivent à 10 mais pas à 45°C), et des streptocoques du groupe sérologique D (cultivent à 10 et 45°C). C'est aussi l'un des streptocoques les plus thermorésistants. Très sensible au sel, il s'oppose nettement aux streptocoques de groupe sérologique D qui cultivent en présence de 6,5 % de sel. Différence essentielle avec les streptocoques lactiques mésophiles (groupe sérologique N) et les streptocoques fécaux (groupe sérologique D). <i>S. lactis</i> et la plupart des streptocoques du groupe sérologique D sont positifs. Petit nombre de sucres fermentés. Préférence marquée pour les disaccharides, lactose et saccharose. <i>S. thermophilus</i> est l'un des streptocoques les moins « actifs » en ce qui concerne l'éventail des sucres fermentés. Cette réaction le différencie des autres streptocoques isolés du lait et produits laitiers en particulier des streptocoques lactiques du groupe sérologique N (RAC).

+ : réaction positive pour 90 % ou plus des souches. (-) : réaction négative pour 90 % ou plus des souches. - : réaction toujours négative.

Lactobacillus bulgaricus est une bactérie thermophile qui ne se développe pas à 15°C mais pousse à 45°C. Elle ne se développe pas sur milieu contenant 2% de NaCl. Les principaux caractères de *Lactobacillus bulgaricus* sont donnés dans le Tableau IV. p. 21.

D. L'ASSOCIATION STREPTOCOQUE-LACTOBACILLE.

L'association des deux bactéries *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* est une "symbiose" (Tamine et Robinson, 1985) qui a fait l'objet de nombreuses études.

Accolas *et al.* (1980) ont étudié les modifications du lait lors de la fermentation en cultures pures ou en cultures mixtes.

Accolas *et al.* (1977) démontrent une synergie de production de l'acide lactique ainsi qu'une augmentation de production de l'acétaldéhyde (composé aromatique) lors de la fermentation en culture mixte Streptocoque-Lactobacille.

D'autre part Galeslout et Hassing, (1973) obtiennent des effets bénéfiques sur la texture du lait fermenté par une culture mixte. La croissance de *Streptococcus thermophilus* serait favorisée par la production d'acides aminés, résultant de l'action protéolytique de *Lactobacillus bulgaricus* (Pette et Lolkema, 1950; Bautista *et al.*, 1966). Tandis que *Lactobacillus bulgaricus* serait stimulé par l'acide formique, l'acide pyruvique et le CO₂ produit par *Streptococcus thermophilus* (Galeslout *et al.*, 1968; Accolas *et al.*, 1971).

TABLEAU IV: Principaux caractères de *Lactobacillus bulgaricus* d'après Accolas, 1982.

	CARACTERES	L. BULGARICUS
GENOTYPE	<p>Contenu de l'ADN en G + C.</p> <p>Homologie des acides nucléiques</p> <p>Parenté d'enzymes iso-fonctionnelles (lactico-déshydrogénases) de différentes souches</p>	<p>Voisin de 50 % avec ceux de <i>L. lactis</i> : ≥ 80 % <i>L. helveticus</i> : 0 à 40 % avec celles de <i>L. lactis</i> : oui <i>L. helveticus</i> : non</p>
PHENOTYPE	<p>Morphologie</p> <p>Isomère de l'acide lactique</p> <p>Groupe sérologique</p> <p>Exigences nutritionnelles</p> <ul style="list-style-type: none"> - riboflavine - vitamine B12 - pyridoxal - acide folique - thymidine <p>Production de gaz à partir du glucose</p> <p>Croissance</p> <ul style="list-style-type: none"> à 15°C à 45°C <p>Hydrolyse de l'arginine</p> <p>Acide lactique % produit dans le lait</p> <p>Sucres fermentés</p> <ul style="list-style-type: none"> - fructose - galactose - glucose - lactose - maltose - mannose - sucrose - trehalose 	<p>Variable avec l'âge, le milieu, la souche. Granules métachromatiques abondants dans les cellules de cultures âgées colorées au bleu de méthylène</p> <p>D (-)</p> <p>E</p> <ul style="list-style-type: none"> + - - - - - - + - ≤ 1,8 % + ± ± + - - -

+ : réaction positive pour 90 % ou plus des souches. - (-) : réaction négative pour 90 % ou plus des souches. - - : réaction toujours négative.

D'autre part, la symbiose des bactéries du yaourt procurerait une remarquable stabilité des cultures mixtes dans le cas des yaourts fabriqués en continu (Accolas *et al.*, 1977; Driessen *et al.*, 1977; MacBean *et al.*, 1979).

En conclusion, il existe bien une symbiose entre les deux espèces qui se déroule en deux phases: dans un premier temps, *Streptococcus thermophilus* bénéficie de l'action protéolytique de *Lactobacillus bulgaricus* qui, dans un deuxième temps, tire profit des métabolites et des produits de dégradation libérés par *Streptococcus thermophilus*.

III. LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS.

A. INTRODUCTION.

Les bactéries synthétisent des polysaccharides qui sont localisés soit dans le cytosol comme source d'énergie (glycogène), soit comme constituant de la membrane plasmique ou de la paroi (peptidoglycannes, (Schleifer et Kandler, 1972), acides teichoïques (Archibald et Baddiley, 1966)), soit à l'extérieur de la paroi cellulaire. Ce dernier type forme les polysaccharides exocellulaires .

Ils sont faiblement liés à la surface cellulaire, pouvant même se dissoudre dans le milieu de culture de la bactérie (Bishops et Jennings, 1982; Wicken, 1985). C'est pour cette raison qu'ils sont encore appelés exopolysaccharides (EPS). Ces polymères glucidiques présentent une grande variabilité de structure (Stacey et Barker, 1960; Sutherland, 1977; Kenne et Lindberg, 1982).

La majorité de ces macromolécules ont une grande spécificité immunologique et ils ne sont produits que par un genre, une espèce ou un groupe de bactéries (Kenne et Lindberg, 1982). D'autre part de nombreux polysaccharides bactériens sont antigéniques et quelques-uns sont utilisés comme vaccins (Bishops et Jennings, 1982; Jennings, 1983; Cryz et al., 1985; Austrian, 1985; Lee, 1987).

Les recherches concernant les exopolysaccharides se sont considérablement développées ces dernières années. En effet, ces exopolymères possèdent des domaines d'applications très diversifiés: dans l'alimentation comme gélifiants, épaissants, stabilisants,

inhibiteurs de cristallisation; en médecine comme immunostimulant, ou encore dans diverses industries comme l'industrie pétrolière.

D'autre part, l'utilisation de micro-organismes dans la production d'hydrocolloïdes de nature polysaccharidique présente le double intérêt: économique et "disponibilité", par rapport aux sources traditionnelles d'approvisionnements en macromolécules glucidiques comme les carraghénanes isolés d'algues ou la gomme arabique, exsudat d'acacias (**Sandford et Baird, 1982**).

Ces exopolysaccharides sont généralement composés d'unités oligosaccharidiques de répétition et les propriétés décrites ci dessus sont directement liées à la structure chimique de ces composés. En conséquence la détermination de ces enchaînements glucidiques est d'une grande importance.

B. LES ENVELOPPES BACTERIENNES.

La forme et la rigidité des cellules des procaryotes sont dues à la présence d'une paroi qui recouvre la membrane plasmique. Les bactéries sont classées en 2 types suivant la structure de leur paroi:

- Les bactéries à gram (+).
- Les bactéries à gram (-).

Cette classification des bactéries a été introduite par **C. Gram** en 1884 selon la coloration de la paroi à l'aide d'un réactif à base de violet de Gentiane.

La paroi des bactéries à Gram (+) (**Figure 2**, p. 26) est essentiellement constituée de l'intérieur vers l'extérieur d'une couche épaisse de peptidoglycannes dans laquelle sont intégrés les acides teichoïques. A l'extérieur, se situent les polysaccharides exocellulaires.

Chez les bactéries à Gram (-) (**Figure 3**, p. 27) on retrouve la couche de peptidoglycannes mais moins épaisse. Les lipopolysaccharides spécifiques de la bactérie Gram (-) forment l'autre constituant. Ils représentent 10% à 15% de la matière sèche de la paroi, et ils sont, de par leur position externe, le principal déterminant antigénique de la bactérie (O-antigène). Comme dans le cas des bactéries Gram (+), nous retrouvons à l'extérieur les polysaccharides extracellulaires (exopolysaccharides ou EPS). Ceux-ci, comme les O-antigènes des lipopolysaccharides, forment les antigènes spécifiques de la bactérie.

C. COMPOSITION ET STRUCTURE DES POLYSACCHARIDES.

Les exopolysaccharides bactériens constituent une famille de composés caractérisés par une grande diversité de structure (**Sutherland, 1982**).

1. Composition chimique.

Les exopolysaccharides bactériens sont souvent constitués d'hexoses neutres: D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-fucose et L-rhamnose. Ils contiennent en outre des acides uroniques, des

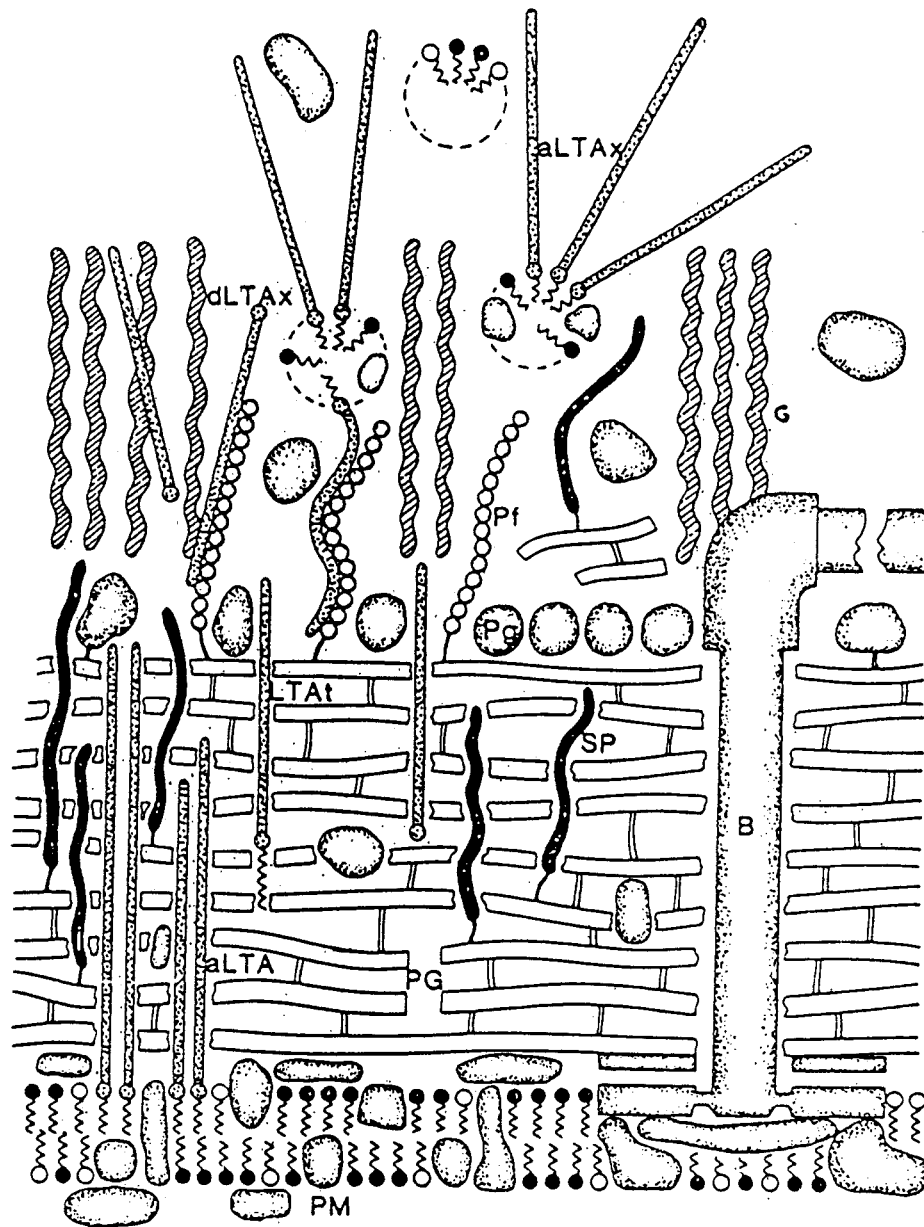


Figure 2: Schéma de la paroi de bactéries à Gram (+) d'après Wicken,(1985). (PG) peptidoglycane. (PM) membrane plasmique. (SM) acides teichoïques, acides teichuroniques et polysaccharides liés covalentiellemment au peptiglycane. (B) corp basal du flagelle. (Pg) protéines globulaires et (Pf) fibrillaires. (aLTA) (LTAt) (ALTAx) (DLTAX) acides lipotechoïques sous différentes formes. (G) Capsule polysaccharide extracellulaire.

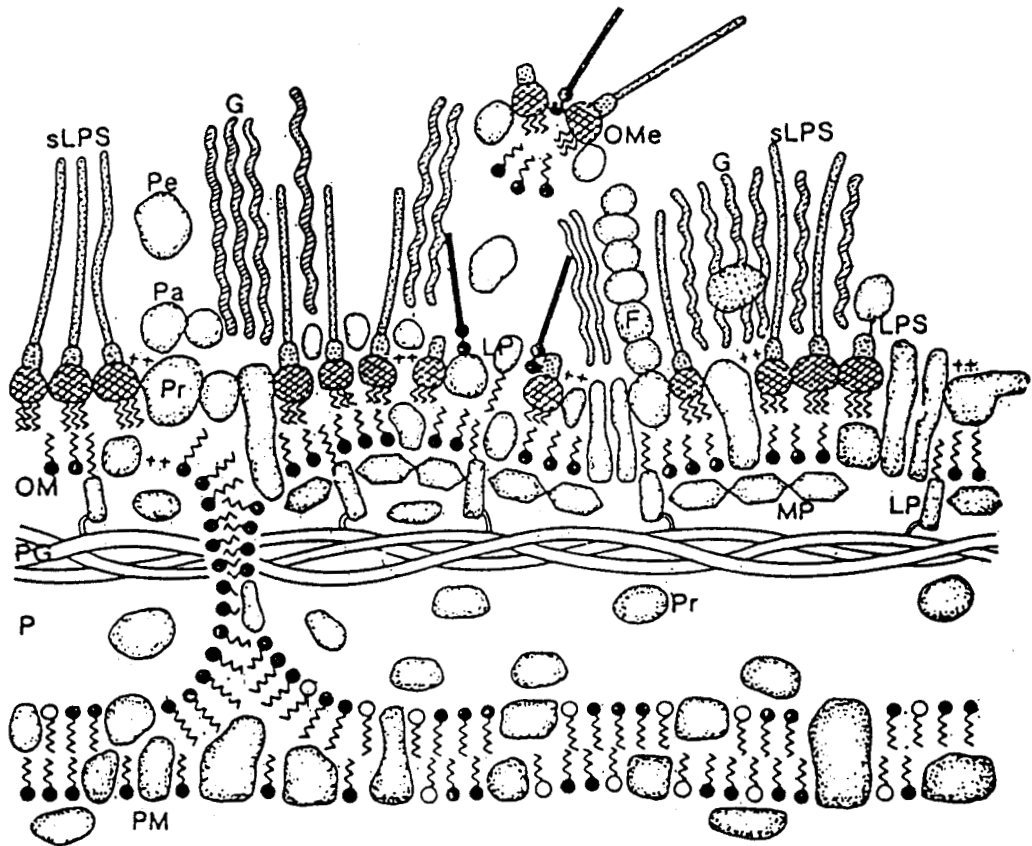


Figure 3: schéma de la paroi des bactéries Gram (-) d'après Wicken, (1985). La paroi est divisée en trois régions, nommées, membrane externe (OM), peptidoglycane monocouche (PG) et périplasma (P) recouvrant la membrane plasmique (PM). (LPS) lipopolysaccharides lisses. (rLPS) lipopolysaccharides rugueux. (LP) lipoprotéines. (MP) matrices protéiques. (F) fibrille. (Pa) protéines associées. (Pe) protéines extracellulaires. (OMe) fragments de membranes. (G) Capsule polysaccharidique extracellulaire.

hexosamines et des sucres particuliers tels que des amino-dideoxy-hexoses, diamino-di ou trideoxy-hexoses (Kenne et Lindberg, 1982).

Les pentoses sont rares, les heptoses et les acides octulosoniques sont généralement absents des polysaccharides (Sutherland, 1977). Les exopolysaccharides possèdent en outre des substituants non glucidiques tels que les groupements acyles: acétate (Linker et Jones, 1964), formiate (Sutherland, 1970), succinate (Harada, 1965) et pyruvyle (Sloneker et Orantas, 1962) celui-ci étant souvent associé avec l'acétate (Sutherland, 1972).

On identifie également des composés inorganiques comme le phosphate trouvé chez *Streptococcus pneumoniae* 13 (Watson et al., 1972).

2. Structure primaire des exopolysaccharides.

Sutherland, (1972) classe les exopolysaccharides en 2 groupes distincts, en se fondant sur leurs compositions et leurs mécanismes de biosynthèse.

Les homopolysaccharides sont constitués de la polymérisation d'un seul monosaccharide comme le glucose (dextrane, Hehre, 1941) ou le fructose (levane, Hestrin et al., 1943).

Dans cette première classe, Sutherland (1982) distingue, des homopolysaccharides synthétisés par des bactéries métabolisant un substrat spécifique : le saccharose. En absence de cette source carbonée, la bactérie ne peut se développer. Ces polysaccharides de type dextrane et levane sont synthétisés par des bactéries du genre *Streptococcus* et *Leuconostoc*.

Des homopolysaccharides peuvent être également synthétisés par des bactéries utilisant des substrats carbonés différents. C'est le cas d'*Acetobacter xylinum* qui produit de la cellulose, ou *Escherichia coli* K-235 qui synthétise un polymère d'acide sialique: l'acide colominique (Barry et Goebel, 1957).

Dans cette sous-classe d'homopolysaccharides on rencontre des polymères substitués par des groupements succinyles et pyruvyles (Hisamatsu et al., 1978).

Les hétéropolysaccharides sont formés généralement d'unités de répétition de 2 à 4 monosaccharides, voire jusqu'à 10 dans le cas de *Rhizobium phaesoli* (Aman et al., 1982).

Comme pour les homopolysaccharides, Sutherland (1982) effectue une sous-classification des hétéropolysaccharides en fonction de la nature du substrat utilisé par les bactéries. Le premier groupe est synthétisé par des bactéries métabolisant un substrat carboné spécifique.

Dans ce cas, il apparait que la nature de la source azotée est également importante pour la production du polysaccharide (Sutherland et Wiallamson, 1979).

L'autre groupe correspond à des hétéropolysaccharides synthétisés sur des sources carbonées non spécifiques. Ce groupe d'exopolysaccharides est le plus hétérogène.

C'est ainsi que dans le genre *Klebsiella*, 80 sérotypes ont été décrits. Ils diffèrent uniquement par la structure de leurs polysaccharides capsulaires. C'est également le cas pour le groupe des *Streptocoques*.

3 exemples de structure primaire d'unités de répétition de polysaccharides isolés de *Streptococcus pneumoniae* et de *Klebsiella* sont donnés respectivement dans les Figures 4a p. 31 et 4b p. 32.

Une dernière classe est constituée d'hétéropolysaccharide biosynthétisé par des bactéries excréant des alginates. Ces polysaccharides sont constitués de deux monosaccharides l'acide D-mannuronique et l'acide L-guluronique.

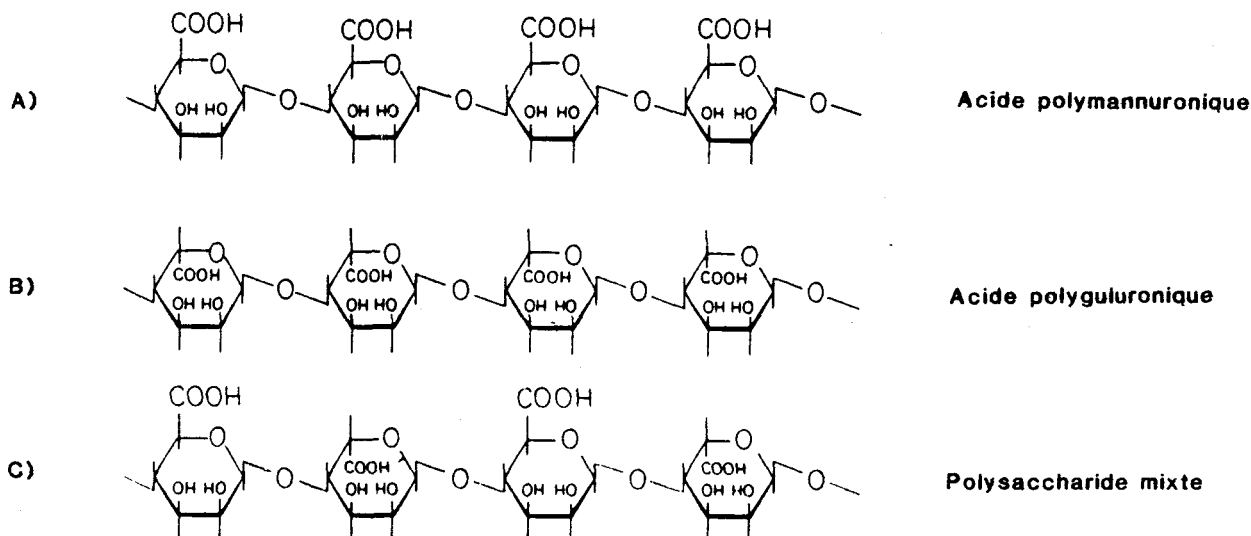
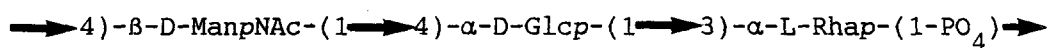
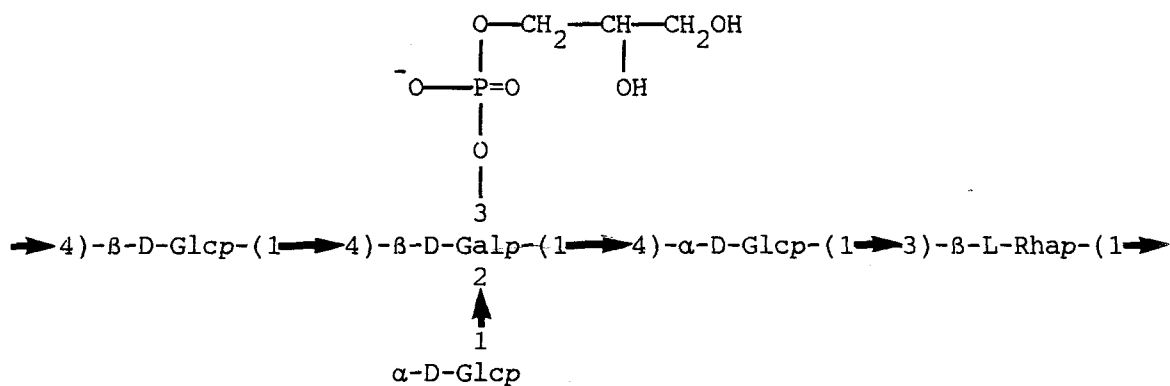


Figure 5: Structures des polysaccharides trouvés chez les alginates bactériens.

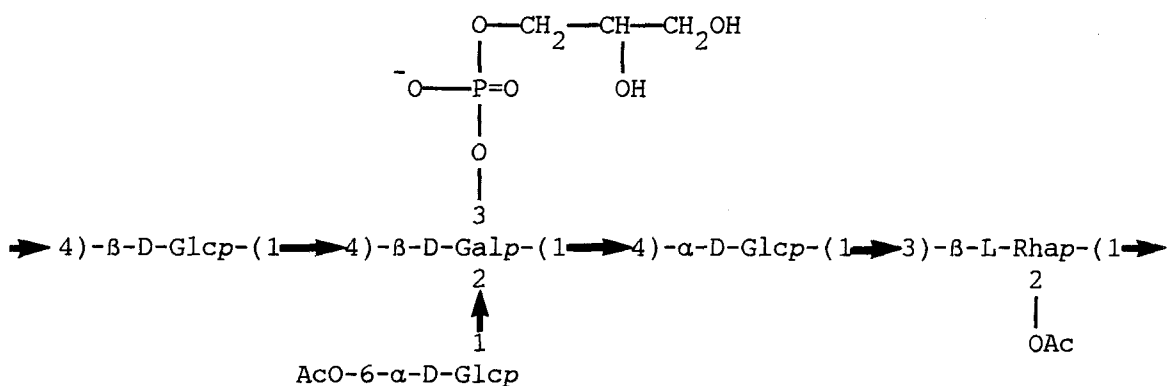
Cependant ces deux monosaccharides ne sont pas agencés en unités de répétition. En effet, la bactérie excrète en mélange du polymannuronate (a), du polyguluronate (b) et un polysaccharide mixte constitué à la fois d'acide mannuronique et guluronique (c) (Haug et al., 1974). Nous verrons dans le paragraphe biosynthèse que cette hétérogénéité révèle un processus tout à fait particulier de synthèse de ces exopolysaccharides.



Streptococcus pneumoniae type 19A

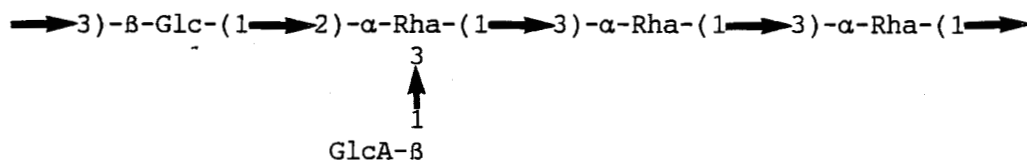


Streptococcus pneumoniae type 18A

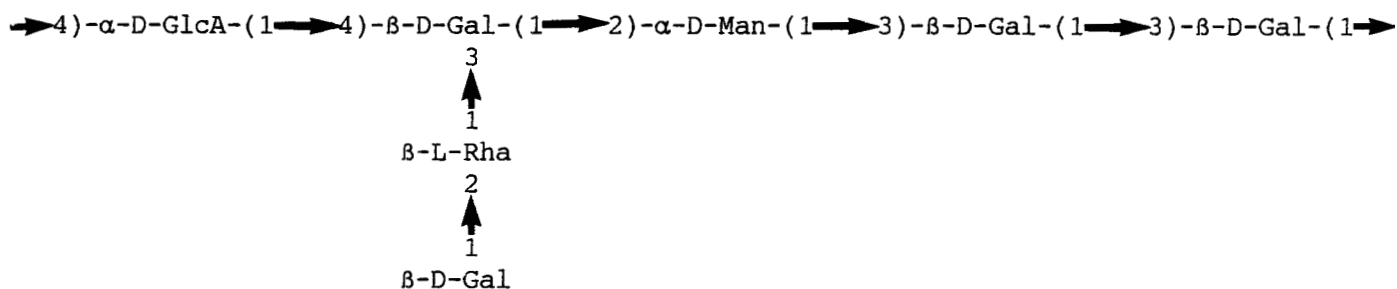


Streptococcus pneumoniae type 18F

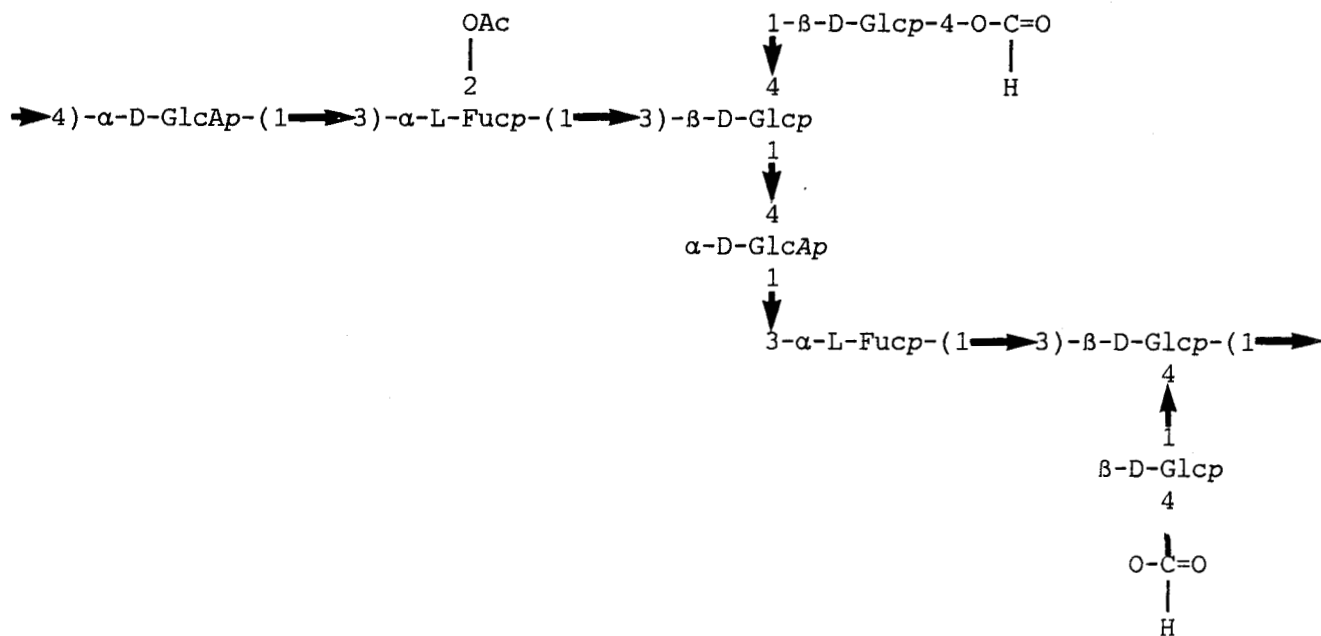
Figure 4a: Structure primaire de l'unité de répétition des polysaccharides isolés de 3 souches de *Streptococcus pneumoniae* (bactéries gram +): *Streptococcus pneumoniae* 19A (Katzenellenbogen et Jennings, 1983), *Streptococcus pneumoniae* 18A (Jansson et al., 1988) et *Streptococcus pneumoniae* 18F (Jansson et al., 1988).



Klebsiella sérotype K45.



Klebsiella sérotype K40.



Klebsiella sérotype K54.

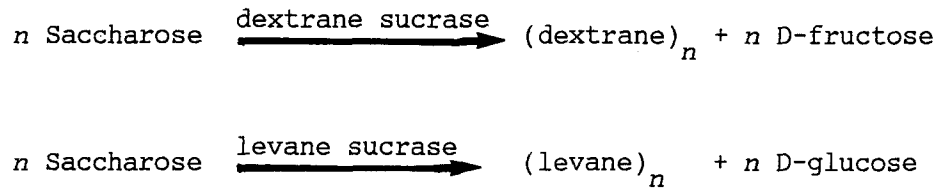
Figure 4b: Structure primaire de l'unité de répétition des polysaccharides isolés de 3 souches différentes de *Klebsiella* (bactéries gram -): sérotype K45 (Dutton et al., 1982), sérotype K54 (Dutton et Merrifield, 1982), sérotype K40 (Ray et al., 1987).

D. BIOSYNTHESE ET EXCRETION DES EXOPOLYSACCHARIDES.

Les exopolysaccharides bactériens sont synthétisés dans différentes phases de croissance et pour des conditions de culture variables, qui dépendent des micro-organismes étudiés (Sutherland, 1982; 1985). Deux mécanismes de biosynthèse des polysaccharides sont décrits qui reposent sur le lieu de la biosynthèse et sur la nature des précurseurs mis en jeu pour cette synthèse.

1. La biosynthèse extracellulaire.

Les levanes et les dextrans produits par plusieurs bactéries gram (+) sont synthétisés par une série d'enzymes extracellulaires par les réactions suivantes:



Les deux polymères ont besoin du saccharose pour être synthétisés, à la fois comme "primer" ou germe de synthèse et comme substrat d'approvisionnement en glucose ou fructose.

Pour ce qui est de la biosynthèse du levane, la levane sucrase catalyse la fixation répétitive de fructose en liaison $\alpha 2 \rightarrow 1$.

Par contre en ce qui concerne la biosynthèse du dextrane, le schéma réactionnel est plus compliqué comme l'indique la structure primaire branchée avec des liaisons $\alpha 1 \rightarrow 3$ et $\alpha 1 \rightarrow 6$. Le pourcentage de

ces deux liaisons diffère selon le type de *Streptocoque*. Ainsi *Streptococcus sanguis* produit un dextrane constitué de 82% de liaisons $\alpha 1 \rightarrow 6$ alors que *Streptococcus mutans* produit essentiellement un $\alpha 1 \rightarrow 3$ dextrane (95% de liaisons $\alpha 1 \rightarrow 3$).

En conséquence, soit la dextrane sucrase est une enzyme complexe formée de deux enzymes distinctes synthétisant la liaison $1 \rightarrow 3$ et $1 \rightarrow 6$ respectivement, soit la dextrane sucrase est une enzyme qui catalyse la synthèse d'un seul type de liaison ($\alpha 1 \rightarrow 3$ ou $\alpha 1 \rightarrow 6$) et un deuxième système enzymatique de type transglucosylase intervient pour effectuer le point de branchement (Sutherland, 1982; Whitfield, 1988).

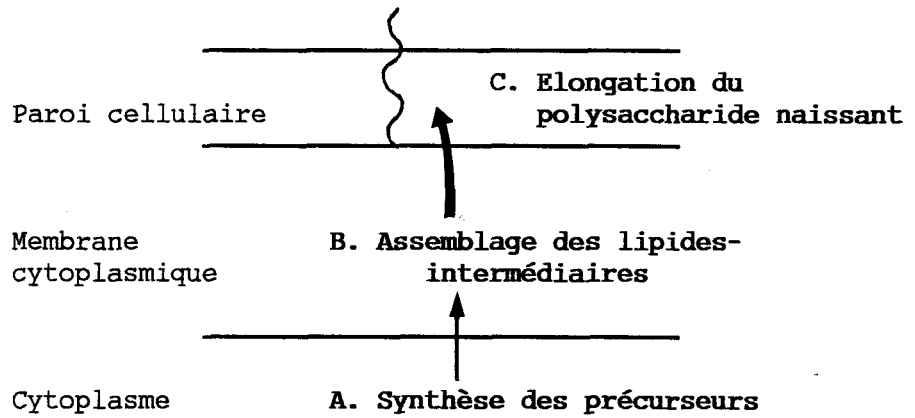
2. Biosynthèse intracellulaire.

Sur tous les polysaccharides étudiés à ce jour, beaucoup proviennent des bactéries gram (-), cependant il apparait que le mécanisme de biosynthèse est identique chez les bactéries gram (+) et gram (-).

Nous avons illustré dans la **Figure 6** (p. 35) la topographie possible et les mécanismes de biosynthèse des polysaccharides chez les bactéries gram (+) et gram (-). Les précurseurs de la biosynthèse activés, sous forme de nucléotides diphosphate monosaccharides ou plus rarement sous forme de nucléotides monophosphate monosaccharides, (Troy, 1979) sont formés dans le cytoplasme.

En effet, les enzymes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs sont localisés dans le cytoplasme mais peuvent être parfois

GRAM POSITIVE



GRAM NEGATIVE

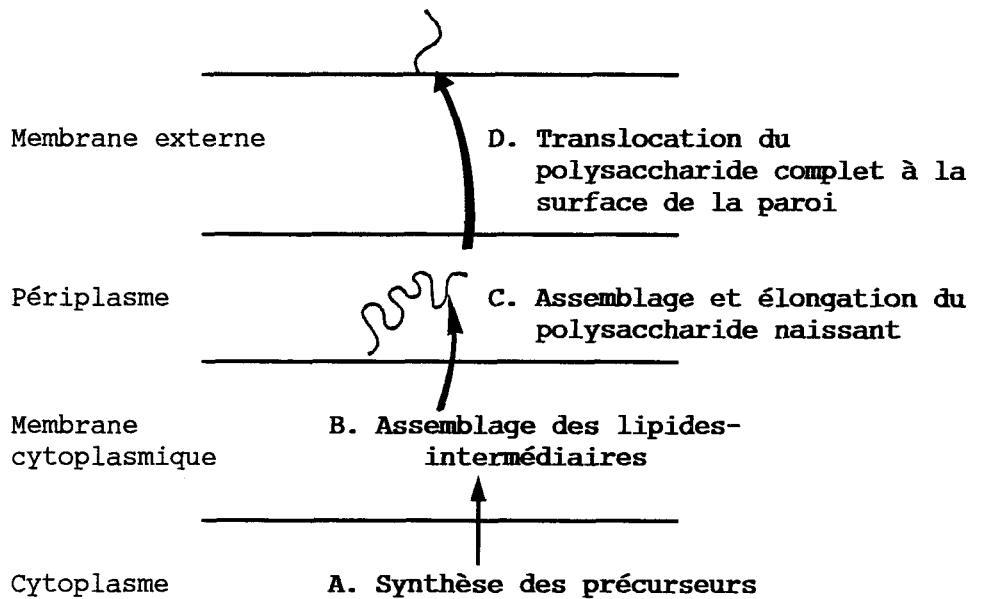


Figure 6: Mécanisme possible pour la synthèse et l'assemblage des exopolysaccharides bactériens. (Whitfied, 1988).

associés lâchement avec la membrane cytoplasmique au niveau de la laquelle se trouvent les glycosyltransférases (Sutherland et Norval, 1971). L'assemblage des monosaccharides s'effectue dans la membrane cytoplasmique sur un intermédiaire lipidique, qui doit être en quantité suffisante pour permettre les étapes de polymérisation.

La **Figure 7a** (p. 37) illustre les étapes de transfert des monosaccharides sur l'intermédiaire lipidique dans la biosynthèse de l'unité pentasaccharidique de répétition de l'exopolysaccharide de *Xanthomonas campestris* (Ielpi, 1981; 1983).

Le lipide impliqué dans cette biosynthèse est un undécaprénol phosphate (C_{55} -P) identique à l'intermédiaire lipidique décrit dans la biosynthèse des antigènes O des lipopolysaccharides et dans celle du peptidoglycane (Troy et al., 1970). Comme dans le cas de la biosynthèse des glycanes des glycoprotéines l'intermédiaire lipidique intervient dans la solubilisation de l'oligosaccharide hydrophile ainsi que son transport à travers les domaines hydrophobes de la membrane cytoplasmique. En outre, il jouerait un rôle de régulation dans la biosynthèse du polysaccharide, fondé sur sa disponibilité (Troy, 1979; Sutherland, 1982).

Comme nous pouvons le voir dans le cas de *Xanthomonas campestris* (**Fig. 7b**; p. 37), les polysaccharides peuvent être substitués par des résidus acétyles, succinyles ou encore pyruvyles. L'acétyl-CoA et le phospho-énol-pyruvate constituent respectivement les précurseurs activés des substituants acétyle et pyruvyle. La fixation s'effectue généralement sur le polysaccharide encore attaché à l'intermédiaire lipidique.

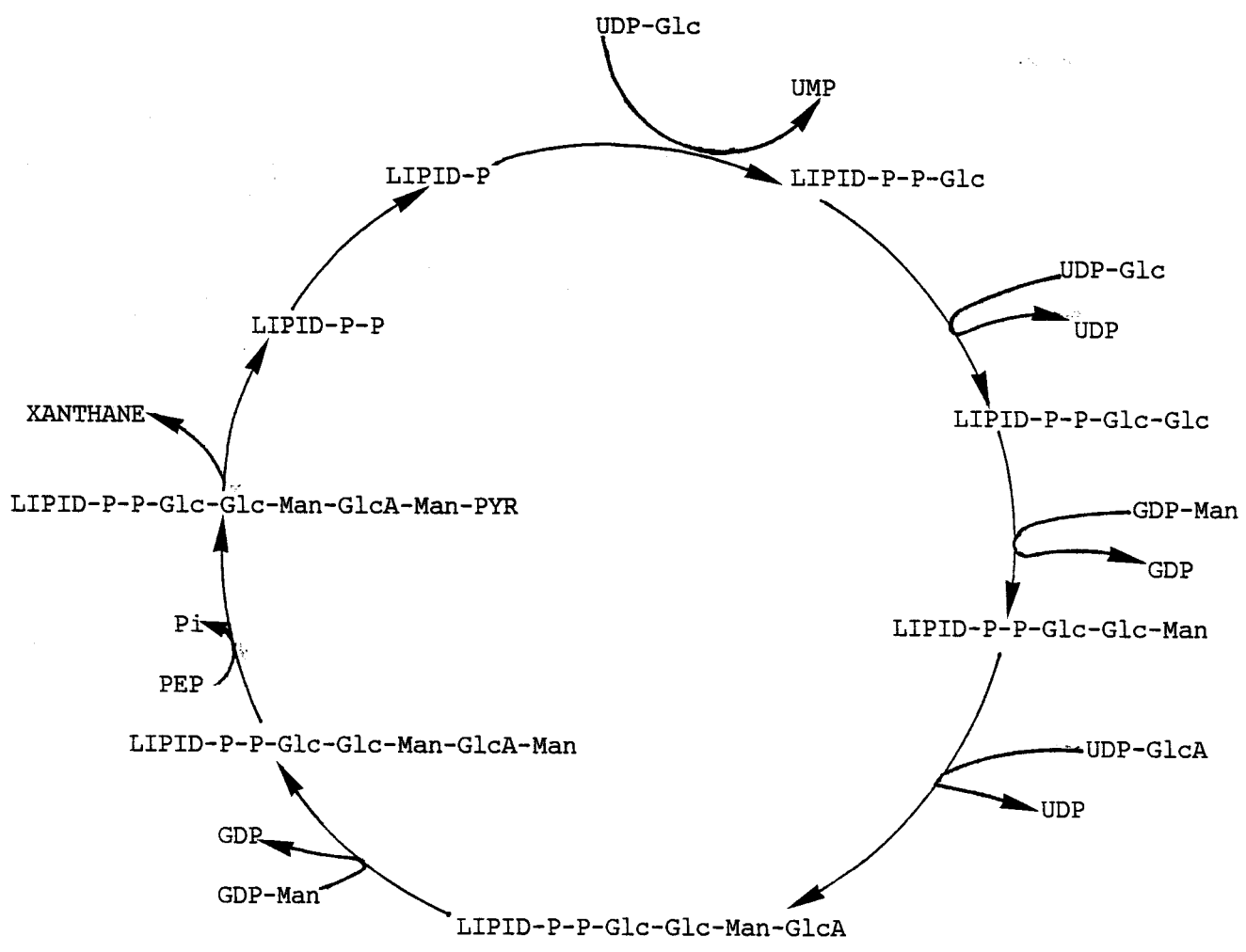


Figure 7a : Biosynthèse du polysaccharide de *Xanthomonas campestris*. Mécanisme de l'addition de monosaccharides pour former l'unité pentasaccharidique. (Ielpi *et al.*, 1981; 1983).

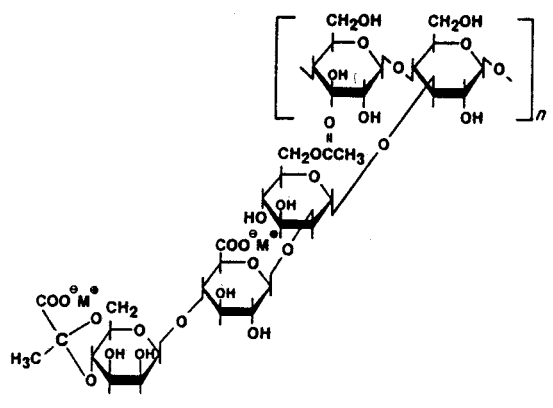


Figure 7b : Structure de l'unité de répétition du polysaccharide de *Xanthomonas campestris* (Xanthane).

Dans certains cas, l'addition du substituant est indispensable à la fin de la synthèse complète de l'unité de répétition (*Klebsiella* type 8, Sutherland, 1982).

Dans d'autres cas, les réactions de substitution ne semblent pas indispensables à l'assemblage de l'oligosaccharide de répétition. C'est en particulier le cas pour la synthèse de Xanthane par *Xanthomonas campestris* (Ielpi et al., 1981; 1983)

Durant la synthèse qui s'effectue dans la paroi cellulaire, les oligosaccharides sont transférés de l'intermédiaire lipidique sur un accepteur endogène constitué du polysaccharide en voie d'élongation (Troy et McCloskey., 1979). Whitfield et al. (1984) et Whitfield et Troy, (1984) ont montré à l'aide d'expériences *in vivo* et *in vitro* sur *Escherichia coli* K1 que l'inhibition de la synthèse protéique affecte l'initiation de nouveaux accepteurs, mais ne modifie en rien l'élongation des accepteurs préexistants.

Ces résultats suggèrent donc que les réactions d'initiation et d'élongation découlent de mécanismes bien distincts. Les mécanismes d'addition de molécules telles que des phospholipides, qui contribuent à l'ancrage des polysaccharides à la surface de la cellule ne sont pas encore connus. En effet, il est possible que le polysaccharide soit assemblé sur la molécule d'ancrage ou bien que cette molécule soit additionnée sur le polysaccharide terminé.

Alors que le transfert des oligosaccharides sur les accepteurs n'est pas un processus complexe chez les bactéries gram +, les contraintes imposées par la structure des parois cellulaires des

bactéries gram - constituent un problème lors du processus de transfert du polysaccharide du périplasme vers la membrane externe (Figure 6 p.35).

Dans l'assemblage des polysaccharides capsulaires de nature polysialoside d'*Escherichia coli* K1, l'élongation du polymère s'effectue du côté terminal non réducteur du polysaccharide, cette extrémité terminale se situant à la partie la plus externe du périplasme (voir Figure 6; p. 35) (Rohr et Troy., 1980). Boulnois et al., (1987) et Silver et al., (1987) observent l'accumulation de polysaccharide dans le périplasme de certains mutants. Cet assemblage périplasmique du polysaccharide précède la translocation du polymère à la surface cellulaire.

Chez *Escherichia coli* k1, ce système de translocation implique plusieurs enzymes (Boulnois et al., 1987), dont l'une est périplasmique (Silver et al., 1987). Des homologues dans les DNA intervenant dans le système de translocation ont été identifiées dans d'autres sérotypes d'*Escherichia coli* (Robert et al., 1986).

Le mécanisme par lequel le polymère est transféré à travers la membrane externe n'est pas clairement établi. Des études effectuées dans les laboratoires Bayer (Bayer, 1979) montrent que chez *Escherichia coli* K29, le polysaccharide capsulaire est exporté au niveau de 200 à 400 sites par cellule (zones d'adhésion ou jonctions de Bayer) où le cytoplasme et la membrane externe sont très intriqués.

Des sites d'exportation de fibrilles de cellulose ont également été observés chez *Acetobacter xylinum* (Brown et al., 1976; Zaar, 1979).

3. Autres systèmes de biosynthèses.

La synthèse de la cellulose par *Acetobacter xylinum* a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique et utilise comme précurseurs des sucres-nucléotides-diphosphates. Les résultats d'expériences de biosynthèse en absence d'intermédiaires lipidiques avec des enzymes solubilisés, fournissent la preuve que ces intermédiaires ne sont pas impliqués dans ce processus (Aloni *et al.*, 1983).

Azotobacter vinelandii utilise un autre système pour synthétiser son alginate. Dans un premier temps un polymère d'acides mannuroniques est synthétisé (Pindar *et Bucke*, 1975). Dans un deuxième temps, une mannuronane 5' épimérase extracellulaire transforme dans la membrane externe certains résidus d'acide mannuronique en acide guluronique, ce qui conduit à la structure décrite par Skjak-Braek *et Larsen*, (1985).

4. Contrôle et régulation de la biosynthèse.

Chez *Rhizobium meliloti*, les gènes codant pour les exopolysaccharides sont divisés entre le chromosome et un mégaplasme PRmeSU47b (Leigh *et al.*, 1985), mais pour beaucoup d'autres polysaccharides les déterminants sont chromosomiques. Environ 15 Kb du DNA chromosomique codant pour plus de 12 produits de gènes sont nécessaires pour la synthèse, la polymérisation, la modification et la translocation des polysaccharides capsulaires (Echarti *et al.*, 1983; Silver *et al.*, 1984; Boulnois *et al.*, 1987). Les gènes codant pour une

variété d'antigènes d'*Escherichia coli* K(L) sont organisés de la même manière (Roberts et al., 1986). C'est également le cas pour *Escherichia coli* K30 et *Kbsiella* K20 qui produisent des exopolysaccharides chimiquement identiques. Le contrôle de la disponibilité des précurseurs se fait soit par inhibition rétroactive (Kornfield et Ginsburg, 1966), soit par dégradation (Vimr et Troy, 1985).

Sutherland (1982) a aussi émis l'hypothèse d'une régulation de la biosynthèse des exopolysaccharides dépendant de la quantité de lipides intermédiaires disponibles. Cependant, les éléments qui interviennent dans la régulation de la biosynthèse des polysaccharides exocellulaires ne sont pas encore tous définis.

C'est ainsi que chez *Acetobacter xylinum* la synthèse de cellulose est régulée directement par une molécule cyclique d'acide diguanylique et indirectement par la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Ross et al., 1987). Les techniques modernes de manipulation génétique qui permettent de contrôler la production, la quantité et la qualité du polysaccharide sont utilisées pour la production commerciale de polysaccharides. Un excellent exemple est la synthèse de gomme xanthane par *Xanthomonas campestris*. Récemment des plasmides augmentant l'expression de xanthane ont été identifiés. De même, le(s) gène(s) impliqué(s) dans la pyruvatisation a ont été(s) cloné(s) (Harding et al., 1987). Ce dernier élément est fondamental, car l'acide pyruvique, lié sur le mannose terminal non réducteur des ramifications, intervient dans les propriétés rhéologiques du polysaccharide.

E. ROLES DES EXOPOLYSACCHARIDES.

Les bactéries produisant des exopolysaccharides ont été identifiées dans de nombreuses niches écologiques et il est évident que le rôle joué par le polysaccharide est dépendant de l'environnement du micro-organisme. **Dudman (1977)** a suggéré que la capacité de production d'exopolysaccharides par un micro-organisme était directement fonction de l'environnement.

1. Barrière générale.

Une des fonctions attribuées aux exopolysaccharides concerne la protection du microorganisme. **Dudman (1968)** montre qu'un exopolysaccharide sécrété par *Rhizobium meliloti* peut exercer la fonction de macrofiltre.

En effet, les micro-organismes peuvent s'entourer d'une couche de polysaccharides extrêmement hydratée qui leur fournit une protection contre la dessiccation et l'attaque par des protozoaires. De même, la présence d'une couche d'hydrocolloïdes autour de la cellule peut avoir un effet significatif sur les propriétés de diffusion à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (**Dudman, 1977**).

Les bactéries entourées de leur coque polysaccharidique peuvent, par moment, devenir inaccessibles aux agents antibactériens comme les antibiotiques par exemple (**Costerton et al., 1987**).

2. Interactions ioniques.

Les exopolysaccharides acides des bactéries gram (-) seraient les réservoirs à ions nécessaires aux enzymes membranaires (Heptinstall *et al.*, 1970). Les exopolysaccharides anioniques peuvent aussi fixer les ions et ainsi affecter la pénétration à la surface de la membrane des ions métalliques utiles ou toxiques (Dudman, 1977).

3. Rôle de reconnaissance.

Les exopolysaccharides sont impliqués dans le processus de reconnaissance et jouent un rôle dans la spécificité antigénique (Ginsburg et Kobata, 1971).

Un des aspects intéressants est la relation symbiose entre des espèces de *Rhizobium* et des légumineuses (Dudman, 1977; Tsien et Schmidt, 1981). Ils suggèrent que des lectines sécrétées par la plante pourraient être importantes dans l'établissement de l'association symbiotique avec la bactérie, et plus particulièrement avec le polysaccharide de surface de *Rhizobium*. Le polysaccharide de surface de la bactérie porte la spécificité de reconnaissance de la légumineuse.

Une lectine comme la trifolin A ne reconnaît pas d'éventuels changements au niveau des substituants non-glucidiques des polysaccharides capsulaires produits au cours du cycle de croissance (Sherwood *et al.*, 1984) ou par des souches mutantes (Gardioli *et al.*, 1987).

Des études sur les interactions de *Pseudomonas aeruginosa* avec des tissus pulmonaires de Rat suggèrent que l'intervention des exopolysaccharides dans la reconnaissance cellulaire constitue un phénomène largement répandu. C'est ainsi que deux formes de lectine liant l'héparine ont été isolées des tissus pulmonaires de Rat, qui réagissent préférentiellement avec certains types d'exopolysaccharide de *Pseudomonas aeruginosa* (Ceri et al., 1986).

Ces découvertes associées à l'observation de Doig et al (1987) quand à la présence de récepteurs aux alginates exopolysaccharide de *Pseudomonas aeruginosa*, suggèrent le rôle des lectines endogènes dans l'adhésion et la colonisation des surfaces pulmonaires par *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose cystique.

4. Rôle dans l'adsorption.

Dans la variété des biotopes que les microorganismes colonisent, la survie de ces derniers dépend parfois de leur possibilité à adhérer à une surface (Gibbons et Van Houte, 1975; Berkeley et al., 1980; Sutherland, 1983). La présence d'exopolysaccharide comme molécule intervenant dans l'adhésion sur des surfaces inertes ou biologiques est bien connue depuis longtemps.

C'est ainsi que l'adhésion de *Streptococcus mutans*, bactérie cariogène, à la surface des dents s'effectue grâce au dextrane qu'elle synthétise (Gibbons, 1972; James et al., 1982). Par la suite, d'autres bactéries cariogènes peuvent se fixer formant ainsi la plaque dentaire (Davis et al., 1986).

5. Importance des polysaccharides dans la virulence des bactéries.

La production d'exopolysaccharides, particulièrement sous la forme de capsules, est largement répandue chez les bactéries pathogènes.

Le type d'exopolysaccharide, la quantité synthétisée et le taux de synthèse peut avoir un rapport avec la pathogénicité des micro-organismes. La capsule semble être importante pour la survie des bactéries, puisque sa coque polysaccharidique la protège de la phagocytose (Dudman, 1977; Horowitz et Silverstein, 1980; Jann et Jann, 1983). Cette protection est fonction des propriétés des polysaccharides: hydrophobicité, charge et viscosité. Ceux qui masquent la surface cellulaire n'activent pas le complément, ce qui freine l'opsonisation des bactéries.

6. Rôle dans l'adsorption des bactériophages.

Les phages peuvent s'adsorber sur des structures aussi différentes que les flagelles, pili, lipopolysaccharides, les complexes acides teichoïques-peptidoglycannes et les protéines de surface.

Les bactériophages actifs sur des souches encapsulées sont généralement spécifiques des exopolysaccharides. Lindberg (1973) décrit l'isolement et la caractérisation des dépolymérase de phage qui agissent sur les exopolysaccharides. Cet auteur suggère que le phage se reconnaît et s'attache à l'exopolysaccharide. La queue du phage se déplace alors le long de l'enchaînement du polymère, libérant des

morceaux d'exopolysaccharide, grâce à une activité endoglycosidase qui est localisée à la base de la queue. La coque polysaccharidique ayant été dépolymérisée, le phage peut alors faire pénétrer son agent infectieux dans la bactérie.

Les bactériophages sont très utiles pour déterminer la structure primaire des polysaccharides, car ils libèrent les unités de répétitions saccharidiques. Ces dernières se prêtent particulièrement bien à l'étude par résonance magnétique nucléaire du C13, car elles ne présentent plus de viscosité et les signaux obtenus sont tout à fait significatifs de l'enchaînement des monosaccharides dans le polymère (Beurret, 1984).

Enfin, cette hydrolyse enzymatique ne touche pas aux substituants très labiles comme les succinates, pyruvates et acétates qu'il est alors possible de positionner (Annison *et al.*, 1988).

IV. LES POLYSACCHARIDES DES BACTERIES LACTIQUES.

A. INTRODUCTION.

L'observation selon laquelle la viscosité des produits laitiers fermentés serait due à la sécrétion d'un polysaccharide n'est pas nouvelle. Déjà en 1923, **Hammer** étudie la production d'un mucus par des souches de *Streptococcus lactis* isolées de la crème du lait. D'autres auteurs notent la production de polysaccharide par *Streptococcus lactis longi* (**Sundman, 1953; Nilsson et Nilsson, 1958**).

La Rivière et al., (1967), Pidoux et al., (1988) isolent un polysaccharide des grains de Kéfir, et d'une souche "visqueuse" de *Lactobacillus brevis*.

Sharpe et al., (1972) donnent la composition chimique d'un mucus isolé de souches de *Lactobacillus*. Ils concluent que toutes les souches étudiées produisent un glucanne.

Brooker (1976) observe un polysaccharide produit par *Streptococcus cremoris* en microscopie électronique. Ce polysaccharide, attaché à la surface cellulaire, relie les bactéries aux éléments de la matrice caséique et aux globules gras.

Une observation identique a été décrite par **Schellhaas (1983)** à partir des deux bactéries *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. De même, **Gancel (1988)** montre par microscopie électronique que *Streptococcus thermophilus* produit, sur milieu synthétique, un polymère qui relie les bactéries entre elles. Les deux bactéries utilisées dans la fabrication du yaourt: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* font l'objet actuellement de recherches actives.

B. POLYSACCHARIDE DE LACTOBACILLUS BULGARICUS.

Schellhaas (1983), **Manca de Nadra et al., (1985)** et **Cerning et al., (1986)** ont isolé et caractérisé un polysaccharide issu de souches épaississantes de *Lactobacillus bulgaricus*.

Schellhaas (1983) décrit une unité de répétition constituée par du galactose et du glucose dans les rapports molaires 2;1 respectivement (Tableau V p. 49). De plus elle met en évidence son polysaccharide par microscopie électronique.

Manca de Nadra et al. (1985) isolent à partir d'un yaourt commercial une souche CRL 420 qui, cultivée sur lait reconstitué, lui permet d'obtenir un polymère de masse moléculaire 200.000, constitué de glucose et de fructose dans les rapports molaires 1;2 respectivement (Tableau V p. 49). L'utilisation d' α -glucosidase et de dextranase sur le polymère suggèrent que les résidus de glucose seraient liés par des liaisons $\alpha 1 \rightarrow 4$ et $\alpha 1 \rightarrow 6$ dans les mêmes proportions.

TABLEAU V: Rapports molaires en monosaccharides des polysaccharides excrétés par *Lactobacillus bulgaricus*.

Monosaccharides				Auteurs
Gal	Glc	Fru	Rha	
2	1	-	-	Schellhaas, (1983)
-	1	2	-	Manca de Nadra et al., (1985)
4	1	-	1	Cerning et al., (1986)

TABLEAU VI: Concentration en polysaccharide et viscosité de lait écréméensemencé par des souches épaisissantes et non-épaisissantes de *Lactobacillus bulgaricus*.

	Acidité Titrable	Viscosité mPa.s	mg polysaccharide/ L de culture
Souche non-filante			
CNRZ 398	68	7	14
Souches filantes			
CNRZ 416 ^a	71	3	57
CNRZ 416 ^b	85	164	285
CNRZ 737 ^b	84	218	424

^a Lait écrémé.

^b Lait écrémé + 1% caséine.

En 1986, **Cerning et al.** décrivent l'isolement et la caractérisation d'un polysaccharide obtenu par fermentation sur du lait écrémé de souches épaississantes de *Lactobacillus bulgaricus*. Ce polymère est constitué de galactose, glucose et de rhamnose dans les rapports molaires approximatifs de 4; 1; 1 respectivement (Tableau V p. 49).

La masse moléculaire de ce polysaccharide est de 500.000. D'autre part, l'auteur montre que des souches non épaississantes produisent peu de polysaccharides alors que des souches épaississantes se caractérisent pour la plupart d'entre elles par une production en polysaccharides plus importante corrélée à une augmentation de la viscosité (Tableau VI p. 49).

C. POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.

Des souches filantes ou épaississantes permettant d'améliorer significativement la constance des produits ont été isolées par de nombreux auteurs (**Galeslout et Hassing, 1973; Chalet-Wagner, 1979; Bouillanne et Desmazeaud, 1980; Bouillanne et al., 1981**). Ces caractères sont certainement à mettre à l'actif de la production d'exopolysaccharide par ces souches de bactéries. En effet, la capacité de *Streptococcus thermophilus* à synthétiser des exopolysaccharides a été établie par plusieurs auteurs.

C'est ainsi que **Galeslout et Hassing (1973)** observent une augmentation de l'aspect filant du laitensemencé par des souches épaississantes de *Streptococcus thermophilus*.

Schellhaas (1983) isole d'une culture de *Streptococcus thermophilus* sur lait un polysaccharide, et indique une composition en monosaccharides identique à celle du polysaccharide isolé à partir du lait fermenté par *Lactobacillus bulgaricus* (Galactose:2; Glucose:1 , Tableau V p. 49 et Tableau VII p. 53).

A l'aide de la résonance magnétique nucléaire du C13, l'auteur identifie 18 pics majeurs dont 3 se situent dans la région des carbones anomériques, ce qui est en faveur d'une unité trisaccharidique de répétition. Enfin toujours par résonance magnétique nucléaire du carbone, l'auteur indique que deux des liaisons glycosidiques sont en configuration β et qu'une est en configuration α . Dans son mémoire de thèse, **Schellhaas** décrit les conditions de température, de pH, de milieu lui permettant d'obtenir la meilleure viscosité.

C'est ainsi qu'elle observe que ses souches de *Streptococcus thermophilus* ainsi que de *Streptococcus cremoris* ne se développent pas et ne produisent pas de polysaccharide entre pH 5,5 et 5,8, alors qu'un pH supérieur (6,0- 6,2) est plus favorable. Ces observations sont en accord avec celles de **Rasic et Kurman (1978)**.

D'autre part, si elle augmente la teneur en azote par évaporation du milieu et/ou si elle supplémente son milieu en hydrolysats de caséines (caséino-amino-acides ou CAA), elle observe une augmentation du taux de croissance mais pas d'augmentation significative de la viscosité. Comme de nombreux auteurs (**Galesloot et Hassing, 1973; Rasic et Kurman, 1978**) elle observe une meilleure viscosité à des températures de l'ordre de 30-32°C par rapport à celle obtenue à des températures plus élevées de l'ordre de 45°C, qui constitue la température de croissance de la bactérie.

TABLEAU VII: Rapports molaires en monosaccharides des polysaccharides excrétés par *Streptococcus thermophilus*.

Souches	Monosaccharides						Auteurs
	Gal	Glc	Man	Rha	Ara	Xyl	
FERM-P n°5850	1	2,2	-	-	-	-	Tsuchiya, (1981)
Souche commerciale	2	1	-	-	-	-	Schellhaas, (1983)
CNRZ 389 soluble	2,29	1	0,6	0,2	0,08	tr	Cerning <i>et al.</i> , (1988)
CNRZ 1068 soluble	1,43	1	0,1	0,05	0,08	tr	
CNRZ 1068 ^a	0,73	1	-	-	-	-	

^a Souche de *Streptococcus thermophilus* associée à une souche de *Lactobacillus bulgaricus*.

Chalet-Wagner (1979), **Schellhass (1983)** et **Gancel (1988)** n'ont pas pu établir de relation directe entre l'augmentation de viscosité et l'augmentation du taux de polysaccharides. **Gancel (1988)**, montre en dosant le polysaccharide excrété par *Streptococcus thermophilus* sur milieu synthétique, que la production est maximum pour une température de croissance de 30°C et 45°C avec une température de phase stationnaire de 10°C.

A partir de trois souches épaississantes **Giraffa et Bergère (1987)** isolent deux fractions polysaccharidiques: l'une soluble, l'autre insoluble. Les souches épaississantes produisent plus de polysaccharides solubles que la souche épaississante mais les quantités sont faibles (40 mg/l). Ils observent également une augmentation du taux de polysaccharides lorsque la température d'incubation est de 30°C.

En 1981, **Tsuchiya et al.** isolent un polysaccharide de haut poids moléculaire et de viscosité élevée appelé MPS-80 par culture de bactérie de la famille des Lactobacilles et des Streptocoques (*Lactobacillus jugurti* FERM-P-n°5851 et *Streptococcus thermophilus* FERM-P-n°5850). Cet exopolysaccharide obtenu sur milieu de culture pour bactérie lactique ou mieux sur milieu contenant du lait écrémé ou du petit lait est constitué de galactose et de glucose dans les rapports molaires 1;2 respectivement (Tableau VII p. 52).

Les deux polysaccharides obtenus à partir de *Lactobacillus jugurti* et *Streptococcus thermophilus* possèdent les mêmes comportements chromatographiques sur Sépharose 2B et une composition chimique identique.

D'autre part, les auteurs démontrent que le polysaccharide MPS-80 prolonge la vie des Souris qui ont été infectées par diverses tumeurs d'ascite (Carcinome d'Erlich, Sarcome 180) et des cellules de Leucémie Lymphocytaire P-388. Ce travail prouve pour la première fois que l'exopolysaccharide produit par les bactéries lactiques possède une action antitumorale.

Enfin **Cerning et al. (1988)** isolent un exopolysaccharide de *Streptococcus thermophilus* cultivé sur lait écrémé, essentiellement composé de galactose et de glucose. Les rapport molaires en monosaccharides indiqués dans le tableau VII p. 52 indiquent des différences selon la nature des souches de *Streptococcus thermophilus* (pour 1 glucose, 2,29 galactose pour CNRZ 389 et 1,43 galactose pour CNRZ 1068).

D'autre part, lorsque *Streptococcus thermophilus* est cultivé en présence de *Lactobacillus bulgaricus*, la composition du polysaccharide obtenu se modifie (Glc:1; Gal:0,77). Le Tableau VIII p. 55 rassemble les résultats comparatifs des productions de polysaccharides et des viscosités obtenues par fermentations des laits avec des souches non épaississantes et épaississantes. L'auteur conclut à une certaine relation entre la viscosité et la quantité de polymère produite.

Cependant, il est constaté une variabilité dans les valeurs de viscosités obtenues à partir des mêmes souches et dans les mêmes conditions (souches épaississantes CNRZ 1066). Il semble toutefois démontré que la fermentation en présence des deux bactéries du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) permette une synergie dans la production de polysaccharide (792 mg/l) avec une bonne corrélation de viscosité du milieu (1640 mPa.s). De telles variabilités de production d'hydrocolloïdes ont également été signalées par **Gancel (1988)**.

TABLEAU VIII: Production de polysaccharide et viscosité dans du lait écrémé fermenté par des souches épaississantes et non-épaississantes de *Streptococcus thermophilus* (Cerning et al., 1988).

	Acidité Titrable	Viscosité mPa.s	polysaccharide mg/l		
			ins.	sol.	total
Souches non-épaississantes					
CNRZ 388	46	4	24	32	56
CNRZ 388 ^a	63	164	52	9	61
Souches épaississantes					
CNRZ 1100	60	40	29	14	43
CNRZ 1068 ^a	62	1100	146	20	166
CNRZ 1066	57	41	36	9	45
CNRZ 1066 ^a	60	240	185	152	347

^a Lait écrémé + 1% de caséine.

ins.: insoluble; sol.: soluble; mPa.s: millipascal par seconde.

TRAVAUX PERSONNELS

I. ISOLEMENT ET STRUCTURE DU POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.

Le but du travail qui nous a été confié est l'isolement de l'exopolysaccharide excrété par *Streptococcus thermophilus*, bactérie lactique utilisée dans la fermentation du lait, afin d'en déterminer sa composition, sa structure et ses propriétés.

A. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE.

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique qui se développe sur milieux lactés. Pour éviter le problème de la séparation du polysaccharide d'un milieu aussi complexe que le lait, **Frédérique GANCEL (1988)**, en amont de ce travail, a essayé de mettre au point un milieu synthétique. Elle a donc étudié les besoins de la bactérie et a optimisé un milieu synthétique, liquide en vue de produire de grandes quantités de polysaccharides. Malheureusement, la culture de *Streptococcus thermophilus* sur milieu synthétique n'a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes d'exopolysaccharide. D'autre part, les molécules isolées possédaient des compositions en monosaccharides présentant de grandes variations.

C'est pourquoi, nous avons préféré travailler sur l'exopolysaccharide sécrété par *Streptococcus thermophilus* ensemencé sur lait écrémé à 140 gr/l. La culture est poursuivie jusqu'à ce que le milieu atteigne pH 5.

B. ETUDE STRUCTURALE DU POLYSACCHARIDE EXTRAIT DU YAOURT.

L'isolement du polysaccharide à partir d'un lait fermenté par *Streptococcus thermophilus*, et son étude structurale sont décrits dans le premier article:

Article 1.

STRUCTURE OF EXOCELLULAR POLYSACCHARIDE PRODUCED BY *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*.

Accepté dans *Carbohydrate Research* (1989).

**STRUCTURE OF EXOCELLULAR POLYSACCHARIDE PRODUCED
BY STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.**

Thierry DOCO, Jean-Michel WIERUSZESKI and Bernard FOURNET^{*}.

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et
Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n°217)
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Didier CARCANO, Patricia RAMOS and Alain LOONES.

SODIMA - Centre de Recherche International André GAILLARD.
10, rue J-J. Rousseau, 94200 Ivry-sur-Seine.

* Author for correspondence.

secreted into the extracellular environment in the form of slime. Such polymers vary considerably in their chemical structure ¹. In the dairy industry, specially in France, the use of slime producing bacteria in the starter culture to increase the viscosity has been advocated by many researchers ²⁻⁷.

The polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* or *Lactobacillus bulgaricus* would be commercially interesting, but detailed studies on these polysaccharides are rare. Recent publications on *Lactobacillus bulgaricus* ²⁻⁵ and *Streptococcus thermophilus* ^{3,6-7} give carbohydrate composition with large variation on the nature of the monosaccharides and on the molar carbohydrate composition of their exopolysaccharides. In addition, no data are published on the primary structure of these exopolysaccharides from bacteria used in dairy industry.

Here we describe the purification, the identification and the primary structure of an exocellular polysaccharide produced by ropy strain of *Streptococcus thermophilus*.

RESULTS AND DISCUSSION

Streptococcus thermophilus bacteria were grown on sterilized reconstituted skimmed milk and the exocellular polysaccharide was isolated after pronase digestion of milk protein by ethanol precipitation and gel-permeation chromatography on Sephacryl S1000. The treatment of 115 g of lyophilized fermented milk give 42 mg of polysaccharide.

The purified product obtained after Sephacryl S-1000 was shown to be homogeneous by gel-permeation chromatography on Sepharose 4B (mol.wt. 1.10^6).

Gas liquid chromatography of pertrifluoroacetylated methyl-glycosides obtained after methanolysis and pertrifluoroacetylation of polysaccharide and of polyol acetates obtained after acid hydrolysis, reduction and peracetylation indicated the presence of galactose, glucose and N-acetylgalactosamine in the ratios of 1.95; 1.0; 0.89 respectively (Table I).

After methanolysis of permethylated polysaccharide, the partially methylated and acetylated methylglycosides were analysed by g.l.c-m.s. Four methyl-ethers were identified (Table II) as 2,3,4,6-tetra-O-methyl and 2,4,6-tri-O-methylgalactosides, 2,4-di-O-methylglucoside and 4,6-di-O-methyl-N-acetyl-N-methylgalactosaminide. These results indicated that the exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* is constituted by a tetrasaccharidic repeating units with a (1→3)-linked backbone composed of one galactose residue, one glucose residue and one N-acetylgalactosamine residue and a (1→6)-linked branch with one residue of galactose.

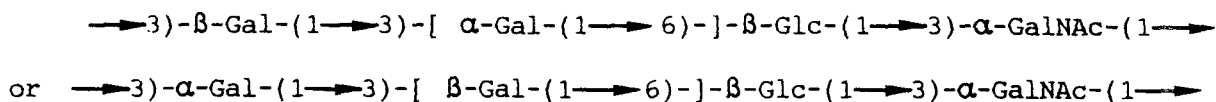
The insoluble IO_4H resistant polysaccharide obtained by Smith degradation of native exopolysaccharide yielded galactose, glucose and N-acetylgalactosamine in the molar ratios of 1.13; 1.0; 0.73 respectively. As was expected by methylation analysis, the results indicated that only the branched galactose was degraded during the periodate oxidation. The methylation analysis of IO_4H resistant polysaccharide (Table II) yielded 3 majors methylated monosaccharides: 2,4,6-tri-O-methylgalactoside, 2,4,6-tri-O-methylglucoside and 4,6-di-O-methyl-N-acetyl-N-methylgalactosaminide showing a linear (1→3)-linked trisaccharide repeating unit for this IO_4H resistant polysaccharide, and confirmed that the branched galactose unit was linked to the glucose residue of backbone by a (1→6)-linkage.

In order to determine the sequence of monosaccharides in the tetrasaccharide repeating unit, the polysaccharide was N-deacetylated on the N-acetylgalactosamine residue and the resulting N-deacetylated polysaccharide was subjected to nitrous acid deamination followed by reduction of liberated oligosaccharide. The analysis of monosaccharides from the oligosaccharide isolated by Bio-Gel P2 chromatography shown the transformation of N-acetylgalactosamine to the 2,5-anhydrogalactitol and the presence of galactose and glucose.

These results was confirmed by the analysis of methyl-ethers obtained by methanolysis of permethyloligosaccharide (Table II, and Figure 1). Three methyl-ethers were identified: 2,3,4,6-tetra-O-methylgalactoside, 2,4-di-O-methylglucoside and 1,4,6-tri-O-methyl-2,5-anhydrogalactitol. The tetrasaccharidic nature of this oligosaccharide was confirmed by the FAB-m.s analysis of permethylated oligosaccharide in positive ion mode by the identification of molecular ion at m/e 856 $(M+Na)^+$ (Figure 2). These results are in accordance with the structure Gal-(1 \rightarrow 3)-[Gal(1 \rightarrow 6)-]-Glc-(1 \rightarrow 3)-anhydroGal for the eliminated oligosaccharide by N-deacetylation nitrous deamination from the native polysaccharide.

To determine the anomeric configuration of the different sugar residues, the polysaccharide was subjected to oxidation with chromium trioxide. As mentioned in Table III, all glucose residues were degraded indicating that the monosaccharide have β -configuration, half of galactose residue was oxidized showing that one residue have β -configuration and the other residue have α -configuration. The amount of N-acetylgalactosamine did not decrease during the oxidation, the result indicates that the N-acetylgalactosaminyl residues have α -glycosidic linkages.

These results led to structure for the repeating unit of the polysaccharide:



To choose between these two repeating units, the native and the IO_4H resistant polysaccharide were subjected to n.m.r. analysis, and hence attention was attracted to the anomeric region of the spectra. The ^1H -n.m.r. spectrum of the native polysaccharide shows two H-1 α singlet at 5.088 ($J_{1,2} = 3.65$ Hz) and 4.989 ($J_{1,2} = 1.46$ Hz) and two H-1 β doublet at 4.613 ($J_{1,2} = 7.67$ Hz) and 4.418 ($J_{1,2} = 10$ Hz). The ^1H -n.m.r. spectrum of IO_4H resistant polysaccharide showed the disappearance of the H-1 α at 4.989 ppm indicating that the branching galactose residues eliminated during the Smith degradation were in α -configuration and possessed the chemical shift at $\delta = 4.989$ ppm. In the same way the comparison between ^1H -n.m.r. spectrum of native and IO_4H resistant polysaccharide showed a shift of H-1 β doublet at 4.613 to 4.584 indicating that the attachment of branching galactose affected the anomeric proton of β -glucose residue and allowed to assign the chemical shift of 1-H β of glucose residue at 4.613 ppm. The two others anomeric protons were not modified by the Smith degradation: H-1 at 5.088 ppm and 4.418 ppm attributed respectively to α -GalNAc and β -Gal of the backbone.

These results are in accordance with the structure 1 for the repeating unit of the polysaccharide from *Streptococcus thermophilus*.

Figure 3 shows the ^{13}C -n.m.r. spectrum of the native polysaccharide from *Streptococcus thermophilus*. IO_4H resistant polysaccharide was not sufficiently soluble in D_2O for an efficient determination of its ^{13}C -n.m.r. spectrum. Spectrum has revealed four well resolved signals of nearly equal intensities in anomeric carbon region. Chemical shifts at 106.28 ppm and 105.92 ppm can be attributed to C-1 of β -Gal and β -Glc from the backbone respectively in regard of value of chemical shift of

C-1 of β -Gal(1 \rightarrow 3) at 105.2⁸ and C-1 of disubstituted glucose in (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -D-glucans published by SAITO & al⁹ (δ =104.5 ppm). Chemical shifts at 101.02 ppm can be assigned to C-1 of external galactose in regard of chemical shift of C-1 of galactose from the trisaccharide α -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Man-(1 \rightarrow 4)-]- α -D-Man.¹⁰

The last anomeric carbon at 97.23 ppm corresponded to C-1 of GalNAc. This chemical shift value was closed to chemical shift of C-1 of galactose in the disaccharide β -Glc-(1 \rightarrow 3)- α -GalOMe (δ =100.0 ppm)¹¹. The presence of the N-acetylhexosamine in the polysaccharide from *Streptococcus thermophilus* can be confirmed by the signal at 176.88 ppm and 24.92 corresponding to the N-acetyl carbon atoms.

The chemical shifts of carbons from the disubstituted glucose residues in the main-chain can be deduced by comparison with the values described in β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6) linked β -D-glucans⁹, specially the 3-O-substituted C-3 at 87.6 ppm and 6-O-substituted C-6 at 69.06 ppm. The 3-O-sustituted C-3 of β -galactose in the main-chain can be assigned to the signal at δ =80.15 ppm in comparison with the value of C-3 of internal galactose in trisaccharide β -Gal-(1 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- α -Glc.⁸

The signals at 51.10 ppm and 63.70 ppm can be assigned to C-2 and C-6 of GalNAc respectively¹².

EXPERIMENTAL

Isolation and purification.

Ropy strains (CNCMI 733, CNCMI 734, CNCMI 735) of *Streptococcus thermophilus* were obtained from the particular collection of the Centre National de Cultures de Microorganismes (Institut Pasteur, Paris).

A preculture was inoculated into sterilized reconstituted skimmed milk (147 g/L) and fermented at 43° until pH 5. The fermented milk was dialyzed 3 days at 4° against distilled water. The retentate was lyophilized. 115 g of powder were dissolved in 1 L of calcium acetate buffer (10 mM, pH 8). The casein was hydrolyzed by 2.3 g of pronase (Merck, Darmstad) enzyme/substrat ratio 1/50, pH 8, 37°, 48h in presence of toluene, pH was maintained at 8 by 1M NaOH. This procedure is repeated three times. The proteins were precipitated by 10% TCA (Trichloroacetic acid).

After centrifugation the supernatant was applied on column of Dowex 50x8 (20-50 mesh; H⁺ form; 42x3.2 cm) coupled with Dowex 1x8 (20-50 mesh; HCOO⁻ form; 42x3.2 cm). The neutral fraction was precipitated by addition of 3 vol. of ethanol.

The precipitate was collected after centrifugation (10.000 rpm, 4°), redissolved in water and freeze-dried. The crude preparation (fraction of 20mg) was dissolved in 0.1 M ammonium acetate buffer and applied to a Sephacryl S1000 (50x1.6 cm, LKB-Pharmacia, Stockholm) column equilibrated and washed with the same buffer. Fractions were dialyzed against water and freeze-dried.

The molecular weight of polysaccharide was determined by gel filtration on Sepharose 4B (92x1.6 cm, LKB-Pharmacia, Stockholm) equilibrated in 0.05M phosphate buffer pH 6.15. The column was calibrated with several dextran samples (Sigma, Saint-Louis, $5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$, $2.3 \cdot 10^5$, $4 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^4$).

Carbohydrate analysis.

Qualitative and quantitative sugar analysis were carried out after

methanolysis (MeOH/HCl 0.5N, 24h, 80°) by gas-liquid chromatography of pertrifluoroacetylated methyl glycosides ¹³ and after hydrolysis (TFA, 4N, 4h, 100°) by gas-liquid chromatography of polyol-acetates. ¹⁴.

Methylation analysis.

The polysaccharide was permethylated as described in ¹⁵. The permethylated polysaccharide was subjected to methanolysis, and the partially methylated methylglycosides were peracetylated with pyridine/acetic anhydride (1/5, v/v) at room temperature overnight.

The partially acetylated and methylated methylglycosides were then separated by g.l.c and analysed by g.l.c-m.s under the conditions described by FOURNET & al ¹⁶.

NMR spectroscopy analysis.

¹³C-n.m.r spectrum at 100 MHz were recorded on a BRUKER AM-400 WB spectrometer coupled with a aspect 3000 calculator (Centre Commun de Mesures, USTL-FA). The sample (50 mg/1 mL D₂O) was analyzed at 80° with the standard program POWGATE (1H Broad-band with composite-pulse decoupling, D₁=0.1s; PW=90°=6μs; S₁=S₂=1 watt).

Spectral width was 26000 Hz for 32K frequency domain and time domain data points. Chemical shifts are expressed relative to internal TMSP-D₄ (Sodium Trimethylsilyl-2,2',3,3'-D-Propionate, δ=0.0 ppm) with an accuracy of 0.1 ppm.

¹H-n.m.r spectroscopy was performed with the same spectrometer, the polysaccharide was repeatedly exchanged in D₂O (99,95 atom%, ²H, CEA) with intermediate lyophilization. Resolution enhancement of spectra was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation according to ¹⁷.

Periodate oxidation.¹⁸

The *Streptococcus* polysaccharide (20 mg) was dissolved in (10 mL) aqueous 50 mM NaIO₄ and the solution was kept for 168 h at room temperature in the dark. An excess of 1,2-ethanediol was then added to the solution and the mixture was dialyzed against water for 48 h. The non-dialyzed material was treated with 1 M KBH₄ at 20° for 14 h. After destruction of excess of KBH₄ by Dowex 50x8 (20-50 mesh, H⁺ form), the solution was dialyzed against distilled water.

The resulting non-dialyzed material was hydrolyzed in 0.1 N TFA (5 mL) at 20° for 20 h. After elimination of trifluoroacetic acid by repeating evaporation in presence of methanol, the resulting material was subjected to gel-chromatography on Fractogel TSK-HW40S (50x1.6cm, Merck,Darmstadt) using acetic acid 0.5% as eluant.

N-Deacetylation and Diazotation.

For N-Deacetylation, the polysaccharide (20 mg) was treated of 5 mL of a solution containing 2 M NaOH and 2 M KBH₄ at 100° for 6 h. After neutralization with 6 M HCl, the solution was dialyzed. The non-dialyzed material was subjected to chromatography on a Fractogel TSK-HW40S (50x1.6cm, Merck, Darmstadt) using acetic acid 0.5% in water as eluant. The N-deacetylated polysaccharide dissolved in 2 mL of water was treated by 33 mg of sodium nitrite and 0.2 mL of acetic acid at 4° for 20 h¹⁹. After neutralisation with Dowex 50x8 (mesh 20-50; H⁺ form), the resulting material was reduced by sodium borodeuteride followed by purification with Dowex 50x8 (mesh 20-50; form H⁺) and gel filtration on Bio-Gel P2 (44x1.6 cm, Biorad) using acetic acid 0.5% in water as eluant.

Oxidation with chromium trioxide ²⁰.

The polysaccharide (5 mg) dissolved in formamide (2.5 mL) was acetylated by a mixture of acetic anhydride-pyridine (v/v) (2.5 mL). The peracetylated polysaccharide were dissolved in glacial acetic acid (3 mL), powdered chromium trioxide (45 mg) was added, and the mixture was stirred in an ultrasonic bath at 50°. Aliquots (1 mL) were removed at 0, 1 and 2 h, and immediately diluted with water. Each mixture was partitioned between water and chloroform and the respective chloroform extracts were combined, dried (Na_2SO_4) and evaporated to dryness. The materials were treated by TFA 4N, 4h at 100° and the alditol acetates prepared in the usual way. The alditol-acetates were analyzed by g.l.c.

Acknowledgments:

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité associée au CNRS n° 217; Directeur: Professeur J. Montreuil), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois and by SODIMA, Centre de Recherche International André GAILLARD. The authors are grateful to Yves Leroy and Anne Honvault for frequent help in M.S. analysis. They are grateful to the Conseil Régional du Nord/Pas-de-Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, the Ministère de l'Éducation and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400-Mhz NMR and Kratos MS 50 RF apparatus.

References:

- 1: J.W. SUTHERLAND, *Adv. Micro. Physiol.*, Vol. 23, Academic Press, London, 1982, pp.79-150.
- 2: M. ODA, H. HASEGAWA, S. KOMATSU, M. KAMBE, AND F. TSUCHIYA, *Agric. Biol. Chem.*, 47 (1983) 1623-1625.
- 3: S.M. SCHELLHAAS, (1983), *Ph. D. Thesis*, University of Minnesota, U.S.A.
- 4: M.C MANCA DE NADRA, A.M STRASER DE SAAD, A.A PESCE DE RUIZ HOLGADO, AND G. OLIVER, *Milchwissenschaft*, 40 (1985) 409-411.
- 5: J. CERNING, C. BOUILLANNE, M.J. DESMAZEAUD, AND M. LANDON, *Biotechnology Letters*, 9 (1985) 625-628.
- 6: G. GIRAFFA, AND J.L. BERGERE, *Le Lait*, 67 (1987) 285-298.
- 7: J. CERNING, C. BOUILLANNE, M.J. DESMAZEAUD AND M. LANDON, *Biotechnology Letters*, 10 (1988) 255-260.
- 8: J.G. COLLINS, J.H. BRADBURY, E. TRITONOFF, AND M.MESSER., *Carbohydr. Res.*, 92 (1981) 136-140.
- 9: H. SAITO, T. OHKI, N. TAKASUKA, AND T. SASAKI., *Carbohydr. Res.*, 58 (1977) 293-305.
- 10: B.V. McCLEARY, F.R. TARAVEL, AND N.N.H. CHEETHAN., *Carbohydr. Res.*, 104 (1982) 285-297.
- 11: Y.V. WOZNEY, L.V. BACKINOWSKY, AND K. KOCHETKOV., *Carbohydr. Res.*, 73 (1979) 282-286.
- 12: D.R. BUNDLE, H.J. JENNING, AND I.C.P. SMITH., *Can. J. Chem.*, 51 (1973) 3812-3819.
- 13: J.P. ZANETTA, W.C. BRECKENRIDGE AND G. VINCENDON, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 291-304.

- 14: J. MONTREUIL, S. BOUQUELET, H. DEBRAY, B. FOURNET, G. SPIK, AND G. STRECKER, in M.F. CHAPLIN AND J.F. KENNEDY (Eds.), *Carbohydrate Analysis, a practical approach*, IRL, Pres. OXFORD, 1986, pp 143.
- 15: J. PAZ-PARENTE, P. CARDON, Y. LEROY, J. MONTREUIL, AND B. FOURNET, *Carbohydr. Res.*, 141 (1985) 41-47.
- 16: B. FOURNET, G. STRECKER, Y. LEROY, AND J. MONTREUIL, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 489-502.
- 17: R.R. ERNST, *Adv. Magn. Res.*, 2 (1966) 1-135.
- 18: J. JOHNSON, S. KIRKWOOD, A. MISAKI, T.E NELSON, J.V. SCALETTI, AND F. SMITH., *Chem. Ind. (London)*, 1963, pp.820-822.
- 19: I. IWASAKI, Y. ARAKI, S. KAYA, AND E. ITO., *Eur. J. Biochem.*, 176 (1988) 559-565.
- 20: J. HOFFMAN, B. LINDBERG, AND S. SVENSSON, *Acta Chem. Scand.*, 26 (1972) 661-666.

Table I.

Molar carbohydrate composition* of native and IO_4H resistant polysaccharides from *Streptococcus thermophilus*.

Monosaccharides	Polysaccharides			
	Native		IO_4H -resistant	
	TFA	MeOH/HCl	TFA	MeOH/HCl
	4N, 100°	0.5N, 80°	4N, 100°	0.5N, 80°
	4 h	24 h	4 h	24 h
Galactose	1.98	1.95	0.9	1.13
Glucose	1.0	1.0	1.0	1.0
N-acetylgalactosamine	0.73	0.89	0.81	0.73

* Glucose taken as 1.0 .

Table II.

G.l.c analysis of methyl-ethers obtained from methylated native polysaccharide (A), IO_4H resistant polysaccharide (B) and N-deacetylated nitrous acid deamination oligosaccharide (C) from *Streptococcus thermophilus*.

Methylated sugars ^a (as methylglycosides)	Molar ratio ^b		
	A	B	C
2,3,4,6-Gal	0.80	-	2.4
2,4,6-Gal	1.0	1.0	-
2,4,6-Glc	-	0.6	-
2,4-Glc	0.83	0.17	1.0
4,6-GalNAcMe ^c	0.8	0.4	-
1,4,6-tri-O-methyl- 2,5-anhydroGal	-	-	0.8

^aKey: 2,3,4,6-Gal= methyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactoside,
1,4,6-tri-O-methyl-2,5-anhydroGal= 1,4,6-tri-O-methyl-
2,5-anhydrogalactitol, etc...

^b Values are given relative to one residue of 2,4,6-tri-O-methylgalactoside (A and B), and one residue of 2,4-di-O-methylglucoside (C).

^c N-acetyl-N-methyl is abbreviated as NAcMe.

Table III :

Oxidation of *Streptococcus thermophilus* polysaccharide by chromium trioxide.

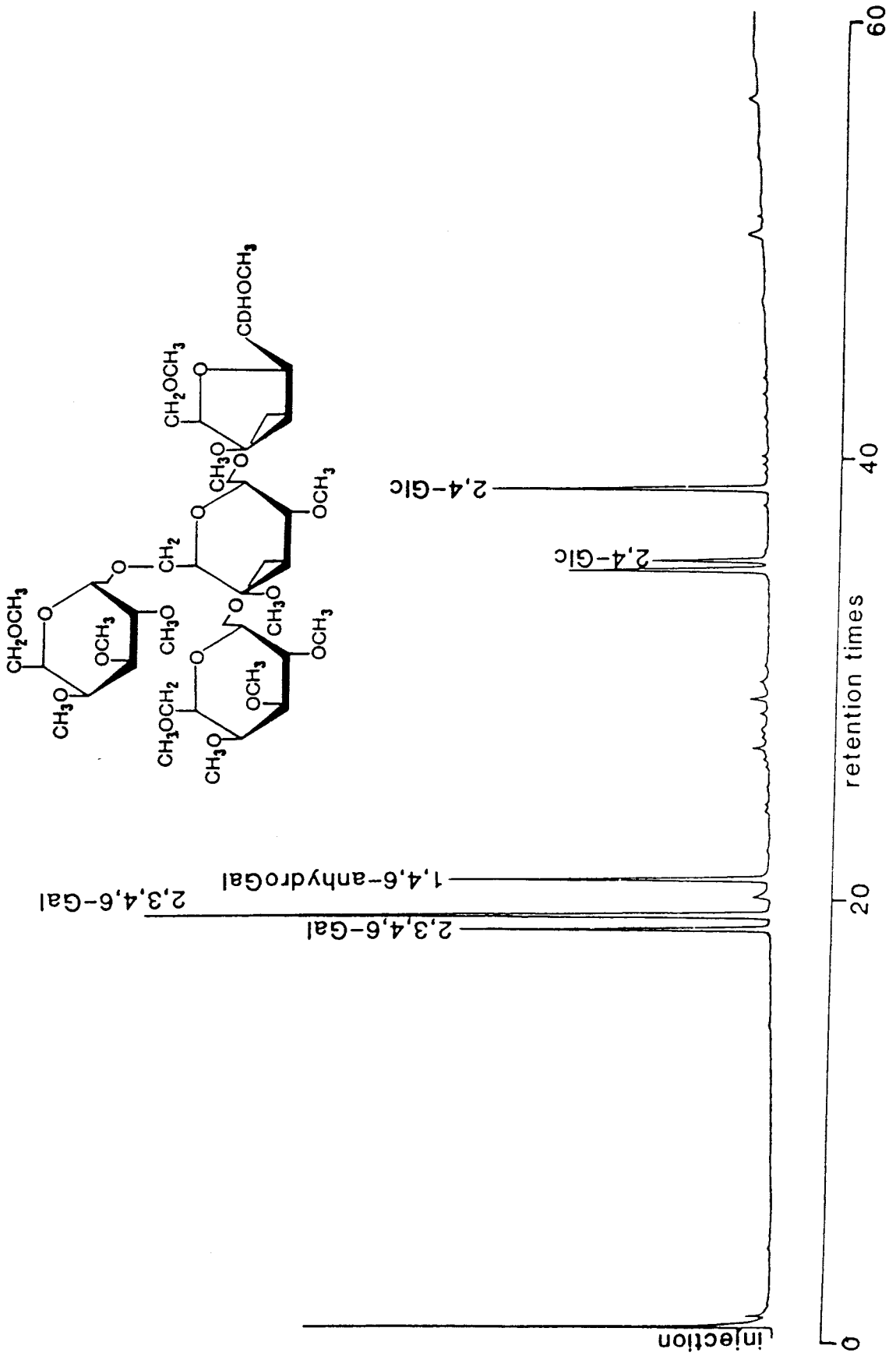
Time of oxidation (h)	Monosaccharides (as alditol acetates)		
	Glucose	Galactose	N-acetylgalactosamine
0	1	1.98	0.73
1	0.24	0.99	1
2	0.14	0.80	1

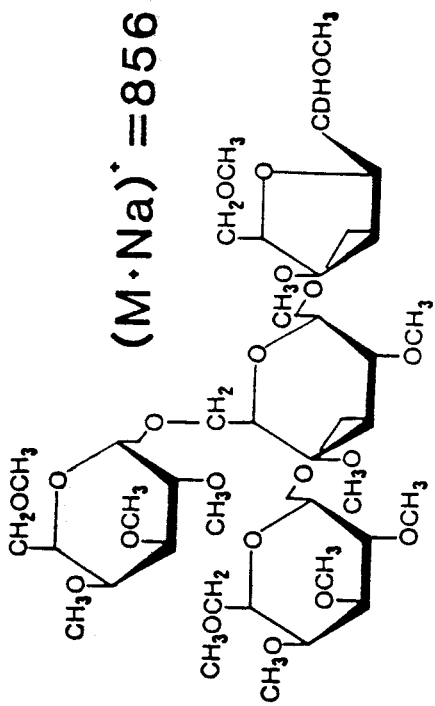
Legends to figures:

Figure 1 : Gas chromatogram (glass capillary column; walls coated with OV-101) of partially methylated and acetylated methylglycosides obtained by methylation and subsequent methanolysis of oligosaccharide alditol obtained after reduction of oligosaccharide produced by N-deacetylation and nitrous deamination from *Streptococcus thermophilus* polysaccharide.

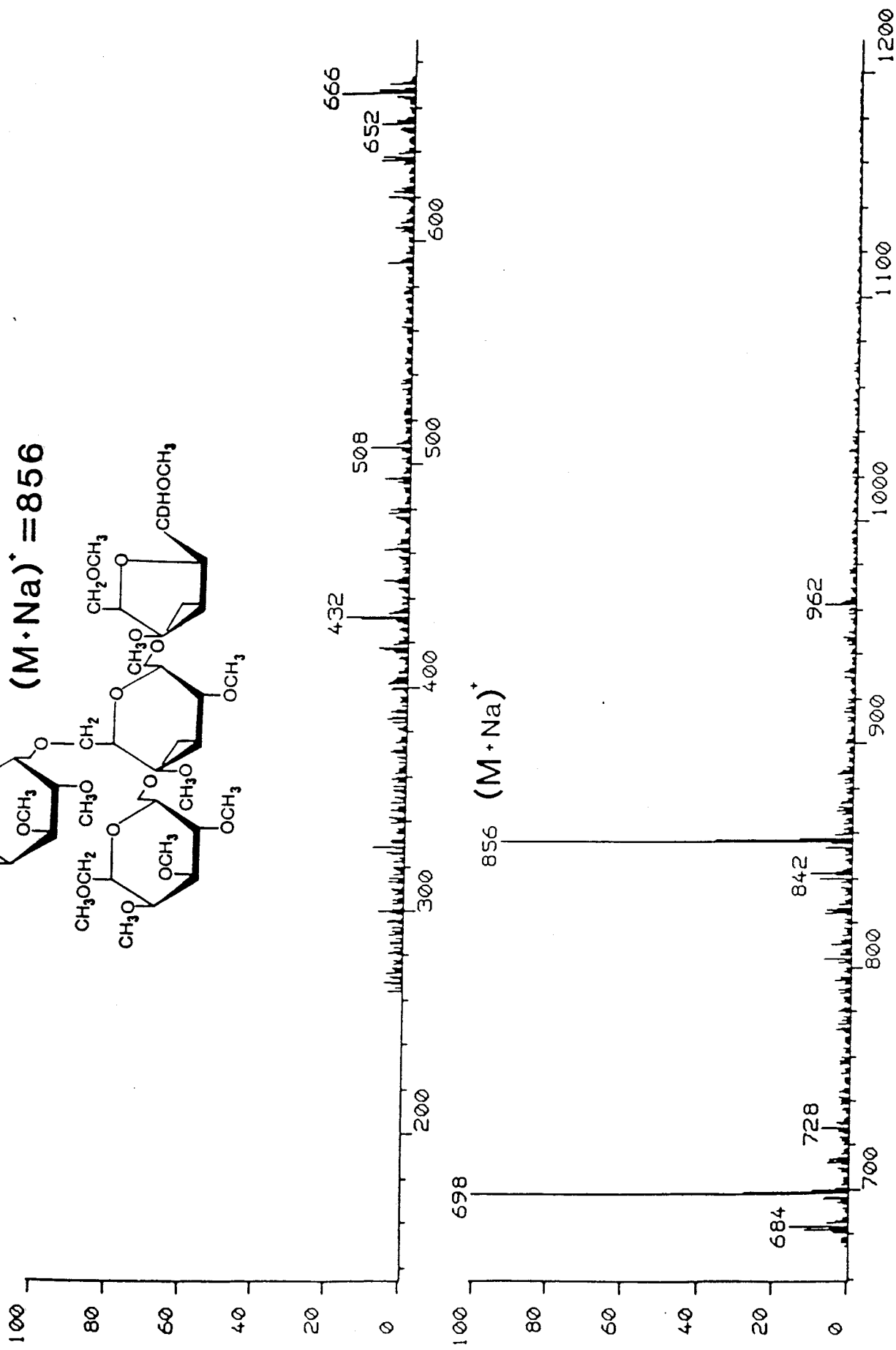
Figure 2 : FAB-m.s spectrum of permethylated oligosaccharide-alditol obtained by methylation of oligosaccharide-alditol from N-deacetylation-nitrous deamination degradation of *Streptococcus thermophilus* polysaccharide.

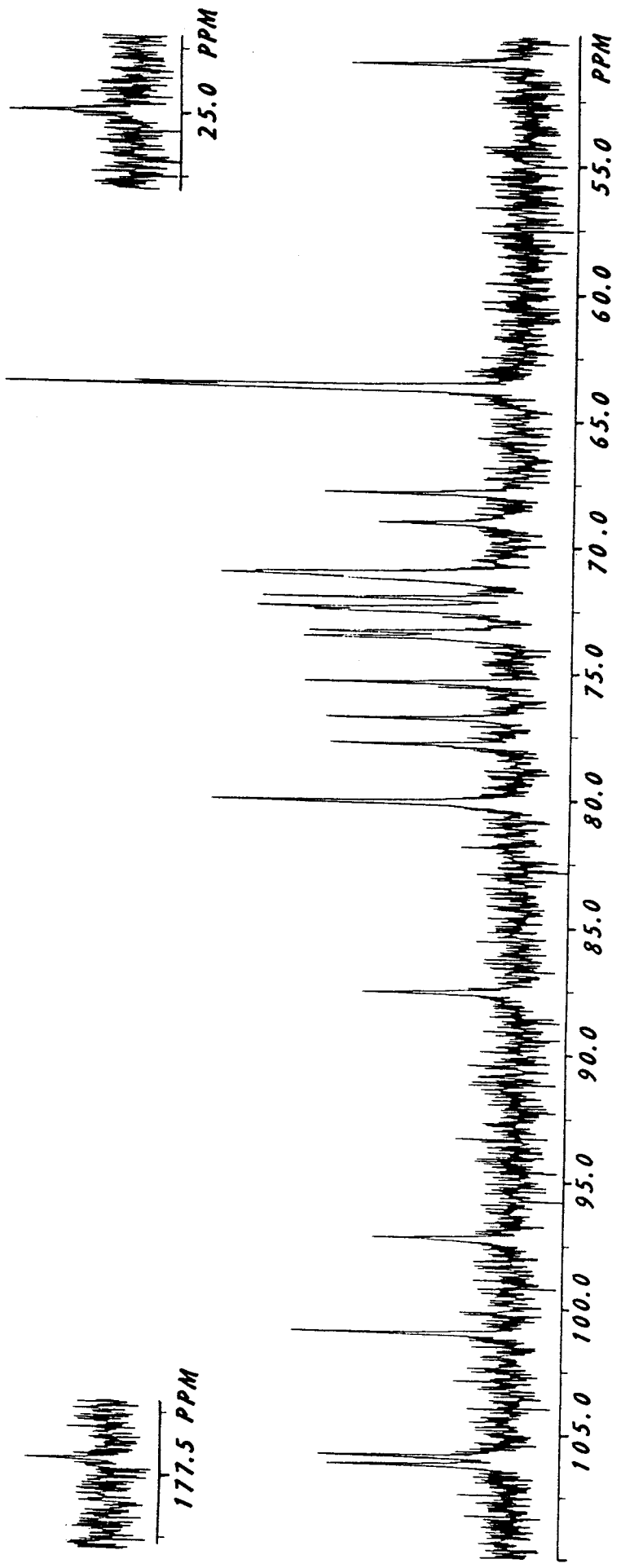
Figure 3 : ^{13}C -n.m.r. spectrum of exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus*.





(M·Na)⁺ = 856





En conclusion, l'exopolysaccharide de *Streptococcus thermophilus* a été isolé à raison de 40 mg/litre de lait fermenté et la structure de l'unité de répétition a été établie.

Aucun travaux sur la structure des exopolysaccharides secrétés par des bactéries lactiques n'ont été jusqu'à ce jour publiés. Seuls des compositions en monosaccharides ont été décrites. Contrairement à **Schellhaas (1983)**, **Tsuchiya (1981)** et **Cerning et al., (1988)**, nous avons identifié et confirmé la présence d'une osamine, plus précisément la N-acétylgalactosamine, par méthode chimique et par résonance magnétique nucléaire. Nous caractérisons aussi du glucose et du galactose dans les mêmes rapports molaires (1; 2) que **Schellhaas (1983)** et **Cerning et al., (1988)**. **Tsuchiya (1981)** trouve des rapports molaires inverses.

D'autre part, nous constatons un faible rendement de purification qui peut être dû, soit à la méthode de préparation, soit à une synthèse faible d'exopolysaccharides par *Streptococcus thermophilus*. Cette deuxième hypothèse a déjà été établie par plusieurs auteurs (**Chalet-Wagner, 1979; Giraffa et Bergère, 1987; Cerning et al., 1988**).

Sur la base de la connaissance de la structure primaire de l'unité de répétition, une modélisation d'un enchaînement de 6 unités de répétition a pu être effectuée au laboratoire du Professeur G. Vergoten de la Faculté de Pharmacie de Lille (**Figure 8**, p.79) qui indique que la macromolécule glucidique prend une conformation hélicoïdale.

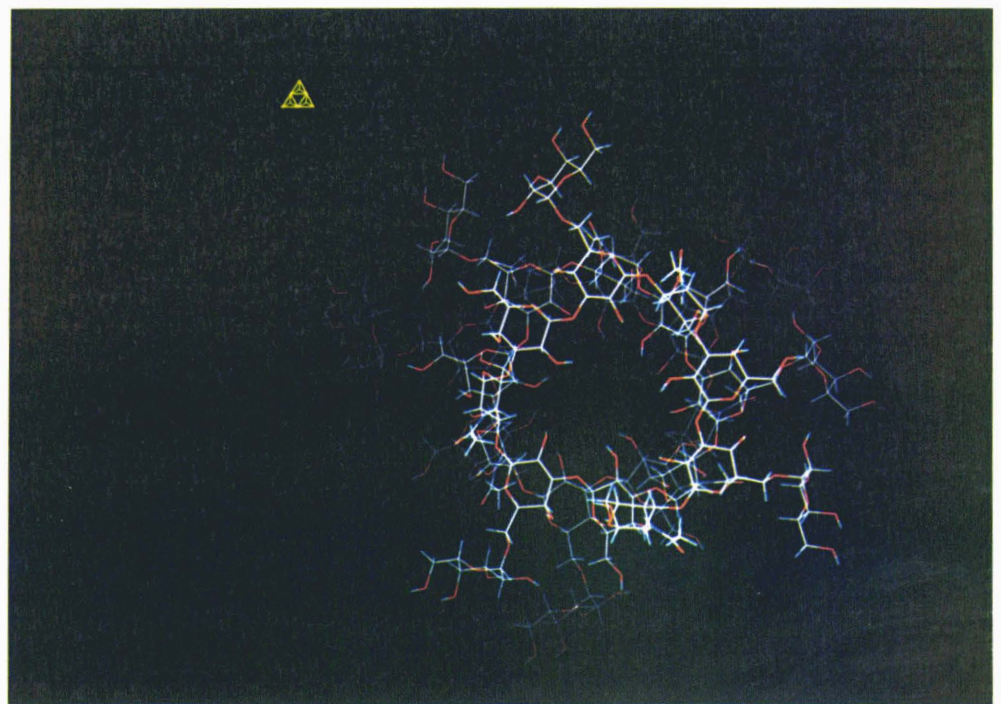
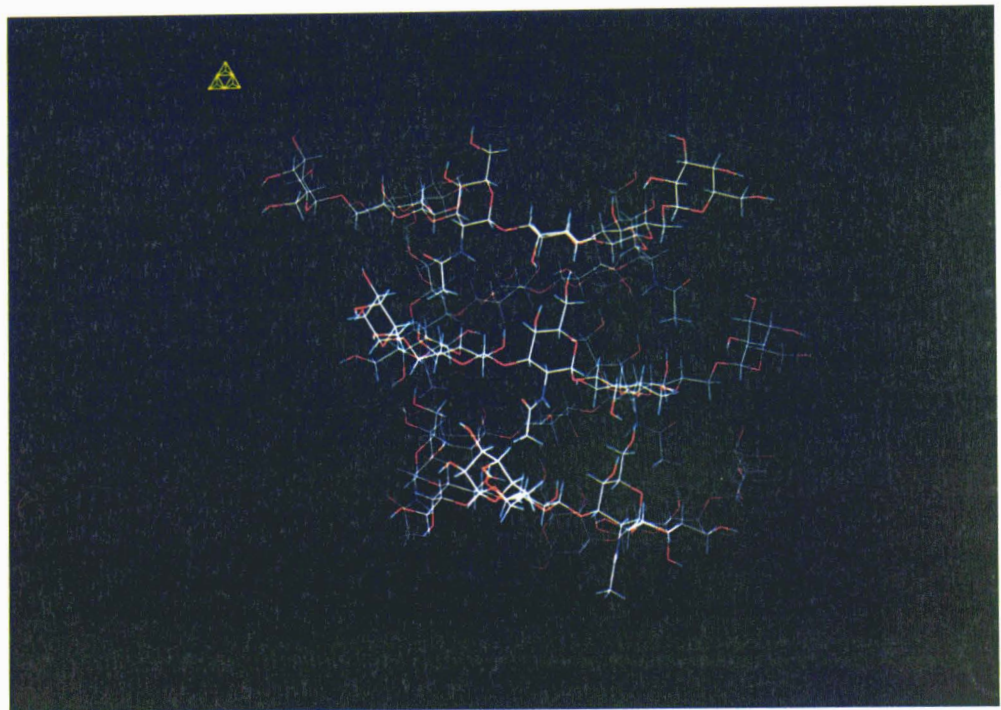


Figure 8: Modélisation moléculaire* d'un enchaînement de 6 unités tétrasaccharidiques de répétition du polysaccharide de *Streptococcus thermophilus*. a) Vue de face. b) vue de dessus.

* La modélisation moléculaire par ordinateur a été réalisée par le Professeur G. Vergoten, Faculté de Médecine, Lille.

**II. IDENTIFICATION, DOSAGE ET PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU
POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.**

A. IDENTIFICATION PAR HPLC DU POLYSACCHARIDE.

Le protocole expérimental d'obtention du polysaccharide tel que nous l'avons décrit dans la publication précédente nous permet d'isoler des quantités intéressantes d'hydrocolloïdes.

Cependant cette technique est beaucoup trop lourde pour être appliquée à des études comparatives de production de polysaccharides par des souches différentes de *Streptococcus thermophilus* ensemencé sur lait.

C'est pourquoi nous nous sommes efforcés de mettre au point une méthode d'identification et de dosage rapide du polysaccharide à l'aide d'une technique chromatographique qui associe l'échange d'ions et la gel filtration.

Cette méthode fait l'objet du deuxième article:

Article 2:

**RAPID ISOLATION AND ESTIMATION OF POLYSACCHARIDE FROM FERMENTED
SKIMMED MILK WITH *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* BY COUPLED ANION EXCHANGE
AND GEL-PERMEATION HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.**

soumis à *Journal of Dairy Research*.

RAPID ISOLATION AND ESTIMATION OF POLYSACCHARIDE FROM
FERMENTED SKIMMED MILK WITH STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS
BY COUPLED ANION EXCHANGE AND GEL-PERMEATION
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Thierry DOCO and Bernard FOURNET*.

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et
Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n° 217)
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Didier CARCANO, Patricia RAMOS and Alain LOONES.

SODIMA.

Centre de Recherche International André GAILLARD.
10, rue J-J. Rousseau, 94200 Ivry-sur-Seine.

* To whom all correspondence should be addressed.

SUMMARY.

A method for the rapid isolation and quantitative determination of *Streptococcus thermophilus* polysaccharide from small volumes of fermented skimmed milk using HPLC has been developed. The method involves analysis of the *Streptococcus* polysaccharide by sequential filtration, followed by high-performance liquid chromatography on anion exchange and gel-permeation coupled columns. This system allows to isolate rapidly small quantities of polysaccharide and to estimate the amount of polysaccharide produced in milk by several *Streptococcus* strains.

INTRODUCTION.

Dairy starter cultures that contain *Streptococcus thermophilus* and/or *Lactobacillus bulgaricus* capable of producing slime are commercially interesting. But information on the amount and chemical composition of polysaccharides produced by these lactic bacteria in fermented skimmed milk are lacking. Although reports concerning chemical composition of lactic bacteria exopolysaccharides ¹⁻¹⁰ produced in milk culture abound, only Giraffa and Bergère ⁷, Cerning *et al.* ⁸ and Doco *et al.* ^{9,10}, have stated the amount of polysaccharide excreted by *Streptococcus thermophilus* during the milk culture. This information appears crucial in regard to the yoghurt body and texture improvement that may be expected from the presence of these polysaccharides. Indeed, Cerning *et al.* ⁸ have described a direct relationship between viscosity of the skimmed milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and the amount of polysaccharide produced by these bacteria.

In this paper we describe a method for the rapid isolation and measure small amounts of *Streptococcus thermophilus* polysaccharide by HPLC.

EXPERIMENTAL.

Materials.

Ropy strains (CNCMI 733, CNCMI 734, CNCMI 735) of *Streptococcus thermophilus* were obtained from the private collection of the Centre National de Cultures de Microorganismes (Institut Pasteur, Paris).

A preculture was inoculated into sterilized reconstituted skimmed milk and fermented at 43°C down to pH 5.

Apparatus.

A model Spectra-Physics 8700 High-pressure liquid chromatograph equipped with a model LDC-Milton Roy variable-wavelength detector and Spectra-Physics 6040 differential refractometer were connected to two Spectra-Physics model 4290 computing Integrator. HPLC was performed on AX 300 Anion Exchange resin columns (250x4.6 mm, Brownlee Labs, Santa Clara, CA, USA) coupled with Biosil TSK 250 gel-permeation column (300x7.5 mm, Bio Rad, Saint Louis, MI, USA). The columns were equilibrated with phosphate buffer 0.05M, pH 6.5. Sample injections were performed using a sample loop valve equipped with a 500 µl loop (Valco Instrument, Houston, Tx, USA). Ten ml of milk fermented by strains of *Streptococcus* was sonicated with a Sonifer cell disruptor B30 during 5 min. The solution was spinned at 3000 rpm for 15 min and the supernatant was filtered on a 0.45 µm Millipore filter followed by filtration on Sep-Pak C18 Cartridges (Cartridges for rapid preparation , Waters).

0.4 ml fractions were subjected to HPLC using 0.05M phosphate buffer pH 6.5, the flow rate was 1 ml/min with the same buffer. After 3 injections the columns were washed by 0.5M NaCl in 0.05M phosphate buffer. Protein- and sugar-containing fractions were detected by absorption at 206 nm and by refractive index determination.

Quantitative determination of polysaccharides amounts were performed with control straight line obtained by injections of solution of standard polysaccharide (372 µg/ml) isolated from skim fermented milk with *Streptococcus thermophilus* by gel-permeation after pronase digest, trifluoroacetic acid precipitation of contaminating materials and ethanol precipitation ^{9,10}.

Sugar analysis.

The molar composition of monosaccharides was determined by Gas-liquid chromatography (GLC) of trifluoroacetylated methyl glycosides (MeOH/HCl 0.5N, 24h, 80°C) according to Zanetta *et al.* ¹¹ and by Gas-liquid chromatography of polyol acetates obtained after hydrolysis (TFA, 4N, 4 h, 100°C), reduction and peracetylation ¹².

RESULTS AND DISCUSSION.

Separation of the polysaccharide from the contaminating milk proteins was achieved by HPLC using an AX 300 anion exchange resin coupled to a TSK 250 gel-permeation column. Elution with phosphate buffer yields a sugar-containing fraction with a retention time of 6.5 min (Fig.1B).

This fraction has the same chromatographic behaviour as the polysaccharide isolated by gel-permeation after pronase digestion of *Streptococcus thermophilus* fermented skimmed milk ^{9,10}. (Fig.1A). This polysaccharide fraction (Fig.1B) was not contaminated by proteins which were eluted with a retention time of 15 min. The carbohydrate composition of the polysaccharide was determined by GLC (Table I). No difference was observed in the molar ratio of the standard polysaccharide

and the polysaccharides isolated by HPLC from fermented milk with several strains of *Streptococcus thermophilus*.

This technique allows to prepare repeatedly small amounts of polysaccharide (between 15 µg to 25 µg by each injection) from milk proteins by HPLC. As indicated in Table I, the strains 733, 734 and 735 of *Streptococcus thermophilus* yield about the same quantity of polysaccharides. Similar values were obtained by Giraffa and Bergère⁷ (< 40 mg/l) while Cerning et al.⁸ found after extensive dialysis of pronase digest polysaccharides amounts ranging from 14 mg to 40 mg/l.

The carbohydrate compositions listed in table I of *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide obtained by pronase digestion^{9,10} or HPLC from fermented skimmed milk are at variance with results reported by Oda et al.³, Schellhaass⁴ and recently by Cerning et al.⁸. In these papers, the authors do not report the presence of amino-sugars. Molar ratios between galactose and glucose the two majors neutral monosaccharide are also different: 1;2 for Oda et al.³, 2;1 for Shellhaass⁴ and about 1;1 for Cerning et al.⁸. In addition to these neutral monosaccharides Cerning et al.⁸ found small amounts of xylose, arabinose, rhamnose and mannose. These differences in monosaccharide composition of exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* originated from the use of different purification methods.

As far as we are concerned, we can observe that the molar carbohydrate composition of polysaccharides isolated by HPLC are the same with the control polysaccharide purified from fermented skimmed milk by gel-permeation after pronase digestion, trichloroacetic acid precipitation of contaminating materials and ethanol precipitation of *Streptococcus* polysaccharide^{9,10}.

ACKNOWLEDGMENTS.

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité associée au CNRS n°217; Directeur Professeur J. Montreuil), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois and by SODIMA, Centre de Recherche International André GAILLARD and by grant (n°338.86 to th.Dococ from the Association National pour la Recherche Technologique). The authors are grateful to Yves Leroy for his expert technical assistance.

REFERENCES.

- 1 M. Groux, *Schweiz. Milchzeit.*, 99 (1973) 18-20.
- 2 A.Y. Tamine and R.K. Robinson., *Milchwissenschaft.*, 33 (1978) 209-212.
- 3 M. Oda, M. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe and F. Tsuchiya, *Agric. Bio. Chem.*, 47 (1983) 1623-1625.
- 4 S.M. Schellhaass, (1983), *ph. D. Thesis.*, University of Minnesota, U.S.A.
- 5 M.C. Manca de Nadra, A.M. Staser de Saad, A.A. Pesce de Ruiz Holgado and G. Oliver, *Milchwissenschaft.*, 40 (1985) 409-411.
- 6 J. Cerning, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud and M. Landon, *Biotechnology letters.*, 9 (1985) 625-628.
- 7 G. Giraffa and J.L. Bergère, *Le Lait.*, 67 (1987) 285-298.
- 8 J. Cerning, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud and M. Landon, *Biotechnology letters.*, 10 (1988) 255-266.
- 9 European Patent n° 89 400 525.5 , 24th of February 1989.
- 10 T. Doco, J.M. Wieruszeski, B. Fournet, D. Carcano, P. Ramos and A. Loones, *Carbohydr. Res.*, submitted for publication.
- 11 J.P. Zanetta, W.C. Breckenridge and G. Vincendon, *J. Chromatog.*, 69 (1972) 291-304.
- 12 J. Montreuil, S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik and G. Strecker, in M.F. CHAPLIN and J.F. KENNEDY (Eds.), *Carbohydrate Analysis, a practical approach*, IRL, Pres. OXFORD, 1986, pp 143.

TABLE I:

Carbohydrate composition and weights of polysaccharides isolated from fermented skimmed milk with several strains of *Streptococcus thermophilus* by HPLC.

Samples	Yields (mg/ml)	Molar ratio *		
		Gal	Glc	GalNAc
Control **				
Strain 733	-	2.16	1	0.92
HPLC isolation				
Strain 733	40	2.19	1	0.92
Strain 734	67.3	1.91	1	0.77
Strain 735	53	2.2	1	0.77

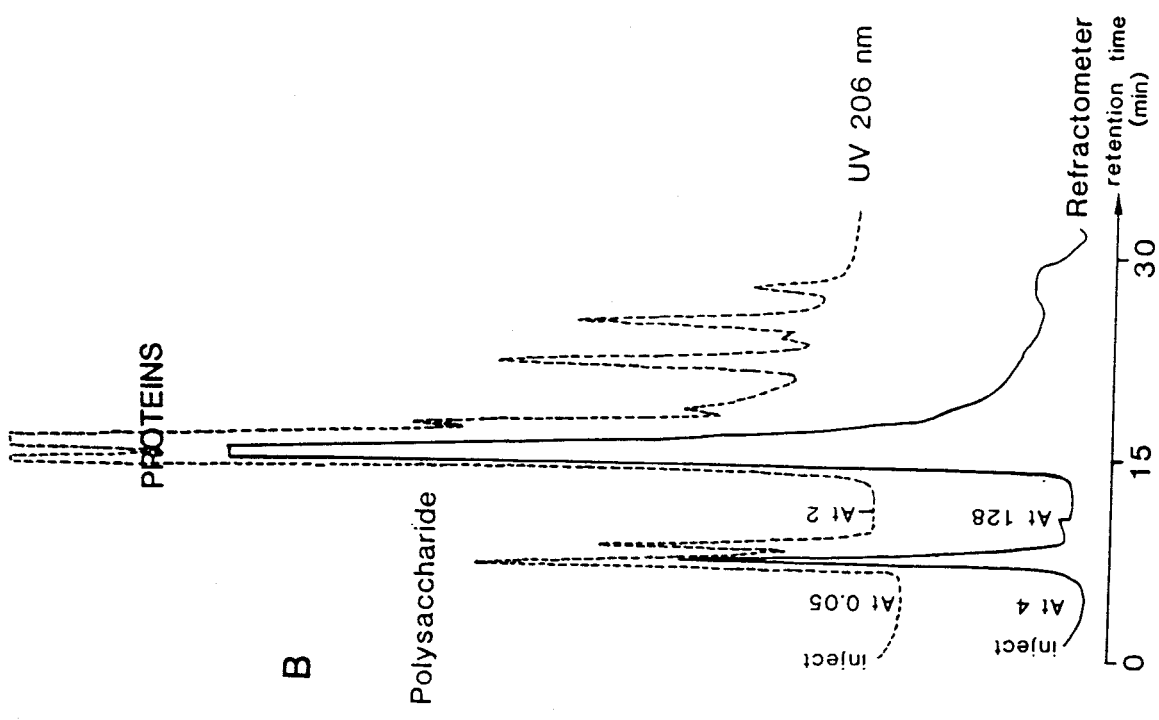
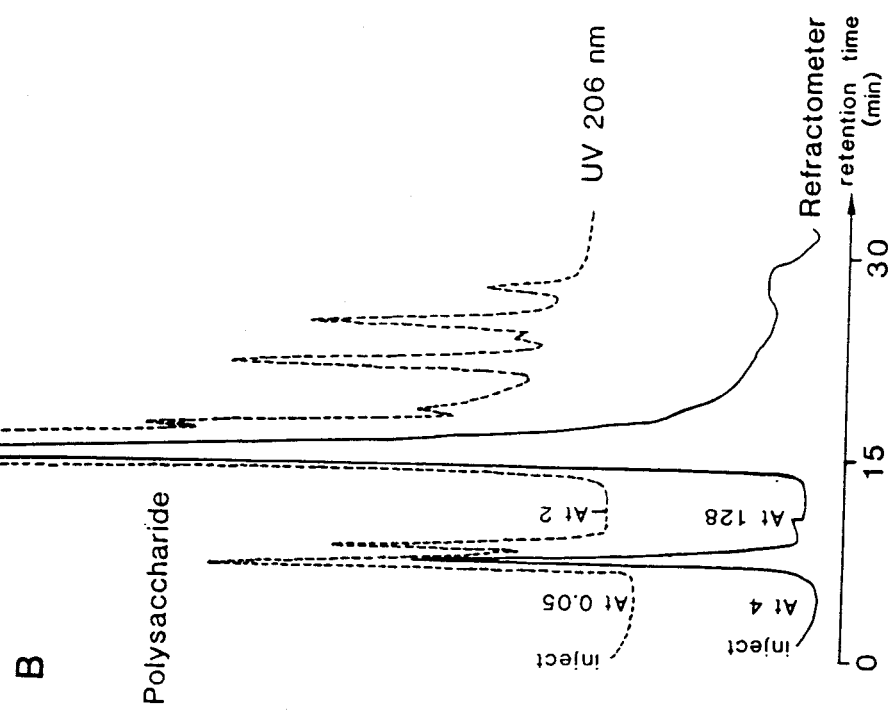
* The molar ratio of glucose (Glc) is taken as 1.

** Control: polysaccharide isolated by gel-permeation after pronase digestion of fermented skimmed milk with *Streptococcus thermophilus* strain 733.

Gal: Galactose; Glc: Glucose; GalNAc: N-acetylgalactosamine.

Figure Legend:

Figure 1: HPLC on coupled AX 300 Anion Exchange resin and TSK 250 gel-permeation columns of Control polysaccharide (A) and fermented skimmed milk fraction from *Streptococcus thermophilus* strain 733 (B). for experimental condition see Material and Methods.



Les conclusions que nous pouvons tirer de cette méthode sont les suivantes:

- Une méthode rapide de caractérisation et de dosage d'une macromolécule glucidique à partir d'un milieu complexe par HPLC d'échange d'ions et de tamisage moléculaire est décrite.

- L'exopolysaccharide isolé par la technique d'HPLC possède une composition en monosaccharides identique à celle décrite pour le polysaccharide isolé à l'aide du procédé classique (*Doco et al.*, 1989).

- La technique décrite permet l'isolement de petites quantités de polysaccharide (15 à 25 µg par injection) permettant d'effectuer la caractérisation de l'hydrocolloïde ainsi isolé par analyse de sa composition en monosaccharides.

- L'analyse de trois hydrocolloïdes isolés par différentes techniques d'HPLC à partir de lait fermenté par trois souches de *Streptococcus thermophilus* indique l'identité de composition en monosaccharides de ces polymères glucidiques, et permet d'envisager pour ces trois polymères des structures primaires identiques.

**B. ETUDE DES RELATIONS ENTRE QUANTITE DE POLYSACCHARIDES EXCRETES
PAR STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS ET POUVOIR TEXTURANT.**

La méthode d'identification et de dosage du polysaccharide dans le yaourt que nous avons mise au point, nous a permis d'effectuer

une étude comparative de production du polysaccharide sécrété par des Streptocoques seuls ou associés sur lait nature ou sucré.

Nous avons essayé de corrélér les quantités de polysaccharides obtenues avec des mesures de viscosité, en collaboration avec Didier Carcano (SODIMA-CRI)(Carcano, 1988).

1. Matériels.

Les clones de *Streptococcus thermophilus* type 14 et 17 ont été isolés à partir de la souche S22 (ferment SODIMA) par F. Gancel à l'Université de CAEN (Gancel, 1988).

Ils sont définis par l'auteur comme étant hyperproducteurs de polysaccharides sur milieu synthétique. Le clone de *Lactobacillus bulgaricus* P a été associé en symbiose pour deux essais. Enfin le ferment KA68 qui est utilisé actuellement dans la fabrication des yaourts bulgares a été choisi comme témoin externe.

2. Préparation de l'échantillon et Chromatographie Liquide Haute Pression.

Le protocole est celui décrit dans l'article 2 (p. 81).

Les valeurs des absorbances en UV et en indice de réfraction sont reportées sur une gamme d'étalonnage obtenue par injections de concentrations croissantes en polysaccharides de *Streptococcus thermophilus*

3. Résultats.

Les résultats obtenus pour les différents clones sont donnés dans le TABLEAU IX. p. 94.

Les conclusions que nous pouvons tirer de ce travail sont les suivantes:

- L'échantillon 12, qui correspond au yaourtensemencé par le ferment KA68, renferme le plus de polysaccharides. Ses caractéristiques rhéologiques sont supérieures à celles des autres laits fermentés: viscosité et coefficient de consistance élevés. La viscosité de cet échantillon (16900 cp) est la plus importante.

- La comparaison des 3 yaourts sucrés (Echantillons 12, 4 et 8) met en évidence des productions de polysaccharides comparables, mais rapportées aux nombres de bactéries, KA68 (échantillon 12) a un rendement supérieur en polysaccharides par cellule.

- L'association avec une souche de *Lactobacillus bulgaricus* P atténue les différences de concentrations en polysaccharides, et donne de bonnes valeurs de viscosité de 9800 à 15400 cp.

- Les clones de *Streptococcus thermophilus* seuls sur lait nature (Echantillons 7 et 10) ou sucré (Echantillon 4) donnent des quantités non négligeables de polysaccharides, mais une viscosité nulle ou négligeable (inférieure à 500 cp).

Tableau IX: Caractéristiques des cultures fermentées à l'aide des clones *Streptococcus thermophilus* 14 et 17, en association ou non avec *Lactobacillus Bulgaricus*.

Echantillons		Streptocoque nombre de C par ml	PS µg/ml	PS µg/C	Acidité Dornic	Viscosité en C p	Lactobacille nombre de C par ml
12 (lait sucré)		1.10^8	36	36.10^{-8}	120	16900	2.10^7
Clone 17	17(ST1)	1.10^7	3,3	33.10^{-8}	-	-	-
	7(lait)	2.10^8	41,5	20.10^{-8}	70	100	-
	4(lait sucré)	2.10^8	41,5	20.10^{-8}	60	800	-
clone 17 + lacto P	11(lait)	9.10^8	58,3	6.10^{-8}	117	9800	2.10^8
	8(lait sucré)	8.10^8	40	5.10^{-8}	115	13300	2.10^8
clone 14	14(ST1)	1.10^7	0,7	7.10^{-8}	-	-	-
	10(lait)	-	86,6	-	65	100	-
clone 14 + lacto P	9(lait)	-	45,9	-	125	15800	-
	3(lait sucré)	7.10^8	47	6.10^{-8}	120	15400	2.10^8

ST1: milieu synthétique; clone 14 et 17: souche de *Streptococcus Thermophilus*;
Lacto P: *Lactobacillus Bulgaricus* P; C: Cellule bactérienne; C_p: Centipoïse.

- La synthèse de polysaccharides par le clone 17 est plus importante quand celui-ci n'est pas associé au lactobacille (Echantillons 7 et 14 en comparaison avec les échantillons 11 et 8). Mais la valeur de viscosité est plus importante avec le lactobacille: 9800 cp sur lait nature et 13300 cp sur lait sucré. L'association avec le lactobacille pourrait avoir des conséquences négatives sur la production de polysaccharides par *Streptococcus thermophilus*.

- La quantité de polysaccharides plus élevée dans la culture obtenue avec le clone 17 sur lait (Echantillon 7) par rapport à la culture obtenue avec le clone 17 en association avec le lactobacille P sur lait (Echantillon 11) n'induit pas une texture supérieure; Ceci peut être dû à la différence d'acidité des cultures en fin de fermentation, qui influence l'agencement du réseau protéique. En effet on constate que la texture résultante de la fermentation par le Streptocoque seul est quasi liquide.

En conclusion, la technique de dosage et d'identification du polysaccharide par HPLC nous a permis de mener une première étude comparative de la quantité de polysaccharide dans les yaourts obtenus par ensemencement à l'aide de souches productrices et hyperproductrices.

Les premiers résultats obtenus sont significatifs et permettent de tirer des conclusions sur la variabilité clonale des streptocoques et sur l'influence du milieu de culture (lait nature ou sucré).

Par contre nous n'avons pas obtenu de relation directe entre la quantité de polysaccharides produite et la mesure de viscosité.

Ce que nous pouvons mentionner, c'est que la viscosité dépend de plusieurs éléments:

- la présence du lactobacille.
- une acidité Dornic suffisante (supérieure à 100).
- un Streptocoque producteur ou hyperproducteur.

C. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU POLYSACCHARIDE DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* EXTRAIT DU YAOURT.

1. Méthodes d'obtention du polysaccharide.

Le polysaccharide étudié a été obtenu suivant le protocole décrit au chapitre I,B. (p. 57).

2. Détermination de ses propriétés texturantes dans un solvant aqueux.

Le traitement d'un litre de lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* conduit à l'obtention d'environ 40 mg de polysaccharide bactérien purifié. La masse moléculaire de la macromolécule est d'environ 1.10^6 . Connaissant l'unité tétrasaccharidique de répétition,

nous pouvons envisager que le polymère est constitué de 1000 à 1500 unités de répétition.

D'autre part, la modélisation d'un enchaînement de 6 unités de répétitions tétrasaccharidique (figure 8 p. 79) permet d'envisager une conformation hélicoïdale pour l'édifice macromoléculaire qui devrait alors présenter, en solution des propriétés hydrodynamiques et épaississantes.

Cette étude a été entreprise en collaboration avec D. Carcano (Carcano, 1988) au laboratoire du professeur B. Launay de l'ENSIA, Massy.

Le premier objectif était la détermination de la viscosité intrinsèque ($[\eta_0]$) de la molécule, soit le volume hydrodynamique potentiellement occupé par la molécule dans un solvant.

a. Matériels.

La détermination de ($[\eta_0]$) nécessite des mesures de la viscosité apparente η_0 à plusieurs niveaux de concentration.

La viscosité intrinsèque est alors déterminée selon l'équation (1).

$$\frac{\eta_{\text{spo}}}{c} = ([\eta_0]) + \lambda([\eta_0])^2 \cdot c$$

avec

$$\eta_{\text{spo}} = \frac{\eta_0 - \eta_{\text{sol}}}{\eta_{\text{sol}}} \quad (1)$$

avec η_o = viscosité apparente de la solution.

η_{sol} = viscosité apparente du solvant.

C = concentration de la macromolécule dans le solvant.

η^{spo} = viscosité spécifique.

λ = coefficient de Huggins

L'indice o signifie que les valeurs de viscosité apparente sont déterminées aux faibles vitesses de cisaillement, c'est à dire dans le domaine newtonien dans le cas d'un comportement non-newtonien.

La détermination de $([\eta_o])$ est effectuée à l'aide d'un viscosimètre LOW-SHEAR 30 (Contraves).

Ce viscosimètre a la configuration d'un appareil de Couette dans lequel le gradient de vitesse est sensiblement constant. Ce gradient est engendré par le mouvement de rotation de deux cylindres coaxiaux, entre lesquels se trouve le liquide à étudier. Le cylindre intérieur est suspendu à un fil de torsion, le cylindre extérieur pouvant être animé d'un mouvement de rotation uniforme, de vitesse angulaire w connue.

Les couches périphériques sont entraînées par le cylindre extérieur et, par action de proche en proche, le cylindre intérieur tend à suivre le mouvement de rotation; le fil de suspension exerce un couple antagoniste qui va en croissant avec l'angle de rotation. En régime permanent, le cylindre intérieur prend une position d'équilibre fixe, telle que le couple de torsion du fil de suspension équilibre exactement les forces de frottement qui s'exercent sur toute la surface latérale du cylindre interne.

Cette variation du couple, mesurée par le fil de torsion, est traduite en viscosité.



Ce type de viscosimètre permet de travailler à de faibles gradients de cisaillement ($\tau = 0.01747 \text{ s}^{-1}$ à $\tau = 128.5 \text{ s}^{-1}$).

Le solvant utilisé est un tampon citrate-phosphate de pH 4,4. Les concentrations respectivement utilisées en polysaccharides sont de 5000 ppm (0,5%), 3333 ppm (0,33%) et 1000 ppm (0,1%).

b. Résultats.

Les rhéogrammes η en fonction de $\dot{\gamma}$ (Figure 9 p. 100) permettent de déterminer les zones newtoniennes d'écoulement. Sur le tableau suivant sont réunies, pour les trois concentrations, les valeurs de la viscosité spécifique newtonienne de la solution de polysaccharides:

Concentration [PS]	C (%)	0,100	0,333	0,500
Viscosité spécifique	$\eta_{\text{spo}}/C \text{ (\%}^{-1}\text{)}$	2,3	3,87	4,7

Dans ces conditions, la viscosité intrinsèque du polysaccharide déterminé sur la Figure 10 p. 101 est de 1,75 dl/g.

c. Conclusion.

Ce polysaccharide isolé d'un lait fermenté par *Streptococcus thermophilus*, possède une viscosité intrinsèque supérieure par exemple à celle de l'amylose, épaississant exogène pour desserts lactés, qui est de 1,54 dl/g dans KCl 3,3M, mais très faible par rapport au xanthane.

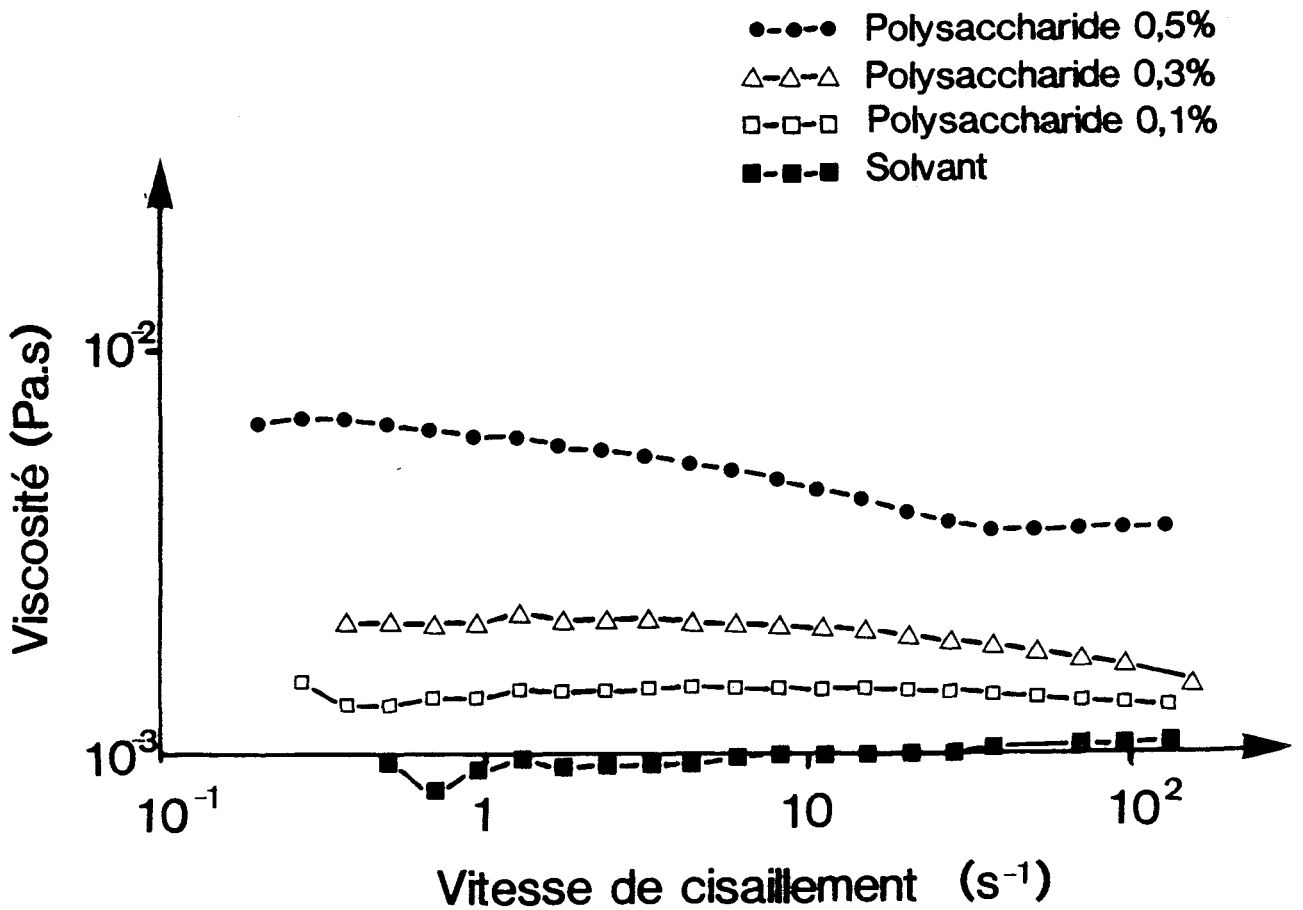


Figure 9: Diagramme des viscosités apparentes du polysaccharide de *Streptococcus thermophilus* à des concentrations différentes, à 20°C dans un solvant citrate-phosphate pH 4.

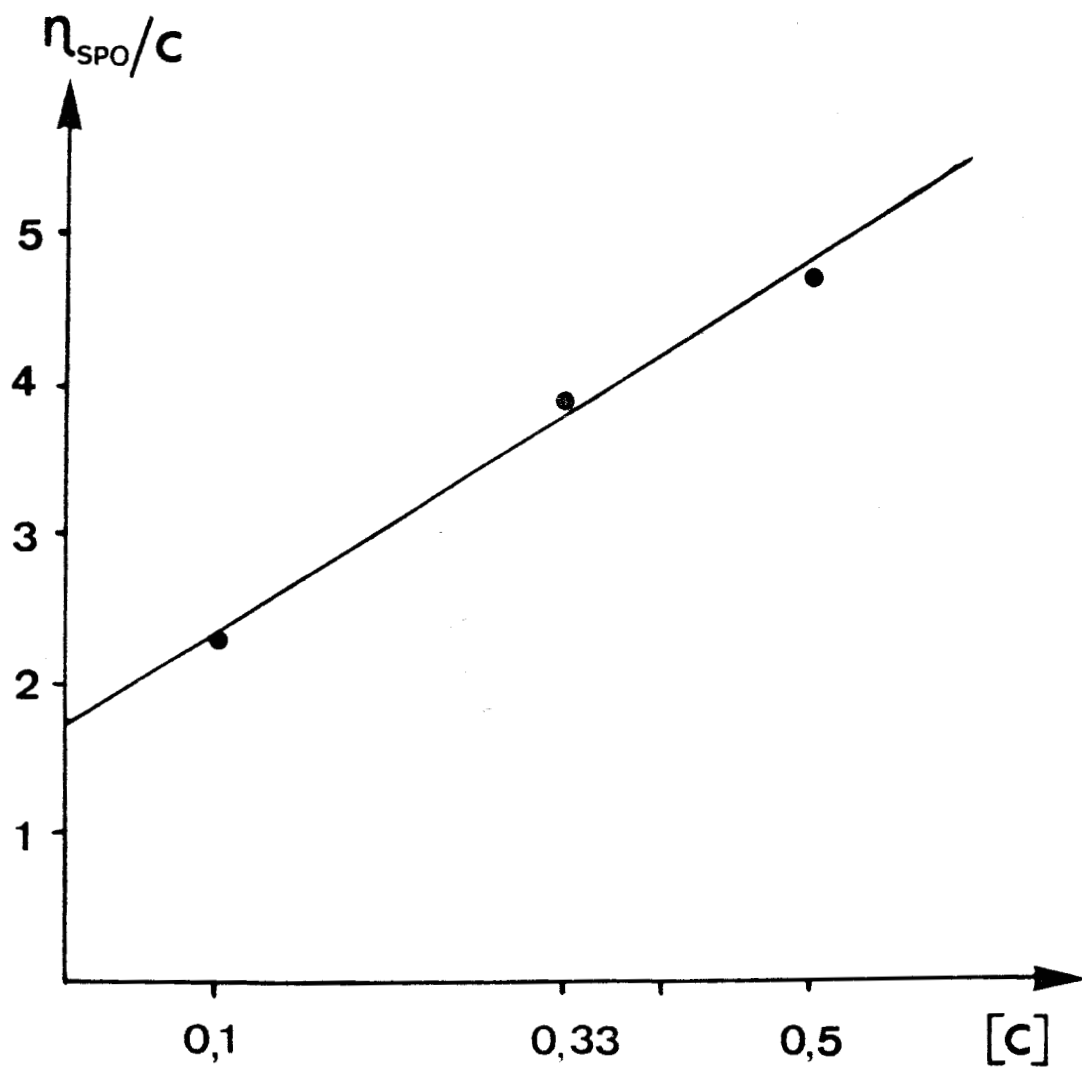


Figure 10: viscosité intrinsèque du polysaccharide de *Streptococcus thermophilus* en fonction de sa concentration.

3. Détermination de ses propriétés texturantes dans un yaourt à boire.

Nous avons voulu étudier l'incidence d'une addition de polysaccharides produits par *Streptococcus thermophilus* sur les propriétés rhéologiques d'un "yaourt à boire".

L'objectif était de mettre en évidence le pouvoir texturant du polysaccharide isolé tel que décrit dans le chapitre I.B.p. 57, lyophilisé et remis en solution dans un yaourt à boire.

a. Matériels^{*}.

Le polysaccharide isolé a été mis en solution, dans un tampon citrate-phosphate à pH 4, sous forme d'une solution mère à 0,5%.

Nous avons ajouté cette solution mère dans le yaourt liquide, de façon à atteindre une concentration finale de polysaccharides ajoutés de 0,025%. A titre de témoin, nous avons ajouté une même quantité du tampon dans un "yaourt à boire".

La composition du yaourt à boire était la suivante:

- lait à 20 gr/l de matière grasse : 97 %
- ferment lactique : 3 %

Les mesures de viscosité sont réalisées au Rhéomètre "Low Shear 30" contraves.

* Les expérimentations ont été effectuées dans le laboratoire du Professeur B. Launay, à l'ENSIA de Massy.

b. Résultats.

La viscosité du yaourt contenant le polysaccharide est plus élevée par rapport au yaourt ne contenant pas de polysaccharide.

Ainsi on observe, pour une vitesse de cisaillement de 6 s^{-1} , que la viscosité du yaourt additionné de polysaccharides est égale à 285 mPa.s, alors que celle du témoin n'était que de 215 mPa.s (**Figure 11** p. 104).

Malheureusement, la très faible quantité de polysaccharides disponible pour la mesure ne nous a pas permis de pousser plus à fond notre série d'essais

c. Conclusions.

Ces premiers résultats, relatifs à l'augmentation de la viscosité dans le yaourt par ajout de polysaccharides sont très encourageants. La quantité de polysaccharide disponible étant très faible, il n'est pas possible de tirer des conclusions définitives.

Cette expérience devra être reprise en augmentant la quantité de polysaccharides additionnés.

D. CONCLUSIONS.

Les conclusions que nous pouvons tirer sur le dosage et les propriétés rhéologiques du polysaccharide excrété dans un milieu lacté par *Streptococcus thermophilus* sont les suivantes:

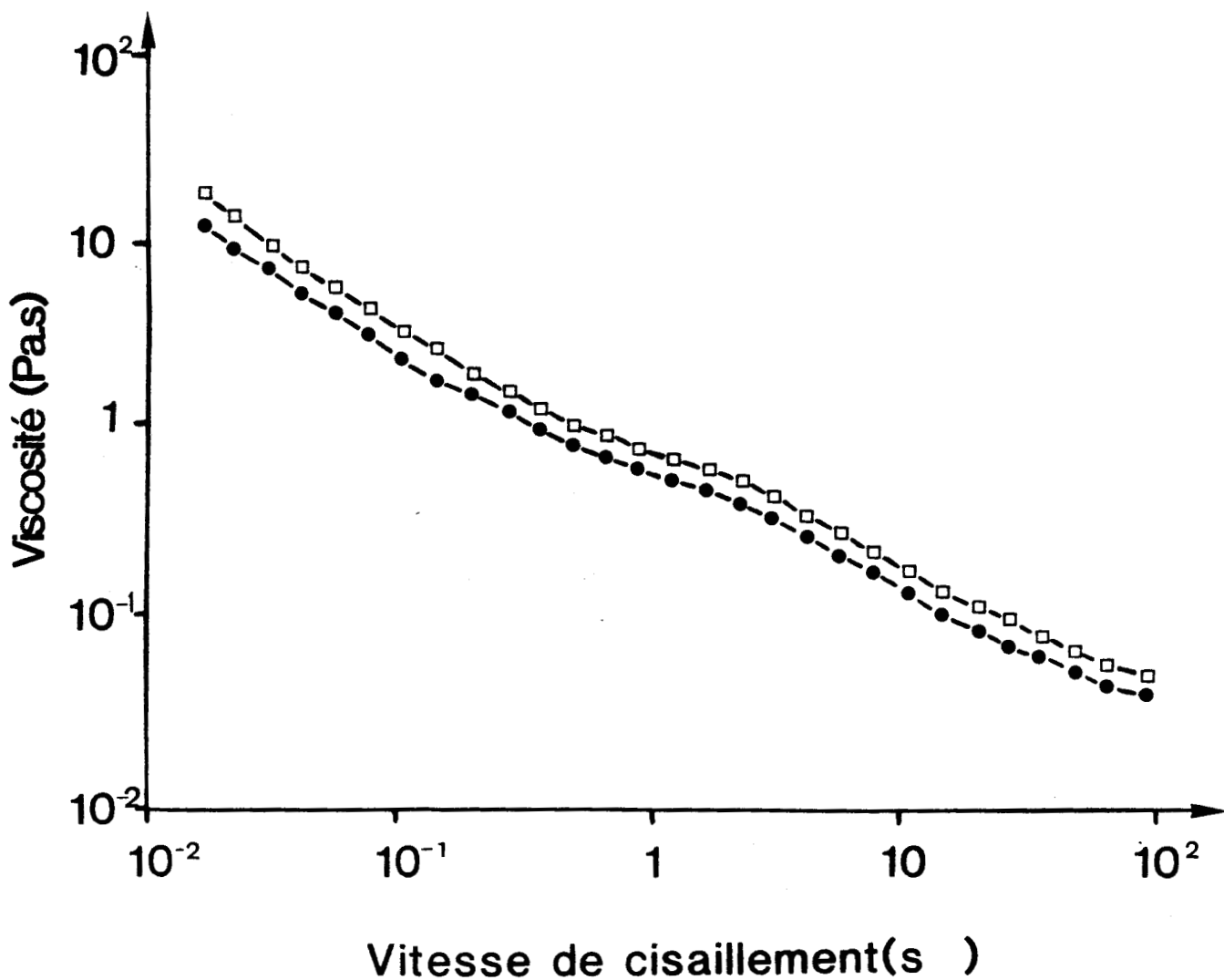


Figure 11: Comparaison des rhéogrammes obtenus à partir du yaourt liquide (●-●-●) et du yaourt liquide additionné de polysaccharide à raison de 0,025 % (□-□-□).

- Les techniques modernes de chromatographie liquide haute performance nous ont permis d'identifier et de doser le polysaccharide excrété par *Streptococcus thermophilus* dans un milieu aussi complexe que le lait.

- Nous n'avons pas pu relier d'une façon nette l'augmentation de la viscosité d'un lait fermenté avec l'augmentation de l'excrétion de l'hydrocolloïde bactérien. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Chalet-Wagner, 1979; Schellhass, 1983** et **Gancel, 1988**. Cependant, il fut mentionné à ce niveau les travaux de **Cerning et al., (1988)**, qui indiquent une certaine relation entre viscosité du lait fermenté et production de polysaccharide.

- L'hydrocolloïde isolé du lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* possède des propriétés de viscosité intrinsèque supérieures à l'amylose, sans toutefois atteindre celles du xanthane.

L'ajout de cette molécule dans un lait de type "yaourt à boire" augmente d'une façon discrète la viscosité de ce dernier, indiquant les interactions de la macromolécule avec les constituants du lait.

Toutefois il faut considérer que la construction de ce réseau est un phénomène dynamique, qui résulte de l'interaction entre chaîne polysaccharidique en cours de synthèse, et les protéines du lait

Il est en conséquence très difficile de conclure sur des expériences qui reproduisent de façon très différente ce qui s'effectue durant la fermentation du lait par les bactéries lactiques.

III. MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ISOLEMENT EN GRANDE
QUANTITE DU POLYSACCHARIDE EXCRETE DANS LE MILIEU LACTE
PAR STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.

Les techniques d'isolement de polysaccharides à partir de lait fermenté par hydrolyse protéolytique des protéines du lait suivie d'échange d'ions et de gel filtration sont extrêmement longues et ne permettent pas , compte tenu de la concentration du polysaccharide (40 mg/litre) d'isoler des quantités significatives d'hydrocolloïdes. Or nous avons pu voir dans le chapitre précédent que les études rhéologiques nécessitent des quantités de polysaccharides importantes.

D'autre part, sur la base de nos connaissances des propriétés pharmacologiques des polymères glucidiques, il nous a paru intéressant de regarder les propriétés antitumorales de ce polysaccharide.

De telles études nécessitent là aussi des quantités importantes de molécule. C'est pourquoi nous avons entrepris de produire cette macromolécule par un procédé qui, en continu, concentre le polysaccharide tout en éliminant les protéines par hydrolyse enzymatique couplé à un module d'ultrafiltration.

Ce travail fait l'objet d'un article accepté à *Biotechnology
Technics*.

Article 3:

**PREPARATION OF POLYSACCHARIDE FROM *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* BY AN
ENZYMATIC ULTRAFILTRATION REACTOR.**

PREPARATION OF POLYSACCHARIDE FROM STREPTOCOCCUS
THERMOPHILUS USING AN ENZYMATIC ULTRAFILTRATION REACTOR.

Thierry DOCO¹, Jean Marie PIOT², Didier GUILLOCHON²,
Didier CARCANO³, Patricia RAMOS³, Alain LOONES³
and Bernard FOURNET^{1*}.

*
1. Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et
Techniques de Lille Flandres-Artois et Unité Mixte n°111 du CNRS
(Directeur Professeur J.Montreuil) 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex.
2. Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT A,
LILLE I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cédex. 3. SODIMA-CRI ANDRE
GAILLARD, 10 rue Jean-Jacques Rousseau, 94200 Ivry sur Seine.

SUMMARY.

The polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* on skim
milk is isolated by a continuous enzymatic hydrolysis using enzymatic
reactor coupled to an ultrafiltration module. Using this procedure 338
mg of polysaccharide were obtained from 450g of fermented milk powder.

INTRODUCTION.

The use of slime producing bacteria in the Dairy industry is impor-
tant with respect to the improvement of body and texture of yoghurt.
Streptococcus thermophilus and *Lactobacillus bulgaricus* used in Dairy
starter cultures produced polysaccharides which have been studied by
many authors (Schellhaass, 1983; Manca de nadra et al. ,1985; Giraffa &
Bergère, 1987; Cerning et al. ,1986, 1988;).

In a previous paper, (Doco et al., 1989a; 1989b) we have reported
the purification, identification and primary structure of a polysaccha-
ride produced by the ropy strain of *Streptococcus thermophilus*. However
only limited quantities of polysaccharide could be isolated by using this
technique.

In the present paper, we describe a technique to produce large
amounts of polysaccharide from milk fermented by *Streptococcus*
thermophilus. The procedure is based on continuous enzymatic hydrolysis
of proteins coupled to an ultrafiltration module. The latter was
designed to eliminate small peptides and concentrate polysaccharide of
high molecular weight in the reactor. By developing this method we have

significantly decreased the time previously required to isolate the polysaccharide (Doco et al., 1989a; 1989b).

MATERIALS AND METHODS.

Bacterial strains. Ropy strains (CNCMI 733, CNCMI 734, CNCMI 735) of *Streptococcus thermophilus* were obtained from the private collection of the Centre National de Cultures de Microorganismes (Institut Pasteur, Paris). A preculture was inoculated into sterilized reconstituted skimmed milk (140 gr/l) and fermented at 43°C down to pH 5.

Enzymatic ultrafiltration reactor. The enzymatic ultrafiltration reactor (Fig. 1) was constituted by a 4 liters reactor coupled via a circulating pump (Minitan, Millipore, Bedford, MA, USA) to an ultrafiltration module (Minitan, Millipore) equipped with ten PTGC-OM4 membranes (Millipore) giving total filter surfaces of 600 cm² with nominal molecular weight cut-off of 10.000 daltons. The pH value was controlled by a pH-stat (Titrator model TR150, Schott Geräte, Mainz, RFA) connected to

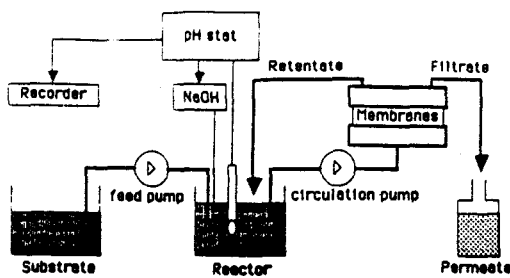


Figure 1. Scheme of the enzymatic ultrafiltration reactor

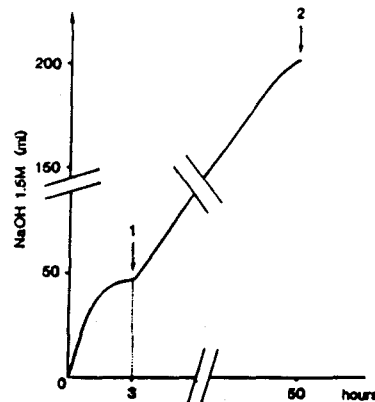


Figure 2 Consumption of NaOH during continuous hydrolysis of fermented milk by Pronase (1: ultrafiltration and addition of substrate; 2: diafiltration)

a burette model TA 50 (Schott Geräte) and a recorder 2210 (LKB-Pharmacia, Stockholm). The enzymatic ultrafiltration reactor was supplied in substrate by the feed pump (Gilson minipuls 2, Villiers le Bel, France).

Continuous enzymatic hydrolysis. Before proteolytic digestion, the fermented milk was dialyzed 3 days at 4°C against distilled water and 30 g worth of freeze-dried powder were dissolved in the reactor by 3 liters of calcium acetate buffer 10 mM at pH 8 and heated at 40°C. 60 mg of Pronase (500,000 Units, Activity 102 PUK/mg at 40°C, pH 7.5, Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A) are added. After 3 hours hydrolysis at pH 8, the peptides were continuously eliminated by ultrafiltration and the level in the enzymic reactor was maintained by the addition of fermented milk (10 g/l in calcium acetate buffer 10 mM, pH 8). The ultrafiltrate flow rate was 840 ml/h. The continuous enzymatic hydrolysis was performed during 50 hours. The retentate was then desalted by diafiltration using 12 liters of distilled water and then concentrated to 500 ml by ultrafiltration.

Isolation of polysaccharide. The retentate was treated by 10% trichloroacetic acid. After neutralization using NH₄OH, the high

molecular weight compounds were precipitated by adding 3 vol. of ethanol. This procedure was repeated three times. The precipitate (1 g) was dissolved in 50 mM TRIS-HCL Buffer, pH 8.6 and applied on a column of DEAE-Tris Acryl (0.39x39 cm, IBF, Villeneuve la Garenne, France) equilibrated with the same buffer. The fractions retained in the column were eluted with the same buffer containing 1M NaCl. Retained fraction and non-retained fraction (polysaccharide) were dialyzed against water and freeze-dried. The non retained fraction was purified by gel-permeation on Sepharose 4B (92x1.8 cm) using 5 mM phosphate buffer at pH 6.15.

Carbohydrate analysis. Qualitative and quantitative sugar analysis were carried out after methanolysis (MeOH/HCl 0.5M, 24 h, 80°C) by gas-liquid chromatography of pertrifluoroacetylated methylglycosides according to Zanetta *et al.* (1972) and after hydrolysis (TriFluoroAcetic Acid, 4M, 4h, 100°C) by gas-liquid chromatography of polyol-acetates (Montreuil *et al.* 1986).

RESULTS and DISCUSSION.

Pronase digestion of milk proteins was followed by the consumption of NaOH (see Figure 2). After 3 hours the curve reached a plateau indicating that the concentration of substrate was decreasing in the reactor. In order to maintain a constant rate of hydrolysis, ultrafiltration was started simultaneously with the addition of substrate. Under these conditions 45 l of fermented milk (10 g/l) were Hydrolysed. After ultrafiltration, the high molecular weight compounds which had accumulated in the reactor (6.02 g) were obtained by ethanol precipitation. Figure 3 gives the elution pattern of the ethanol

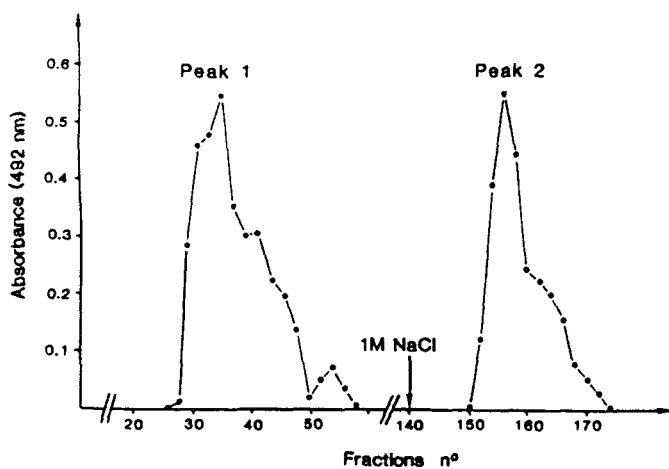


Figure 3: DEAE-Tris Acryl column chromatographic elution pattern of the ethanol precipitated enzymatic hydrolysate from fermented milk

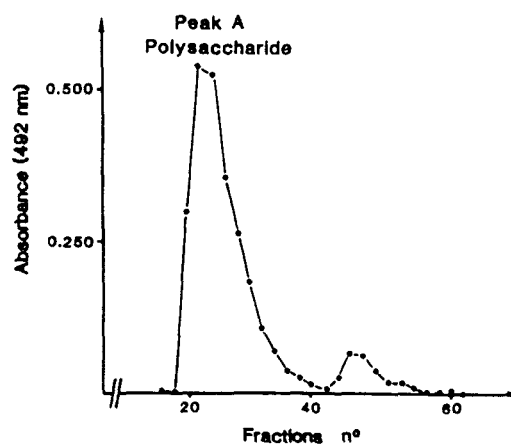


Figure 4: Purification of polysaccharide on Sepharose 4B of DEAE-Tris Acryl Peak 1

precipitate on DEAE-Tris Acryl showing the non-retained Peak 1 constituted by the polysaccharide. This fraction was further purified on Sepharose 4B (Figure 4). The polysaccharide eluted as peak A displays the same carbohydrate composition as was previously described (Doco *et*

al. 1989a; 1989b) namely: glucose, galactose and N-acetylgalactosamine with molar ratios of 1; 1.95; 0.9 respectively.

Using these conditions we obtained 338 mg of polysaccharide from 450 g of fermented milk powder. The previous experimental conditions (Doco et al. 1989a; 1989b) yielded only 42 mg from 115 g of fermented milk powder. Thus the use of a continuous enzymatic ultrafiltration reactor allows us to double the polysaccharide yield (0.075 g / 100 g) by comparison with the classical procedure (0.036 g/ 100 g) (Doco et al. 1989a; 1989b). These polysaccharide yields compare favorably with those obtained by Tsuchiya et al. (1981) for MPS-80 polysaccharide isolated from whey powder solution inoculated with *Streptococcus thermophilus*. However the carbohydrate composition of the MPS-80 polysaccharide is different in composition (glucose: 2.2; galactose: 1) than our polysaccharide. We obtained about three times more polysaccharide than Cerning et al. (1988) and Giraffa & Bergère. (1987) with a different carbohydrate composition (glucose: 1; galactose: 1 and minor others monosaccharides, CERNING et al. 1988).

ACKNOWLEDGMENTS:

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte n° 111: Directeur Professeur J. Montreuil), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois and by SODIMA-Centre de Recherche International André Gaillard and by a grant (n°338.86 to Th. DOCO from the Association National pour la Recherche Technologique).

REFERENCES.

- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., and Landon, M. (1986) *Biotech. Lett.* **8**, 625-628.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., and Landon, M. (1988) *Biotech. Lett.* **10**, 255-260.
- Doco, T., Piot, J.M., Guillochon, D., Carcano, D., Ramos, P., Loones, A., and Fournet, B., (1989a) European patent n° 98 400 525.5, 24.02.89.
- Doco, T., Wieruszkeski, J.M., Fournet, B., Carcano, D., Ramos, P., and Loones, A., (1989b) *Carbohydr. Res.* accepted for publication.
- Giraffa, G., and Bergère, J.L. (1987) *Le Lait.* **67**, 559-574.
- Manca de Nadra, M.C., Staser de Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., and Oliver, G. (1985) *Milchwissenschaft.* **40**, 409-411.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., and Strecker, G. (1986) in CHAPLIN, M.F., and KENNEDY, J.F., (Eds.) *Carbohydrate Analysis, a practical approach*, pp 143., IRL, Press. Oxford.
- Schellhaass, S.M. (1983) *Ph. D. Thesis.*, University of Minnesota, U.S.A.
- Tsuchiya, F., Miyaza, K., Kambe, M., Oda, M., and Ebisawa, N., (1981) UK PATENT APPLICATION N°8135111.
- Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C., and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatog.* **69**, 291-301.

Dans cet article, nous avons décrit une technique de production du polysaccharide à partir de lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* mettant en oeuvre un réacteur enzymatique couplé à un module d'ultrafiltration.

Ce protocole expérimental permet de multiplier par 2 le rendement en polysaccharides par rapport à la technique décrite précédemment (Doco *et al.*, 1989): 0,075 g/100g au lieu de 0,036 g/100g.

D'autre part, cette technique en continu permet de traiter des volumes importants de lait fermenté (hydrolyse protéolytique sur 45 litres de lait fermenté en 50 h) en des temps relativement courts, ce qui conduit à la préparation de quantités importantes de polysaccharides.

IV. MISE EN EVIDENCE DE PROPRIETES ANTITUMORALES DU POLYSACCHARIDE DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.

Il est connu depuis plus de 20 ans que les macromolécules glucidiques possèdent des effets antitumoraux. C'est ainsi que Ikekawa *et al.*, (1968; 1969) ont montré que des extraits aqueux de champignon de la famille des *Polyporaceae* inhibent la croissance de tumeurs solides du Sarcome 180 implantées chez la souris. Cette activité a été attribuée à un (1→3)-β-D-glucanne synthétisé par ce champignon. Depuis, de nombreux autres polysaccharides isolés de diverses sources: levures, champignons, algues, bactéries, ont présenté des propriétés antitumorales similaires (Whisher *et al.*, 1976; Bishop et Jennings, 1982).

En ce qui concerne les polymères glucidiques produits par les bactéries lactiques, *Tsuchiya et al.*, (1981) reportent pour la première fois des activités antitumorales pour un polysaccharide appelé MPS-80 isolé de petit lait fermenté par *Streptococcus thermophilus*.

Nous avons démontré que notre polysaccharide possédait une activité antitumorale. Ce travail a pu être effectué grâce à une collaboration avec le Professeur G. Franz de l'Université de Regensburg (RFA)*.

1. Matériels.

100 mg de polysaccharide sont dissous dans une solution de NaCl à 0,9 %, à une concentration de 1 mg/ml.

La tumeur utilisée est un sarcome 180/CD1 implanté chez la souris.

Les souris sont divisées en 4 lots:

- 1 lot témoin qui ne reçoit que des injections de NaCl.
- 3 lots de Souris recevant respectivement 0,2 mg, 1 mg et 5 mg/ Kg et par jour de polysaccharide par voie péritonéale.

Le traitement commence 24 h après l'inoculation de la tumeur chez la Souris. L'injection de polysaccharide est quotidienne pendant 10 jours. La tumeur est prélevée au bout de 30 jours, et pesée.

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau X (p. 113) et la figure 12 (p.114).

* Universität Regensburg, Institut Für Pharmazie Universitätsstrasse

TABLEAU X: Evaluation du poids des tumeurs prélevées chez la Souris
30 jours après le début du traitement.

Substance	Dose mg/Kg	moyennes des poids de tumeurs	Inhibition ^a %	régression ^b complète
Témoin	-	8,80	-	0/14
Polysaccharide	0,2	5,95	32	2/10
	1	4,61	48	0/7
	5	2,37	73	4/10

^a $(C-T/C) \times 100$; C = moyenne du poids des tumeurs du groupe témoin;

T = moyenne du poids des tumeurs des groupes traités.

^b Nombre de Souris sans tumeur/ Nombre de Souris traitées.

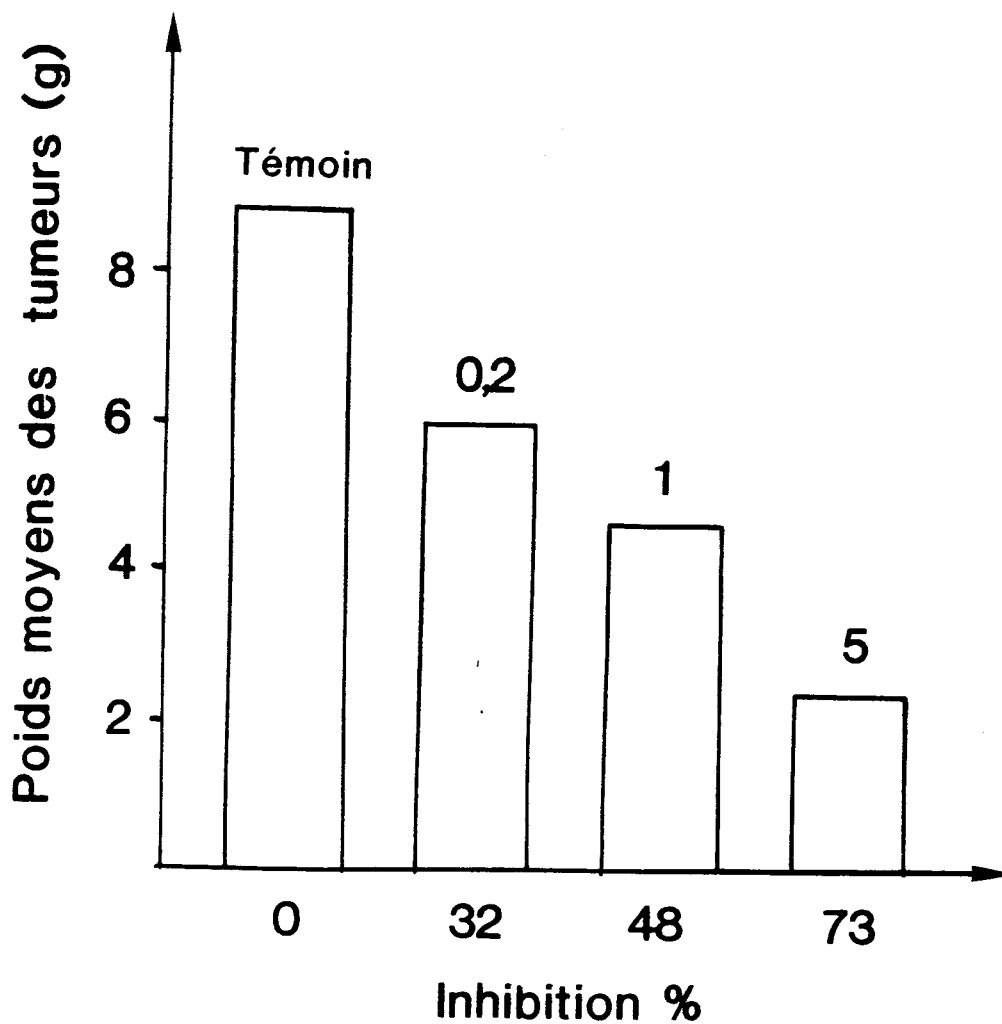


Figure 12: Poids moyen des tumeurs obtenus 30 jours après l'implantation, sans injection de polysaccharide (témoin) et avec injection de polysaccharide à raison de 0,2, 1 et 5 mg/ Kg par jour, pendant 10 jours.

2. Discussion.

A J+30, pour des doses comprises entre 0.2 à 5 mg/kg d'exopolysaccharide de *Streptococcus thermophilus*, nous constatons une augmentation du pourcentage d'inhibition de croissance de la tumeur de 32 à 73 %.

On constate donc une activité antitumorale non négligeable, qui reste toutefois faible par rapport à celle que l'on observe avec les β 1-3, β 1-6 glucanne tel le schizophyllane produit par *Schizophyllum commune* (Matsuo *et al.*, 1982) qui inhibe la tumeur à 60%-70% pour des doses de 0,2 mg/ Kg. Latgé *et al.*, (1988) démontrent une activité immunostimulante, supérieure pour un β 1-3, β 1-6 glucanne isolé de *Nomuraea rileyi*, qui inhibe totalement le développement des tumeurs pour des concentrations de polysaccharides comprises entre 0,2 à 5 mg/Kg.

Enfin, si nous comparons nos résultats à ceux de Tsuchiya *et al.*, (1981) qui ont travaillé sur le même modèle expérimental, nous constatons qu'il obtient le même nombre de survivants (4/10) mais pour des injections de polysaccharides 10 fois plus importantes (50 mg/Kg/jour).

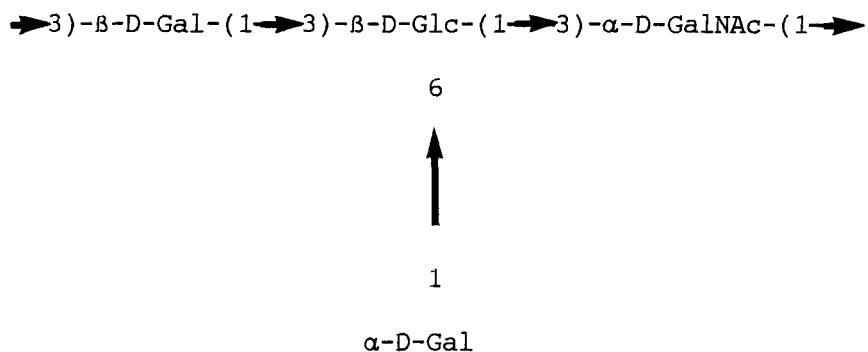
Ces premiers résultats indiquent donc que l'exopolysaccharide excrété au cours de la fermentation sur milieu lacté par *Streptococcus thermophilus* possède des propriétés antitumorales dues à une stimulation globale du système immunitaire. De telles expériences doivent être reproduites à l'aide du même modèle expérimental et également sur d'autres sarcomes comme le fibrosarcome DBA₂/ McSc₁.

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons dégager de ces travaux sont les suivantes:

1- L'isolement et la structure primaire du polysaccharide excrété dans un milieu lacté par *Streptococcus thermophilus* sont décrits. L'utilisation des méthodes chimiques et spectroscopiques a permis de déterminer la structure de l'unité tétrasaccharidique de répétition:



C'est à notre connaissance la première structure primaire d'exopolysaccharide de bactérie lactique déterminée.

2- la modélisation d'un enchaînement de 6 unités tétrasaccharidiques de répétitions permet d'envisager une structure hélicoïdale pour l'édifice macromoléculaire. Cette conformation spatiale est responsable des propriétés hydrodynamiques de la macromolécule glucidique dans son milieu.

3- La mise en oeuvre d'une technique rapide de dosage du polysaccharide excrété dans le milieu lacté nous a permis de mener une étude sur la production de polysaccharide par des souches de *Streptococcus thermophilus* productrice et hyperproductrice et sur la viscosité du lait fermenté. Comme **Chalet-Wagner, (1979); Schellhass, (1983)** et **Gancel (1988)**, nous n'avons pu relier d'une façon nette l'augmentation de viscosité du lait fermenté à une augmentation de l'excrétion du polysaccharide. Ces résultats, qui semblent être en désaccord avec ceux de **Cerning et al., (1988)**, doivent être cependant nuancés compte tenu de la complexité du milieu lacté et de l'intervention dans la structure du coagulum à la fin de la fermentation de nombreux facteurs comme le pH, la température, la présence ou l'absence de lactobacille etc...

4- Les propriétés rhéologiques indiquent que l'hydrocolloïde polysaccharidique isolé à partir d'un lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* présente une viscosité supérieure à celle de l'amylose mais cependant nettement plus faible que celle du xanthane. L'addition de cette macromolécule à du "yaourt à boire" augmente la viscosité du produit.

Ces études physiques devront toutefois être confirmées par des expériences menées avec des quantités de polysaccharide supérieures à celles que nous avons utilisées. Cependant les premiers résultats, confortés par les images de la conformation spatiale de la macromolécule glucidique, démontrent l'importance de ce polysaccharide dans les interactions moléculaires conduisant à la structure du yaourt.

5- La nécessité d'avoir à notre disposition des quantités importantes de polysaccharides pour les études rhéologiques et pharmacologiques nous a conduit à mettre au point une technique

d'hydrolyse en continu des protéines du lait fermenté permettant grâce à un module d'ultrafiltration de concentrer les macromolécules glucidiques.

Ce procédé, par rapport à la technique classique, possède l'avantage de pouvoir traiter de grands volumes de lait fermenté et en conséquence d'obtenir des quantités significatives de polysaccharides.

En effet, il permet de doubler les rendements en polysaccharides.

6- Les premières études menées sur le pouvoir antitumoral du polysaccharide isolé du laitensemencé par *Streptococcus thermophilus* sont positives. Nous observons une diminution du poids, voire une inhibition complète des tumeurs de Sarcome 180 implantées chez la souris pour des doses injectées de polysaccharide de 5 mg/Kg/jour.

Ces propriétés antitumorales, dues à une stimulation globale du système immunitaire sont toutefois plus faibles que celles observées sur des modèles expérimentaux identiques, par des β 1-3, β 1-6 glucannes isolé de champignons. Nos résultats sont toutefois supérieurs à ceux décrits en 1981 par **Tschiya et al.**. Il apparait de ces travaux que le polysaccharide excrété par *Streptococcus thermophilus* possède de réelles propriétés antitumorales.

Enfin, il est intéressant de constater que les propriétés sont portées par une macromolécule glucidique qui possède une conformation spatiale hélicoïdale très semblable à celle d'hydrocolloïdes polysaccharidiques immunostimulants tel le schizophylanne. Un tel rapprochement entre conformation et propriété antitumorale a déjà été évoqué par **Franz (1987)**.

Ces résultats ont été obtenus sur du lait fermenté par un seul genre: *Streptococcus thermophilus*. Nous avons commencé à isoler et étudier le polysaccharide excrété dans le laitensemencé par *Lactobacillus bulgaricus*. Le deuxième stade de l'étude concernera les effets de la culture mixte, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* sur la production du ou des polysaccharide(s) dans le yaourt, la structure des hydrocolloïdes polysaccharidiques ainsi excrétés et les interactions moléculaires conduisant à la texture du yaourt brassé.

B I B L I O G R A P H I E

ACCOLAS J.P., VEAUX R. and AUCLAIR J., 1971.

Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite.
Le lait 51, 249-272.

ACCOLAS J.P., BLOQUEL R., DIDIENNE R. and REGNIER J., 1977.

Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt.
Le lait 57, 1-23.

ACCOLAS J.P., HEMME D., DESMAZEAUD M.J., VASSAL L., BOUILLANNE C. and VEAUX M., 1980;

Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière.
Le lait 60, 487-520.

ACCOLAS J.P., 1982.

Taxonomic features and identification of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*.
Bulletin IDF/FIL 145, 10.

ALM L., 1982.

Effect of fermentation on curd size and digestibility of milk proteins in vitro of Swedish fermented milk products.
J. Dairy Sci. 65, 509.

ALONI Y., COHEN R., BENZIMAN M. and DELMER D., 1983.

Solubilation of the UDP-glucose: 1,4 β -D glucan 4- β -D glucosyltransferase (cellulose synthetase) from *Acetobacter xylinum*. A comparison of regulatory properties with those of the membrane-bound form of the enzyme.
J. Biol. Chem. 258, 4419-4423.

AMAN P., FRANZEN L.E., DARVILL J.E., McNEIL M., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P., 1982.

The structure of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium phaesoli* strain 127. K38.
Carbohydr. Res. 103, 77-100.

ANNISON G., DUTTON G.G.S and MANDAL P.K., 1988.

Bacteriophage degradation of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* K 24 and determination of the position of the O-acetyl group.
Carbohydr. Res. 177, 278-284.

ARCHIBALD A.R. and BADDILEY J., 1966.

The teichoic acids.
Adv. Carbohydr. Chem. 21, 323-375.

AUSTRIAN R., 1985.

Polysaccharide vaccines.
Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie 136B n°3.

AYEBO A.D. and SHAHANI K.M., 1980.

Role of cultured dairy products in the diet.
Cultured Dairy Products J., 21-28.

AYEBO A.D., SHAHANI K.M. and DAM R., 1981.

Antitumor component(s) of yogurt: fractionation.
J. Dairy Sci. 64, 2318-2323.

AYEBO A.D., SHAHANI K.M., DAM R. and FRIEND B.A., 1982.

Ion exchange separation of antitumor component(s) of yogurt dialyzate.
J. Dairy Sci. 65, 2388-2390.

BARRY and GOEBEL , 1957.

Nature 179, 206.

BAUTISTA E.S., EMMA S., DAHIYA R.S AND SPECK M.L., 1966.

Identification of compounds causing symbiotic growth of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in milk.
J. Dairy Res. 33, 299-307.

BAYER M.E., 1979.

The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection.
in Bacterial outer membranes.
Eds. by Inouye J.W. & Sons, Ltd, New-York, pp 167-202.

BERKELEY R.C.W., LYNCH J.M., MELLING J., RUTLER P.R. and VINCENT B., 1980.

Microbial adhesion to surfaces.

Ellis Horwood, Chischester.

BEURRET M., 1984.

Intérêt des bactériophage pour l'étude structurale de polysaccharide capsulaires antigéniques de Klebsiella.

Thèse, Université de Grenoble.

BISHOPS C.T. and JENNING H.J., 1982.

Immunology of polysaccharides.

in *The polysaccharides*, Eds. G.O. ASPINALL. vol 1, 291-330.

BLANC B., 1981.

Valeur nutritionnelle du yaourt aliment vivant.

Symp. Internatl. sur les effets nutritionnels de la flore digestive.

Paris, pp 118-149.

BOGDANOV I.G., DALEV P.G., GUREVICH A.I., KOLOSOV M.N., MAL'KOVA V.P., PLEMYANNIKOVA L.A. and SOROKINA I.B., 1975.

Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall.

FEBS Letters 57, 259-261.

BOGDANOV I.G., VELICHKOV V.T., GUREVICH A.I., DALEV P.G., KOLOSOV M.N., MAL'KOVA V.P., PLEMYANNIKOVA L.A. and SOROKINA I.B., 1978.

Antitumor action of glycopeptides from cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*.

Oncology, 1750-1753.

BOTTAZZI V., FRIEND B.A. and SHAHANI K.M., 1985.

Proprieta antitumorali dei batteri lattici e degli alimenti fermentati con batteri lattici.

Batteri Lattici X, 873-879.

BOTTAZI V. and BIANCHI F., 1986.

Types of microcolonies of lactic acid bacteria, formation of void spaces and polysaccharides in yoghurt.

Scienza-Casearia 37, 297-315.

BOUILLANNE C. and DESMAZEAUD M.J., 1980.

Etude de quelques caractères de souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées en fabrication de yoghurt et proposition d'une méthode de classement.

Le lait 59, 458-473.

BOUILLANNE C., DESMAZEAUD M.J., LANDON M., GRATADOUX J.J. and FOURIER M., 1981.

Classement des souches de *Lactobacillus bulgaricus* selon quelques caractères utilisés en fabrication du yoghurt. Association avec *Streptococcus thermophilus*.

Science des Aliments 1, 7-17.

BOULNOIS G.J., ROBERTS I.S., HODGE R., HARDY K.R., JANN K. and TIMMIS K.N., 1987.

Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: definition of three functional regions for capsule production.

Mol. Gen. Genet. 208, 242-246.

BROOKER B.E., 1976.

Cytochemical observations on the extracellular carbohydrate produced by *Streptococcus cremoris*.

J. of Dairy Res. 43, 283-290.

BROWN R.M., WILLISON J.M. and RICHARDSON L.L., 1976.

Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 4565-4569.

CARCANO D., 1988.

Texture du yaourt brassé: caractérisation et influence de paramètres biotechnologiques.

Thèse, Université de Lille.

CERI H., McARTHUR H.A.I. and WHITFIELD C., 1986.

Association of alginate from *Pseudomonas aeruginosa* with two forms of heparin-binding in nature and disease.

Infect. Immun. 57, 1-5.

CERNING J., BOUILLANNE C., DESMAZEAUD M.J. and LANDON M., 1986.

Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*.

Biotechnology Letters 8, 625-628.

CERNING J., BOUILLANNE C., DESMAZEAUD M.J. and LANDON M., 1988.

Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*.

Biotechnology Letters 10, 255-260.

CHALET-WAGNER M., 1979.

Contribution à l'étude du caractère épaissant de *Streptococcus thermophilus*.

Mémoire de fin d'étude ENSFAR.

COSTERTON J.W., CHENG K.J., GEESEY G.G., LADD T.I., NICKEL J.C.,

DASGUPTA M. and MARRIE T.J., 1987.

Bacterial biofilms in nature and disease.

Annu. Rev. Microbiol. 41, 435-464.

CRYZ S.J., FURER E. and GERMANIER R., 1985.

Purification and vaccine potential of *Klebsiella capsular polysaccharide*.

Infect. Immun. 50, 225-230.

DAVIS H.M., HINES H.S. and EDWARDS J.R., 1986.

Structural elucidation of a water insoluble glucan produced by a cariogenic oral *Streptococcus*.

Carbohydr. Res. 156, 69-77.

DEHOVE R., 1981.

La réglementation des produits alimentaires et autres.

Commerce-Edition, 10^e Edition, Paris, pp 750.

DOCO T., WIERUSZESKI J.M., FOURNET B., CARCANO D., RAMOS P. and LOONES A., 1989.

Structure of exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*.

Accepté *Carbohydr. Res.*

DOIGH P., SMITHN.R., TODD T. and IRVIN R.T., 1987.

Characterisation of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells.

Infect. immun. 55, 1517-1522.

DRIESSEN F.M., UBBELS J. and STADHOUDERS J., 1977.

Continous manufacture of yoghurt. I: Optimal conditions and kinetics of the prefermentation process.

Biotechnology and Bioengineering 19, 821-839.

DUDMAN W.F., 1968.

Capsulation in rhizobium species.

J. of Bacteriol. 95, 1200-1201.

DUDMAN W.F., 1977.

The role of surface polysaccharides in natural environments. in surface carbohydrates of the prokaryotic cell. Eds. by I.W. SUTHERLAND. Academic press, N.Y. , pp 357-414.

DUTTON G.G.S and MERRIFIELD E.H., 1982.

The capsular polysaccharide from Klebsiella serotype K54; Location of the O-acyl group, and a revised structure.

Carbohydr. Res. 105, 189-203.

DUTTON G.G.S., DIFABIO J.L. and ZANLUNGO A.B., 1982.

Structural of capsular polysaccharide of Klebsiella serotype K45.

Carbohydr. Res. 106, 93-100.

ECHARTI C., HIRCHEL B., BOULNOIS G.J., VARLEY J.M., WALDVOGEL F. and TIMMIS K.N., 1983.

Cloning and analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: Lack of homology with *Neisseria meningitidis* group BDNA sequences. *Infect. Immun.* 41, 54-60.

FAVIER J.C.,

Composition du yaourt.

Cah. Nutr. Diet. XXII, 5.

FRANZ G., 1987.

Polysaccharides d'origine microbienne a activité antitumorale.

MRS "Essor des biotechnologies" Polysaccharides microbiens, Paris.

FRIEND B.A., FARMER R.E. and SHAHANI K.M., 1982.

Effect of feeding and intraperitoneal implantation of yoghurt culture cells on Ehrlich ascites tumor.

Milchwissenschaft 37, 708-710.

FRIEND B.A. and SHAHANI K.M., 1984a.

Nutritional and therapeutic aspects of Lactobacilli.

J. of Applied Nutrition. 36, 125-153.

FRIEND B.A. and SHAHANI K.M., 1984b.

Antitumor properties of lactobacilli and dairy products fermented by lactobacilli.

J. Food Protection 47, 717-723.

GALESLOOT T.E., HASSING F. and VERINGA H.A., 1968;

Symbiosis in yoghurt I: Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*.

Netherlands Milk and Dairy Journal 22, 50-63.

GALESLOOT T.E. and HASSING F., 1973.

Further investigations concerning the consistency of yoghurt, Medelingen.

Nederlands institut voor Zuivelonderzoek 7, 15-33.

GANCEL F., 1988.

Physiologie de la production des exopolysaccharides chez des souches industrielles de *Streptococcus thermophilus*.

Thèse, Université de Caen.

GARDIOL A.E., HOLLINGSWORTH R.I. and DAZZO F.B., 1987.

Alteration of surface properties in a Tn5 mutant strain of *Rhizobium trifolii* 0403.

J. of Bacteriol. 169, 1161-1167.

GIBBONS R.J., 1972.

in: Streptococci and Streptococcal discose.

Eds. WANNAMAKER L.W. and MATSEM J.M., Acad. Press., pp 371-384.

GIBBONS R.J. and VANHOUTE J., 1975.

Bacterial adherence in oral microbiol ecology.

Ann. Rev. Microbiol. 29, 19.

GIRAFFA G. and BERGERE J.L., 1987.

Nature du caractère épaissant de certaines souches de *Streptococcus thermophilus*: étude préliminaire.

Le lait 67, 285-298.

HANDAM I.Y. and MIKOLAJCIK E.M., 1974.

Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*.

J. Antibiotic. 27, 631.

HAMMER B.W., 1923.

Studies on ropiness in cultures of *Streptococcus lactis*.

Res. Bul. Ia. Agr. Exp. Sta. 74, 258.

HARADA T., 1965.

Succinoglucan 10.C3: a new acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes.

Arch. Biochem. Bioph. 112, 65-69.

HARDIE J.M., 1986.

Genus Streptococcus. in Bergey's manual of systematic bacteriology.
vol 2, SNEATH P.H., MAIS N.S., SHARP E. & HOLT J., Eds WILLIAMS and
WILKINS, Baltimore, pp 1043-1070.

HARDING N.E., CLEARY J.M., CABANAS D.K., ROSEN I.G. and KANG K.S., 1987.

Genetic and physical analysis of cluster of genes essential for xanthan
gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*.

J. Bacteriol. 169, 2854-2861.

HAUG A., LARSEN B. and SMIDSRØD N., 1974.

Carbohydr. Res. 32, 217.

HEHRE E.J., 1941.

Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a
sterile bacterial extract.

Science 93, 237-238.

HEPNER G., FRIED R.R., JEOR S.St., FUSETTI L. and MORIN R., 1972.

Hypocholesteremic effect of yogurt and milk.

Amer. J. Clin. Nutr. 62, 19.

HEPTINSTALL S., ARCHIBALD A.R. and BADDILEY J., 1970.

Teichoic acids and membrane function in bacteria.

Nature 225, 519-521.

HESTRIN S., ASCHNER M. and SHAPIRO S.A., 1943.

The enzymic production of levan.

Biochem. J. 37, 450-456.

HISAMATSU M., ABE J., AMENURA A. and HARADA T., 1978.

Carbohydr. Res. 61, 89.

HOROWITZ M.A. and SILVERSTEIN S.C., 1986.

Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and
killing by human phagocytes.

J. Clin. Invest. 65, 82-94.

IELPI L., COUSO R.O. and DANKERT M.A., 1981.

Xanthan gum biosynthesis: Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to pentasaccharide-P-P-lipid.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 1400-1480.

IELPI L., COUSO R.O. and DANKERT M.A., 1983.

Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage.

Biochem. Int. 6, 323-333.

IKEKAWA T., NAKANISHI M., UEHARA N., CHIHARA G. and FUKUOKA F., 1968.

Gann 54, 155-157.

IKEKAWA T., UEHARA N., MAEDA Y., NAKANISHI M. and FUKUOKA F., 1969.

Cancer Res. 29, 734-735.

JAMES D.W., PREISS J. and ELBEIN A.D., 1982.

Biosynthesis of polysaccharides.

in *The Polysaccharides*, Eds. G.O. ASPINALL. vol 1, 107-207.

JANN K. and JANN B., 1983.

The K antigens of *Escherichia coli*.

Prog. Allergy. 33, 53-79.

JANSSON P.E., LINDBERG B., LINDBERG J. and HENRICHSEN J., 1988a.

Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 18F.

Carbohydr. Res. 173, 217-225.

JANSSON P.E., KUMAR N.S., LINDBERG B. and WIDMALM G., 1988b.

Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 18A.

Carbohydr. Res. 173, 227-233.

JENNING H.J., 1983.

Capsular polysaccharides as human vaccines.

Adv. Carbohydr. Chim. Biochem. 141.

KATO I., KOBAYASHI S., YOKOKURA T. and MUTAI M., 1981.

Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice.
Gann. 72, 517-523.

KATO I., YOKOKURA T. and MUTAI M., 1985.

Induction of tumoricidal peritoneal exudate cells by administration of
Lactobacillus casei.
Int. J. Immunopharmac. 7, 103-109.

KATZENEHELLENBOGEN E. and JENNING H.J., 1983.

Structural determination of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 19A (57).
Carbohydr. Res. 124, 235-245.

KAVASNIKOV E.I. and SODENKO V.I., 1967.

Antibiotic properties of *Lactobacillus brevis*.
Mikrobiol. Zh. Kyviv., 29, 517.

KENNE L. and LINDBERG B., 1982.

Bacterial polysaccharide.
in *The polysaccharides*, Eds. G.O. ASPINALL. vol 2, 287-353.

KILARA A. and SHAHANI K.M., 1976.

Lactase activity of cultured and acidified dairy product.
J. Dairy Sci. 59, 2031-2035.

KITAZAWA M., TOBA T., ITOH T., ADACHI S. and KUMANO N., 1988.

Effects of ropy sour milk on the metastasis of Lewis Lung Carcinoma in
Mice.
Agric. Biol. Chem. 52, 2331-2337.

KODAMA R., 1952.

Studies on the lactic acid bacteria. II. Lactolin: a new antibiotic
substance produced by lactic acid bacteria.
J. Antibiotic., 5, 72.

KORNFELD R.H. and GINSBURG V., 1966.

Control of synthesis of guanosine 5'-diphosphate D-mannose and guanosine 5'-diphosphate L-fucose in bacteria.

Biochem. Biophys. acta. 117, 79-87.

LARIVIERE J., KOOLMAN P. and SCHMIDT K., 1967.

Kefiran, a novel polysaccharide produced in kefir grain by *Lactobacillus brevis*.

Archiv. fur Mikrobiologie. 59, 269.

LATGE J.P., BOUCIAS D., FRANZ G. and FOURNET B., 1988

Exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, leur procédé d'obtention et composition thérapeutique les contenant.

Patent n° 88-07-171.

LEE V.A. and LORENZ K., 1979.

The nutritional and physiological impact of milk in human nutrition.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition 11, 41-116.

LEE C.J., 1987.

Bacterial capsular polysaccharides: Biochemistry, Immunity and Vaccine.

Molecular Immunology 24, 1005-1019.

LEIGH J.A., SIGNER E.R. and WALKER G.C., 1985.

Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6231-6235.

LINDBERG A.A., 1973.

Bacteriophage receptors.

Annu. Rev. Microbio. 27, 205-236.

LINKER A. and JONES R.S., 1964.

A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism.

Nature 204, 187-188.

MacBEAN R.D., HALL R.J. and LINKLATER P.M., 1979.

Analysis of pH-stat continuous cultivation and the stability of the mixed fermentation in continuous yoghurt production.

Biotechnology and bioengineering 21, 1517-1541.

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.

MATSUO T., 1982.

Drug Res. 32, 647.

METCHNIKOFF E., 1908.

The prolongation of life.

Putnam's sons N.Y. 1ST Ed.

NILSSON R. and NILSSON G., 1958.

Studies concerning Swedish ropy milk. The antibiotic qualities of ropy milk.

Arch. Mikrobiol. 31, 191.

ODA M., HASEGAWA H., KOMATSU S., KAMBE M. and TSUCHIYA F., 1983.

Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* species.

Agric. Biol. Chem. 47, 1623-1625.

ORLA-JENSEN S., 1919.

The lactic acid bacteria.

Eds. A.F. Host and Son, Copenhagen.

PETTE J.W. and LOLKEMA H., 1950.

Yoghurt I: Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*.

Milk and Dairy J. 6, 209-224.

PIDOUX M., BRILLOUET J.M. and QUEMENER B., 1988.

Characterization of the polysaccharide from a *Lactobacillus brevis* and from sugary Kefir grains.

Biotech. letters 10, 415-420.

PINDAR D.F. and BUCKE C.W., 1975.

The biosynthesis of alginic acids by *Azotobacter vinelandii*.

Biochem. J. 152, 617-622.

PULASANI S.R., RAO D.R. and SUNKI G.R., 1979.

Antimicrobial activity of lactic cultures partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*.

J. Food. Sci. 44, 575-578.

RASIC J.L. and KURMAN J.A., 1978.

Technical Dairy publishing house.

Jyllengevej 39, DK 2720 Vanlose Copenhagen, Danemark.

RAY A.K., ROY A. and ROY N., 1987.

Structure of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* serotype K40.

Carbohydr. Res. 165, 77-86.

REDDY G.V., SHAHANI K.M. and BANERJEE M.R., 1973.

Inhibitory effect of yogurt on Ehrlich Ascites tumor-cell proliferation.

J. of the National Cancer Institute 50, 815-817.

REDDY G.V., SHAHANI K.M., FRIEND B.A. and CHANDAN R.C., 1983a.

Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*.
III. production and partial purification of bulgarian from *L. bulgaricus*.

Cult. Dairy Prod. J. 18, 15.

REDDY G.V., FRIEND B.A., SHAHANI K.M. and FARMER R.E., 1983b.

Antitumor activity of yogurt components.

J. Food Protection 46, 8-11.

RIEGER-HUG D. and STIRM S., 1981.

Comparative study of host capsule depolymerase associated with *Klebsiella* bacteriophages.

Virology 113, 363-378.

ROBERTS I., MOUNTFORD R., HIGH N., BITTER-SUERMAN D., JANN K., TIMMIS K.N. AND BOULNOIS G.J., 1986.

Molecular cloning and analysis of genes for production of K5, K7, K12 and K92 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*.

J; Bacteriol. 168, 1228-1233.

ROHR T.E. and TROY F.A., 1980.

Structure and biosynthesis of surface polymers containing polysialic acid in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. 255, 2332-2342.

ROSS P., WEINHOUSE H., ALONI Y., MICHAELI D., WEINBERGER-OHANA P., MAYER R., BRAUN S., DEVROOM E., Van Der MAREL G.A., Van BOOM J.H. and BENZINAM M., 1987.

Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid.

Nature 325, 279-281.

SANDFORD P.A. and BAIRD J., 1982.

Industrial utilization of polysaccharides.

in *The Polysaccharides*, Eds. G.O. ASPINALL. vol 2, 412-485.

SCHELLHAASS S.M., 1983.

Characterization of exocellular slime produced by bacterial starter cultures used in manufacture of fermented dairy products.

PHD thesis University of Minesota.

SCHLEIFER K.H. and KANDLER O., 1972.

Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their toxonomic implications.

Bacteriol. Rev. 36, 407-477.

SHACKELFORD L.A., RAO D.R., CHAWAN C.B. and PULUSANI S.R., 1983.

Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in Rats.

Nutrition and Cancer 5, 160-164.

SHAHANI K.M., VAKIL J.R. and KILARA A., 1976.

Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*.

II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*.

Cult. Dairy. Prod. J. 11, 14-17.

SHAHANI K.M. and CHANDAN R.C., 1979.

Nutritional and healthful aspects of cultured and culture containing dairy foods.

J. Dairy Sci. 62, 1685-1694.

SHAHANI K.M., FRIEND B.A. and BAILEY P.J., 1983.

Antitumor activity of fermented colostrum and milk.

J. Food Protection 46, 385-386.

SHARPE M., GARVIE E. and TILBURY R., 1972.

Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*.

Appl. Microbiol. 23, 389.

SHERWOOD J.E., VASSE J.M., DAZZO F.B. and TRUCHET G.L., 1984.

Development of trifolin A-binding ability of the capsule of *Rhizobium trifolii*.

J. Bacteriol. 159, 145-152.

SILVER R.P., AARONSON W. and VANN W.F., 1987.

Translocation of cellular polysaccharides in pathogenic strains of *Escherichia coli* K1 requires a 60-Kilodalton periplasmic protein.

J. Bacteriol. 169, 5489-5495.

SKJAK-BRAEK G. and LARSEN B., 1985.

Biosynthesis of alginate: purification and characterization of mannuronan C5 epimerase from *Azotobacter vinelandii*.

Carbohydr. Res. 139, 273-283.

SLONEKER J.M. and ORENTAS D.G., 1962.

Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide.

Nature 194, 478-479.

SMITH E.E.B., MILLS G.T. and BERNHEIMER H.P., 1961.

Biosynthesis of pneumococcal capsular polysaccharide I: properties of the systems synthesizing type III capsular polysaccharide.

J. Biol. Chem. 236, 2179-2182.

STACEY M. and BARKER S.A., 1960.

Polysaccharides of microorganisms.

Oxford univ. Press, London and New-York.

SUNDMAN. V., 1953.

On the microbiology of Finnish ropy sour milk.

XIII Intern Dairy Congrès, Hague. 3, 1420.

SUTHERLAND I.W., 1970.

Formate, a new components of bacterial exopolysaccharides.

Nature 228, 280.

SUTHERLAND I.W. and NORVAL M., 1970.

The synthesis of exopolysaccharide by *Klebsiella aerogenes* membrane preparation and the involvement of lipid intermediates.

Biochem. J. 120, 567-576.

SUTHERLAND I.W., 1972.

Bacterial exopolysaccharide.

Adv. in Microbiol. physiology 8, 143-213.

SUTHERLAND I.W., 1977.

Surface carbohydrates of the procaryotic cell.

Eds. Academic Press, New-York.

SUTHERLAND I.W. and WILLIAMSON J., 1979.

Eur. J. Applied Microbiol. 6, 233.

SUTHERLAND I.W., 1982.

Biosynthesis of microbial exopolysaccharides.

Advan. Microb. Physiol. 23, 79-150.

SUTHERLAND I.W., 1983.

Microbial exopolysaccharides: their role in microbial adhesion in aqueous systems.

Crit. Rev. Microbiol. 10, 173-202.

SUTHERLAND I.W., 1985.

Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharide.

Annu. Rev. Microbiol. 39, 243-270.

TANIME A.Y and ROBINSON R.K., 1985.

Yoghurt science and technology. Eds. Pergamon Press.

TERRE S., 1986.

Propriétés technologiques nutritionnelles et physiologiques de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Tech. Laitière & Mark. 1008, 26-39.

TROY F.A., FRERMAN F.E. and HEATH E.C., 1970.

The biosynthesis of capsular polysaccharide in *Aerobacter aerogenes*.

J. Biol. Chem. 246, 118-133.

TROY F.A., 1979.

The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers.

Annu. Rev. Microbiol. 33, 519-560.

TROY F.A. and McCLOSKEY M.A., 1979.

Role of a membranous sialyltransferase complex in the synthesis of surface polymers containing polysialic acid in *Escherichia coli*: Temperature induced uncoupling in the assembly process.

J. Biol. Chem. 254, 7377-7387.

TSIEN H.C. and SCHMIDT E.L., 1981.

Localization and partial characterization of soybean lectin-binding polysaccharides of *Rhizobium japonicum*.

J. Bacteriol. 145, 1063.

TSUCHIYA F., MIYAZAWA K., KAMBE M., ODA M. and EBISAWA N., 1981.

Polysaccharide MPS 80 de haute masse moleculaire et sa préparation.

UK PATENT APPLICATION N°8135111.

VIMR E.R. and TROY F.A., 1985.

Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of *N-acetylneuraminate pyruvate-lyase*.

J. Bacteriol. 164, 854-860.

VINCENT J.G., VEOMETT R.C. and RILEY R.I., 1959.

Anit bacterial activity associed with *lactobacillus acidophilus*.

J. Bacteriol. 78, 477.

WATSON M.J., TYLER J.M., BUCHAMAN J.G. and BADDILEY J., 1972.

The type-specific substance from Pneumococcus Type 13.

Biochem. J. 130, 45-54.

WHEATER D.M., HIRCH A. and MATTICH A.T.R., 1951.

"Lactobacillin" an antibiotic from lactobacilli.

Nature 168, 659.

WHEATER D.M., HIRCH A. and MATTICH A.T.R., 1952.

Possible identity of "Lactobacillin" with hydrogen peroxide produced by lactobacilli.

Nature 170, 623.

WHISTLER R.L., BUSHWAY A.A., SINGH P.P., NAKAHARA W. and TOKUSEN R., 1976.

Adv. carbohydr. Chem. Biochem. 32, 235-275.

WHITFIELD C. and TROY F.A., 1984.

Biosynthesis and assembly of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. Activation of sialyl polymer synthesis in active sialyltransferase complexes requires portein synthesis.

J. Biol. Chem. 259, 12776-12780.

WHITFIELD C., ADAMS D.A. and TROY F.A., 1984.

Biosynthesis and assembly of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. Role of a low density vesicle fraction in activation of the endogenous synthesis of sialyl polymers.

J. Biol. Chem. 259, 12769-12775.

WHITFIELD C., 1988.

Bacterial extracellular polysaccharides.

Can. J. Microbiol. 34, 415-420.

WICKEN A.J., 1985.

Bacterial cell walls and surfaces. in Bacterial Adhesion.

Eds. Plenum Press. New-York, 45-67.

ZAAR K., 1979.

Visualisation of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the gram negative bacterium *Acetobacter xylinum*.

J. Cell. Biol. 80, 773-777.

