

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITE DE LIEGE — GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RESISTANCE AU SECHAGE  
DES BACTERIES LACTIQUES**

Ibourahema COULIBALY

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences  
agronomiques et ingénierie biologique

**Promoteurs** : Professeur Philippe THONART

Docteur Jacqueline DESTAIN

2010

***Copyright.***

Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits des voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite de la dite loi et des modifications ultérieures.

---

**Ibourahema COULIBALY (2010).** Contribution à l'étude de la résistance au séchage des bactéries lactiques (thèse de doctorat en français) ; Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, (Belgique), 260 p., 22 tableaux, 39 figures.

## Résumé

L'utilisation de souches lactiques, à l'échelle industrielle, nécessite une sélection sur base des propriétés technologiques, physiologiques et biochimiques, ainsi que la mise en œuvre de procédés biotechnologiques bien maîtrisés pour leur production et leur conservation. A cet effet, le séchage est une étape importante. Sous forme sèche, le produit est plus facilement manipulable. Cependant au cours du séchage, les micro-organismes subissent un stress thermique et/ou osmotique qui se traduit par une perte de viabilité pendant le stockage. L'utilisation d'agents protecteurs au cours du stockage a permis d'obtenir une bonne viabilité. En effet, les bactéries sont soumises pendant la lyophilisation et au cours du stockage à une mortalité liée en grande partie à l'oxydation des acides gras membranaires. L'analyse de ces acides au cours des différents procédés de fabrication et de stockage permet de noter la présence des hydroperoxydes. Cette oxydation est engendrée par l'action de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés principalement l'acide linoléique (C<sub>18:2</sub>) et linoléique (C<sub>18:3</sub>) ce qui engendre la formation des hydroperoxydes : acide hydroperoxyoctadécadiénoïque (HPOD) et acide hydroperoxyoctadécatriénoïque (HPOI) méthylés ou non en position 13- et 9-. Une analyse des composés secondaires émanant des poudres de bactéries lactiques indique la présence de composés volatils. Parmi ceux-ci, apparaissent des molécules volatiles (principalement des aldéhydes), qui modifient la saveur d'origine des corps gras. Les études menées au niveau des constituants phospholipidiques de la membrane montrent un lien entre le degré d'oxydation et la mortalité cellulaire au cours du stockage. Les différents phospholipides déterminés au nombre de sept (7) subissent tous cette oxydation à des degrés divers. L'utilisation d'antioxydant au cours du stockage permet d'inhiber les phénomènes de peroxydation des lipides et permet également de maintenir la valeur nutritionnelle (teneur en AGPI, réduction des dérivés peroxydés nocifs) du produit.

---

**Ibourahema COULIBALY (2010).** Contribution to the study of resistance of lactic acid bacteria subject to drying. (Dissertation in French) ; University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech , (Belgium), p. 260 p., 22 tables, 39 figures.

## Summary

The use of lactic strains in industrial scale requires selection on the basis of technological, physiological and biochemical properties, as the implementation of biotechnological processes under control for their production and conservation. At this effect drying process is an important step. In dry form, the product is more easily manipulated. However during the drying process, microorganisms undergo heat stress and/or osmotic resulting in a loss of viability during storage. The use of protective agents during storage has resulted in a good viability. In fact, the bacteria are subjected during lyophilization and during storage to a mortality largely oxidation the membrane fatty acids. The analysis of these acids during the process helps to note the presence of hydroperoxydes which are the cause of this mortality. This oxidation is caused by the action of oxygen on polyunsaturated acids linoleic acid (C<sub>18:2</sub>) and linolenic (C<sub>18:3</sub>) mostly, causing the formation of hydroperoxydes: hydroperoxyoctadecadienoic acid (HPOD) and hydroperoxyoctadeca-trienoic acid (HPOT) at position 13 - and 9 - methyl or not. An analysis of secondary compounds from the powders indicates the presence of birds. These products appear volatile compounds (mainly aldehydes), hydrocarbons, alcohols, acids etc., which altered the original flavour of fat. Studies in phospholipids constituents of the membrane show a link between the degree of oxidation and cell death during storage. The various phospholipids determined, seven (7) are all undergo this oxidation to various degrees. The use of antioxidants during storage can inhibit the process of lipid peroxydation and helps also to maintain the nutritional value (PUFA content, reduction of harmful peroxide-derived) product.

---

## *Dédicace*

*A Bintou, mon épouse. Ce travail te doit beaucoup. Qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de durs labeurs, de compréhensions et de tolérances, de privations et d'efforts communs.*

*A toi Mohamed Lamine Junior, notre fils, tout étonné que son papa ait enfin fini d'aller à « l'école » comme lui !*

*A notre fille Oriane Fatim Manaḳa, ta naissance vient comme un cadeau de Dieu pour couronner cette thèse.*

*A mon père, décédé ce Lundi matin d'un mois de Janvier 1983 et qui me disait un jour « je n'ai pas mis mes enfants à l'école pour la police, ni la gendarmerie mais pour aller à l'université, le temple du savoir », trouve ici la réalisation de ton vœux, mon immense reconnaissance et que le paradis soit ta demeure.*

*A ma mère pour l'absence prolongée de son fils aîné et la peine endurée.*

---

## Remerciements

*La réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais pas les citer toutes sans dépasser le nombre de pages raisonnablement admis dans ce genre de travail. Il me tient à cœur de remercier tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin.*

*Je pense particulièrement à Monsieur le Professeur Philippe THONART, mon promoteur, pour la finesse de ses attitudes sur le plan aussi bien humain que scientifique. Ses remarques successives ont permis d'améliorer les différentes versions de ce travail. Il a toujours trouvé comme promoteur les mots justes et un soutien total et sans faille dans les moments délicats. De lui, j'ai toujours reçu non seulement les encouragements dont le doctorant a tant besoin, mais aussi les précieux conseils pratiques que seul un homme, ayant des qualités humaines comme lui, peut amener à prodiguer. Grâce à son approche respectueuse de la personne humaine, je me suis continuellement senti à l'aise. Je lui en sais infiniment gré.*

*Je remercie très sincèrement Madame le Docteur Jacqueline DESTAIN co-promoteur, pour avoir lu ce travail et pour m'avoir continuellement donner des conseils très avisés dans la rédaction des différents articles scientifiques de cette thèse.*

---

*Il m'est agréable de remercier Messieurs les Professeurs Karim AMIGHI de l'Université Libre de Bruxelles (U.L.B) et DOMMES Jacques de l'Université de Liège (U.Lg) et Madame le Docteur Marie-Laure FAUCONNIER de l'unité de biologie végétale de Gembloux (GxABT) pour m'avoir permis de travailler dans leurs différents laboratoires.*

*Je tiens à adresser ma gratitude aux membres du jury, en particulier à Monsieur le Professeur Georges LOGNAY de me faire l'honneur de juger cette thèse, et à Messieurs les Professeurs François BERA, Daniel PORTETELLE pour leur disponibilité.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame le Professeur Carmen SOCACIU et Madame le Docteur Sabine DANTHINE pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.*

*Je remercie particulièrement Monsieur le Docteur Robin DUBOIS-DAUPHIN qui a su faire grandir en moi la rigueur scientifique et qui a accepté de m'accorder un temps précieux dans la rédaction de cette thèse et des articles qui la composent.*

*Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel du bureau 22.73 en occurrence Mme Dominique ROBLAIN pour son aide, ses conseils et sa disponibilité. Ce fut très agréable de travailler avec toi.*

*Je tiens à remercier particulièrement le personnel du secrétariat du CWBI, que je nomme affectueusement la « tour de contrôle du CWBI », Marina CHANET, Marguerite DEMI et Cécile EK pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur qui n'a jamais fait défaut tout au long de ces années.*

*Je tiens ici à remercier tout le personnel scientifique et technique qui œuvre chaque jour pour la renommée du CWBI, en particulier aux Docteurs Franck DELVIGNE, Marc OGENA, Jean-Marc ALDRIC, Hakim GHALFI, Carine DORTU ; Mlles Magali MASSON, Lamia MAJAD, Martine ALLGAERT, Annick SALVE, Cathy HELWUS, Pascale VANHAL, Daniëlle DUBALLET, Fabienne PISCART et Messieurs Samuel TELEK, Christophe THIRY, Benoît MASSAUX, Pol, Laurent, Frederick, Thami el MEJDOUB, pour leur aide et leur amitié et surtout leur compréhension pour ces années formidables passées ensemble.*

---

*Ma gratitude aux personnels de chimie organique et analytique en occurrence Mmes Maryse HARDENNE, Céline PIERART et Messieurs Vincent HOTE et Dany TRISTMAN pour leur aide et surtout leur disponibilité.*

*Mes six années d'études au CWBI, se sont déroulées dans un environnement convivial, c'est pourquoi je tiens à remercier tous les doctorants avec lesquels j'ai passé ces journées au CWBI à l'unité de Bio-industries de Gembloux: Ali BAYANE, Maïmouna SOW, N'DOYE Bassirou, Pascal KAKANA, Wazé Mireille ALLOUE, Antoine ASSAMOI, Francine AKE, Philomène KABRAN, Privat KOUAKOU, Ana AGUILAR-GALVEZ, Mohamed CISSE, Charles YAPO, Michel MUSONI, Michel DIOP, Eugène KARENZI, Venant NIHORIMERE, Roland FOMA, Khady BA, Guillaume HENRY, Annick LEJEUNE, Mohamed ALCHIHAB, Thambi KAR pour leur marque de sympathie et leur amitié sans faille durant cette période.*

*Je tiens à remercier solennellement l'Etat de Côte d'Ivoire pour m'avoir soutenu financièrement par l'octroi d'une bourse d'études durant ces six années.*

*En dehors de tout cadre professionnel, je voudrais remercier certaines personnes avec qui j'ai partagé des relations humaines fortes durant cette thèse. Merci à ALABI Fabrice Taofic et à SILVE Souleymane pour leur fraternité. Grâce à vous, en plus de la thèse j'ai eu des frères sur le chantier de DIEU. Merci pour le réconfort lorsque le moral n'était pas au rendez-vous, votre compagnie quotidienne a fait de mon séjour à Gembloux des moments de joies et de souvenirs heureux tout en apportant une guidée spirituelle. Je n'oublierais pas mes jeunes frères TRAORE Souleymane, Gaoussou KARAMOGO et CISSE Mohamed pour leur respect et leur sympathie.*

*Je remercie religieusement El Hadj Marouane pour les efforts dont il déploie chaque jour au sein de notre communauté musulmane de Gembloux.*

*Je pense également aux familles: BAMBBA (Adja, Youssouf et leur fille); CISSE (Souleymane imam, Maimouna et enfant); COULIBALY (Saran, Ibrahim et enfants),*

---



*SILUE (Abdoulaye et enfants), DIABY (Koro, Adama et enfants) et Kamagaté (Ahmed, Aline et enfants) à Bruxelles. Un remerciement sincère aux familles BAMBA (Arouna, Mariam et enfants) à Kuurne, KONE (Yaya, Matogoma et enfant) à Quaregnon, Sylla à Amay; KONE (Abdoulaye, Awa et enfants) à Flénu et Kaba, CISSE mohamed à Mons; OUARTARA Ibrahim à Bruxelles et à tous les membres et sympathisants du CNI Belgique. Mes sincères amitiés à la famille FRESH (Abdessalem, Emilienne, Samy et Sabry), à Hélène Aboubakar FOURREIRA et enfants ainsi qu'à Guido Claudine et enfants à Gembloux.*

*Mes sincères remerciements à nos aînés ASSIE Kouakou Lazare, AMBE Guy- Alain et Eric AKPA pour leurs conseils avisés.*

*Je remercie également les membres de l'association des étudiants ivoiriens en Belgique (ASETIB) et plus particulièrement ceux de la section de Gembloux pour leur dynamisme, leur convivialité et leur esprit d'entraide.*

*Enfin, je voudrais dire un grand merci à mon épouse COULIBALY Bintou, à nos enfants COULIBALY Mohamed Lamine Junior et sa sœur COULIBALY Oriane Fatim Manaka pour leur patience, ainsi qu'à mes parents et aux familles proches pour leur soutien de tout temps.*

*Que toutes les personnes que j'ai oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe mes sincères reconnaissances et mes remerciements distingués*

*Ibourahema*

---

# Table des matières

---

# Table des matières

---

|   |          |
|---|----------|
| <b>LISTE DES PUBLICATIONS.....</b>                                  | <b>A</b> |
| I. PUBLICATIONS ACCEPTEES DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE ..... | A        |
| II. PUBLICATION EN COURS DE SOUMISSION.....                         | A        |
| III. CONFERENCES SEMINAIRES ET CONGRES.....                         | B        |
| IV. FORMATIONS AU COURS DU DOCTORAT.....                            | C        |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>                                  | <b>D</b> |

## INTRODUCTION GENERALE

---

---

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| <b>INTRODUCTION GENERALE .....</b> | <b>2</b> |
|------------------------------------|----------|

## CHAPITRE I

---

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE – PREMIERE PARTIE .....</b>  | <b>10</b> |
| I-1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....   | 10        |
| I-2. INCIDENCES DE LA LYOPHILISATION SUR LA VIABILITE DES BACTERIES LACTIQUES AU COURS DU STOCKAGE : REVUE..... | 11        |
| RESUME .....  | 12        |
| ABSTRACT .....  | 13        |
| I-2.1. GENERALITES SUR LE SECHAGE DES MICROORGANISMES.....  | 14        |
| I-2.1.1. <i>Introduction</i> .....  | 14        |
| I-2.1.2. <i>Types de séchage dans les industries agro-alimentaires</i> .....                                    | 14        |
| I-2.2. LYOPHILISATION DES BACTERIES LACTIQUES.....  | 16        |
| I-2.2.1. <i>Description et principes de la lyophilisation</i> .....   | 17        |
| I-2.2.2. <i>Facteurs agissants sur la conservation des cellules séchées</i> .....                               | 21        |
| I-2.2.3. <i>Conservation du produit sec</i> .....   | 22        |

|   |    |
|---|----|
| I-2.3. UTILISATION DES CRYOPROTECTEURS.....   | 23 |
| I-2.3.1. <i>Cryoprotection des bactéries lactiques</i> .....  | 23 |
| I-2.3.2. <i>Mécanismes d'action des cryoprotecteurs</i> .....   | 24 |
| I-2.4. ACIDES GRAS ET OXYDATION CELLULAIRE.....   | 25 |
| I-2.4.1. <i>Rôles des acides gras au niveau des bactéries</i> .....   | 25 |
| I-2.4.2. <i>Mécanismes d'oxydation des lipides</i> .....  | 26 |
| I-2.4.3. <i>Autooxydation</i> .....   | 27 |
| I-2.4.4. <i>Photooxydation</i> .....  | 31 |
| I-2.4.5. <i>Oxydation enzymatique</i> .....   | 32 |
| I-2.5. FACTEURS INFLUENÇANTS L'OXYDATION DES LIPIDES .....  | 33 |
| I-2.5.1. <i>Principaux facteurs de l'oxydation des lipides</i> .....  | 33 |
| I-2.5.2. <i>Impacts de l'oxydation des lipides sur les starters</i> .....   | 34 |
| I-2.6. DIFFERENTES APPROCHES POUR INHIBER L'OXYDATION DES STARTERS LACTIQUES<br>LYOPHILISÉS AU COURS DU STOCKAGE..... | 36 |
| I-2.6.1. <i>Mécanismes d'action des antioxydants préventifs</i> .....   | 36 |
| I-2.6.2. <i>Mécanismes d'action des antioxydants de type « chaîne rompue et chain breaking »</i> .....                | 37 |
| I-2.7. REMERCIEMENTS .....  | 39 |
| I-2.8. CONCLUSIONS .....  | 39 |
| I-2.9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....  | 39 |

## **I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE – DEUXIÈME PARTIE ..... 45**

|   |    |
|---|----|
| I-3. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....                                     | 45 |
| I.4. FUNCTIONAL ASPECT OF <i>Lactobacillus</i> SPP. : A REVIEW..... | 46 |
| RESUME .....  | 47 |
| ABSTRACT .....  | 48 |
| I-4.1. INTRODUCTION.....  | 49 |
| I-4.2. LACTOBACILLUS GENUS .....                                    | 50 |
| I-4.2.1. <i>Ecology</i> .....                                       | 50 |
| I-4.2.2. <i>Metabolism</i> .....                                    | 50 |
| I-4.3. CHARACTERISTICS OF GRAM POSITIVE BACTERIA .....              | 52 |
| I-4.3.1. <i>Generalities</i> .....                                  | 52 |
| I-4.3.2. <i>Membrane structure</i> .....                            | 53 |
| I-4.4. ADHESION AND RESISTANCE IN THE HOST .....                    | 55 |
| I-4.4.1. <i>Anchor types</i> .....                                  | 55 |
| I-4.4.2. <i>Enzymes</i> .....                                       | 57 |
| I-4.4.3. <i>Adherence proteins and binding domains</i> .....        | 57 |

---

|  |    |
|--|----|
| I-4.4.4. <i>The cell-surface hydrolase (CSH) domain</i> .....  | 58 |
| I-4.5. <i>Phospholipids and fatty acids of Lactobacillus spp.</i> .....  | 59 |
| I-4.5.1. <i>Structure of phospholipids</i> .....   | 59 |
| I-4.5.2. <i>Fatty acids</i> .....  | 61 |
| I-4.6. PROBIOTICS AND BIOTHERAPEUTICS .....  | 61 |
| I-4.6.1. <i>Probiotics and food production</i> .....   | 61 |
| I-4.6.2. <i>Biotherapeutics and potential benefits</i> .....   | 63 |
| I-4.6.3. <i>Benefits for health</i> .....  | 64 |
| I-4.7. CONCLUSIONS .....   | 66 |
| I-4.8. REFERENCES.....   | 67 |
| I-5. CONCLUSIONS : INCIDENCES DE LA LYOPHILISATION SUR LA VIABILITE DES BACTERIES<br>LACTIQUES AU COURS DU STOCKAGE..... | 73 |

---

## CHAPITRE II

---

|   |    |
|---|----|
| SELECTION ET IDENTIFICATION DE NOUVELLES SOUCHES<br>RESISTANTES DE BACTERIES LACTIQUES..... | 74 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| II. SELECTION ET IDENTIFICATION DE NOUVELLES SOUCHES RESISTANTES DE<br>BACTERIES LACTIQUES .....  | 75 |
| II.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS .....   | 75 |
| II.2. CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM POULTRY FARMS IN SENEGAL   | 76 |
| RESUME .....  | 77 |
| ABSTRACT .....  | 78 |
| II-2.1. INTRODUCTION .....  | 79 |
| II-2.2. MATERIALS AND METHODS .....   | 80 |
| II-2.2.1. Isolation of LAB strains, culture media and growth conditions.....  | 80 |
| II-2.2.2. Determination of lactic acid isomers .....  | 81 |
| II-2.2.3. Assay of residual glucose.....  | 82 |
| II-2.2.4. Behaviour for tolerance to high temperatures, high concentrations of lactic acid and sodium chloride, and low<br>pH.....        | 82 |
| II-2.2.5. Determination of the turbidity.....   | 83 |
| II-2.3. RESULTS AND DISCUSSION.....   | 83 |
| II-2.3.1. Screening of lactic acid bacteria.....  | 83 |
| II-2.3.2. Rapid screening for tolerance to high temperatures, high concentrations of lactic acid and sodium chloride, and<br>low pH ..... | 84 |
| II-2.3.3. Growth and lactic acid production profiles from time-course studies .....   | 87 |
| II-2.3.4. Optical isomer of lactic acid comparison.....   | 90 |
| II-2.4. ACKNOWLEDGEMENTS .....  | 91 |
| II-2.5. REFERENCES .....  | 91 |
| II-3. CONCLUSIONS : SELECTION ET IDENTIFICATION DE NOUVELLES SOUCHES RESISTANTES DE<br>BACTERIES LACTIQUES .....                          | 94 |

---

## CHAPITRE III

---

### EFFETS DES CRYOPROTECTEURS SUR LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS CELLULAIRES DE *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419..... 96

|  |     |
|--|-----|
| III. EFFETS DES CRYOPROTECTEURS SUR LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS CELLULAIRES DE <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419.....   | 96  |
| III-1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....  | 96  |
| III-2. THE RESISTANCE TO FREEZE-DRYING AND TO STORAGE WAS DETERMINED AS THE CELLULAR ABILITY TO RECOVER ITS SURVIVAL RATE AND ACIDIFICATION ACTIVITY .....   | 97  |
| RESUME.....  | 98  |
| ABSTRACT .....   | 99  |
| III-2.1. INTRODUCTION.....   | 100 |
| III-2.2. MATERIALS AND METHODS .....   | 101 |
| III-2.2.1. <i>Microorganisms and growth conditions</i> .....   | 101 |
| III-2.2.2. <i>Rehydration/ enumeration</i> .....   | 103 |
| III-2.2.3. <i>Acidification activity and water content</i> .....   | 103 |
| III-2.2.4. <i>Fatty acids analyses (FAME)</i> .....  | 103 |
| III-2.2.5. <i>Statistical Analysis</i> .....   | 104 |
| III-2.3. RESULTS AND DISCUSSION .....  | 104 |
| III-2.3.1. <i>Fatty acid composition of freeze-dried <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 and <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LMG9192<sup>T</sup></i> .....  | 104 |
| III-2.3.2. <i>Impacts of protectives agents and storage time on membrane fatty acid composition of <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 and <i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> LMG9192<sup>T</sup></i> ..... | 105 |
| III-2.3.3. <i>Effects of sorbitol, monosodium glutamate and glycerol, on the survival and resistance to freeze-dried storage of <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419</i> .....                                     | 108 |
| III-2.3.4. <i>Relationship between the resistance, freeze-dried <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 storage and its membrane fatty acid composition</i> .....   | 113 |
| III-2.4. CONCLUSIONS .....   | 114 |
| III-2.5. ACKNOWLEDGEMENTS.....   | 115 |
| III-2.6. REFERENCES.....   | 115 |
| III-3. CONCLUSIONS : EFFETS DES CRYOPROTECTEURS SUR LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS CELLULAIRES DE <i>Lactobacillus plantarum</i> CWBI-B1419 .....   | 119 |

---

## CHAPITRE IV

---

### SUIVI DE LA DEGRADATION DES ACIDES GRAS POLYINSATURES..... 120

|   |     |
|---|-----|
| IV. SUIVI DE LA DEGRADATION DES ACIDES GRAS POLYINSATURES .....   | 121 |
| IV.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS .....   | 121 |
| IV.2. SURVIVAL OF FREEZE-DRIED <i>Leuconostoc mesenteroides</i> KMROG AND <i>Lactobacillus plantarum</i> CWBI-<br>B1419 RELATED TO THEIR CELLULAR FATTY ACIDS COMPOSITION DURING STORAGE..... | 122 |
| RESUME.....   | 123 |
| ABSTRACT .....  | 124 |
| IV-2.1. INTRODUCTION.....   | 125 |
| IV-2.2. MATERIALS AND METHODS .....   | 126 |
| IV-2.2.1. <i>Micro-organisms and cultivation</i> .....  | 126 |
| IV-2.2.2. <i>Productions</i> .....  | 126 |
| IV-2.2.3. <i>Storage conditions</i> .....   | 127 |
| IV-2.2.4. <i>Dry cell weight and water content determinations</i> .....   | 127 |
| IV-2.2.5. <i>Water activity measurements</i> .....  | 127 |
| IV-2.2.6. <i>Survival rate</i> .....  | 127 |
| IV-2.2.7. <i>Analysis of cellular fatty acids</i> .....   | 128 |
| IV-2.2.8. <i>Statistical analysis</i> .....   | 129 |
| IV-2.3. RESULTS AND DISCUSSION .....  | 129 |
| IV-2.3.1. <i>Survival of lactic acid bacteria after freeze-drying</i> .....   | 129 |
| IV-2.3.2. <i>Influence of water activity on survival rate.</i> .....  | 130 |
| IV-2.3.3. <i>Survival of <i>L. mesenteroides</i> and <i>Lb. plantarum</i> during storage</i> .....  | 130 |
| IV-2.3.4. <i>Cellular fatty acid relative contents after freeze-drying and changes in fatty acid composition</i> .....  | 134 |
| IV-2.4. CONCLUSIONS .....   | 142 |
| IV-2.5. ACKNOWLEDGEMENTS .....  | 142 |
| IV-2.6. REFERENCES.....   | 143 |
| IV.3. CONCLUSIONS : SUIVI DE LA DEGRADATION DES ACIDES GRAS POLYINSATURES .....   | 146 |



---

## CHAPITRE V

---

### CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS ISSUS DE LA DEGRADATION DES ACIDES GRAS DE BACTERIES LACTIQUES .....151

|  |     |
|--|-----|
| V. CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS ISSUS DE LA DEGRADATION DES ACIDES GRAS DE BACTERIES LACTIQUES : <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 ..... | 148 |
| V.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....  | 148 |
| V.2. CHARACTERIZATION OF VOLATILES COMPOUNDS EMITTED FROM FREEZE-DRIED <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 PRODUCT DURING STORAGE. ....             | 149 |
| RESUME.....  | 150 |
| ABSTRACT .....   | 151 |
| V-2.1. INTRODUCTION .....  | 152 |
| V-2.2. MATERIALS AND METHODS.....  | 153 |
| <i>V-2.2.1. Microorganism and inoculum</i> .....   | 153 |
| <i>V-2.2.2. Productions and storage conditions</i> .....   | 153 |
| <i>V-2.2.3. Dry cell weight, water Content and survival rate</i> .....   | 153 |
| <i>V-2.2.4. Data analysis of SPME</i> .....  | 154 |
| <i>V-2.2.5. GC-MS operating parameters</i> .....   | 154 |
| V-2.3. RESULTS AND DISCUSSION.....   | 155 |
| <i>V-2.3.1. Viability of <i>L. planatrum</i> CWBI-B1419 during storage</i> .....   | 155 |
| <i>V-2.3.2. Volatile compound analysis</i> .....   | 156 |
| V-2.4. CONCLUSIONS .....   | 162 |
| V-2.5. AKNOWLEGE.....  | 163 |
| V-2.6. REFERENCES .....  | 163 |
| V-3. CONCLUSIONS : CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS ISSUS DE LA DEGRADATION DES ACIDES GRAS DE BACTERIES LACTIQUES.....                   | 166 |

---

## CHAPITRE VI

---

### ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES DE *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 AU COURS DU STOCKAGE ..... 167

|  |     |
|--|-----|
| VI. ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES DE <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 AU COURS DU STOCKAGE .....  | 168 |
| VI-1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....   | 168 |
| VI-2. EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE ON PHOSPHOLIPIDS COMPOSITIONS AND VIABILITY UPON<br><i>Lactobacillus plantarum</i> CWB-B1419 ..... | 169 |
| RESUME .....   | 170 |
| ABSTRACT .....   | 171 |
| VI-2.1. INTRODUCTION.....  | 172 |
| VI-2.2. MATERIALS AND METHODS .....  | 173 |
| VI-2.2.1. <i>Strain and culture</i> .....  | 173 |
| VI-2.2.2. <i>Solvents and standards</i> .....  | 173 |
| VI-2.2.3. <i>Lipid extraction</i> .....  | 174 |
| VI-2.2.4. <i>Solid-phase extraction (SPE)</i> .....  | 174 |
| VI-2.2.5. <i>HPLC- ELSD of the PL fraction</i> .....   | 175 |
| VI-2.3. RESULTS.....   | 176 |
| VI-2.3.1. <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 <i>growth characteristics</i> .....   | 176 |
| VI-2.3.2. <i>Biochemical behaviour of L. plantarum</i> CWBI-B1419 <i>during storage</i> .....  | 177 |
| VI-2.3.3. <i>Free fatty acids and lipids compositions</i> .....  | 178 |
| VI-2.3.4. <i>Fatty acids distribution in lipids classes</i> .....  | 179 |
| VI-2.3.5. <i>HPLC procedure for the separation and quantification of phospholipids in the PL fraction</i> .....                        | 180 |
| VI-2.4. DISCUSSION .....   | 182 |
| VI-2.5. CONCLUSION .....   | 183 |
| VI-2.6. AKWNOLEDGE .....   | 183 |
| VI-2.7. REFERENCES.....  | 183 |
| VI-3. CONCLUSIONS : ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES DE <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 AU COURS DU<br>STOCKAGE .....                         | 187 |

---

## CHAPITRE VII

---

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| DISCUSSIONS GENERALES ..... | 188 |
| Discussions générales ..... | 189 |

---

## CHAPITRE VIII

---

|  |     |
|--|-----|
| CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES..... | 211 |
| Conclusions générales .....                | 211 |
| Perspectives .....                         | 214 |

---

## ANNEXES

---

|   |     |
|---|-----|
| ANNEXES.....  | 217 |
| Annexe 1 : Article publié dans la revue « African Journal of Biotechnology ».....                   | 218 |
| Annexe 2 : Article publié dans la revue « Applied Biochemistry And Biotechnology ».....             | 219 |
| Annexe 3 : Article publié dans la revue « Applied Microbiology and Biotechnology ».....             | 220 |
| Annexe 4 : Article publié dans la revue « International Journal of Microbiology ».....              | 221 |
| Annexe 5 : Montage de la chromatographie HPLC couplé au ELSD et le chromatogramme.....              | 222 |
| Annexe 6 : Voies d'utilisation intracellulaire des acides gras et synthèse des phospholipides ..... | 223 |
| Annexe 7: Dispositif HPLC-SPME pour l'analyse des composés volatils .....                           | 224 |
| Annexe 8 : Formule type milieu MRS.....   | 225 |
| Annexe 9 : Appareillage pour la concentration et le séchage des cellules.....                       | 226 |
| Annexe 10 : Appareil servant à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....                   | 227 |

---

## TABLEAUX ET FIGURES

---

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| TABLEAUX ET FIGURES .....       | 228 |
| Liste des tableaux.....         | 229 |
| Liste des figures .....         | 231 |
| LISTE DES MEMBRES DU JURY ..... | 235 |

## **Publications & abréviations**

---

# Liste des publications

---

## I. Publications acceptées dans des revues à comité de lecture

Coulibaly I., Robin D-D., Destain J., and Thonart Ph., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal. *Afr. J. Biotechnol.*, **7**, 2006-2012.

Coulibaly I., Yao A.A., Lognay G., Fauconnier M.L and Ph. Thonart., 2009. Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 70-84.

Yao A.A., Coulibaly I., Lognay G., Fauconnier M.L and Ph. Thonart., 2008. Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 1045-1052.

Coulibaly I., Robin D-D., Destain J., Fauconnier M.L., Lognay G and Ph. Thonart., 2010. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *Int.l J. Microbiol.* **2010**, doi:10.1155/2010/625239, 9 pages.

## II. Publications en cours de soumission

Coulibaly I., Robin D. D., Destain J., Danthine S., Béra F., Majad L., Mejob T., Wathelet J.P. and Thonart Ph., 2010. Incidences de la lyophilisation sur la viabilité des bactéries lactiques au cours du stockage : *In press* (revue *BASE*).

Coulibaly I., Béra F., Robin D. D., Destain J., Majad L., Mejob T., Wathelet J.P. and Thonart Ph., 2010. Functional aspects of *Lactobacillus* sp. Synthèse bibliographique. (Soumis à *African Journal of Biotechnology*).

### III. Conférences, séminaires et congrès

Participation aux journées scientifiques “**Biomedica 2009**” du 1er au 2 Avril 2009 au Palais des Congrès de Liège - **Poster:** Coulibaly I., Yao A. A., Lognay G., Fauconnier M-L, Thonart P., 2009. Determination of phospholipids extracted from freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and during the subsequent storage.

Participation à “**Intensive Program food and health**” Cluj-Napoca Roumanie, February 2007, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine - **Poster:** Ibourahema Coulibaly, Maimouna Sow N'deye, Robin Dubois Dauphin and Philippe Thonart. 2007. Identification of new strain used as probiotic.

Participation au séminaire de formation “**Maîtrise des équipements : les pipettes automatiques**” le 1er Février 2006 à l'auditoire ZT1 de la Faculté des sciences Agronomiques de Gembloux. Formateurs : Mme Callens et M. Muydermans - Société : VWR.

Participation au séminaire de formation “**Les outils de la communication**” le 29 Mars 2006 à l'auditoire ZT1 de la Faculté des sciences Agronomiques de Gembloux - **Formateur :** M. Lahousse - **Société :** LAPIERRE & LIBERT s.c.r.l.

Participation au séminaire de formation “Maîtrise des dispositifs de mesure: les pH-mètres” le 24 Mai 2005 à l'auditoire CA de la Faculté des sciences Agronomiques de Gembloux - **Formateur:** Pr. BARTHELEMY Jean-paul. - **Laboratoire:** Unité de Chimie Analytique et Phytopharmacie.

Participation au séminaire de formation “Principes de stérilisation en laboratoire” le 16 Décembre 2004 à l'auditoire ZT1 de la Faculté des sciences Agronomiques de Gembloux - **Formateurs :** LAMBERT David - **Société :** H+P Labortechnik AG

#### IV. Formations au cours du doctorat

Participation aux formations spécifiques TechnofuturTIC “Initiation au langage html” du 16 Décembre 2008 au 20 Janvier 2009. Cours donné par TechnofuturTIC en formation à distance - **Formateurs** : Anne-Sophie PATINY & Baya AZOUIGH

Participation aux formations spécifiques BioWin “Bonnes Pratiques de Validation” du 26 au 27 Mai 2009 à la salle de réunion de Cardio3 Biosciences SA Axis parc Business Center Rue Edouard Belin, 12 B-1435 Mont Saint Guibert Belgique - **Formateur** : CAMBIER Jacques en collaboration avec Cefochim asbl Zoning de Seneffe, Zone C, 7180 Seneffe Belgique.

Participation aux formations spécifiques BioWin “Introduction à la Bioinformatique” du 02 au 03 Juin 2009 au centre de formation en biotechnologies- Tour GIGA B34 2eme Etage Avenue de l’hôpital 1, 4000 Liège - **Formateurs** : Xavier TORDOIR & Alexandre IRRTHUM

Participation au séminaire de formation “**Virologie - Module de base**” les 17 et 23 Mars 2010 à l’auditoire de Culture in vivo asbl, Rue du Progrès, 4 1400 Nivelles – Belgique. Formateur : Vincent MERIAUX

Participation au séminaire de formation “**Tests immunologiques**” le 24 Mars et le 1<sup>er</sup> Avril 2010 à l’auditoire de Culture in vivo asbl, Rue du Progrès, 4 1400 Nivelles – Belgique. Formateur : Vincent MERIAUX

Participation au séminaire de formation “**ELISA Validation**” le 30 Avril 2010 à l’auditoire de Culture in vivo asbl, Rue du Progrès, 4 1400 Nivelles – Belgique. Formateurs : Vincent MERIAUX, FAUCONNIER Allan

# Liste des abréviations

---

- a<sub>w</sub>** : water activity
- C** : cell suspension without protective compound
- CFA** : cellular fatty acid
- CL** : cell suspension with 8% lithothamne400®
- ELSD** : evaporative light scattering detection
- FD** : freeze-drying
- FFA** : free fatty acid
- GxABT** : Gembloux Agro-Bio Tech
- HOD** : hydroperoxyde acid
- HPOD** : hydroperoxy octadecadienoic acid
- HPOT** : hydroperoxy octadecatrienoic acid
- K*** : inactivation rate
- K<sub>a</sub>*** : acidification loss rate
- K<sub>g</sub>*** : kilogramme
- L*** : *Leuconostoc*
- LAB** : lactic acid bacteria
- Lb, L*** : *Lactobacillus*
- LPC** : lysophosphatidylcholine
- m** : mètre
- Me** : methyl esterified
- mL** : millilitre
- MUFA** : monounsaturated fatty acid
- NL** : neutral lipid
- P** : cell without cryoprotectant
- PA** : phosphatidic acid
- Pc** : cell with cryoprotectants
- PC** : phosphatidylcholine
- PE** : phosphatidylethanolamine



- 
- PG** : phosphatidyl-DL-glycerol  
**PI** : phosphatidylinositol  
**PL** : phospholipids  
**PUFA** : polyunsaturated fatty acids  
**R<sup>2</sup>** : determination coefficient  
**RH** : relative humidity  
**SFA** : saturated fatty acids  
**SM** : sphingomyeline  
**SPE** : solid phase extraction  
**T<sub>g</sub>** : température de transition vitreuse  
**TL** : total lipid  
**T<sub>s</sub>** : température de stockage  
**UFA** : unsaturated fatty acids  
**ULg** : Université de Liège

# Introduction générale

---

## Introduction générale

---

Représenté, comme l'un des marchés lucratifs, le plus grand en production de biomasse, les bactéries lactiques, après les levures sont de nos jours utilisées sous diverses formulations. Elles sont utilisées principalement pour des applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins. Comme starters, elles occupent aussi une place de choix dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères. Depuis quelques années, elles ont acquis un rôle croissant en santé animale et humaine, proposées sous le terme de probiotiques. En combinaison avec des prébiotiques (oligosaccharides), on obtient des synbiotiques qui sont très exploités en alimentation humaine. Utilisés dans les fermentations industrielles, ces bactéries interviennent dans plusieurs aspects de la vie humaine. Le pouvoir antibactérien de l'acide lactique produit dans les cultures est exploité dans plusieurs formulations alimentaires *in vitro* (conservations) et *in vivo* (probiotiques). En alimentation, la production de ces microorganismes représente une activité industrielle importante de plus en plus croissante. Dans le groupe des lactiques, les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* sont les plus couramment utilisées dans les fermentations alimentaires (laiteries, fromagerie...) (Collins et al., 1998 ; Gomez et al., 1999). La plupart des espèces appartenant à ce genre bactérien ont d'importants besoins nutritionnels et possèdent peu de résistance aux procédés industriels de transformation (séchage, stockage, etc.), de conditionnement ainsi qu'à leur application *in vivo* (propriétés physicochimiques du tractus digestif) Buckenhüskes, (1993). Cette situation amène les industries avec les microbiologistes à rechercher de nouveaux isolats de bactéries lactiques capables d'apporter plus de satisfaction en supportant l'ensemble des procédés de production, de stockage et de formulation sans que ne soient perdues leurs propriétés fonctionnelles (Bernier et al., 1998 ; Klein et al., 1998 ; Schillinger, 1999). Au cours des opérations de post-fermentation, les bactéries lactiques sont soumises à différentes opérations unitaires industrielles que sont : le refroidissement, la concentration, la cryoprotection, la congélation ou la lyophilisation et le stockage.

---

L'objectif de cette filière industrielle microbiologiste est de produire des concentrés bactériens de qualité élevée, c'est-à-dire, comportant un nombre élevé de cellules viables, capables d'être conservés le plus longtemps possible et bien reproductibles. Force est de constater que ces opérations unitaires induisent différents types de stress (chimique ou biochimique, thermique, osmotique, mécanique, oxydatif) qui sont à l'origine d'une dégradation de l'état physiologique des cellules, avec des conséquences directes sur la qualité technologique des ferments.

La maîtrise de l'ensemble des opérations pour obtenir des starters présentant des propriétés technologiques optimales lors de leur utilisation est indispensable. Pour garantir de telles performances technologiques (résistance, viabilité, etc.) et métaboliques au moment de leur utilisation, l'optimisation des conditions de production et de conservation des souches bactériennes est indéniable. Les procédés de conservation utilisés à l'échelle industrielle (lyophilisation, atomisation, fluidisation) sont de plus en plus performants, les paramètres opérationnels étant bien maîtrisés. Une fois transformées sous forme séchée, les bactéries lactiques sont souvent amenées à être congelées ou réfrigérées pour garantir une stabilité dans le temps. C'est pour cette raison que la déshydratation est souvent citée comme la principale cause de cette mortalité lors du stockage. Le maintien des propriétés probiotiques et organoleptiques et les impératifs de rentabilité impliquent en amont une sélection rigoureuse des souches destinées à la production industrielle de starter. Ainsi, la sélection de souches microbiennes (bactéries lactiques), technologiquement performantes et naturellement plus résistantes aux procédés technologiques est un moyen fiable de s'assurer la survie et la stabilité de ces souches lors du stockage même à température ambiante. Cette sélection est basée sur les critères de thermo-résistance et de la résistance à la dessiccation de bactéries lactiques isolées à partir d'échantillons de divers supports (sol, volaille, fientes etc.) provenant de pays chauds et arides. L'adaptation de ces souches à de telles conditions drastiques est la preuve qu'elles possèdent des systèmes d'adaptation capables d'améliorer leur capacité de résistance aux stress thermiques et osmotiques. La mise en contact des cellules avec un stress modéré leur permet également de s'adapter aux conditions défavorables, et donc de mieux résister à une situation de stress plus intense, comme celle qu'elles rencontrent lors de la congélation.

---

Après la sélection, les nouvelles souches destinées à la production industrielle, doivent faire l'objet d'une identification rigoureuse. Une validation permet de vérifier la conformité des critères d'activité, de performances et de pureté spécifiques à chaque application. Le contrôle de l'identité des espèces industriellement exploitées est fonction de ces caractères génotypes.

Des essais plus approfondis (recherches) visant à comprendre les mécanismes physiologiques à l'origine de ces dégradations (oxydations) ont été effectués. Par exemple, les cellules produites dans un environnement acide ou à basse température développent des mécanismes d'adaptation et résistent mieux (meilleure survie et meilleure activité) à la congélation et leur temps de survie au cours du stockage est prolongé. Par réaction à ces différentes conditions, les cellules développent des réponses physiologiques d'adaptation au niveau membranaire (acides gras membranaires) et au niveau cytoplasmique (synthèse de protéines de stress). Ces compositions en acides gras ouvrent de nouvelles voies d'investigation pour améliorer la conservation des cellules. Les résultats actuellement disponibles sur l'oxydation des acides gras décrivent principalement l'effet de conditions environnementales que sont : le pH, la température, la composition du milieu au cours de la fermentation, pour modifier la résistance des bactéries lactiques à la congélation et à la lyophilisation. Cependant, l'effet de stress modérés et de l'oxydation des acides gras membranaires liés aux opérations unitaires de production et les conditions de stockage, de même que l'état physiologique des bactéries lactiques, manquent de recherches et d'investigations.

C'est pour cette raison que cette étude prend toute son importance, en ce sens qu'elle a pour but de comprendre comment la résistance de *L. plantarum* CWBI-B1419, soumise à un stress au cours de la lyophilisation et pendant le stockage, est influencée par les étapes du procédé. Ce mémoire de thèse est présenté sous forme d'essai structuré autour d'articles scientifiques. En accord avec les règlements de l'université de Liège campus de Gembloux Agro-Bio Tech, les chapitres en anglais sont précédés d'un résumé en français.

Le document est subdivisé en huit (8) chapitres. Le **chapitre I**, intitulé “*Synthèse bibliographique*”, subdivisé en deux parties, porte sur la problématique de la recherche

---

et résume les connaissances actuelles sur les ferments et les bactéries lactiques, de même que les défis à relever pour produire et exploiter ces bactéries comme probiotiques. La première partie (Part – I) a fait l'objet d'un article sous la forme de revue soumise à *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* (BASE). Cette première partie de synthèse bibliographique (revue) (Part-I) : intitulée, “*Incidences de la lyophilisation sur la viabilité des bactéries lactiques au cours du stockage : revue*”, résume les techniques de conservation, avec une vue d'ensemble des techniques de séchage par atomisation et par fluidisation et surtout par lyophilisation. Cette dernière est la plus couramment utilisée en industrie agroalimentaire et se révèle comme une méthode de choix, malgré quelques inconvénients pour la production de ferments lactiques probiotiques. Quant à la deuxième partie (Part-II), rédigée en anglais “*Functional aspect of Lactobacillus spp. a review*”, elle met en relation la viabilité bactérienne et les produits de dégradation des acides gras cellulaires au cours du stockage. Elle décrit également les enzymes impliquées dans ces phénomènes de détérioration. Les phospholipides membranaires des bactéries lactiques ont aussi été étudiés. L'importance de ces produits au niveau des bactéries probiotiques a ainsi été démontrée. Suite à la synthèse bibliographique, les hypothèses, buts et objectifs de recherche sont posés.

Dans le souci d'assurer d'excellentes qualités probiotiques et organoleptiques, les impératifs de rentabilité impliquent une sélection rigoureuse des souches destinées à la production industrielle. La sélection de starters microbiens technologiquement performants et naturellement plus résistants est un moyen fiable pour améliorer la survie et la stabilité des souches lors du stockage. C'est qui est traité dans le **chapitre II**, intitulé “*Sélection, identification et caractérisation de nouvelles souches de bactéries lactiques thermorésistantes*”, où est étudié l'isolement de souches lactiques plus résistantes afin d'améliorer la conservation des starters au cours du stockage. Ces isolats de bactéries sont soumis à plusieurs séries de tests (acidité, pH, température, NaCl, etc.) afin de retenir les souches qui sont les plus résistantes dans ces conditions drastiques (température élevée, sécheresse). Ces souches seront capables de garantir une viabilité commercialement satisfaisante, après un stockage de longue durée. Ce chapitre constitue la première étape de l'étude de la résistance des bactéries lactiques (probiotiques) et a été publié dans le journal “*African Journal of Biotechnology*”, sous le titre de

---

« *Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal* », *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 2006-2012 : 2008.

L'étude des performances technologiques, au cours de la conservation à température ambiante des souches isolées, de même que leurs propriétés en tant que probiotiques constitue le troisième thème de ce mémoire. Le **chapitre III** est intitulé **“Effets des cryoprotecteurs sur la composition des acides gras cellulaires chez *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage à température ambiante”**. Dans ce chapitre, les résultats présentés portent sur l'effet des additifs au cours de la lyophilisation et pendant le stockage. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'effets notables de ces protecteurs pendant la lyophilisation mais un effet positif au cours du stockage en agissant sur la composition des acides gras membranaires et la viabilité cellulaire. Les résultats de ces travaux ont été soumis à la revue **“*International Journal of Microbiology*”** avec l'intitulé «*The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity*», *Int. J. Microbiol.*, : **2010**, article ID 625239, 9 pages. D'autres mécanismes permettant de comprendre la mortalité cellulaire pendant le stockage et la conservation ont fait l'objet de notre attention.

Les résultats présentés dans le **chapitre IV**, qui a pour titre **“*Décomposition des acides gras polyinsaturés au cours du stockage*”** montrent la dégradation des acides gras cellulaires. L'analyse des produits primaires de dégradation des acides gras polyinsaturés au cours du stockage chez *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 a été investiguée en comparaison avec la souche de *Leuconostoc mesenteroides*. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication et ont permis de comprendre le phénomène de mortalité lié à l'oxydation cellulaire. Cet article a été soumis dans le journal **“*Applied Microbiology and Biotechnology*”**, intitulé «*Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* CWB-B1419 related to their cellular fatty acids composition during storage*», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 70-84 : 2009. Les produits primaires de décompositions des acides gras ont été déterminés, il s'agit des oxylipines. Les recherches se sont ensuite focalisées sur la décomposition de ces dernières en composés volatils. Les différents aspects sont passés en revue dans le **chapitre V**, intitulé **“*Détermination des produits volatils chez *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419*”**.

---

Les produits secondaires volatils se dégageant, lors de la dégradation de poudres lyophilisées, pendant le stockage ont été caractérisés. Ces travaux basés sur la méthode de la SPME ont donné des résultats intéressants. Cette technique a permis de répertorier les différentes classes de produits volatils qui sont responsables des odeurs au cours de l'oxydation cellulaire. Les résultats de ces analyses ont fait l'objet d'un article soumis dans la revue "***Biotechnology and Applied Biochemistry***". Avec l'intitulé « *Characterization of volatile compounds emitted from freeze-dried L. plantarum CWBI-B1419 product during storage* », in press.

La cinquième partie porte sur l'étude de la composition et le suivi des phospholipides membranaires au cours du stockage. Après extraction en phase solide (SPE) sur une cartouche aminopropyl (Varian Bond Elut NH<sub>2</sub>), les échantillons ont été analysés par chromatographie HPLC couplée à un Evaporative Light Scattering Detection signal (SPME-ELSD). Le **chapitre VI**, intitulé "***Détermination des phospholipides chez Lactobacillus plantarum CWBI-B1419 au cours du stockage***" traite des modifications physiologiques observées lors du stockage au niveau des classes de phospholipides (acide phosphatidique, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, sphingomyéline, esters de stérol, phosphatidyl-DL-glycérol et lysophosphatidylcholine (PA, PE, PI, PC, SM, ES et LPC).

Les composés phospholipidiques chez *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 sont au nombre de sept. Au cours du stockage, ces différents composés sont soumis à réarrangements des acides gras. Le suivi au cours de 120 jours de conservation, a mis en évidence une corrélation entre ces modifications et la mortalité cellulaire de ces composés. Les résultats ont été discutés et l'importance de ces produits au niveau des bactéries probiotiques a été ainsi démontrée. Le résultat de ces travaux a été soumis dans "***Microbiology and Applied Biotechnology***" sous le titre « *Determination of phospholipids in lipids extracted from Lactobacillus plantarum CWBI-B1419 after freeze-drying and during the subsequent storage* », in press.

La **discussion générale, chapitre VII**, resume et discute l'ensemble des résultats des travaux qui ont donné lieu à la rédaction de publications. Les travaux de sélection ont



---

abouti à l'isolement et à l'identification de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 grâce à la combinaison de techniques de biologie moléculaire (PCR) et des tests biochimiques (API CHL50).

Ensuite, l'addition de certains additifs utilisés comme cryoprotecteurs a montré un effet positif sur la conservation des bactéries au cours du stockage. Notre travail n'a pas permis de montrer un effet notable pendant la lyophilisation. La discussion porte alors sur la dégradation des acides gras polyinsaturés au niveau de poudres lyophilisées de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 pendant le stockage à différentes températures. Le chapitre de la discussion générale se conclut sur la détection et l'analyse des phospholipides au cours du stockage en relation avec la survie des bactéries.

Le **chapitre VIII**, présente *les conclusions générales* les plus importantes de cette étude et les principales *perspectives* envisagées à la poursuite des recherches dans ce domaine.

# Chapitre I

---

## Synthèse bibliographique

## I. Synthèse bibliographique – Première partie

---

### I-1. Contexte et objectifs

Les bactéries lactiques naturellement présentes dans notre environnement, sont exploitées dans le monde entier, depuis l'antiquité, de façon empirique dans l'alimentation humaine et animale. Les industries alimentaires, pharmaceutiques et diététiques sont de plus en plus intéressées par la sélection et l'utilisation de bactéries lactiques présentant des propriétés spécifiques profitables aux consommateurs, tant sur le plan organoleptique que sur celui de la santé. Pour garantir de telles performances technologiques et métaboliques au moment de leur utilisation, il est important d'optimiser les conditions de production et de conservation des souches bactériennes, de contrôler leur viabilité et leurs aptitudes technologiques au cours du stockage. Les procédés de conservation utilisés à l'échelle industrielle (lyophilisation, atomisation, fluidisation, etc.) sont de plus en plus performants, les paramètres opérationnels étant bien maîtrisés. Les bactéries lactiques doivent encore être congelées ou réfrigérées sous forme de poudres ou de granulés, pour leur garantir une stabilité à long terme car la présence d'eau (activité d'eau élevée) est souvent citée comme la principale cause de mortalité lors du stockage. Cette revue présente les travaux déjà effectués dans le domaine, les procédés d'optimisation de la production et de la conservation des starters lactiques.

## I-2. Incidences de la lyophilisation sur la viabilité des bactéries lactiques au cours du stockage : revue

---

Publication 1 – *Biotechnol. Agr. Soc. Environ*

*Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*

Coulibaly, I<sup>(1\*)</sup>., Dubois-Dauphin, R<sup>(1)</sup>., Danthine, S<sup>(3)</sup>., Majad, L<sup>(1)</sup>., Mejjoub, T<sup>(2)</sup>., Destain, J<sup>(1)</sup>., Bera, F<sup>(3)</sup>., Wathelet, J.P<sup>(4)</sup>., Thonart, Ph<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

<sup>(3)</sup>Food Technology Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(4)</sup>Organic Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

La plupart des starters lactiques ont d'importants besoins nutritionnels et possèdent peu de résistance vis-à-vis des conditions environnementales entourant leur production (séchage, stockage...) et leur utilisation *in vivo* (propriétés physicochimiques du tractus digestif). Cette situation amène régulièrement les industriels à développer avec les microbiologistes, des projets de recherche de nouvelles bactéries lactiques capables de supporter l'ensemble des procédés de production, de stockage et de formulation sans perdre leurs propriétés fonctionnelles. Parmi les différentes méthodes de séchage (atomisation, fluidisation et lyophilisation), la lyophilisation permet d'obtenir une déshydratation poussée compatible avec des durées de conservation très longues. Cette méthode implique des changements de la température du produit assez agressifs pour les micro-organismes car elle nécessite une congélation, ce qui n'est pas sans conséquence pour les cellules. Dans certains cas, elles occasionnent des altérations cellulaires (peroxydation des acides gras) et génétiques (modification des protéines). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente sensiblement le taux de viabilité de ces cellules.

**Mots-clés.** Probiotiques, lyophilisation, radicaux libres, acides gras cellulaires, hydroperoxydes, peroxydation, cryoprotecteurs.

## Abstract

### **Preservation of industrial's lactic acid bacteria (probiotics) by freeze-drying.**

Majority of the lactic acid bacteria have important nutritional needs and do not have resistance against the environmental conditions surrounding their production (drying, storage...) and their use in vivo (physico-chemical properties of the digestive tract). In this condition, industrialists and microbiologists develop regularly research projects of new lactic bacteria able to support the whole of the processes of production, storage and formulation without losing their functional properties. Among the various methods of drying (atomization, fluidization and freeze-drying), freeze-drying makes it possible to obtain a thorough dehydration compatible with very long storage times. This method involve changes in product temperature and are enough aggressive for micro-organisms because they require freezing that is not without consequences for cells In otherwise, they cause cellular deteriorations (peroxydation of the fatty-acids) and genetics (modification of proteins). The use of cryoprotecteurs during freeze-drying and antioxidants during storage appreciably increases the rate of viability of these cells.

**Keywords.** Probiotics, freeze-drying, cellular fatty acid, free radicals, hydroperoxyds, peroxydation, cryoprotectants.

## I-2.1. Généralités sur le séchage des micro-organismes

### I-2.1.1. Introduction

La commercialisation de souches microbiennes, qu'il s'agisse de bactéries, de levures ou de moisissures, nécessite de les conditionner sous une forme durable stable (Leslie et al., 1995). En effet en raison de leur physiologie, les cellules microbiennes ne se conservent pas à l'état natif dans leur milieu de culture. Leur développement est souvent assuré en fermenteur dans un substrat liquide. Conservées dans ce milieu après leur croissance, les cellules y consomment les derniers nutriments disponibles et expriment pour la plupart, un métabolisme fermentaire qui nuit à la qualité du produit (modification du pH, émanation d'odeurs, etc.). De plus, les cellules après avoir brûlé leurs réserves, meurent en grand nombre (Zhao et al., 2005). Il est donc indispensable de stabiliser la population microbienne. Le séchage des cellules apparaît alors comme une solution pratique. En éliminant l'eau, le métabolisme cellulaire est bloqué, les cellules sont figées dans un état physiologique déterminé. Outre la conservation des micro-organismes, le séchage facilite la manipulation et le stockage et en réduit les coûts. Les méthodes de séchage seront passées en revue, surtout les méthodes appliquées à l'échelle industrielle à savoir l'atomisation, la fluidisation et la lyophilisation. Elles sont assez agressives vis-à-vis des micro-organismes car elles impliquent de fortes variations de la température du produit (Mille et al., 2005). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente significativement le taux de viabilité des cellules.

### I-2.1.2. Types de séchage dans les industries agro-alimentaires

Concentration, dessiccation, séchage, déshydratation : autant de termes que l'on regroupera sous le terme général d'élimination d'eau. Toutes ces opérations obéissent en effet, fondamentalement, aux mêmes lois et leurs objectifs sont les mêmes. Alors que la concentration traite un produit liquide pour aboutir à un liquide, le séchage part d'un produit liquide ou solide, pour aboutir à un solide. Le séchage est un procédé de conservation extrêmement ancien qui, privant l'aliment d'eau libre, interdit toute activité microbienne ou enzymatique. La concentration ne donne lieu qu'à une élimination d'eau

partielle, mais elle permet d'obtenir un produit dont la pression osmotique est parfois suffisante pour entraver tout développement microbien (Thonart, 2004). C'est ainsi que l'élimination d'eau permet de tamponner les caractères saisonniers de certaines activités agricoles (fenaïson) ou industrielles (concentrés de jus de pommes en cidrerie). Des produits secs tels que le lait en poudre, se conservent pendant des années. Le séchage consiste à éliminer un solvant emprisonné dans un solide en l'évaporant dans la phase gazeuse qui le baigne (Aller et al., 1998). Pour cela, il faut apporter de l'énergie pour compenser à la fois l'énergie de liaison solide-liquide (due à des forces de Van der Waals) et la chaleur latente de vaporisation du solvant (Bayrock et al., 1997a). Cet apport peut être fait par la phase gazeuse (on parle alors de séchage par convection), ou par une source externe (chauffage par effet Joule, par radiation infrarouge, ou par courants de haute fréquence). Il faut aussi éviter la saturation en solvant de la phase gazeuse, ce qui est assuré par un balayage de l'atmosphère, qui maintient la pression partielle en solvant au voisinage du solide, inférieure à la pression de vapeur saturante. Les techniques de séchage couramment utilisées sont les suivantes :

**Atomisation** : en agroalimentaire, l'atomisation est une méthode de déshydratation d'un liquide (jus, lait, ...). Lors de la déshydratation par atomisation, les aliments liquides sont projetés dans une chambre chauffante sous forme de fines gouttelettes ce qui permet de faire évaporer l'eau et de recueillir l'aliment déshydraté en poudre à la base de l'appareil. Cette méthode est utilisée notamment pour la déshydratation du lait. Elle se déroule en quatre grandes étapes : la nébulisation ou la dispersion en un spray homogène du liquide, le contact du spray avec l'air chaud (150°C), l'évaporation de l'eau des gouttelettes et la séparation du produit déshydraté (50-60°C) et de l'air. Elle a l'inconvénient de faire perdre aux aliments leurs arômes qui sont entraînés avec la vapeur d'eau et aussi, par suite du chauffage, de dénaturer certains composants car lorsque les cellules sont séchées avec une teneur faible en eau, un certain nombre des composants cellulaires comme l'ADN ou l'ARN et des protéines sont affligées (Santivarangkna et al., 2008).

**Fluidisation** : cette technique s'applique aux produits solides sous formes de particules ou susceptibles de se désagréger par frottement. La fluidisation consiste à faire passer une phase fluide (très souvent un gaz) à travers un lit de particules, supportées par



une grille, pour les mettre en suspension. Le terme fluidisation vient du fait que la suspension gaz/solide est amenée dans un état semblable à celui des fluides. La technique du séchage par lit fluidisé est la conjonction de deux idées : le séchage et la fluidisation. Si le courant est envoyé à une vitesse suffisante, elle provoque une désagrégation du solide, par contre, si cette vitesse n'est pas trop forte, les grains, au lieu d'être entraînés, ont une agitation désordonnée comparable à l'agitation moléculaire (Rasul et al., 2000). C'est ce qu'on appelle un lit fluidisé. Le but de la fluidisation est notamment d'augmenter la surface de contact gaz-solide pour faciliter le séchage. Il existe trois grands types de lit fluidisé : lit fluidisé simple, l'air assure à la fois la fluidisation, l'apport de chaleur et l'évacuation des vapeurs désorbées ; lit fluidisé vibré, l'apport de chaleur est encore assuré par l'air, mais la fluidisation se fait cette fois par un procédé mécanique ; lit fluidisé à échangeur interne, l'air n'assure que la fluidisation et l'évacuation des vapeurs. L'apport de chaleur est effectué par un échangeur externe, placé à l'intérieur du lit (Caillet et al., 2007).

**Lyophilisation** : la technique consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est à dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux (De Beer et al., 2006). La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condensateur, ou piège. Cette technique permet de conserver à la fois le volume et l'aspect du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur (Chouvenc et al., 2004). La lyophilisation comporte généralement trois étapes : la congélation, la sublimation et la dessiccation secondaire.

## I-2.2. Lyophilisation des bactéries lactiques

La lyophilisation s'est développée pendant la seconde guerre mondiale pour le stockage du plasma sanguin (Pegg, 2002). Ainsi, pour des vaccins comme pour un grand nombre de médicaments et de micro-organismes la lyophilisation est la seule technique permettant une conservation à long terme des principes actifs à l'état sec (Tang et al., 2004). Dans le domaine des industries alimentaires, les ferments lactiques (probiotiques et starters) sont de plus en plus utilisés sous la forme lyophilisée (Pegg, 2002).

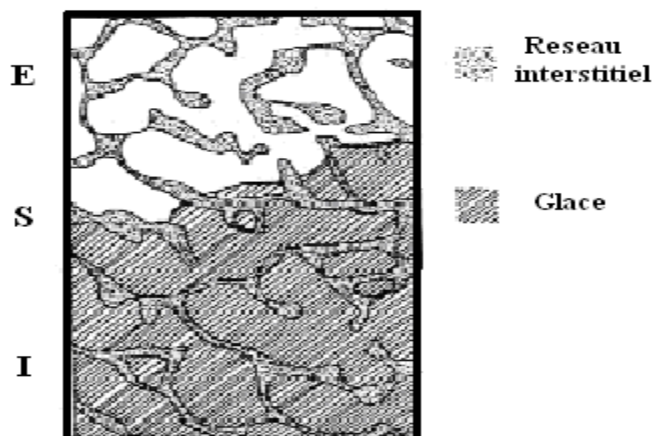
### I-2.2.1. Description et principes de la lyophilisation

La première phase de l'opération consiste à congeler le produit, c'est-à-dire à amener l'eau qu'il contient à l'état solide ; ceci implique de lui soustraire de l'énergie. La seconde phase consiste à extraire l'eau du produit par volatilisation en lui fournissant de l'énergie thermique (Shalaev et al., 2002). Cette seconde opération se déroule dans une enceinte où règne une pression très largement inférieure à la pression atmosphérique (de l'ordre de 0,1 à 1 mBar).

**Congélation :** au cours de la congélation, la solution liquide de départ est supposée homogène, une partie de l'eau se sépare des substances dissoutes pour cristalliser à l'état pur. Le reste de l'eau se solidifie ensuite peu à peu en mélange avec les solutés pour former une matière interstitielle (entre les cristaux de glace) qui adopte une structure amorphe (non cristalline ou vitreuse) (Simatos et al., 1994). En général, à partir d'une solution complexe, les substances dissoutes ne cristallisent pas (Searles, 2001 ; Shuck et al., 2004). Un paramètre important à prendre en compte pour l'étape de la congélation est la vitesse de congélation qui conditionne la dimension des cristaux de glace. En effet, plus les cristaux de glace formés sont grands, plus le diamètre des pores est important, et par conséquent, plus la vitesse de dessiccation est élevée. Il est donc important du point de vue technologique, de produire de petits cristaux de glace par une congélation rapide conduisant à l'obtention de petits cristaux intracellulaires non dommageables pour les cellules, (De Angelis et al., 2004).

**Dessiccation :** elle se déroule en deux temps : d'abord la sublimation de l'eau cristallisée (séchage primaire, l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux), puis la phase de désorption et d'évaporation de l'eau liée qui a adopté, lors de la congélation, une forme non cristalline ou vitreuse (séchage secondaire). Celle-ci résulte de la solidification sans réarrangement des molécules en raison de la très grande augmentation de la viscosité (Caillet et al., 2007). Ces états (cristallin et vitreux) peuvent coexister dans des proportions variables pour un même échantillon, la proportion d'eau à l'état vitreux étant d'autant plus grande que la vitesse de congélation et la viscosité sont grandes (Hausman et al., 2005). Les cavités laissées par les cristaux après la sublimation de l'eau

confèrent la porosité nécessaire à l'évaporation de l'eau située dans l'espace interstitiel (Fonseca et al., 2001).



**Figure 1.** Représentation schématique d'un produit en cours de lyophilisation. Symbole: S=interface de sublimation; E=zone externe poreuse; I=zone interne congelée (Simatos et al., 1994).

L'eau présente dans la masse vitreuse doit d'abord subir une diffusion moléculaire au sein de la matière avant d'atteindre les cavités et les canaux qui la mèneront vers l'extérieur. On comprend dès lors que la manière selon laquelle la congélation est menée conditionne la qualité du séchage. Des cristaux de grandes tailles et jointifs donnent lieu à un réseau de cavités qui communiquent entre elles et qui conduisent bien l'eau vers l'extérieur. De plus, la réhydratation est aussi facilitée avec moins de risque d'obtenir des « flotteurs », c'est à dire des matières de charges en suspension. Un degré de cristallisation élevé (c'est-à-dire qu'une forte proportion de l'eau totale est sous forme cristalline) favorise l'établissement de jonctions entre les cristaux et réduit l'épaisseur des cloisons de matière vitreuse qui séparent les cristaux comme l'indique la **fig. 1**, ci-dessus.

**Affaissement/collapse :** de manière schématique, la structure congelée peut être considérée comme un pore initialement rempli de glace. Les parois de ce pore sont constituées de la phase cryo-concentrée (soluté et eau « liée »). Lorsque la glace est éliminée par sublimation, les parois du pore ne sont plus soutenues par la glace. Si la température du produit est suffisamment faible, la phase cryo-concentrée est maintenue dans un état solide amorphe et on observe une rétention de structure (les parois ne

subissent pas d'écoulement visqueux et se maintiennent dans leur forme initiale). Au contraire, si la température remonte, le matériau constituant les parois du pore peut subir une transition vitreuse et l'écoulement visqueux qui en résulte entraîne l'affaissement de la structure. Selon [Pikal et Shah \(1990\)](#), l'affaissement du produit est observable, quand l'écoulement visqueux est induit par les forces de tension de surface qui tendent à minimiser la surface spécifique du produit ([Bellows et al., 1973](#)). La distance  $R_{collapse}$  parcourue par l'écoulement visqueux (de la surface plane au point de chute) peut être estimée par la relation proposée par [Pikal et al. \(1990\)](#).

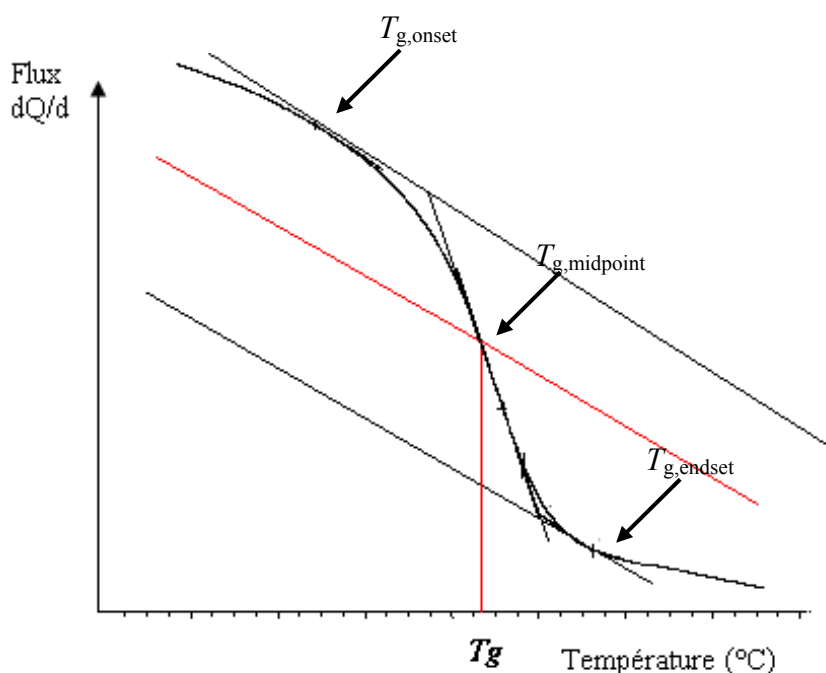
$$R_{collapse} = (2 \cdot \gamma_s) \int_0^t \frac{dt}{\eta(T, t)}$$

$\eta$  : représentant la « viscosité » globale de la matrice et son unité (Pa.s), dépendante du temps ( $t$ ) et de la température ( $T$ ) et ( $\gamma_s$ ) la tension de surface (N.m-1). L'affaissement de structure est un phénomène dynamique.

**Affaissement /Température de transition vitreuse :** selon [Matthieu et al., \(2002\)](#), la température de transition vitreuse (**fig. 2**) est un paramètre important pour la caractérisation d'un produit. Plusieurs types de mesures (la teneur en eau, l'activité de l'eau, les isothermes sorption-désorption et la température de transition vitreuse par l'ACD) sont souvent utilisés pour suivre et expliquer comment la migration de l'eau s'effectue au cours du temps dans un aliment ([Faiveley et al., 2003](#)). La transition vitreuse est le changement d'état d'une molécule sous l'action de la température, et entraînant des variations importantes de ses propriétés mécaniques (chute du module d'élasticité). Elle est caractérisée par une température de transition vitreuse ( $T_g$  pour "glass transition"). En dessous de cette température le polymère est dit vitreux (état solide) et présente le comportement d'un corps solide élastique. Au dessus, il présente le comportement de solide plastique (état viscoélastique), suite à l'affaissement des liaisons moléculaires (Force de Van der Waals) ([Labuza et al., 2004 ; Fonseca et al., 2001](#)). Par convention la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est le lieu où la valeur de la viscosité atteint  $10^{12}$  Pa.s ([Matthieu et al., 2002](#)).

La viabilité et l'activité des bactéries diminuent généralement pendant les différentes étapes de la fabrication et du stockage. Composées principalement d'hydrates de carbones et de protéines, les bactéries congelées sont susceptibles de subir les phénomènes de transition vitreuse et de collapse.

La mobilité moléculaire et les propriétés physicochimiques des matériaux biologiques congelés sont fortement liées à l'activité d'eau et à la température (Faivelet et al., 2003). La technique d'analyse thermique par l'analyse calorimétrique différentielle (ACD) consiste à maintenir une différence de température nulle entre la substance étudiée et une substance inerte de référence, lorsque les deux échantillons sont soumis à la même variation linéaire de température et au même environnement, et à mesurer l'énergie nécessaire fournie soit à l'échantillon étudié soit à la référence (généralement par effet Joule). Comme pour l'analyse thermique différentielle, les surfaces des pics enregistrés en fonction du temps, c'est à dire en fonction de la température, sont liées quantitativement aux effets thermiques et peuvent être calibrées soit par effet Joule soit par comparaison avec un pic obtenu lors d'une transformation d'enthalpie connue (Champion et al., 2000).



**Figure 2.** Evolution du flux de chaleur ( $dQ/dt$ ) en fonction de la température ( $T$ ), mesurée par analyse calorimétrique différentielle. La température de transition vitreuse ( $Tg$ ,  $Tg_{midpoint}$ ) correspond à la médiane aux deux droites parallèles entre tangentes aux points ( $Tg_{onset}$  et  $Tg_{endset}$ ) au point d'inflexion de la courbe.

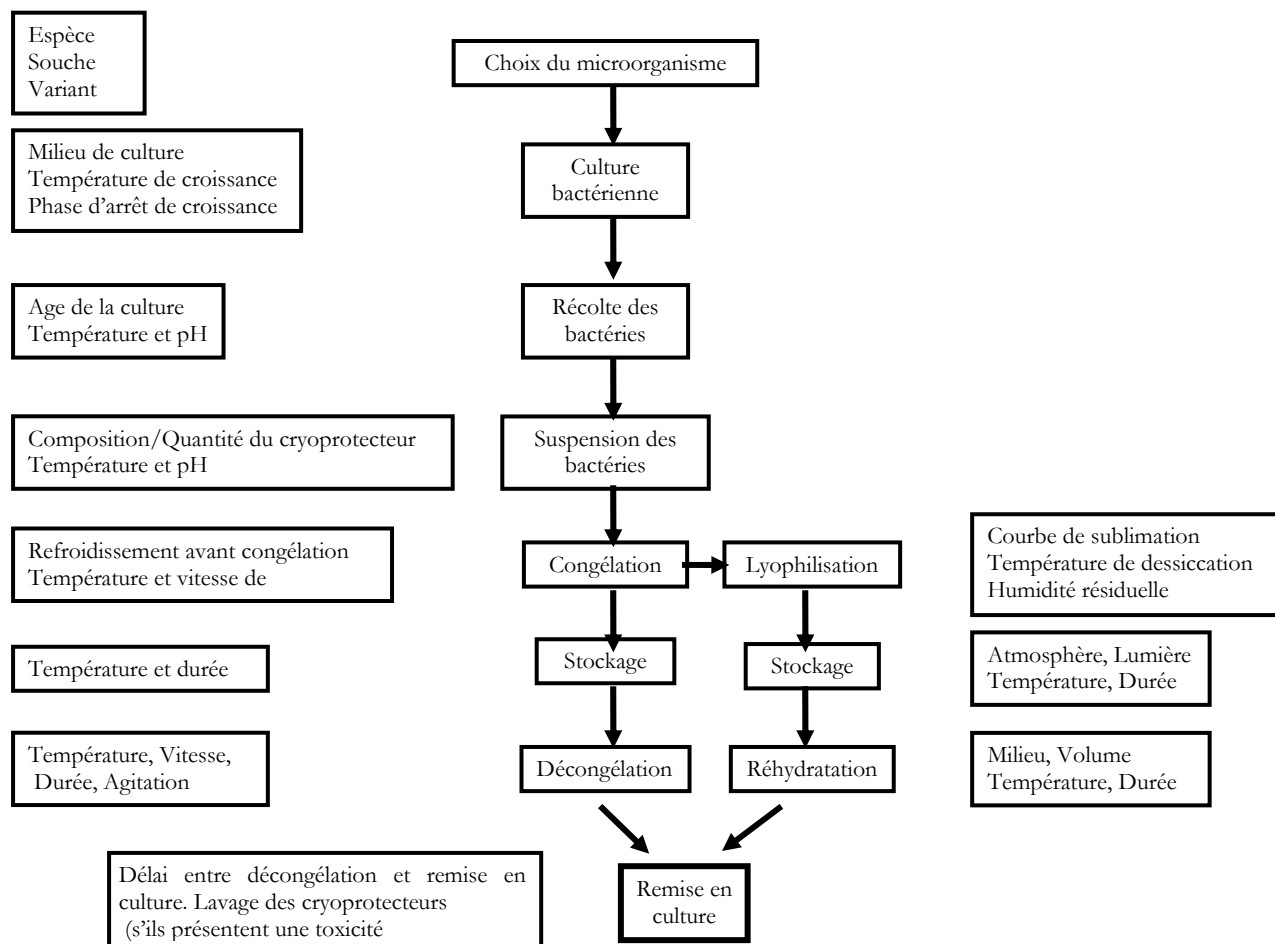
Ces diagrammes sont habituellement établis avec des mesures effectuées par analyse calorimétrique différentielle (ACD). Associés aux isothermes de sorption d'eau des produits secs, ils sont souvent employés pour expliquer la stabilité de ces produits pendant le stockage (Roos et al., 1991).

La transition vitreuse est aussi définie comme le changement d'état d'une molécule sous l'action de la température et entraînant des variations importantes de ses propriétés mécaniques (chute du module d'élasticité). Elle est caractérisée par une température de transition vitreuse ( $T_g$  pour "glass transition") (Hausman et al., 2005). En revanche, le phénomène d'affaissement intervient dans la couche sèche, en cours de dessiccation. L'étude des propriétés physiques susmentionnées réalisée sur les bactéries lactiques est susceptible d'expliquer certains changements qui se produisent pendant leur traitement et leur stockage

#### I-2.2.2. Facteurs agissants sur la conservation des cellules séchées

La maîtrise des procédés de congélation ou de lyophilisation ne doit pas se borner aux conditions de changements de l'état de l'eau ; le succès est intimement lié à l'état dans lequel se trouve le produit biologique au moment du traitement. Les nombreux facteurs qui influencent directement la survie des souches sont représentés sur la **figure 3** : facteurs physiques de refroidissement, de congélation et de décongélation ou de dessiccation mais aussi facteurs biologiques d'adaptabilité du microorganisme au traitement (Besson et al., 1987 ; Roméo et al., 2001). Le nombre et la diversité de ces facteurs expliquent la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles de la survie d'un microorganisme, d'autant plus qu'il est mal aisé de les étudier isolément. D'autres facteurs comme le rayonnement U.V ou solaire et l'oxygène favorisent les réactions d'oxydation. Pour une conservation optimale, un conditionnement sous vide ou sous atmosphère inerte (azote pur) en flacon scellé ou bouché hermétiquement est recommandé (King et al., 1998). La perte de viabilité des cellules sèches est une conséquence des dommages causés aux cellules au niveau de différentes cibles, à savoir la paroi cellulaire, la membrane cellulaire et l'ADN (Teixeira et al. , 1995a). Le séchage est responsable de différentes formes de dommages cellulaires, principalement en raison des changements dans l'état physique des lipides membranaires et dans la structure des protéines sensibles qui

conduisent souvent à une perte sévère de la viabilité bactérienne (Leslie et al. 1995). La dessiccation impose un stress sévère aux micro-organismes par l'élimination de l'eau et induit des changements de conformation des protéines et de la membrane cellulaire (Strasser et al., 2009).



**Figure 3.** Facteurs influençant la survie des bactéries la lyophilisation. [Encadrés] : Depuis leur culture jusqu'à leur décongélation ou réhydratation (Besson et al., 1987).

### I-2.2.3. Conservation du produit sec

Pour préserver le produit lyophilisé et lui assurer une longue conservation, il est parfois souhaitable de rétablir la pression atmosphérique dans la chambre de stockage à l'aide d'un gaz inerte et sec (N<sub>2</sub>, Ar). Par ailleurs, plus la température de stockage est basse, meilleure est la conservation, comme l'ont démontré Gardiner et al., (2000) au niveau des starters lactiques. Les produits lyophilisés sont caractérisés par les propriétés

importantes pour leur conservation, leur manipulation ou leur usage : humidité résiduelle, masse spécifique, couleur ou luminance (l'intensité lumineuse émise/réfléchi dans une direction donnée par unité de surface), leur friabilité et leur réhydratabilité (Abd El-Gawad et al., 1989).

### I-2.3. Utilisation des cryoprotecteurs

#### I-2.3.1. Cryoprotection des bactéries lactiques

Il existe des substances protectrices qui permettent aux cellules de mieux supporter une congélation ou une décongélation lentes et un stockage à température supérieure à -50°C appelées cryoprotecteurs (Fonseca et al., 2001). Les cryoprotecteurs sont groupés en deux classes qui ne sont pas forcément exclusives (tab. 1).

On distingue ainsi les substances qui pénètrent dans les cellules (cryoprotecteurs intracellulaires, CPI) et celles qui demeurent à l'extérieur des cellules (cryoprotecteurs extracellulaires, CPE), (Williams et al., 1977). Les bactéries contiennent naturellement des cryoprotecteurs : les **sucres** (sucrose et le tréhalose), chez les bactéries gram<sup>+</sup> (Bert et al., 1998) ; les **polyols** (glycérol, sorbitol, et mannitol), que l'on retrouve chez les algues, les champignons, les levures, les plantes et certaines bactéries (Kets et al., 1996a ; Hans et al., 1995), les **acides aminés et dérivés**.

**Tableau 1.** Quelques substances utilisés comme cryoprotecteurs cellulaires (d'après Adjizian et al., 1987).

| Agents                                     | Intracellulaires (CPI)  | Extracellulaires (CPE)                                     |
|--|---|--|
| Poids moléculaires (g/mol)                 | < 400   | > 10.000   |
| Activité à une concentration de l'ordre de | la mole (M)   | la millimode (mM)  |
| Exemples de molécules utilisées            | glycérol,<br>dyméthylsulfoxyde,<br>méthanol éthanol,<br>polyéthylène oxyde,<br>(PEO-400), diméthyl<br>acétamide 1-2 propanediol | polyvinyl pyrrolidone,<br>Amidon hydroxyéthyle,<br>dextran |



(bétaine et carnitine), chez plusieurs groupes de bactéries (Csonka, 1989) et l'acide tetrahydroxypyrimidine carboxylique (hydroxyectoïne) chez les bactéries halophiles (Del Moral et al., 1994), le glutamate, la glutamine, proline et l'alanine chez *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* et d'autres micro-organismes (Jewell et al., 1991) et les acides aminés bêta chez les bactéries méthanogènes (Lai et al., 1991).

### I-2.3.2. Mécanismes d'action des cryoprotecteurs

Les mécanismes de la cryoprotection sont l'objet de nombreuses études de nos jours. Les modes d'action les plus probables sont : un accroissement du volume de la phase liquide interstitielle, à une température donnée, par dépression du point de congélation commençante et donc réduction des effets liés à un refroidissement lent ; une diminution de la taille des cristaux de glace par abaissement de la température de nucléation et une réduction de leur vitesse de croissance et une stabilisation de la configuration native des protéines (Leslie et al., 1995). Lorsque les premiers cristaux de glace apparaissent, les CPE se concentrent uniquement à l'extérieur des cellules, contrairement aux autres solutés qui se concentrent à l'intérieur et l'extérieur des cellules. La perte d'eau des cellules conduit donc à une concentration en autre soluté, plus faible qu'en absence de CPE, minimisant ainsi les effets de l'accroissement de concentration de la solution interstitielle (Fonseca et al., 2004). Au niveau des membranes cellulaires séchées, des sucres comme le tréhalose et le saccharose peuvent remplacer les molécules d'eau dans leur liaison avec les groupes polaires des phospholipides empêchant ainsi les dommages durant la réhydratation (Leslie et al., 1995 ; Aguilera & Karel, 1997). Le tréhalose et le saccharose stabilisent la structure des protéines intracellulaires par ce phénomène de remplacement de l'eau (Carpenter et al., 1993). D'autres études ont montré que les cryoprotecteurs étaient indispensables lors de la congélation quelles que soient les courbes de refroidissement. Tous les cryoprotecteurs ne pénètrent pas dans les cellules. Il est d'usage de les séparer en cryoprotecteurs non diffusants (la plupart des sucres ajoutés) et diffusants (le glycérol, l'éthylène glycol, par exemple) (Pegg et al., 1988). Les cryoprotecteurs diffusants vont se substituer à une partie de l'eau intracellulaire et permettre ainsi une déshydratation partielle des cellules en plus de limiter la formation de cristaux de glace intracellulaire. Ils réduisent également la vitesse de croissance de ces

cristaux, abaissent la température de solidification de l'eau intracellulaire, tel un « antigel », et modifient la forme des cristaux de glace (Hey et al. 1998 ; Palasz et al., 1996). Quand aux cryoprotecteurs pénétrants, ils protègent aussi au cours de la congélation et de la décongélation en réduisant la taille des cristaux de glace et en induisant des formes de cristaux moins traumatisantes. Ils permettent, via l'augmentation de la viscosité du milieu, la diminution de la rapidité des mouvements de l'eau et de chocs osmotiques importants. De plus, ils permettent, via l'augmentation de la pression osmotique, la réduction de la quantité de cryoprotecteurs pénétrants nécessaires à une bonne conservation (Meryman, 1974).

## I-2.4. Acides gras et oxydation cellulaire

### I-2.4.1. Rôles des acides gras au niveau des bactéries

Les lipides membranaires sont le seuil d'intenses modifications en vue de maintenir une fluidité et ainsi assurer la perméabilité des membranes cellulaires.

**Tableau 2.** Effet de la température de culture sur la composition en acides gras (%) chez *L. plantarum* (Russell et al., 1989)

| Acides gras          | Noms communs         | Noms scientifiques     | 10°C | 30°C | 40°C |
|----------------------|----------------------|------------------------|------|------|------|
| C <sub>16:1</sub>    | Acide palmitoléique  | 9-hexadecenoic acid    | 11   | 18   | 2    |
| C <sub>16:0</sub>    | Acide palmitique     | hexadecanoic acid      | 15   | 30   | 56   |
| C <sub>17:0cyc</sub> | Acide margarique     | heptadécanoïque acide  | <1   | tr   | tr   |
| C <sub>18:1</sub>    | Acide oléique        | acide 9-octadecenoïque | 56   | 34   | 11   |
| C <sub>18:0</sub>    | Acide stéarique      | acide octadecanoïque   | 10   | 4    | 13   |
| C <sub>19:0cyc</sub> | Acide nonadécyclique | acide nonadécanoïque   | 6    | 8    | 16   |

*cyc*: cyclopropane fatty acid ; *tr* : trace.

Cette activité est indispensable pour le bon fonctionnement des cellules en cas de stress (Russell et al., 1989). D'autres travaux (tab. 2), similaires effectués par Russell et al. (1995) ont mis en évidence l'impact de la température d'incubation des cultures sur *L. plantarum*. Cette expérience a montré que l'augmentation de la synthèse des acides gras insaturés (C<sub>18:1</sub> principalement) d'une part et d'autre part une augmentation de la synthèse des C<sub>16:0</sub>, afin de réguler la fluidité membranaire était fortement liée à une élévation de la température d'incubation.

Pour *L. monocytogenes*, une baisse de la synthèse des C<sub>15:0</sub> et une augmentation de la synthèse des C<sub>17:0</sub> ainsi que des C<sub>18:1</sub> a été mis en évidence dans les conditions similaires (Russell et al., 1995).

#### I-2.4.2. Mécanismes d'oxydation des lipides

Après leur lyophilisation, au cours du stockage, les bactéries lactiques subissent d'intenses phénomènes de dégradations, liés pour la plupart à l'oxydation des lipides membranaires. Ces réactions d'oxydations sont les principaux facteurs qui déterminent la durée de vie des cellules contenant ces lipides. Les produits (substrats) de ces réactions sont principalement des acides gras insaturés (Rousch et al., 2003). Leur degré d'oxydation et la vitesse de celui-ci sont fonction de leur insaturation. Une différence fondamentale existe entre les acides gras saturés et les acides gras polyinsaturés. Tandis que les acides gras saturés s'oxydent à une température supérieure à 60°C, les acides gras polyinsaturés s'oxydent même lors de l'entreposage des aliments à l'état congelé (Niki et al., 2005). Plusieurs mécanismes naturels de contrôle de l'oxydation se déroulent au niveau des cellules. Ces mécanismes ont pour but de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques (Pereira et al., 2003). Les mécanismes de régulation des systèmes pro-oxydants et anti-oxydants sont mis en place pour maintenir l'équilibre entre les facteurs impliqués dans les réactions d'oxydation. Mais cette régulation des facteurs pro- et anti-oxydants est perturbée durant les processus de transformation et de stockage des produits, ce qui favorise le développement des réactions d'oxydation (Niki et al., 2000). Selon les travaux effectués par Steinberg et collaborateurs en 1989, les facteurs qui influencent, ou qui initient, l'oxydation des lipides sont de deux types : - des facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des

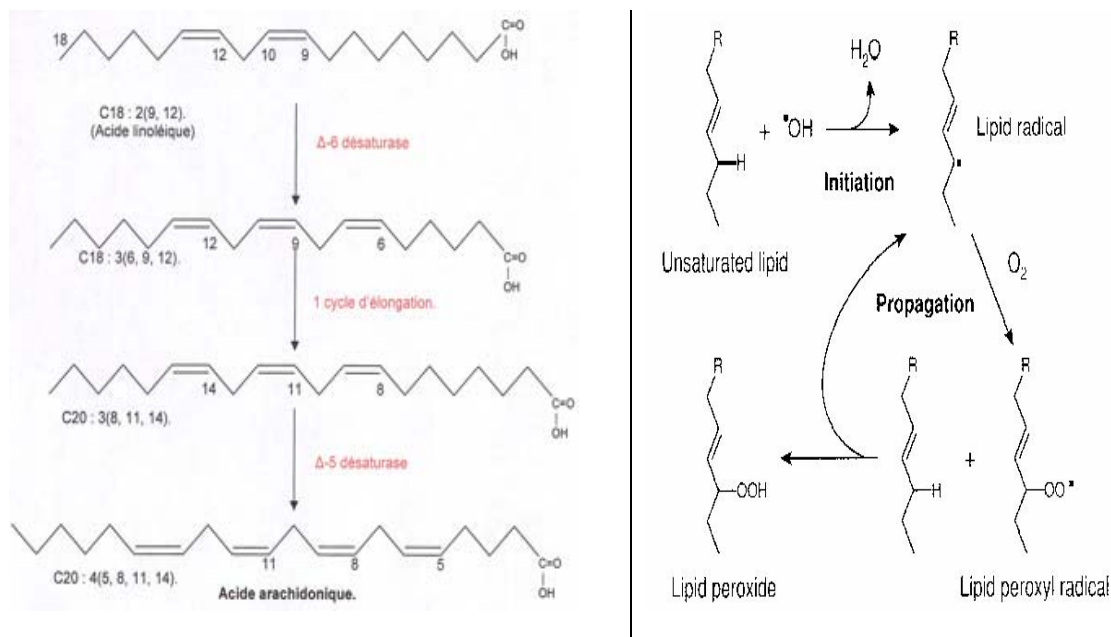
lipides (nombre et position des insaturations), la présence de pro-oxydants (ions métalliques, enzymes, etc.) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc.) et - des facteurs externes tels que la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation (Steinberg et al., 1989). La classification de l'oxydation est fonction des agents initiateurs, ainsi on distingue 3 types d'oxydation des lipides :

- l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres,
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs,
- l'oxydation enzymatique initiée par la présence des enzymes d'oxydation.

Parmi les travaux effectués sur les phénomènes d'oxydation, celui des lipides pose de sérieux problèmes qui résident dans la dégradation des propriétés biochimiques, organoleptiques (formation de composés volatils d'odeur désagréable : rancissement) d'une part et d'autre part dans les qualités nutritionnelles (par interaction des produits d'oxydation avec les acides aminés) des produits lyophilisés (Takebe et al., 2002). Les réactions d'oxydation conduisent à la formation de radicaux libres puis d'hydroperoxydes, composés intermédiaire, qui à leur tour se décomposent en donnant naissance à des composés volatils, des composés furaniques et surtout des aldéhydes saturés et insaturés qui sont des molécules cancérigènes et toxiques aussi bien pour les bactéries que pour l'homme (Chena et al., 2006). Ces réactions nécessitent la présence d'oxygène, qui doit être activé en oxygène singulet soit sous l'action des photons (lumière), soit de radicaux libres déjà présents dans le milieu, soit d'enzymes (peroxydases, lipoxygénases, etc.). Elles se développent en milieu anhydre ou à très faible activité de l'eau pour des valeurs ( $a_w < 0.2$ ), dans le cas de l'auto-oxydation et à l'interface eau-milieu apolaire dans le cas de l'oxydation catalysée par les enzymes (Bradley et al., 1992).

#### I-2.4.3. Autooxydation

Dans la nature, il existe un certain nombre d'autooxydations, dont celle du dioxygène ( $O_2$ ) qui donne naissance à l'ozone ( $O_3$ ). Dans l'organisme, l'auto-oxydation ou oxydation spontanée de certains composants, forme essentiellement des peroxydes, dégradés ensuite par des enzymes spécifiques (**fig. 4**) : les peroxydases.



Structure des principaux acides gras polyinsaturés

Schéma de l'auto-oxydation

**Figure 4.** Réaction auto-catalytique de l'oxydation des acides gras insaturés, (Yin et al., 2007).

Pour ce qui est des lipides, l'oxydation est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes. Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras (**Phase d'initiation**). La réaction s'auto-entretient, puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (**Phase de propagation**), les lipides insaturés disparaissent progressivement et la concentration en hydroperoxydes croît pour atteindre son maximum au milieu de la phase de propagation (Mason et al., 1955 ; Guesnet et al., 2005).

- **Phase d'initiation** (fig. 5) : en présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés représentés ici par (RH) perdent un proton ( $H^\circ$ ) pour former un radical libre de lipide ( $R^\circ$ ). L'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que par les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni...).



**Figure 5.** Phase d'initiation

• **Phase de propagation (fig. 6)** : les radicaux libres formés ( $R^\circ$ ) fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables ( $ROO^\circ$ ) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras (RH) pour former des hydroperoxydes (ROOH).

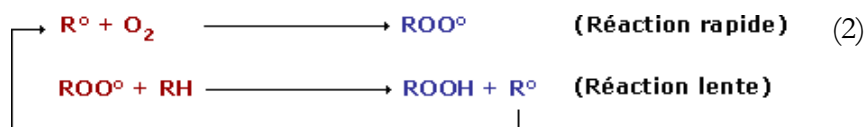


Figure 6. Phase de propagation

• **Phase de terminaison (fig. 7)** : les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre.

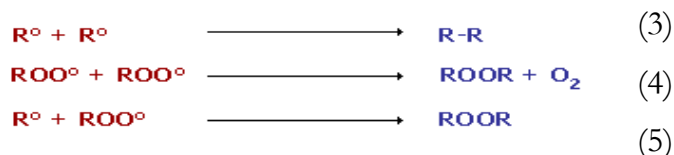


Figure 7. Phase de terminaison

Comme illustré par la **fig. 8**, les réactions d'autooxydations conduisent à la formation de radicaux libres puis d'hydroperoxydes, composés intermédiaires, qui à leur tour se décomposent en donnant naissance à des composés volatils, composés furaniques et surtout aldéhydes saturés et insaturés.

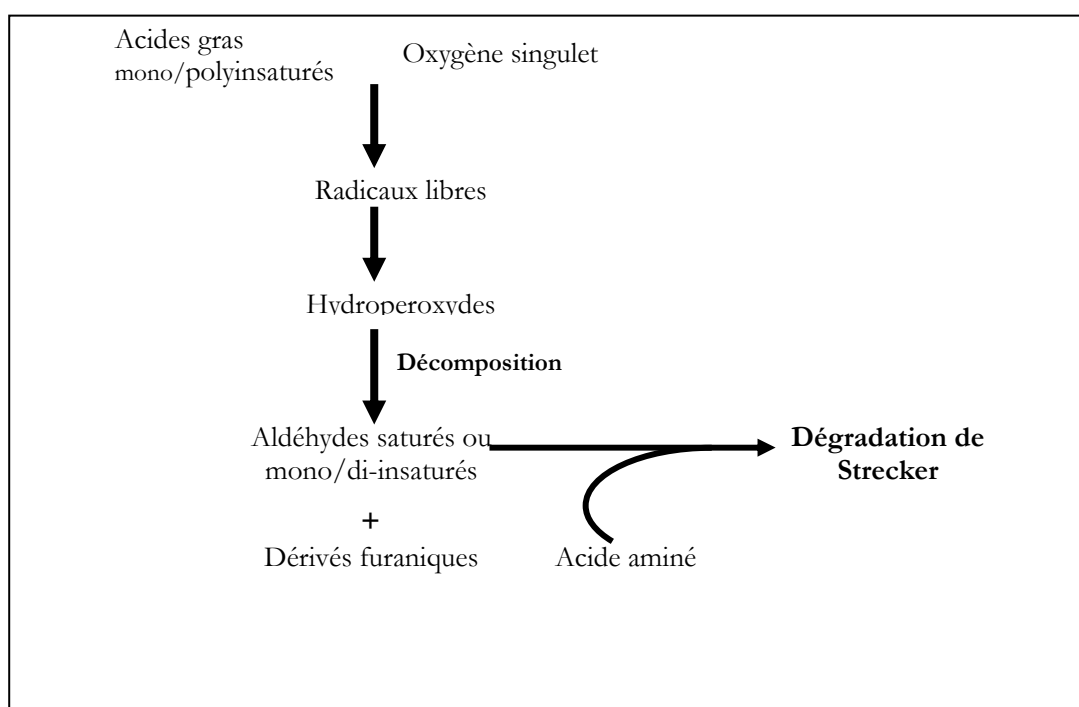
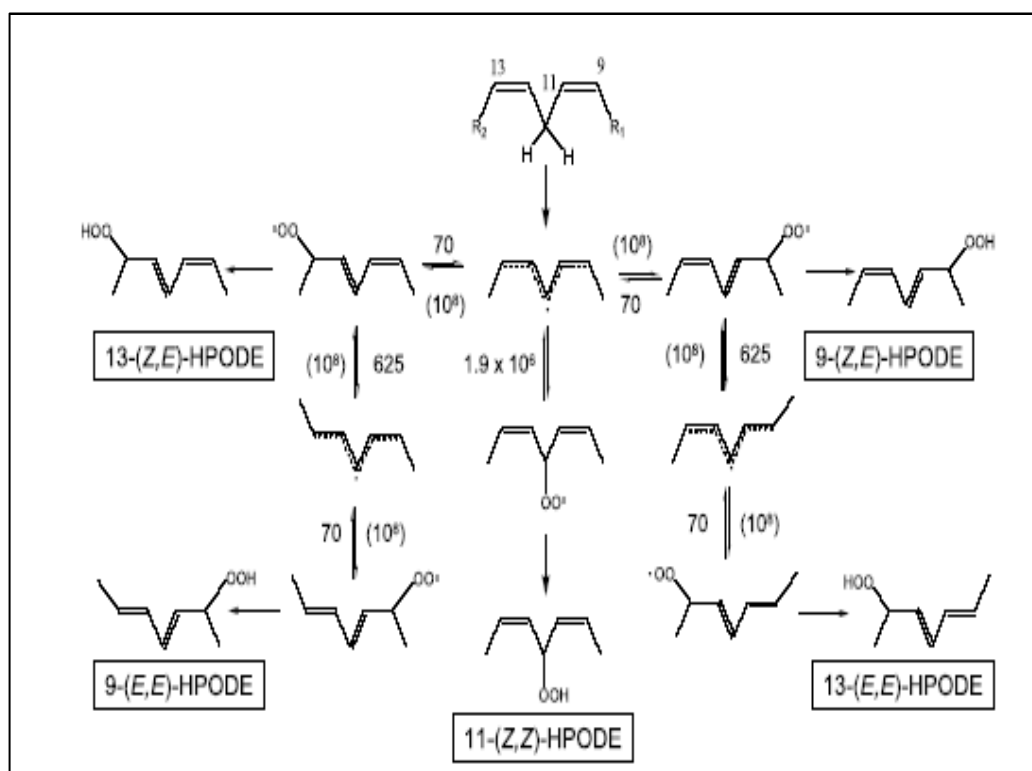


Figure 8. Schéma de l'auto-oxydation (Chyau et al., 1999)

En présence d'ammoniac, d'amines ou d'acides aminés (dégradations de Strecker) et d'hydrogène sulfuré provenant de la dégradation des acides aminés sulfurés (Chyau et al., 1999), ces réactions peuvent être à l'origine de nouveaux composés d'arômes dont les hétérocycles (Whitfield et al., 1992).



**Figure 9.** Les différentes étapes de la réaction d'oxydation des linoléates (d'après Niki et al., 2005).

La réorganisation ou la cyclisation de la peroxyde radical est une réaction importante seulement pour les AGPI ayant plus de trois doubles liaisons et elle n'a pas lieu au cours de l'oxydation des linoléates (Porter et al., 1995). Les différentes étapes de la réaction d'oxydation des linoléates sont illustrées par la **fig. 9** (modifié sur la base (Yin et al., 2005)).

Les hydroperoxydes, les premiers produits de l'oxydation des lipides sont instables (Noguchi et al., 2002). Cette instabilité engendre une série de réactions complexes qui aboutissent à une myriade de composés ayant des poids moléculaires variables (**tab. 3**).

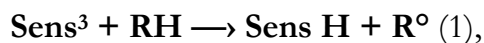
**Tableau 3.** Peroxydation des lipides (produits des linoléates). Les caractéristiques des réactions chimiques et les produits spécifiques issus de l'oxydation des linoléates par différents mécanismes.

| Type  | Caractéristiques       | Isomères des HPODE |  |                    |
|---|------------------------|--------------------|--|--------------------|
|   |                        | Régio              | Stéreo   | Enantio            |
| Enzymatique (15-LOX)  | catalytique spécifique | 13                 | cis, trans   | S                  |
| Non enzymatique, oxydation à chaîne radicalaire (LO <sub>2</sub> <sup>*</sup> ) | réaction en chaîne     | 9, 13              | cis, trans,<br>trans, trans<br>9-ct=13-ct,<br>9-tt=13-tt | R = S<br>(racemic) |
| Non enzymatique, oxydation non radicalaire ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )      | stochiométrie          | 9, 10, 12,<br>13   | cis, trans   |                    |

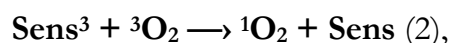
#### I-2.4.4. Photooxydation

Comme évoqué pour l'auto-oxydation, la photooxydation qui est une oxydation induite en grande partie par la présence de la lumière et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines, la chlorophylle ou la riboflavine est aussi une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène. Pour ce qui est du mécanisme, les photosensibilisateurs (Sens) absorberaient l'énergie lumineuse et afin d'atteindre un état de triplet excité (Sens<sup>3</sup>). Ces photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel et al., 1979 ; Hatch et al., 2003)

- ✓ Le premier type de mécanisme est induit par des photosensibilisateurs (type I), telle que la riboflavine, qui agissent comme des radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, elles arrachent un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène (1).

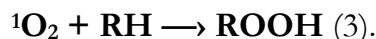


- ✓ Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (Sens<sup>3</sup>) avec l'oxygène triplet auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (2).

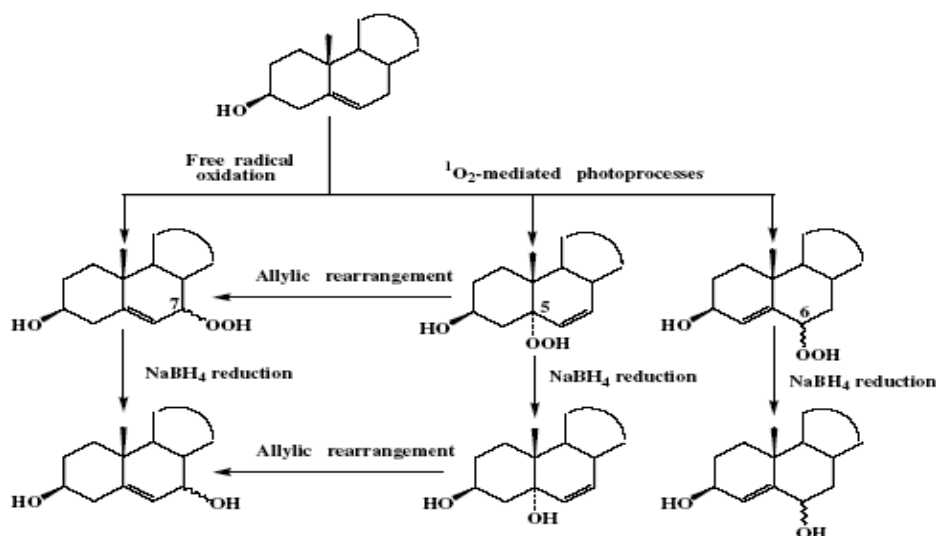




L'oxygène singulet ainsi formée est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde (ROOH) (3).



Les réactions radicalaires interviennent en chaîne par la suite de cette auto-oxydation. Selon les travaux effectués par Laine et al. (2006), les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par auto-oxydation.

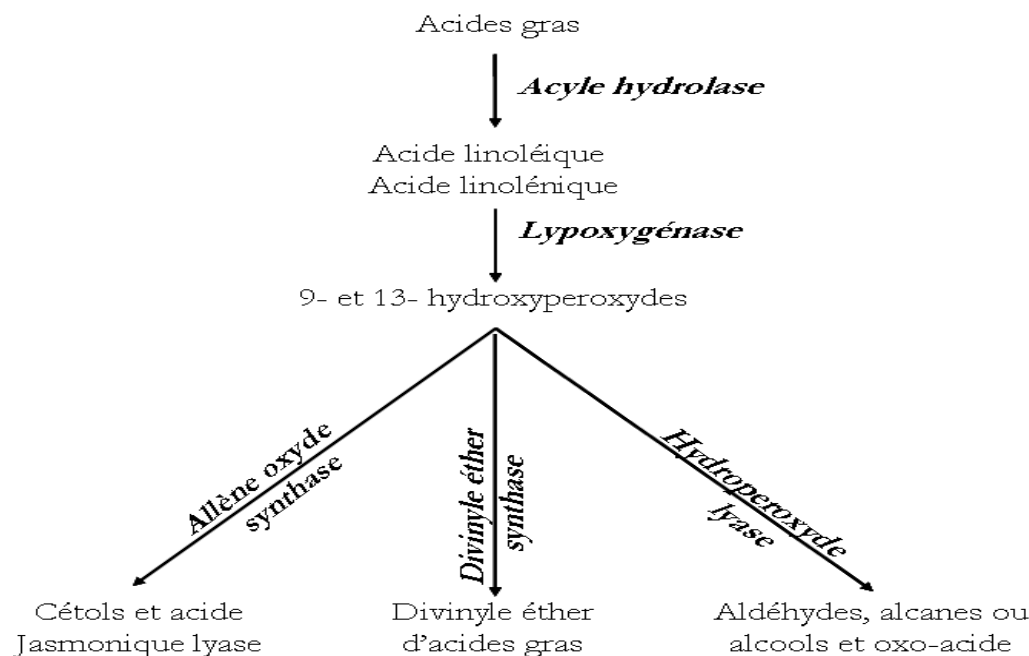


**Figure 10.** Auto-oxydation et photo-oxydation des  $\Delta^5$ -stérols, (Fernades et al., 2007).

#### I-2.4.5. Oxydation enzymatique

Après l'auto-oxydation et la photooxydation, un troisième type d'oxydation a lieu au niveau des lipides issus généralement des plantes. Cette oxydation est initiée par des enzymes, d'où le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés d'origine enzymatique (**fig. 11**). Les deux enzymes principalement impliquées sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase. La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes (Pereira et al., 2003). Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et des phospholipases. La cyclooxygénase est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras insaturé pour former des hydroperoxydes spécifiques (Porter et al., 1995). L'oxydation enzymatique se produit même à basse température. Durant le stockage, à l'état congelé l'activité enzymatique est ralentie. A  $-40^\circ\text{C}$ , l'oxydation

enzymatique des lipides est complètement arrêtée. Cependant, une fois la décongélation amorcée et des températures de 0°C à 4°C atteintes, cette activité reprend et s'accroît (Collado et al., 2007).



**Figure 11.** Les principales voies de la lipoxygénase.- The main lipoxygenase pathway. (Fauconnier, 1997).

## I-2.5. Facteurs influençant l'oxydation des lipides

### I-2.5.1. Principaux facteurs de l'oxydation des lipides

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'oxydation des lipides au cours des procédés de transformation et de conservation des aliments. Parmi celles-ci, citons : la température, le pH, l'activité de l'eau ( $a_w$ ) et la pression partielle en oxygène ( $PO_2$ ), (Chatterjee et al., 2000). Une élévation de la température favorise l'oxydation des lipides. Cette oxydation est d'autant plus rapide que la température est importante. Ainsi, les opérations de cuisson par exemple sont bien connues pour avoir un effet pro-oxydant marqué (Howlett et al., 1997). Quant à la congélation, par contre elle se révèle comme un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des aliments, car la vitesse d'oxydation des lipides est notablement réduite à faible température. L'influence du pH dans le déroulement de l'oxydation se manifeste par le biais de plusieurs mécanismes. Premièrement, pour les réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir des protons ( $H^+$ ), le

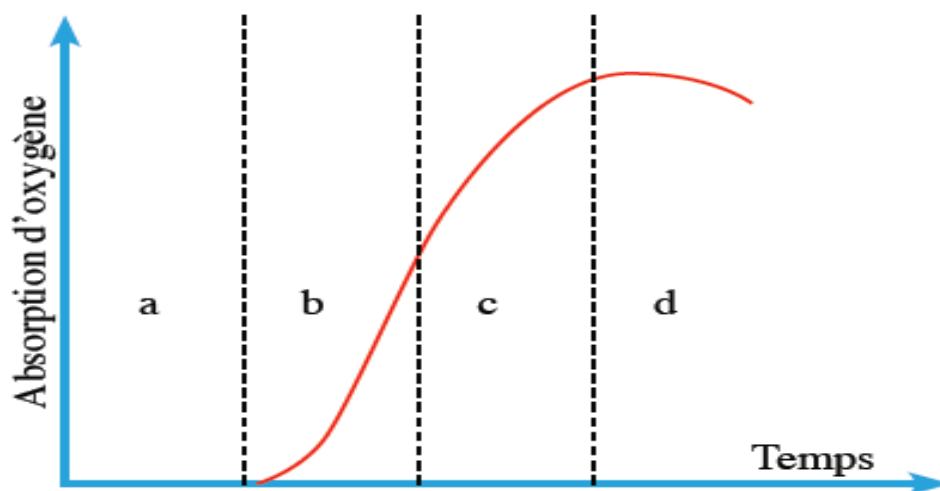
potentiel redox décroît linéairement avec le pH. Un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation, en particulier quand les espèces pro-oxydantes (ions des métaux de transition) ou antioxydantes (acide ascorbique, BHT et BHA) solubles en phase aqueuse sont présentes (Hatch et al., 2003). Le pH intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité et le potentiel redox de ces ions métalliques, et donc leur réactivité vis à vis des molécules oxydables sont élevées. Dans le cas des tissus musculaires, un pH bas favorise la dénaturation des hémoprotéines et la libération du fer qui est un agent pro-oxydant. L'activité de l'eau d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. En effet, l'eau permet la mobilisation des substances pro-oxydantes ou antioxydantes (Berger et al., 2001). En général, une activité d'eau ( $a_w$ ) comprise entre 0,2 et 0,3 correspond aux vitesses d'oxydation les plus faibles. Ces valeurs correspondent à la formation d'une couche monomoléculaire d'eau autour des constituants. Une  $a_w$  comprise entre 0,6 et 0,8 correspond aux vitesses d'oxydation les plus grandes.

Par contre, les réactions d'oxydation enzymatique des lipides sont fortement ralenties quand l'activité de l'eau est inférieure à 0,6. La concentration d'oxygène (pression partielle en oxygène) dans l'espace environnant le produit et dans le produit lui-même influence la vitesse d'oxydation des lipides. Elle intervient également au niveau de la nature des produits secondaires formés par décomposition des hydroperoxydes. Son incidence est donc à la fois sur la durée de conservation du produit et sur la nature des odeurs perçues quand le produit est oxydé. La relation entre vitesse d'oxydation et pression partielle en oxygène dépend de plusieurs facteurs comme l'activité de l'eau, la température, la nature des catalyseurs. Quand la concentration en oxygène est suffisamment élevée, la vitesse d'oxydation est indépendante de cette concentration. Inversement, quand la concentration d'oxygène est suffisamment faible, la vitesse d'oxydation est indépendante de la concentration en substrat et directement proportionnelle à la concentration d'oxygène.

#### **I-2.5.2. Impacts de l'oxydation des lipides sur les starters**

Les dommages causés aux LAB pendant le stockage est également attribuée aux modifications dans le profil des acides gras (taux d'acides gras saturés et des acides gras

insaturés) de la membrane, pour laquelle l'oxydation des lipides est une cause importante (Castro et al., 1995 ; 1996 ; Teixeira et al. 1996 ; Andersen et al. 1999). L'oxydation des lipides génère des produits primaires qui sont les hydroperoxydes (**fig. 12**). Ces hydroperoxydes peuvent générer, après leur dégradation, des composés de faible poids moléculaire (carbonyles, alcools, acides,..) très nocifs pour la survie de bactéries.



*a- Période d'induction*

*b- Formation d'hydroperoxydes induisant la réaction en chaîne à radicaux libres*

*c- Formation prédominante d'hydroperoxydes*

*d- Prédominance de la scission des hydroperoxydes avec formation de radicaux libres*

**Figure 12.** Représentation schématique de l'autoxydation des lipides insaturés (Techniques de laboratoire N°2 -2007).

Elle peut donner lieu à des changements physiques dans les fonctions et les structure membranaires (In 't Veld et al., 1992 ; Borst et al., 2000). La perte rapide de la viabilité tend à se produire au début de la période de conservation (Korobkina et al., 1982; Brennan et al., 1983 ; King et al., 1993), tandis que les changements dans la composition lipidique de la membrane cellulaire augmentent au cours du stockage (Teixeira et al., 1996). En outre, il est établi aujourd'hui que la conséquence des nombreuses oxydations biologique aboutit à la formation de radicaux libres, qui sont l'une des principales causes de la mortalité cellulaire (Van et al., 2002). L'attaque des acides gras par les radicaux libres diminue l'hydrophobicité en raison de l'introduction de groupes hydrophiles et affaiblit par conséquent, l'interaction hydrophobe protéines membranaires, (Santivarangkna et al., 2008).

Par exemple, une diminution de l'activité de l'ATPase membranaire a été suggérée comme conséquence du changement de cette interaction (Castro et al., 1996). Les changements affectent aussi dans la membrane, certains mécanismes de contrôle liés à la régulation et à la réplication de l'ADN, car l'initiation de la synthèse d'ADN et son maintien requièrent l'attachement du complexe d'ADN à la membrane cytoplasmique (Israeli et al., 1975). En outre, les radicaux libres peuvent aussi bien directement provoquer des dommages de l'ADN (Inouye, 1984 ; Akasaka 1986 ; Hruszkewycz 1988). Bien qu'il soit plausible d'ajouter un antioxydant pour diminuer l'oxydation des lipides, l'addition doit être exercé avec soin. Ces méthodes et composés serviront dans la suite à définir les différentes approches afin d'inhiber l'oxydation cellulaire.

## **I-2.6. Différentes approches pour inhiber l'oxydation des starters lactiques lyophilisés au cours du stockage**

Le contrôle ou l'inhibition de l'oxydation des lipides est basée sur la maîtrise des paramètres : température, pH,  $a_w$  et concentration en oxygène (Coulibaly et al., 2008). Selon Buettner et al. 1999, les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être répartis en deux types : les *antioxydants préventifs* qui empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou interceptent les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation et les *antioxydants « chain breaking »* qui interceptent les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique et retardent la peroxydation (période d'induction) (Niki et al., 2000).

### **I-2.6.1. Mécanismes d'action des antioxydants préventifs**

#### ***I-2.6.1.1 Les chélateurs des métaux de transition :***

Le cycle redox de certains métaux responsable dans la production des radicaux libres est bloqué par des chélateurs de métaux. Ce sont des protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le fer, la céruloplasmine et l'albumine qui séquestrent le cuivre (Mugoli et al., 1993). Notons au passage que les flavonoïdes sont de bons chélateurs du fer ceci est un des mécanismes de leur activité antioxydante (Van et al., 1998 ; Morel et al., 1993).

### *I-2.6.1.2 Les désactivateurs (quencher) de l'oxygène singulet.*

Selon Buettner et al. (1999), les « quencher » peuvent agir par désactivation chimique en se fixant sur une molécule telle qu'un acide gras pour donner un hydroperoxyde :  $^1\text{O}_2 + \text{LOH} \rightarrow \text{LOOH}$ , ou encore par désactivation physique éliminant l'énergie d'excitation sans changement chimique :  $^1\text{O}_2 + \beta\text{-carotène} \rightarrow \text{O}_2 + \beta\text{-carotène}$ . Les caroténoïdes sont cités particulièrement pour leur efficacité et le lycopène pour sa grande réactivité.

### *I-2.6.1.3 Elimination des hydroperoxydes*

Les hydroperoxydes sont générateurs des radicaux libres, leur élimination prévient l'oxydation des biomolécules. Les hydroperoxydes (LOOH) peuvent être réduits par des enzymes. La glutathion peroxydase (GPx) élimine les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### *I-2.6.1.4 Les piègeurs d'oxygène*

Ce sont des molécules telles que les sulfites ou l'acide ascorbique.

### *I-2.6.2 Mécanismes d'action des antioxydants de type « chaîne rompue et chain breaking »*

Cette catégorie d'antioxydants va réagir le plus souvent avec les radicaux peroxydes ( $\text{LOO}^\circ$ ) ou alcoxydes ( $\text{LO}^\circ$ ) interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation. Il est à noter que ces antioxydants n'inhiberont pas par conséquent l'autoxydation des lipides par l'oxygène singulet. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes : - interviennent en donnant de l'hydrogène  
- agissent comme des antioxydants sacrifiés.

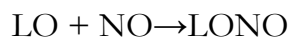
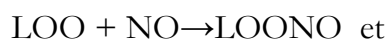
### *I-2.6.2.1 Les donneurs d'hydrogène*

Ces antioxydants sont principalement des composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés (tocophérols, tocotriénols, BHT, BHA, flavonoïdes). Ils sont susceptibles de céder un hydrogène au radical alcoxyde et au radical peroxyde. Après la réaction d'oxydation, l'antioxydant est transformé en un radical qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne

radicalaire. Il doit ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant. Le tocophérol donnera un radical tocophéroxyde qui évoluera vers un composé d'oxydation non radicalaire tel que la tocophérylquinone ou un composé de dimérisation ou de polymérisation supérieure.

#### *I-2.6.2.2 Les antioxydants «sacrifiés» :*

Le qualificatif de « chain breaking antioxidant sacrificial » employé par Buettner concerne des molécules, elles mêmes radicalaires, qui réagissent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la propagation de la peroxydation. Deux radicaux sont connus pour se combiner avec les radicaux peroxydes : le monoxyde d'azote (NO) et l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).



#### *I-2.6.2.3 Mécanismes d'action mixtes des antioxydants :*

Certains antioxydants ont des modes d'action mixtes. Deux exemples peuvent illustrer ces mécanismes multiples. L'exemple de l'acide ascorbique qui est un désactivateur de l'oxygène singulet, élimine aussi l'oxygène moléculaire, il est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques et aux radicaux tocophéroxydes pour régénérer le tocophérol.

Quand aux flavonoïdes tels que les anthocyanines, les catéchines, les flavones, les flavonols, les isoflavones et les proanthocyanidines ce sont des chélateurs de métaux, piègeurs d'anions superoxyde et donneurs d'hydrogène. L'utilisation des antioxydants (tocophérols, polyphénols, flavonoïdes, vitamine E, vitamine C, etc.) est souvent la méthode la plus courante en industries agroalimentaires pour inhiber l'oxydation des lipides.

Les antioxydants utilisés sont soit des agents de prévention qui bloquent la phase d'initiation en réagissant avec les initiateurs de la réaction (O<sub>2</sub>, lumière, métaux, ...), soit des agents de terminaison qui bloquent la poursuite de la phase de propagation en réagissant avec les radicaux libres et les transformant en composés stables (Niki et al., 2000).

## I-2.7. Remerciements

Nous remercions très sincèrement le personnel du CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle) pour son assistance et son dévouement ainsi que Maryse, Vincent Hotte et Dany Trisman de l'unité de Chimie organique de la faculté agronomique de Gembloux. Je remercie également la république de Côte d'Ivoire pour son soutien financier.

## I-2.8. Conclusions

Il est donc possible de conserver par lyophilisation un grand nombre de bactéries lactiques, à l'échelle du laboratoire, mais aussi industrielle. Les conditions opératoires qui permettent d'obtenir une bonne conservation de l'activité métabolique des bactéries sont relativement bien connues, à l'inverse des mécanismes de leur altération. La résolution des difficultés, telles que la mauvaise conservation de certaines souches à l'état lyophilisé et la reprise d'activité souvent trop lente des ferments destinés aux ensemencements directs, passe certainement par une meilleure compréhension de ces mécanismes. Pour optimiser la conservation, plusieurs techniques et voies de recherches doivent être menées de concert. Parmi les plus prometteuses, on peut citer l'étude des modifications subies par les structures membranaires au cours des traitements de conservation, la recherche de formulation incorporant des cryoprotecteurs plus efficaces, l'induction des mécanismes de résistance à ces traitements (par adaptation des bactéries par leur culture dans des conditions appropriées ou éventuellement par utilisation d'antioxydant afin de bloquer le phénomène de peroxydation).

## I-2.9. Références bibliographiques

- Abdel Gawad, A.M., Nassar, A.M. and Hilali, M., 1989. Isolation of *Toxoplasma gondii*, *Isospora felis* and *Isospora rioolfa* from the meat of some farm animals. *J. Egypt. Vet. Med. Assoc.*, **49**, 405 - 414.
- Aller R. C., 1998. Mobile deltaic and continental shelf muds as suboxic, fluidized bed reactors. *Mar. Chem.*, **61**, 143-155.
- Bayrock D., and Ingledew W.M., 1997a. Fluidized bed drying of baker's yeast : moisture levels, drying rates and viability changes during drying. *Food. Research. Intern.*, **30**, 407-415.
- Bayrock D., and Ingledew W.M., 1997b. Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food. Research. Intern.*, **30**, 417-425.



- Berger S., Weichert H., Porzel A., Wasternack C., Kühn H., Feussner I., 2001. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1533**, 266-276.
- Bert P. and Glaasker E. (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **29**, 397- 407.
- Besson P., and Cutayar S., 1987. *Stabilité et Conservation des Microorganismes*, 12<sup>ème</sup> colloque, p. 54, Société Française de Microbiologie, Section Microbiologie Industrielle, Bhandari B.R. and Howes T. 1999. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *J. Food Eng.*, **40**, 71-79.
- Blond G., 1994. Congelation-Lyophilisation. *ENS. BANA*. 127-148.
- Bozoglu T.F., and Gurakan G.C., 1989. Freeze-drying injury of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food. Protect.*, **52**, 259-260.
- Bradley D.G., Min D.B., 1992. Singulet oxydation in foods. *Critical Reviews in Foods Sc. and Nutr.*, **31**, 211-236.
- Buettner G. 1999. Singlet oxygen toxicity is cell line-dependant: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochem. Photobiol.*, **70**, 858-67.
- Caillet A., Rivoire A., Galvan J.M., Puel F., Févotte G., 2007. Crystallization of Monohydrate Citric Acid. Part 1: In situ monitoring through the joint use of raman spectroscopy and image analysis. *Cry. Gr. Design.*, **7**, 2080-2087.
- Carpenter J.F., and Crowe J.H., 1988. Modes of stabilization of protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiol.*, **25**, 459-470.
- Carpenter J.F., Crow J.H., and Arakawa T., 1990. Comparison of solute-induced protein stabilisation in aqueous solution and in the Frozen and Dried states. *J. Dairy Sci.* **73**, 3627-3636.
- Carpenter J.F., Prestrelski S.J., Arakawa T. (1993). Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 456-464.
- Champion D.; Le Meste M.; Simatos D. 2000. Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range. *Trends. Food. Sc. Technol.* **11**, 41-55.
- Chatterjee M. T., Seunath, A. Khalawan, S. A. and Curran B. P. G. 2000. Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response elements (STRE).
- Chena Z-H., Yoshida Y., Saito Y., Noguchib N., E. Niki., 2006. Adaptive response induced by lipid peroxidation products in cell cultures. *FEBS. Letters.*, **580**, 479-483.
- Chouvenc P., Vessot S., Andrieu J., Vacus P., 2004. Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis. *Drying. Technol.*, **22**, 1577-1601.
- Chyau C.C., Mau J-L., 1999. Release of volatile compounds from microwave heating of garlic juice with 2,4-decadienals. *Food Chem.*, **64**, 531-535.
- Coulibaly I., Yao A. A., Lognay G., Fauconnier M. L., Thonart P. 2009. Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 70-84.

- Crowe L.M., Reid D.S., and Crowe J.H., 1996. Is trehalose special for Preserving dry Biomaterials ? *Biophys. J.*, **71**, 2087-2093.
- Csonka L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Reven. Microbiol.*, **53**, 121-147.
- Csonka L.N., and Hanson A.D., 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 569-606.
- De Angelis M., Gobbetti M., 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics.*, **4**, 106-122.
- De Beer T.R.M., Baeyens W. R.G., Ouyang J., Vervaet C., Remon J.P., 2006. Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension. *The Analyst.*, **131**, 1137-1144.
- Del Moral A., Severin J., Ramoscorlenzana D., Truper H.G. and Galinski E.A., 1994. Compatible solutes in new moderately Halophilic isolates. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **12**, 165-172.
- Faivelet M., 2003. L'eau et la conservation des aliments Techniques de l'ingénieur-Traité agro-alimentaire dossier F1011, 11p. URL://techniques-ingenieur.fr
- Fauconnier M.L., Marlier M., 1997. Revue bibliographique : les lipoxgénases du soja. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **1**, 125-141.
- Fernandes P., Cabral J.M.S. 2007. Phytosterols: applications and recovery methods. *Biores. Technol.*, **98**, 2335-2350.
- Flambert C.M.F., 1979. *Principes généraux de séchage*. Gembloux
- Fonseca F., Corrieu G., 2001. *Cryoprotection and freezing influence on acidification activity of thermophilic lactic acid bacteria. Relationships between biologic and thermodynamic properties*. Thèse de doctorat : Institut national agronomique Paris-Grignon, Paris (France).
- Gardiner G. E., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M. A. E., Fitzgerald G. F., Collins J. K., Ross R. P. and Stanton C. 2000. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2605-2612.
- Guesnet P., Alessandri JM., Astorg P., Pifferi F., Laviolle M. 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL* 12 : 333-343.
- Hans J.B., Donald B.E.N., and Richard G.J., 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant. Cell.*, **7**, 1099-1111.
- Hausman D.S., Cambron R.T., Sakr A., 2005. Application of on-line Raman spectroscopy for characterizing relationships between drug hydration state and tablet physical stability. *Int. J. Pharm.*, **299**, 19-33.
- Hebert C., Roux S., and Egly J.M., 1993. La cryopréservation des échantillons biologiques. *Techn. biof.*, **218**, 3-11.
- Hey, J. M. MacFarlane, D. R. 1998. «Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: ice crystal growth kinetics». *Cryobiology.*, **37**, 119-130.

- Hottot A., Vessot S., Andrieu J., 2004. A direct characterization method of the ice morphology. Relationship between mean crystal size and primary drying times of freeze-drying process. *Drying Technol.*, **22**, 2009-2021.
- Howlett N., and Avery S.V., 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2971-2976.
- Jennings T.A. 1999. *lyophilisation, Introduction and Basic Principles*. Jennings T. A. (Ed.), Interpharm Press, Denver, Colorado.
- Jewell J.B., and Kashket E.R., 1991. Osmotically regulated transport of proline by *Lactobacillus acidophilus* IFO 3532. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2829-2833.
- Kets E.P.W., Calinski E.A., Wit M., De Bont J.A.M., and Heipiepper H.J., 1996a. Mannitol: a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.*, **178**, 6665-6670.
- King V.A-E., Lin H-J., and Liu C-F., 1998. Accelerated storage testing of freeze-dried and controlled low-temperature vacuum dehydrated *Lactobacillus acidophilus* J. *Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 161-165.
- Labuza, T.P., K. Roe, C. Payne, F. Panda, T.J. Labuza, P.S. Labuza, and L. Krusch. 2004. Storage stability of dry food systems: Influence of state changes during drying and storage. In: Drying 2004. M. Silva and S. Rocha (eds.). pp. 48-68. Ourograf Grafica Campinas, Brazil (ISBN # 85-904573-1-1; <http://www.feq.unicamp.br/~ids2004/>).
- Lai M.C., Sowers K.R., Robertson D.E., Roberts M.F., and Gunsalus R.P., 1991. Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J. Bacteriol.*, **173**, 5352-5358.
- Laine G., Gobel C., Du Jardin P., Feussner I., Fauconnier M-L., 2006. Study of Precursors responsible for Off-flavor formation during Storage of potato flakes. *J. Agric. Food. Chem.*, **54**, 5445-5452.
- Leslie S.B., Lighthart I.B., Crowe J.H., and Crowe L.M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3592-3597.
- Mason H.S., Fowlks W.L., Peterson E., 1955. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2914-2915.
- Mazur p., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiol.* **14**, 251-272.
- Meryman, H. T., 1974. «Freezing injury and its prevention in living cells». *Annu Rev Biophys Bioeng.*, **3**, 341-363.
- Mille Y., Beney L., Gervais P., 2005. Compared tolerance to osmotic stress in various microorganisms: towards a survival prediction test. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 479- 484.
- Niki E., Kawakami A., Yamamoto Y., Kamiya Y., 2000. Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 1971-1975.
- Niki E., Kawakami A., Yamamoto Y., Kamiya Y., Noguchi N., 2003. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochim. Biophys. Res.*, **338**, 668-676.
- Niki E., Noguchi N. 2005. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life.*, **50** , 323-329.

- Noguchi N., Yamashita H., Hamahara J., Nakamura A., Kühn H., Niki E., 2002. The specificity of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation and the effects of radical-scavenging antioxidants. *Biol. Chem.*, **383**, 619-626.
- O'Byrne C.P. and Booth I.R. 2002. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, **74**, 203-216.
- Okumura T., Matsuoka M., 2005. Evaluation of the microcrystallinity of a drug substance, Indomethacin, in a pharmaceutical model tablet by chemometric FT-Raman spectroscopy. *Pharm. Res.*, **22**, 1350-1357.
- Palasz, A. T. et MapJetoft, R. 1. 1996. «Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances». *Biotechnol Adv.*, **14**, 127-149.
- Pegg DE., 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.*, **20**, 5-13.
- Pegg, D. E. et Diaper, M. P. 1988. «On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes». *Biophys.*, **54**, 471-488.
- Pereira E.D.J., Panek A..D., Eleutherio E.C.A., 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell. Str. Chap.*, **8**, 120-124.
- Pikal S.N., Warnakulasuriya E.V.L, Margaret L.B., and William S. A. K., 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *Int. Dairy. J.*, **5**, 515-21.
- Porter N.A., Caldwell S.E., Mills K.A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.*, **30**, 277-290.
- Potts M., 1994. Dessication tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, **58**, 755-805.
- Rasul M. G., Rudolph V., and Wang F.Y., 2000. Particles separation using fluidization techniques. *Int. J. Min. Proc.* **60**, 163-179.
- Rey., 1986. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food. Protect.*, **49**, 47-53.
- Roméo Y., Bouvier J., Gutierrez C., 2001. La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. *Lait.* **81**, 49-55.
- Ross Y.H and Karel M. 1991. Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions. *J. Food. Sc.*, **56**, 1676-161.
- Rousch J.M., Scott E.B., and Milton R.S., 2003. Changes in fatty acid profiles of thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **295**, 145-156.
- Russell N.J., 1989. Functions of lipids: structural roles and membranes functions. *Microbial lipids*, **2** : 279-365, Ratledge C. and Wilkinson S.C. (Eds.), Academic Press, London.
- Russell N.J., Evans R. I., TerSeeg P. F., Hellemons J., Verheul A., and Abee T., 1995. Membrane as a target for stress adaptation. *Int. J. Food. Microbiol.*, **28**, 255-261.
- Santivarangkna C., Kulozik U. and Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 1-13
- Schuck P., Bouhallaba S., Duruptb D., Vareilleb P., Humbertb J.P., Marin M., 2004. Séchage des lactosérums et dérivés : rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. *Lait.*, **84**, 243-268.

- Shalaev E.Y., Johnson-Elton T.D., Chang L., Pikal MJ., 2002. Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-zero temperatures: implications for freeze-drying. *Pharm. Res.*, **19**, 195-201.
- Simatos D., Blond G., Le Meste M., and Morice M., 1994. Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation, dans «*Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*» Edition Loriga. 1, 555-573.
- Smith P.G., 2007. Application of fluidization to food processing. *In Fluidization in Food Processing Handbook* from C.H.I.P.S. Willey Blackwell. p 244.
- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Witztum J.L., 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924.
- Takebe G., Yarimizu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S. and Takahashi K. 2002. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41254-41258
- Tang X., Pikal MJ., 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice, *Pharm. Res.* **21**, 191-200.
- Thonart Ph., 1997. Les applications des bactéries lactiques. In : "Séminaire sur la sélection, la production et le conditionnement des ferments lactiques" p.8-31. *Compte rendu des allocutions et des conférences*, Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis et Centre wallon de Biologie Industrielle-Liège.
- Thonart Ph., 2004. Communication personnelle. Professeur à la FUSAGx, Unité de Bio-Industries, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Gembloux, Belgique
- Whitfield F.B., 1992. Volatils from interactions of Maillard reactions and lipids. *CRC. Critical Reviews in Foods Sc. and Nutr.*, **31**, 1-58.
- Yancey P., Clark M., Hand S., Bowlus R. and Somers G., 1982. Living with water stress evolution of osmolyte systems. *Science.*, **217**, 1214-1222.
- Yin H., Porter N.A., 2005. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid. Redox. Signal.*, **7**, 170-184.
- Yin H., Brooks J.D., Gao L., Porter N.A., Morrow J. D., 2007. Identification of Novel Autoxidation Products of the  $\omega$ -3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid *in Vitro* and *in Vivo*., *J. Biol. Chem.* **282**, 29890-29901
- Zhao G., Zhang G., 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 333-338.

## I. Synthèse bibliographique – Deuxième partie

---

### I-3. Contexte et objectifs

Les bactéries lactiques sont utilisées pour les nombreuses propriétés fonctionnelles dont elles font preuve dans le domaine de la technologie alimentaire, de la conservation des aliments et de l'amélioration de la santé humaine et animale (Thonart, 1997). Parmi ces caractéristiques, citons le métabolisme fermentaire (homo et hétérolactique), la production d'acide lactique, de composés aromatiques, d'enzymes et leur activité antimicrobienne. Ce groupe de bactéries est essentiellement constitué des genres *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Le genre *Lactobacillus* est caractérisé par des cellules en forme de bâtonnet régulier ayant une réponse positive à la coloration Gram. Les cellules ne sont pas mobiles, elles ne possèdent pas de catalase et ne sont pas sporulantes. La production d'acide lactique fait partie intégrante de leur fonctionnalité. Elles sont mésophiles et aéro-anaérobies facultatives. La deuxième partie de cette synthèse bibliographique met en évidence les fonctionnalités connues de cette espèce.

## I.4. Functional aspect of *Lactobacillus* spp. : a review

---

Publication 2 – *Afr. J. Biotechnol*

*African Journal of Biotechnology,*

Coulibaly, I<sup>(1\*)</sup>., Dubois-D, R<sup>(1)</sup>., Majad, L<sup>(1)</sup>., Mejoub, Th<sup>(2)</sup>., Destain, J<sup>(1)</sup>., Béra, F<sup>(3)</sup>., Wathelet, J.P<sup>(4)</sup>., Thonart, Ph<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

<sup>(3)</sup>Food Technology Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(4)</sup>Organic Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

Le genre *Lactobacillus* est Gram-positif anaérobie facultative ou microaérophile. Chez l'homme, ces bactéries sont en symbiose et sont présentes dans la flore intestinale. Les différentes espèces de *Lactobacillus* sont utilisées pour la production de yogourt, de fromage, de choucroute, de cornichons, de bière, du vin, de cidre, de kimchi, de chocolat et autres aliments fermentés ainsi que les aliments pour animaux, tels que l'ensilage. Au cours de ces dernières années beaucoup d'intérêt a été accordé à l'utilisation des lactobacilles comme probiotiques. Leurs potentiels pour la prévention de maladie chez les humains et les animaux ont été démontrés. Cette synthèse bibliographique passe en revue les connaissances sur le genre *Lactobacillus* en général tout en donnant un aperçu sur les recherches portant sur l'espèce *Lactobacillus plantarum* en particulier. Il précise la problématique de la classification des espèces de la famille. Nous nous sommes attardés aussi sur les mécanismes d'adhérence à la paroi de l'hôte. Les différents types de métabolismes ont été passés en revue. Les intérêts que présente l'utilisation de ces souches, comme probiotiques pour l'homme et pour les animaux ont été détaillés.

**Mots-clés :** genre, *Lactobacillus*, *Lb. plantarum*, habitats, métabolisme, potentialités, effets.



## Abstract

*Lactobacillus* is a genus of Gram-positive facultative anaerobic or microaerophilic bacteria. In humans they are symbiotic and are found in the gut flora. *Lactobacillus* species are used for the production of yogurt, cheese, sauerkraut, pickles, beer, wine, cider, kimchi, chocolate and other fermented foods, as well as animal feeds such as silage. In recent years much interest has been shown in the use of lactobacilli as probiotic organisms and their potential for disease prevention in humans and animals. This literature focused the knowledge on the *Lactobacillus* genus in general, while giving an overview of research on the species *Lactobacillus plantarum* in particular. It states the problem of classification of species of the family. We are focused on mechanisms for adherence to the wall of the host. The different types of metabolism have been reviewed. The interests of the use of these strains as probiotics for humans and even for animals have been detailed.

**Keywords:** genus, *Lactobacillus*, *Lb. plantarum*, ecology, metabolism, potential, benefits.

## I-4.1. Introduction

The genus *Lactobacillus* is the largest group among the Lactobacteriaceae, and contains over 100 species (Dellaglio et al., 2005 ; Satokari et al., 2003). *Lactobacillus* is a genus of Gram-positive facultative anaerobic or microaerophilic bacteria (Black et al., 1996). They are a major part of the lactic acid bacteria group, named as such because most of its members convert lactose and other sugars to lactic acid. They are common and usually benign. In humans they are present in the vagina and the gastrointestinal tract, where they are symbiotic and make up a small portion of the gut flora. Many species are prominent in decaying plant material. The production of lactic acid makes its environment acidic, which inhibits the growth of some harmful bacteria. Several members of the genus have had their genome sequenced (Ljungh et al., 2009). Lactobacilli are members of the lactic acid bacteria, whose primary fermentation end product is lactic acid (Tannock, 2004). Lactobacilli are nutritionally fastidious, and are associated with a large variety of plants and animals, a factor that has presumably contributed to their diversity, by adaptive radiation. Lactobacilli are used extensively for fermentation of plant material, dairy products and meat (reviewed by Stiles, 1996), and thus have been intensively investigated for their industrial applications (Konings et al., 2000). In addition, some species have potential for production of raw ingredients for industrial processes, such as propanediol production for the textile industry (Nakamura & Whited, 2003). Lactobacilli are part of the normal human gastrointestinal (GI) microbiota and they may also be found in the GI tracts of other mammalian species (Klaenhammer & Russell, 2000 ; Tannock, 2004 ; Vaughan et al., 2005). Some *Lactobacillus* species have been attributed with probiotic properties, implying 'living micro-organisms which upon ingestion in certain numbers exert health benefits beyond inherent nutrition' (Guarner & Schaafsma, 1998). This has added further incentive to detailed microbiological, biochemical and genomic studies of lactobacilli (Klaenhammer et al., 2005). Taxonomic analysis has already led to a recognition of the unusual diversity of the genus *Lactobacillus* (Dellaglio et al., 2005; Dellaglio & Felis, 2005b), and one objective of this study was to extend the 16S rRNA phylogeny of the lactobacilli (Dellaglio & Felis, 2005) and investigate its correlation with genome based comparison.

## I-4.2. *Lactobacillus* genus

### I-4.2.1. Ecology

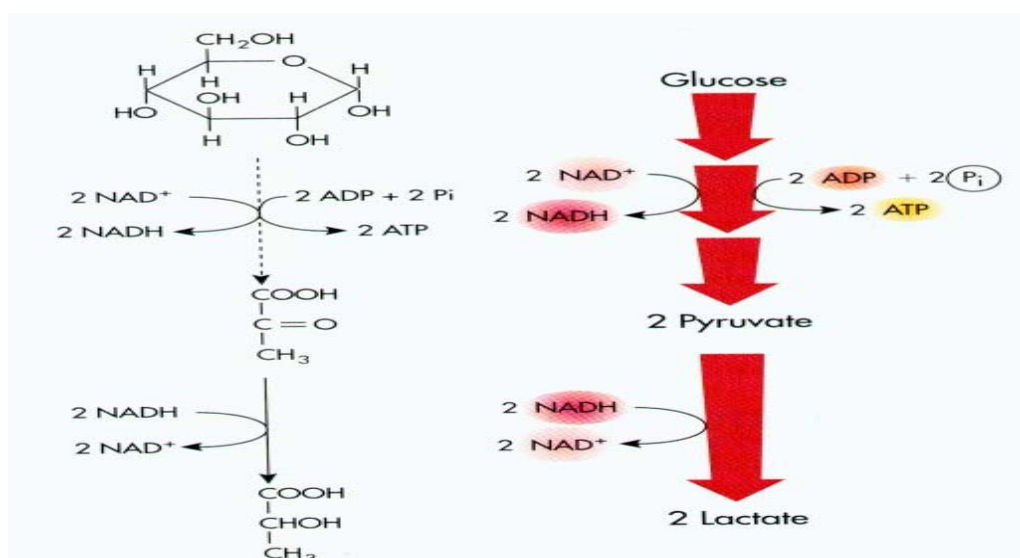
*Lactobacillus plantarum* is a versatile and widespread microorganism found in environments ranging from vegetable, dairy and meat fermentations to the human gastrointestinal (GI) tract (Kleerebezem et al., 2003). *L. plantarum* is a lactic acid bacteria (LAB) able to colonize habitat as diverse as fresh and fermented plant materials, meat products, fish, dairy, sourdoughts, fermented beverages, and the gastrointestinal tract of animals and humans (Tannock et al., 2004). Strains of species are increasingly used as starter for the fermentation of feed and foods of plant origin, but also as a silage inoculant and as human probiotic. Some strains are isolated from chicken faeces of West Africa (Coulibaly et al., 2008). *L. plantarum* strains may face antimicrobial selection in numerous habitats (e.g. in animals, consumers, or the environment).

### I-4.2.2. Metabolism

The genus *Lactobacillus* currently consists of over 125 species and encompasses a wide variety of organisms. The genus is polyphyletic, with the genus *Pediococcus* dividing the *L. casei* group, and the species *L. acidophilus*, *L. salivarius*, and *L. reuteri* being representatives of three distinct subclasses. The genus *Lactobacillus* is divided into three groups based on the fermentative abilities of the species (Kandler & Weiss, 1986) :

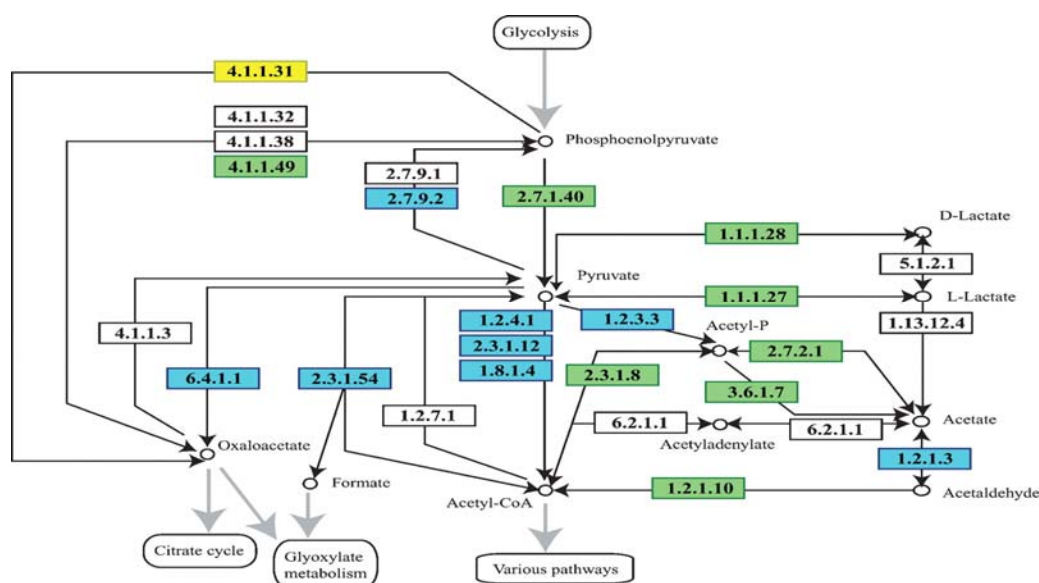
- Obligately homofermentative (**Group I**) ,  
*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*
- Facultatively heterofermentative (**Group II**),  
*L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*
- Obligately heterofermentative (**Group III**).  
*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*

The genus *Paralactobacillus* falls within the *L. salivarius* group. In recent years, other members of the genus *Lactobacillus* (formerly known as the *Leuconostoc* branch of *Lactobacillus*) have been reclassified into the genera *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Oenococcus*, and *Leuconostoc*.



**Figure 13.** Homolactic acid fermentation pathway. In lactic fermentation by *Lactobacillus*, the substrate (glucose) is oxidized to pyruvate, and pyruvate becomes reduced to lactic acid. Redox balance is maintained by coupling oxidations to reductions within the pathway.

More recently, the *Pediococcus* species *P. dextrinicus* has been reclassified as a *Lactobacillus* species (IJSEM). The differences aspects of *Lactocillus* spp. fermentation's and the products are illustrated by **fig. 13 & 14**. Group I, the obligately homofermentative species, degrade hexoses almost completely to lactic acid and do not ferment pentoses or gluconate. Species of group II are facultatively heterofermentative and produce acetic acid, ethanol and formic acid under glucose limitation, in addition to lactic acid. Pentoses are usually fermented. Group III contains the obligately heterofermentative lactobacilli which ferment hexoses to lactic acid, acetic acid, ethanol and carbon dioxide. Pentoses are fermented to lactic acid and acetic acid. Group I contains 21 species, divided into two subgroups based on DNA-DNA hybridization (Kandler & Weiss, 1986). **Subgroup 1** includes *Lactobacillus delbrueckii* (the type species of the genus) and *Lactobacillus jensenii* (Kandler & Weiss, 1986). **Subgroup 2** is represented by *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus kefiranoferiens*, *Lactobacillus vitulinus*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus uli* (Pot et al., 1994) and the *Lactobacillus casei*/*Pediococcus Lactobacillus aviarius*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus ruminis* and *Lactobacillus sharpeae* (Collins et al., 1991). Open circles represent metabolites; the square boxes represent enzymes with their EC numbers. The colour of a box indicates the presence of the gene encoding that enzyme in *L. plantarum* (blue), in *L. johnsonii* (yellow) or in both (green).



**Figure 14.** Pyruvate metabolism in *L. johnsonii* and *L. plantarum*. The figure is based on the pyruvate metabolism pathway from the KEGG database (Kanehisa et al., 2002).

Open circles represent metabolites; the square boxes represent enzymes with their EC numbers. The colour of a box indicates the presence of the gene encoding that enzyme in *L. plantarum* (blue), in *L. johnsonii* (yellow) or in both (green). Not shown are enzymes and pathways that (i) are cytochrome dependent, (ii) do not occur in bacteria, and (iii) have no known genes. The *L. acidophilus* group was later divided into six genotypic groups based on DNA-DNA hybridization, with the species *L. acidophilus* in group A1 (Fujisawa et al., 1992). Groups A2, A3 and A4 contain *Lactobacillus crispatus* (Cato et al., 1983), *Lactobacillus amylovorus* and *Lactobacillus gallinarum* (Fujisawa et al., 1992), respectively. Groups B1 and B2 include *Lactobacillus gasseri* (Lauer & Kandler, 1980) and *Lactobacillus johnsonii* (Fujisawa et al., 1992), respectively.

### I-4.3. Characteristics of gram positive bacteria

#### I-4.3.1. Generalities

Gram-positive bacteria are those that are stained dark blue or violet by Gram staining. This is in contrast to Gram-negative bacteria, which cannot retain the crystal violet stain, instead taking up the counterstain (safranin or fuchsin) and appearing red or pink. Gram-positive organisms are able to retain the crystal violet stain because of the

high amount of peptidoglycan in the cell wall. Gram-positive cell walls typically lack the outer membrane found in Gram-negative bacteria. The following characteristics are generally present in a Gram-positive bacterium (Van et al., 2001):

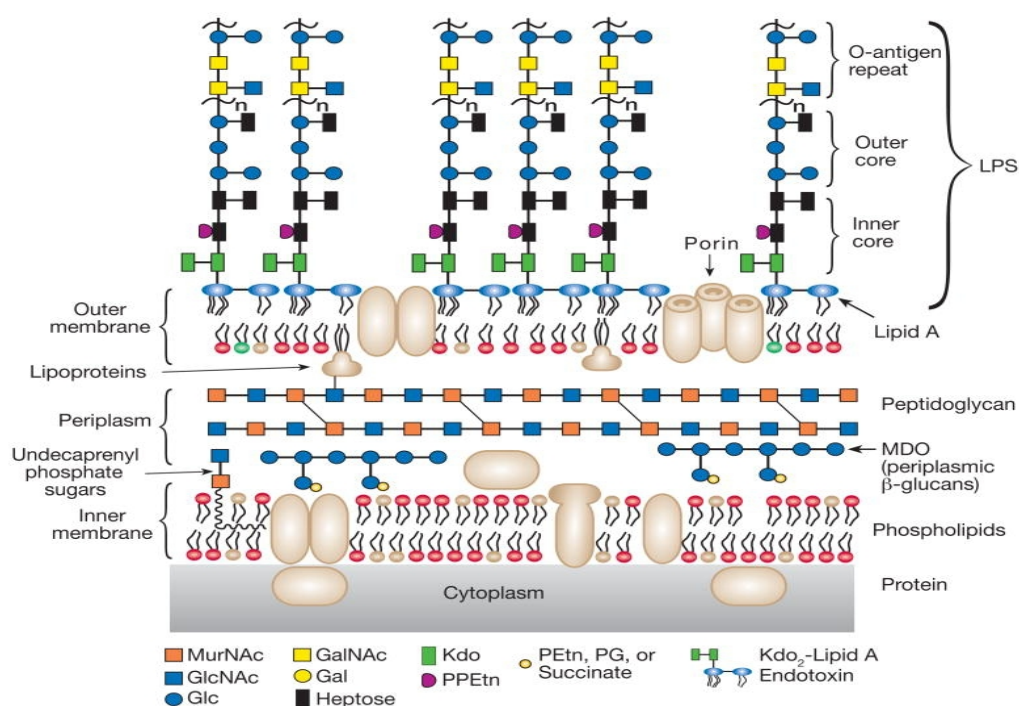
- cytoplasmic lipid membrane
- thick peptidoglycan layer
- teichoic acids and lipoteichoic acids are present, which serve to act as chelating agents, and also for certain types of adherence.
- Capsule polysaccharides (only in some species)
- flagellum (only in some species), if present, it contains two rings for support as opposed to four in Gram-negative bacteria because Gram-positive bacteria have only one membrane layer.

#### I-4.3.2. Membrane structure

Some studies showed that this difference in staining depends on the nature of the cell wall. In Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, the cell wall consists of inner and outer membranes separated by a space termed the periplasm (**fig. 15**) (Van et al., 2001 ; Berg et al., 2007). Peptidoglycan constitutes the major structural component of the periplasm, and it consists of a polysaccharide covalently cross-linked by short peptides. The periplasmic space of Gram-negative bacteria may also contain  $\beta$ -glucans (Wacker et al., 2002). The outer membrane is an asymmetric lipid bilayer, because it contains mostly lipopolysaccharide (LPS) in the outer leaflet. Muroid (slimy) strains also contain a polysaccharide capsule that surrounds the whole cell, which may have a role in virulence (Ostacsh et al., 2005).

Gram-positive bacteria lack the outer membrane (**fig. 16**), but they have a much thicker peptidoglycan layer, which is modified with additional specialized polymers known as teichoic acids (Eichler et al., 2005). The polysaccharide components of the cell envelope, which surrounds the cell and encloses the cytoplasm, have important structural and functional roles in the life of bacteria. Capsular polysaccharides and LPS provide defense against bacteriophages and contain the major antigenic determinants that distinguish various serotypes of bacteria (Schaffer et al., 2005). In the context of mammalian infection, these structures represent the first line of defense against

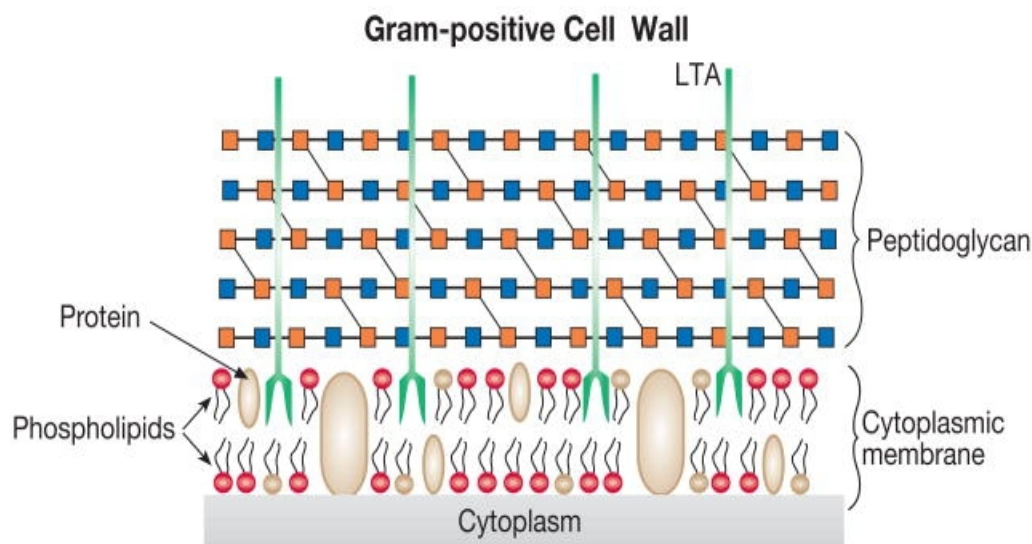
complement, and they can have profoundly detrimental effects on the host (Bhavser et al., 2006).



**Figure 15.** Schematic representation of the cell wall of Gram-negative bacteria showing several layers of polysaccharides and glycoconjugates.

The periplasm contains peptidoglycan, which is a copolymer of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid with peptide cross-links, and a class of  $\beta$ -glucans known as membrane-derived oligosaccharides (MDO). The outer leaflet of the outer membrane is rich in lipopolysaccharide (LPS). In mucoid strains, a capsular polysaccharide covers the entire cell (not shown). (Red lipids) Phosphatidylethanolamine, (yellow lipids) phosphatidylglycerol, (Kdo) 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid, (heptose) L-glycero-D-manno-heptose, (n) variable number of O-antigen repeats and (PPEtn) pyrophosphoethanolamine.

Peptidoglycan (also known as murein) makes up about 10% of the dry weight of the cell wall in Gram-negative bacteria and as much as 20-25% of the dry weight in Gram-positive bacteria (Raetz et al., 2007). It consists of parallel strands of polysaccharide composed of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid (MurNAc) in  $\beta$ 1-4-linkage, which are thought to surround the bacterium (Weerapna et al., 2006 ; Brenan et al., 2007).



**Figure 16.** Cell wall from Gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria lack the outer membrane and associated lipopolysaccharide (LPS) that is present in Gram-negative organisms. In Gram-positive bacteria, the peptidoglycan layer is thicker and contains teichoic acids.

#### I-4.4. Adhesion and resistance in the host

##### I-4.4.1. Anchor types

In humans, as many as  $10^7$ - $10^8$  *Lactobacillus* spp. ml<sup>-1</sup> have been reported in vaginal fluid (Redondo-Lopez et al., 1990). Some strains are marketed as probiotics that are claimed to provide a health benefit for the consumer through interactions with the human GI system (for a review see de Vries et al., 2005). Extracellular proteins and anchor types

The *L. plantarum* genome is predicted to encode 223 extracellular proteins, of which the large majority have a motif or domain for attachment to the cell surface (**tab. 4**). The different types of extracellular proteins and their anchoring mechanisms are shown in **tab. 4** Forty-eight of these proteins contain a N-terminal lipobox, a common mechanism for secretion and membrane attachment of proteins through covalent binding of a conserved cysteine residue to a lipid (Sutcliffe & Harrington, 2002). In *L. plantarum* this anchor type is found mainly in substratebinding proteins of ABC transporters. Twenty-seven proteins contain a C-terminal LPxTG recognition signal (Boekhorst et al., 2005) for covalent attachment to peptidoglycan by sortase, while 10 proteins are predicted to contain one or more copies of the LysM domain, which is thought to be involved in interaction with peptidoglycan (Bateman & Bycroft, 2000 ; Steen et al., 2003), of the

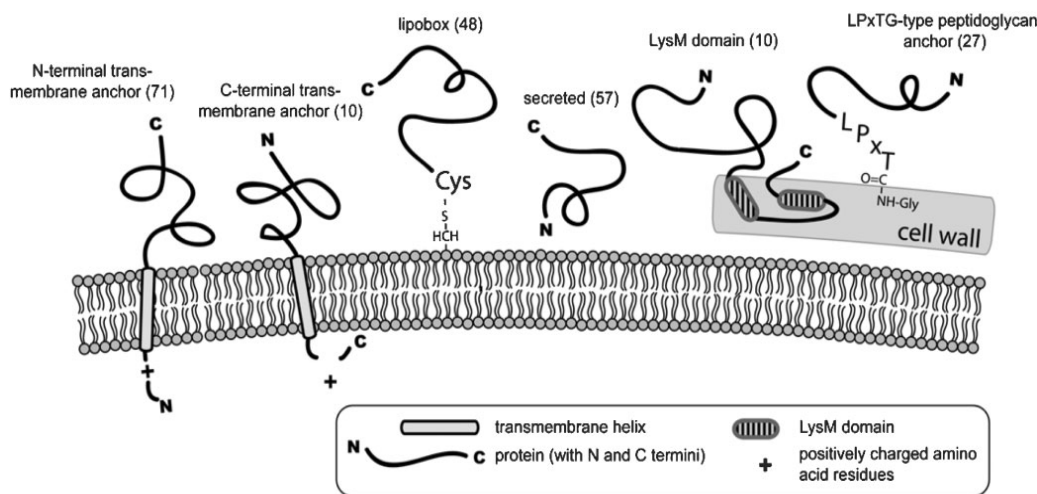


residual extracellular proteins, 71 contain a predicted N-terminal signal peptide that appears to lack a clearly identifiable signal peptidase cleavage site, suggesting their N-terminal anchoring in the membrane.

**Table 4.** Functional classification and anchor types.

|                    | LPxTG anchor | LysM domain | Lipobox | N-terminal membrane anchor | C-terminal membrane anchor | Unknown/secreted | Total |
|--------------------|--------------|-------------|---------|----------------------------|----------------------------|------------------|-------|
| <b>Adherence</b>   | 10           | 0           | 0       | 0                          | 0                          | 2                | 12    |
| <b>Enzyme</b>      | 1            | 8           | 10      | 34                         | 0                          | 16               | 69    |
| <b>Phage</b>       | 0            | 2           | 3       | 0                          | 0                          | 2                | 7     |
| <b>Regulator</b>   | 0            | 0           | 0       | 5                          | 0                          | 0                | 5     |
| <b>Transporter</b> | 0            | 0           | 22      | 5                          | 0                          | 3                | 30    |
| <b>Unknown</b>     | 16           | 10          | 13      | 27                         | 10                         | 34               | 100   |
| <b>Total</b>       | 27           | 10          | 48      | 71                         | 10                         | 57               | 223   |

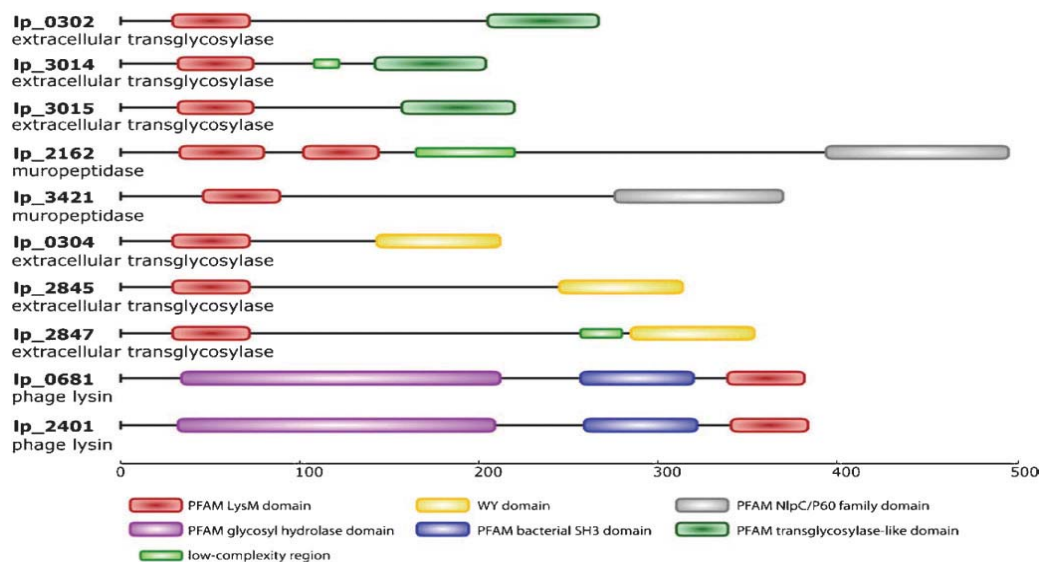
Ten additional proteins are predicted to be anchored through a C-terminal transmembrane anchor. Finally, the remaining 57 proteins are predicted to be either unattached or associated with the cell wall using other (unknown) mechanisms. Extracellular proteins were divided into groups reflecting predicted protein function, based on both functional annotation and domain composition. Proteins were reclassified as enzymes, transporters, regulators, phage-related proteins, adherence proteins (predicted to bind to extracellular macromolecules such as mucins and fibronectin) or unknown (tab. 4). An example of the multi-domain compositions of extracellular proteins is provided by the group of proteins containing a LysM domain for anchoring to peptidoglycan (fig. 17).



**Figure 17.** Extracellular anchored and secreted proteins of *L. plantarum*. Numbers in parentheses are the number of predicted proteins of the different types.

### I-4.4.2. Enzymes

Extracellular enzymes play a role in secretion and modification of proteins, in maintenance of the bacterial cell wall, and in the modification and degradation of extracellular compounds, allowing for the use of such molecules as a source of nutrients.



**Figure 18.** Domain composition of *L. plantarum* proteins predicted to be associated with the cell wall through LysM domains. Putative protein functions are listed below the ORF names (Boekhorst et al., 2006).

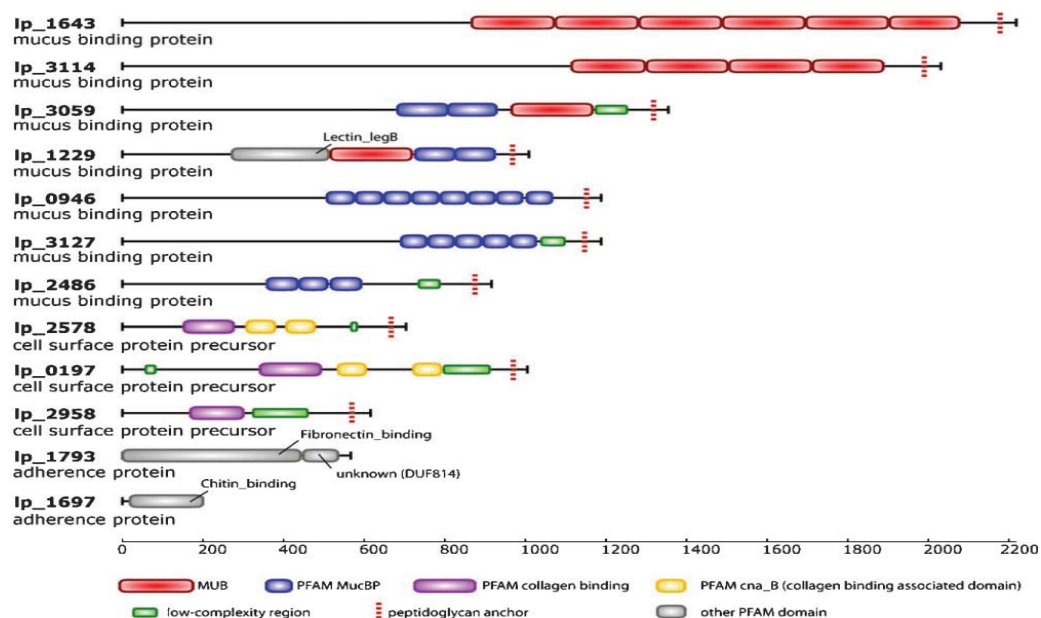
### I-4.4.3. Adherence proteins and binding domains

Adhesion factors are generally considered to play an important role in host–microbe interactions, and adhesion factors identified in pathogenic bacteria have been shown to play a key role in virulence (Hammerschmidt, 2006 ; Navarre & Schneewind, 1999). Analogously, in probiotic bacteria they are expected to play a role in persistence and competitive exclusion of pathogens or other health-stimulatory interactions (Marco et al., 2006). The domain composition of the *L. plantarum* proteins predicted to be involved in the adherence to extracellular macromolecules was analysed (fig. 18). This group consists of three proteins containing domains predicted to be involved in adherence to collagen (Pfam: PF05737) (Symersky et al., 1997), one protein with a chitin-binding domain (Pfam: PF03067) (Yuen et al., 1990), one protein with a fibronectin-binding domain (Pfam: PF05833) (Christie et al., 2002) and seven proteins with domains predicted to be involved in adherence to mucus (fig. 18). These putative mucus-binding proteins

contain either copies of the Pfam MucBP domain and/or copies of the larger MUB domain. While the MucBP domain is not only found in lactic acid bacteria, but also in *Listeria* species, the MUB domain appears to be unique for lactic acid bacteria (Boekhorst et al., 2006). The collagen-binding domain is found in a wide range of firmicutes, while the fibronectin-binding and chitin-binding domains are present in proteins from both eukaryotes and prokaryotes.

#### I-4.4.4. The cell-surface hydrolase (CSH) domain

A domain of approximately 250 amino acids was found in five *L. plantarum* proteins and was designated the cell-surface hydrolase (CSH) domain, based on its sequence similarity with a range of Pfam domains belonging to the clan of alpha/beta hydrolase-fold families. Multiple-sequence alignment of the *L. plantarum* CSH-containing proteins (fig. 19) confirmed the presence and relative spacing of the conserved Ser, Asp and His residues, as well as the conserved GxSxG motif, that are characteristic for the alpha/beta hydrolase-fold family (Nardini et al., 1999). These findings suggest that these *L. plantarum* proteins act as cell-surface hydrolases. Nevertheless, the exact function of the postulated hydrolases remains to be established since the alpha/beta hydrolase-fold family includes peptidases, lipases, esterases and dehalogenases.



**Figure 19.** Domain composition of *L. plantarum* proteins predicted to be involved in the adherence to extracellular macromolecules. Putative protein functions are listed below the ORF names.

Another distinct set of eight homologous proteins of *L. plantarum* also have the characteristics of alpha/beta hydrolases, but differ in sequence alignment from the CSH domains, and are classified as members of the Pfam DUF915 family.

#### I-4.5. Phospholipids and fatty acids of *Lactobacillus* spp.

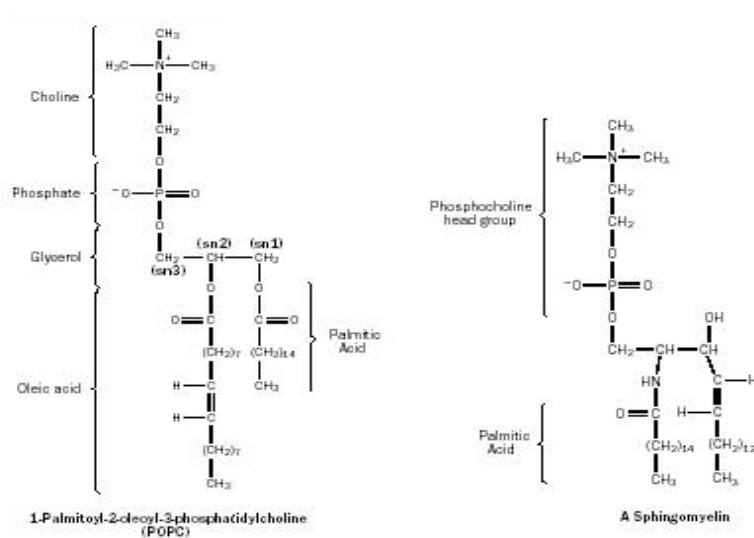
Phospholipids are the major components of bacterial cell membranes. These lipid compounds possess closely related and complex structures classed according to the polar head group linked to the phosphate moiety. The diversity of the polar head groups is important, and as far as prokaryotic organisms are concerned, the main classes of phospholipids are phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), and their respective derivatives: mono-, bi-, or trimethylated forms of PE and a dimeric form of PG [diphosphatidylglycerol (DPG)], (Exterkate et al., 1971 ; Fischer et al., 1990). The other phospholipid classes, such as phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), and phosphatidylserine (PS), are considered to be less characteristic of *Lactobacillus* cell membranes (Lechevalier, 1977 ; Fang et al., 2000). At neutral pH, the former are negatively charged and the latter are globally neutral. Each phospholipid class is made up of several molecular species. The diversity of these molecular species depends on the two fatty acyl chains linked to the glycerol backbone (mainly saturated or monounsaturated and from 16 to 18 carbon atom chain length). Moreover, the study of the fatty acid distribution (*sn-1* or *sn-2* position) is of interest to determine the stereochemistry of the molecular species.

##### I-4.5.1. Structure of phospholipids

The structure of the most common class of phospholipids, phosphoglycerides, is based on glycerol, a three-carbon alcohol with the formula  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ . Two fatty acid chains, each typically having an even number of carbon atoms between 14 and 20, attach (via a dual esterification) to the first and second carbons of the glycerol molecule, denoted as the *sn1* and *sn2* positions, respectively (Exterkate et al., 1971). The third hydroxyl group of glycerol, at position *sn3*, reacts with phosphoric acid to form phosphatidate. Common phospholipids, widely distributed in nature, are produced by further reaction of the phosphate group in phosphatidate with an alcohol, such as serine,

ethanolamine, choline, glycerol, or inositol ((Shaw et al., 1970 ; Fischer et al., 1990). The resulting lipids may be charged, for example, phosphatidyl serine (PS), phosphatidyl inositol (PI), and phosphatidyl glycerol (PG) or dipolar (having separate positively and negatively charged regions) for example, phosphatidyl choline (PC) and phosphatidyl ethanolamine (PE). The term "lecithin" refers to PC-type lipids (Ber et al., 2002). A typical phospholipid arrangement is the presence of a saturated fatty acid, such as palmitic or stearic acid, at the sn1 position, and an unsaturated or polyunsaturated fatty acid, such as oleic or arachidonic acid, at sn2 (see **fig. 20** for the structure of a phosphoglyceride).

Another class of phospholipids is the sphingolipids. A sphingolipid molecule has the phosphatidyl-based headgroup structure described above, but (in contrast to a common phospholipid molecule) contains a single fatty acid and a long-chain alcohol as its hydrophobic components. Additionally, the backbone of the sphingolipid is sphingosine, an amino alcohol (rather than glycerol). Structure A represents a classic glycerophospholipid, POPC and it is composed of choline, phosphate, glycerol, and two fatty acids. Structure B is an example of a sphingomyelin, and it is composed of choline, phosphate, sphingosine and only one fatty acid



**Figure 20.** The structures of two phospholipids, (Berg et al., 2002).

The structure of a representative sphingolipid, sphingomyelin, is also shown in **fig. 20**. Sphingolipids, occurring primarily in nervous tissue, are thought to form cholesterol-

rich domains within lipid bilayer membranes that may be important to the functions of some membrane proteins (Voet et al., 1999).

#### I-4.5.2. Fatty acids

Numerous studies have investigated the lipid composition of *Lactobacillus* spp. (Exterkate et al., 1971 ; Thorne et al., 1964 ; Uchida et al., 1973). Lactobacilli typically have *n*-C<sub>16:0</sub>, *n*-C<sub>18:1</sub>, and *γ*-C<sub>19</sub> as the major carboxylate constituents, with lesser amounts of *n*-C<sub>14:0</sub>, *n*-C<sub>16:1</sub>, and *n*-C<sub>18:0</sub> and traces of odd-carbon-number acids in some species (Drucker et al., 1981). Such fatty acid profiles are typical of gram-positive groups but common in gram-positive bacteria (O'Leary et al., 1988). Fatty acids are a carboxylic acid with a long unbranched aliphatic tail (chain), which is either saturated or unsaturated. Saturated fatty acids do not contain any double bonds or other functional groups along the chain. The term "saturated" refers to hydrogen, in that all carbons (apart from the carboxylic acid [-COOH] group) contain as many hydrogens as possible. Saturated fatty acids form straight chains and, as a result, can be packed together very tightly, allowing living organisms to store chemical energy very densely. The fatty tissues of *Lactobacillus* spp. contain large amounts of long-chain saturated fatty acids.

### I-4.6. Probiotics and biotherapeutics

#### I-4.6.1. Probiotics and food production

*Lactobacillus* species, widespread in food and the environment, are important in technological applications as starter or adjunct nonstarter strains in food productions. The simultaneous presence of various lactic acid bacteria (LAB), expressing different species-specific enzyme activities, is essential for the development of flavor and specific quality traits of cheese (Baruzzi et al., 2005 ; Morea et al. 1998 ; Cappello et al. 2001). There is a need to characterize regional dairy products and to monitor the natural adjuvant nonstarter strains responsible for the production process. Many *Lactobacillus* species are associated with fermented foods and often may characterize products with traditional designation of origin. *L. plantarum* strains are found in fermented products as olives and pickled vegetables and in sourdoughs (Corsetti et al., 2001). *L. fermentum* is associated to

fermented meats, sausages, and other food products as sourdoughs (Corsetti et al., 2001). In various cheese productions, *L. paracasei*, *L. zeeae*, *L. fermentum*, and *L. buchneri* were found at different times of ripening, contributing to final cheese quality to a different extent, according to the type of cheese (Baruzzi et al., 2000 ; Morea et al., 1998 ; Cappello et al., 2001 ; Corsetti et al., 2001 ; Ercolini et al., 2001, 2004). In addition to typical foods with standard manufacturing protocols, new foods have been produced with the addition of probiotic strains, belonging to *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johnsoni*, and *L. acidophilus* species. Their presence is frequent in cheeses, fermented milks, table olives, and pickles. Thus, there is a need to ascertain their presence for certifying the benefits claimed in these products. For these reasons, we studied the detection and identification of six species, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. zeeae*, *L. fermentum*, and *L. buchneri*, as these species are frequently present in fermented foods, cheeses, and probiotic-enriched foods. Some *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria may possess potential therapeutic properties including anti-inflammatory and anti-cancer activities, as well as other features of interest. Research studies have demonstrated the protective effects of some strains of these bacteria for anti-tumor and anti-cancer effects (Gladwin et al., 2007).

Dietary administration alleviated the risks of certain types of cancers and suppressed colonic tumor incidence, volume and multiplicity induced by various carcinogens. For a few strains oral administration effectively reduced DNA adduct formation, ameliorated DNA damage and prevented putative preneoplastic lesions such as aberrant crypt foci induced by chemical carcinogens in the gastrointestinal tract. Reports also indicated that some cultures administered to animals inhibited liver, colon, bladder, and mammary tumors, highlighting potential systemic effects of probiotics with anti-neoplastic activities (Madigan et al., 2005). Lactobacilli are also used to restore particular physiological balance such as in the vaginal eco-system (Gynoflor). Their role is (1) to physically protect the vaginal epithelium by building a thick layer separating the epithelium from pathogens, (2) to physiologically keep the balance of the vaginal ecosystem in maintaining the pH at ~4.5 and (3) generating hydrogen peroxide against pathogens.

#### I-4.6.2. Biotherapeutics and potential benefits

Experiments into the benefits of probiotic therapies suggest a range of potentially beneficial medicinal uses for probiotics. For many of the potential benefits, research is limited and only preliminary results are available. It should be noted that the effects described are not general effects of probiotics. Recent research on the molecular biology and genomics of *Lactobacillus* has focused on the interaction with the immune system, anti-cancer potential, and potential as a biotherapeutic agent in cases of antibiotic-associated diarrhoea, travellers' diarrhoea, pediatric diarrhoea, inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome (Ljungh et al., 2009).

##### *I-4.6.2.1. Managing lactose intolerance*

As lactic acid bacteria actively convert lactose into lactic acid, ingestion of certain active strains may help lactose intolerant individuals tolerate more lactose than what they would have otherwise (Sanders et al., 2000). In practice probiotics are not specifically targeted for this purpose, as most are relatively low in lactase activity as compared to the normal yogurt bacteria.

##### *I-4.6.2.2. Prevention of colon cancer*

In laboratory investigations, some strains of LAB (*Lactobacillus bulgaricus*) have demonstrated anti-mutagenic effects thought to be due to their ability to bind with heterocyclic amines, which are carcinogenic substances formed in cooked meat (Wollowski et al., 2001). Animal studies have demonstrated that some LAB can protect against colon cancer in rodents, though human data is limited and conflicting (Brady et al., 2000). Most human trials have found that the strains tested may exert anti-carcinogenic effects by decreasing the activity of an enzyme called  $\beta$ -glucuronidase (Brady et al., 2000) (which can generate carcinogens in the digestive system). Lower rates of colon cancer among higher consumers of fermented dairy products have been observed in some population studies (Sanders et al., 2000).



#### *I-4.6.2.3. Lowering cholesterol*

Animal studies have demonstrated the efficacy of a range of LAB to be able to lower serum cholesterol levels, presumably by breaking down bile in the gut, thus inhibiting its reabsorption (which enters the blood as cholesterol). Some, but not all human trials have shown that dairy foods fermented with specific LAB can produce modest reductions in total and LDL cholesterol levels in those with normal levels to begin with, however trials in hyperlipidemic subjects are needed (Sanders et al., 2000).

#### *I-4.6.2.4. Lowering blood pressure*

Several small clinical trials have shown that consumption of milk fermented with various strains of LAB can result in modest reductions in blood pressure. It is thought that this is due to the ACE inhibitor-like peptides produced during fermentation (Sanders et al., 2000).

### **I-4.6.3. Benefits for health**

#### *I-4.6.3.1. Improving immune function and preventing infections*

LABs are thought to have several presumably beneficial effects on immune function. They may protect against pathogens by means of competitive inhibition (i.e., by competing for growth) and there is evidence to suggest that they may improve immune function by increasing the number of IgA-producing plasma cells, increasing or improving phagocytosis as well as increasing the proportion of T lymphocytes and natural killer cells (Reid et al., 2003 ; Ouwehand et al., 2002). Clinical trials have demonstrated that probiotics may decrease the incidence of respiratory tract infections (Hatakka et al., 2001) and dental caries in children (Näse et al., 2005). LAB foods and supplements have been shown to be effective in the treatment and prevention of acute diarrhea, and in decreasing the severity and duration of rotavirus infections in children and travelers' diarrhea in adults (Reid et al., 2003). Recently, clear immune enhancing effect of probiotics is demonstrated in the gut of healthy subjects. In a randomized, double blind, placebo controlled, crossover study, healthy volunteers ingested either live probiotic cells (*L. plantarum*) inactivated cells of the same probiotic, or a placebo.

These processes activate the immune system enabling it to play its protective role (the immune response).

#### *I-4.6.3.2. Helicobacter pylori*

LABs are also thought to aid in the treatment of *Helicobacter pylori* infections (which cause peptic ulcers) in adults when used in combination with standard medical treatments. However more studies are required into this area ([Hamilton-Miller et al., 2003](#)).

#### *I-4.6.3.3. Antibiotic-associated diarrhea*

A meta-analysis suggested probiotics may reduce antibiotic-associated diarrhea ([Cremonini et al., 2002](#)). A subsequent randomized controlled trial also found benefit in elderly patients ([Hickson et al., 2007](#)). In a randomized clinical trial, published in 2007, a University of Montreal team of pharmacologists demonstrated that lactobacilli-fermented solution can be effective in AAD prevention in hospitalized patients” ([Beausoleil et al., 2007](#)). In 2009 Encap Drug Delivery announced that they had entered into collaboration with Probac AB to develop a novel probiotic capsule product aimed at treating antibiotic associated diarrhoea.

#### *I-4.6.3.4. Reducing inflammation*

LAB foods and supplements have been found to modulate inflammatory and hypersensitivity responses, an observation thought to be at least in part due to the regulation of cytokine function ([Reid et al., 2003](#)). Clinical studies suggest that they can prevent reoccurrences of inflammatory bowel disease in adults ([Reid et al., 2003](#)), as well as improve milk allergies ([Kirjavainen et al., 2003](#)). They are not effective for treating eczema, a persistent skin inflammation ([Boyle et al., 2008](#))

#### *I-4.6.3.5. Improving mineral absorption*

It is hypothesized that probiotic lactobacilli may help correct malabsorption of trace minerals, found particularly in those with diets high in phytate content from whole grains, nuts and legumes ([Famularo et al., 2005](#))

#### *I-4.6.3.6. Prevents harmful bacterial growth under stress*

In a study done to see the effects of stress on intestinal flora, rats that were fed probiotics had little occurrence of harmful bacteria latched onto their intestines compared to rats that were fed sterile water (Hitt et al., 2006).

#### *I-4.6.3.7. Irritable bowel syndrome and colitis*

*B. infantis* 35624, sold as Align, was found to improve some symptoms of irritable bowel syndrome in women in a recent study (Whorwell et al., 2006). Another probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* 299v was also found to be effective in reducing IBS symptoms (Niedzielin et al., 2001). Additionally, a probiotic formulation, VSL#3, was found to be safe in treating ulcerative colitis, though efficacy in the study was uncertain (Kerr et al., 2003). Bifidobacterium animalis DN-173 010 may help (Guyonnet et al., 2007).

#### *I-4.6.3.8. Synbiotics*

As probiotics are mainly active in the small intestine and prebiotics are only effective in the large intestine, the combination of the two may give a synergistic effect (Gibson et al., 1995). Appropriate combinations of pre- and probiotics are symbiotics.

### **I-4.7. Conclusions**

The genus *Lactobacillus* could be important to the host, because deconjugated bile salts are less effective in emulsification of dietary lipids and micelle formation. Thus, interactions of lactobacilli with their hosts and their impact on host characteristics continue to fascinate microbiologists. Lactobacilli clearly offer microbiologists exciting research prospects, both for biomedical applications and for acquiring fundamental knowledge of how bacterial cells function in the gut ecosystem. As model gut bacteria, they may provide lessons in the molecular mechanisms that define autochthony as well as in understanding bacterial physiology in relation to host welfare. For these reasons, lactobacilli are set to remain the fond favorites of many microbiologists. Lactobacilli are members of the lactic acid bacteria, a broadly defined group characterized by the

formation of lactic acid as a sole or main end product of carbohydrate metabolism. The lactobacilli are gram-positive, non-spore-forming rods

#### I-4.8. References

- Baruzzi F., Matarante A., Caputo L., Morea M., 2005. Development of a culture-independent polymerase chain reaction-based assay for the detection of lactobacilli in stretched cheese. *J. Rapid. Methods. Autom. Microbiol.*, **13**, 177-192.
- Baruzzi F., Morea M., Matarante A., Coconcelli P.S., 2000. Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation, *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 807-814.
- Bateman A., & Bycroft M., 2000. The structure of a LysM domain from E. coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* **299**, 1113-1119.
- Beausoleil M., Fortier N., Guénette S., L'ecuyer A., Savoie M., Franco M., Lachaine J., Weiss K., 2007. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CL1285® and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can. J. Gastro.*, **21**, 732-736.
- Berg S., Kaur D., Jackson M., Brennan P.J., 2007. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - Roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiol.*, **17**, 35-56.
- Berg Jeremy M., Tymoczko John L., and Stryer Lubert., 2002. *Biochemistry*, 5th edition. New York: W. H. Freeman.
- Bhavsar A.P., Brown E.D., 2006. Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: How spirals and spaces challenge paradigms. *Mol. Microbiol.*, **60**, 1077-1090.
- Black J.G., 1996. *Microbiology. Principles and Applications*. Third Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. pp. 144-148.
- Boekhorst J., de Been M.W., Kleerebezem M., & Siezen R.J., 2005. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *J. Bacteriol.*, **187**, 4928-4934.
- Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M., & Siezen R.J., 2006. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiol.*, **152**, 273-280.
- Boyle R.J., Bath-Hextall F.J., Leonardi-Bee J., Murrell D.F., Tang M.L., 2008. Probiotics for treating eczema. *Coch. Database. Syst. Rev.*, **4**, CD006135.
- Brady L.J., Gallaher D.D., Busta F.F., 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J. Nutr.*, **130**, 410-414.
- Brennan P.J., Crick D.C., 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 475-488.
- Cappello M.S., Laddomada B., Poltronieri P., Zacheo G., 2001. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent 66(3B), 569.

- Cato E.P., Moore W.E.C., & Johnson J.L., 1983. Synonymy of strains of "*Lactobacillus acidophilus*" group A2 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 426-428.
- Cavalier-Smith T., 2006. Rooting the tree of life by transition analyses. *Biol. Direct.*, **1**, 19.
- Christie J., McNab R., & Jenkinson H.F., 2002. Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiol.*, **148**, 1615-1625.
- Collins M.D., Rodrigues U.M., Ash C., Aguirre M., Farrow J.A.E., Martinez-Murcia A., Phillips B.A., Williams A.M., & Wallbanks S., 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **77**, 5-12.
- Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N., Gobbetti M., 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food. Microbiol.*, **64**, 95-104.
- Cremonini F., Di Caro S., Nista E.C., 2002. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 1461-1467.
- Dellaglio F., & Felis G.E., 2005. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*, Edited by G. W. Tannock. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 25-49.
- Dellaglio F., Felis G.E., & Torriani S., 2005. Is the genus *Lactobacillus* a single genus? In LAB8 Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Netherlands: *FEMS*.
- Drucker D.B., 1981. Microbiological applications of gas chromatography. Cambridge University Press, Cambridge.
- Eichler J., Adams M.W. 2005. Posttranslational protein modification in Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 393-425.
- Ercolini D., Mauriello G., Blaiotta G., Moschetti G., Coppola S., 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture dependent and culture independent approaches. *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**, 610-617.
- Ercolini D., Mauriello G., Blaiotta G., Moschetti G., Coppola S., 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 263-270.
- Exterkate F.A., Otten B.J., Wassenberg H.W., and Veerkamp J.H., 1971. Comparison of the phospholipid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.*, **106**, 824-829.
- Famularo G., De Simone C., Pandey V., Sahu A.R., Minisola G., 2005. *Probiotic lactobacilli*: an innovative tool to correct the malabsorption syndrome of vegetarians? *Med. Hypotheses.*, **65**, 1132-1135.
- Fang J., Barcelona M.J., and Semrau J.D., 2000. Characterization of methanotrophic bacteria on the basis of intact phospholipid profiles. *FEMS. Microbiol. Lett.* **189**, 67-72.
- Fernandes C.F., Shahani K.M., & Amer M.A., 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. *FEMS. Microbiol. Rev.* **46**, 343-356.

- Fischer, W. 1990. Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids, *In* M. Kates (ed.), Handbook of lipid research, vol. 6. Plenum Press, New York. p. 123-234.
- Fischer W., Laine R.A., and Nakano M., 1978. On the relationship between glycerophosphoglycolipids and teichoic acids in Gram-positive bacteria. II. Structures of glycerophosphoglycolipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **528**, 298-308.
- Fujisawa T., Benno Y., Yaeshima T. & Mitsuoka T., 1992. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 487-491.
- Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
- Gilliland S.E., Walker D.K., 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci* **73**, 905-911.
- Giorgi A., Torriani S., Dellaglio F., Bo G., Stola G. & Bernuzzi L. 1987. Identification of vaginal lactobacilli from asymptomatic women. *Microbiologica.*, **10**, 377-384.
- Gladwin M., Trattler Bi., 2007. *Clinical Microbiology made ridiculously simple*. Miami, FL: MedMaster, Inc. pp. 4-5.
- Guarner F., & Schaafsma G.J., 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol* **39**, 237-238.
- Guyonnet D., Chassany O., Ducrotte P., 2007. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **26**, 475-86.
- Hamilton-Miller J.M., 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicrobiol. Ag.*, **22**, 360-366.
- Hammerschmidt S., 2006. Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Cur.r Opin. Microbiol.*, **9**, 12-20.
- Hatakka K., Savilahti E., Pönkä A., 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *B.M.J.*, **322**, 1327-1330.
- Hickson M., D'Souza A.L., Muthu N., 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *B.M.J.*, **335**, 7610-76 80.
- Kandler O., & Weiss N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. vol. 2, pp. 1209-1234.
- Kerr Martha. 2003. Probiotics Significantly Reduce Symptoms of IBS, Ulcerative Colitis. <http://www.medscape.com/viewarticle/455964>. Retrieved on 2009-06-15.
- Kirjavainen P.V., Salminen S.J., Isolauri E., 2003. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **36**, 223-227.

- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Buck B.L., Azcarate-Peril M.A., & Altermann E., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS. Microbiol. Rev.*, **29**, 393-409.
- Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., & 17 other authors 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 1990-1995.
- Konings W.N., Kok J., Kuipers O.P., & Poolman B., 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 276-282.
- Dicks L.M.T., Silvester M., Lawson P.A., and Collins M.D., 2000. *Lactobacillus fornicalis* sp. nov., isolated from the posterior fornix of the human vagina. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1253-1258.
- Lauer E., & Kandler O., 1980. *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zentbl. Bakteriol Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. I. Orig.*, **C1**, 75-78.
- Lechevalier, M.P., 1977. Lipids in bacteria taxonomy-a taxonomist's view. *Crit. Rev. Microbiol.*, **7**, 109-210.
- Ljungh A., Wadstrom T., 2009. *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Eds., Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-41-7.
- Madigan M., Martinko J., 2005. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Eds., Prentice Hall.
- Marco M.L., Pavan S., & Kleerebezem M., 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, 204-210.
- Morea M., Baruzzi F., Cappa F., Cocconcelli P.S., 1998 Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **43**,53-60.
- Nakamura C.E., & Whited G.M., 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 454-459.
- Nardini M., & Dijkstra B.W., 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 732-737.
- Näse L., Hatakka K., Savilahti E., 2001. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.*, **35**, 412-420.
- Navarre W.W., & Schneewind O., 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 174-229.
- Niedzielin K., Kordecki H., Birkenfeld B., 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**, 1143-1147.
- O'Leary W.M., and Wilkinson S.G., 1988. Gram-positive bacteria, p. 117-201. In C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.), *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London.
- Ostash B., Walker S., 2005. Bacterial transglycosylase inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 459-466.
- Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects". *Ant. Van. Leeuw.*, **82**, 279-289.

- Pot B., Ludwig W., Kersters K., & Schleifer K-H., 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications*, pp. 13-90. Edited by L. De Vuyst & E. J. Vandamme. London: Blackie Academic & Professional.
- Raetz C.R.H., Reynolds C.M., 2007. Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 295-329.
- Redondo-Lopez, V., Cook R.L., & Sobel, J.D., 1990. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.*, **12**, 856-872.
- Reid G., Jass J., Sebulsky M.T., McCormick J.K., 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice". *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 658-672.
- Sanders M.E., 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.*, **130**, 384-390.
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H., Saarela M., Matto J., & de Vos W.M., 2003. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, 572-584.
- Schaffer C., Messner P., 2005. The structure of secondary cell wall polymers: How Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiol.*, **151**, 643-651.
- Shaw N., 1970. Bacterial glycolipids. *Bacteriol. Rev.*, **34**, 365-377.
- Steen A., Buist G., Leenhouts K.J., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A.L., Venema G., Kuipers, O. P., & Kok J., 2003. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J. Biol. Chem.*, **278**, 23874-23881.
- Stiles M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Ant. Van. Leenw.*, **70**, 331-345.
- Sutcliffe, I.C., & Harrington, D.J., 2002. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiol.*, **148**, 2065-2077.
- Symersky J., Patti J.M., Carson M., & 8 other authors 1997. Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 833-838.
- Tannock G.W., 2004. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3189-3194.
- Thorne K.J.I., 1964. The phospholipids of *Lactobacillus casei*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **84**, 350-353.
- Uchida K., and Mogi K., 1973. Cellular fatty acid spectra of Hiochi bacteria, acid-tolerant lactobacilli, and their separation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**, 233-249.
- Van H.J., 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiol.*, **11**, 2-36.
- Vaughan E.E., Heilig H.G., Ben-Amor K., & de Vos W.M., 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS. Microbiol. Rev.*, **29**, 477-490.
- Voet Donald., Voet Judith G., and Pratt Charlotte., 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. New York: Wiley.
- Wacker M., Linton D., Hitchen PG., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W., Aebi M., 2002. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science.*, **298**, 1790-1793.



- Weerapana E., Imperiali B., 2006. Asparagine-linked protein glycosylation: From eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiol.*, **16**, 91-101.
- Weidenmaier C., Peschel A., 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 276-287.
- Whorwell P.J., Altringer L., Morel J., 2006. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.*, **101**, 1581-1590.
- Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L., 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 451-455.
- Yuen L., Dionne J., Arif B., & Richardson C., 1990. Identification and sequencing of the spheroidin gene of *Choristoneura biennis* entomopoxvirus. *Virology*, **175**, 427-433.

## **I-5. Conclusions : Incidences de la lyophilisation sur la viabilité des bactéries lactiques au cours du stockage**

Il est donc possible de conserver par atomisation, fluidisation ou lyophilisation un grand nombre de bactéries lactiques, non seulement dans le cadre du laboratoire, mais aussi à l'échelle industrielle. Les conditions opératoires qui permettent d'obtenir une bonne conservation de l'activité métabolique des bactéries sont relativement bien connues, mais les mécanismes de leur altération et de leur préservation sont, eux mal connus. La résolution des difficultés qui subsistent, telles que la mauvaise conservation de certaines souches à l'état lyophilisé et la reprise d'activité souvent trop lente des ferments pour ensemencements directs, passe certainement par une meilleure compréhension de ces mécanismes. Pour optimiser la conservation donc, plusieurs techniques et voies de recherches doivent être menées de concert. Parmi ces voies de recherche les plus prometteuses, on peut citer l'étude des modifications subies par les structures membranaires au cours des traitements de conservation, la recherche de formulation incorporant des cryoprotecteurs plus efficaces, l'induction des mécanismes de résistance à ces traitements (par adaptation des bactéries au cours de leur culture dans des conditions appropriées ou éventuellement par utilisation d'antioxydant afin de bloquer les phénomènes de peroxydation).

## **Chapitre II**

---

**Sélection et identification de nouvelles souches  
résistantes de bactéries lactiques**

## II. Sélection et identification de nouvelles souches résistantes de bactéries lactiques

---

### II.1. Contexte et objectifs

Le premier objectif fixé dans ce travail est la sélection de souches naturellement résistantes. Une sélection rigoureuse est le premier des facteurs proposés pour améliorer la conservation des bactéries lactiques par [Klaenhammer et Kleeman \(1981\)](#). Ainsi, pour garantir une viabilité commercialement satisfaisante, après un stockage à long terme, il est opportun de sélectionner des souches qui ont survécu à des conditions drastiques (températures élevées, sécheresse). Le choix de ces deux critères repose sur l'hypothèse suivante : une souche qui a survécu dans un environnement hostile : chaud et sec, possède ou a développé un mécanisme lui permettant une meilleure adaptation à la chaleur et la déshydratation. Or, en biotechnologie, lors des procédés technologiques ou au cours du stockage, la perte de viabilité « systématiquement observée » des souches de bactéries lactiques est imputable à ces deux facteurs.

C'est dans cette optique que nous avons dans un premier temps, sélectionné des souches de bactéries lactiques sur la base de leur résistance à un traitement thermique.

## II.2. Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal

---

Publication 3 – *Afr. J. Biotechnol*

*African Journal of Biotechnology*

Coulibaly, I<sup>(1\*)</sup>., Dubois-D, R<sup>(1)</sup>., Destain, J<sup>(1)</sup>., Thonart, Ph <sup>(1, 2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

Le groupe comprenant les bactéries lactiques est l'un des groupes les plus divers de bactéries connues et ces organismes ont été caractérisés en détail par l'utilisation de différentes techniques. Dans cette étude, une trentaine de souches bactériennes ont été isolées à partir des fèces et des plumes de poulets. Un total de dix-neuf isolats ont été obtenus et par le dépistage séquentiel pour l'activité de la catalase et la coloration de Gram, huit ont été jugées LAB, dont six ont été établies afin d'être homofermentative par le test plug gel. Cinq isolats ont été identifiés par l'utilisation du kit API 50CHL : quatre souches de lactobacilles et une souche lactocoques ont été sélectionnées pour étudier leur croissance et leur profil de production d'acide lactique dans une expérience au cours du temps. Les souches de lactobacilles, isolées à partir des fèces et des sols, produisent des quantités élevées de cellules et de l'acide lactique par rapport à la souche de lactocoque isolée des plumes. L'isomère L(+)-lactique est le seul isomère optique d'utilisation dans les industries pharmaceutique et alimentaire parce que c'est seulement cette forme adaptée qui est assimilée. Les isomères optiques de l'acide lactique ont été examinés par la L(+) et D(-) lactate déshydrogénase kit. Les souches de lactobacilles produisent une combinaison des deux isomères optiques de l'acide lactique. Parmi ces produits, *L. casei* ssp. *casei* produit une faible quantité de D(-)-lactique (2%). Le taux optimal de glucose pour la production d'acide lactique par des souches de *Lactobacillus* est élevé à 180g/l et 120g/l pour *L. plantarum* et *L. paraplantarum* respectivement.

**Mots-clés:** caractérisation, les bactéries lactiques, *Lactobacillus*, L(+)-lactique, D(-)-lactique acide, les isomères optiques.

## Abstract

The group that includes the lactic acid bacteria is one of the most diverse groups of bacteria known and these organisms have been characterized extensively by using different techniques. In this study, thirty lactic acid bacterial strains isolated from soils chicken faeces and feathers. A total of nineteen isolates were obtained and by sequential screening for catalase activity and Gram-staining, eight were determined to be LAB out of which six were established to be homofermentative by the gel plug test. Five isolates were identified by use of the API 50 CHL kit and four *Lactobacilli* strains and one *Lactococci* strain were selected to study their growth and lactic acid production profiles in a time course experiment. The *Lactobacilli* strains, both isolated from faeces, produced higher amounts of cells and lactic acid from soils as compared to the lactococci strain isolated from feathers. L(+)-lactic acid is the only optical isomer for use in pharmaceutical and food industries because is only one adapted to assimilate this form. The optical isomers of lactic acid were examined by L(+) and D(-) lactate dehydrogenase kit. *Lactobacilli* strains produce combination of both optical isomers of lactic acid. Among them, *L. casei subsp. casei* produces the low amount of D(-)-lactic (2%). The optimum rate of glucose for lactic acid production by *Lactobacillus* strains were 180 g/l and 120 g/l for *L. plantarum* and *L. paraplantarum* respectively.

**Keywords:** characterization, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, L(+)-lactic acid, D(-)-lactic acid, optical isomers.

## II-2.1. Introduction

The isolation and screening of microorganisms from natural sources has always been the most powerful means for obtaining useful and genetically stable strains for industrially important products. Lactic acid bacteria (LAB) are important in the food and dairy industries because the lactic acid and other organic acids produced by these bacteria act as natural preservatives as well as flavour enhancers. LAB find increasing acceptance as probiotics which aid in stimulating immune responses, preventing infection by enteropathogenic bacteria, and treating and preventing diarrhoea (Reid, 1999). LABs are a diverse bacterial group consisting of 11 genera. These bacteria are Gram-positive, non-spore-forming cocci or rods which produce lactic acid as their main metabolic product. *Lactobacilli* are found in a variety of habitats, also in the gastrointestinal (GI) tract of human. Lactic acid bacteria have a long history as GRAS organisms (generally regarded as safe) and especially members of genus *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* are widely used in fermentation industry. Several species of genus *Lactobacillus* have been used in food products as probiotic organisms. Probiotic strains are selected for potential application on the basis of particular physiological and functional properties. Since generalizations about the probiotic performance of species cannot be yet made based on scientific evidence, it is more reliable to assume that probiotic properties are strain-specific (Sanders, 1999). In non-food applications, lactic acid is the building blocks used in the chemical polymerisation of poly lactic acid (PLA), a biodegradable and biocompatible material which is a good alternative to synthetic plastics. Lactic acid could be produced by chemical synthesis, e.g., as a by-product in the petrochemical industries, or it could be made by microbial fermentation. The fermentation process is becoming more relevant because the raw materials used in fermentation are renewable in contrast to petrochemicals (Kharras et al., 1993). Furthermore, the fermentation process could produce optically pure isomers of lactic acid. Pure isomers, L(+) or D(-)-lactic acid, are more valuable than the racemic DL form because each isomer has its own applications in the cosmetics and pharmaceuticals industries. In PLA, the ratio of L(+) and D(-)-lactic acid influences the degradability of the polymers (Kharras et al., 1993); therefore it is easier to manufacture PLA with specific properties, e.g., degradability, if L(+) and D(-)-lactic acid are supplied separately. LAB that have industrial potential should be



homofermentative, i.e., they produce only lactic acid. The lactic acid bacteria (LAB) are of major economic and nutritional importance because of their use in the production and preservation of a many variety of fermented products. In particular, species closely related to the *Lactobacillus* group are increasingly used as adjunct cultures in milk fermentations (Mayra-Makinen et al., 1998). Much current research is focused on characterizing their industrially relevant traits and the opportunities for strain improvement by metabolic engineering (Gasson, 1993 ; de Vos, 1997 ; Mollet, 1999). Lactic acid bacteria are characterized as Gram-positive, usually non-motile, non-sporulating bacteria that produce lactic acid as a major or sole product of fermentative metabolism. Kandler and Weiss have classified *Lactobacillus* isolates from temperate regions according to their morphology, physiology and molecular characters (Kandler et al., 1986). Schleifer classified LAB based on the molecular characteristics (Schleifer et al., 1987). LAB from food and their current taxonomical status have been described by many (Gonzalez, 2000 ; Ringoe, 1998 ; Schleifer, 1987 ; Stiles, 1997). Taxonomic studies on LAB from African animals are rare. Molecular methods are important for bacterial identification (Drancourt et al., 2000 ; Greetham et al., 2002 ; Sghir et al., 2000) and possibly more accurate for LAB than are conventional phenotypic methods. The objective of this study was to isolate lactic acid bacteria from chicken faeces and poultry soils and to screen these isolates for desirable traits such as homofermentative ability, production of isomeric form lactic acid, and tolerance to high concentration of lactic acid, low pH and high temperature.

## II-2.2. Materials and Methods

### II-2.2.1. Isolation of LAB strains, culture media and growth conditions

Soils and faeces samples were collected from different poultry farms in Dakar (Senegal, West Africa). Strains isolation was carried out according to Nakayama et al. (1967). Five grams of sample were mixed with 100 ml of GYP medium contained 1% glucose (w/v), 1% yeast and 1% peptone. The sample suspension was heated for 10 min at 80°C and incubated anaerobically at 30°C. After 48 h of incubation, 100 µl of the mixture were spread onto the surface of GYP agar containing 1% CaCO<sub>3</sub>. The culture was incubated anaerobically at 30°C. Acid producing bacteria were recognised by the clear

zones around the colonies. Bacteria were purified by several isolations and fresh cultures of these isolates were conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  with glycerol (30%) as cryoprotective agents (Saw et al., 2004). Each of the isolates was first tested for catalase by placing a drop of 3% hydrogen peroxide solution on the cells. Immediate formation of bubbles indicated the presence of catalase in the cells. Only those isolates which were catalase- negative were Gram-stained, and only those which were Gram-positive were put through the gel plug test (Gibson et al., 1945) to determine whether the isolate produced carbon dioxide during fermentation. An isolate was deemed to be a homofermentative lactic acid producer if no gas was produced. Based on the results, five homofermentative isolates were selected for further studies. These isolates were identified by the API 50CHL identification kit (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

#### II-2.2.2. Determination of lactic acid isomers

Bacterial cell concentration was determined at 610 nm and calibrated into colony forming units (CFU) by colony count method and into dry mass weight (Siebold et al., 1995). Bacterial cell concentration was determined by dry mass weight (Vaccari et al., 1993 ; Monteagudo et al., 1997). The dry mass weight of bacterial and fungal cells was determined by centrifugation of the fermentation broth and freeze dried sediments (Monteagudo et al., 1997). The concentration of lactic acid was measured based on colorimetric determination by L(+) and D(-)-lactate dehydrogenase kit (Megazyme International Ireland Ltd., Co. Wicklow, Ireland). In this method, known amounts of production medium were taken during fermentation and centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min. The supernatant was used directly for determination of lactic acid concentration. The assays are specific for either D-lactic acid or L-lactic acid. In the assay of lithium D-lactate (MW = 96.0) results of approx. 96% (w/w) can be expected, while a value of 98% (w/w) should be obtained with lithium L-lactate. The smallest differentiating absorbance for the assay is 0.005 absorbance units. This corresponds to 0.107 mg/L of sample solution at the maximum sample volume of 1.50 mL (or to 1.60 mg/L with a sample volume of 0.1 mL). The absorbance of the solutions (A1) was read against blank at 340 nm (Beckman Coulter, spectrometer AD 340s) after approx. 3 min and start the reactions by addition of 0.02 ml of (D-LDH)/ (L-LDH) suspensions and then the second

absorbance's read of the solutions (A2) at the end of the reaction (approx. 20 min). If the reaction has not stopped after 20 min, continue to read the absorbances at 5 min intervals until the absorbance either remain the same, or increase constantly over 5 min. The D(-) and L(+)-lactic acid were also determined by enzyme test kit according to the manufacture instruction. (Megazyme International Ireland Ltd)

### **II-2.2.3. Assay of residual glucose**

Consumption of glucose during cultivation is measured at the end of fermentation. The diluted supernatant as above was also used for the assay of residual glucose. After centrifugation, the supernatant was collected for analysis. The determination of glucose in the supernatant was measured by using an analyzer of sugar YSI2700 SELECT (Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

### **II-2.2.4. Behaviour for tolerance to high temperatures, high concentrations of lactic acid and sodium chloride, and low pH**

A basal MRS medium was used in these series of studies ([de Man et al., 1960](#)) but without beef extract, and with 0.15 g/l bromocresol purple added as pH indicator (pH 7). A lowering of this pH would change the medium from purple to yellow, and was taken to indicate cell growth because the production of lactic acid is growth-related. No change in the colour of the medium was taken to indicate no cell growth because no acids were released. Universal bottles with screw caps were each filled with 20 ml of the basal MRS medium and autoclaved. An 18 h culture of each isolate was used as the inoculum whereby the cells were spun down, resuspended in 0.85% saline, and 100 µl of the suspension was inoculated into each test bottle. The temperatures tested were 15, 30, 37, 44 and 55°C, the concentrations of lactic acid tested were 3%, 5%, 7.5%, 9% and 12% (w/v), and the concentrations of NaCl tested were 1.5%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10% (w/v). Four pH were tested, i.e., 4, 5.5, 7 and 9. The basal MRS medium was adjusted with 1M phosphoric acid and 1M NaOH to prepare this initial pH. The bottles were placed in water baths with reciprocal shaking, set at the specific test temperatures or at 37 °C for the tests on pH and concentrations of lactic acid and NaCl. At the end of 42 h, the colour

change and turbidity of each bottle was noted as a simple indication of growth or no-growth. Each treatment was tested with triplicate bottles.

### II-2.2.5. Determination of the turbidity

The biomass evolution was followed by using the turbidimetric method (the optical density: OD) at 540 nm. Acidity of the culture media was measured by titration with 0.5N NaOH using phenolphthalein as pH indicator.

## II-2.3. Results and discussion

### II-2.3.1. Screening of lactic acid bacteria

Thirty bacterial isolates were obtained from the poultry farms in Senegal (Dakar) and glucose was used in the enrichment medium. Of these, 25 tested Gram-positive and catalase-negative, and all but one was rod-shaped. The one remaining LAB isolate was coccus-shaped. Fifteen of these isolates did not produce gas in the gel plug test and were, therefore, deemed to be homofermenters. Based on the origin which the isolate was obtained, five of these 15 were selected for characterization and the tolerance tests. **Tab. 5** lists these five isolates, giving details about the food origin, according to the substrate used in the enrichment process (sugar), cell morphology, and identification by the API 50CHL kit, probability of fit to the closest species, and the type of lactic acid isomer produced.

**Table 5.** Some characteristics of the five homofermentative LAB isolates

| Isolate name | Origin from Which isolated | Cell morphology | Identification by API 50CHL kit | Identification Probabilities (%) | Lactic acid isomer Produced |
|--------------|----------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Spo03        | Fleachers                  | Rod             | <i>Lactobacillus casei</i>      | 97,6                             | L(+)                        |
| Spo05        | Fresh intestine            | Cocci           | <i>Lactococcus lactis</i>       | 98,5                             | L(+)                        |
| Spo11        | soils                      | Rod             | <i>Lb. plantarum</i>            | 99,8                             | D/L                         |
| Spo04        | soils                      | Rod             | <i>Lb. plantarum</i>            | 99,8                             | D/L                         |
| Spo20        | Chicken faeces             | Rod             | <i>Lb. paraplantarum</i>        | 99,9                             | D/L                         |

The isolate from fleachers regardless of the sugar used in the enrichment medium, were identified as *L. casei*, while the isolate from soils was identified as *L. plantarum*. The isolate obtained from fresh intestine was identified as *L. lactis*. Isolates identified as *L. casei* and *L. lactis* produced only the L-form of the lactic acid while the isolate identified as *L. plantarum* produced a mixture of D and L isomers of lactic acid. LAB strains that produce a single isomeric form of lactic acid are more desirable as industrial strains compared to those strains that produce a racemic mixture of lactic acid.

This is because the material properties of poly (lactic acid) are governed by the ratio of L and D isomers in the polymer, so the polymerization process would be better controlled when the lactic acid used as starting material is in single isomeric forms.

### **II-2.3.2. Rapid screening for tolerance to high temperatures, high concentrations of lactic acid and sodium chloride, and low pH**

**Tab. 6** shows the tolerance of each of the five selected isolates to the environmental conditions tested. Three strains of the *Lactobacillus* sp. grew at 15 to 44°C, while the isolated from fleachers, Spo03, could not grow at 15°C. The *Lactococcus*, Spo5, isolated from fresh chicken's intestine grew at higher temperatures ranging from 30 to 44°C with no growth indicated at 15°C. Wouters et al. (2000) noted reduced glycolytic activity leading to reduced production of lactic acid in *L. lactis* at low temperature. The ability to grow at high temperature is a desirable trait as it could translate to increased rate of growth and lactic acid production. At the same time, a high fermentation temperature reduces contamination by other microorganisms. Spo05, however, was the least tolerant to high concentrations of lactic acid as growth was indicated only at 2 % and not at 5% and higher. The two isolates from soils and chicken faeces, Spo4 and Spo20 respectively, were the most tolerant of high lactic acid concentrations as they were able to grow at 7.5%. The other one isolate from soils Spo11 could tolerate up to 5% lactic acid concentration. None of the five isolates grew at 9% and 12% lactic acid concentrations. A higher tolerance to lactic acid is a desirable trait for an industrial strain of LAB as it could produce more lactic acid in the fermentation broth without prematurely affecting itself adversely. In contrast to its low tolerance to lactic acid, Spo5 was the most tolerant to high NaCl concentration compared to the other isolates. Spo5 grew in concentrations up

to 7.5% while the rest could grow up to 5%. None of the isolates could grow in 7.5% NaCl. This test gave an indication of the osmotolerance level of a LAB strain. Bacterial cells cultivated in a high salt concentration would experience a loss of turgor pressure, which would then affect the physiology, enzyme activity, water activity and metabolism of the cells (Liu et al., 1998). Some cells overcome this effect by regulating the osmotic pressure between the inside and outside of the cell (Kashket, 1987). There are reports describing strains of *Lactococci* (Uguen et al., 1999) and *Lactobacilli* (Hutkins et al., 1987 ; Glaasker et al., 1998) showing decreased growth rate with increasing osmolarity of the medium. Uguen et al. (1999) also noted increased amount of glycine betaine, an osmolyte, in lactococci cells when they were grown in high NaCl concentration. Liu et al. (1998) reported that the uptake of glycine betaine was induced in cells as an adaptive measure to withstand increasing external osmotic pressure. The lactococci isolate, Spo5, could be similarly protected to be able to grow at higher NaCl concentration compared to the other isolates which were lactobacilli. During industrial fermentation, as lactic acid is being produced by the cells, alkali would be pumped into the broth to prevent excessive reduction in pH. Thus, the free acid would be converted to its salt form which would in turn increase the osmotic pressure on the cells.

Therefore, an LAB strain with high osmotolerance would be desirable as an industrial strain. All the isolates, except Spo5, could grow at pH 5.5. The inability of Spo5 to grow at low pH was consistent with its inability to grow at high lactic acid concentration, and was attributed to the low tolerance of *L. lactis* to free acid (H<sup>+</sup>) compared to *Lactobacillus* spp. (Kashket, 1987). LAB are acidophilic but while that means a tolerance to low pH, the latter should be differentiated from a situation in which a high concentration of free acids (H<sup>+</sup>) also exists because the free acids could inhibit growth (Amrane and Prigent, 1999). On the other hand, all the isolates except Spo20, lactobacilli, could grow in alkaline environment, pH 9. Rhee and Pack (1980) observed that *Lactobacillus bulgaricus* also could not tolerate high pH.

**Table 6.** Physiological characteristics: tolerance of the five LAB isolates to ranges of temperatures, lactic acid, NaCl concentrations and pH.

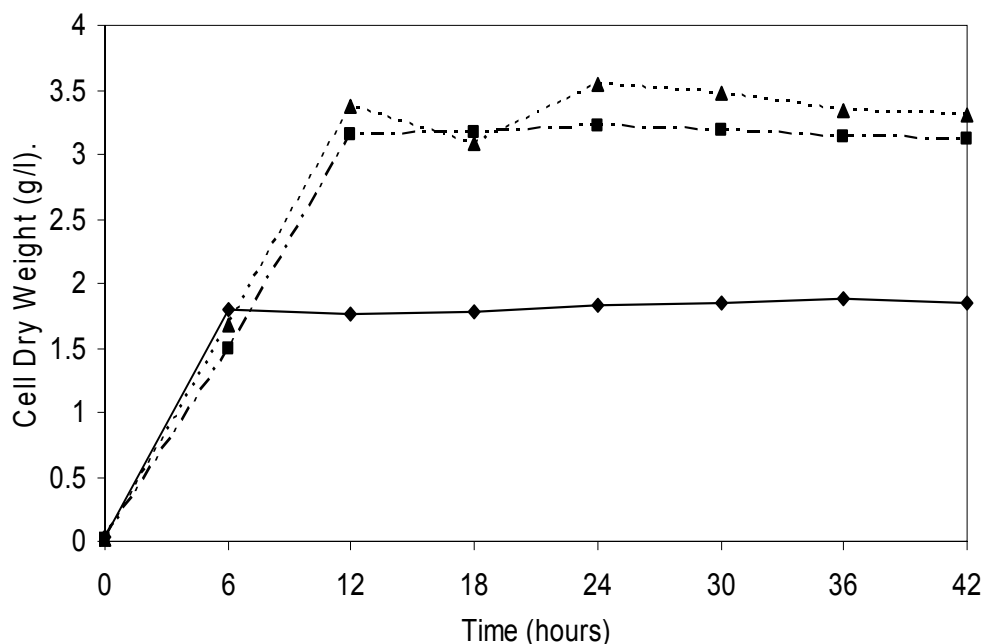
| Environmental conditions                 | Isolate name |       |       |       |       |
|--|--------------|-------|-------|-------|-------|
|  | Spo03        | Spo05 | Spo11 | Spo04 | Spo20 |
| <i>Temperature</i>                       |              |       |       |       |       |
| 15°C                                     | -            | -     | +     | +     | +     |
| 30°C                                     | +            | +     | +     | +     | +     |
| 37°C                                     | +            | +     | +     | +     | +     |
| 44°C                                     | +            | +     | +     | +     | +     |
| 55°C                                     | -            | -     | -     | -     | -     |
| <i>Lactic acid concentration (% w/v)</i> |              |       |       |       |       |
| 3,0                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 5,0                                      | +            | -     | +     | +     | +     |
| 7,5                                      | -            | -     | -     | +     | +     |
| 9,0                                      | -            | -     | -     | -     | -     |
| 12                                       | -            | -     | -     | -     | -     |
| <i>NaCl concentration (% w/v)</i>        |              |       |       |       |       |
| 1,5                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 2,5                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 5,0                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 7,5                                      | -            | +     | -     | -     | -     |
| 10                                       | -            | -     | -     | -     | -     |
| <i>pH (End point)</i>                    |              |       |       |       |       |
| 4,0                                      | +            | -     | +     | +     | +     |
| 5,5                                      | +            | -     | +     | +     | +     |
| 7,0                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 9,0                                      | +            | +     | +     | +     | -     |

+ indicates colour change from purple to yellow, taken to equate growth.

- indicates no colour change from purple, taken to equate no growth.

### II-2.3.3. Growth and lactic acid production profiles from time-course studies

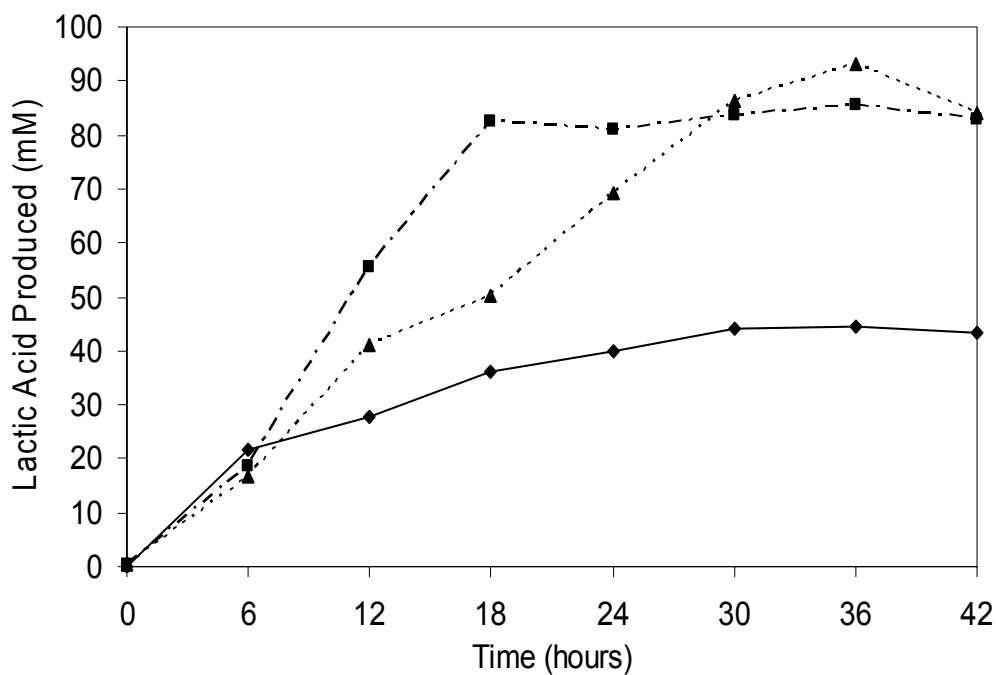
In the first 4 h, Spo05, the lactococci strain, grew faster than Spo04 and Spo20, the lactobacilli strains, based on cell dry weight (cdw) measurements. After this, the growth of Spo5 leveled off at about 1.8 g/l cdw while Spo04 and Spo20 continued to register biomass increase until 19h before their growth too leveled off at around 3.4 and 2.8 g/l cdw, respectively (**fig. 21**). The low biomass produced by Spo5 with respect to Spo04 and Spo20 correlated well with the lower amount of lactic acid produced by Spo05 (**fig. 22**) resulting in a higher pH in the medium (**fig. 23**) and lower consumption of glucose (**fig. 24**).



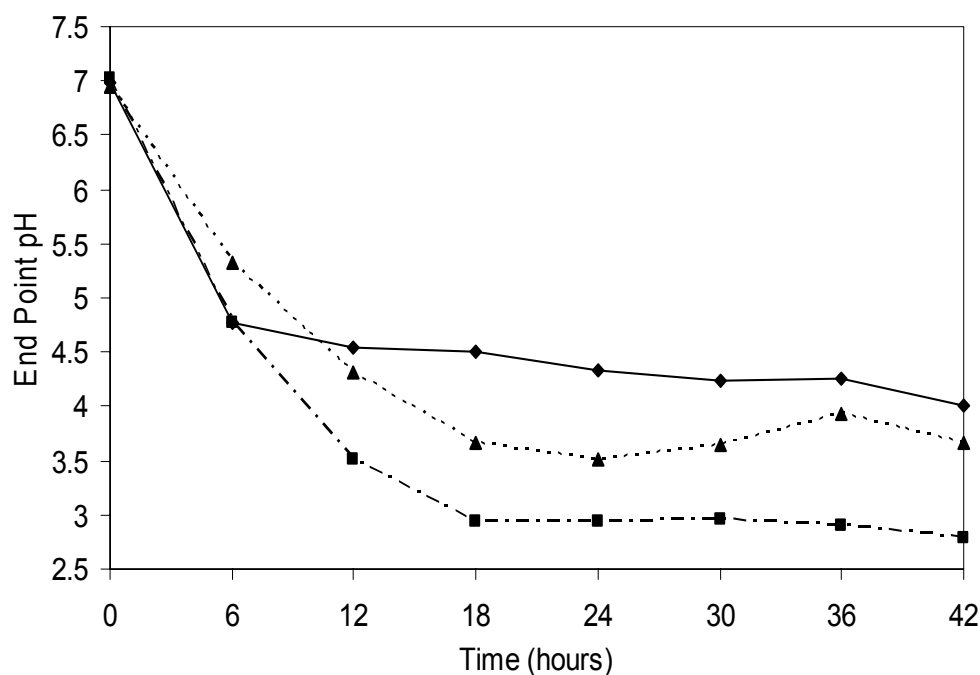
**Figure 21.** Biomass produced by three strains of Lactobacilli: (♦) Spo05, (■) Spo04 and (▲) Spo20 isolates over 42 h.

These results were consistent with those shown in **tab. 5** where Spo5 was found to be unable to tolerate high lactic acid concentrations and low pH compared to Spo04 and Spo20. While the growth profiles of Spo04 and Spo20 did not appear to be different from one another (**fig. 21**), the amount of lactic acid produced by Spo4 was higher than Spo20 for the first day, 24h (**fig. 22**).





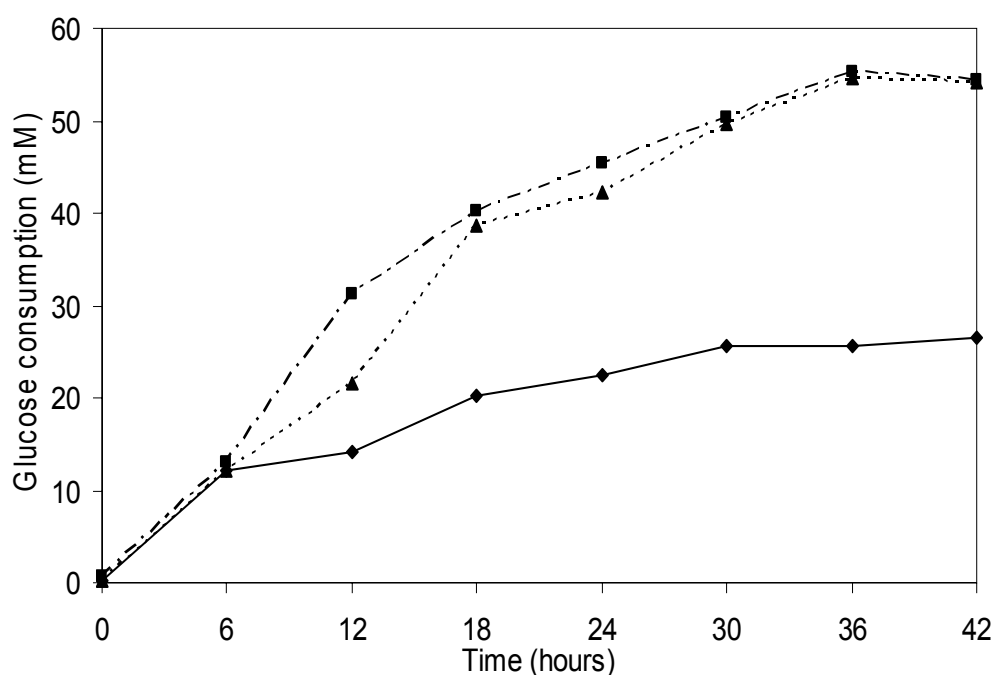
**Figure 22.** Lactic acid produced by three strains of *Lactobacilli*: (◆) Spo05, (■) Spo04 and (▲) Spo20 isolates over 42 h.



**Figure 23.** pH of the cultures of three strains of *Lactobacilli*: (◆) Spo05, (■) Spo04 and (▲) Spo20 isolates over 42 h.

The production of lactic acid by Spo20 also peaked faster at 18 h compared to glucose consumption (fig. 24) of the two *Lactobacilli* strains, respectively. At 30 h, the

yield of lactic acid from glucose was highest with Spo04 at 1.9, followed by Spo20 at 1.6, and Spo5 at 1.5. This indicated that Spo04 had the highest efficiency in converting glucose to lactic acid. Spo04 and Spo20 had similar tolerance levels to high temperature (up to 42°C), lactic acid concentration (7.5%), NaCl concentration (5%), and to low pH (5.5), but the faster production of lactic acid by Spo20 might give it a slight advantage over Spo4. This difference between Spo04 and Spo20 was apparent under current experimental conditions, i.e. using MRS medium in which glucose was the primary carbon source and the medium was not pH-controlled.



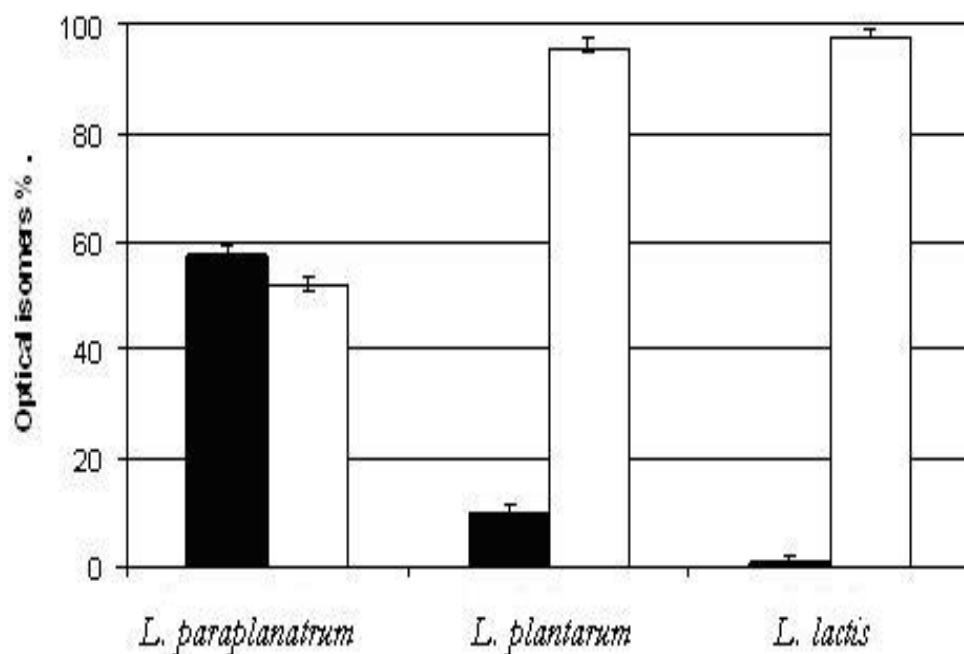
**Figure 24.** Glucose consumption (mm) by three strains of Lactobacilli: (◆) Spo05, (■) Spo04 and (▲) Spo20 isolates over 42 h.

In developing the fermentation process to industrial level, cheaper sources of carbon are necessary and the medium would need to be pH-controlled by incorporating neutralizing agents such as calcium carbonate into the medium to reduce the inhibitory effects of free lactic acid on the producer cells. Under such conditions, the growth and lactic acid production of Spo04 and Spo20 would need to be re-evaluated. The time-course study was conducted to compare the growth and lactic acid producing capacity of two lactobacilli strains and a lactococci strain, the findings of which supported the results of the rapid screening tests on tolerance of the strains to a range of environmental factors. There was little doubt that the amount of biomass and lactic acid produced by the

respective strains were limited by the accumulation of lactic acid in the fermentation broth and the prevailing pH, and reflected the different tolerance levels of the strains. A pH-controlled medium would probably allow for higher accumulation of lactic acid and would be appropriate for future studies where optimization of the fermentation process was the focus.

#### II-2.3.4. Optical isomer of lactic acid comparison

L(+)-Lactic acid is more important for pharmaceutical and food industries, So produced lactic acid was used for optical isomers determination. This was examined by lactate dehydrogenase kit enzyme test. The results of optimum isomers of lactic acid produced by best strains are shown in **fig. 25**.



**Figure 25.** Lactic acid optical isomers comparison produced by three strains of Lactobacilli: Spo05, Spo04 and Sp20 with ■ D(-) Optical isomer and □ L(+) Optical isomer.

The basic difference between this group *L. casei*, *L. lactis* and the other *L. plantarum* and *L. paraplantarum* fermentation is that only the form L(+)-lactic acid is produced, whereas the latter fermentation is anaerobic and L(+)-, D(-)-, DL-lactate is produced. The purity of monomers is highly critical in the synthesis of polylactides and a purity of 99% or greater is usually required with the starting lactide material (Lewis, 1991). Among *Lactobacilli* strains, *L. casei subsp casei* produced high concentration of L(+)-lactic acid with

98% purity. Other *Lactobacillus* strains produce both optical isomers in combination. This confirmed experimental work of Vaccari et al. 1993. This study described the sequential steps of isolating bacteria from south African poultry farms (Senegal), screening the isolates for LAB traits, selection of isolates based on a series of tests for industrially-desirable traits, and finally compared the growth and lactic acid production profiles between the lactobacilli and lactococci strains. In this study, the determination of optical active isomer producers of lactic acid in the fermentation broth and provide a complete profile of substrate utilization by these microorganisms.

## II-2.4. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the republic of Ivory cost for its financial assistance to this work and Mrs Maryse Hardenne and Mr Vincent Hote for their contribution. We thank all the technical personal of CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle). We also like to express our gratitude to the republic of Ivory Cost and the communauté française de Belgique for financial assistance.

## II-2.5. References

- Amrane A, Prigent Y (1999). Effect of the main culture parameters on the growth and production coupling of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.* 2:101-108.
- De Vos WM, Kleerebezem M, Kuipers OP (1997). Expression systems for industrial Gram-positive bacteria with low guanine and cytosine content. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 547-553.
- Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 925-932.
- Gasson, M. J. (1993) Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 12: 3-20.
- Gibson T, Abdel Malek T (1945) The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy. Res.* 14: 35-44.
- Glaasker E, Tjan FSB, Steeg PFT, Konings WN, Poolman B (1998). Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J. Bacteriol.* 180: 4718-4723.
- Gonzalez CJ, Encinas JP, Gracia-Lopez ML, Otero A (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food. Microbiol.* 17: 383-391
- Greetham H, Greetham L, Glenn R., Gibson CG, Hans H, Birgit M, Ulrike S, Enevold F, Matthew DC (2003). *Clostridium colicanis* sp. nov., from canine faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 259-262.

- Hutkins RW, Ellefson WL, Kashket ER (1987). Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 2275–2281
- Kandler O, Weiss N (1986). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath, P. H. A. Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds), Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, pp.1209-1234.
- Kashket ER (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS. Microbiol. Rev.* 46: 233-244.
- Kharras GB, Sanchez-Riera F, Severson DK (1993). Polymers of lactic acid. In: Molby, D.B. (Ed.), *Plastics from microbes: Microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Hanser Publ., pp.93-137.
- Lewis DH, (1991). Controlled release of bioactive agents lactide/glycolide polymers. In: *Polymers as drug delivery systems*. (Chasin, M. and Langer, R. eds.), Dekker Inc, New York, pp.1-41.
- Mayra-Makinen A, Bigret M (1998). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, 2nd. (eds)S. Salminen & A. V. Wright. New York: Marcel Dekker. pp.73-102
- Mollet B (1999). Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry *Int. Dairy. J* 9:11-15.
- Monteagudo JM, Rodriguez L, Rincon J, Fuertes J (1997). Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *J. Chem. Tech. Biotech.* 68: 271-276.
- Nakayama O, Yanoshi M (1967). Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. I. Taxonomic studies on *Bacillus laevolacticus* nov. sp. and *Bacillus racemilacticus* nov. sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 139-153.
- Reid G (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3763-3766.
- Ringoe E, Gatesoupe FJ (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review *Aquaculture.* 160: 177-203.
- Rhee SK, Pack MY (1980). Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 144: 217–221.
- Sanders W, Gerard V, Jan K (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS. Microbiol. Rev.* 23 483-501.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Doré J (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 2263-2266.
- Siebold M, Frieling PV, Joppien R, Rindfleisch D, Schugerl K, Roper H (1995). Comparison of the production of lactic acid by three different *Lactobacilli* and its recovery by extraction and electrodialysis. *Process. Biochem.* 30: 81-95.
- Sow N. M, Dubois, D. R., Roblain, D, Guiro AT, Thonart P. (2005) Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *A. J. Biotechnol.* 4: 409-421.
- Stiles ME, Holzapfel WH (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy *Int. J. Food. Microbiol.* 36: 1-29.

- Uguen P, Hamelin J, Le Pennec J, Blanco C (1999). Influence of osmolarity and the presence of osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl Environ Microbiol.* 63: 291–293.
- Vaccari G, Gonzalez-Vara YRA, Campi AL, Dosi E, Brigidi P, Matteuzzi D (1993). Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus Casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins. *Appl. Microbiol. Biotech.* 40: 23-27.
- Ventura M, Casas I, Morelli L, Callegari ML (2000). Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. *Syst Appl Microbiol* 23:504-509.
- Wouters JA, Kamphuis HH, Hugenholtz J, Kuipers P, De Vos WM, Abee T (2000). Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3686-3691.

### II-3. Conclusions : Sélection et identification de nouvelles souches résistantes de bactéries lactiques

A l'issue de l'identification des isolats, les souches, Spo04 et Spo20 présentent les caractéristiques de souches thermorésistantes. Pour identifier et caractériser ces souches, la vérification de la présence de la catalase a été effectuée car elle permet de discriminer les souches acidifiantes appartenant au genre *Bacillus* de celles appartenant au genre *Lactobacillus*. L'absence de catalase chez les souches milite en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces souches appartiendraient au genre *Lactobacillus*. La résistance à l'acidité gastrique a été étudiée afin de garantir les propriétés probiotiques des souches. D'après l'étude de leur métabolisme fermentaire et la comparaison de l'ARNr16S avec la base de donnée du NCBI grâce au logiciel *Ribosomal Data Project II* plus élargi de souches témoins, sur le plan biochimique, la plupart d'entre elles sont relativement proches du genre *Lactobacillus*. Cette conclusion partielle est confirmée par l'étude de la capacité d'acidification des souches. Mais la comparaison des profils de croissance des souches dans différentes conditions montre que ces souches présentent certaines différences par rapport aux genres *Lactobacillus* et *Bacillus*. Le chapitre suivant est consacré à l'étude des effets de l'utilisation des agents protecteurs sur la composition en acides gras de la membrane et la viabilité au cours du stockage à température ambiante.

## Chapitre III

---

Effets des cryoprotecteurs sur la composition en  
acides gras cellulaires de *Lactobacillus*  
*plantarum* CWBI-B1419



### III. Effets des cryoprotecteurs sur la composition en acides gras cellulaires de *L. plantarum* CWBI-B1419

---

#### III-1. Contexte et objectifs

L'ajout d'agents protecteurs ou cryo-protecteurs est l'un des facteurs les plus déterminants pour améliorer la résistance des souches lors de la congélation ou de la lyophilisation. Cet ajout a une influence sur la composition de la membrane bactérienne, lorsque les composés sont utilisés soit dans le milieu de culture ou soit dans la pâte avant lyophilisation. De [Roissart et Luquet, \(1994\)](#) ont montré qu'une variation, dans le rapport entre la teneur en acides gras insaturés et celle en acides gras saturés, avait une incidence sur la cryorésistance après que le milieu de culture soit supplémenté avec du Tween 80 ou des additifs comme de l'acide oléique. Ceci pourrait expliquer l'amélioration de la cryorésistance notée chez *L. plantarum* par [Goldberg et Eschar, \(1977\)](#) et la résistance chez *Lactobacillus*. Dans ce chapitre, l'effet du sorbitol, du glutamate monosodique et du glycérol sur la composition membranaire de la cellule a été étudié ; l'objectif étant de trouver un agent protecteur pouvant garantir une survie à long terme des bactéries lyophilisées.

## III-2. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity

---

Publication 4 – *Int. J. Microbiol*

*International Journal of Microbiology*

Coulibaly, I<sup>(\*)</sup>., Dubois-D, R<sup>(1)</sup>., Destain, J<sup>(1)</sup>., Lognay, G<sup>(3)</sup>., Fauconnier, M.L<sup>(4)</sup>., Thonart, Ph<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

<sup>(3)</sup>Analytical Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(4)</sup>Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

L'effet des agents de protection sur le taux de survie et la résistance de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 et *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup> au cours de la lyophilisation et pendant le stockage ultérieur est lié à la composition en acides gras de la membrane. Les effets de ces protecteurs sur la composition en acides gras membranaires et sur l'action de l'activité d'acidification des deux souches de *Lactobacillus* conservées à 20°C ont été étudiés. Par addition du sorbitol, du glutamate monosodique et du glycérol comme agents cryoprotecteurs au cours du stockage, on note une baisse de l'acidification pendant le stockage des cellules lyophilisées des deux souches et l'augmentation des concentrations d'acides gras insaturés. L'addition du sorbitol et du glutamate monosodique ne modifie pas la composition en acides gras quelle que soit la souche, mais augmente la résistance à la lyophilisation de *L. plantarum* CWBI-B1419 et améliore le taux de survie pendant le stockage. L'ajout de ces agents de protection et la diminution de l'acidification améliorent le ratio des acides gras insaturés/saturés. Ces résultats indiquent que la survie au cours du stockage et la résistance à la lyophilisation sont étroitement liées à la composition en acides gras membranaires. Ce comportement peut être interprété comme une adaptation de *L. plantarum* CWBI-B1419 à l'ajout du sorbitol et du glutamate monosodique comme additifs. Une adaptation plus prononcée est observée chez *L. plantarum* CWBI-B1419 que chez *L. paracasei* ssp. *casei* LMG9192.

**Mots clés:** taux de survie, bactéries lactiques, lyophilisation, stockage, viabilité, composition des acides gras.

## Abstract

The protective effects of the fatty acid composition and membrane action of the acidification activity of two strains of *Lactobacillus* kept at 20°C were studied. The addition of sorbitol, monosodium glutamate and glycerol during storage is causing the decline of acidification and increased concentrations of unsaturated fatty acids observed in both strains. The addition of sorbitol and monosodium glutamate does not alter the fatty acid composition, whatever the strain, but increases the resistance to freeze-drying of *L. plantarum* CWBI-B1419 and improves survival during storage. The addition of these preservatives and decreased activity of acidification improves the ratio unsaturated. These results indicate that the survival during storage and freeze-drying resistance are closely related to the composition of membrane fatty acids. This behaviour can be interpreted as an adaptation of *L. plantarum* CWBI-B1419 supplemented by cryoprotectant additives such as sorbitol or monosodium glutamate sorbitol and monosodium glutamate as an additive. *L. plantarum* CWBI-B1419 presents a greater adaptation to culture conditions than *L. paracasei* ssp. *casei* LMG9192<sup>T</sup>.

**Keywords:** Survival rate, lactic acid bacteria, freeze-drying, storage, viability, fatty acid composition.

### III-2.1. Introduction

The acidification activity of lactic acid bacteria at the different steps of their production (fermentation, cooling, concentration, cryoprotection, freezing, or freeze-drying) and during storage differs depending on the strain considered and on the operating conditions [1,2]. The freezing and freeze-drying step is especially critical as it negatively affects both viability and physiological state of the bacteria [3,4]. The formation of ice crystals induces mechanical damage that leads to cellular death during freezing [5]. In addition, the crystallization of the water leads to a cryoconcentration of the solutes, which induces some osmotic damage [6]. Some agents such as those used in lyoprotection are of undoubted importance for the survival of cells because they can act on biological functions in preserving the integrity of the lipid bilayer by the phenomenon of water replacement, vitrification (glass formation), and depression of membrane transition temperatures ( $T_m$ ), as reviewed in detail by Castro et al. [7,8] and Champagne et al. [9]. The same observations with sucrose for survival of *Lb. coryniformis* Si3 were noticed by Schoug et al. [10]. Adding cryoprotective agents such as sorbitol, monosodium glutamate, and glycerol before freeze-drying process attenuated the damaging effects of freezing, thus improving the bacterial resistance to drying [11,12]. This protective effect was ascribed to interactions between sorbitol and the membrane phospholipids during the first step of freeze-drying, freezing [13]. Because the cell membrane is the first target to modification of the cell environment, its ability to adapt largely determines the survivability of the cell [14,15]. By considering the important role of fatty acid organization in membrane permeability, the membrane viscosity [16] and the membrane thickness [17] were ascribed to the unsaturation index of membrane fatty acids: the cell membrane adapts by increasing the proportion of unsaturated fatty acids, [18-20]. Unsaturated fatty acids promote exchanges between extracellular and intracellular media by rigidifying the membrane and enhancing the membrane permeability. The increased membrane permeability is related to the presence of the double bonds that tend to form less stable Van-der-waals interactions with adjacent lipids [17]. As a consequence, altering the fatty acid composition of the membrane may improve membrane permeability at low temperature and then may allow the cell to adapt itself to freezing and freeze-drying [21]. They considered either the concentration in some unsaturated fatty acids, or the ratio

between unsaturated and saturated fatty acids (U/S). The U/S ratio depends on the medium and environmental conditions in which the cells are cultivated and stored. Concerning lactic acid bacteria, the addition of ethanol or polyol such as sorbitol in the culture medium enhances the concentration in dihydrosterculic acid and the U/S ratio [22,23]. The biosynthesis of unsaturated C<sub>18:1</sub> fatty acids by some lactic acid bacteria is stimulated by the addition of ethanol and leads to an increase of the U/S ratio [24]. Finally, the fatty acid composition evolves during storage. Castro et al. [7] observed two phases: a first increase of the U/S ratio, which is explained by lipolysis reactions, followed by a decrease. Linders et al. [25] showed that U/S ratio is stable within 90 d of storage and then decreases. This decrease is linked to the oxidation of unsaturated fatty acids that are very sensitive to oxygen [7] and is accentuated by an increase in the residual relative humidity that activates the oxidation processes [8]. It is clear that acting on the membrane fatty acid composition can modulate the U/S ratio. This was achieved by using appropriate operating conditions and led to a better recovery of cellular viability after freeze-drying and subsequent storage [26]. Nevertheless, as viability measurements are insufficient to express both viability and physiological states of lactic acid bacteria, these have to be proved by considering the acidification activity of lactic acid bacteria. This work aimed to characterize the survival rate, resistance, and subsequent storage of a freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strain in relation to its fatty acid composition. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity.

## **III-2.2. Materials and methods**

### **III-2.2.1. Microorganisms and growth conditions**

#### ***III-2.2.1.1. Growth conditions***

*Lactobacillus plantarum* CWBIB1419 was obtained from the collection of the Wallon Center for Industrial's Biology, Belgium and was originally isolated from a poultry farm. *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup> was obtained from the culture collection of the Laboratory of Microbiology of Ghent's University (Belgium). The original reference cultures were maintained in cryogenic storage on glass beads at -80°C. Working cultures were maintained as slopes on de Man-Rogosa-Sharp agar (MRSa). Slopes were stored at

4°C and subcultured every month. *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup> were grown in MRS medium (Merck) at 37°C. The inoculum of the tested bacteria was prepared from strains stored on a substrate with glycerol at -80°C using appropriate media. Bacteria were proliferated for 24 hours and further culturing was carried out after increasing the volume of the medium for the next 48 hours anaerobically at 37°C. Bacteria prepared in this way provided the inoculum which was used at the amount of 1% (v/v).

#### *III-2.2.1.2. Scaling up*

Strains were grown and performed in 100 L bioreactor at 37°C containing MRS medium for 18 hours and then concentrated 20 times by centrifugation. The pH was controlled at 6.5 by adding a 14% KOH. Cells were freeze-dried in a low freeze-drier (Leybold, Belgium) with a standard programme by increasing the temperature gradually from -45°C to 25°C at 0.9 mbar pressure (30 hours) followed by 15 hours at 0.15 mbar. All fermentations were done in duplicate and average values reported.

#### *III-2.2.1.3. Cells concentrations and storage*

Cells were harvested in the stationary phase of growth by centrifugation (7000×g, 30 minutes, 4°C). Concentrated cells were resuspended in the same weight of supernatant at 4°C. Washed cells were then resuspended in sterile Ringer's solution with (3% w/w) of glycerol containing selected concentrations of compounds to be tested : 12 g/L sorbitol (s) and 12 g/L monosodium glutamate (msg), (Sigma, St. Louis, MO, USA). Protectant solutions were sterilized at 121°C for 10 minutes before mixing with a volume of washed cells. Cellular suspensions were maintained for 1 hour at room temperature before freeze-drying, in order to create an isotonic environment between cells and the compound added. Pastes were freeze-dried in trays, using an industrial freeze-dryer (HETO, Heto-Holten A/S, Allerød, Denmark). The initial pressure was 0.2 mbar, the plate temperature was -45°C and the end temperature of the product was 25°C. Freeze-drying time varied according to the amount of material in the drying room and was approximately 18-30 hours. Dried powders were stored in closed container at -20°C for one night without light. Freeze-dried powders are divided in two parts: the first one of about 2 ± 0.5 g was sealed in 15mL Falcon tubes and stored at room temperature (25°C)

without light for 8 months. The second part was vacuum-sealed in aluminium foil and stored at room temperature in darkness.

### **III-2.2.2. Rehydration/enumeration**

Viable counts were made before freeze-drying, after drying, and during storage at regular intervals. After freeze-drying, samples were immediately brought to their original volume 9mL with each peptoned water at 25°C. Then, samples were homogenized for 1 minute by Vortex mixer (SA-5, Stuart Scientific, UK) and incubated at room temperature for 15 minutes. Serial dilutions were spread-plated on the surface of petri plates containing MRS agar. These plates were incubated at 37°C for 48 hours, and the viability was then determined by the drop count technique. Survival levels were expressed as the ratio of colony-forming units per millilitre (cfu/ml) on MRS agar before ( $N_0$ ) and after ( $N_f$ ) freeze-drying. Viability (%) =  $(N_f/N_0) \times 100$ .

### **III-2.2.3. Acidification activity and water content**

Acidification was carried out at 30°C in 120 mL MRS [27] broth inoculated with 1% of  $10^7$  Cf $\cdot$ ml $^{-1}$  of the freeze-dried sample. The total titratable acidity (% lactic acid/g DW) was determinate after 18 hours, according to the AOAC method (1997). The water content (g H<sub>2</sub>O/100 g dry weight) of the freezedried samples was determined after drying at 105°C until constant weight. Water activities of the dried samples after freeze-drying and the saturated salt solutions were measured and confirmed with a Novasina (Novasina, Pfäffikon, *Switzerland*) water activity meter (Aqua Lab, CX-2, Decagon Devices, INC, Washington, U.S.A.) by the dew point method with a standard deviation SD  $\pm$  0.003, respectively. Residual water content was < 3% in all samples.

### **III-2.2.4. Fatty acids analyses (FAME)**

Total lipids extraction was performed according to the adapted method of [28]. Fatty acid methyl esters were prepared by incubating the lipid extracts at 70°C for 90 minutes in 0.5 mL of methanol-BF<sub>3</sub>, containing 15% (v/v) of KOH and 0.2 mL of hexane. The fatty acids were extracted to the upper phase of reagent mixture containing 1mL of hexane, 0.5mL of saturated NaCl; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% 0.2 mL and analysed by gas



chromatography on a HP 6890 (Hewlett Packard, Germany) equipped with a flame ionization detector and a SPTM-2560, 100m\* 0.25mm\* 0.2  $\mu$ m fused silica capillary column. The conditions were as follows: injector temperature, 260°C; detector temperature, 260°C; carrier gas (helium) flow rate, 3 mL/min. The oven temperature was programmed from 140°C during 5 minutes to 240°C at 4°C/min. For peak identification, standard solution (Sigma) was used. The results were relative percentages of fatty acids, determined from peak areas of methyl esters. They were means of three independent experiments.

#### III-2.2.5. Statistical Analysis.

A four-factor analysis of variance with two-factor interactions (*Stastica 9*) was performed to determine the effects of sorbitol, the addition of monosodium glutamate and glycerol, and the length of storage. The Neuman-Keuls multiple comparison procedure was used to discriminate among the means for significant differences at the 5% confidence level. All results presented in this paper are the average of three independent replicate assays. The ratio between the standard deviations and the means values was between 2% and 5%.

### III-2.3. Results and discussion

#### III-2.3.1. Fatty acid composition of freeze-dried *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup>.

Cellular fatty acids (CFAs) from *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup> (control) were analyzed before and after freeze-drying. A total of six fatty acids made up of the membrane of those strains cultivated at pH 6.5, in absence or presence of sorbitol and monosodium glutamate in the washed cells solution (**tab.7**). This presence or absence of those additives did not affect the number of fatty acid detected or identified. As control U/S ratios were 0.57 and 0.58 for *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* LMG9192, respectively; saturated and unsaturated fatty acids were well balanced. When sorbitol and monosodium glutamate were added in the cellular suspensions, the U/S ratio was higher than 0.66 for *L. plantarum* CWBI-B1419 and 0.62 for *L. paracasei*

LMG9192, respectively, thus indicating a shift from saturated to unsaturated fatty acids in the membrane composition. This was due to a decrease in C<sub>16:0</sub>, and C<sub>18:0</sub> and an increase in C<sub>16:1</sub> and C<sub>18:1</sub> fatty acids. As confidence intervals overlapped, C<sub>18:2</sub> and C<sub>18:3</sub> did not show any significant difference, whether or not additives were present. Except for the C<sub>16:1</sub>, most of these fatty acids have been identified in other species of lactic acid bacteria: *L. lactis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus* sp. [23], *Lb. bulgaricus* [8, 29], *Lb. plantarum* [30, 31], *Lb. buchneri* and *Lb. fermentum* [32], *Lactobacillus* sp. [33] and *Leuconostoc mesenteroides* [24].

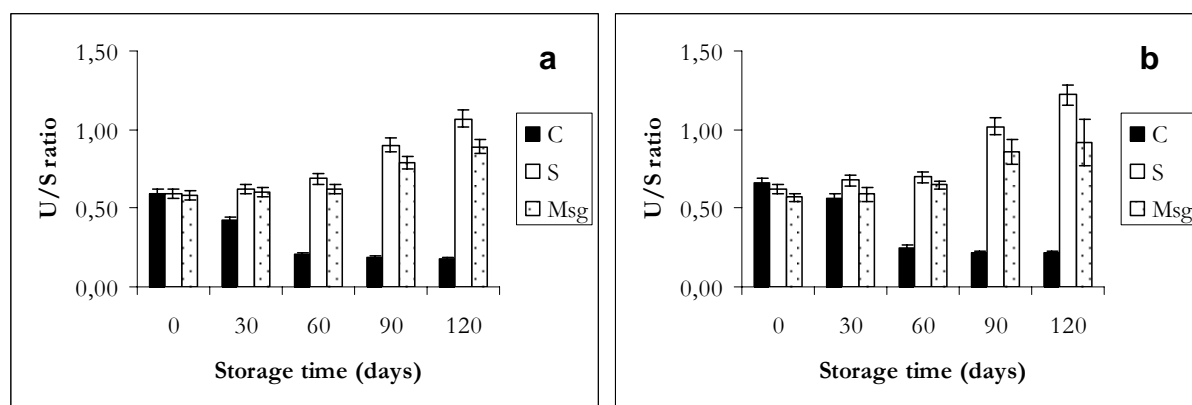
### III-2.3.2. Impacts of protectives agents and storage time on membrane fatty acid composition of *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* sp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup>.

The effect of addition of sorbitol, monosodium glutamate and glycerol as protectives agents and storage time on membrane fatty acid composition was studied. The ratio between unsaturated and saturated fatty acids was more affected by the addition of those additives and the storage time, while the addition of glycerol had no effect. Relative fatty acid concentrations were diversely influenced by glycerol, monosodium glutamate and sorbitol. The addition of glycerol as cryoprotective agent did not modify the fatty acid composition of the membrane because this molecule was added after the concentration step, immediately before freeze-drying. At this stage of production, cells were still in a quiet physiological state. Moreover, at this temperature, the membrane permeability is not high [34] and the passive diffusion of the glycerol from extracellular to intracellular medium was clarified. Consequently, glycerol probably acted mainly as an extracellular cryoprotective agent [13]. As expected, the addition of sorbitol and monosodium glutamate increased the concentration of unsaturated fatty acids C<sub>18:1</sub> and C<sub>16:1</sub>, and decreased the concentration of saturated fatty acids C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:0</sub> ( $P < .001$ ), without any modification of C<sub>18:1</sub> and C<sub>18:2</sub> proportions, (tab. 7). The U/S ratio increased from 0.57 to 0.66 with sorbitol and from 0.57 to 0.62 when monosodium glutamate was used. These results agree with those reported by Champagne et al. [9] and Anchordoguy et al. [13] who showed that the U/S ratio is strongly dependent on the presence of polyol in the medium. This indicated that sorbitol, when incorporated in the intracellular medium, increase thus unbalancing of the fatty acid composition..

**Table 7.** Composition and modifications of membrane fatty acids (% of peaks areas) induced by growth temperature of *L. paracasei* ssp. LMG 9192<sup>T</sup> and *L. plantarum* CWBI-B1419.

| Fatty acids       | Strains (Percentages of peaks ( $\pm 7\%$ )) |                 |                      |                 |                 |                      |
|-------------------|--|-----------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
|                   | LMG 9192 <sup>T</sup>                        |                 |                      | CWBI-B1419      |                 |                      |
|                   | Control                                      | Sorbitol        | Monosodium glutamate | Control         | Sorbitol        | Monosodium glutamate |
| C <sub>16:0</sub> | 53,39 $\pm$ 0,5                              | 52,90 $\pm$ 0,5 | 53,30 $\pm$ 0,4      | 54,16 $\pm$ 0,2 | 51,60 $\pm$ 0,5 | 52,5 $\pm$ 0,3       |
| C <sub>16:1</sub> | 7,79 $\pm$ 0,1                               | 7,80 $\pm$ 0,2  | 7,20 $\pm$ 0,2       | 9,50 $\pm$ 0,1  | 7,20 $\pm$ 0,3  | 8,74 $\pm$ 0,4       |
| C <sub>18:0</sub> | 9,80 $\pm$ 0,2                               | 9,80 $\pm$ 0,4  | 9,40 $\pm$ 0,7       | 9,58 $\pm$ 0,4  | 8,60 $\pm$ 0,2  | 9,21 $\pm$ 0,6       |
| C <sub>18:1</sub> | 27,70 $\pm$ 0,4                              | 24,9 $\pm$ 0,3  | 26,90 $\pm$ 0,1      | 24,33 $\pm$ 0,3 | 26,40 $\pm$ 0,3 | 26,19 $\pm$ 0,7      |
| C <sub>18:2</sub> | 0,40 $\pm$ 0,02                              | 0,80 $\pm$ 0,07 | 0,70 $\pm$ 0,03      | 0,42 $\pm$ 0,05 | 0,80 $\pm$ 0,04 | 0,76 $\pm$ 0,02      |
| C <sub>18:3</sub> | 0,90 $\pm$ 0,01                              | 5,80 $\pm$ 0,2  | 2,50 $\pm$ 0,1       | 2,01 $\pm$ 0,2  | 5,40 $\pm$ 0,6  | 2,60 $\pm$ 0,1       |
| $\Sigma$          | 100  | 100             | 100                  | 100             | 100             | 100                  |
| $\Sigma$ SFA%     | 63,20 $\pm$ 0,3                              | 62,70 $\pm$ 0,7 | 62,70 $\pm$ 0,3      | 63,74 $\pm$ 0,1 | 60,2 $\pm$ 0,5  | 61,71 $\pm$ 0,5      |
| $\Sigma$ UFA%     | 36,80 $\pm$ 0,5                              | 39,30 $\pm$ 0,3 | 37,30 $\pm$ 0,4      | 36,26 $\pm$ 0,2 | 39,80 $\pm$ 0,6 | 38,29 $\pm$ 0,3      |
| U/S               | 0,58 $\pm$ 0,02                              | 0,62 $\pm$ 0,02 | 0,59 $\pm$ 0,03      | 0,57 $\pm$ 0,01 | 0,66 $\pm$ 0,03 | 0,62 $\pm$ 0,01      |

Cells were cultivated by batch fermentation at increased temperatures from 37°C and harvested by centrifugation. After freezing for 24 h, cells were freeze-dried without cryoprotectant and fatty acids were extracted and analysed by CPG. SFA, Saturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids;. Data were presented as the average of two independent trials with SD. Note that experiment was not a quantitative method.



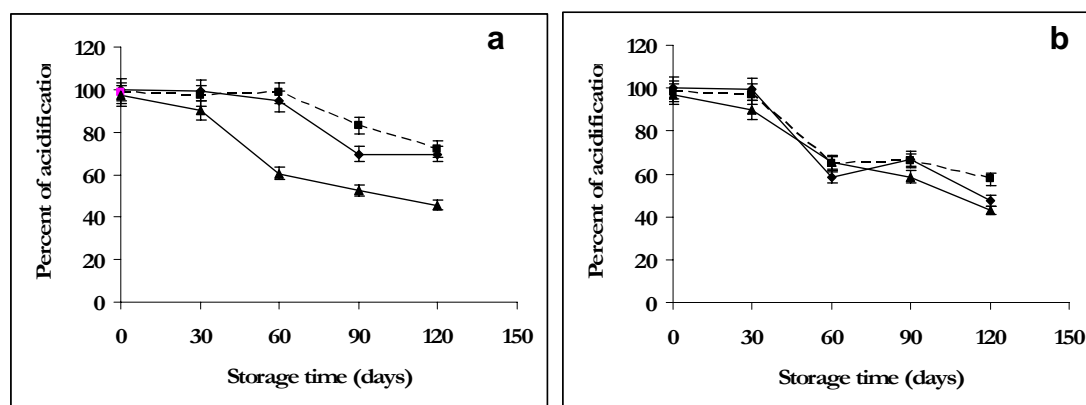
**Figure 26.** Impact of storage time upon U/S ratio of freeze-dried lactobacilli during 120 days at room temperature in vacuum-sealed aluminium foil. Values are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD,  $n=4$ ). (a) *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG 9192<sup>T</sup>, (b) *L. plantarum* CWBI-B1419<sup>T</sup> and (c) control (■), sorbitol (□) and monosodium glutamate (◻).

From **tab. 8**, the storage time of the freeze-dried bacteria affected the fatty acid composition ( $P < .05$ ). By increasing the storage time from 0 to 120 days, the  $C_{16:0}$  concentration increased, whereas the  $C_{18:1}$  and  $C_{18:2}$  concentrations decreased (**tab. 7**). Nevertheless, the differences remained slight. In plot of **fig. 26**, the U/S ratio increased with storage time and according to **tab. 7**, it raised from 0.57 to 0.66, 0.58 to 0.62 with sorbitol, and 0.57 to 0.62 and 0.58 to 0.59 when monosodium was used for *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup>, respectively.

The effect observed on this ratio was more significant as it combined the negative effects that were discerned on the saturated fatty acids and the positive effects noticed on the unsaturated fatty acids. These results agree with those increased during 4wk of storage of freeze-dried *Lb. bulgaricus*. This was ascribed to lipolysis reactions that altered saturated fatty acid concentrations [13]. The U/S ratio decreased as it was shown for freeze-dried or spraydried *Lb. bulgaricus* [8, 20]. The oxidation phenomena that were described by these authors were active in the membrane of *L. plantarum* CWBI-B1419. In this study, cells were freeze-dried and dehydrated; they were sensitive to oxidation reactions. A significant interaction ( $P < .05$ ) was observed between sorbitol and storage time on the U/S ratio. It could be attributed to amore important effect of the time of storage in the presence of sorbitol and monosodium glutamate in cellular suspensions than when those were absent.

### III-2.3.3. Effects of sorbitol, monosodium glutamate and glycerol, on the survival and resistance to freeze-dried storage of *L. plantarum* CWBI-B1419

Cryoprotectants (sorbitol and monosodium glutamate) were added to all lactobacilli before being lyophilised powders. *L. plantarum* CWBI-B1419 acidification activity was not significantly different before and after the freeze-drying. During storage of freeze-dried *Lactobacillus*, the acidification activity decreased, as evidenced [11].



**Figure 27.** Acidification activity of freeze-dried : (a) *L. plantarum* CWBI-B1419, (b) *L. paracasei* ssp. *casei* LMG 9192<sup>T</sup> and (c) control (—◆—), sorbitol (—■—) and monosodium glutamate (—▲—). Values are presented as means ± standard deviation (SD,  $n=4$ )

In **fig. 27** and **tab. 8**, the addition of sorbitol and monosodium glutamate in cellular suspensions showed a significant effect on the rate of loss of acidification activity ( $P < .05$ ). The recovery of the acidification activity was improved by the addition of sorbitol in the resuspended medium (**fig. 27**).

These results are in agreement with those of Simatos et al. [22] who showed that the cellular death of *Lb. bulgaricus* was linearly correlated with the proportion in C19:0, and with those of Guerzoni et al. [35], who indicated that *Lactobacillus* sp. and *L. lactis* viability was improved by adding protectants in the culture medium. This could be related to the changes in the fatty acid composition of the cellular membrane that were observed. As expected, the addition of glycerol as a cryoprotective agent considerably improved the resistance to freeze-dried storage of *L. plantarum* (**fig. 28**). The viability of cells of lactobacilli cultures immediately after freeze-drying was determined.

The *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup> strain revealed the lowest percentage of cell recuperation when monosodium glutamate was used as a protective agent. *L. plantarum* CWBI-B1419 was observed to have higher survival than *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG 9192<sup>T</sup> during storage. It was found good viability of lactobacilli species after drying and subsequent storage when sorbitol and monosodium glutamate were added in cell culture [9]. The rate of loss in acidification activity was three times lower when glycerol was added. This result confirmed the findings of Fonseca et al. [12]. Moreover, the glycerol effect was revealed whatever the other experimental conditions were (presence of sorbitol and monosodium glutamate in cellular suspensions). This indicated that the glycerol displayed an additional effect that can be combined with other beneficial effects. It was found that, survival and cryoprotectants effects of the freeze-dried samples decreased as the storage time increased.

However, after the 120 days storage period, a significantly lost of viable population were noted in the freeze-dried samples held at 20°C in vacuum-sealed aluminium foil at 20°C, respectively ( $P < .05$ ) (**fig. 28**). For example, viable population of freeze-dried lactobacilli held in vacuum-sealed aluminium foil was reduced from an initial population of  $7.4 \times 10^{11}$  to  $4.77 \times 10^9$  or  $3.07 \times 10^9$  cfu/g with a survival percentage of 64.4% or 41.4% after 120d at 20°C for *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG 9192<sup>T</sup> with sorbitol, respectively (**tab. 8**).

At the same period, survival of *Lactobacillus plantarum* CWBIB1419 with monosodium glutamate decrease again, after 120 days at 20°C in the same conditions, the viable population was about  $8.3 \times 10^{11}$  or  $3.57 \times 10^9$  cfu/g with a survival of 43.7%, respectively. In addition, viability was significantly higher for freeze-dried strain in vacuum-sealed with sorbitol,  $a_w = 0.11$  ( $P < .05$ ). At the end of freeze-drying, the water content of freeze-dried sample was  $3.6 \pm 0.6$  g H<sub>2</sub>O/100 g DW with  $a_w = 0.09 \pm 0.01$ . After the 120 days storage period, the water content for all the samples stored at 20°C was not changed significantly (approximately 0.6-fold) according to the package ( $P < .05$ ). As expected, water content for samples stored under vacuum did not change significantly during storage with sorbitol or monosodium glutamate ( $P < .05$ ), respectively (**tab.9**).

**Table 8.** Moisture content and survival of two strains of lactobacilli after freeze-drying with 12 g/L monosodium glutamate and 12 g/l sorbitol. Each value represents the mean of replicates from 2 freeze-drying experiments.

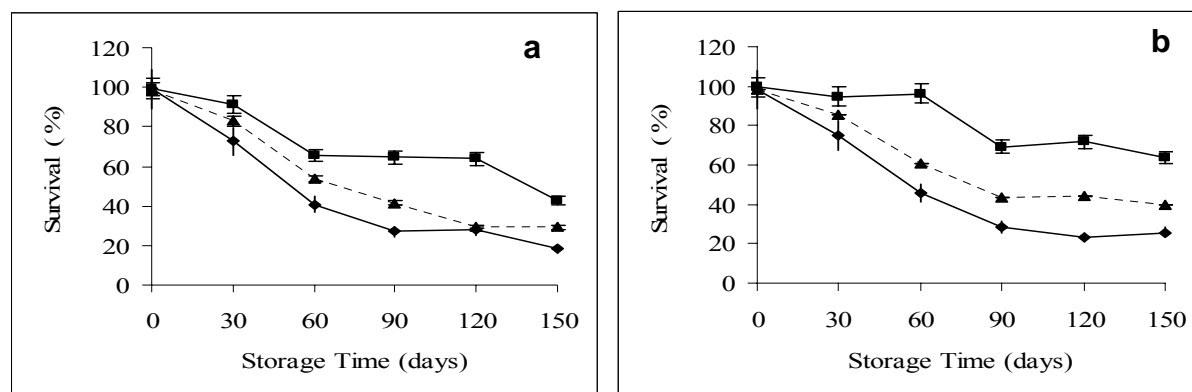
| Strains   | Vacuum-sealed aluminium foil |                        |                        |   |  |          |                      |
|---|------------------------------|------------------------|------------------------|---|--|----------|----------------------|
|   | Moisture content (%)         |                        |                        | Initial concentration of dried cells<br>Cfu/g | Survival (%) of dried samples after 120 days storage |          |                      |
|   | Control                      | Sorbitol               | Monosodium glutamate   |   | Control  | Sorbitol | Monosodium glutamate |
| <i>Lactobacillus ssp. paracasei</i><br>LMG9192 <sup>T</sup> | 3.6 ± 0.6 <sup>d</sup>       | 3.4 ± 0.4 <sup>b</sup> | 3.5 ± 0.3 <sup>c</sup> | 7.4 × 10 <sup>11</sup>                        | 20   | 47       | 31                   |
| <i>Lactobacillus plantarum</i><br>CWBI-B1419                | 3.2 ± 0.5 <sup>d</sup>       | 3.1 ± 0.3 <sup>b</sup> | 3.4 ± 0.4 <sup>c</sup> | 8.3 × 10 <sup>11</sup>                        | 23   | 57       | 36                   |

Values not sharing the same superscript letter vertical number are significantly different,  $P < 0.05$  (Turkey HSD test,  $n=4$ )

<sup>a</sup>Percentage compared those obtained after freeze-drying. Initially, freeze-dried sample with a water content of 3.6 g H<sub>2</sub>O/100 g dry weight contained 7.4 × 10<sup>11</sup> and 8.3 × 10<sup>11</sup> *Lactobacillus ssp. paracasei* LMG9192<sup>T</sup> and *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419.

<sup>b</sup> Percentage obtained with sorbitol, <sup>c</sup> monosodium glutamate,

<sup>d</sup> Percentage with control strain. (S): with sorbitol, (msg): monosodium glutamate; C: control (without cryoprotectant)



**Figure 28.** Survival of freeze-dried lactobacilli during 120 days at room temperature in vacuum-sealed aluminium foil. Values are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD,  $n=4$ ). (a) *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG 9192<sup>T</sup>, (b) *L. plantarum* CWBI-B1419 and (c) control (—◆—), sorbitol (—■—) and monosodium glutamate (—▲—).

At the same period, survival of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 with monosodium glutamate decrease again, after 120 days at 20°C in the same conditions, the viable population was about  $8.3 \times 10^{11}$  or  $3.57 \times 10^9$  cfu/g with a survival of 43.7% , respectively. In addition, viability was significantly higher for freeze-dried strain in vacuum-sealed with sorbitol,  $a_w=0.11$  ( $P<0.05$ ). At the end of freeze-drying, the water content of freeze-dried sample was  $3.6 \pm 0.6$  g H<sub>2</sub>O/100 g DW with  $a_w$   $0.09 \pm 0.01$ . After the 120-day storage period, the water content for all the samples stored at 20°C was not change significantly (approximately 0.6-fold) according to the package ( $P<0.05$ ). As expected, water content for samples stored under vacuum did not change significantly during storage with sorbitol or monosodium glutamate, respectively (**tab. 9**).



**Table 9.** Dry cell weight of freeze-dried cells, conserved at 20°C and safe from oxygen and moisture. Water activity of freeze-dried cells, conserved at 20°C and safe from oxygen and moisture.

| Strains               | Vacuum-sealed aluminium foil  |                         |                  |                                    |                         |                  |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------|
|                       | Dry cell weight ( $\pm 1\%$ ) |                         |                  | Water activity $aw$ ( $\pm 0.01$ ) |                         |                  |
|                       | Sorbitol                      | Monosodium<br>glutamate | Control          | Sorbitol                           | Monosodium<br>glutamate | Control          |
| LMG 9192 <sup>T</sup> | 98.1 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>  | 98.1 $\pm$ 0.90         | 97.98 $\pm$ 0.98 | 0.10 $\pm$ 0.01                    | 0.12 $\pm$ 0.01         | 0.18 $\pm$ 0.009 |
| CWBI-B1419            | 98.6 $\pm$ 0.98               | 97.2 $\pm$ 0.93         | 97.56 $\pm$ 0.83 | 0.11 $\pm$ 0.009                   | 0.11 $\pm$ 0.007        | 0.11 $\pm$ 0.001 |

<sup>a</sup> The means correspond to four repetitions. *s*: with sorbitol; *msg*: monosodium glutamate; *c*: control (without cryoprotectant)

<sup>a</sup> Initial value of survival immediately after freeze-drying.

<sup>b</sup> Value of cell survival obtained after 120 days

#### III-2.3.4. Relationship between the resistance, freeze-dried *L. plantarum* CWBI-B1419 storage and its membrane fatty acid composition.

The fatty acid composition of *L. plantarum* CWBI-B1419 and the ability of the cells to restore their acidification activity were closely related. The importance of the ratio rate between saturated fatty acids and unsaturated fatty acids results on resistance to freezing and better long-term storage of freeze-dried bacteria [36]. This was observed in all the operating conditions used during the fermentation and freeze-dried storage. Addition of sorbitol or monosodium glutamate to the drying medium indicates a significant change in the survival rate during storage as the confidence level ( $P < .05$ ). Furthermore, the effects were synergistic, except in the case of the existence of interactions [37]. A better resistance to freeze-dried storage was achieved by adding sorbitol and more monosodium glutamate in resuspended medium that led to higher U/S ratios. The positive effect of sorbitol was detected regardless of the fermentation pH and whether or not glycerol was added. Adding sorbitol increased the permeability for water of the membrane, thus favoring transport across the membrane [17]. The ability of monosodium glutamate to protect microorganisms during cryopreservation and freeze-drying has previously been described [38,39]. The majority of *Lactobacillus* sp. tested and freeze-dried with monosodium glutamate has shown an increased survival during storage. The stabilisation of their protein structure via reactions between the amino group of the protectant and the carboxyl groups of the microorganism's proteins and the ability to retain greater amounts of residual moisture have been pointed out by de Valdez et al. [40] as explanations that account for protection by monosodium glutamate during freeze-drying and subsequent storage. The cells were then more adapted to suffer the intracellular ice crystallization during freezing and the water mobility during storage [41]. Furthermore, the membrane lipids interact with protein interfaces, either by maintaining the protein structure and activity, or by inhibiting or activating protein functions, such as carrier proteins, which mediate solute transport [9]. For example, the activity of the membrane bound enzyme Na-K-ATPase was shown to be regulated by the lipid portion of the membrane [42]. When sorbitol was added, the effect on the rate of loss in acidification activity could be explained by an influence on some enzymatic activities that may modify the protein

composition and content of the cell. This is corroborated by the results of Rallu et al. [43] who reported, in the case of *L. lactis*, an increase in the concentration of cold-shock proteins when the cells suffered a stress. The appearance of unsaturated fatty acids can then be linked to disadvantageous growth conditions [10]. The positive effect of glycerol on the resistance to powders storage is independent of the U/S ratio, which was not affected by this factor [42]. This indicates that two different mechanisms accounted for the different rates of loss in acidification activity: first, a better cellular adaptation, related to the higher water permeability of the membrane, achieved with high U/S ratios; second a cryoprotective effect of glycerol that took place in addition to the previous effects. This interpretation corroborated the previous hypothesis that this molecule probably acted as an extracellular cryoprotective agent. The relationship between the fatty acid composition of *L. plantarum* and its ability to recover acidification activity led to important consequences for performing starter production [25]. From our results, the resistance to freeze-dried storage was improved by increasing the U/S ratio that was obtained by applying unfavorable experimental conditions for growth and by adding sorbitol in the resuspended medium [28]. This concept can be broadened by relating the membrane fatty acid composition to disadvantageous growth conditions, such as low temperature [22,44, 45] acid stress [43], ethanol stress [45], salt stress osmotic stress [32] or high age of the culture [3,46]. These results demonstrated that sorbitol has a strong protective effect upon the survival of *L. plantarum* CWBI-B1419 and *L. paracasei* subsp. *paracasei* LMG 9192<sup>T</sup>, during storage, even though no significant differences were observed in terms of viability of cells during freeze-drying in the presence or absence of sorbitol.

### III-2.4. Conclusions

The rate of loss in acidification activity during freeze-dried storage varied according to the conditions in which the cells were cultivated and cryoprotected. The resistance to drying and freeze-dried storage of lactic acid starters was defined by its ability to recover acidification activity after thawing. The resistance to freeze-dried powder during storage was improved by growing at unfavorable conditions and by adding additives (sorbitol and monosodium glutamate) in the resuspended medium and glycerol as protective agent. This improvement was related to an increase of the membrane ratio between unsaturated

and saturated fatty acids. The relationship between the U/S ratio and the addition of protectants was obvious. Cryoprotectants such as sorbitol and monosodium glutamate are almost equally effective in protecting lactic acid bacteria dried by freeze-drying. The mechanism of the action of sorbitol and monosodium glutamate appears related to water permeation as sorbitol equally protects cells under hypertonic stress and preserves the osmotic response of the bacteria.

### III-2.5. Acknowledgements

The authors thank all the technical's personals of Walloon Center for industrial Biology. Maryse Hardenne and Celine Pierrart are acknowledged for her very important contribution in the experiments. They also like to express our gratitude to the Republic of Ivory cost for its financial assistance to this work. The authors gratefully acknowledge the French community of Belgium.

### III-2.6. References

1. C. Beal, F. Mihoub, M. Marin, and G. Corrieu, "Demande de Brevet d'invention FR N°2829147. Procédé de préparation d'une composition lyophilisée contenant des bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors d'un stockage à température ambiante et composition obtenue," 2001.
2. E. Selmer-Olsen, S.-E. Birkeland, and T. Sørhaug, "Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 87, no. 3, pp. 429-437, 1999.
3. M. M. Brashears and S. E. Gilliland, "Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase," *Journal of dairy science*, vol. 78, no. 11, pp. 2326-2335, 1995.
4. R. Foschino, E. Fiori, and A. Galli, "Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions," *Journal of Dairy Research*, vol. 63, no. 2, pp. 295-303, 1996.
5. E. E. Tymczyszyn, A. Gomez-Zavaglia, and E. A. Disalvo, "Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 443, no. 1-2, pp. 66-73, 2005.
6. B. M. Corcoran, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, P. Dockery, and C. Stanton, "Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 7, pp. 5104-5107, 2006.
7. H. P. Castro, P. M. Teixeira, and R. Kirby, "Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying," *Biotechnology Letters*, vol. 18, no. 1, pp. 99-104, 1996.

8. H. Castro, P. P. M. Teixeira, and R. Kirby, "Storage of lyophilised cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 44, pp. 172-176, 1995.
9. C. P. Champagne, F. Mondou, Y. Raymond, and D. Roy, "Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria," *Food Research International*, vol. 29, no. 5-6, pp. 555-562, 1996.
10. A. Schoug, J. Fischer, H. J. Heipieper, J. Schnürer, and S. Håkansson, "Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 35, no. 3, pp. 175-181, 2008.
11. F. Fonseca, C. Béal, and G. Corrieu, "Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage," *Journal of Dairy Research*, vol. 67, no. 1, pp. 83-90, 2000.
12. F. Fonseca, C. Béal, F. Mihoub, M. Marin, and G. Corrieu, "State diagrams and sorption isotherms of bacterial suspensions and fermented medium," *Thermochimica Acta*, vol. 366, no. 2, pp. 167-182, 2001.
13. T. J. Anchordoguy, A. S. Rudolph, J. F. Carpenter, and J.H. Crowe, "Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing," *Cryobiology*, vol. 24, no. 4, pp. 324-331, 1987.
14. J. Sajbidor, "Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 17, no. 2, pp. 87-103, 1997.
15. R. K. Thunell, W. E. Sandine, and F. W. Bodyfelt, "Frozen starters from internal pH control grown cultures," *Journal of Dairy Science*, vol. 67, pp. 24-36, 1984.
16. E. P.W. Kets and J. A. M. de Bont, "Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 116, no. 3, pp. 251-256, 1994.
17. G. In't Veld, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings, "Effect of the unsaturation of phospholipid acyl chains on leucine transport of *Lactococcus lactis* and membrane permeability," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1108, no. 1, pp. 31-39, 1992.
18. M. Brennan, B. Wanismail, M. C. Johnson, and B. Ray, "Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*," *Journal of Food Protection*, vol. 49, pp. 47-53, 1986.
19. S. E. Gilliland and C. N. Rich, "Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH," *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 1187-1192, 1991.
20. M. Suutari and S. Laakso, "Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversions of oleic, vaccenic and dihydrosterulic acids," *Journal of General Microbiology*, vol. 138, no. 3, pp. 445-450, 1992.
21. E. Costa, J. Usall, N. Teixido, N. Garcia, and I. Vinas, "Effect of protective agents rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89, no. 5, pp. 793-800, 2000.
22. D. Simatos, G. Blond, M. LeMeste, and M. Morice, "Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation," in *Bactéries Lactiques*, H. de Roissart and F. M Luquet, Eds., vol. 2, pp. 555-573, 1994.

23. I. Goldberg and L. Eschar, "Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 33, no. 3, pp. 489-496, 1977.
24. P. A. Schmitt, G. Mathot, and C. Divies, "Fatty acid composition of the genus *Leuconostoc*," *Milchwissenschaft*, vol. 44, pp. 556-558, 1989.
25. L. J. Linders, W. F. Wolkers, F. A. Hoekstra, and K. Van't Riet, "Effect of added carbohydrates on membrane phase behaviour and survival of dried *Lactobacillus plantarum*," *Cryobiology*, vol. 35, no. 1, pp. 31-40, 1997.
26. F. Dellaglio, G. E. Felis, and S. Torriani, "The status of *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for opinion," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, no. 1, pp. 285-287, 2002.
27. J. C. DeMan, A. M. Rogosa, and M. E. Sharpe, "A medium for the cultivation of lactobacilli," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 23, pp. 130-135, 1960.
28. E. P. W. Kets, P. J. M. Teunissen, and J. A. M. de Bont, "Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 1, pp. 259-261, 1996.
29. P. M. Teixeira, H. P. Castro, and R. Kirby, "Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 22, no. 1, pp. 34-38, 1996.
30. A. A. Yao, I. Coulibaly, L. Georges, M.-L. Fauconnier, and P. Thonart, "Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 79, no. 6, pp. 1045-1052, 2008.
31. N. Rozes, S. Garbay, M. Denayrolles, and A. Lonvaud-Funel, "A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 17, no. 3, pp. 126-131, 1993.
32. L. J. M. Linders, E. P. W. Kets, J. A. M. de Bont, and K. van't Riet, "Combined effect of growth and drying conditions on the activity of dried *Lactobacillus plantarum*," *Biotechnology Progress*, vol. 14, pp. 537-539, 1998.
33. F. Dionisi, P.-A. Golay, M. Elli, and L. B. Fay, "Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acid quantification in lactic acid bacteria," *Lipids*, vol. 34, no. 10, pp. 1107-1115, 1999.
34. Y. Mille, L. Beney, and P. Gervais, "Compared tolerance to osmotic stress in various microorganisms: towards a survival prediction test," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 92, no. 4, pp. 479-484, 2005.
35. M. E. Guerzoni, R. Lanciotti, and P. S. Cocconcelli, "Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*," *Microbiology*, vol. 147, no. 8, pp. 2255-2264, 2001.
36. N. J. Russell and N. Fukunaga, "A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 75, no. 2-3, pp. 171-182, 1990.
37. H. W. Wisselink, R. A. Weusthuis, G. Eggink, J. Hugenholtz, and G. J. Grobbee, "Mannitol production by lactic acid bacteria: a review," *International Dairy Journal*, vol. 12, no. 2-3, pp. 151-161, 2002.

38. G. F. de Vald'ez, G. S. De Giori, A. P. De Ruiz Holgado, and G. Oliver, "Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 45, no. 1, pp. 302-304, 1983.
39. R. S. Porubcan and R. L. Sellars, "Stabilized dry cultures of lactic acid-producing bacteria," US Patent 3 897 307, July 1975.
40. G. F. de Vald'ez, G. S. De Giori, A. P. De Ruiz Holgado, and G. Oliver, "Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 49, no. 2, pp. 413-415, 1985.
41. Y. Wang, G. Corrieu, and C. B'éal, "Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758," *Journal of Dairy Science*, vol. 88, no. 1, pp. 21-29, 2005.
42. N. J. Russell, "Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. Overview," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, no. 1-2, pp. 27-34, 2002.
43. F. Rallu, A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin, "Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals," *Molecular Microbiology*, vol. 35, no. 3, pp. 517-528, 2000.
44. N. J. Russell, R. I. Evans, P. F. TerSeeg, J. Hellemons, A. Verheul, and T. Abee, "Membranes as a target for stress adaptation," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 28, no. 2, pp. 255-261, 1995.
45. A. Lonvaud-Funel and C. Desens, "Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. Incidences des conditions de culture," *Sciences des Aliments*, vol. 10, pp. 817-829, 1990.
46. Z. Drici-Cachon, J. F. Cavin, and C. Divi`es, "Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 22, no. 5, pp. 331-334, 1996.

### III-3. Conclusions : Effets des cryoprotecteurs sur la composition en acides gras cellulaires de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419

L'utilisation des agents additifs permet d'obtenir des taux de viabilité très élevés. Cette étude a montré que la survie des bactéries lactiques, telle que *L. plantarum* CWBI-B1419, *L. paracasei* ssp. *casei* LMG9192 soumises à une lyophilisation dépendent des agents de protection utilisés pendant la lyophilisation et au cours du stockage. Une sélection appropriée de ces facteurs est essentielle pour obtenir la viabilité maximale des cellules pour leur utilisation comme probiotiques. Ces résultats sont nécessaires pour le développement industriel de la formulation de la culture du starter. Les cryoprotecteurs tels que le sorbitol et le monosodium glutamate sont aussi efficaces dans la protection des bactéries lactiques lyophilisées. La concentration et la conservation des cellules bactériennes sont donc tributaires de l'utilisation d'additifs. Malgré toutes ces techniques et formulations, il faut constater une perte de viabilité engendrée par la présence de l'oxygène qui engendre des composés primaires (hydroperoxydes) et secondaires (composés aldéhydiques principalement). C'est dans l'optique de comprendre ces phénomènes et leur importance sur la survie cellulaire que le chapitre suivant est consacré à leur analyse.



## Chapitre IV

---

Suivi de la dégradation des acides gras polyinsaturés

## IV. Suivi de la dégradation des acides gras polyinsaturés

---

### IV.1. Contexte et objectifs

L'un des soucis majeurs de tout industriel travaillant dans la production de starters lactiques reste la perte de viabilité des cellules déshydratées. Stabiliser cette viabilité des starters lactiques au cours du stockage est et demeure un challenge quotidien. Parmi les techniques de séchage (atomisation, lyophilisation, fluidisation, etc), il est indispensable d'adopter celle qui garantit une stabilité des cellules ayant gardé leurs potentialités. Dans cette optique, la lyophilisation la plus couramment utilisée a retenu notre attention. Comme toute technique de séchage, la lyophilisation n'est pas sans effet sur la cellule elle-même. Au nombre des dégats engendrés par la lyophilisation sur la cellule déshydratée, l'oxydation des lipides membranaires revêt une importance primordiale, car elle est responsable de la perte de viabilité au cours du temps des cellules lyophilisées. L'un de nos objectifs serait de comprendre les différents mécanismes d'oxydation qui s'établissent au niveau de la cellule une fois lyophilisée. Dans cette étude, *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 a été utilisée en comparant sa résistance à celle de *Leuconostoc mesenteroides*. En relation avec le taux de viabilité au cours du stockage, l'activité d'eau, le taux de matière sèche ont été déterminés. Différentes températures de stockage ont été nécessaires afin d'établir une corrélation entre la mortalité cellulaire et l'oxydation des lipides membranaires chez *Lactobacillus plantarum* pendant nonante jours.

## IV.2. Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* KMrog and *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 related to their cellular fatty acids composition during storage

---

Publication 5 – *Appl. Biochem. Biotechnol.*

*Applied Biochemistry and Biotechnology*

Coulibaly, I <sup>(1\*)</sup>., Yao, A.A <sup>(2)</sup>., Fauconnier, M.L <sup>(3)</sup>., Lognay, G <sup>(4)</sup> and Ph. Thonart <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

<sup>(3)</sup>Analytical Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(4)</sup>Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

Les souches de bactéries de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B534 et de *Leuconostoc* ssp. *mesenteroides* (*L. mesenteroides*) Kenya MRog2 ont été produites en bioréacteur, concentrées, avec ou sans cryoprotecteurs. En général, le taux de viabilité n'a pas subi de changements significatifs après lyophilisation ( $p > 0,05$ ). Dans la plupart des cas, le taux de viabilité des cellules avec cryoprotecteurs était significativement plus élevé que celles sans additifs ( $p < 0,05$ ). Les acides gras cellulaires (AGC) des deux souches ont été analysés avant et après lyophilisation. Six AGC ont été identifiés, à savoir, l'acide palmitique (C<sub>16:0</sub>), l'acide palmitoléique (C<sub>16:1</sub>), l'acide stéarique (C<sub>18:0</sub>), l'acide oléique (C<sub>18:1</sub>), l'acide linoléique (C<sub>18:2</sub>) et l'acide linoléique (C<sub>18:3</sub>). Quatre d'entre eux, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:0</sub> et C<sub>18:1</sub>, représentent plus de 94% ou 93% des acides gras cellulaires chez *L. mesenteroides* et *L. plantarum*, respectivement, avec une faible proportion du C<sub>18:3</sub>, soit 5 et 6%, respectivement. Le C<sub>18:2</sub> a été détecté avec des pourcentages très faibles ( $\leq 1\%$ ) au niveau de chaque souche. L'acide palmitique (C<sub>16:0</sub>) est présenté en forte proportion au niveau des deux souches. La teneur en humidité et l'activité de l'eau ( $a_w$ ) a significativement augmenté au cours du stockage. On a observé que les ratios C<sub>16:1</sub>/C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>/C<sub>16:0</sub> et C<sub>18:1</sub>/C<sub>16:0</sub> pour les cellules lyophilisées de *L. mesenteroides* ou *L. plantarum*, avec ou sans cryoprotecteurs, n'ont pas beaucoup changé au cours de la période de stockage. Selon le mode d'emballage et des températures d'entreposage, les ratios C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub> et C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub> pour *L. mesenteroides* et *L. plantarum*, avec ou sans cryoprotecteurs ont diminué au cours de cette même période. Toutefois, un ratio plus élevé de C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub> et de C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub> pour *L. mesenteroides* et *L. plantarum* a été noté au niveau des poudres conservées à 4°C ou sous vide à l'abri de lumière et à 20°C en présence d'oxygène et de lumière.

**Mots-clés:** viabilité, stress oxydatif, stress thermique, lyophilisation, acides gras cellulaires, bactéries lactiques.

## Abstract

Lactic acid bacteria strains *Lactobacillus plantarum* CWBI-B534 and *Leuconostoc* ssp. *mesenteroides* (*L. mesenteroides*) Kenya MRog2 were produced in bioreactor, concentrated, with or without cryoprotectants. In general, viable population did not change significantly after freeze-drying ( $p > 0.05$ ). In most cases, viable population for cells added with cryoprotectants was significantly higher than those without ( $p < 0.05$ ). Cellular fatty acids (CFAs) from the two strains in this study were analyzed before and after freeze-drying. Six CFAs were identified, namely, palmitic ( $C_{16:0}$ ), palmitoleic ( $C_{16:1}$ ), stearic ( $C_{18:0}$ ), oleic ( $C_{18:1}$ ), linoleic ( $C_{18:2}$ ), and linolenic ( $C_{18:3}$ ) acids were identified. Four of them,  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:0}$  and  $C_{18:1}$ , make up more than 94% or 93% of the fatty acids in *L. mesenteroides* and *L. plantarum*, respectively, with another one, namely,  $C_{18:3}$ , making a smaller (on average 5-6%, respectively) contribution. The  $C_{18:2}$  contributed very small percentages (on average  $\leq 1\%$ ) to the total in each strain.  $C_{16:0}$  had the highest proportion at most points relative to other fatty acids. Moisture content and water activity ( $a_w$ ) increased significantly during the storage period. It was observed that  $C_{16:1}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}/C_{16:0}$  and  $C_{18:1}/C_{16:0}$  ratios for freeze-dried *L. mesenteroides* or *L. plantarum*, with or without cryoprotectants, did not change significantly during the storage period. According to the packaging mode and storage temperatures,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios for freeze-dried *L. mesenteroides* and *L. plantarum* with or without cryoprotectants decreased as the storage time increased. However, a higher  $C_{18:2}/C_{16:0}$  or  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratio for *L. mesenteroides* and *L. plantarum* was noted in the freeze-dried powder held at 4°C or under vacuum and in dark at 20°C or in the presence of oxygen and light.

**Keywords:** viability, oxidative stress, heat stress, freeze-drying, cellular fatty acids, lactic acid bacteria.

## IV-2.1. Introduction

The introduction of appropriate starter culture techniques may constitute one major step towards improved safety, quality and security of traditional small-scale fermentation in Africa (Holzapfel, 1997). The industrial use of lactic starter cultures for the food industry depends on the concentration and preservation technologies employed, which are required to guaranty long-term delivery of stable cultures in term of viability and functional activity (Carvalho *et al.*, 2003). Freeze-drying has commonly been used for this purpose; nevertheless freeze-dried cells are likely to lose their viability during storage (Fonseca *et al.*, 2000 ; Béal *et al.*, 1994 ; Champagne *et al.*, 1991). Lipid oxidation of membrane fatty acids was deemed responsible for cell death during storage (Teixeira *et al.*, 1996). This is supported by indirect evidence presented in previous reports. For example, chemical injury in the form of free radical damage has been suggested by most researchers as one of the major culprits in desiccation injury (Pereira *et al.*, 2003). Loss of water increases the ionic concentration (which can lead to the formation of reactive oxygen species [ROS]), and in the dry state, bio-molecules become more susceptible to the attack of oxygen. These species can damage proteins, modify bases and sugars in deoxyribonucleic acid (DNA) and cause lipid peroxidation (Pereira *et al.*, 2003 ; Hansen *et al.*, 2006). It is reported that the presence of antioxidants increased the survival rate of dried bacteria during storage (Teixeira *et al.*, 1996, 1995). Dimmick and Heckly (1961) found a strong similarity between the loss of viability and the increase in free-radical concentration during storage of freeze-dried *Serratia marcescens*. Marshall *et al.* (1974) supported the hypothesis that reactions between carbonyl compounds and cellular components are a major cause of mortality during storage of dried micro-organisms. However, to date no papers have been published identifying which bacterial cellular fatty acids are in fact oxidized or degraded during storage. In living organisms lipids, particularly polyunsaturated fatty acids (PUFAs) components of cell membranes, are described as being extremely subject to environmental stress (Prior, 1971 ; Girotti *et al.*, 1984). Stresses such as decreases in  $a_w$  (Halverson *et al.*, 2000) or increases in temperature (Théberge *et al.*, 1996) are known to affect the fatty acid composition of bacterial. A number of factors, such as temperature, atmosphere, exposure to light and moisture influence the viability of freeze-dried cultures (Andersen *et al.*, 1999). It is well-established

that cryoprotectants are almost indispensable when freezing and drying micro-organisms, but the contribution of these compounds to stability of dried-microorganisms during storage is discussed (Hamoudi *et al.*, 2007). The disadvantages of dried cultures undermine their application, but advantages can outweigh disadvantages if the inactivation during storage can be more clearly understood and consequently reduced. Therefore, the purpose of this work was to study the influence of oxygen, humidity and temperature on survival or cellular fatty acids of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*, with or without cryoprotectants, during storage and, if possible, to show the interrelation between viability and polyunsaturated fatty acids degradation. We used whole-cell fatty acid methyl ester (FAME) analysis to examine the effect of storage conditions on fatty acid composition, as this approach reflects the fatty acid composition of phospholipids (Cronan *et al.*, 1987 ; Suzuki *et al.*, 1993) and lipopolysaccharides (Kieft *et al.*, 1994).

## **IV-2.2. Materials and methods**

### **IV-2.2.1. Micro-organisms and cultivation**

The lactic acid bacteria *L. mesenteroides ssp. mesenteroides* Kenya MRog2, isolated and identified from cassava fermentation for gari production (Kostinek *et al.*, 2005) was provided by the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology (Karlsruhe, Germany). The *Lactobacillus plantarum* CWBI-B534 was isolated from poultry farms in vicinity of Dakar (Senegal, West Africa). MRS broths inoculated with each strain were incubated at 30°C for 18h. The supernatants obtained after centrifugation (Sorvall RC2-B, Sorvall, USA) at 2500 x g for 20 min, were decanted. The cell pellets obtained were resuspended in 5 ml (50% v/v) glycerol and frozen at -80°C.

### **IV-2.2.2. Productions**

The strains were grown in 500 L bioreactor containing MRS medium for 18h and then concentrated 20 times by centrifugation. After centrifugation cryoprotectants (2% (w/w) glycerol and 5% (w/w) maltodextrine)) were added to the pellets (PC). Cell suspensions without additifs were used as control (P). Cells were freeze-dried in a Low

freeze-drier (Leybold, Belgium) with a standard programme by increasing the temperature gradually from -45°C to 25°C at 0.9 mbar pressure (30 h) followed by 15h at 0.15 mbar. All fermentations were done in duplicate and average values reported.

#### IV-2.2.3. Storage conditions

Freeze-dried samples were stored during 90 days, in portion-size ( $2 \pm 0.5$  g in each portion) at 20°C (accelerated stability test, 30% RH) and at 4°C (stability at refrigerated temperature, 70% RH). At each storage temperature, samples were stored, in open 20 ml white glass tubes and in aluminium foil packets which were vacuum-sealed. Samples were withdrawn for analysis each 30 days and kept at -20°C (48-72h) before analysis.

#### IV-2.2.4. Dry cell weight and water content determinations

The dry cell weight of 1g of powder was determined at the end of freeze-drying. The water content ( $100 \text{ g dry weight}^{-1}$ ) of the freeze-dried samples during storage at 20 and 4°C with aeration was determined each 15 days. The samples were dried in a convection oven until constant weight and results are mean of four determinations.

#### IV-2.2.5. Water activity measurements

The water activity ( $a_w$ ) of the freeze-dried samples was measured at 25°C using a water activity meter Novasina (Novasina, Pfäffikon, Switzerland). Standard salt solutions (Novasina) of known water activity were used for calibration of the sensor at the measuring temperature. Readings were taken until four sequential readings gave the same results. Results obtained were the average of four determinations for each sample.

#### IV-2.2.6. Survival rate

Percentage survival of the strains after freeze-drying process was expressed as follows:

$$\text{Survival (\%)} = \frac{C_2 \times P_2}{C_1 \times P_1} \times 100$$



Where  $C_1$  and  $C_2$  are the CFU/g of the suspension before and after freeze-drying and  $P_1$  and  $P_2$  are amount of matter obtained before and after freeze-drying. Percentage survival after 90- day storage was calculated as  $100 \times N/N_0$ , where  $N$  is the CFU/g of the freeze-dried sample at a given time and  $N_0$  is the CFU/g of the sample at the end of freeze-drying.

#### **IV-2.2.7. Analysis of cellular fatty acids**

Cells wall fractions were obtained as described previously by [Ndoye et al., 2006](#). The lipids were extracted overnight from cell wall fractions (2.5 ml) and dried cells (1 g), with ethanol-ether (3:1, v/v) mixture according to an adaptation of the method of [Ito et al., \(1969\)](#). Ethanol ether extracts were pooled, filtrated, and then evaporated and concentrated under reduced pression at 35°C. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from the concentrate with 14% (w/w) solution of boron trifluoride in methanol as reagent (Sigma, St Louis, Missouri, USA). After heating at 70°C in a water bath for 90 min, 0.5 ml of saturated Nacl, 0.2 ml of sulphuric acid (10%) and 0.5 ml of hexane were added. The methylated fatty acids were extracted from the upper phase after decanting by means of a Pasteur-pipette. Gas chromatographic analysis of the methyl esters was carried out on a HP 6890 (Hewlett Packard) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector at 250°C. A capillary column (30 m x 0.25 mm (i.d), film thickness 0.25 µm) was used. Helium was used as carrier gas (2.4 ml/min) and the injection volume was 1 µl. Injection was done at 250°C in splitless mode for 1 min. The oven temperature was held at 50°C for 1 min, increased by 30°C/min to 120°C, and then from 120°C to 240°C at 4°C/min with a final hold of 10 min at 240°C. Fatty acids methyl esters were identified by comparing their retention times with standards mixtures FAME MIX 47885U (Supelco, Bellefonte, USA).

The relative fatty acid content was estimated as a percentage of the total peak area using a DP 700 integrator (Spectra physics). The relative content (%) of each fatty acid was normalized by expressing it as a ratio of the relative content (%) of palmitic ( $C_{16:0}$ ) acid for two reasons: [1]  $C_{16:0}$  had the highest proportion at most points relative to other fatty acids, [2]  $C_{16:0}$  did not change significantly during storage ( $p > 0.05$ ) (data not shown).

#### IV-2.2.8. Statistical analysis

Productions in bioreactor were done in duplicate. The mean values and the standard deviation were obtained with four determinations. These data were then compared by Turkey's honestly significant difference (*Statistica 7.1, StatSoft Inc., 2005*). The level of significance was determined at  $p < 0.05$ . (CFU counts were transformed to their base 10 logarithms).

#### IV-2.3. Results and discussion

##### IV.2.3.1. Survival of lactic acid bacteria after freeze-drying

Lactic acid bacteria *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* were produced in bioreactor; the cells were harvested, added or not with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol) and freeze-dried. **Tab. 10** shows viable counts during the process and survival after freeze-drying.

**Table 10.** Viability of *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* before and after freeze-drying

| Population (log CFU/g)    | Treatment <sup>a</sup> | <i>L. mesenteroides</i>   | <i>Lb. plantarum</i>      |
|---------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Before freeze-drying      | P                      | 11.8 ± 0.03 <sup>a*</sup> | 11.8 ± 0.05 <sup>ab</sup> |
|                           | PC                     | 11.7 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 11.7 ± 0.05 <sup>a</sup>  |
| After freeze-drying       | P                      | 11.9 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 11.9 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
|                           | PC                     | 11.6 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 11.6 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| Survival (%) <sup>b</sup> | P                      | 13 ± 2                    | 94 ± 4                    |
|                           | PC                     | 18 ± 1                    | 97 ± 3                    |

<sup>a</sup> P cells without cryoprotectants; PC cells with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol)

<sup>b</sup> Values represent percentage survival of the strain after freeze-drying process

\* Cell count values in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are means ± standard deviation (SD) ( $n = 4$ )

A viable population of  $11.93 \pm 0.02$  log<sub>10</sub> CFU/g or  $11.65 \pm 0.04$  log<sub>10</sub> CFU/g and  $11.88 \pm 0.03$  log<sub>10</sub> CFU/g or  $11.65 \pm 0.04$  log<sub>10</sub> CFU/g for *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum*, added or not with cryoprotectants, were obtained freeze-drying process. Different survival rates were obtained immediately following freeze-drying. *Lb. plantarum* successfully survived or recovered more than 90% of population values, whereas *L.*

*mesenteroides* behaved with low biomass yield (<11%). The effect of the additives is not significant.

#### IV-2.3.2. Influence of water activity on survival rate.

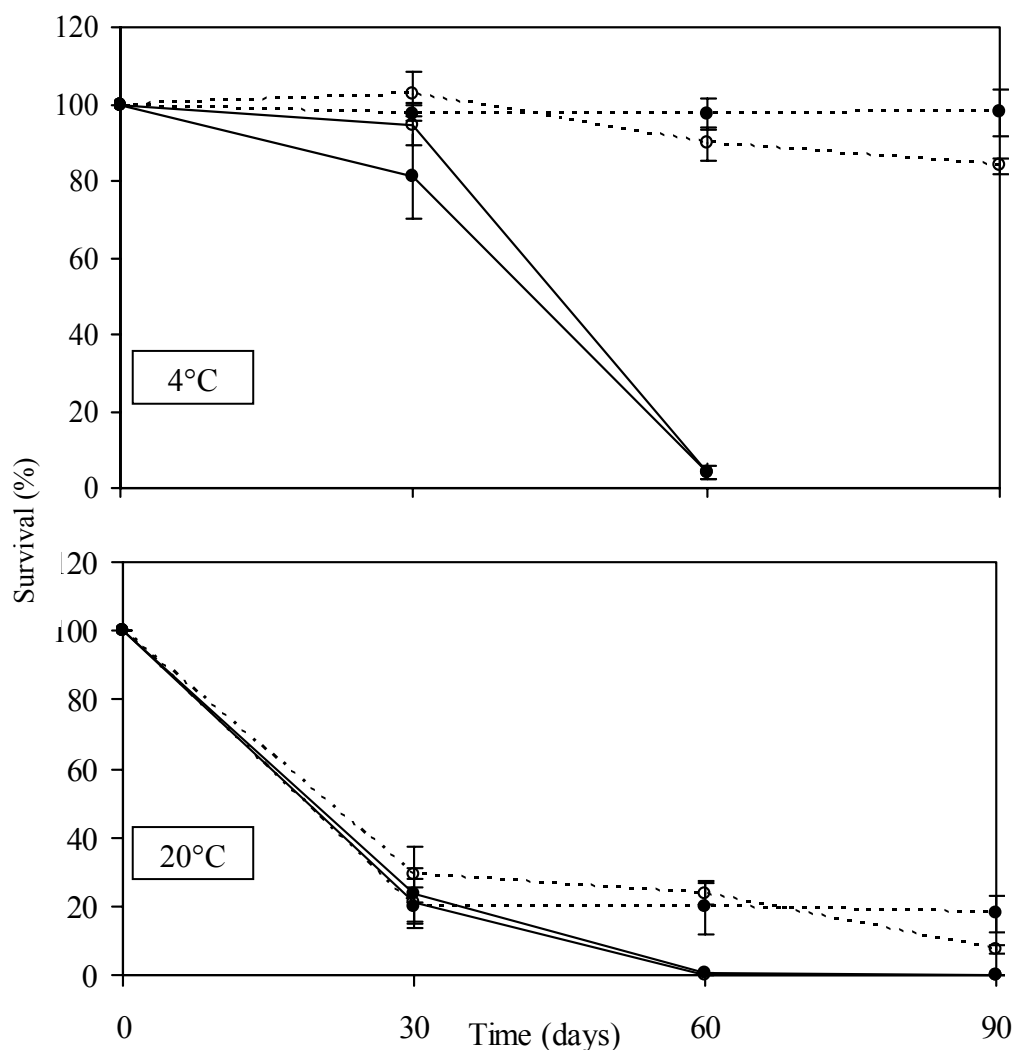
Moisture content and water activity ( $a_w$ ) were determined each 15 days during storage at 4°C (70% RH) and 20°C (30% RH) in opened white glass tube containing 2±0.2g of dried powder. Relationships between  $a_w$  and moisture content (100 g dry weight)<sup>-1</sup> for freeze-dried strains during storage at 4 or 20°C was established for storage in opened white glass tube. The water contents were stable in vacuum-sealed aluminium foil at the same temperature. Moisture content and  $a_w$  increased significantly during the storage period. At the end of freeze-drying, moisture content for freeze-dried *L. mesenteroides* or *Lb. plantarum* P and PC was 3.6 ± 0.7 % and 4.8 ± 0.5% or 3.1 ± 0.3 % and 4.7±0.7% with  $a_w$  0.1 ± 0.01 and 0.1 ± 0.01 or  $a_w$  0.1 ± 0.01 and 0.1 ± 0.01, respectively. After 90-day of storage, water content for freeze-dried *L. mesenteroides* or *L. plantarum* P and PC, increased to 20.2 ± 0.4% and 21.6 ± 0.3% or 19.4 ± 0.8% and 21.8 ± 0.2% at 4°C, to 11.4 ± 0.7% and 16.9 ± 1.1% or 12.1 ± 1.1 % and 15.4 ± 0.4 % at 20°C respectively (**tab. 12, 13, 14 & 15**). During the same time,  $a_w$  increases to 0.6±0.01 and 0.6 ± 0.01 or 0.6 ± 0.01 and 0.6 ± 0.01 at 4°C, to 0.4 ± 0.01 and 0.4 ± 0.01 or 0.4 ± 0.01 and 0.4 ± 0.01 at 20°C, respectively.

The rate of dry matter in a lyophilized powder, which is nearly 94% and a water activity less than 0.2, would be necessary to ensure a level of storage stability at room temperature. These conditions are consistent with research undertaken by French Patent FR No. 2829147, [Beal et al. \(2001\)](#), which stipulates that in a dried product the following parameters: very low water activity (<0.2), rate of dry matter around 96% and a  $T_g = T_s - 25^\circ\text{C} > 20^\circ\text{C}$  ( $T_s$ =surface temperature of the product), contribute to the stability of the product for an extended period during the storage.

#### IV-2.3.3. Survival of *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* during storage

These authors ([Karel, 1975](#) ; [Ishibashi et al. 1985](#)) showed that stability of dried lactic acid bacteria upon storage was better in the 0.1-0.2  $a_w$  zone. In this study, the water

activity of strains after freeze drying have some  $a_w$  less than 0.170 at 25°C (data are not shown). This result shows that the lactic acid bacteria are well lyophilized.



**Figure 29.** Survival of freeze-dried *L. mesenteroides* during storage at 4°C or 20°C. Symbols: o freeze-dried strain without cryoprotectants (P), • freeze-dried strain with cryoprotectants (5% maltodextrine + 2% glycerol) (PC). Dotted lines for storage in vacuum-sealed aluminium foil, continuous lines for storage in opened white glass tube. Values represent means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

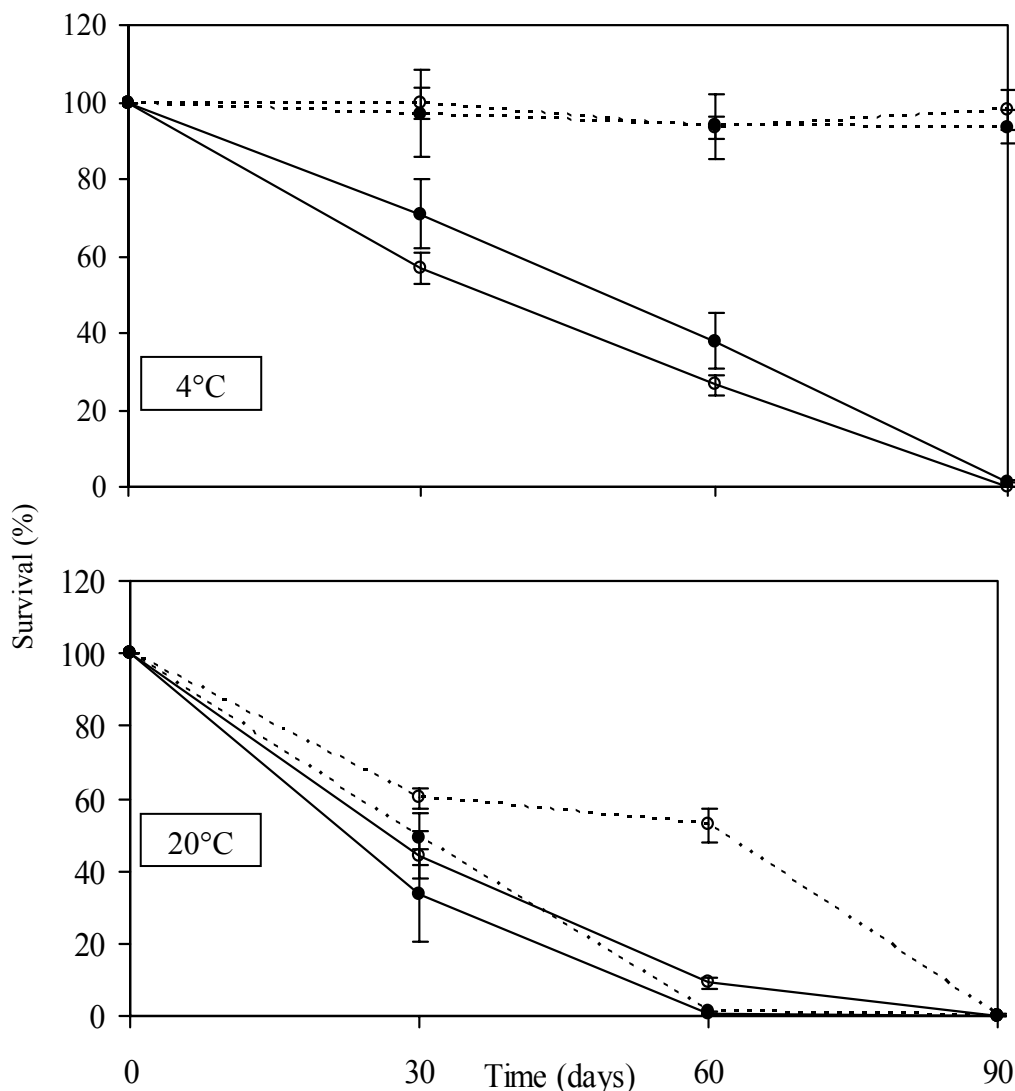
**Fig. 29 & 30** show the survival of freeze-dried *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* during the storage period, respectively. In vacuum sealed aluminium foil and opened white glass tube at 4°C and 20°C. **Tab. 13** shows a summary of the survival of test organisms and water content of the freeze-dried powder under different packaging and storage temperature after 90-day storage. It was found that, regardless of packaging mode and storage temperatures, the viable cells of *L. mesenteroides* (**fig. 29**) and *Lb. plantarum* (**fig.**

30), added or not with cryoprotectants, decreased as the storage time increased. However, a higher viable population of *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* was noted in the freeze-dried powder held at 4°C or under vacuum and in dark than at 20°C or in presence of air and light. For example, the viable population of *Lb. plantarum* with cryoprotectants held in vacuum-sealed aluminium foil or opened white glass tube was reduced from an initial population of 11.65 to 11.72 logCFU/g or 9.88 logCFU/g with no population reduction or a reduction of only 1.77 logCFU/g and a survival percentage of 93.5% or 1.4% after 90-day storage at 4°C (**fig. 30, tab. 13**) compared to a larger population reduction of 2.64 logCFU/g or 4.68 logCFU/g and a less survival of 0.19% or less than 0.1% at 20°C, respectively. As shown in **fig 29, 30** and **tab. 13**, it was noted that for either *L. mesenteroides* or *Lb. plantarum* there was no significant effect of cryoprotectants on survival after 90-day storage.

The powder thus produced from *Lactobacillus plantarum* and *L. mesentoides* meet all these conditions and yet conservation is not optimal during storage except that the survival rate of *Lb. plantarum* is slightly more than high *L. mesentorides*. This difference between the two freeze-dried bacteria during storage finds its origin in the structure of the cells. *L. mesentoroides* consists of small size of cells, factor which exposes the most stress during the process of lyophilization. Apart from this, freeze-dried powders meet these criteria mentioned above and yet the survival rate is not high during storage. According to the work of [Fonseca et al, \(2000\)](#) a number of factors can cause this phenomenon of cell death. In other predominant factors to this loss of viability, one could cite the probable taken into pure water powders contained in the white glass tubes and especially before and the effect of temperature and light, for hermetically sealed bags (under vacuum) containing 2 to 3 grams of powder loss of viability was also noted that at this level find its origin by the combined effect of temperature and storage of a phenomenon of self initiated oxidation at the cellular constituents as fatty acids ([Chatterjee et al.,2000](#)). This oxidation finds its source by oxygen effect, lyophilized powders that create free radicals. These free radicals are toxic substances that lead to rupture the membrane and thus cellular cell death in the future.

These primarily mitigate the adverse events and are especially responsible for significant losses during storage that biologists increasingly need antioxidant to stop or

reduce the oxidation products at the level of freeze-dried powders. It is safe to say that based on our experiences and those of others; the loss of viability during storage is subject to a phenomenon of autooxidation, which should optimize the survival rate especially during storage at room temperature.



**Figure 30.** Survival of freeze-dried *Lb. plantarum* during storage at 4°C or 20°C. Symbols: o freeze-dried strain without cryoprotectants (P), • freeze-dried strain with cryoprotectants (5% maltodextrine + 2% glycerol) (PC). Dotted lines for storage in vacuum-sealed aluminium foil, continuous lines for storage in opened white glass tube. Values represent means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

The important and intrinsic parameters (dry cell matter, water activity) merit attention while optimizing for the increase and prolonged time storage of lyophilized powders of lactic acid bacteria. For this reason and many others, some authors argue that

the cell membrane is the seat of the cell survival in the sense that it contains phospholipids that are probably modified by the oxidation, [Castro et al., 1977](#).

#### IV-2.3.4. Cellular fatty acid relative contents after freeze-drying and changes in fatty acid composition due to storage

Cellular fatty acids (CFAs) from the two strains in this study were analysed before and after freeze-drying. The mean relative contents of CFAs from *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* are presented in **tab. 11** & **12**, respectively. Six CFAs, namely palmitic (C<sub>16:0</sub>), palmitoleic (C<sub>16:1</sub>), stearic (C<sub>18:0</sub>), oleic (C<sub>18:1</sub>), linoleic (C<sub>18:2</sub>) and linolenic (C<sub>18:3</sub>) acids were identified. Four of the CFAs, namely C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:0</sub>, and C<sub>18:1</sub> make up more than 94% or 93% of the fatty acids in *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* respectively, with another one, namely, C<sub>18:3</sub> making a smaller (on average 5-6%, respectively) contribution. The C<sub>18:2</sub> represent very small percentages (on mean  $\leq 1\%$ ) to the total in each strain. C<sub>16:0</sub> had the highest proportion. There was no significant modification in CFAs of *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* in response to dehydration ( $p > 0.05$ ). Moreover, the addition of glycerol and maltodextrine before freeze-drying did not modify significantly the CFAs of the two strains. Cellular fatty acids freeze-dried *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* packaged in vacuum-sealed aluminium foil or opened white glass tube and held at 20 or 4°C during 90 days were analysed. The palmitic acid (C<sub>16:0</sub>) relative content remained high and changed only little during storage. Therefore, the content of the others fatty acids was expressed as a ratio between each fatty acid and the C<sub>16:0</sub>. It was observed that C<sub>16:1</sub>/C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>/C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:1</sub>/C<sub>16:0</sub> ratios for freeze-dried *L. mesenteroides* or *Lb. plantarum*, added or not with cryoprotectants did not change significantly during the storage period.

**Fig. 31** & **32** show linoleic/ palmitic (C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub>) or linolenic/palmitic (C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub>) ratios for freeze-dried *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* during the storage period, respectively. **Tab. 14** & **15** show a summary of linoleic/palmitic (C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub>) and linolenic/palmitic (C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub>) ratios for freeze-dried organisms under different packaging and storage temperature after 90-day storage, respectively. It was found that regardless of packaging mode and storage temperatures, C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub> ratios for freeze-dried *L. mesenteroides* (**fig. 31**) and *Lb. plantarum* (**fig. 32**) added or not with cryoprotectants decreased in function of time. However, a higher C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub> or C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub> ratio for *L.*

*mesenteroides* and *Lb. plantarum* was noted in the freeze-dried powder held at 4°C or under vacuum and in dark than at 20°C or in presence of air and light (**Tab. 13**).

**Table 11.** Cellular fatty acid composition of *L. mesenteroides* before and after freeze-drying

| Treatment <sup>a</sup> |    | Relative content (%) <sup>b</sup> |                        |                        |                         |                        |                        |
|------------------------|----|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|                        |    | C <sub>16:0</sub>                 | C <sub>16:1</sub>      | C <sub>18:0</sub>      | C <sub>18:1</sub>       | C <sub>18:2</sub>      | C <sub>18:3</sub>      |
| Before freeze-drying   | P  | 49.7 ± 0.7 <sup>ab*</sup>         | 7.4 ± 0.1 <sup>a</sup> | 8.5 ± 0.1 <sup>a</sup> | 28.9 ± 0.8 <sup>a</sup> | 1.0 ± 0.1 <sup>a</sup> | 4.5 ± 0.1 <sup>a</sup> |
|                        | PC | 50.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>          | 6.3 ± 0.7 <sup>a</sup> | 7.9 ± 0.1 <sup>a</sup> | 30.0 ± 0.9 <sup>a</sup> | 1.0 ± 0.2 <sup>a</sup> | 4.5 ± 0.3 <sup>a</sup> |
| After freeze-drying    | P  | 48.6 ± 1.3 <sup>a</sup>           | 7.9 ± 0.7 <sup>a</sup> | 8.7 ± 1.6 <sup>a</sup> | 29.3 ± 1.6 <sup>a</sup> | 1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> | 4.5 ± 0.2 <sup>a</sup> |
|                        | PC | 53.1 ± 1.1 <sup>b</sup>           | 6.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 7.7 ± 0.2 <sup>a</sup> | 26.9 ± 1.3 <sup>a</sup> | 0.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 4.7 ± 0.3 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> P cells without cryoprotectants; PC cells with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol)

<sup>b</sup> Values are means ± SD (n = 4) and represent proportions of total fatty acids (%)

The six main fatty acids are palmitic (C<sub>16:0</sub>), palmitoleic (C<sub>16:1</sub>), stearic (C<sub>18:0</sub>), oleic (C<sub>18:1</sub>), linoleic (C<sub>18:2</sub>), linolenic (C<sub>18:3</sub>)

\* Values in the same column with different letters are significantly different (p < 0.05).

For example, C<sub>18:2</sub>/C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:3</sub>/C<sub>16:0</sub> ratios were 0.01 and 0.11 for freeze-dried *Lb. plantarum* with cryoprotectants at the end of freeze-drying, respectively (**tab. 14 & 15**).

**Table 12.** Cellular fatty acid composition of *Lb. plantarum* before and after freeze-drying

| Treatment <sup>a</sup> |    | Relative content (%) <sup>b</sup> |                        |                        |                         |                        |                        |
|------------------------|----|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|                        |    | C <sub>16:0</sub>                 | C <sub>16:1</sub>      | C <sub>18:0</sub>      | C <sub>18:1</sub>       | C <sub>18:2</sub>      | C <sub>18:3</sub>      |
| Before freeze-drying   | P  | 55.0 ± 0.7 <sup>ab*</sup>         | 7.4 ± 0.1 <sup>a</sup> | 7.9 ± 0.6 <sup>a</sup> | 22.7 ± 0.8 <sup>a</sup> | 1.1 ± 0.2 <sup>a</sup> | 6.0 ± 0.9 <sup>a</sup> |
|                        | PC | 54.3 ± 0.9 <sup>ab</sup>          | 7.9 ± 1.0 <sup>a</sup> | 8.4 ± 0.4 <sup>a</sup> | 22.7 ± 0.5 <sup>a</sup> | 1.0 ± 0.1 <sup>a</sup> | 5.8 ± 0.7 <sup>a</sup> |
| After freeze-drying    | P  | 55.2 ± 1.3 <sup>a</sup>           | 6.2 ± 0.1 <sup>a</sup> | 8.1 ± 0.9 <sup>a</sup> | 23.9 ± 0.6 <sup>a</sup> | 0.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 5.8 ± 0.3 <sup>a</sup> |
|                        | PC | 53.6 ± 0.7 <sup>a</sup>           | 7.0 ± 1.2 <sup>a</sup> | 9.7 ± 0.3 <sup>a</sup> | 23.2 ± 0.1 <sup>a</sup> | 0.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 5.7 ± 0.2 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> P cells without cryoprotectants; PC cells with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol)

<sup>b</sup> Values are means ± SD (n = 4) and represent proportions of total fatty acids (%)

The six main fatty acids are palmitic (C<sub>16:0</sub>), palmitoleic (C<sub>16:1</sub>), stearic (C<sub>18:0</sub>), oleic (C<sub>18:1</sub>), linoleic (C<sub>18:2</sub>), linolenic (C<sub>18:3</sub>)

\* Values in the same column with the same letter are not significantly different (p > 0.05).



**Table 13.** Moisture content and survival of freeze-dried *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* after 90-day storage

| Storage          |                              | Treatment <sup>a</sup> | <i>L. mesenteroides</i> <sup>b</sup> |                        |                           | <i>Lb. plantarum</i> <sup>b</sup> |                        |                          |
|------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Temperature (°C) | Container                    |                        | Moisture content (%)                 | Population (log CFU/g) | Survival (%) <sup>c</sup> | Moisture content (%)              | Population (log CFU/g) | Survival (%)             |
| 4                | Vacuum-sealed aluminium foil | P                      | 3.6 ± 0.7 <sup>a*</sup>              | 11.9 ± 0.03            | 83.9 ± 1.9 <sup>a</sup>   | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>            | 11.9 ± 0.02            | 98.0 ± 5.2 <sup>a</sup>  |
|                  |                              | PC                     | 4.8 ± 0.5 <sup>a</sup>               | 12.0 ± 0.04            | 97.8 ± 5.9 <sup>b</sup>   | 4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>            | 11.7 ± 0.07            | 93.5 ± 4.3 <sup>a</sup>  |
|                  | Opened white glass tube      | P                      | 20.2 ± 0.4 <sup>b</sup>              | nd                     | nd                        | 19.4 ± 0.8 <sup>b</sup>           | 8.9 ± 0.03             | 0.1 ± 0.01 <sup>b</sup>  |
|                  |                              | PC                     | 21.6 ± 0.3 <sup>b</sup>              | nd                     | nd                        | 21.8 ± 0.2 <sup>c</sup>           | 9.9 ± 0.19             | 1.4 ± 0.6 <sup>b</sup>   |
| 20               | Vacuum-sealed aluminium foil | P                      | 3.6 ± 0.7 <sup>a</sup>               | 10.8 ± 0.08            | 7.2 ± 1.3 <sup>c</sup>    | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>            | 9.4 ± 0.02             | 0.29 ± 0.02 <sup>b</sup> |
|                  |                              | PC                     | 4.8 ± 0.5 <sup>a</sup>               | 11.2 ± 0.14            | 17.9 ± 5.2 <sup>d</sup>   | 4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>            | 9.0 ± 0.05             | 0.19 ± 0.04 <sup>b</sup> |
|                  | Opened white glass tube      | P                      | 13.4 ± 0.7 <sup>c</sup>              | 6.7 ± 0.03             | < 0.1 <sup>c</sup>        | 12.1 ± 1.1 <sup>d</sup>           | 7.0 ± 0.01             | < 0.1 <sup>b</sup>       |
|                  |                              | PC                     | 16.9 ± 1.1 <sup>d</sup>              | 6.6 ± 0.10             | < 0.1 <sup>c</sup>        | 15.4 ± 0.4 <sup>e</sup>           | 7.0 ± 0.02             | < 0.1 <sup>b</sup>       |

<sup>a</sup> P cells without cryoprotectants; PC cells with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol)

<sup>b</sup> Initially, freeze-dried *L. mesenteroides* or *L. plantarum* P and PC with a moisture content of 3.6 % and 4.8% or 3.1 % and 4.7% contained 11.9 log CFU/ml and 11.6 log CFU/ml or 11.9 log CFU/ml and 11.6 log CFU/ml, respectively.

<sup>d</sup> Values represent percentage in cell reduction compared with those obtained immediately after freeze-drying

\* Values in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

Values are means ± SD (n = 4)

nd: not determined

**Table 14.** Moisture content and  $C_{18:2}/C_{16:0}$  ratio for freeze-dried *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* after 90-day storage

| Temperature<br>(°C) | Storage                         |                        | <i>L. mesenteroides</i> <sup>c</sup> |                               | <i>Lb. plantarum</i> <sup>c</sup> |                         |                               |                 |
|---------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------|
|                     | Container                       | Treatment <sup>a</sup> | Moisture<br>content (%)              | Ratio <sup>b</sup>            | Survival<br>(%) <sup>d</sup>      | Moisture<br>content (%) | Ratio                         | Survival<br>(%) |
| 4                   | Vacuum-sealed<br>aluminium foil | P                      | 3.6 ± 0.7 <sup>a*</sup>              | 0.0213 ± 0.0027 <sup>a</sup>  | 86.4 ± 1.3                        | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 0.0119 ± 0.0001 <sup>a</sup>  | 83.9 ± 5.7      |
|                     |                                 | PC                     | 4.8 ± 0.5 <sup>a</sup>               | 0.0135 ± 0.0004 <sup>b</sup>  | 85.3 ± 0.8                        | 4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>  | 0.0122 ± 0.0001 <sup>a</sup>  | 122.0 ± 8.3     |
|                     | Opened white<br>glass tube      | P                      | 20.2 ± 0.4 <sup>b</sup>              | 0.0135 ± 0.0019 <sup>b</sup>  | 57.8 ± 1.8                        | 19.4 ± 0.8 <sup>b</sup> | 0.0081 ± 0.0005 <sup>b</sup>  | 56.9 ± 1.4      |
|                     |                                 | PC                     | 21.6 ± 0.3 <sup>b</sup>              | 0.0075 ± 0.0002 <sup>bc</sup> | 47.5 ± 0.9                        | 21.8 ± 0.2 <sup>c</sup> | 0.0081 ± 0.0008 <sup>b</sup>  | 81.0 ± 7.5      |
| 20                  | Vacuum-sealed<br>aluminium foil | P                      | 3.6 ± 0.7 <sup>a</sup>               | 0.0090 ± 0.0002 <sup>bc</sup> | 37.8 ± 2.2                        | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 0.0063 ± 0.0006 <sup>bc</sup> | 44.7 ± 2.4      |
|                     |                                 | PC                     | 4.8 ± 0.5 <sup>a</sup>               | 0.0054 ± 0.0001 <sup>c</sup>  | 34.4 ± 0.4                        | 4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>  | 0.0072 ± 0.0002 <sup>bc</sup> | 71.9 ± 3.3      |
|                     | Opened white<br>glass tube      | P                      | 13.4 ± 0.7 <sup>c</sup>              | 0.0059 ± 0.0018 <sup>c</sup>  | 23.9 ± 5.9                        | 12.1 ± 1.1 <sup>d</sup> | 0.0053 ± 0.0002 <sup>cd</sup> | 37.1 ± 0.7      |
|                     |                                 | PC                     | 16.9 ± 1.1 <sup>d</sup>              | 0.0043 ± 0.0003 <sup>c</sup>  | 27.0 ± 4.0                        | 15.4 ± 0.4 <sup>c</sup> | 0.0035 ± 0.0002 <sup>c</sup>  | 35.3 ± 3.4      |

<sup>a</sup> P cell without cryoprotectants; PC cell with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol)

<sup>b</sup> Values represent ratio between each fatty acid and the palmitic acid

<sup>c</sup> Initially, freeze-dried *L. mesenteroides* or *L. plantarum* P and PC with a moisture content of 3.6 % and 4.8% or 3.1 % and 4.7% contained 0.03 of  $C_{16:0}$  and 0.02 of  $C_{16:0}$  or 0.01 of  $C_{16:0}$  and 0.01 of  $C_{16:0}$ , respectively

<sup>d</sup> Values represent percentage compared to the initial ratio

\* Values in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

Values are means ± SD ( $n = 4$ ).

**Table 15.** Moisture content and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratio for freeze-dried *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* after 90-day storage

| Storage          |                              | Treatment <sup>a</sup> | <i>L. mesenteroides</i> <sup>c</sup> |                            |                  | <i>Lb. plantarum</i> <sup>c</sup> |                             |            |
|------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------|
| Temperature (°C) | Container                    |                        | Moisture content (%)                 | Ratio <sup>b</sup>         | (%) <sup>d</sup> | Moisture content (%)              | Ratio                       | (%)        |
| 4                | Vacuum-sealed aluminium foil | P                      | 3.6 ± 0.7 <sup>a*</sup>              | 0.084 ± 0.006 <sup>a</sup> | 88.1 ± 2.4       | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>            | 0.098 ± 0.006 <sup>a</sup>  | 92.9 ± 1.2 |
|                  |                              | PC                     | 4.8 ± 0.5 <sup>a</sup>               | 0.081 ± 0.002 <sup>b</sup> | 93.1 ± 2.6       | 4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>            | 0.100 ± 0.002 <sup>a</sup>  | 95.2 ± 6.9 |
|                  | Opened white glass tube      | P                      | 20.2 ± 0.4 <sup>b</sup>              | 0.026 ± 0.003 <sup>b</sup> | 27.3 ± 2.9       | 19.4 ± 0.8 <sup>b</sup>           | 0.047 ± 0.005 <sup>b</sup>  | 44.7 ± 3.2 |
|                  |                              | PC                     | 21.6 ± 0.3 <sup>b</sup>              | 0.039 ± 0.009 <sup>b</sup> | 44.4 ± 8.5       | 21.8 ± 0.2 <sup>c</sup>           | 0.050 ± 0.002 <sup>b</sup>  | 47.3 ± 0.2 |
| 20               | Vacuum-sealed aluminium foil | P                      | 3.6 ± 0.7 <sup>a</sup>               | 0.029 ± 0.004 <sup>a</sup> | 31.3 ± 3.5       | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>            | 0.036 ± 0.003 <sup>bc</sup> | 34.1 ± 1.7 |
|                  |                              | PC                     | 4.8 ± 0.5 <sup>a</sup>               | 0.039 ± 0.003 <sup>b</sup> | 44.2 ± 6.8       | 4.7 ± 0.7 <sup>a</sup>            | 0.035 ± 0.002 <sup>bc</sup> | 33.9 ± 5.1 |
|                  | Opened white glass tube      | P                      | 13.4 ± 0.7 <sup>c</sup>              | 0.020 ± 0.001 <sup>b</sup> | 21.7 ± 2.7       | 12.1 ± 1.1 <sup>d</sup>           | 0.027 ± 0.002 <sup>c</sup>  | 25.9 ± 0.7 |
|                  |                              | PC                     | 16.9 ± 1.1 <sup>d</sup>              | 0.018 ± 0.002 <sup>b</sup> | 20.3 ± 4.1       | 15.4 ± 0.4 <sup>c</sup>           | 0.023 ± 0.003 <sup>c</sup>  | 22.0 ± 2.7 |

<sup>a</sup> P cell without cryoprotectants; PC cell with cryoprotectants (5% maltodextrine, 2% glycerol)

<sup>b</sup> Values represent ratio between each fatty acid and the palmitic acid

<sup>c</sup> Initially, freeze-dried *L. mesenteroides* or *L. plantarum* P and PC with a moisture content of 3.6 % and 4.8% or 3.1 % and 4.7% contained 0.10 of  $C_{16:0}$  and 0.09 of  $C_{16:0}$  or 0.11 of  $C_{16:0}$  and 0.11 of  $C_{16:0}$  for P and PC, respectively

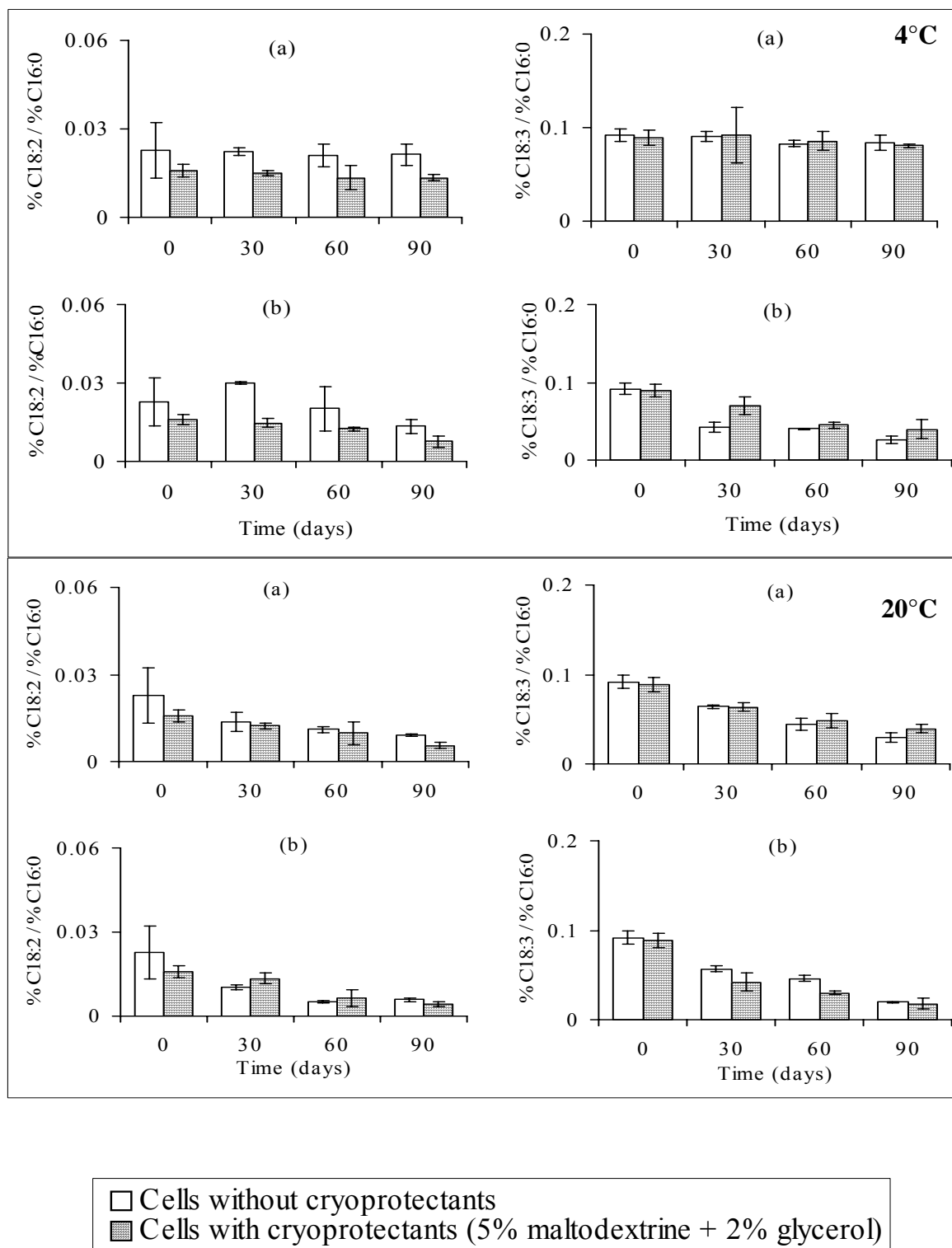
<sup>d</sup> Values represent percentage compared to the initial ratio

\* Values in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

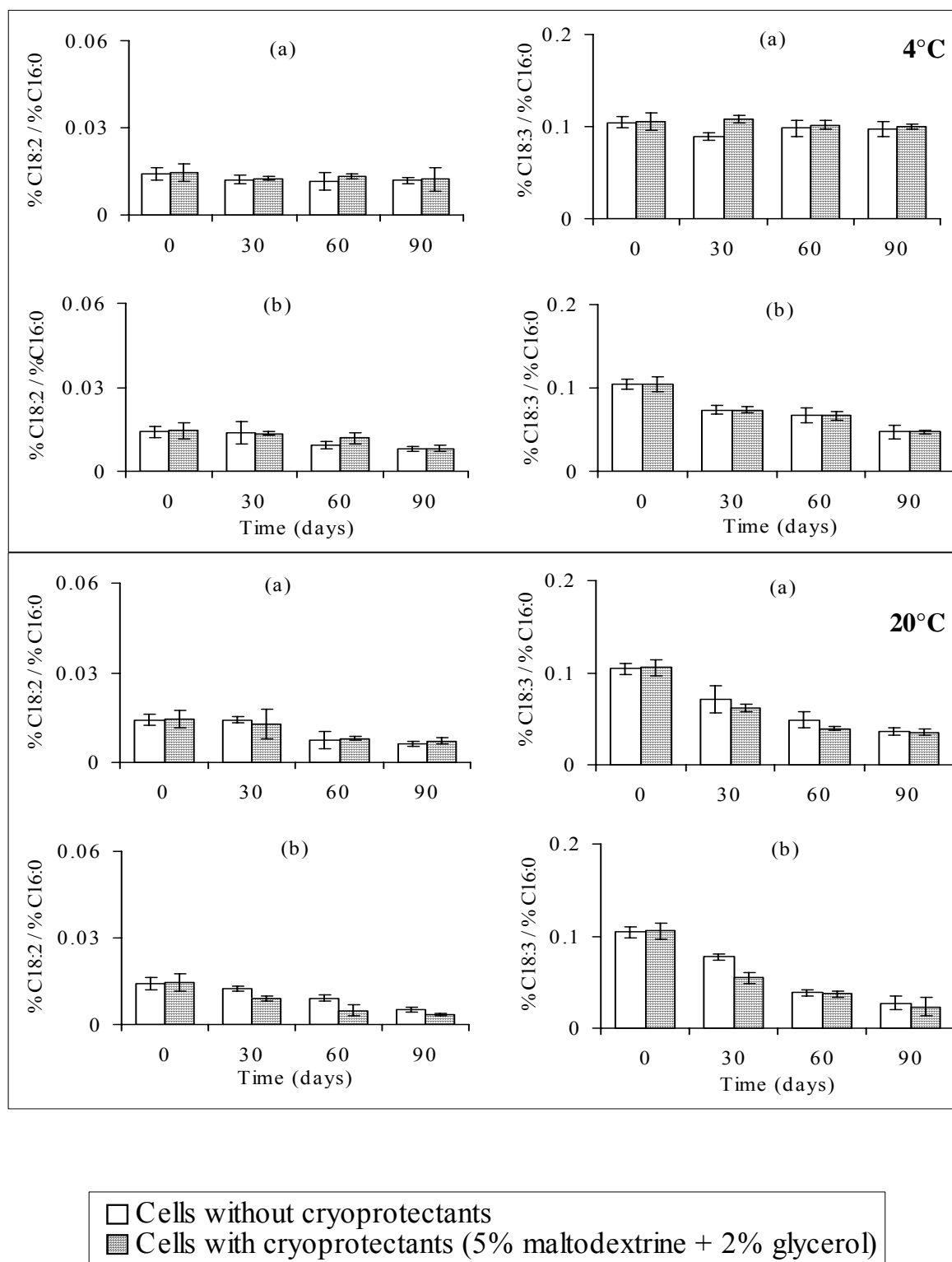
Values are means ± SD ( $n = 4$ ).

After a 90-day storage in vacuum-sealed aluminium foil or opened white glass tube,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  ratio decreased from the original value by 0% or 19.0% with a ratio reduction of only 0 or 0.002 at 4°C (**fig. 31, tab. 14**) compared to a larger decreased from the original value by 28.1% or 64.71% with a ratio reduction of 0.003 or 0.007 at 20°C, respectively. During the same time  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratio decreased from the original value by 4.8% or 52.7% with a ratio reduction of only 0.010 or 0.060 at 4°C (**fig. 31, tab. 15**) compared to a larger decreased from the original value by 66.1% or 78.0% with a ratio reduction of only 0.075 or 0.087 at 20°C, respectively. In most cases, after 90-day storage, the decreased in  $C_{18:2}/C_{16:0}$  ratio was less than that in  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratio (**tab.14 & 15**).  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios for freeze-dried strains added with or without cryoprotectants are not significantly different after 90-day storage ( $p > 0.05$ ).

Lipid oxidation and specially lipids of membrane fatty acid was probably deemed responsible for cell death during storage (Teixeira *et al.*, 1995, 1996). Cellular fatty acids of *L. mesenteroides* and *Lb. plantarum* consisted of : palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic and linolenic. All these acids have been identified previously in cellular membrane of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria (Sow *et al.*, 2005, Ndoye *et al.*, 2007) ratios. Contrarily to their saturated and unsaturated analogs, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are much more susceptible to oxidation (Halliwell *et al.*, 1993). After 90-day,  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios were significantly lower for both freeze-dried strain held in opened glass tube at 20°C. The effect of temperature during storage on freeze-dried powder is harmful to the microorganisms' survival. What concern light, its action is detrimental and leads to decrease the survival rate. Upon exposure to combined light, temperature and oxygen, a cooperative, deleterious effect was noted resulting in an even higher loss in viability. A possible interpretation is that under these conditions linoleic and linolenic acids can be further rapidly converted in hydroperoxides (Howe *et al.*, 2002; Halliwell *et al.*, 1993). This is supported by the fact that, during storage in opened white glass tube at 4°C and in vacuum-sealed aluminium foil at 20°C  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios decrease more slowly. The occurrence of many of these compounds has been explained on the basis of the formation and/or combination of free radicals resulting from homolytic cleavage of C-C linkages near the double bound.



**Figure 31.**  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios of freeze-dried *L. mesenteroides* during 90-day storage at: 4 °C (A) or 20°C (B) in vacuum-sealed aluminium foil (a) or in opened white glass tube (b). Bars are means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ) and represent the ratio between each fatty acid and the palmitic ( $C_{16:0}$ ) acid.



**Figure 32.**  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios of freeze-dried *Lb. plantarum* during 90-day storage at: 4 °C (A) or 20°C (B) in vacuum-sealed aluminium foil (a) or in opened white glass tube (b). Bars are means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ) and represent the ratio between each fatty acid and the palmitic ( $C_{16:0}$ ) acid.

Thus linoleic and linolenic acids degradation may not be dependant on the presence or absence of free molecular oxygen but on the presence of reactive free radicals in the dried matrix. Linolenic acid was degraded faster than linoleic acid and even in cell membrane, as previous studies have shown, an unsaturated fatty acid compound with more double bounds (and/or conjugated double bonds) would be easily oxidized (Zhang *et al.*, 2007). Our results strongly point towards the possibility that the loss of water during freeze-drying process generates an oxidative stress. Pereira *et al.*, (2003) reported also that freeze-dried cells showed increase in oxidation during storage. However, the origin of free radicals during dehydration remains unknown (França *et al.*, 2007). The influence of temperature during storage of unsaturated fatty acids in the absence of oxygen, dimeric compounds and substances of lower molecular weight are more likely to be produced (Nawar, 1996).

#### **IV-2.4. Conclusions**

These results presented here provide experimental support to the hypothesis that storage in presence of air, light, high moisture content and high temperature is detrimental to freeze-dried powders. Low survival during storage was associated with a decrease in  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios. Our results confirm the importance controlling temperature, atmosphere and residual water activity of dried cultures in order to optimize survival. These data further support the view that PUFA (linoleic and linolenic acids) could play a key role in determining cellular susceptibility to oxidative and/or heat stress. The beneficial effect of the use of cryoprotectants is associated clearly with high viability after freeze-dying rather than increased stability during storage. Further attempts to stabilize freeze-dried cells during storage must be made, and the addition of compounds that interact with the cytoplasmic membrane could be explored. Detection of linoleic or linolenic acids degradation by products will allow having a correct picture of lipid degradation proceeds.

#### **IV-2.5. Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology, Karlsruhe, Germany for providing *L. mesenteroides*

*spp. mesenteroides* Kenya MRog2 strain and Mrs Maryse Hardenne and Mr Philippe Mottet for their contribution. We thank all the technical's personals of CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle). We also express our gratitude to the republic of Ivory Cost and communauté française de Belgique for its financial assistance.

#### IV-2.6. References

- [1] Abadias M, Benabarre A, Teixido N, Usall J, Viñas I. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. Int J Food Microbiol 2001; 65 :173-182.
- [2] Andersen AB, Fog-Petersen MS, Larsen H, Skibsted LH. Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as Related to Physical State of Freezing Matrix. Lebensm Wiss u Technol 1999; 32: 540-547.
- [3] Béal C, Corrieu G. Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 398 at the different steps of their production. Lebensm Wiss U Technol 1994; 27: 86-92.
- [4] Béal C, Mihoub F, Marin M. and Corrieu G. Procédé de préparation d'une composition lyophilisée contenant des bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors d'un stockage à température ambiante et composition obtenue. Demande de Brevet d'invention FR N°2829147 2001.
- [5] Bozoglu TF, Ozilgen M, Bakir U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying. Enz Microbiol Technol 1987; 9: 531-537.
- [6] Carvalho AS, Silva JH, Teixera P, Malcata FX, Gibbs P. Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus*. International dairy journal 2003; 13(6): 463-468.
- [7] Castro HP, Teixeira PM, and Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze-drying. Journal of Applied Microbiology 1977; 82: 87-94.
- [8] Champagne CP, Detournay H, Hardy MJ. Effect of medium on growth and subsequent survival, after freeze-drying, of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*. J Ind Microbiol 1991;7: 147-120.
- [9] Champagne CP, Mondou F, Raymond Y, Roy D. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. Food Research International 1996; 29(5-6): 555-562.
- [10] Chatterjee MT, Seunath A, Khalawan SA, Curran BPG. Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response elements (STRE). Microbiology 2000; 146: 877-884.
- [11] Cronan Jr, Yan Z, John E. Transcriptional Analysis of Essential Genes of the *Escherichia coli* Fatty Acid Biosynthesis Gene Cluster by Functional Replacement with the Analogous *Salmonella typhimurium* Gene Cluster. Journal of bacteriology; 1998, p. 3295-3303.
- [12] Dimmick, R. L.; Heckly, R. J. Free radical formation during storage of freeze dried *Serratia marcescens*. Nature 1987; 192: 776.
- [13] Fonseca F, Béal C, Corrieu, J. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic starters during freezing and frozen storage. Journal of Dairy Res 2000; 67: 83-90.



- [14] França MB, Panek AD, Eleutherio ECA. Oxidative stress and its effects during deshydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2007; 146(4): 621-632.
- [15] Girotti AW, Thomas JP, Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* 1984; 259: 1744.
- [16] Gu MB, Choi SH, Kim SW, Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *E coli* for toxicity monitoring. *J Biotechnol* 2001; 88: 95-105.
- [17] Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanisms, measurement, and significance. *Am Clin Nutr* 1993; 57: 715-725.
- [18] Halverson LJ, Firestone M K. Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2114-2421.
- [19] Hamoudi L, Goulet J, Ratti C. Effect of protective agents on the viability of *Geotricum candidum* during freeze-drying and storage. *Food microbiology and safety* 2007; 72(2): M45-M49.
- [20] Hansen JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 215-234.
- [21] Holzapfel W. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 1997; 8(5/6): 241-258.
- [22] Howe AG, Schillmiller AL, Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2002; 5: 230-236.
- [23] Ishibashi N, Tatematsu I, Shimamura S, Tomita M, Okonogi S. Effect of water activity on the viability of freeze-dried bifidobacteria and lactic acid bacteria. *Fundamentals and applications of Freeze-drying to biological materials, Drugs and foodstuffs. I. I. o. Refrigeration. Paris* 1985; 227-232.
- [24] Ito M, Connor WE, Blanchette EJ, Treadwell CR, Vahounny GV. Inhibition of lymphatic absorption of cholesterol by cholestane-3beta, 5 alpha, 6 beta-triol. *Journal of Lipid Research* 1969; 10: 694-702.
- [25] Karel M. Interaction of food proteins with water and with lipids, and some effects of these interactions on functional properties, in "Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes", Academic Press Inc NY; 1977, p. 317-338.
- [26] Kieft TL, Ringleberg DB, White DC. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and dessication in a porous medium. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 3292-3299.
- [27] Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CMA. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol* 2005; 28: 527-540.
- [28] Magasanik B, Schaechter M, Umberger HEC, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and molecular biology American Society for Food Microbiology Washington, DC. Bd 1.S 1987; 474-497.
- [29] Marshall BJ, Goote GG, Scott WJA. Study of factors affecting the survival of dried bacteria during storage. Technical Paper, CSIRO Australian Division of Food Research 1974; 39: 1-29.

- [30] Nawar. Lipids. Food chemistry. F. O. R. New york, Marcel Dekker, Inc 1996; 1: 225-319.
- [31] Nawar, W. W. Lipids. Principles of Food Science. O. R. Fennema 1976.
- [32] Ndoye B, Weekers F, Diawara B, Guiro AT, Thonart P. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. J food Eng 2007; 79: 1374-1382.
- [33] Pereira EJ, Panek AD, Eleutherio ECA. Protection against oxidation during dehydration of yeast. Cell Stress and Chaperones 2003; 8: 120-124.
- [34] Porubcan RS, Sellars RL, Lactic starter culture concentrates. Microbial technology. H. J. Pepler, Perlman, D. (Eds). New York, Academic Press; 1979, p. 59-92.
- [35] Pryor WA. Free radical pathology. Chem Eng News 1971; 49: 34-51.
- [36] Sow NM, Dubois-Dauphin R, Roblain, D, Guiro AT, Thonart P. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. African Journal of Biotechnology 2005; 4(5): 409-421.
- [37] Suzuki K, Goodfellow M, O'Donnell AG. Cell envelopes and classification. London, England, Academic Press; 1993.
- [38] Teixeira PC, Castro MH, Malcata FX, Kirby RM. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray drying. Journal of Dairy Science 1995; 78: 1025-1031.
- [39] Teixeira PC, Castro MH, Kirby RM. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. Letters in Applied Microbiology 1996; 22: 34-38.
- [40] Théberge M. C, Prévost D, Chalifour, FP. The effect of different temperatures on the fatty acids composition of *Rhizobium bv. viciae* in the faba bean symbiosis. New Phytologist 1996 ; 134: 657-664.
- [41] Wang YC, Yu RC, Chou CC. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. Int J Food Microbiol 2004; 93: 209-217.
- [42] Zhang W, Shi Bi, Shi J. A theoretical study on autoxidation of unsaturated fatty Acids and Antioxidant Activity Of phenolic Compounds. Journal of American Leather Chemists Association 2007; 102: 99-105.

### IV.3. Conclusions : Suivi de la dégradation des acides gras polyinsaturés

A l'issue de ces travaux, les résultats récoltés permettent d'établir un support expérimental à l'hypothèse que le stockage en présence de l'air, de la lumière, d'une humidité importante en combinaison avec une température élevée est préjudiciable à la conservation des cellules lyophilisées. La principale difficulté résulte de leurs fortes teneurs en acides gras polyinsaturés qui sont très sensibles aux réactions d'oxydation. Ces réactions induisent des dégradations des propriétés du produit au cours des procédés de transformation et de conservation. L'objectif de cette étude était d'identifier les étapes critiques du procédé de production et de lyophilisation des bactéries, afin de proposer des solutions permettant de limiter le développement des réactions d'oxydation des lipides responsables de la dégradation des starters au cours de sa fabrication et de sa conservation. Au cours de la conservation à 4°C sous vide, les poudres issues de la lyophilisation contiennent de faibles concentrations en produits d'oxydation des polyinsaturés. Cette faible concentration résulterait de réactions de décomposition de ces produits et/ou d'interactions intervenant entre ces produits et les protéines. D'autres tentatives pour stabiliser les cellules lyophilisées pendant le stockage doivent être effectuées, et l'addition de composés qui, par exemple interagiraient avec la membrane cytoplasmique, pourrait être explorée. Dans le souci de compréhension des phénomènes de mortalité cellulaire, l'analyse des composés volatils s'avère importante. C'est pourquoi le **chapitre V** portera sur les produits volatils de dégradation des acides gras cellulaires.

## Chapitre V

---

Caractérisation des composés volatils issus de la  
dégradation des acides gras de bactéries  
lactiques

## V. Caractérisation des composés volatils issus de la dégradation des acides gras membranaires

---

### V.1. Contexte et objectifs

L'objectif de ce chapitre était de suivre l'oxydation des lipides par la formation des composés volatils au cours du stockage à température ambiante 20°C. Les acides gras totaux de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 se caractérisent par un taux élevé d'acides gras polyinsaturés (~30%). Les phospholipides, principalement les phosphatidyléthanolamines (PE) contiennent une forte proportion d'acides gras polyinsaturés à chaîne longue dont 15% d'acides gras de la série n-3 et un taux élevé d'aldéhydes. Le niveau initial des composés volatils (aldéhydes) issus de l'oxydation des lipides des cellules lyophilisées de bactéries lactiques est faible. Mais lors de la dégradation des polyinsaturés et particulièrement des phospholipides tels que les phosphatidyléthanolamines, l'indice des produits primaires d'oxydation des lipides augmente et les quantités des produits volatils issus de l'oxydation des lipides sont multipliées par 18 à 20 (Nordvi et al., 2007). Dans le cadre de ce chapitre, cette étude a pour intérêt fondamental de caractériser les composés volatils produits par des starters lactiques utilisés comme prébiotiques, probiotiques voire synbiotiques. Les produits (poudres) issus de la lyophilisation sont stockés à température ambiante. L'extraction par la technique d'espace de tête dynamique ou head space («purge and trap») permet de mettre en évidence 109 composés. Parmi les composés identifiés 30 composés sont susceptibles, selon les auteurs (Salmeron et al., 2009 ; Cheng et al., 2005) d'être produits par le métabolisme bactérien des lipides, des glucides ou des acides aminés. Une analyse en composantes principales des composés volatils permet de distinguer différents groupes que sont : les aldéhydes, les alcools, les alcènes, les alcanes, les esters, les cétones, et les composés dérivés des amino acides. Cette étude permet une approche différente dans la compréhension des phénomènes d'oxydation au niveau du groupe de *Lactobacilli* par la production de composés volatils lors de l'altération d'acides gras membranaires polyinsaturés.

## V.2. Characterization of volatiles compounds emitted from freeze-dried *L. plantarum* CWBI-B1419 product during storage.

---

Publication 6 – *Biotechnol. Appl. Biochem*

*Biotechnology and Applied Biochemistry*

Coulibaly, I<sup>(1\*)</sup>., Destain, J<sup>(1)</sup>., R, Dubois-D<sup>(1)</sup>., Wathelet, J. P <sup>(3)</sup>., and P. Thonart <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

<sup>(3)</sup>Organic Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

La poudre issue de la lyophilisation de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 a été analysée à trois stades, au cours du stockage. La teneur en eau et le taux de viabilité des bactéries ont été suivis, les composés volatils ont été extraits des poudres par la technique de prélèvement de l'espace de tête dynamique et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (GC-MS). L'analyse révèle 109 composés volatils identifiés : des aldéhydes, des alcools, des alcènes, des alcanes, des esters, des cétones et des composés dérivés d'acides aminés comme les groupes de volatils les plus répandus. Dix volatils ont été retenus en raison de leur pourcentage élevé des surfaces des pics. Sept de ces volatils ont été analysés en suivant leur évolution au cours du stockage. Parmi ces composés on note la diminution des taux d'acide éthanoïque et du cyclotetrasiloxane octaméthyl, contrairement à l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide 2-méthylpropanoïque, l'acide butanoïque et 3-méthylbutanoïque dont les pourcentages augmentent de façon significative ( $p < 0.1$ ) durant les 90 jours de stockage. Le pourcentage des volatils issu de *L. plantarum* CWBI-B1419 est fonction de la période de stockage et aussi de la quantité des acides gras polyinsaturés. En dépit de la forte teneur en acides gras polyinsaturés, le catabolisme des acides aminés et la synthèse d'esters ont conduit à d'importants changements dans la composition des produits volatils des bactéries lactiques issus de réactions d'oxydation des lipides.

**Mots-clés:** Composés volatils, Acides organiques volatils; cellules lyophilisées, le stockage, *Lactobacillus*, (GC-MS); microextraction en phase solide (SPME).

## Abstract

The powder of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 was analyzed at three stages during storage. The water content, the rate of viable bacteria were monitored and the volatile compounds were extracted from the powders by the technique of sampling of the dynamic headspace and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The analysis revealed 109 volatils compounds identified aldehydes, alcohols, alkenes, alkanes, esters, ketones and compounds derived from amino acids such as the predominates groups. Ten volatiles were selected according to their high percentage of peak areas. Seven of these volatils were analyzed by following their evolution during storage. Among these compounds we noticed a decreased of ethanoic acid and cyclotetrasiloxane octamethyl unlike acetic acid, propionic acid, 2-methylbutanoic acid and 3-methylbutanoic with increasing percentages of significantly ( $p < 0.1$ ) during 90 days of storage. The contents of volatiles from *L. plantarum* CWBI-B1419 is a function of the storage period and also the quatntité polyunsaturated fatty acids. Despite the high content of polyunsaturated fatty acids, catabolism of amino acids and synthesis of esters led to important changes in the composition of volatile products of lactic acid bacteria from oxidation reactions of lipids.

**Keywords:** Volatils compound, Volatile organic acid; Freeze-dried cells, storage, *Lactobacillus*, (GC-MS); Solid-phase microextraction (SPME).



## V-2.1. Introduction

The composition of volatile compounds gives characteristic aroma profiles that are specific for different types of dry-cured meat sausages (Montel et al., 1998 ; Schmidt et al., 1998 ; Dainty et al., 1999 ; Edwards et al., 1999 ; Toldra, 2002). Unsaturated fatty acids can be oxidised easily by diverse oxidation mechanisms. Light exposure and presence of photosensitisers such as riboflavin and chlorophyll can accelerate lipid oxidation through type I pathway of excited photosensitisers and singlet oxygen oxidation or type II pathway (Boff et al., 2002). Changes of volatile profiles can be used as indicators for determining the degree of oxidation in fats and oils (Lemaître et al., 2006). The most important odor and flavour compounds in dry-cured meat sausages are formed by the decomposition of fatty acids and amino acids (Ordonez et al., 1999 ; Toldra 2002). Free unsaturated fatty acids (UFA) will easily oxidize to lipid hydroperoxides, which are unstable and rapidly decompose to secondary oxidation volatile compounds such as aldehydes, alcohols, ketones, furans, alkanes, and alkenes (Frankel, 2005). Amino acid catabolism gives different volatile compounds like sulphides, pyrazines, and branched-chained amino acids (BCAA) (Ordonez et al., 1999). The aroma of fresh lactic acid bacteria can be attributed to secondary lipid oxidation compounds formed from hydroperoxides either by lipoxygenases or autooxidation of UFA and PUFA (Kawai, 1996 ; Dunford and Shahidi, 1998 ; Cadawallader, 2002).

During storage, increasing levels of these compounds can lead to the development of rancid off-flavors in bacteria fatty acid. The objectives of this study were to determine the effects of light irradiation and oxygen effect on the formation of volatile compounds from polyunsaturated fatty acid model systems. In addition, the general changes in volatils during cold storage as well as the influence of 4 different milk protein ingredients were studied. The volatile compounds were collected using dynamic headspace sampling and separated and identified by use of dynamic headspace gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). Previous studies (Nordvi et al., 2007) have shown that in order to obtain an adequate lipid to protein ratio, extra protein needs to be added to secure physical stabilization of the lactic acid bacteria oil throughout processing. However, intrinsic properties of commercial protein powders can influence on the oxidative stability.

## V-2.2. Materials and methods

### V-2.2.1. Microorganism and inoculum

A selected *L. plantarum* CWBI-B1419 bacterial strain (CWBI, Wallon Center for Industrial Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Belgium), isolated from poultry farm was used as inoculum in this study. MRS broths inoculated with strain were incubated at 30°C for 18 h. The bottles were incubated at 30°C to the exponential phase of growth (18h). The bacterial suspensions were then used to inoculate the fermenting media at 1%(v/v). In all cases, the initial microbial concentration was approximately  $7.5 \log_{10}$  CFU/ml. The cell pellets obtained were resuspended in 5 ml (50% v/v) glycerol and frozen at -80 °C. The supernatants obtained after centrifugation (Sorvall RC2-B, Sorvall, USA) at  $2,500 \times g$  for 20 min, were decanted.

### V-2.2.2. Productions and storage conditions

The strains were grown in 100 L bioreactor containing MRS medium for 18 h and then concentrated 20 times by centrifugation. The supernatants obtained after centrifugation (Sorvall RC2-B, Sorvall, USA) at  $2,500 \times g$  for 20 min, were decanted with 2%, w/w glycerol and 5%, w/w maltodextrine. Cells were freeze-dried in a low freeze-drier (Leybold, Belgium) with a standard program by increasing the temperature gradually from -45°C to 25°C at 0.9 mbar pressure (30h) followed by 15h at 0.15 mbar. All fermentations were done in duplicate and average values reported. Freeze-dried samples were stored during 90 days, in portion size ( $2 \pm 0.5$  g in each portion) at 20°C in aluminum foil packets which were vacuum-sealed. Samples were withdrawn for analysis each 30 days and kept at -20°C (48-72 h) before analysis

### V-2.2.3. Dry cell weight, water Content and survival rate

The dry cell weight of 1 g of powder was determined at the end of freeze drying. The water content (100 g dry weight)<sup>-1</sup> of the freeze-dried samples during storage at 20°C was determined each 30 days. The samples were dried in a convection oven until constant weight and results are mean of triplicate determinations. The water activity ( $a_w$ ) of the freeze-dried samples was measured at 20°C using a water activity meter Novasina

(Novasina, Pfäffikon, Switzerland). Standard salt solutions (Novasina) of known water activity were used for calibration of the sensor at the measuring temperature. Readings were taken until four sequential readings gave the same results. Results obtained were the average of three determinations. The viable counts were obtained by plate count method after 48h. Percentage survival after 90-day storage was calculated as  $100 \times N/N_0$ , where  $N$  is the CFU/g of the freeze-dried sample at a given time and  $N_0$  is the CFU/g of the sample at the end of freeze-drying.

#### **V-2.2.4. Data analysis of SPME**

Two grams of freeze-dried cells were added to a 20-mL glass sample vial (Perkin Elmer, Mass., U.S.A.) and fitted with a self-sealing septum at its top, through which the solid-phase microextraction (SPME) syringe needle (bearing a fiber coated with 8  $\mu\text{m}$  thick film of Carboxen-polydimethylsiloxane, Supelco, Bellefonte, Pa., U.S.A.) was introduced and maintained in the headspace at 35°C for 30min. The SPME fiber was conditioned according to the manufacturer's recommendations (280°C for 30min in the GC injector). The volatile analytes absorbed to the SPME fiber were analyzed by GC-MS (Hewlett-Packard, 5890 series II plus, N.J., U.S.A.). The compounds were separated by a CPWAX-52CB fused silica column (50 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.2  $\mu\text{m}$ , Agilent, Calif., U.S.A.).

#### **V-2.2.5. GC-MS operating parameters**

The injection port was heated at 250°C, in splitless mode, and helium flow rate was maintained at 1 mL/min. The SPME fiber was maintained in the injection port for 10min. The oven temperature program was held at 40°C for 4min, increased to 250°C at a rate of 8°C/min, and held for 5min. Detection was performed with the mass spectrometer operating in a scan mode (mass range from 35 to 400  $m/z$  using a scan rate of 4.51 scans/s) and the ionization energy was set at 70 eV. The temperatures of the ion source and the quadrupole mass analyzer were held at 200 and 100°C, respectively. The eluted compounds were identified by their retention times and by comparison of their mass spectra with the Wiley Mass Spectral database (Wiley & Sons Inc., N.Y., U.S.A.). Triplicate samples were analyzed. Gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) (HP5890 series II plus) was used to quantify volatiles. The compounds

compounds were separated by a capillary AT1000 column (Alltech, Ky., U.S.A.) (25 m × 0.32 mm × 0.30 μm). The analysis conditions were the same as for GC-MS. The eluted compounds were identified on their retention times as compared with the retention times of corresponding standards and after analyzing the same sample in GC-MS. The internal standard used was 2-ethylbutanoic acid at a concentration of 10 ppm. Duplicate samples were analyzed. The data was then analysed using ANOVA

### V-2.3. Results and discussion

#### V-2.3.1. Viability of *L. plantarum* CWBI-B1419 during storage.

According to Béal et al. (1994) and Ishibashi et al. (1984) stability of dried lactic acid bacteria upon storage was better in the 0.1-0.2  $a_w$  zone. During this study, the water activity of *L. plantarum* CWBI-B1419 after freeze drying have some  $a_w$  less than 0.170 at 25 °C This result give us an indication that the lactic acid bacteria are well lyophilized. *L. plantarum* CWBI-B1419 was produced in bioreactor; the cells were harvested, added or not with 5% maltodextrine, 2% glycerol and freeze-dried. **Tab. 16** shows viable counts during the process and survival after freeze-drying. A viable population of  $11.88 \pm 0.03$  log<sub>10</sub>CFU/g or  $11.65 \pm 0.04$  log<sub>10</sub>CFU/g *L. plantarum* CWBI-B1419 added or not with maltodextrine and glycerol were obtained after the freeze-drying process. The effect of the additives is not significant. Moisture content and water activity ( $a_w$ ) were determined (**tab. 16**).

**Table 16.** Viability of *L. plantarum* CWBI-B1419 before and after freeze-drying.

|                      | Dry matters<br>(%) | Dry parameters  |       | Population<br>(log CFU/g) | Survival<br>(%)   |
|----------------------|--------------------|-----------------|-------|---------------------------|-------------------|
|                      |                    | Moisture (%)    | $a_w$ |                           |                   |
| Before freeze-drying | $93.8 \pm 0.4^a$   | $3.1 \pm 0.3^a$ | -     | $9.4 \pm 0.02^b$          | $0.29 \pm 0.02^b$ |
| After freeze-drying  | $93.7 \pm 0.5^a$   | $4.7 \pm 0.7^a$ | 0.165 | $11.8 \pm 0.05^b$         | $0.19 \pm 0.04^b$ |

The rate of dry matter in a lyophilized powder, which is nearly 94% and a water activity less than 0.2, would be necessary to ensure a level of storage stability at room temperature. These conditions are consistent with research undertaken by French's Patent FR No. 2829147, (Béal et al., 2001) which stipulates that in a dried product the following parameters: very low water activity (<0. 2), rate of dry matter around 96% and a  $T_g = T_s$ -

25°C >20°C, contribute to the stability of the product for an extended period during the storage.

The powder produced from this lactic acid bacterium meets all these conditions and yet conservation is not optimal during storage. Apart from this, freeze-dried powders meet the above-mentioned criteria and yet the survival rate is not high during storage. According to the work of (Carvaho et al., 2003), a number of factors can influence the rate of survival in function of time. With regard to the other predominant factors to this loss of viability, one could cite (the water activity), probably taken into contained pure water powders, the effect of temperature and light for hermetically sealed bags (under vacuum) containing 2-3 g of powder. Loss of viability was also noted that at this level find its origin by the combined effect of temperature and oxidation of cellular constituents as unsaturated fatty acids (Niki et al., 2003). Peroxides (R-OOH) are primary reaction products formed in the initial stages of oxidation, and therefore give an indication of the progress of lipid oxidation (Nawar, 1996).

This oxidation finds its source by oxygen effect, lyophilized powders that create free radicals. These free radicals are toxic substances that lead to rupture the membrane and thus cellular cell death in the future. These primarily mitigate the adverse events and are especially responsible for significant losses during storage that biologists increasingly need antioxidant to stop or reduce the oxidation products at the level of freeze-dried powders. It is safe to say that based on our experiences and those of others; the loss of viability during storage is subject to a phenomenon of autooxidation, which should optimize the survival rate especially during storage at room temperature. The oxidation products are varied. Hydroperoxides from the decomposition of polyunsaturated give way to volatile secondary products that represent the same phenomenon. These compounds are also important indicators of cellular oxidation

### V-2.3.2. Volatile compound analysis.

Volatile compounds from freeze-dried powders were extracted by SPME. Several types of fibers (CAR/PDMS, and CAR/PDMS/DVB) were tested under the same conditions to evaluate the more adapted one. Best results were obtained with the

CAR/PDMS/DVB fiber, which is in good accordance with [Sanches et al. \(2004\)](#) and [Marco et al. \(2004\)](#). Analysis of the volatile SPME profiles obtained for the different time points of freeze-dried cells. 109 compounds were found as volatile compounds and very low levels of these compounds as compared to volatile compounds extracted from freeze-dried *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates, ([Ivan et al., 2009](#)). Details about the peak identities and relative abundances of the volatile compounds expressed as (compound peak area/total compounds peak area) x 100 are shown in **tab. 16**. Among the identified organic compound there are acids, amides, alcohols, aldehydes, aromatic hydrocarbons, esters, furans, ketones, peroxides, and pyrans. High concentrations of ten volatile compounds were found in freeze-dried powder (**tab. 17**).

1,3-butanediol, 2,3 butanediol, acetic acid, hexanal, cyclotetrasiloxane octamethyl and benzaldehyde are mainly identified. Beside these compounds, additional volatile compounds were also identified in very small amounts (**tab. 17**). Hexanal is the only aldehyde formed from both the 9- and the 13-hydroperoxide of linoleic acid at least by chemical reactions. Hexenal may be the direct product of the chemical fragmentation of the 13-hydroperoxide of linoleic acid, or it may derive from 2,4 decadienal that may be a product of chemical oxidation of 9-hydroperoxy linoleic acid (HPOD) ([Petersen et al., 1998](#) ; [Goodridge et al., 2003](#)). Freeze-dried powder of *Lactobacillus plantarum* had known to contain mainly linoleic acid as PUFAs and the major LOX activity in tubers forms 9-derivatives, the precursors of enzymatic C-9 aldehyde formation ([Coulibaly et al., 2009](#)). Our study failed to detect other compound as aldehyde. However, hexenal may be the preferred product of 9-hydroperoxides from chemical reactions as well. Moreover, the SPME technique may discriminate as the fibers adsorb more preferentially the most volatile compounds. Despite this disadvantage, the technique is well-adapted to define smell perception ([Sanches et al., 2005](#)). Heptane and hexene were also identified and quantified by HPLC; benzaldehyde, pyrazine and nonadecane were identified as minor products. Except hexenal, none of aldehydes have been identified by SPME-GC-MS. The rate of hexenal has been increased during storage. Based on these results and the work carried out by [Fauconnier et al. \(2007\)](#) and [Yao et al. \(2008\)](#), assuming an oxidation by enzymatic formation of hexenal in the lyophilized powder has been issued. Another group of compounds originally aroma can be generated during the treatment because of the enzymatic activity of lactic bacteria.

The high concentrations of acetic acid could be explained by the aerobic metabolism of *L. plantarum*. Sedewitz et al. (1984) have showed that *L. plantarum*, during the stationary phase, under aerobic conditions and low glucose concentration, can consume the previously secreted lactic acid and an equivalent amount of acetic acid is released. Similar behaviour of *L. plantarum* in residual media was also reported by Vazquez et al. (2008). The high relative concentrations of acetic acid found in freeze-dried powder suggest that part of the lactic acid produced could have been metabolised to acetic acid. Aldehydes were found in freeze-dried *Lactobacillus* in relatively quantities (tab. 17 & 18). The final stages of the fermentation of bacteria, plants and yeast involve the conversion of pyruvate to acetaldehyde by the enzyme pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1), followed by conversion of acetaldehyde into ethanol. The latter reaction is further catalyzed by alcohol dehydrogenase, running in the opposite direction (Molimard et al., 1996) or formed by the metabolism of lactate or by the oxidation of ethanol (McSweeney et al., 2000 ; Ortigosa et al., 2005 and Bosset et al., 1997). Branched aldehydes originate from amino acid degradation (Engels et al., 1997), i.e. 2-methyl propanal, 2-methyl butanal and 3-methyl butanal were produced from Val, Ile and Leu, respectively (Urbach, 1995) were not detected, benzaldehyde has also been found in some trials with important concentration.

**Table 17.** Relative abundances of volatile compounds detected in freeze-dried *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 during storage.

| Peak n° | Compounds                   | RT   | Identification (%) |         |         |         |          |
|---------|-----------------------------|------|--------------------|---------|---------|---------|----------|
|         |                             |      | Trial-1            | Trial-2 | Trial-3 | Trial-4 | Σ trials |
| 1.      | Hexane                      | 0,15 | 0,17               | -       | -       | -       | 0,17     |
| 2.      | Heptane                     | 0,96 | -                  | 5,19    | -       | -       | 5,19     |
| 3.      | Ethanol                     | 1,11 | 0,79               | -       | -       | -       | 0,79     |
| 4.      | Acetic acid                 | 1,60 | 6,89               | -       | 13,18   | -       | 20,07    |
| 5.      | Ethanoic acid               | 1,65 | 3,42               | -       | 6,23    | -       | 9,65     |
| 6.      | 1-Butanol                   | 1,86 | 0,68               | -       | -       | -       | 0,68     |
| 7.      | 1,3-Butanediol              | 2,91 | 15,26              | 0,87    | 12,89   | 6,84    | 35,86    |
| 8.      | 2,3-Butanediol              | 2,95 | 6,75               | 6,48    | 19,89   | -       | 33,12    |
| 9.      | Silane triethyl(ethoxy)     | 2,96 | -                  | 4,31    | -       | -       | 4,31     |
| 10.     | Butanol trimethyl ester     | 2,98 | -                  | -       | -       | 14,67   | 14,67    |
| 11.     | 1,3-Dihydroxybutane         | 2,99 | 18,54              | -       | -       | -       | 18,54    |
| 12.     | Butane-2,3-diol             | 3,07 | 1,74               | -       | 11,83   | -       | 13,57    |
| 13.     | Ethyl 2-hydroxypropanoate   | 3,26 | 0,46               | -       | 0,73    | -       | 1,19     |
| 14.     | Cyclotrisiloxane hexamethyl | 3,38 | 2,58               | 1,78    | 2,40    | 1,53    | 8,29     |
| 15.     | Pyrazine, 2,5 dimethyl      | 4,19 | -                  | 4,05    | -       | -       | 4,05     |

|     |  |       |      |      |      |       |       |
|-----|--|-------|------|------|------|-------|-------|
| 16. | hexenal                                  | 4,79  | -    | -    | -    | 18,80 | 18,8  |
| 17. | Ethyl metoxy acetate                     | 4,81  | 0,25 | -    | -    | 2,44  | 2,69  |
| 18. | Ethanol 2- (21-methylethoxy)             | 4,83  | -    | 0,21 | -    | -     | 0,21  |
| 19. | 1-Propene, 1-methylthio-(z)              | 4,84  | -    | -    | 0,42 | -     | 0,42  |
| 20. | Disiloxane ethenylpentamethyl            | 5,47  | 0,58 | 0,81 | 0,53 | 2,60  | 4,52  |
| 21. | Pentamethylheptane -(2,2,4,6,6)          | 5,57  | 0,69 | -    | -    | -     | 0,69  |
| 22. | Cyclotrisiloxane hexamethyl              | 5,58  | 0,51 | -    | -    | -     | 0,51  |
| 23. | Ethanol 2,2-diethoxy                     | 5,61  | -    | 6,29 | -    | 2,04  | 8,33  |
| 24. | Cyclotetrasiloxane octamethyl            | 5,69  | 2,71 | 0,76 | 7,37 | 7,91  | 18,75 |
| 25. | Trimethyl ethoxysilane                   | 5,72  | -    | 0,62 | -    | -     | 0,62  |
| 26. | Methylanisole                            | 5,76  | -    | -    | -    | 6,11  | 6,11  |
| 27. | Cyclotetrasiloxane                       | 5,88  | 5,06 | -    | -    | -     | 5,06  |
| 28. | Dimethylpyrazine                         | 5,89  | -    | 0,91 | -    | -     | 0,91  |
| 29. | Pyrazine ,2 5-dimethyl-3-(3-methylbutyl) | 5,95  | -    | 4,45 | -    | -     | 4,45  |
| 30. | Benzene , 1-methoxy-4-methyl             | 5,96  | -    | -    | -    | 3,25  | 3,25  |
| 31. | Trimethylpyrazine                        | 5,98  | -    | -    | 0,63 | -     | 0,63  |
| 32. | Pyrazine 3-ethyl-2,5-dimethyl            | 7,13  | -    | 4,37 | -    | 1,56  | 5,93  |
| 33. | 2-allyl-5-methylpyrazine                 | 7,25  | -    | 4,90 | -    | -     | 4,9   |
| 34. | Tetrapyrazine                            | 7,27  | -    | -    | 0,69 | -     | 0,69  |
| 35. | Ethoxycarbonylbenzophenone               | 7,60  | 0,23 | -    | -    | -     | 0,23  |
| 36. | Benzaldehyde 2,4-bis[trimethylsil]oxy]   | 7,62  | 0,38 | -    | -    | -     | 0,38  |
| 37. | Benzaldehyde                             | 7,65  | -    | -    | -    | 1,76  | 1,76  |
| 38. | 3-Heptene                                | 7,69  | 0,09 | -    | -    | -     | 0,09  |
| 39. | Benzeneethanol                           | 7,70  | -    | -    | 0,96 | -     | 0,96  |
| 40. | Pyrimidine, 2-(2-nitro-3-thienyl)        | 7,98  | -    | 5,55 | -    | -     | 5,55  |
| 41. | Benzaldehyde 2,5-bis[(trimethylsil)oxy]  | 8,22  | 3,71 | -    | -    | 9,11  | 12,82 |
| 42. | Benzoic acid                             | 8,23  | 9,86 | -    | -    | -     | 9,86  |
| 43. | Benzeneacetic acid                       | 8,25  | -    | -    | 5,09 | -     | 5,09  |
| 44. | 2,3,5-Triethyl-6-ethylpyrazine           | 8,30  | -    | -    | 0,29 | -     | 0,29  |
| 45. | 5-Methyl-1-heptene                       | 8,69  | -    | -    | -    | 2,11  | 2,11  |
| 46. | Dodecane                                 | 8,90  | 0,45 | 0,94 | -    | -     | 1,39  |
| 47. | Trisiloxane hexamethyl                   | 9,00  | -    | -    | 0,56 | -     | 0,56  |
| 48. | Ethanone, 1-(3,5-dimethyl-2-pyrazinyl)   | 9,27  | -    | -    | -    | 0,65  | 0,65  |
| 49. | Cyclotetrasiloxane octamethyl            | 9,51  | 0,51 | 0,89 | -    | -     | 1,4   |
| 50. | Propenylpyrazine                         | 9,70  | -    | -    | -    | 0,76  | 0,76  |
| 51. | 1,4-Di-tert-butylbenzene                 | 9,73  | -    | -    | 0,12 | -     | 0,12  |
| 52. | 1-Tetradecene                            | 9,75  | 0,38 | -    | -    | -     | 0,38  |
| 53. | Phenethyl acetate                        | 9,77  | -    | -    | -    | 0,11  | 0,11  |
| 54. | Cyclotetrasiloxane hexamethyl            | 9,82  | 0,38 | 0,64 | -    | -     | 1,02  |
| 55. | 2-Undecanone                             | 10,24 | -    | 1,21 | 0,32 | -     | 1,53  |
| 56. | 4-Ethyl-4-methyl-1-hexene                | 10,42 | 0,32 | 0,87 | -    | -     | 1,19  |
| 57. | Methylnonadecane                         | 10,44 | -    | -    | -    | 0,38  | 0,38  |
| 58. | Cyclotetrasiloxane octamethyl            | 10,47 | -    | -    | 0,35 | -     | 0,35  |
| 59. | Pyrazine 2,5-dimethyl-3-(methylbutyl)    | 10,56 | -    | 2,48 | -    | -     | 2,48  |
| 60. | 16-oxosalutaridine                       | 10,66 | 9,90 | 9,46 | 4,61 | 9,35  | 33,32 |
| 61. | Tetradecane 2-methyl                     | 10,95 | -    | 0,32 | -    | -     | 0,32  |
| 62. | Tritriacontane                           | 10,96 | 0,18 | -    | -    | -     | 0,18  |
| 63. | Hydroxycyclohexane                       | 10,99 | -    | 0,21 | -    | -     | 0,21  |
| 64. | 1-benzothiopyran-4-one 1-oxide           | 11,07 | 0,16 | -    | 0,14 | 0,84  | 1,14  |
| 65. | 4H-1-benzothiopyran-4-one                | 11,08 | -    | 0,83 | -    | -     | 0,83  |
| 66. | Cyclohexane                              | 11,11 | 0,34 | 0,50 | -    | -     | 0,84  |



|      |  |       |      |      |      |      |       |
|------|--|-------|------|------|------|------|-------|
| 67.  | Tridecane 2-methyl                       | 11,26 | 0,83 | 1,27 | 0,34 | 1,22 | 3,66  |
| 68.  | 5-Ethyl-1-nonene                         | 11,46 | 0,35 | 0,66 | -    | -    | 1,01  |
| 69.  | 1-Hexene                                 | 11,47 | -    | -    | 1,18 | -    | 1,18  |
| 70.  | Propyl -trimethylpyrazine                | 11,62 | -    | -    | 0,73 | -    | 0,73  |
| 71.  | Tetradecane                              | 11,65 | -    | 1,52 | -    | -    | 1,52  |
| 72.  | Silane trimethyl                         | 11,66 | -    | -    | -    | 0,42 | 0,42  |
| 73.  | Benzenepropanoic acid                    | 11,68 | -    | -    | 0,15 | -    | 0,15  |
| 74.  | Cyclohexane diethyl                      | 11,72 | -    | 1,13 | -    | -    | 1,13  |
| 75.  | Nonadecane                               | 11,75 | 0,49 | -    | -    | -    | 0,49  |
| 76.  | Trisiloxane octamethyl                   | 11,80 | -    | 0,39 | -    | -    | 0,39  |
| 77.  | Cyclohexane 1-ethyl-2, 4-dimethyl        | 11,92 | 0,16 | 0,63 | -    | -    | 0,79  |
| 78.  | Methyl decane                            | 12,06 | 0,16 | -    | -    | -    | 0,16  |
| 79.  | Naphthoic acid                           | 12,07 | -    | 0,40 | -    | -    | 0,4   |
| 80.  | Eicosane                                 | 12,09 | -    | -    | 0,43 | -    | 0,43  |
| 81.  | 1-Tetradecene                            | 12,31 | -    | -    | -    | 0,38 | 0,38  |
| 82.  | Cyclotetradecane                         | 12,32 | 0,28 | 0,58 | -    | -    | 0,86  |
| 83.  | Undecadien-2-one                         | 12,36 | -    | -    | 0,23 | -    | 0,23  |
| 84.  | Cyclotetrasiloxane octamethyl            | 12,37 | -    | 0,73 | -    | 2,96 | 3,69  |
| 85.  | (Z)-5-Dodecenyl acetate                  | 12,59 | -    | -    | 0,21 | -    | 0,21  |
| 86.  | Spiro[4.5]decane                         | 12,60 | -    | 1,22 | 0,56 | -    | 1,78  |
| 87.  | 1-Decene,4-methyl                        | 12,61 | 0,59 | -    | -    | -    | 0,59  |
| 88.  | Butylated hydroxyanisole                 | 12,62 | -    | 1,27 | -    | -    | 1,27  |
| 89.  | Cyclohexadien-1-one                      | 12,63 | -    | -    | -    | 0,64 | 0,64  |
| 90.  | Z5-Decenylaceytate                       | 12,69 | -    | -    | 0,45 | -    | 0,45  |
| 91.  | Cyclopentane                             | 12,70 | -    | -    | -    | 0,6  | 0,6   |
| 92.  | 2-Trideconone                            | 12,89 | -    | 7,81 | 2,45 | -    | 10,26 |
| 93.  | Phosphoric acid                          | 12,90 | 1,48 | -    | -    | -    | 1,48  |
| 94.  | Cyclotetrasiloxane octamethyl            | 12,91 | -    | 1,26 | -    | -    | 1,26  |
| 95.  | 2-Tridecanol                             | 12,98 | -    | -    | -    | 0,82 | 0,82  |
| 96.  | Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)       | 13,11 | 0,37 | 0,68 | 2,45 | -    | 3,50  |
| 97.  | 2H-1-Benzothiopyran                      | 13,13 | -    | -    | -    | 1,67 | 1,67  |
| 98.  | Butylated hydroxytoluene                 | 13,15 | -    | -    | 0,93 | -    | 0,93  |
| 99.  | Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)       | 13,16 | -    | 0,39 | -    | -    | 0,39  |
| 100. | Butyl hydroxy toluene                    | 13,20 | -    | -    | -    | 0,65 | 0,65  |
| 101. | Pentadecane, 3-methyl                    | 13,76 | 0,16 | 0,45 | -    | -    | 0,61  |
| 102. | Furan, 2-butyltetrahydro                 | 14,15 | -    | 0,92 | -    | -    | 0,92  |
| 103. | Trisiloxane octamethyl                   | 14,89 | 0,10 | -    | -    | -    | 0,10  |
| 104. | Mercaptoacetic acid, bis(trimethylsilyl) | 14,92 | -    | 0,35 | -    | -    | 0,35  |
| 105. | Dimethyl silane                          | 14,95 | -    | -    | 1,10 | -    | 1,10  |
| 106. | Cyclohexane (3,3 dimethylpenthyl)        | 15,09 | -    | 1,24 | -    | -    | 1,24  |
| 107. | 2-Pentadecanone                          | 15,26 | -    | 4,55 | -    | -    | 4,55  |
| 108. | Benzendicarboxylic acid                  | 17,11 | 0,23 | 3,08 | 0,44 | -    | 3,75  |
| 109. | 1, 13-Tetradecadiene                     | 17,21 | 0,80 | -    | -    | -    | 0,8   |

Alcohols were amongst the main volatile compounds in powder and the alcohols present at the greatest concentrations were 1,3-butanediol, 2,3-butanediol. Secondary alcohols are formed by enzymatic reduction of methyl ketones which are produced from fatty acids (Molimard et al., 1996).

**Table 18.** The main volatils compounds found in the dynamic headspace/GC analysis of freeze-dried *L. plantarum* CWBI-B1419 during storage.

| Pe<br>ak<br>n° | Compounds names                          | RT    | Significant<br>effect<br>of time | Changes<br>during<br>storage | Log <sub>10</sub> of peak area |      |      |
|----------------|--|-------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------|------|
|                |  |       |                                  |                              | Storage time (days)            |      |      |
|                |  |       |                                  |                              | 30                             | 60   | 90   |
| 1.             | Heptane                                  | 0.96  | +                                | -                            |                                | nd   |      |
| 2.             | Acetic acid                              | 1.60  | ++                               | ↓                            | 0.70                           | 0.68 | 0.58 |
| 3.             | Ethanoic acid                            | 1.65  | +                                | -                            |                                | nd   |      |
| 4.             | Pyrazine, 2,5 dimethyl                   | 2.91  | +++                              | ↑                            | 0.95                           | 0.95 | 0.98 |
| 5.             | 2,3-Butanediol                           | 2.95  | +++                              | ↓                            | 0.91                           | 0.90 | 0.87 |
| 6.             | Silane triethyl(ethoxy)                  | 2.96  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 7.             | Butanol trimethyl ester                  | 2.98  | ++                               | ↑                            | 0.56                           | 0.60 | 0.66 |
| 8.             | 1,3-Dihydroxybutane                      | 2.99  | ++                               | ↑                            | 0.66                           | 0.70 | 0.75 |
| 9.             | Butane-2,3-diol                          | 3.07  | ++                               | ↑                            | 0.53                           | 0.63 | 0.70 |
| 10.            | Cyclotrisiloxane hexamethyl              | 3.38  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 11.            | Pyrazine, 2,5 dimethyl                   | 4.19  | +                                | -                            |                                | nd   |      |
| 12.            | hexenal                                  | 4.79  | ++                               | ↑                            | 0.67                           | 0.73 | 0.79 |
| 13.            | Ethanol 2,2-diethoxy                     | 5.09  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 14.            | Disiloxane ethenylpentamethyl            | 5.47  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 15.            | Ethanol 2,2-diethoxy                     | 5.61  | ++                               | ↓                            | 0.67                           | 0.59 | 0.48 |
| 16.            | Cyclotetrasiloxane octamethyl            | 5.69  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 17.            | Methylanisole                            | 5.76  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 18.            | Cyclotetrasiloxane                       | 5.88  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 19.            | Pyrazine,2 5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)  | 5.95  | +                                | -                            |                                | nd   |      |
| 20.            | Pyrazine 3-ethyl-2,5-dimethyl            | 7.13  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 21.            | 2-allyl-5-methylpyrazine                 | 7.25  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 22.            | Pyrimidine, 2-(2-nitro-3-thienyl)        | 7.98  | ++                               | ↑                            | 0.50                           | 0.65 | 0.70 |
| 23.            | Benzaldehyde 2,5-bis[(trimethylsilyloxy] | 8.22  | +                                | -                            |                                |      |      |
| 24.            | Benzeneacetic acid                       | 8.25  | +                                | -                            |                                | nd   |      |
| 25.            | 16-oxosalutaridine                       | 10.66 | +++                              | ↑                            | 0.92                           | 0.96 | 0.99 |
| 26.            | 2-Trideconone                            | 12.89 | +                                | -                            |                                | nd   |      |
| 27.            | 2-Pentadecanone                          | 15.26 | +                                | -                            |                                | nd   |      |

The results of multiple data analysis are indicated by: the significance levels  $+ \leq 3$ ,  $++ \leq 6$  and  $\geq 6$ . The arrows correspond with increase (↑) or decrease (↓) in group with time. The table shows the mean values of the log-transformed peak areas for all samples after 30, 60 and 90 days of storage.

The characteristic aroma of freeze-dried powder can be attributed to the secondary alcohols, in particular, 2-heptanol and 2-nonanol (De Frutos et al., 1991 ; Molimard et al., 1996).

Among the 26 compounds identified as having the highest rates, ten were followed for their high levels after analysis (tab. 18). During storage, the results of analysis of 30, 60 and 90 days we noticed, seven compounds with high concentrations those are :

hexanal, 16-oxosalutaridine, pyrimidine, 2-(2-nitro-3-thienyl), butane-2,3-diol, butanol trimethyl ester, 1,3-dihydroxybutane and pyrazine, 2,5 dimethyl while acetic acid, 2,3-butanediol and 2,2-ethanol diethoxy experiencing decline during the same storage. This difference could be due to the fact that the mortality increased in the cells and the rate of peroxide with increasing rates in acetate and alcohol decreasing (Barron et al., 2005 ; McSweeney et al., 2000).

This assertion is consistent with the work carried out by Arora et al. (1995) ; Moio et al. (1998). These alcohols are used as precursor for the formation of ethyl esters (Fox et al., 1997 ; Molimard et al., 1996). There is a link between cell death and the oxidation phenomena observed during storage and production of certain volatile compounds. Among the most important in *Lactobacillus plantarum* CBI-B1419, hexenal is a compound key product of the secondary decomposition related to membrane oxidation. Our work is consistent with those made by Molimard et al. (1996). Products are essentially volatile compound and hexenal has the highest concentration. Methyl ketones are products of microbial  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids followed by  $\beta$ -keto acid decarboxylation (Okumura et al., 1985).

#### V-2.4. Conclusions

The alcohols, alkanes, esters, methyl-branched and phenylalanine derivates, ketones, and aldehydes were the most abundant groups of volatils in freeze-dried *L. plantarum* CWBI-B1419. The amino acid catabolism and ester synthesis seemed to be more prominent than the lipid oxidation and glycolysis during 90 days storage with no access to air. Many common secondary lipid oxidation products remained stable or decreased during storage. Some of the different additives affected only the esters and pyrazines, not the lipid oxidation compounds. Even with a high content of long chained PUFA in freeze-dried cell product, the occurrence of lipid oxidation compounds of these vacuum-packed products was lower than expected. In general, the volatile production depends more on the substrate than on the microorganism. The results obtained add to the knowledge of the volatile composition of cereals and cereal-based products, and provide

useful information for further development of suitable dairy probiotic used for drinks and others products.

### V-2.5. Acknowledge

We thank all the technical's personals of Walloon Center for industrial Biology. Maryse Hardenne and Celine Pierrart are acknowledged for her very important contribution in the experiments. We also like to express our gratitude to the republic of Ivory cost for its financial assistance to this work. Gratefully acknowledged for French community of Belgium

### V-2.6. References

- Arora, G., Cormier, F., & Lee, B. 1995. Analysis of odor active volatils in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/Sniffing, *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 748-752.
- Barron, L. J. R., Redondo, Y., Aramburu, M., Perez-Elotondo, F. J., Albisu, M., Najera, A. I., et al. 2005. Variations in volatile compounds and flavour in Idiazabal cheese manufactured from ewe's milk in farmhouse and factory, *J. Sc. Food. Agr.*, **85**, 1660-1671.
- Béal, C., & Corrieu, G. 1994. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **27**, 86-92.
- Béal, C., Mihoub, F., Marin, M., & Corrieu, G. 2001. Demande de Brevet d'invention FR N°2829147.
- Boff, J. M., & Min, D. B. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews. Food. Sc. Safety*, **1**, 158-172.
- Bosset, J. O., Butikofer, U., Gauch, R., & Sieber, R. 1997. Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. II. Gas chromatographic investigation of some volatile neutral compounds using dynamic headspace. *Lebens. Wis. Techn.*, **30**, 464-470.
- Cadawallader KR. 2002. Enzymes and flavor biogenesis in fish. In:Haard NF, Simpson BK, editors. *Seafood enzymes. Utilization and influence on postharvest seafood quality*. New York:Marcel Dekker. p 365-83.
- Carvalho, A. S., Silva, J. H., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. 2003. *Int. Dairy. J.*, **13**, 463-468.
- Cheng H.Z., Kyoung H.K., Hwan K., and Hyong J.L., 2005. Analysis and characterization of aroma-active compounds of *Schizandra chinensis* (omija) leaves, *J. Sci. Food. Agric.*, **85**, 161-166.
- Dainty R., Blom H. 1995. Flavour of fermented sausage. In: Campbell-Platt G, Cook PE, editors. *Fermented meats*. London, U.K.: Blackie Academic and Professional. p 176-93.
- De Frutos, M., Sanz, J., & Martinez-Castro, J. 1991. Characterization of artisanal cheeses by GC/MS analysis of their medium volatils (SDE) fraction, *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 524-530.

- Dunford E., Shahidi F. 1998. Flavours of fish meat. In: Shahidi F, editor. Flavor of meat, meat products, and seafoods. New York: Blackie Academic & Professional. p 131-58.
- Edwards R.A., Ordonez J.A., Dainty R.H., Hierro E.M., de la Hoz L. 1999. Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages, *Food. Chem.*, **64**:461-465.
- Engels, W. J. M., Dekker, R., De Jong, C., Neeter, R., & Visser, S. 1997. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *Int. Dairy. J.*, **7**, 255-263.
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H., Wallace, J. 1993. Biochemistry of cheese ripening. In 2nd ed. P. F. Fox (Ed.), Cheese: Chemistry, physics and microbiology, General aspects, 389-438. London: Chapman & Hall
- Frankel EN. 2005. Lipid oxidation. 2nd ed. Bridgewater, U.K.: The Oily Press. 470 p.
- Ishibashi, N., Tatematsu, I., Shimamura, S., Tomita, M., & Okonogi, S. 1985. Drugs and foodstuffs (pp. 227–232). Paris: International Institute of Refrigeration
- Kawai T. 1996. Fish flavor, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **36.**, 257-98.
- Langsrud Ø. 2002. 50-50 multivariate analysis of variance for colinear responses, *J. R. Stat. Soc. Ser D. Stat.*, **51**, 305-17.
- Lemaitre, R., King, B., Mozaffarian, D., Sootodehnia, N., & Siscovick, D. 2006. Trans-Fatty acids and sudden cardiac death. *Atheros. Suppl.* **7**, 13-15.
- Marco, A.; Navarro, J. L.; Flores, M. 2004. Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME), *Food Chem.*, **84**, 633-641.
- McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Lait*, **80**, 293-324.
- Montel MC, Masson F, Talon R. 1998. Bacterial role in flavour developmen, *Meat. Sci.*, **49**, S111-23.
- Nawar W W .1996. Lipids. In *Food Chemistry* , pp 225-319. Fennema O R, ed. New York, NY: M. Dekker, Inc.
- Nordvi B., Egelanddal B., LangsrudØ, Ofstad R., Slinde E. 2007. Development of a novel fermented and dried saithe and salmon product, *Innov. Food. Sci Emerging. Technol.*, **8**,163-71.
- Ordonez J.A., Hierro E.M., Bruna J.M., de la Hoz L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening, *Critical. Rev. Food. Sci. Nutri.*, **39**, 329-67.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Torre, P., & Izco, J. M. 2005. Use of wild *Lactobacillus* strains in an adjunct culture for a Roncal-type cheese. *J. Dairy. Res.*, **72**, 168-178.
- Sanches-Silva, A.; Lopez-Hernandez, J.; Paseiro-Losada, P. 2005. Profiling flavor compounds of potato crisps during storage using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A.*, **1064**, 239-245.
- Sanches-Silva, A.; Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A.; Lopez-Hernandez, J.; Paseiro-Losada, P. 2004. Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **1046**, 75-81.

- Schmidt S., Berger R.G. 1998. Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *Lebensm-Wiss Technol.*, **31**, 559-567.
- Sedewitz, B., Schleifer, K. H., & Gotz, F. 1984. Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.*, **160**, 462-465.
- Stolz, P., Vogel, R. F., & Hammes, W. P. 1995. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. II. *Lactobacillus pontis*, *Lact. reuteri*, *Lact. amylovorus* and *Lact. fermentum*. *Zeit. Lebens. Unt. Forsch.*, **201**, 402-410.
- Toldra F. 2002. Dry-cured meat products. Trumbull: Food & Nutrition Press. 244 p.
- Vazquez, J. A., Docasal, S. F., Prieto, M. A., Gonzalez, M. A., & Murado, M. A. 2008. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-silage of fishing by-products, *Biores. Tech.*, **99**, 6246-6257.
- Viallon C., Berdague J.L, Montel M.C, Talon R, Martin J.F., Kondjoyan N., Denoyer C. 1996. The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausages, *Food. Res. Int.*, **29**, 667-74.

### V-3. Conclusions : Caractérisation des composés volatils issus de la dégradation des acides gras

L'étude des composés volatils issus des cellules lyophilisées de *Lactobacillus plantarum* CWB-B1419 montre la présence de divers composés parmi lesquels, l'hexenal qui est détecté en quantité notable. La présence de composés volatils principalement l'hexenal montre la corrélation entre la dégradation des acides gras par le phénomène d'oxydation. Les produits secondaires de cette oxydation sont en général des aldéhydes, des cétones, des alcanes et des dérivés aminoacides. En ce qui concerne ces composés secondaires d'oxydation, de nombreux indices chimiques permettent de doser les aldéhydes (indices de paranisidine, test TBA, indice de carbonyle...) mais avec une sensibilité et un domaine d'application parfois réduits. Des composés volatils sélectionnés (hexenal, pyrazine, 2,5 diméthyl, butanol triméthyl ester, 1,3-dihydroxybutane, butane-2,3-diol, pyrimidine, 2-(2-nitro-3-thienyl), 16-oxosalutaridine) ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse après microextraction en phase solide. Parmi les composés identifiés par la SPME-GC-MS, le taux de l'hexenal est relativement important au cours du stockage. Les résultats ont montré que les concentrations de la plupart de ces composés augmentaient au cours du stockage, surtout à température ambiante (25°C). Il se formait plus de composés d'oxydation des lipides dans les poudres sans cryoprotecteur que dans celles avec cryoprotecteurs, cependant plus faiblement en l'absence d'oxygène. La présence des composés volatils (hexenal) est proportionnelle à celle des hydroperoxydes au cours du stockage.

## Chapitre VI

---

Analyse des phospholipides de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage



## VI. Analyse des phospholipides de *L. plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage à température ambiante

---

### VI-1. Contexte et objectifs

L'objectif de cette partie de notre travail, consistera à mettre en évidence la relation entre le taux de mortalité et la présence des composés primaires (hydroperoxydes) au cours du stockage dus à la dégradation des acides gras polyinsaturés. Cette étude permettra de comprendre certains mécanismes à l'origine de la perte de stabilité des souches lyophilisées. Certes, l'oxydation des lipides membranaires des bactéries fait depuis un certain temps l'objet d'intenses recherches, mais il existe très peu d'études qui mettent en relation le taux de mortalité en relation avec la modification de la composition des phospholipides membranaires des cellules lyophilisées. Dans cette étude, nous mènerons des expérimentations afin de montrer l'existence de liens entre l'oxydation des lipides membranaires et la perte de viabilité cellulaire ou du pouvoir d'acidification de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 lyophilisé au cours du stockage. Selon les résultats précédents (**Chapitres IV & V**), nous avons démontré qu'au cours du stockage en présence d'oxygène et d'humidité, il se produisait une accumulation de produits primaires de dégradations issues des acides linoléiques et linoléiques de même que les produits secondaires volatils détectés par SPME. L'intérêt de ce chapitre-ci serait de montrer que la mortalité cellulaire est un résultat de la modification de la composition phospho-lipidique de la membrane de bactéries lactiques lyophilisées en général et en particulier de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419, notre souche de référence.

## VI-2. Effect of storage temperature on phospholipids compositions and viability upon *Lactobacillus plantarum* CWB-B1419

---

Publication 7 – *Microbiol. Appl. Biotechnol.*

*Microbiology and Applied Biotechnology*

Coulibaly, I<sup>(1\*)</sup>., Destain, J<sup>(1)</sup>., Dubois-D, R<sup>(1)</sup>., Lognay, G<sup>(3)</sup>., Fauconnier, M.L<sup>(4)</sup>  
and Ph. Thonart <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(2)</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium.

<sup>(3)</sup>Analytical Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>(4)</sup>Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium.

---

\* **Corresponding Author** : I. Coulibaly, Phone : +3281622305, Fax : +32816614222  
E-mail : [conl\\_lam@yahoo.fr](mailto:conl_lam@yahoo.fr)

## Résumé

Les lipides totaux de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 ont été analysés après lyophilisation. Sept classes de lipides particuliers ont été identifiées comme étant des lipides neutres (LN), des acides gras (AG), des phospholipides (PL), des esters de stérol (ES), des triglycérides (TG), diglycérides (DG) et monoglycérides (MG). Les principaux acides gras identifiés dans la plupart des classes lipidiques sont les acides : palmitique (C<sub>16:0</sub>), palmitoléique (C<sub>16:1</sub>), oléique (C<sub>18:1</sub>), linoléique (C<sub>18:2</sub>) et l'acide linoléique (C<sub>18:3</sub>). Les phospholipides (PL) sont les principaux constituants et représentaient 50-60% des lipides totaux. Ces phospholipides ont été fractionnés. Les phospholipides de *L. plantarum* CWBI-B1419 contiennent : l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylcholine (PC), la sphingomyéline (SM), la lysophosphatidylcholine (LPC) et la phosphatidylglycérol (PG). On a observé que la PG était en proportion plus élevée dans la plupart des pourcentages relatifs aux autres PL et était le composant prédominant des PL (30% -56%). L'évolution du taux individuel de chaque PL a été suivi au cours du stockage à 20°C et 40°C avec ou sans Lithothamne 400<sup>®</sup>, respectivement.

**Mots-clés:** bactéries lactiques, acides gras, classes de phospholipides, détection par diffusion de la lumière, survie, température.

## Abstract

The total lipids of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 were analysed after freeze-drying. Seven individual lipids classes were identified namely neutral lipids (NL), fatty acids (FA), phospholipids (PL), sterols ester (ES), triglycerides (TG), diglycerides (DG) and monoglycerides (MG). The principal fatty acids identified in most lipid classes were palmitic (C<sub>16:0</sub>), palmitoleic (C<sub>16:1</sub>), oleic (C<sub>18:1</sub>), linoleic (C<sub>18:2</sub>), and linolenic (C<sub>18:3</sub>). PL were the major constituents and accounted for 50-60% of the total lipids. PLs were fractionated. PL of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 content phosphatidic acid (PA), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM), lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidylglycerol (PG). It was observed that PG had the highest proportion at most points relative to other PL and was the predominant component of PL (30%-56%). Evolution of individual rate was followed during stored at 20°C and 40°C with or without lithothamne®400, respectively.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Fatty acids, phospholipids class separation, light scattering detection, survival, temperature.

### Nomenclature

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>PA</b> : phosphatidic acid        | <b>TL</b> : total lipid                                     |
| <b>PE</b> : phosphatidylethanolamine | <b>NL</b> : neutral lipids                                  |
| <b>PI</b> : phosphatidylinositol     | <b>PL</b> : phospholipids                                   |
| <b>PC</b> : phosphatidylcholine      | <b>FD</b> : freeze-drying                                   |
| <b>SM</b> : sphingomyelin            | <b>C</b> : cell suspension without protective compound      |
| <b>LPC</b> : lysophosphatidylcholine | <b>CL</b> : cell suspension with 8% lithothamne 400         |
| <b>PG</b> : phosphatidyl-DL-glycerol | <b>FFA</b> : free fatty acid                                |
| <b>SPE</b> : solid phase extraction  | <b>ELDS</b> : evaporative light scattering detection signal |
| <b>ES</b> : esters de stérol         | <b>TG</b> : triglycerides                                   |
| <b>MG</b> : monoglycerides           | <b>DG</b> : diglycerides                                    |

## VI-2.1. Introduction

For the last decade, HPLC has been the method of choice for the separation and quantification of phospholipids (PL) classes. This methodology has the advantage of avoiding the extensive derivatization needed in GC analysis of PL (Descalzo *et al.*, 2003). Previous studies have demonstrated that the properties of an ELSD are useful for a quantitative HPLC detection of lipid classes within different polarity classes (Homanzt *et al.*, 1998). This detection method has been described as highly sensitive for neutral lipids and phospholipids, with an acceptable reproducibility to enable quantification (Grizard *et al.*, 2000 ; Silversand *et al.*, 1997). A clear benefit of this technique is the possibility of detecting lipophilic substances independent of the absorption properties of eluents or samples and without any probe labeling of detected molecules (Seppänen-Laasko *et al.*, 2001). The signal intensity of an ELSD seems to be dependent on the development of droplets of eluents by the nebulizer/evaporator, as well as on the detector temperature. Nowadays, the use of an ELSD eliminates problems of derivatization methodology and transparent of mobile phase in UV associated with other HPLC detectors and allows qualitative/quantitative studies of nonvolatile analytes (Mounts *et al.*, 1990 ; Patton *et al.*, 1982 and Stolyhwo *et al.*, 1984). For example, unlike refractive index and low-wavelength UV, ELSD uses multisolvent gradients to improve resolution and perform faster separation of the eluted compounds (Christie *et al.*, 1985 ; Vaghela *et al.*, 1995 and Mounts *et al.*, 1992). Therefore, an HPLC-ELSD system could analyze underivatized intact lipids, thus saving time and avoiding losses during derivatization and hydrolysis. Evaporative light scattering is based on the detection of nonvolatile molecules carried by a volatile mobile phase. The column effluents are nebulized to an aerosol, followed by volatile compound vaporization and formation of small solute droplets. The laser light scattered by these droplets is detected by a photodiode (Stolyhwo *et al.*, 1992). The separation of all PL classes from different matrixes by use of a variety of multisolvent gradients had been reported previously (Van der Meeren *et al.*, 1988 ; Juanéda, *et al.*, 1990 ; Christie *et al.*, 1988 and Picchioni *et al.*, 1996). Lipids ranging from cholesterol to lysophosphatidylcholine (LPC) can be resolved in a single normal-phase HPLC run using a gradient of increasing polarity. Even nonpolar molecules like hydrophobic pulmonary surfactant proteins can be accurately detected by ELSD (Bünger *et al.*, 200). The polarity of different lipid classes

constitutes a useful tool allowing PL separation. Solid-phase extraction (SPE) takes advantage of this property and has been used as an alternative to liquid–liquid extraction. A selective elution of the desired compounds can be obtained with SPE by simple fractionation of the analytes through differences in their polarity (Wachob *et al.*, 1991). For dairy products like freeze-dried LAB, important phospholipids are phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylcholine (PC). Important sphingolipids in dairy products are sphingomyelin (SM), glucosylceramide and lactosylceramide. Lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidic acid (PA) are rarely reported in dairy products; when they do appear, it is likely due to careless sample preparation or to phospholipase activity (Christie *et al.*, 1987). The aim of this study was to determine the distribution of individual molecular species of phospholipids of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 during storage at 20°C and 40°C with or without lithothamne 400® respectively by HPLC-ELSD.

## **VI-2.2. Materials and methods**

### **VI-2.2.1. Strain and culture**

The fermentation in a 20L bioreactor was performed in triplicate, using the culture medium and the operational parameters of 30°C, 120 rpm, and pH 6, controlled. The fermentation time was 17h. The biomass was centrifuged in a Beckman Avanti J-25 High-Performance Centrifuge Systems (Analys, Belgium) centrifuge. The cream was collected, and analysis of dry matter content, viability, and pH of the cream was performed; this cream was the raw material for the freeze-drying according to Armando *et al.*, 2006. The viable counts were obtained by plate count method after 48 h. Acidification was carried out at 30°C in 150 ml MRS broth inoculated with 1% of 10<sup>7</sup> cfu ml<sup>-1</sup> of the freeze-dried sample. The total titratable acidity (% of lactic acid/g DW) was determinate after 18 h, according to the AOAC method, (1997).

### **VI-2.2.2. Solvents and standards**

*Reagents.* *n*-Hexane, 2-propanol, methanol, and water were HPLC grade from VWR International bvba Haasrode Resaerchpark, Geldenaddksebaan 464 B-3001 Leuven. All

other chemicals were analytical reagent grade. L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine (PE), L- $\alpha$ -phosphatidyl-DL-glycerol (PG), phosphatidic acid (PA), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC), L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC), L- $\alpha$ -phosphatidylinositol (PI) and sphingomyelin (SM) with purity of approximately 98% were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). To prepare calibration curves, standards were diluted by the appropriate solvent considering its solubility. Duplicate injections of each dilution were used.

### **VI-2.2.3. Lipid extraction**

Fatty acids were extracted overnight from dried cells of *Lactobacillus plantarum* ( $2 \pm 0.2$  g), with ether-ethanol (3:1v/v) mixture according to an adaptation of the method of Ito *et al.*, (1969). The extraction was performed by successively adding 10mL of chloroform containing butyl-hydroxy-toluene (0.01%), 10 mL of chloroform and 12.8 mL of NaCl (1.56%). After each new addition, the mixture was homogenized by a 20s blending period (Ultra-turrax, IKA, Staufen, Germany). The mixture was centrifuged for 10 min at 6000 *g*. Total lipids (TL) were obtained by collecting an aliquot (10 mL) of the chloroform phase. During the extraction procedure, tubes were kept at 0-4°C.

### **VI-2.2.4. Solid-phase extraction (SPE)**

After evaporation of the chloroform, the TL extract was diluted in 1.5mL of chloroform/methanol (2:1, vol/vol). The organic phase was collected into a conical vial, evaporated to dryness under a nitrogen stream, and made up to 0.5-mL final volume with chloroform. The extract was applied to the top of a normal-phase silica cartridge (Bond Elut NH<sub>2</sub>, Anion Exchange, varian Inc. N.V, Varian S.A, Belgium) that had been previously conditioned with 10 mL of chloroform. Sequential elution was performed with the cartridge column was equilibrated by rinsing twice with 2 ml of hexane using the Supelco extraction apparatus. Lipids dissolved in 10 mL of chloroform were loaded onto the column and the chloroform was pulled through. There after, the column was eluted with 4 ml of a chloroform-2-propanol 2:1 mixture (neutral lipid fraction). Then, 4 ml of ether containing 2% acetic acid followed by 4 ml of methanol was applied to elute free fatty acids and neutral phospholipids, respectively (Hee-Yong *et al.*, 1990). Finally, acidic lipids were eluted using 4 ml of a mixture of hexane-2-propanoethanol-0.1 M ammonium

acetate in water-formic acid 420:350:100:50:0.5 containing 5% phosphoric acid 20 mL of chloroform, 5 mL of acetone, and 20 mL of methanol. To prevent the oxidation of polyunsaturated chains during PL extraction, 0.02% wt/vol BHT was added to the solvents. This procedure separates neutral lipids, and polar lipids (Wachob *et al.*, 1991 ; Linard *et al.*, 1989). The methanol extract was dried at 40°C under a nitrogen stream, dissolved in 1 mL of chloroform, and filtered through a 0.2 µm nylon membrane, the PL fraction was diluted in 2mL *n*-Chloroform–methanol solution (80:20 before injection onto the HPLC according to **tab. 19**.

**Table 19.** HPLC Gradient Scheme

|  | Time (min) |     |     |     |      |    |     |     |     |     |
|--|------------|-----|-----|-----|------|----|-----|-----|-----|-----|
|  | 0          | 5   | 10  | 13  | 13:1 | 15 | 17  | 24  | 25  | 30  |
| MeOH(%) <sup>a</sup>   | 0          | 0   | 45  | 45  | 60   | 80 | 100 | 0   |     |     |
| ACN (%)  | 0          | 0   | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 100 | 100 |     |
| Isopropanol/hexane<br>(40:60,v/v) (%)                        | 100        | 0   | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 0   | 0   | 100 |
| Isopropanol/hexane/H <sub>2</sub><br>O (63:35:2, by vol) (%) | 0          | 100 | 55  | 55  | 40   | 20 | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Flow (mL/min)  | 1          | 1   | 0.8 | 0.8 | 1    | 1  | 1   | 0.8 | 0.8 | 0.8 |

<sup>a</sup> Percentage of each component of the mobile phase is indicated. ACN, acetonitrile.

#### VI.2.2.5. HPLC-ELSD of the PL fraction

- *HPLC methodology.* The Spectra System HPLC from Thermo Separation Products (TSP) included a P4000 quaternary pump and an autosampler AS3000 with an injection valve of 100-µL sample loop. The separation system consisted of a 3-µm Waters Spherisorb Silica column of 120 × 4.6 mm with a silica guard column. The column oven was set at 30°C. All equipment was connected through an SN4000 interface with the data acquisition system software PC1000 (TSP).

- *Detector calibration.* The evaporative light-scattering system consisted of a ELSD Model 500 detector (Alltech, Deerfield, IL). An interface module converted the ELSD analog signal to digital data that could be processed by the computer. The suitable signal-to-noise ratio was determined by injection and detection of PL standards. A drift tube temperature of 70°C, a gas flow rate of 1.98 standard liters per minute, and a gas pressure of 13.1 psi (0.090 MPa), were the most convenient parameters. High-purity N<sub>2</sub> was used



as nebulizer gas. Under these conditions, vaporization of the solute did not occur, and there was also a stable baseline with attenuation factor of 1. The PL fractions (10  $\mu$ L) were injected. The gradient system used for the separation of the major PL classes is given in Table 1. All solvents were degassed and filtered prior to analysis.

- *Repeatability and recovery assays.* Repeatability was determined for all the analytes, which were present in total lipids. One batch sample was divided into three aliquots of 1 mL each, which were subjected to the HPLC-SPE procedure. The percent recovery was determined for PC, the component present in the largest amount in the analyzed sample (74-85% of the total PL). Total lipid (1 mL) was enriched with 2 mg of standard and analyzed by using the HPLC-SPE procedure. Three independent samples were prepared.

- *Calibration curves.* A response calibration curve for each class of PL was prepared. Standards were diluted with the appropriate solvent, considering the solubility of the PL. Duplicate 10- $\mu$ L injections of each dilution were used in the range from 1 to 40  $\mu$ g for three separate replicates for each analyte. The hypothesis of linearity was tested by using the Linear Regression Model (GLM) procedure, a package program of the Statistical Analysis System (SAS, Cary, NC).

## VI-2.3. Results

### VI-2.3.1. *L. plantarum* CWBI-B1419 growth characteristics

**Table 20.** Survival after freeze-drying process at 20°C and 40°C for 90-day, kinetic parameters of growth and substrate consumption of *L. plantarum* CWBI-B1419 in batch culture

|           | Cell count (cfu/DW)  |                      |                      |            |      | Parameters <sup>b</sup>  |                 |                   |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|------------|------|--------------------------|-----------------|-------------------|
|           | Before F.D           | During storage       |                      | % Survival |      | $\mu$ (d <sup>-1</sup> ) | $X_{max}$ (g/l) | $Y_{x/sub}$ (g/g) |
|           |                      | 20°C                 | 40°C                 | 20°C       | 40°C |                          |                 |                   |
| <b>C</b>  | 8,8.10 <sup>11</sup> | 1,5.10 <sup>11</sup> | 1,7.10 <sup>10</sup> | 17         | 2    | 0.59 ± 0,01              | 10.2 ± 0,02     | 0.48 ± 0,02       |
| <b>CL</b> | 7,1.10 <sup>11</sup> | 2,7.10 <sup>11</sup> | 4,9.10 <sup>10</sup> | 38         | 7    |                          |                 |                   |

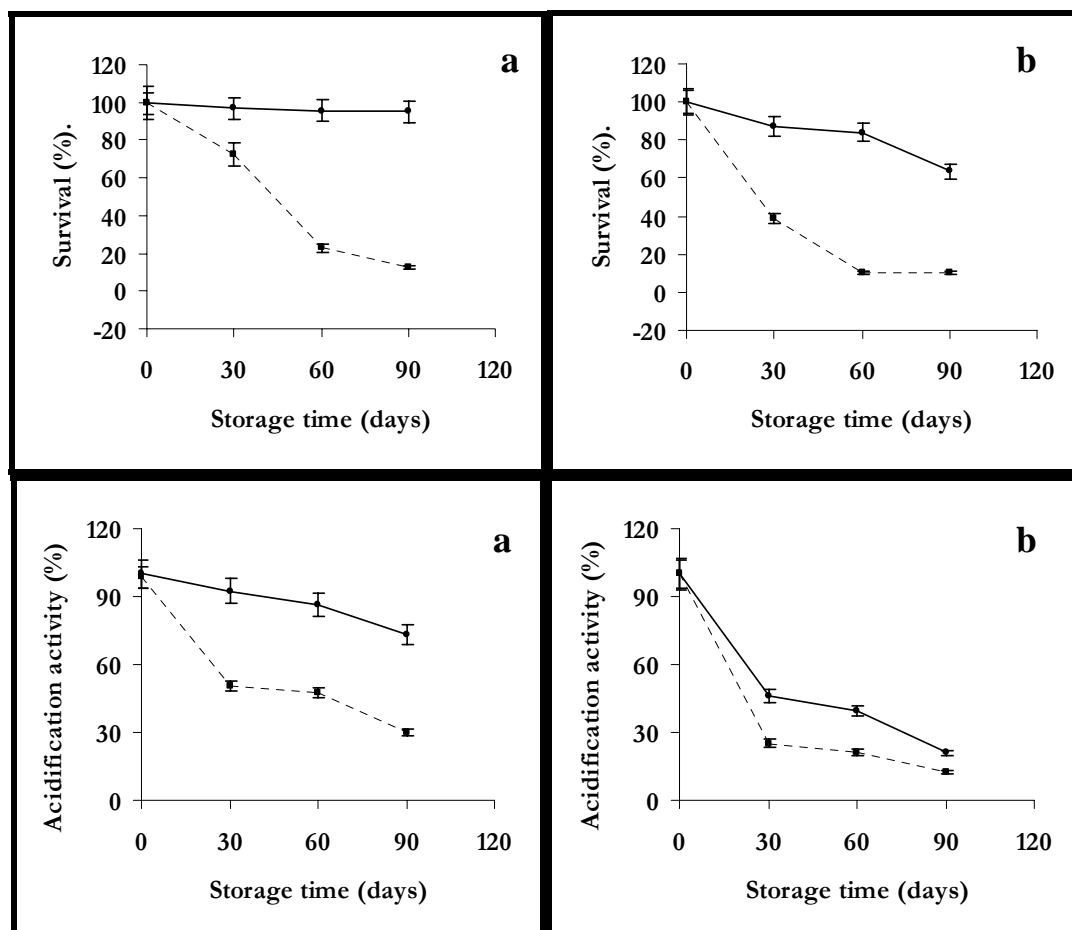
<sup>a</sup> All values were means of three measurements and expressed as means  $\pm$  standard deviation.

<sup>b</sup>  $\mu$ , specific growth rate (d<sup>-1</sup>);  $X_{max}$ , maximum biomass concentration (g/l);  $Y_{x/sub}$ , growth yield based on substrate(g/g). **C**: cells without lithothamne, **CL**: cells with lithothamne.

The kinetics of cell growth and glucose consumption of *L. plantarum* are shown in **tab. 20**. The bacteria grew well with specific growth rate of  $0.59\text{d}^{-1}$ . The growth yield coefficient, based on substrate,  $Y_{x/\text{sub}}$ , was  $0.48\text{ g/g}$ . The highest biomass concentration,  $X_{\text{max}}$  of  $10.20\text{ g/l}$  was obtained after 16 hours. The kinetic growth parameters obtained in this study were comparable to those reported by [Armando \*et al.\*, 2006](#).

### VI-2.3.2. Biochemical behaviour of *L. plantarum* CWBI-B1419 during storage

*L. plantarum* CWBI-B1419 was produced in the bioreactor, freeze-dried, and held at  $20^{\circ}\text{C}$  or  $40^{\circ}\text{C}$  in vacuum-sealed aluminium foil for 90 days.

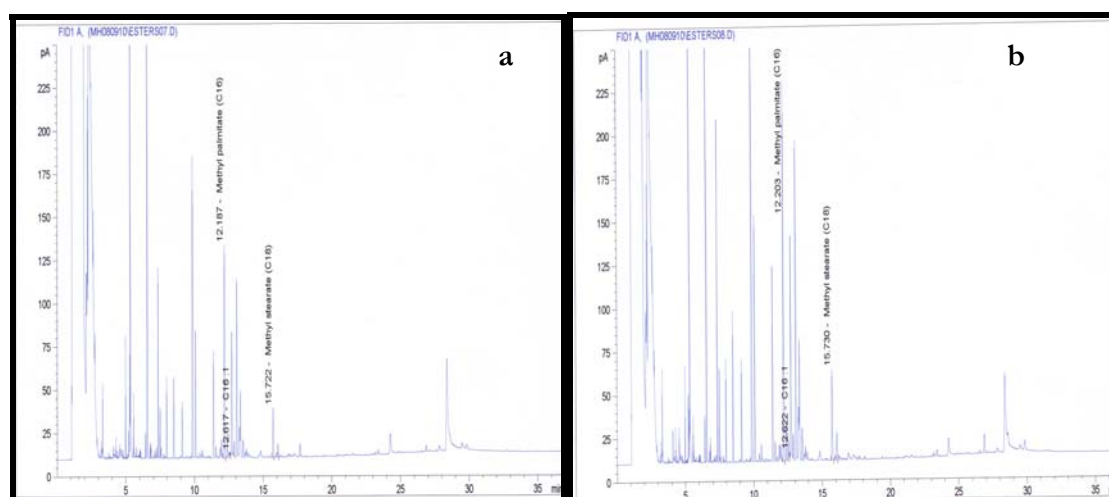


**Figure 33.** Behaviour of freeze dried *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 in function of survival rate and acidification activity during 90 days at **a)**  $20^{\circ}\text{C}$  or **b)**  $40^{\circ}\text{C}$ , with lithothamene (-●-) or without lithothamene (-■-). Values are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD,  $n=3$ ).

According to the curves illustrated in **fig. 33**, the decreasing of acidification activity and survival rate are closely related to the storage temperature. After 90 days of storage, there is a survival and acidification activity significantly higher for lyophilized powder stored at 20°C vacuum foil contrast to those stored at 40°C in the same conditions. For comparison, the viable population of the strain lyophilized and stored in sealed foil under vacuum has been affected and we note that from an initial population of  $8,8.10^{11}$  to  $1,5.10^{11}$  or  $1,7.10^{10}$  cfu/g without lithothamne<sup>®</sup>, we have a survival percentage of 17% and 2% respectively after 90 days at 20°C and 40°C. But after 90 days at 40°C under the same conditions but with lithothamne<sup>®</sup>, the viable population was about to  $7,1.10^{11}$  to  $2,7.10^{11}$  or  $4,9.10^{10}$  cfu/g with a survival of 38% and 7% at 20°C and 40°C respectively. When the activity of acidification strain lyophilized and stored under the conditions mentioned above there is a decrease of 24% or 60% with freeze-dried cell cell with lithothamne<sup>®</sup> after a period of 90 days storage at 20°C and 40°C, respectively.

### VI-2.3.3. Free fatty acids and lipids compositions

Free fatty acids (FFAs) from two freeze-dried powders of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 (with lithothamne and without lithothamne at 20°C and 40°C, respectively) were analysed. **Fig. 34** shows the mean relative contents of these FFAs.

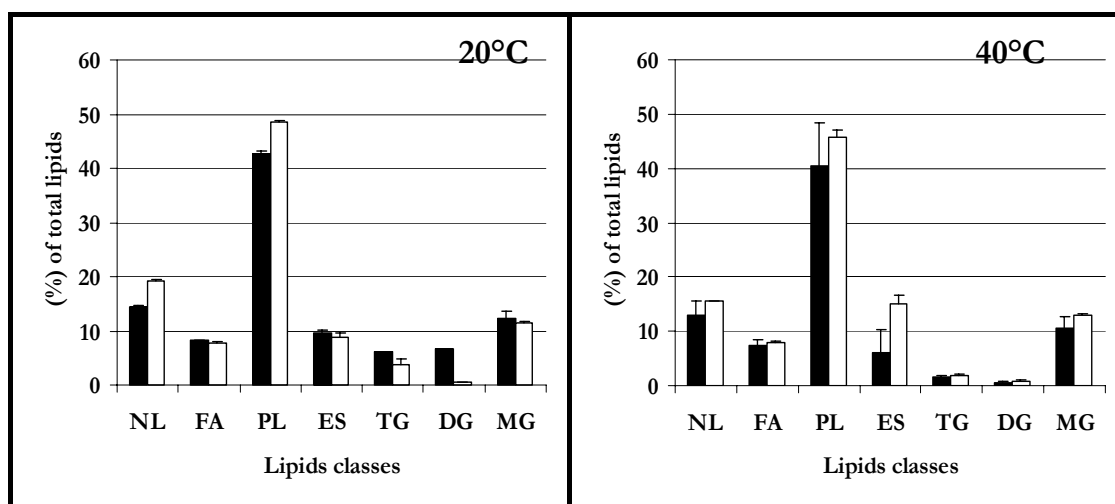


**Figure 34.** Free fatty acids profile of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 **a)** after freeze-drying without lithothamne<sup>®</sup>400, (**C**); **b)** after freeze-drying with lithothamne<sup>®</sup>400, (**CL**).

Assay of the constituent fatty acids of *L. plantarum* CWBI-B1419 revealed predominantly esters of palmitic (C<sub>16:0</sub>), palmitoleic (C<sub>16:1</sub>), oleic (C<sub>18:1</sub>), linoleic (C<sub>18:2</sub>), and linolenic (C<sub>18:3</sub>) acids in variable proportions. The palmitic (C<sub>16:0</sub>) accounted from 52.4% to 55.4% without or with lithothamne at the end of freeze-drying, respectively. Palmitoleic (C<sub>16:1</sub>) making a smaller (on average 7.0-7.4%) and oleic (C<sub>18:1</sub>) from 23.5 to 27.2%, without or with lithothamne, respectively. The C<sub>18:2</sub> and C<sub>18:3</sub> represent the smallest percentages less than 1% to the total fatty acids. There was no significant difference in FFAs of *C* and *CL*.

#### VI-2.3.4. Fatty acids distribution in lipids classes

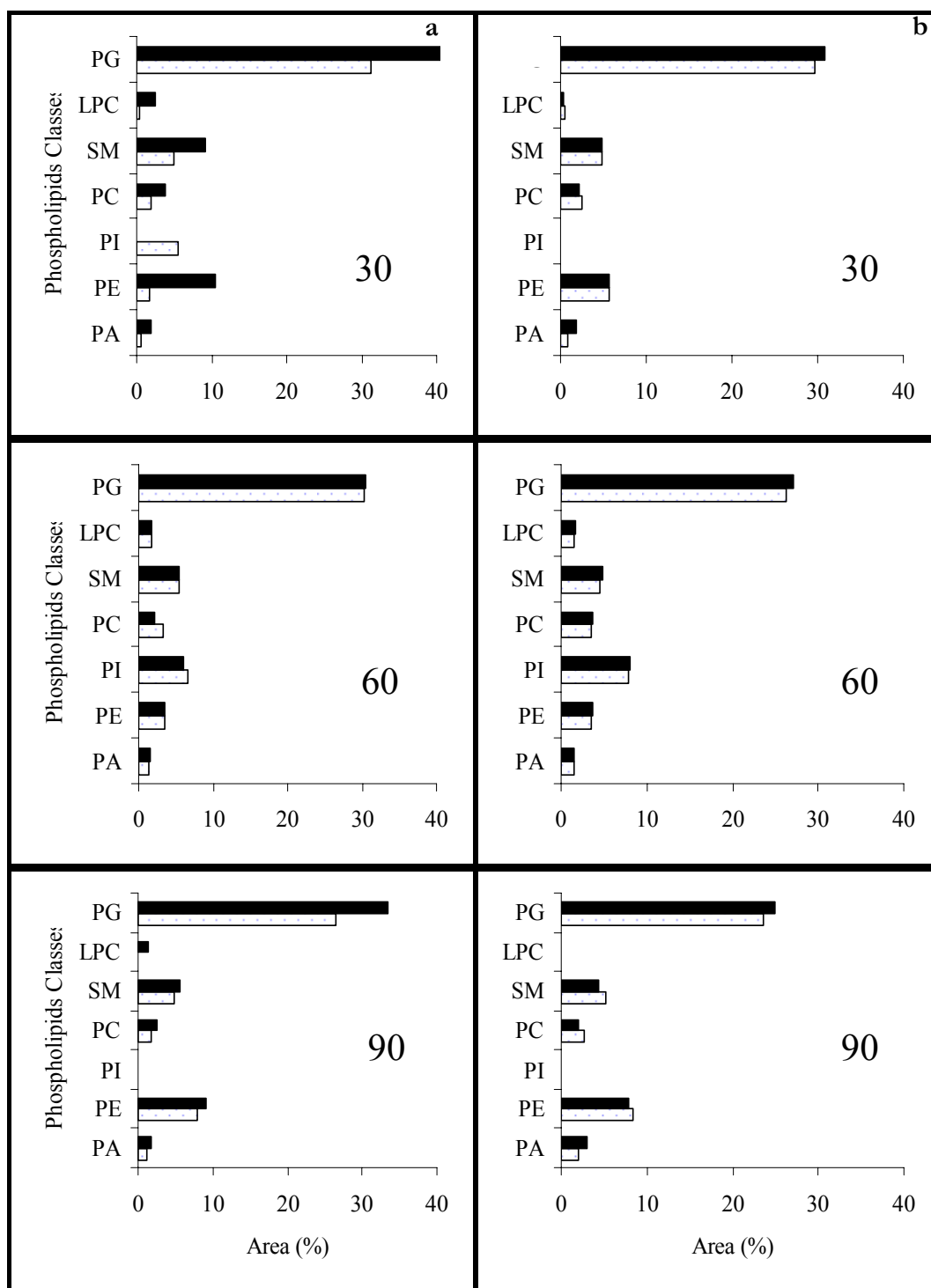
Fatty acid profiles of different lipid fractions of *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 are depicted in **fig. 35**. PL was mainly composed of unsaturated fatty acids, C<sub>16:1</sub> and C<sub>18:1</sub> which altogether represented 60.54% of the total fatty acids (TFA) in this lipid fraction. The saturated fatty acids palmitoleic C<sub>16:0</sub> and stearic C<sub>18:0</sub> represent almost 40% of this total. PL content high proportion of saturated fatty acids than NL. There was significant difference in NL and PL according to saturated fatty acids. The fatty acid profile of PL was quite different from those of NL and TL.



**Figure 35.** Individual lipid class content (% of total lipids) of *L. plantarum* CWBI-B1419. Symbol : (□) freeze-dried strain without lithothamne, (■) freeze-dried strain with 8% lithothamne<sup>®</sup>. Values are represented as means ± standard deviation of triplicates.

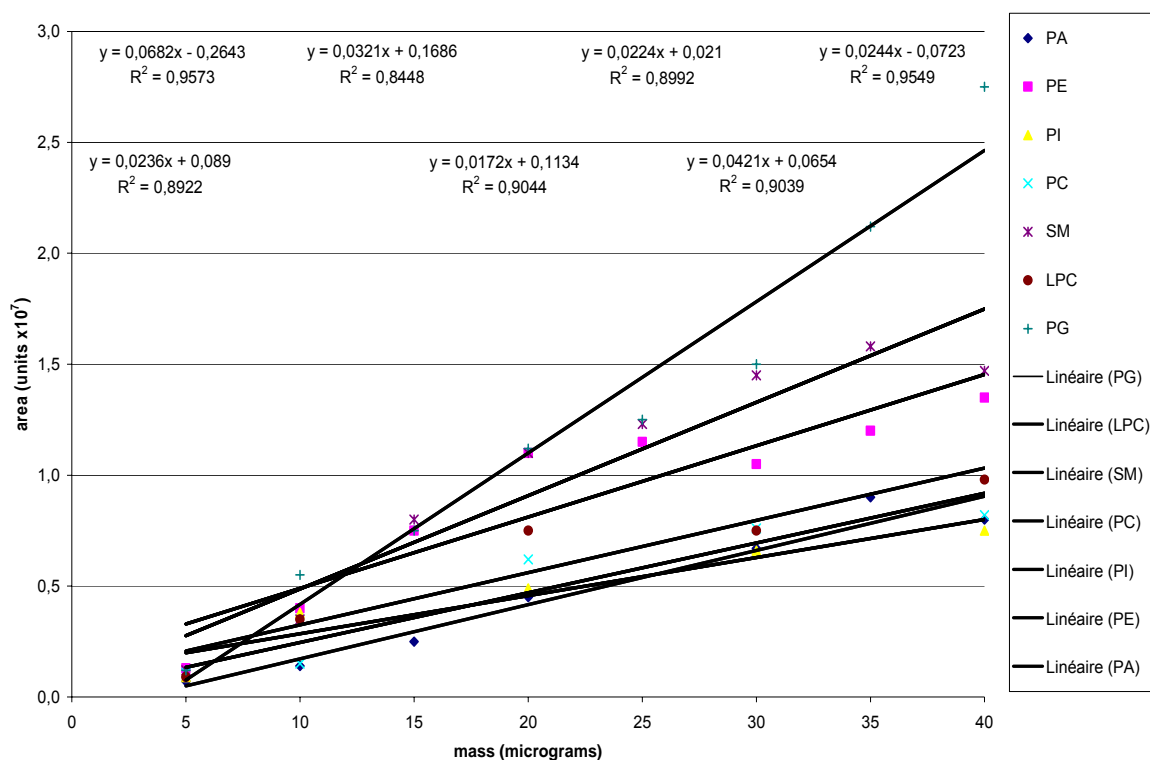
The contents of other MUFAs, such as C<sub>18:1</sub> and C<sub>16:1</sub> was also in the sample order but slightly high in PL fraction. The percentages of unsaturated fatty acids of PL were 8.99% and 31.5% for C<sub>16:1</sub> and C<sub>18:1</sub> respectively (data are not show).

VI-2.3.5. HPLC procedure for the separation and quantification of phospholipids in the PL fraction



**Figure 36.** Percentage composition of phospholipids classes in freeze-dried powder of *L. plantarum* CWBI-B1419. Symbols: ■ freeze-dried powder with lithothamne® (CL), □ freeze-dried powder without lithothamne® (C) at 30, 60 and 90 days.

The detection methods of PL in HPLC involve direct measurement of total phospholipids. Direct measurement of PL has been accomplished using an automated total phospholipides analyzer named Evaporative Light Scanning Detector (ELSD), coupled with HPLC system. It was found that fatty acid of *L. plantarum* CWBI-B1419 was dominated by NL and PL which represented almost 20% and 50% of total lipid extract (**fig. 35**). As a consequence, quantification of the polar lipid classes required purification of the total lipid extract with aminopropyl cartridges by SPE. After SPE, the main rapeseed lipid components PA, PE, PI, PC, SM and LPC were separated with symmetrical peaks as shown in **fig. 35 & 36**. PL from power stored at 20°C has been described as having the following phospholipids distribution after 90 days: PA (7.45, 5.31 wt%) ; PE (21.15, 19.98 wt%) ; PI (34.26, 31.46 wt%) ; PC (7.05, 6.0 wt%) ; SM (22.87, 22.27wt%) and LPC (18.10, 10.09%wt) respectively, with or without lithothamne®. The profile at 40°C with or without lithothamne was similar. Linearity was obtained within the 5 to 40 µg range ( $p < 0.001$ ) by using the Linear Regression Model (GLM) procedure, a package program of the Statistical Analysis System (SAS, Cary, NC). Each point represents the mean value of duplicate injections for three separate replicates.



**Figure 37.** Calibration curves: mass of PL vs. ELSD response in 10 µL of injection volume.

Results are given as linear curves of phospholipids extracted of three separate extractions from the same sample of *L. plantarum* CWBI-B1419 freeze-dried. Each curve includes a linear equation of the regression line as well as the  $R^2$ .

The experiments were performed thrice. SPE, the solid phase extraction has yielded the following phospholipids: PA, phosphatidic acid ; PE, phosphatidylethanolamine ; PC, phosphatidylcholine ; PI, phosphatidylinositol ; SM, sphingomyelin; LPC lyso-phosphatidylcholine ; PG, phosphoglycerol as shown by **fig. 37**.

#### VI-2.4. Discussion

Detection of phospholipids is favored because (i) lipids are extracted by the hydrophobic solvent and (ii) SPE selectively desorbs surface-active molecules such as polar lipids, though not all types equally well. Many studies have focused on the lipid composition of *Lactobacillus* spp. (Exterkate *et al.*, 1971 ; Thorne, 1961 ; Uchida, 1973). Authors such as (O'Leary *et al.*, 1988 ; Ikawa *et al.*, 1963) showed that lactobacilli are generally composed of n-C<sub>16:0</sub>, n-C<sub>18:1</sub> and C<sub>19</sub> CYC-carboxylate as the main constituents with a small amount of n-C<sub>14:0</sub>, n-C<sub>16:1</sub>, and n-C<sub>18:0</sub> and traces in some species (Drucker, 1994). These atypical profiles in terms of fatty acids are those of gram-positive, but the main groups are the common gram-positive bacteria (O'Leary, 1988). The analysis of polar groups in *L. plantarum* B1419-CWBI revealed the same trends and showed that the majority of polar lipids is composed of phosphatidylglycerol (PG). These results are fully consistent with studies by Fischer *et al.* (1978). As for other components such as phosphatidic acids, diphosphatidylglycerol (cardiolipin), phosphatidylglycerol (Exterkate *et al.*, 1971 ; Fischer *et al.*, 1999), phosphoglycolipids and diglycosyldiacylglycerol (Heller *et al.*, 1988), there are small quantities. During storage we noticed a decrease in PG for freeze-dried at 20°C while at 40°C not only PG but also decreased PE and SM begin a significant decline in 90 days. These results are similar to those we obtained with *L. plantarum*. At this temperature the powders without lithothamne are most vulnerable. As explanation and following this period the decrease in the ratio unsaturated/saturated fatty acids and cell death occurred essentially at the same rate (data are not showed). As stated before, the mechanisms of death during storage are still unknown but from these results it seems evident that lipid oxidation and survival during storage may be related. This is

supported by indirect evidence presented in previous reports. For example, it is reported that the presence of antioxidants increased the survival rate of dried bacteria during storage (Porubcan *et al.*, 1975 ; Teixeira *et al.*, 1995b). Dimmick *et al.* (1961) found a strong similarity between the loss of viability and the increase in free-radical concentration during storage of freeze-dried *Serratia marcescens*. Work done by Marshall *et al.* (1974) supports the hypothesis that reactions between carbonyl compounds and cellular components are a major cause of mortality during storage of dried micro-organisms. The nature of these compounds was not presented but it is possible that they are products formed during lipid oxidation. Slater, (1984) reported that, in eukaryotic cells, extensive lipid peroxidation can result in membrane disorganization by peroxidizing mainly the highly unsaturated fatty acids leading to changes in the ratio of unsaturated to other fatty acids. The uncontrolled peroxidation of biomembranes can thus lead to profound effects on membrane structure and function, and may be sufficient to cause cell death.

### VI-2.5. Conclusion

The present method thus *Lactobacillus* phospholipids almost free of triglycerides in one step and does not require the pre-extraction of total lipids is conventional. These methods have been successfully used and have given a satisfaction in our analysis for our isolation of phospholipids from bacteria and plant tissues. Work for monitoring changes in phospholipids classes will be conducted for other species in order to know the limits of the method.

### VI-2.6. Akwnoledge

The authors would like to acknowledge Ir Céline Pierart, Maryse Hardenne and Mr Vincent Hote for their contribution. We thank all the technical personal of CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle). We also like to express our gratitude to the Republic of Ivory Coast and the Communauté Française de Belgique for financial assistance.

### VI-2.7. References

Aluyi, H. S., V. Boote, D. B. Drucker, and J. M. Wilson. 1992. Fast atom bombardment-mass spectrometry for bacterial chemotaxonomy: influence of culture age, growth temperature, gaseous environment and extraction techniques. *J. Appl. Bacteriol.* 72:80-86.



- Armando, H., Frédéric, W., Jesús, M., Carlos, B., and Thonart, P. 2006. Freeze-drying of the biocontrol agent *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 Predicted stability of formulated powders, *Ind. Biotech.*, **2**, 209-212.
- Batley, M., N. H. Packer, and J. W. Redmond. 1982. Molecular analysis of the phospholipids of *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* 710:400-405.
- Becart, J., C. Chevalier, and J.P. Biesse. 1990. Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light scattering evaporative detector - application to raw material for cosmetic use, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **13**, 126-129.
- Bünger, H., and U. Pison. 1995. Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection, *J. Chromatogr. B. Biomed.Sci. Appl.*, **672**, 25-31.
- Christie, W. W. 1986. Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the "mass detector." *J. Chromatogr.*, **361**, 396-399.
- Christie, W. W., and R. A. Urwin. 1995. Separation of lipid classes from plant tissues by high-performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **18**, 97-100.
- Christie, W.W. 1985. Rapid Separation and Quantification of Lipid Classes by High Performance Liquid Chromatography and Mass (light-scattering) Detection, *J. Lipid Res.*, **26**, 507-512.
- Christie, W.W., and Morrison, W.R. 1988. Separation of Complex Lipids of Cereals by High-Performance Liquid Chromatography with Mass Detection, *J. Chromatogr.*, **436**, 510-513.
- Cole, M. J., and C. G. Enke. 1991. Direct determination of phospholipid structures in microorganisms by fast atom bombardment triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.* 63:1032-1038.
- Drucker, D. B. 1994. Fast atom bombardment mass spectrometry of phospholipids for bacterial chemotaxonomy, p. 18-35. *In* C. Fenselau (ed.), *Mass spectrometry for the characterization of microorganisms*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Eckard, P. R., Taylor, L. T. and Slack, G. C. 1998. Method Development for the Separation of Phospholipids by Subcritical Fluid Chromatography, *J. Chrom. A.*, **826**, 241.
- Exterkate, F. A., B. J. Otten, H. W. Wassenberg, and J. H. Veerkamp. 1971. Comparison of the phospholipid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* 106:824-829.
- Fang, J., M. J. Barcelona, and J. D. Semrau. 2000. Characterization of methanotrophic bacteria on the basis of intact phospholipids profiles, *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 67-72.
- Fenselau, C. 1994. Mass spectrometry for characterization of microorganisms. An overview, p. 1-17. *In* C. Fenselau (ed.), *Mass spectrometry for the characterization of microorganisms*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Fischer, W. 1990. Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids, p. 123-234. *In* M. Kates (ed.), *Handbook of lipid research*, vol. 6. Plenum Press, New York.
- Fischer, W., R. A. Laine, and M. Nakano. 1978. On the relationship between glycerophosphoglycolipids and teichoic acids in Gram-positive bacteria. II. Structures of glycerophosphoglycolipids, *Biochim. Biophys. Acta.*, 528,298-308.

- Grizard, G., B. Sion, D. Bauchart, and D. Boucher. 2000. Separation and Quantification of Cholesterol and Major Phospholipid Classes in Human Semen by High-Performance Liquid Chromatography and Light Scattering Detection, *Ibid.*, **740**, 101-107.
- He, J. Vaghela, M.N., and Kilara, A. 1995. Quantitative Analysis of Phospholipids from Whey Protein Concentrates by High Performance Liquid Chromatography with a Narrow Bore Column and an Evaporative Light-Scattering Detector, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **72**, 729-733.
- Cheung, A.P., Wang, E., Fang, K., and Liu, P. 2001. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for a Non-chromophore-containing Phosphatidyl Inositol Analog, 1-[(1-O-octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycero)-phospho]-1D-3-deoxy-*myo*-inositol, Using Indirect UV Detection, *J. Chromatogr. A.*, **913**, 355-363.
- Heller, D. N., C. M. Murphy, R. J. Cotter, C. Fenselau, and O. M. Uy. 1988. Constant neutral loss scanning for the characterisation of bacterial phospholipids desorbed by fast atom bombardment, *Anal. Chem.*, **60**, 2787-2791.
- Homan, R., and M.K. Anderson. 1998. Rapid Separation and Quantification of Combined Neutral and Polar Lipid Classes by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Mass Detection, *J. Chromatogr. B.*, **708**, 21-26.
- Ikawa, M. 1963. Nature of the lipids of some lactic acid bacteria, *J. Bacteriol.*, **85**, 772-781.
- Juanéda, P., Rocquelin, G., and Astorg, P.O. 1990. Separation and Quantification of Heart and Liver Phospholipid Classes by High-Performance Liquid Chromatography Using a New Light-Scattering Detector, *Lipids.*, **25**, 756-759.
- Lechevalier, M. P. 1977. Lipids in bacteria taxonomy - A taxonomist's view, *Crit. Rev. Microbiol.*, **7**, 109-210.
- Linard, A. 1989. Separation des Classes de Phospholipides par Chromatographie Liquide Haute Performance, *Cab. Techn. INRA.*, **20**, 41-48.
- Miwa, H., Yamamoto, M., Futata, T., Kan, K. and Asano, T. 1996. Thin-layer Chromatography and High-performance Liquid Chromatography for the Assay of Fatty Acid Compositions of Individual Phospholipids in Platelets from Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus Patients: Effect of Eicosapentaenoic Acid Ethyl Ester Administration, *J. Chrom. B.*, **677**, 217.
- Montanari, L., Fantozzi, P., Snyder, J.M. and King, F.W. 1999. Selective Extraction of Phospholipids from Soybeans with Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol, *J. Supercritical. Fluids.*, **14**, 87.
- Mounts T.L., Abidi, S.L., and Rennick, K.A. 1992. HPLC Analysis of Phospholipids by Evaporative Laser Light-Scattering Detection, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **69**, 438-442.
- Mounts, T.L., and Nash, A.M. 1990. HPLC Analysis of Phospholipids in Crude Oil for Evaluation of Soybean Deterioration, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 757-760.
- Munster, C., Lu, J., Schinzel, S., Bechinger, B. and Salditt, T. 2000. Grazing Incidence X-ray Diffraction of Highly Aligned Phospholipid Membranes Containing the Antimicrobial Peptide Magainin 2, *Eur. Biophys. J.*, **28**, 683.
- O'Leary, W. M., and S. G. Wilkinson. 1988. Gram-positive bacteria, p. 117-201. In C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.), *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London.
- Olsson, N. U. and Salem, N. Jr. 1997. Molecular Species Analysis of Phospholipids, *J. Chrom. B.*, **692**, 245.

- Patton, G.M., Fasulo, J.M., and Robins, S.J. 1982. Separation of Phospholipids and Individual Molecular Species of Phospholipids by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Lipid Res.*, **23**, 190-196.
- Picchioni, G.A., Watada, A.E., and Whitaker, B.D. 1996. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Plant Phospholipids and Glycolipids Using Light-Scattering Detection, *Lipids.*, **31**, 217-221.
- Row, K.H. and Lee, J.W., (1999). Gradient Separation of Soybean Phospholipids with Retention Factors of a New Polynomial Correlation, *Korean J. Chem. Eng.*, **16**, 170.
- Sas, B., E. Peys, and M. Helsen. 1999. Efficient method for (lyso) phospholipid class separation by high-performance liquid chromatography using an evaporative light-scattering detector, *J. Chromatogr.A.*, **864**, 179-182.
- Seppänen-Laasko, T., I. Laasko, H. Vanhanen, K. Kiviranta, T. Lehtimäki, and R. Hiltunen.,2001. Major Human Plasma Lipid Classes Determined by Quantitative High-Performance Liquid Chromatography, Their Variation and Associations with Phospholipid Fatty Acids, *Ibid.*, **75**, 437-445.
- Servillo, L., Iorio, E. L., Quagliuolo, L., Camussi, G., Balestrieri, C. and Giovane, A.. 1997. Simultaneous Determination of Lysophospholipids by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *J. Chrom. B.*, **689**, 281.
- Silversand, C., and C. Haux.1997. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Separation and Quantification of Lipid Classes: Application to Fish Lipids, *Ibid.*, **703**,7-14.
- Stolyhwo, A., Colin, H., Guiochon, G. 1983. Use of Light Scattering as a Detector Principle in Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **265**, 1-18.
- Stolyhwo, A., Colin, H., Martin, M., and Guiochon, G. 1984. Study of the Qualitative and Quantitative Properties of the Light-Scattering Detector, *J. Chromatogr.*, **288**, 253-275.
- Thorne, K. J. I. 1964. The phospholipids of *Lactobacillus casei*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **84**, 350-353.
- Uchida, K., and K. Mogi. 1972. Cellular fatty acid spectra of *Pediococcus* species in relation to their taxonomy, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 109-129.
- Uchida, K., and K. Mogi. 1973. Cellular fatty acid spectra of Hiochi bacteria, acid-tolerant lactobacilli, and their separation, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 19:233-249.
- Vaghela, M.N., and Kilara, A. 1995. Quantitative Analysis of Phospholipids from Whey Protein Concentrates by High Performance Liquid Chromatography with a Narrow Bore Column and an Evaporative Light-Scattering Detector, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **72**, 729-733.

### VI-3. Conclusions : Analyse des phospholipides de *L. plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage à température ambiante

L'analyse des phospholipides membranaires a permis de voir la variation engendrée par l'effet de la température sur les différents composants de ce complexe lipidique. Mais au delà de cette analyse, il ressort que le taux de mortalité est étroitement lié à la modification de cette entité. Parmi les différentes techniques, celle de la SPME semble donner de très bons résultats en un temps record. La maîtrise des différents paramètres essentiels de cette étude permet donc d'envisager des perspectives prometteuses. A la lumière des résultats de l'analyse des phospholipides, on est en mesure d'affirmer que la modification des composés phospholipidiques est à l'origine de la mortalité cellulaire observée chez *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'impact des modifications des phospholipides au cours du stockage (acide palmitique C<sub>16:0</sub> et acide oléique C<sub>18:1</sub>). De ces résultats, nous pouvons donc conclure que la résistance cellulaire et l'adaptation des bactéries aux conditions drastiques de production et de stockage sont fonction de la modification des phospholipides membranaires.

# Chapitre VII

---

## Discussions générales

## Discussions générales

---

Au cours de ces décennies, le marché des bactéries lactiques en général et celui des probiotiques en particulier suscite un intérêt de plus en plus croissant au niveau de la recherche scientifique. La préoccupation des biotechnologues étant de produire et de commercialiser des souches performantes à l'image de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 autant pour leurs propriétés fonctionnelles (acidifiantes), que pour leurs comportements au cours du stockage à température ambiante (peu de perte de viabilité due à une bonne résistance à la dessiccation), leurs résistances à l'acidité de l'estomac, aux sels biliaries et aux phénomènes d'échauffement couramment rencontrés dans la plupart des procédés technologiques. Les travaux de cette thèse avaient pour objectif principal l'étude de la résistance des bactéries lactiques à la lyophilisation. Pour mener à bien ce travail, cet objectif général a été scindé en cinq objectifs fondamentaux :

- ✓ la sélection de souches lactiques performantes capables de résister non seulement aux procédés technologiques mais surtout aux conditions de stockage.
- ✓ la réalisation de différentes formulations mises en jeu au cours de la lyophilisation pour optimiser la conservation à température ambiante.
- ✓ l'étude des produits primaires de dégradation des acides gras polyinsaturés afin de comprendre les mécanismes de la mortalité observée au cours du stockage. Ce volet s'est surtout intéressé aux produits primaires de la dégradation (hydroperoxydes au nombre de quatre 9- et 13- HOD, 9- et 13- HPOD).
- ✓ l'étude des produits secondaires issus de la dégradation des acides gras insaturés en l'occurrence les composés volatils.
- ✓ l'étude et le suivi des phospholipides membranaires au cours du stockage.

L'utilisation des bactéries à des fins industrielles se trouve confrontée à la problématique de la production et surtout à celle de la conservation compte tenu de l'agressivité des procédés de séchage vis à vis des cellules. Pour accroître le taux de survie, les scientifiques ont recours à la sélection de souches de plus en plus résistantes (**chapitre II**) mais également à l'usage d'additifs protecteurs pendant le séchage et au cours du stockage. L'utilisation d'additifs permet d'obtenir des résultats satisfaisants comme le montrent,

les travaux décrits au **chapitre III** : « Effets des agents protecteurs sur la composition en acides gras cellulaires de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 ». Il est bien connu que les bactéries se protègent contre les effets néfastes des phénomènes osmotiques par l'accumulation de composés organiques à bas poids moléculaires, les solutés compatibles (Glaasker et al., 1996). Ces additifs n'inhibent pas les fonctions vitales de la cellule même à des concentrations cytoplasmiques élevées. En effet, ils ne produisent pas d'effets néfastes sur la structure et la solubilité des protéines, l'interaction protéines-protéines, l'interaction enzyme-substrat ou l'interaction protéine-acide nucléique (Low, 1985 ; Yancey et al., 1982). L'accumulation intracellulaire de ces composés provient d'une synthèse de novo ou d'un transport à partir du milieu de croissance (Ko et al., 1994). Ces additifs sont de diverses structures : des polyols (glycérol, sorbitol, et mannitol), des sucres (sucrose, sorbitol, tréhalose), des acides aminés et dérivés comme la bêtaïne, la carnitine, l'acide tetrahydroxypyrimidine carboxylique (hydroxyectoïne), le glutamate, la glutamine, proline et l'alanine. Ils se présentent aussi sous le vocable de cryoprotecteurs ou de solutés compatibles et remplissent trois fonctions principales au niveau de la cellule :

- ✓ rétablir la pression de turgescence dans les cellules par rapport à l'environnement extracellulaire (Csonka, 1989 ; Csonka et al., 1991).
- ✓ améliorer la stabilité des enzymes à basse activité d'eau (Lippert & Galinski, 1992).
- ✓ stabiliser les membranes durant les périodes de dessiccation (Crowe et al., 1987 ; Leslie et al., 1995 ; Rudolph et al., 1986). Ces fonctions sont étroitement liées à la structure moléculaire des solutés compatibles qui présentent des caractéristiques spécifiques communes (Pocard et al., 1994 ; Gutierrez et al., 1995) : - molécules organiques à bas poids moléculaire- une grande solubilité dans l'eau -une charge neutre à pH physiologique - une absence de toxicité sur les enzymes in vitro.

De nouvelles techniques et méthodes, permettent de nos jours de prédire la stabilité de la viabilité cellulaire au stockage ; parmi celles-ci, les techniques de mesure de la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) par l'analyse calorimétrique différentielle, les techniques de marquage par la fluorescence, et la détermination des constituants membranaires (les acides gras membranaires et les phospholipides) par les techniques de chromatographie en phase gazeuse.

Selon [Matthieu et al. \(2002\)](#), la température de transition vitreuse est l'un des paramètres importants pour la caractérisation d'un produit. La perte de la viabilité et de l'activité des bactéries se produisent généralement pendant les différentes étapes de la fabrication et du stockage. Des changements de leur état physique se produisent puisque ces matériaux biologiques se composent principalement d'hydrates de carbone et de protéines, qui peuvent être amorphes ou partiellement amorphes. Afin de mieux comprendre les changements qui se produisent pendant le traitement et le stockage des bactéries lactiques, on analyse leurs propriétés physiques. Des diagrammes d'état pour décrire les différentes régions de l'état physique des matériaux montrent le rapport entre la composition et la température. Ces diagrammes sont habituellement établis avec des mesures effectuées par calorimétrie à balayage différentiel ou Differential Scanning Calorimetry (DSC). Les diagrammes associés aux isothermes de sorption d'eau sont souvent liés à la qualité du produit sec et sont employés pour expliquer la stabilité de ces produits pendant le stockage. Nous avons utilisé ces données pour attester de la qualité de la lyophilisation et par conséquent déterminer la durée de conservation des poudres issues de la lyophilisation à différentes températures de stockage.

Toujours dans l'optique de prévoir et suivre la survie cellulaire, les biologistes et microbiologistes ont de plus en plus recours à la technique de la fluorescence appelée cytométrie en flux. La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse des cellules, des bactéries et des particules en suspension dans un liquide qui permet de les faire passer une à une à grande vitesse devant un ou plusieurs faisceaux lasers. Un système optique et informatique sophistiqué analyse les propriétés optiques des cellules (diffraction et réflexion lumineuses). L'utilisation de molécules fluorescentes permet d'augmenter le nombre de paramètres étudiés par cellule (jusqu'à 8 ou 10 simultanément). On peut ainsi analyser le contenu en ADN des cellules, et donc la répartition d'une population cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire ([Hoerni et al., 2006](#)). Cette technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide, permet d'analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Dans le cas qui nous concerne, cette technique sert à faire la discrimination des bactéries basée sur l'activité métabolique.



Deux types de méthodes existent pour détecter les cellules métaboliquement actives :

✓ celles basées sur des processus énergie-dépendant ((biosynthèses, potentiel de membrane, transport de molécules à travers les membranes, etc.),

✓ celles basées sur des processus énergie-indépendant (activité enzymatique : activité estérase, diacétate de fluorescéine, déshydrogénase (CTC)). Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur par l'intermédiaire d'une composante informatique et optique (miroir dichroïque et filtre optique). La fonction tri des cytomètres en flux les plus évolués permet de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques. L'une des applications de la cytométrie en flux est le tri cellulaire, cette fonction permet de séparer les cellules selon les informations données par le phénotype.

Tous ces instruments de prévisions aboutissent à une seule conclusion, les cellules au cours du stockage subissent divers stress et des modifications au niveau de la membrane cellulaire. Parmi ces modifications, l'oxydation des acides gras tient une place de premier rôle car elle est responsable de la production de radicaux libres (hydroperoxydes) à partir des acides gras polyinsaturés linoléique et linoléique comme démontré au **chapitre IV**. Nos résultats sont en accord avec les travaux réalisés par

[Zhang et al., 2007](#) ; [França et al., 2007](#) et [Howe et al., 2002](#). L'analyse des produits volatils, les produits secondaires de dégradation des poudres issus de la lyophilisation des bactéries lactiques montre une corrélation entre le taux de mortalité et la production de certains composés aldéhydiques, cétones et autres selon les résultats du **chapitre V** : « **Analyses des composés volatils issus de la dégradation des acides gras de bactéries lactiques** ». L'étude des acides gras et des phospholipides permet ensuite de rendre compte de la détérioration des constituants phospholipidiques au cours du stockage. Cela traduit l'importance des peroxydes dans la mortalité cellulaire voir **chapitre VI** : « **Détermination des phospholipides chez *L. plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage** ». Ce volet montre également l'intérêt de l'utilisation des antioxydants pendant le stockage.

## De l'importance de la sélection et de l'identification de souches lactiques thermorésistantes et performantes

---

Selon [Klaenhammer et al. \(1981\)](#), une sélection rigoureuse est le premier des facteurs pour l'amélioration de la conservation des bactéries lactiques. Afin de garantir une viabilité commercialement satisfaisante, après un stockage à long terme, il est opportun de sélectionner des souches qui ont survécu à des conditions drastiques (température élevée, sécheresse).

Le choix de ces deux critères repose sur plusieurs paramètres parmi lesquels, l'hypothèse qu'une souche ayant survécu dans un environnement drastique : chaud et sec, possède ou a développé un mécanisme de défense contre la chaleur et la déshydratation. Or, en biotechnologie, lors de l'étape de production ou au cours du stockage, la perte de viabilité « systématiquement observée » des souches de bactéries lactiques est imputable à ces deux facteurs. C'est dans cette optique, que nous avons sélectionné des souches de bactéries lactiques sur la base de leur résistance à un traitement thermique et à la déshydratation.

En ce qui concerne la déshydratation, les techniques utilisées se basent dès lors sur les capacités d'une bonne reprise d'activité des souches après application d'un traitement osmotique sur les cellules. Celui-ci permet de mobiliser l'eau libre dans l'environnement et de déclencher un système de protection contre ce stress. Les travaux constituant les objectifs fixés au **chapitre II**, nous ont permis de montrer les paramètres et les facteurs sur lesquels un contrôle et une optimisation étaient susceptibles d'améliorer la résistance thermique et la viabilité au cours de la conservation des souches. Les différentes techniques utilisées ont permis de discriminer les cinq souches pour aboutir à une résistance conforme aux critères cités ci-dessus. Ces résultats sont en phase avec les travaux effectués par [Niamsup et al. \(2003\)](#) et [Prasad et al. \(2003\)](#). Dans le cadre des études visant à isoler les microorganismes thermotolérants pour une utilisation dans l'industrie de la fermentation, nous avons isolé un grand nombre de bactéries lactiques (Sp03, Sp04, Sp05, Sp011 et Sp020) comme indiqué par le **tab. 21** à partir de fientes de poulets et les sols proches de poulaillers au Sénégal qui atteignent des températures relativement élevées, soit 40-50°C.

**Tableau 21.** Caractéristiques physiologiques: la tolérance des cinq isolats de bactéries lactiques aux gammes de température, de l'acide lactique, les concentrations de NaCl et de pH. (cf tab.6 chap. II).

| Environmental conditions                 | Isolate name |       |       |       |       |
|--|--------------|-------|-------|-------|-------|
|  | Spo03        | Spo05 | Spo11 | Spo04 | Spo20 |
| <i>Température</i>                       |              |       |       |       |       |
| 15°C                                     | -            | -     | +     | +     | +     |
| 30°C                                     | +            | +     | +     | +     | +     |
| 37°C                                     | +            | +     | +     | +     | +     |
| 44°C                                     | +            | +     | +     | +     | +     |
| 55°C                                     | -            | -     | -     | -     | -     |
| <i>Lactic acid concentration (% w/v)</i> |              |       |       |       |       |
| 3,0                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 5,0                                      | +            | -     | +     | +     | +     |
| 7,5                                      | -            | -     | -     | +     | +     |
| 9,0                                      | -            | -     | -     | -     | -     |
| 12                                       | -            | -     | -     | -     | -     |
| <i>NaCl concentration (% w/v)</i>        |              |       |       |       |       |
| 1,5                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 2,5                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 5,0                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 7,5                                      | -            | +     | -     | -     | -     |
| 10                                       | -            | -     | -     | -     | -     |
| <i>pH (End point)</i>                    |              |       |       |       |       |
| 4,0                                      | +            | -     | +     | +     | +     |
| 5,5                                      | +            | -     | +     | +     | +     |
| 7,0                                      | +            | +     | +     | +     | +     |
| 9,0                                      | +            | +     | +     | +     | -     |

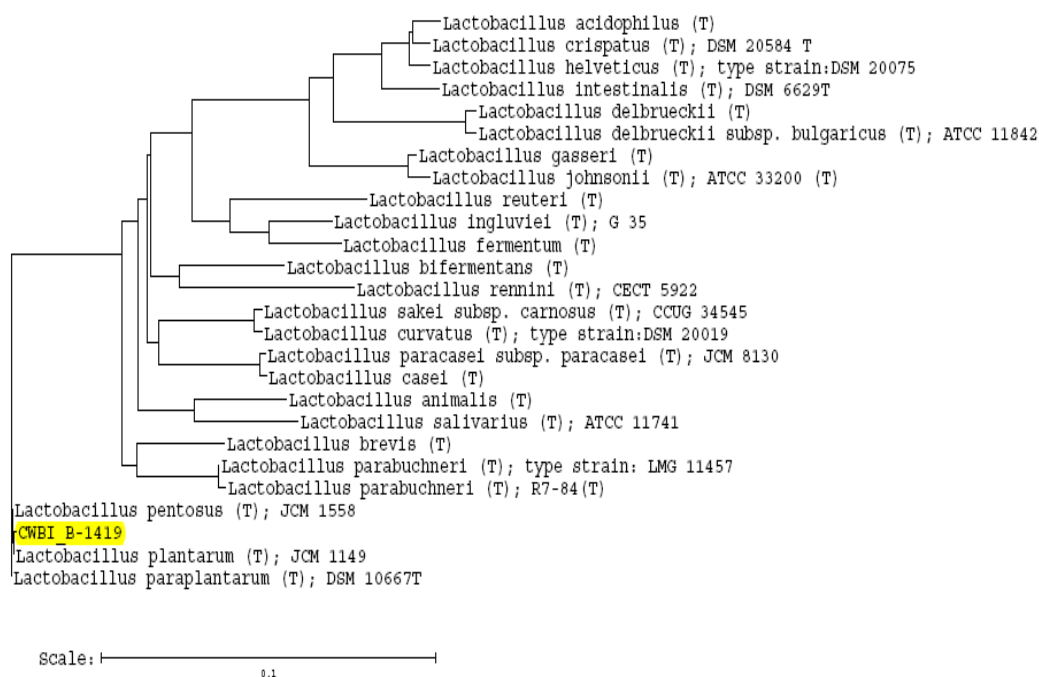
+ Indique un changement de couleur, passant du violet au jaune, croissance.

- Indique qu'aucun changement de couleur de pourpre, pas de croissance.

Dans la présente étude, cinq souches de bactéries lactiques isolées de ces déjections de poulets ont été caractérisées. A l'issue des tests, la souche Sp04 a été retenue pour sa résistance aux températures élevées. Les souches (Spo03, Spo05, Spo011 et Spo020) ont été identifiées par une étude antérieure réalisée par [Sow et al. \(2004\)](#)

En ce qui concerne les aspects taxonomiques, l'analyse des séquences 16S d'ADNr de ces bactéries lactiques a été réalisée grâce à une PCR (polymerase chain reaction). Pour identifier et discriminer des souches la technique PCR est un outil incontestable et de plus en plus utilisée comme l'attestent les travaux de [Hastings et al. \(1981\)](#) ; [Jin et al. \(1998\)](#) ;

Mori et al. (1997) et Amin et al. (2009). Sur la base des valeurs biochimiques, physiologiques, des données génétiques, les tests montrent que des cinq (5) souches testées, trois (3) sont du genre *Lactobacillus*. Selon le séquençage du 16s ADNr, les résultats du dendrogramme (fig. 38), montrent que la souche ayant les propriétés de thermorésistance identifiée appartient non seulement au genre *Lactobacillus* mais également à l'espèce *plantarum*.



**Figure 38.** Dendrogramme montrant la position de la souche CWBI-B1419 dans le groupe des *Lactobacillus* spp. selon les alignements des séquences codant pour l'ARNr 16S (Dendrogramme réalisé avec le programme *Ribosomal Data Project II*).

Les analyses phylogénétiques des séquences obtenues sont effectuées à l'aide des logiciels Genecompar (Applied, Maths, Belgium) et Vector NTI (Informax, Invitrogen, Maryland, USA). Les séquences d'ADNr 16S obtenues (1500 pb environ) sont alignées et comparées par rapport à celles contenues dans les banques de données internationales (NCBI/Genbank). Les résultats de ces analyses sont traduits sous forme de dendrogramme pour mettre en évidence les homologues entre les nouvelles souches et les souches types des espèces connues dans ces banques. Cette analyse a permis de montrer que la souche CWBI-B1419 est un *Lactobacillus plantarum* à fort potentiel probiotique puisque fermentant les principaux sucres (arabinose, glucose, ribose, mannose, etc.).

## Nécessité et intérêt de l'utilisation des agents protecteurs au cours de la lyophilisation et pendant le stockage.

D'après la demande de brevet FR N°2829147, (Béal et al., 2001), l'activité de l'eau et la température de transition vitreuse sont les deux principales propriétés physiques traduisant la stabilité des produits lyophilisés lors d'un stockage à température ambiante. D'après le même brevet, les poudres lyophilisées des bactéries lactiques (en présence de cryoprotecteurs) se conservent sans trop de perte de viabilité à une température de stockage ( $T_s$ ) au moins pendant trois mois si ces mêmes poudres ont une  $T_g$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) =  $T_s + 25^{\circ}\text{C}$ . Cette affirmation n'est cependant valable que si l' $a_w$  est de l'ordre de 0,1 ce qui correspond à une dessiccation secondaire assez poussée. *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419, *L.casei* ssp. *paracasei* LMG9192 et *L. paraplantarum* CWBI-B1419 ont été cultivés à une échelle semi-industrielle et récoltées dans la phase stationnaire quelques temps après la fin de l'activité acidifiante. Après centrifugation, la suspension bactérienne résultante a été mélangée soit avec du glycérol (2 g/l) et de la maltodextrine (5 g/l) dans un cas et dans l'autre cas soit avec du sorbitol, et du monosodium glutamate à raison de 12 g/l (p/v) pendant 30 min à température ambiante. Les résultats avec l'emploi de maltodextrine et de glycérol (Chap IV) permettent de montrer un pourcentage de survie supérieur contrairement aux cellules séchées sans additifs (tab. 22). Des conclusions similaires ont été décrites par Champagne et al. (2001).

**Tableau 22.** Taux de survie de deux souches de lactobacilli après lyophilisation avec 12 g/l de monosodium glutamate et 12 g/l de sorbitol. Chaque valeur représente la moyenne des répétitions des deux expériences de lyophilisation

| Souches  | Sachets aluminium scellés sous vide           |  |         |          |
|--|---|--|---------|----------|
|  | Concentrations initiales des cellules séchées | Taux de survie (%) des échantillons séchés après 120 jours de stockage |         |          |
|  |   | Cfu/g  | Control | Sorbitol |
| <i>Lactobacillus</i> ssp. <i>paracasei</i> LMG9192 | $7.4 \times 10^{11}$ a                        | 20   | 47      | 31       |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> CWBI-B1419          | $8.3 \times 10^{11}$ a                        | 23   | 57      | 36       |

Dans les deux cas, on assiste à une amélioration du taux de survie ou de stabilité de l'ordre de 90% pour les échantillons traités avec les additifs protecteurs contrairement aux cellules sans protecteurs où le taux de survie ne dépasse guère les 20%. On note un taux de survie de 57% quand le sorbitol est utilisé et de 35% quand c'est le glutamate monosodique après 120 jours de stockage pour *L. plantarum* CWBI-B1419. De même, la souche *L. plantarum* est plus résistante avec des taux doubles (36 à 57%) par rapport à *L. casei* ssp. *paracasei* LMG9192. Ces résultats sont en parfaite harmonie avec les travaux effectués par [Giulio et al. \(2005\)](#), montrant que la résistance de *L. plantarum* est plus élevée que celle enregistrée par *L. paraplantarum*. ***A la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que l'influence des additifs de protection est spécifique de l'espèce et doit donc être déterminée au cas par cas.*** La sensibilité élevée de la souche de *L. plantarum* comparativement à *L. paraplantarum* peut être due à la plus grande fragilité de la surface membranaire des cellules avec comme conséquence une augmentation des dégâts membranaires ([Fonseca et al., 2000](#)).

Les dommages causés aux systèmes biologiques séchés par lyophilisation peuvent être attribués principalement à l'évolution de l'état des lipides membranaires et à des changements dans la structure des protéines sensibles ([Leslie et al., 1995](#)). Cependant, même si la survie est importante après la congélation et/ou le séchage, la viabilité peut être réduite par la suite pendant le stockage ([Abadias et al., 2001](#); [Fonseca et al., 2000](#); [Wisselink et al., 2002](#)). Les additifs ont un rôle important dans la conservation et le maintien de la viabilité cellulaire. Pour remplir ces fonctions, l'additif utilisé comme protecteur devrait fournir une bonne cryoprotection des cellules pendant la lyophilisation, il doit être facile à sécher et fournir les atouts d'une matrice permettant la stabilité et la facilité de réhydratation ([Costa et al., 2000](#)). Le sorbitol et le monosodium glutamate (gms) sont présentés comme des protecteurs de qualité ([Abadias et al., 2001](#) ; [Hubalek et al., 1996](#) ; [Lindres et al., 1997](#)). L'augmentation de l'activité résiduelle et de la viabilité après le séchage en présence du sorbitol comme matrice de séchage a été précédemment décrite pour divers organismes ([Abadias et al., 2001](#) ; [Lindres et al., 1997](#)). Bien que le mécanisme de protection cellulaire par des polyols n'est pas entièrement compris, trois hypothèses ont été proposées ([Wisselink et al., 2002](#)): (i) le maintien de la turgescence, ([Kets et al., 1996](#)), (ii) la stabilisation de la structure des lipides membranaires et des

protéines à faible activité d'eau (Leslie et al., 1995 ; Yoo et al., 1993), (iii) la prévention des dommages oxydatifs par inhibition des réactions responsables de la production des radicaux libres par l'oxygène (Leslie et al., 1995). La stabilisation des structures de protéines par des réactions entre les groupes aminés (-NH<sub>2</sub>) du protecteur et les groupes carboxyle (-COOH) des protéines du micro-organisme, et la capacité de retenir de plus grandes quantités d'eau résiduelle ont été présentées comme des explications de la protection par le monosodium glutamate pendant la lyophilisation (Font de Valdez et al., 1983). Les résultats sont en accord avec les travaux expérimentaux relatifs à la survie de cellules lyophilisées de *L. plantarum* et *L. rhamnosus* pendant le stockage à température ambiante, en présence de chacun des quatre sucres (myo-inositol, sorbitol, fructose et de tréhalose), le monosodium glutamate (msg) et l'antioxydant (propyl-gallate) par Leslie et al., 1995. Tous les composés testés au cours de ces travaux se sont avérés efficaces dans la protection pour *L. plantarum* CWBI-B1419 et un peu moins pour les autres souches (*L. paraplantarum* CWBI-B545, *L. casei* ssp. *paracasei* LMG9192). En accord avec les résultats publiés par Font de Valdez et al. (1983), aucune corrélation n'a été observée entre l'efficacité de protection du sorbitol sur la bactérie et leur pouvoir fermentescible. Ce résultat suggère que l'effet est de nature physico-chimique. Les mécanismes proposés pour tenter de rationaliser la protection par le sorbitol en cours de stockage comprennent la prévention d'endommager les membranes par interaction avec la membrane (Linder et al., 1997b) et la stabilisation de la fonctionnalité des protéines de structure (Yoo et al., 1993).

### **Incidences de la dégradation des acides gras polyinsaturés et leurs effets sur la viabilité cellulaire (les hydroperoxydes).**

---

L'action des additifs sur la membrane cellulaire observée au cours du stockage, nous amène à analyser les produits résultant de l'oxydation des acides gras. Les résultats obtenus permettent de confirmer qu'au cours de la croissance bactérienne, les différentes phases de la cinétique de croissance ont une incidence sur la thermorésistance, de même que le pH du milieu d'incubation qui joue un rôle prépondérant, (Sakamoto, 2002). Cette

constatation entraîne la nécessité de stabiliser les paramètres que sont le pH et la température. Elles présentent une résistance thermique qui leur permet de croître et de se reproduire à 45°C contrairement à *L. paracasei* sp. *casei* LMG 9192 et *L. paraplantarum* CWBI-B545. Selon les travaux effectués par Sow et al. (2004), la thermotolérance de la souche *L. plantarum* CWBI-B1419 peut être la résultante de plusieurs facteurs, dont la synthèse d'un fort pourcentage d'acide oléique (C<sub>18:1</sub>) et dans une moindre mesure d'acide linoléique (C<sub>18:2</sub>) ; comme décrit par les travaux de Russell et al. (2002) et Yoo et al. (2005) qui sont unanimes sur ce sujet. Pour ces auteurs la diminution de la synthèse des acides gras monoinsaturés est étroitement liée à l'augmentation de la température d'incubation. Ceci constitue en fait une réponse à une modification de la fluidité membranaire. Cette constatation est aussi vérifiée pour la souche CWBI-B1419.

Au cours de la lyophilisation et surtout pendant le stockage, la membrane subit les phénomènes d'oxydation initiés par la présence d'oxygène ce qui est illustré par les résultats du **chapitre IV**. En effet, les acides gras cellulaires (AGC) de *L. mesenteroides* et de *L. plantarum* CWBI-B1419 ont été analysés avant et après lyophilisation. Six principaux acides gras ont été identifiés, à savoir les acides palmitique (C<sub>16:0</sub>), palmitoléique (C<sub>16:1</sub>), stéarique (C<sub>18:0</sub>), oléique (C<sub>18:1</sub>), linoléique (C<sub>18:2</sub>) et l'acide linoléique (C<sub>18:3</sub>). Quatre de ces acides, à savoir les C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:0</sub> et C<sub>18:1</sub>, représentent plus de 94% ou 93% des acides gras chez *L. mesenteroides* et *L. plantarum* CWBI-B1419, respectivement, et un taux de 5-6%, en moyenne pour le C<sub>18:3</sub>, respectivement. Le C<sub>18:2</sub> représente un pourcentage très réduit (en moyenne ≤ 1%). Les C<sub>16:0</sub> constituent chez *L. mesenteroides* et *L. plantarum* CWBI-B1419, la plus forte proportion. Il n'existe aucune modification significative au niveau des acides gras cellulaires (CFA) de *L. mesenteroides* et *L. plantarum* en réponse à la déshydratation. En outre, l'ajout de glycérol et de maltodextrine, avant la lyophilisation ne modifie pas significativement les acides gras polyinsaturés des deux souches. Les acides gras cellulaires de poudres de *L. mesenteroides* et *L. plantarum* emballées et scellées sous vide dans du papier d'aluminium ou dans des tubes de verre blanc et maintenues à 20 ou 4°C pendant 90 jours ont été analysés. L'acide palmitique (C<sub>16:0</sub>) n'a pas subi de modification au cours du stockage. Par conséquent, les teneurs en acides gras sont exprimées par un rapport entre chaque acide gras et le C<sub>16:0</sub>. On a ainsi observé que les ratios C<sub>16:1</sub>/C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>/C<sub>16:0</sub> et C<sub>18:1</sub>/C<sub>16:0</sub> pour les cellules lyophilisées de *L. mesenteroides* ou de *L. plantarum*,



avec ou sans cryoprotecteurs n'ont pas beaucoup évolué au cours de la période de stockage. On a constaté que, indépendamment du mode d'emballage et des températures d'entreposage, les ratios  $C_{18:2}/C_{16:0}$  et  $C_{18:3}/C_{16:0}$  des cellules lyophilisées de *L. mesenteroides* et de *L. plantarum*, avec ou sans cryoprotecteurs ont subi une diminution au cours du temps. Toutefois, un ratio plus élevé de  $C_{18:2}/C_{16:0}$  ou  $C_{18:3}/C_{16:0}$  pour *L. mesenteroides* et *L. plantarum* a été noté dans les poudres lyophilisées et conservées à 4°C sous vide et dans l'obscurité qu'à 20°C et en présence d'air et de la lumière. Pour exemple, les ratios de  $C_{18:2}/C_{16:0}$  et de  $C_{18:3}/C_{16:0}$  sont de 0,01 et 0,11 pour *L. mesenteroides* et *L. plantarum* lyophilisés avec cryoprotecteurs. A titre comparatif, *L. plantarum* est plus résistant que *L. mesenteroides*, ce qui lui procure une viabilité à long terme au cours du stockage.

Aux regards de ces résultats, l'oxydation des lipides et spécialement des acides gras des lipides membranaires est probablement lié à la mortalité cellulaire (Teixeira et al., 1995 ; 1996). Les acides gras cellulaires de *L. mesenteroides* et *L. plantarum* sont composés des acides: palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique et linoléinique. Tous ces acides ont été identifiés précédemment dans la membrane cellulaire des bactéries lactiques et bactéries acétiques (Ndoye et al., 2007 ; Sow et al., 2004). Contrairement à leurs analogues d'acides gras saturés, les acides gras insaturés et polyinsaturés (AGI, AGPI) sont beaucoup plus sensibles à l'oxydation (Catterijee et al., 2000). Les résultats de nos travaux ont attesté qu'après 90 jours, les ratios  $C_{18:2}/C_{16:0}$  et  $C_{18:3}/C_{16:0}$  avaient significativement baissé pour les deux souches stockées en tubes de verre ouverts à 20°C. L'effet de l'élévation de la température lors de stockage de la poudre lyophilisée est nuisible à la survie des microorganismes. Quand à la lumière, son action est néfaste et conduit à la diminution du taux de survie. La lumière, combinée à de haute température et la présence de l'oxygène agissent de façon synergique entraînant une perte encore plus élevée dans la viabilité. Ces pertes seront dues à la transformation des acides linoléiques et linoléiniques en hydroperoxydes (Howe et al., 2002 ; Halliwell et al., 1993). Cette hypothèse est étayée par le fait que, pendant le stockage en tube de verre ouvert à 4°C et dans les sachets d'aluminium scellés sous vide et stockés à 20°C, les ratios  $C_{18:2}/C_{16:0}$  et  $C_{18:3}/C_{16:0}$  diminuent plus lentement.

La dégradation des acides linoléiques et linoléiques est en relation avec la présence ou non d'oxygène. Nos travaux ont révélé que l'acide linoléique se dégradait plus rapidement que l'acide linoléique. Les acides gras les plus insaturés avec plusieurs doubles liaisons (et/ou des doubles liaisons conjuguées) seraient plus facilement oxydés (Zhang et al., 2007). Ces mêmes résultats suggèrent la possibilité que la perte d'eau pendant les processus "congélation plus séchage" génèrent un stress oxydatif. Pereira et al. (2003) ont également signalé que des cellules lyophilisées sont susceptibles d'une augmentation de l'oxydation pendant le stockage.

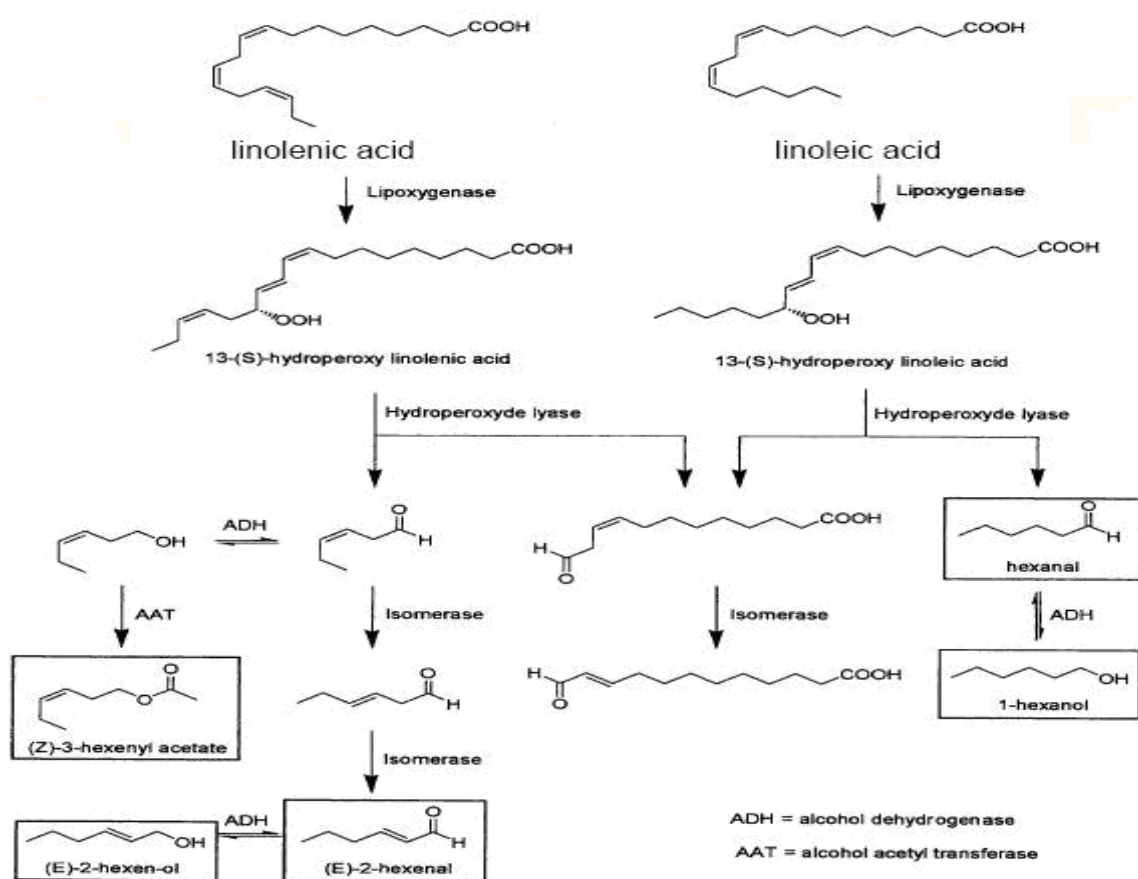
Toutefois, l'origine de radicaux libres au cours de la déshydratation reste inconnue selon les travaux réalisés par França et al. (2007). L'influence de la température lors du stockage des acides gras insaturés même en l'absence d'oxygène, est susceptible de produire des composés dimériques et des substances de faibles poids moléculaires (Nawar et al., 1996). Ces composés de faibles poids moléculaires, sont pour la plupart des composés volatils qui se dégagent lors de l'oxydation et sont identifiés comme produits secondaires de la dégradation. Quelle est donc l'importance de ces produits secondaires dans la compréhension de la mortalité cellulaire ? Répondre à cette question revient à montrer les principaux composés volatils et leur évolution au cours du stockage.

### **Détermination des produits secondaires de la dégradation des acides gras polyinsaturés (les composés volatils).**

---

Les premiers produits formés par attaque de l'oxygène activé sur les doubles liaisons des chaînes d'acides gras, sont des composés peroxydés instables, les hydroperoxydes, dont la structure va dépendre de la nature des acides gras attaqués (acides mono-, di-, tri- ou polyinsaturés). Les radicaux alcoxyles qui en dérivent par scission, conduisent à de multiples produits secondaires dont la nature et les proportions dépendent de différents paramètres. Parmi ces produits, apparaissent des molécules volatiles (principalement des aldéhydes, hydrocarbures, alcools, acides...) qui modifient la saveur d'origine des corps gras. Le groupe de produits volatils le plus important en quantité (quelques centaines de ppb ou µg/kg) est celui des aldéhydes (de C<sub>5</sub> à C<sub>12</sub>) d'où la

notion de « rancissement aldéhydique » (par opposition au rancissement butyrique des produits laitiers fermentés). La **fig. 39** ci-dessous retrace les mécanismes régissant l'altération des acides gras polyinsaturés. Le seuil de perception de ces produits dans les corps gras est très faible. Les composés secondaires d'oxydation non volatils sont principalement des triglycérides oxydés monomères comportant au moins un acide gras altéré porteur d'un groupement fonctionnel de type hydroxyle, carbonyle ou époxyde. En ce qui concerne les composés secondaires d'oxydation, de nombreux indices chimiques permettent de doser les aldéhydes (indices de paranisidine, test TBA, indice de carbonyle...) mais avec une sensibilité et un domaine d'application parfois réduits. La méthode d'analyse des composés volatils par l'espace de tête dynamique et de la chromatographie en phase gazeuse permet de rechercher et de doser les traceurs du rancissement (aldéhydes, hydrocarbures) et constitue de ce fait, une méthode intéressante et sensible.



**Figure 39.** Illustrations des mécanismes régissant l'altération des polyinsaturés aboutissant à la formation des composés volatils (d'après Niki et al., 2005)..

Les résultats et l'examen de nos travaux sur les composés volatils illustrés par les **tab. 17 & 18** du **chapitre V** permettent de mettre en évidence plusieurs renseignements. On remarque de prime à bord que les poudres lyophilisées de *Lactobacillus* contiennent un certain nombre d'aldéhydes (benzaldéhydes, benzaldéhyde 2,4-bis (triméthylsil)-oxy, hexenal). Ceci peut être interprété comme un signe d'oxydation de la matière grasse et montre que le butylhydroxytoluène (B.H.T) que l'on trouve dans le **tab. 17** et qui a été ajouté à dessein comme antioxygène, n'a pas permis d'éviter totalement l'oxydation. Les composés cétones et les méthylcétones (ethoxycarbonylbenzophenone, 4 H-1-benzothiopyran-4-one, undecadien-2-one, cyclohexadien-1-one, 2-trideconone et 2-pentadecanone) se retrouvent en quantités relativement importantes dans les échantillons analysés ; pourtant il s'agit là de substances volatiles. On peut expliquer cette anomalie apparente par le fait que les méthylcétones sont susceptibles de se former spontanément par action de la chaleur en présence d'eau même à l'état de traces [6] en cétoacides qui peuvent représenter jusqu'à 4 p. 100 des acides gras totaux de la matière grasse butyrique. Les conditions d'une telle transformation sont évidemment remplies pendant la phase de séchage. Ces résultats ont également montré la présence d'hydrocarbures dans les poudres lyophilisées avec *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419. La présence de ces composés pourrait trouver son origine par la présence d'un phénomène et/ou un mécanisme d'oxydation. A ce sujet les travaux effectués par [Barbieri et al. \(1994\)](#) attestent que ces composés sont probablement les produits secondaires d'auto-oxydation des lipides. Pour [Arora et al. \(1995\)](#), ces composés issus de cette oxydation sont des précurseurs pour la formation d'autres composés aromatiques forts appréciés dans les produits fermentés laitiers. Ces changements dans le profil des volatils sont le résultat des processus d'oxydation. La dégradation des matières grasses provoque chez la bactérie une présence accrue des composés volatils, en particulier les aldéhydes, méthyle cétones, alcools, ([Widder et al., 1991](#)). Les résultats de nos travaux sont en adéquation avec ceux publiés par [Prasad et al. \(2003\)](#) montrant le comportement des bactéries au cours du stockage.

Pour avoir une vue d'ensemble de la mortalité cellulaire au cours du stockage des cellules lyophilisées, nos travaux se sont penchés sur l'analyse des phospholipides membranaires afin de comprendre les différentes variations préjudiciables à la survie cellulaire pendant le processus de stockage. C'est pour cette raison que le chapitre suivant permettra à travers la discussion de comprendre l'importance des phospholipides.

## Intérêts de l'étude des phospholipides membranaires chez le genre *Lactobacillus* ssp.

---

L'étude des phospholipides est motivée par la compréhension des phénomènes d'oxydation et leur impact sur la mortalité. De nombreuses études se sont penchées sur la composition lipidique de *Lactobacillus* spp. et principalement des phospholipides membranaires dans le souci de la compréhension des mécanismes intervenant dans l'oxydation (Drucker et al., 1995). Les travaux menés par O'Leary et al. (1988) ont montré par leurs recherches que les phospholipides des lactobacilles sont généralement composés de n-C<sub>16:0</sub>, n-C<sub>18:1</sub> et C<sub>19</sub> et d'une faible proportion des acides n-C<sub>14:0</sub>, n-C<sub>16:1</sub>, et n-C<sub>18:0</sub> (Drucker, 1994). Des travaux similaires effectués au Centre Wallon de Biologie Industrielle par Sow et al. (2004), Coulibaly et al. (2008) montrent la présence de six acides gras notables chez *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419, *L. paraplantarum* CWBI-B545 *Leuconostoc. mesenteroides* KMrog et *L. paracasei* ssp. *casei* LMG9192 à savoir : l'acide palmitique (C<sub>16:0</sub>), palmitoléique (C<sub>16:1</sub>), stéarique (C<sub>18:0</sub>), oléique (C<sub>18:1</sub>), linoléique (C<sub>18:2</sub>) et l'acide linoléique (C<sub>18:3</sub>). O'Leary et al. (1988) ont montré que ces profils sont typiques d'acides gras des bactéries gram-positifs. L'analyse des groupes polaires chez *L. plantarum* CWBI-B1419 a révélé la même tendance et a montré que la grande majorité des lipides polaires est composée de phosphatidylglycérol (PG). Ces résultats sont entièrement compatibles avec les études effectuées par Fischer et al. (1990), pour ce qui concerne les composants tels que les acides phosphatidique, diphosphatidylglycérol, phosphatidylglycérol phosphoglycolipides et diglycosyldiacylglycérol. Pendant le stockage on a remarqué une diminution du PG pour les poudres lyophilisées et stockées à 20°C, alors qu'à 40°C en plus de celle du PG, on observe une baisse significative après 90 jours des PE et SM. Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus avec *L. plantarum* CWBI-B1419. A des températures élevées, les poudres sans lithothamne sont les plus vulnérables, ce qui entraînerait une baisse de viabilité due aux phénomènes d'oxydation. Ces altérations provoquent la production de radicaux libres qui seraient toxiques pour les cellules lyophilisées, la baisse du ratio U/S et la mort cellulaire se sont produites essentiellement au même rythme.

Ce ralentissement serait occasionné par le fait que l'oxydation est au seuil maximal. Les mécanismes de mort cellulaire au cours du stockage sont encore mal connus, mais à partir de ces résultats, il paraît évident que la corrélation entre l'oxydation des lipides et la survie pendant le stockage est liée. Cette hypothèse est étayée par des preuves indirectes présentées dans différents travaux. Par exemple, il est indiqué que la présence d'antioxydants a augmenté le taux de survie des bactéries séchées pendant le stockage (Alexander et al., 2006 ; Teixeira et al., 1995b). Dimmick et al. (1987) ont constaté une forte similarité entre la perte de la viabilité et l'augmentation de la concentration des radicaux libres pendant le stockage des cellules lyophilisées de *Serratia marcescens*. Les travaux réalisés par Richard et al. (1997) soutiennent l'hypothèse que les réactions entre les groupements carbonylés et les composants cellulaires sont une cause majeure de mortalité au cours du stockage des cellules séchées de micro-organismes. La nature de ces composés n'est pas présentée, mais il est possible que ces produits soient formés pendant l'oxydation des lipides. Slater, (1984) a signalé que, dans les cellules eucaryotes, la peroxydation lipidique peut entraîner la désorganisation de la membrane par peroxydation principalement des acides gras hautement insaturés entraînant ainsi des changements dans le ratio des acides gras insaturés. La peroxydation incontrôlée des biomembranes peut donc conduire à des effets profonds sur la structure des membranes. La technologie et la méthode utilisée nous permettent de quantifier l'évolution des phospholipides durant le stockage. La grande sensibilité à l'oxydation des acides gras polyinsaturés en occurrence les acides linoléiques (C<sub>18:2</sub>) et linoléiques (C<sub>18:3</sub>) a été montrée par les résultats antérieurs et permettent de supposer que ces changements au niveau des phospholipides peuvent affecter la perméabilité membranaire. Cette supposition est en accord avec les travaux réalisés par Livense et al. (1994). Ce chapitre a permis non seulement d'identifier les différentes classes de phospholipides mais a surtout permis de faire un lien entre l'évolution des différents phospholipides au cours du temps et la mortalité cellulaire observée au cours du stockage à température ambiante.

Rappelons que les résultats issus de nos travaux (**chapitre IV**), permettent d'observer une baisse des rapports acide linoléique (C<sub>18:2</sub>)/acide palmitique (C<sub>16:0</sub>) et acide linoléique (C<sub>18:3</sub>)/acide palmitique (C<sub>16:0</sub>) d'une part et d'autre part une accumulation des produits primaires de dégradation du C<sub>18:2</sub> ou C<sub>18:3</sub> au cours du stockage de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11 dans des conditions d'aération, en présence d'une

humidité et d'une température élevées. Partant de ces constatations et se basant sur les résultats du **chapitre VI**, nous en avons déduit que l'oxydation des acides gras membranaires, et plus particulièrement celle des acides gras polyinsaturés, contribuerait à une instabilité (perte de viabilité cellulaire et/ou activité) des souches lyophilisées au cours de leur stockage. L'instabilité provoquée par cette oxydation se justifierait à partir de l'instant où la fraction polaire des acides gras issus des lipides membranaires serait oxydée.

## Références bibliographiques

---

- Abadias M., Benabarre A., Teixidó N., Usall J., Viñas I., 2001. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*, *Int. J. Food. Microbiol.*, **65**, 173-182.
- Alexander G.S., Xianli W., Ronald L.P., Boxin O., Dejian H., John O., Amit A., Gitte S.J., Aaron N. H., and Edward S. 2006. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai), *J. Agric. Food Chem.*, **54** (22), 8604-8610.
- Amin M., Jorfi M., Khosravi A.D., Samarbafzadeh A.R., Farajzadeh S. A., 2009. Isolation and Identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from Plants by PCR and Detection of their Antibacterial Activity, *J. Biol. Sc.*, **9**, 810-814.
- Baumann D. P., 1964. Preservation of lactic cultures. Ph. D. thesis, Iowa state university of science and technology, Ames, Iowa.
- Baumann D. P., Reinbold G.W., 1966. Freezing of lactic cultures, *J. Dairy. Sci.*, **49**, 259-264.
- Bergère J. L., Hermier J. 1967. - La production massive de cellules de streptocoques lactiques. II. Croissance de *Streptococcus lactis* dans un milieu à pH constant. *Le Lait.*, **48**, 13-30.
- Costa E., Usall J., Teixidó N., Garcia N., Viñas I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying, *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 793-800.
- Coulibaly I., Anastasie Yao A., G. Lognay., M-L. Fauconnier., and P. Thonart., 2009. Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 70-84.
- David A.S., Moreno S.N.J., Docampo R., 1995. Ca<sup>2+</sup> storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity, *Biochem. J.* **310**, 789-794
- Delcour, J., Ferain, T. & Hols, P. 2000. Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 497-504.
- Dimmick, R. L., Heckly, R. J. 1987. Free radical formation during storage of freeze dried *Serratia marcescens*. *Nature* ., **192**, 776.

- Drucker, D. B. 1994. Fast atom bombardment mass spectrometry of phospholipids for bacterial chemotaxonomy, p. 18-35. *In* C. Fenselau (ed.), Mass spectrometry for the characterization of microorganisms. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Drucker D.B., Megson G., Harty D. W. S., I. Riba, and S. J. Gaskell. 1995. Phospholipids of *Lactobacillus* spp. *J. bacteriol.*, **177**, 6304-6308.
- Fischer, W. 1990. Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids, p. 123-234. *In* M. Kates (ed.), Handbook of lipid research, vol. 6. Plenum Press, New York.
- Fonseca F., Béal C. and Corrieu G., 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage, *J. Dairy Res.* **67**, 83-90.
- Fonseca F., Béal C., Corrieu G. 2000. Method for quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.*, **67**, 83-90.
- Font de Valdéz G., de Giori G., de Ruiz Holgado A.P., Oliver G.1983. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45** 302-304.
- Font de Valdéz G., de Giori G., de Ruiz Holgado A.P., Oliver G.1985. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 413-415.
- Gibson O.A., Landerkin G.B., Morse P.M., 1965. Survival of strains of lactic streptococci during frozen storage, *J. Dairy Sci.*, **32**, 151-156.
- Gibson O.A., Landerkin G.B., Morse P.M., 1966. Effects of additives on the survival of lactic streptococci in frozen storage, *Appl. microbiol.*, **14**, 665-669.
- Giulio B.D., Orlando P., Barba G., Coppola R., Rosa M.D., Sada A., Prisco P.P.D., and Nazzaro F. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 739-746.
- Hastings, J. W., and K. H. Nealson. 1981. The symbiotic luminous bacteria, p. 1322-1345. *In* M. Starr, H. Stolp, H. Trüper, A. Balows, and H. Schlegel (ed.), The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hoerni B., 2006. Dictionnaire des cancers ; 3eds. Ed Frison-Roche Paris pp 617.
- Hubalék Z., Cryopreservation of microorganisms, Academia, Prague, Czech Republic, 1996.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N. & Jalaludin, S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, 183-185.
- Kets E.P.W., Galinski E.A., De Wit M., De Bont J.A.M., Heipieper H.J. 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12, *J. Bacteriol.*, **178**, 6665-6670.
- Konings W.N., Kok J., Kuipers O.P, Poolman B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium, *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 276-282.
- Lamprech E.D., Foster E.M., 1963. The survival of starter organisms in concentrated suspensions *J. Appl. Bact.*, **26**, 359-369.



- Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592-3597.
- Lievens L.C., Verbeek M.A.M., Noomen A., Van't Riet K. 1994. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 90-94.
- Linders L.J.M., Wolkers W.F., Hoekstra F.A., van't Riet K. 1997. Effect of added carbohydrates on membrane phase behaviour and survival of dried *Lactobacillus plantarum*, *Cryobiol.*, **35**, 31-40.
- Mazur P., 1966. Physical and chemical basis of injury in singlecelled microorganisms subjected to freezing and thawing, *«dans» oryobiology»* (h. t. meryman, ed.) pp. 213-315. Academic press, London and New-york.
- Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama, T., Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y., Inoue, N. & Shinano H., 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei* related taxa, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 54-57.
- Moss O.W., Speck M.L., 1963. Injury and death of *streptococcus laetis* due to freezing and frozen storage, *Appl. Microbiol.*, **11**, 326-329.
- Niamsup P., Sujaya N., Tanaka M., Sone T., Hanada S. Kamagata Y., Lumyong S. Assavanig A., Asano K., Tomita F. and Yokota A. 2003. *Lactobacillus thermotolerans sp.nov.*, a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 263-268.
- O'Leary, W. M., and S. G. Wilkinson. 1988. Gram-positive bacteria, p. 117–201. In C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.), *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London.
- Oowman R.A., Speck M.L., 1965. Ultra-low temperature storage of lactic streptococci, *J. Dairy.Sci.*, **48**, 1531-1532.
- Palmfedt J., Hahn-Hägerdal B. 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying, *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 235-238.
- Porubcan R.S., Sellars R.L. 1975. Stabilized dry cultures of lactic acid-producing bacteria, US Patent **3**, 897-907.
- Porubcan R.S., Sellars R.L. 1979. Lactic starter culture concentrates. *Microbial technology*. H. J. Peppler, Perlman, D. (Eds). New York, Academic Press, 59-92.
- Prasad J., Mc. Jarrow P. and Gopal P. 2003. Heat and Osmotic Responses of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in Relation to Viability after Drying, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 917-925.
- Richard M.J., Belleville F., Chalas J., Ceballos P. I., Vitoux D., Boyer M.J., Chaudière J., Favier A. 1997. Les glutathion peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique, *Ann. Biol. Clin.*, **55**, 195-208.
- Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P., Kulozik U. 2007. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying, *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 748-756.
- Selmer-Olsen E., Birkeland S.-E., Sorhaug T. 1999. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration, *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 429-437.
- Teixeira PC, Castro MH, Malcata FX, Kirby RM. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray drying. *J.Dairy Sc.*, **78**, 1025-1031.

- Uchida, K., and K. Mogi. 1973. Cellular fatty acid spectra of Hiochi bacteria, acid-tolerant lactobacilli, and their separation, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 233-249.
- Vassal L., Mocquot G., 1967. Fermentation lactique accélérée en fromagerie grâce à l'emploi d'un nombre très élevé de bactéries. *Tech. lait.*, 541, 9-13.
- Wisselink H.W., Weusthuis R.A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobber G.J. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review, *Int. Dairy. J.*, **12**, 151-161.
- Yao A. Anastasie., Coulibaly I., G. Lognay., M-L. Fauconnier and P. Thonart., 2008. Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**,1045-1052
- Yoo B., Lee C.M. 1993. Thermoprotective effect of sorbitol on proteins during dehydration, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 190-192.

## Chapitre VIII

---

**Conclusions générales et perspectives**

## Conclusions générales

---

Les cellules sont soumises à différents types de stress (thermique, acide, nutritionnel, oxydatif, mécanique, osmotique), tout au long du procédé de production de ferments lactiques. La conservation et la stabilisation des cellules par lyophilisation représentent, en particulier, une situation de stress hydrique important pour les cellules. Elle constitue une étape critique pour le maintien de la qualité des ferments lactiques et/ou starters. La non optimisation ou le mauvais contrôle des conditions de lyophilisation est, en effet, responsable d'une dégradation des propriétés technologiques des cellules. Dans le souci d'améliorer la résistance des bactéries lactiques, une approche intéressante consiste à la sélection de nouvelles souches de bactéries lactiques naturellement résistantes, présentes dans un environnement chaud et sec gage d'une bonne stratégie pour augmenter et diversifier les ressources génétiques disponibles. Car ce stress modéré permet aux cellules de développer des mécanismes physiologiques de défense et d'adaptation qui vont, par la suite, leur permettre de mieux résister aux conditions de stress réel. De même, l'utilisation des antioxydants et des procédés d'élimination de l'oxygène au cours du stockage serait un atout dans l'optimisation du taux de survie des cellules lyophilisées. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact du séchage (lyophilisation) sur la résistance des bactéries lactiques et le comportement des cellules lyophilisées de *L. plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage. L'amélioration de la résistance des cellules à l'issue des différentes étapes de la production, de la lyophilisation et du stockage est envisageable et même possible avec des formulations et d'additifs.

La première partie de ce travail a réalisé un bilan des recherches récentes dans le domaine de la lyophilisation des bactéries lactiques. Subdivisée en deux parties la synthèse bibliographique a présenté les principales notions relatives aux bactéries lactiques, leur conservation par lyophilisation, le rôle et l'intérêt des cryoprotecteurs, le rôle et l'effet des antioxydants sur la physiologie cellulaire (**partie I**).

La deuxième partie de cette thèse a démontré que pour des critères technologiques et économiques, il était impératif de mettre au point des méthodes de sélection rigoureuses, spécifiques, fiables et reproductibles. Ce fut le premier objectif de notre travail de recherche. A partir d'échantillons prélevés à proximité de poulaillers au Sénégal

(Afrique de l'ouest), dans un environnement chaud et sec, des souches de bactéries lactiques ont été sélectionnées sur la base de leur résistance aux stress thermique et osmotique et aux effets croisés de ces deux facteurs. L'adaptation bactérienne aux modifications des conditions environnementales comme critère de sélection est une alternative pour améliorer la viabilité des souches lors du stockage ainsi que leurs performances technologiques. La grande mortalité cellulaire observée chez la plupart des bactéries lactiques est justement due à l'absence d'une réponse adéquate face à la déshydratation, d'où leur grande sensibilité. Ce volet a permis d'enrichir la collection d'une nouvelle souche Gram positive et catalase négative correspondant au numéro de collection CWBI-B1419 et identifiée comme *Lactobacillus plantarum*.

Lors de la troisième partie de la thèse, des substances protectrices ont été ajoutées avant la lyophilisation et les cellules ont été stockées selon les conditions décrites ci-dessus, afin d'étudier l'effet de ces additifs sur la résistance des cellules au cours de la lyophilisation et pendant le stockage. Les performances technologiques et probiotiques de *L. plantarum* CWBI-B1419 au cours du stockage se trouvent renforcées suite à l'ajout de ces additifs. Ce qui permet donc de démontrer qu'elles peuvent être produites à grande échelle et conservées sous formes lyophilisées.

La quatrième partie des résultats a permis de mettre en lumière, le rôle prépondérant joué par l'oxydation des acides gras polyinsaturés pour la première fois sur la mortalité cellulaire. Ce chapitre avait donc pour objectif majeur de comprendre certains mécanismes à l'origine de la perte de stabilité des souches lyophilisées au cours du stockage. Parmi ces mécanismes, l'oxydation des lipides membranaires des bactéries a été étudiée. Nous avons montré que les acides gras polyinsaturés étaient instables à l'oxydation et produisaient des oxylipines (hydroperoxydes). Ces hydroperoxydes étant instables à la chaleur, se décomposent en de nombreux produits secondaires volatiles (Nawar, 1996), ce qui entraîne une forte diminution du ratio de  $C_{18:2}/C_{16:0}$  ou  $C_{18:3}/C_{16:0}$  et une accumulation rapide des oxylipines issus des acides linoléique ou linoléique pendant le stockage à 20°C de poudres lyophilisées de *L. plantarum* CWBI-B1419 à une  $a_w=0.23$ . Ce phénomène pourrait être suffisant pour entraîner une augmentation de la mortalité cellulaire et/ou la perte de l'activité métabolique. A partir de l'analyse des réponses physiologiques des cellules, nous avons montré que la meilleure tolérance de la souche *L.*

*plantarum* CWBI-B1419 est liée à des rapports différents entre acides gras insaturés et saturés, correspondant à des cellules avec une fluidité membranaire plus importante.

La cinquième partie a mis en évidence la présence de composés volatils issus de la dégradation des acides gras polyinsaturés linoléiques et linoléiques qui sont à l'origine de la production des hydroperoxydes et responsables de la mortalité cellulaire observée pendant le stockage. Il ressort que les composés aldéhydiques sont les composés volatils les plus importants, mais la présence d'autres composés (cétones et hydrocarbures) a été notée. Cette étude permet de faire une relation entre les produits primaires d'oxydations (oxylipines) et les produits secondaires qui en découlent (aldéhydes).

Enfin la sixième partie de ce travail a permis non seulement de connaître la composition en phospholipides de *L. plantarum* CWBI-B1419 mais aussi a permis de comprendre le rôle joué par les différents constituants phospholipidiques dans le phénomène de peroxydation au cours du stockage à température ambiante. Les travaux de ce chapitre ont montré la présence de sept (7) principaux phospholipides (PA, PE, PI, PS, PG, SM et LPG). Il a également établi la relation entre la variation de la composition de ces phospholipides et la mortalité cellulaire des cellules lyophilisées au cours du stockage. La résistance au stockage varie aussi selon les conditions opératoires utilisées. Ces résultats sont intéressants en vue d'applications industrielles.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats permet de conclure que les procédés de séchage (lyophilisation) ont un effet sur la résistance des cellules, et sur leur stabilisation au cours du stockage sous forme lyophilisée (poudres). Selon les procédés et les conditions appliquées, les réponses observées diffèrent, dans le sens de l'amélioration en fonction de la résistance des cellules. Ces résultats sont intéressants pour une application industrielle, car ils permettent d'identifier les conditions opératoires qui doivent être appliquées pour obtenir un ferment lactique actif avec un fort potentiel probiotique. Pour optimiser, la production de ferments lactiques avec une activité acidifiante élevée, il conviendra de jouer sur les paramètres de centrifugation, de congélation, de séchage et aussi le type d'additif à incorporer. De plus, la combinaison entre sélection rigoureuse et des conditions de séchage optimisées et non drastiques permet également la production de cellules avec une bonne activité.

## Perspectives

---

Ces résultats permettent d'ouvrir de nombreuses perspectives, qui peuvent être présentées selon deux niveaux. Il s'agira dans un premier temps de poursuivre directement et d'approfondir certains aspects de l'étude, et les méthodes de travail relatives à l'état physiologique de la cellule. Dans un autre volet, il serait souhaitable de revoir l'environnement de stockage des poudres lyophilisées des starters lactiques.

Ce travail constitue donc une contribution qui pourra être valorisée, à la fois à l'échelle du laboratoire, mais surtout au stade industriel, pour préserver efficacement la stabilité des ferments lactiques pendant le stockage. Cette technologie a plusieurs champs d'applications en Afrique et en particulier en Côte d'Ivoire

1. Pour les pays en voies de développement (PVD) et les grandes villes comme Abidjan, l'acquisition des techniques servant à la conservation des starters lactiques a plusieurs débouchés. Les bactéries lactiques pourraient être utilisées pour résoudre d'énormes problèmes sanitaires d'intérêts publics comme l'épuration des lagunes et étangs d'eaux pollués.
2. L'acquisition des techniques de conservation des bactéries lactiques pourrait être utilisée pour améliorer et amplifier les techniques de fermentation des mets traditionnels comme "l'attiéké, le gari, le soumala et le dègué". Ce qui permet d'obtenir une grande innocuité et une plus value.
3. La fabrication d'un starter lactique nécessite une technologie très précise. La sélection, l'identification, l'étude des propriétés fonctionnelles, la production et les techniques de stockage exigent un savoir-faire. Ces connaissances sont souvent régies par des brevets qui souvent rendent l'accès difficile à cette technologie, d'où l'importance de vulgarisation ces connaissances en direction du continent africain.

4. La mise au point d'un starter mixte original (microorganismes-lipase) pouvant être utilisé dans un procédé de traitement des effluents gras industriels comme le cas de *Yarrowia lipolytica* (Alloué et al., 2008 ; Destain et al., 1997)

Le deuxième enseignement important qui ressort de ces travaux de thèse concerne l'identification de certaines réponses physiologiques, en relation avec les réponses technologiques décrites précédemment.

a. Les réponses physiologiques ont donc été analysées, au niveau membranaire (composition en acides gras membranaires), une perspective à envisager serait de coupler une analyse des réponses aux niveaux membranaires et une autre au niveau cytoplasmique (protéome cellulaire) en fonction de la variation des changements environnementaux ou opératoires effectués lors de la récolte ou de la concentration des cellules.

b. A travers l'analyse des acides gras membranaires et in fine du protéome de *L. plantarum* CWBI-B1419, certaines réponses générales de ce microorganisme pourront être identifiées et étendre ces acquis à d'autres souches d'intérêts industriels.

c. L'action des composés utilisés pour la protection des cellules pour pallier aux stress hydrique et/ou physiologique n'est pas clairement défini et reste mal illustré. L'étude des phénomènes de relargage des ions (potentiel électrochimique) et l'analyse en cytométrie de flux ou microscopie électronique de la membrane cellulaire, ainsi que l'analyse en spectrométrie infrarouge de la fraction polaire des lipides membranaires, avant ou après la lyophilisation et en présence de différentes concentrations de glycérol, maltodextrine ou saccharose pourraient être envisagées.

d. Parmi les perspectives donnant suite une directe à nos travaux, il pourrait être judicieux de suivre le comportement des cellules au cours du



stockage par l'analyse et le suivi des modifications au niveau de chaque classe de phospholipides membranaires.

Une autre perspective d'étude pourrait approfondir et étendre le phénomène de relargage à d'autres souches. Une attention particulière doit être accordée au phénomène de relargage des ions. En effet, l'augmentation d'une part de la concentration en sels ou du monosodium glutamate, de la température ainsi qu'une diminution de la concentration en protons dans le milieu de réhydratation entraîneraient une augmentation de la concentration en solutés dissouts et entraînerait une réduction du nombre de cellules viables; d'autre part, l'augmentation de la concentration en glycérol, maltodextrine ou saccharose entraînerait une réduction de la concentration en solutés dissouts et un pourcentage plus élevé de cellules viables (Santivarangkna et al., 2007). L'étude des mécanismes des enzymes impliquées dans la modification des acides gras membranaires (désaturases) serait une voie à explorer dans le souci de la compréhension des phénomènes responsables de la mortalité cellulaire.

Enfin une étude des composés volatils (produits secondaires d'oxydation) produits par d'autres souches de *Lactobacillus* sp. serait intéressante d'envisager.

# Annexes

---

## Annexe 1 : Article publié dans la revue « African Journal of Biotechnology »

African Journal of Biotechnology Vol. 7 (12), pp. 2006-2012, 17 June, 2008  
Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>  
ISSN 1684-5315 © 2008 Academic Journals

Full Length Research Paper

## Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal

Coulibaly Ibourahema<sup>1\*</sup>, Robin Dubois Dauphin<sup>1</sup>, Destain Jacqueline<sup>1</sup> and Philippe Thonart<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Unité de Bio-industries, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium.

<sup>2</sup>Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Service de Technologie Microbienne, université de Liège (ULg), Sart Tilman, B40, B-4000 Liège, Belgium.

Accepted 16 May, 2008

The group that includes the lactic acid bacteria is one of the most diverse groups of bacteria known and these organisms have been characterized extensively by using different techniques. In this study, thirty lactic acid bacterial strains were isolated from soils chicken faeces and feathers. A total of nineteen isolates were obtained and by sequential screening for catalase activity and Gram-staining, eight were determined to be LAB out of which six were established to be homofermentative by the gel plug test. Five isolates were identified by use of the API 50CHL kit and four *Lactobacilli* strains and one *Lactococci* strain were selected to study their growth and lactic acid production profiles in a time course experiment. The *Lactobacilli* strains, both isolated from faeces, produced higher amounts of cells and lactic acid from soils as compared to the lactococci strain isolated from feathers. L (+)-lactic acid is the only optical isomer for use in pharmaceutical and food industries because is only adapted to assimilate this form. The optical isomers of lactic acid were examined by L (+) and D (-) lactate dehydrogenase kit. *Lactobacilli* strains produced combination of both optical isomers of lactic acid. Among them, *Lactobacillus casei subsp. casei* produced the low amount of D (-)-lactic (2%). The optimum rates of glucose for lactic acid production by *Lactobacillus* strains were 180 and 120 g/l for *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum*, respectively.

**Key words:** Characterization, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, L (+)-lactic acid, D (-)-lactic acid, optical isomers.

### INTRODUCTION

The isolation and screening of microorganisms from natural sources has always been the most powerful means for obtaining useful and genetically stable strains for industrially important products. Lactic acid bacteria (LAB) are important in the food and dairy industries because the lactic acid and other organic acids produced by these bacteria act as natural preservatives as well as flavour enhancers. LAB find increasing acceptance as probiotics which aid in stimulating immune responses, preventing infection by enteropathogenic bacteria, and treating and preventing diarrhoea (Reid, 1999). LAB is a

diverse bacterial group consisting of 11 genera. These bacteria are Gram-positive, non-spore-forming cocci or rods which produce lactic acid as their main metabolic product. *Lactobacilli* are found in a variety of habitats, also in the gastrointestinal (GI) tract of human. Lactic acid bacteria have a long history as GRAS (generally regarded as safe) organisms and especially members of genus *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* are widely used in fermentation industry. Several species of genus *Lactobacillus* have been used in food products as probiotic organisms. Probiotic strains are selected for potential application on the basis of particular physiological and functional properties. Since generalizations about the probiotic performance of species cannot be yet made based on scientific evidence, it is more reliable to assume that probiotic properties are strain-specific (San-

\*Corresponding author. E-mail: [coulibaly.i@fsagx.ac.be](mailto:coulibaly.i@fsagx.ac.be).

Annexe 2 : Article publié dans la revue « Applied Biochemistry and Biotechnology »

Appl Biochem Biotechnol (2009) 157:70–84  
DOI 10.1007/s12010-008-8240-1

---

## Survival of Freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* Related to Their Cellular Fatty Acids Composition during Storage

Ibourahema Coulibaly • Anastasie Yao Amenan •  
Georges Lognay • Marie Laure Fauconnier •  
Philippe Thonart

Received: 29 January 2008 / Accepted: 31 March 2008 /  
Published online: 20 May 2008  
© Humana Press 2008

**Abstract** Lactic acid bacteria strains *Lactobacillus plantarum* CWBI-B534 and *Leuconostoc* ssp. *mesenteroides* (*L. mesenteroides*) Kenya MRog2 were produced in bioreactor, concentrated, with or without cryoprotectants. In general, viable population did not change significantly after freeze-drying ( $p > 0.05$ ). In most cases, viable population for cells added with cryoprotectants was significantly lower than those without ( $p < 0.05$ ). Cellular fatty acids (CFAs) from the two strains in this study were analyzed before and after freeze-drying. Six CFAs were identified, namely, palmitic ( $C_{16:0}$ ), palmitoleic ( $C_{16:1}$ ), stearic ( $C_{18:0}$ ), oleic ( $C_{18:1}$ ), linoleic ( $C_{18:2}$ ), and linolenic ( $C_{18:3}$ ) acids were identified. Four of them,  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:0}$ , and  $C_{18:1}$ , make up more than 94% or 93% of the fatty acids in *L. mesenteroides* and *L. plantarum*, respectively, with another one, namely,  $C_{18:3}$ , making a smaller (on average 5–6%, respectively) contribution. The  $C_{18:2}$  contributed very small percentages (on average  $\leq 1\%$ ) to the total in each strain.  $C_{16:0}$  had the highest proportion at most points relative to other fatty acids. Moisture content and water activity ( $a_w$ ) increased significantly during the storage period. It was observed that  $C_{16:1}/C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}/C_{16:0}$  and  $C_{18:1}/C_{16:0}$  ratios for freeze-dried

---

Coulibaly Ibourahema and Yao Amenan Anastasie equally contributed to this work.

I. Coulibaly (✉) • P. Thonart

Unité des Bio-industries, Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium  
e-mail: bioindus@fsagx.ac.be

A. Y. Amenan (✉) • P. Thonart

Service de Technologie Microbienne, Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI),  
Université de Liège (ULg), Sart Tilman, B40 B-4000 Liège, Belgium  
e-mail: bioindus@fsagx.ac.be

M. L. Fauconnier

Unité de Biologie végétale (BV), Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

G. Lognay

Unité de Chimie Analytique (CA), Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

## Annexe 3 : Article publié dans la revue « Applied Microbiology and Biotechnology »

Appl Microbiol Biotechnol (2008) 79:1045–1052  
DOI 10.1007/s00253-008-1497-z

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

## Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage

Amenan A. Yao · Ibourahema Coulibaly ·  
Georges Lognay · Marie-Laure Fauconnier ·  
Philippe Thonart

Received: 16 March 2008 / Revised: 7 April 2008 / Accepted: 7 April 2008 / Published online: 7 May 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** The impact of polyunsaturated fatty acid (PUFA) degradation on the survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 was investigated over 90-days storage at 4 °C or 20 °C in vacuum-sealed aluminium foil or glass tubes with two water activities ( $a_w=0.11$  or 0.23). Colony counts, acidification activity (% lactic acid/g), linoleic/palmitic (18:2/16:0) or linolenic/palmitic (18:3/16:0) ratio by gas chromatography and 18:2 or 18:3 oxylipins by reversed phase-high performance liquid chromatography were determined. The viable cells, acidification activity and 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio decreased as the storage time increased. The survival, acidification activity and 18:2/16:0 or 18:3/16:0

ratio were greatest for the freeze-dried strain held in vacuum-sealed aluminium foil at 4 °C. The 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio decrease was correlated with the accumulation of 18:2 or 18:3 oxylipins during storage in glass tubes. Hydroperoxy PUFAs, hydroxy PUFAs, divinyl ether PUFAs and oxo PUFAs were the main oxylipins identified. A large decrease in the 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio and a rapid accumulation of oxylipins during storage might be enough to cause high cell death and loss of metabolic activity. These results provide further experimental support for the hypothesis that lipid oxidation and survival or activity of freeze-dried bacteria might be related.

**Keywords** Lactic acid bacteria · Lipid oxidation · Oxylipins · Polyunsaturated fatty acid · Viability

Amenan Yao and Ibourahema Coulibaly contribute to this work equally.

A. A. Yao (✉) · P. Thonart  
Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit,  
University of Liège,  
Sart-Tilman B40,  
4000 Liège, Belgium  
e-mail: AmenanAnastasia.Yao@student.ulg.ac.be

I. Coulibaly · P. Thonart  
Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit,  
Gembloux Agricultural University,  
Passage des déportés 2,  
5030 Gembloux, Belgium

G. Lognay  
Analytical Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University,  
Passage des déportés 2,  
5030 Gembloux, Belgium

M.-L. Fauconnier  
Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University,  
Passage des déportés 2,  
5030 Gembloux, Belgium

### Introduction

Lactic acid bacteria for food industry are commonly freeze-dried for long-term storage. It is now well-established that factors such as temperature, atmosphere, exposure to light, and relative humidity affect the stability of freeze-dried bacteria during storage. These factors alone or in combination might lead to unacceptably high loss of viable cells and/or activity (acid-producing capacity) due to deteriorative chemical reactions. The storage of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in glass vials sealed under vacuum or nitrogen gas was found to be superior to storage in air (Bozoglu et al. 1987). The survival of *L. bulgaricus* was greatest at 11% relative humidity ( $RH_{eq}$ ) and 5 °C compared with storage at 59%  $RH_{eq}$  and 20 °C (Castro et al. 1995). The acidification activity in *S. thermophilus* was higher during storage at 5 °C or under

## Annexe 4 : Article publié dans la revue « International Journal of Microbiology »

Hindawi Publishing Corporation  
International Journal of Microbiology  
Volume 2010, Article ID 625239, 9 pages  
doi:10.1155/2010/625239

## Research Article

## The Resistance to Freeze-Drying and to Storage Was Determined as the Cellular Ability to Recover Its Survival Rate and Acidification Activity

Ibourahema Coulibaly,<sup>1</sup> Robin Dubois-Dauphin,<sup>1</sup> Jacqueline Destain,<sup>1</sup>  
Marie-Laure Fauconnier,<sup>2</sup> Georges Lognay,<sup>3</sup> and Philippe Thonart<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>2</sup>Analytical Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>3</sup>Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University, Passages des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>4</sup>Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, 4000 Liège, Belgium

Correspondence should be addressed to Ibourahema Coulibaly, coul.lam@yahoo.fr

Received 8 November 2009; Accepted 7 April 2010

Academic Editor: Effie Tsakalidou

Copyright © 2010 Ibourahema Coulibaly et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The protective effects of the fatty acid composition and membrane action of the acidification activity of two strains of *Lactobacillus* kept at 20°C were studied. The addition of sorbitol, monosodium glutamate and glycerol during storage is causing the decline of acidification and increased concentrations of unsaturated fatty acids observed in both strains. The addition of sorbitol and monosodium glutamate does not alter the fatty acid composition, whatever the strain, but increases the resistance to freeze-drying of *L. plantarum* CWBI-B1419 and improves survival during storage. The addition of these preservatives and decreased activity of acidification improves the ratio unsaturated. These results indicate that the survival during storage and freeze-drying resistance are closely related to the composition of membrane fatty acids. This behaviour can be interpreted as an adaptation of *L. plantarum* B1419-CWBI supplemented by cryoprotectant additives such as sorbitol or monosodium glutamate sorbitol and monosodium glutamate as an additive. *L. plantarum* CWBI-B1419 presents a greater adaptation to culture conditions than *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG9192<sup>T</sup>.

### 1. Introduction

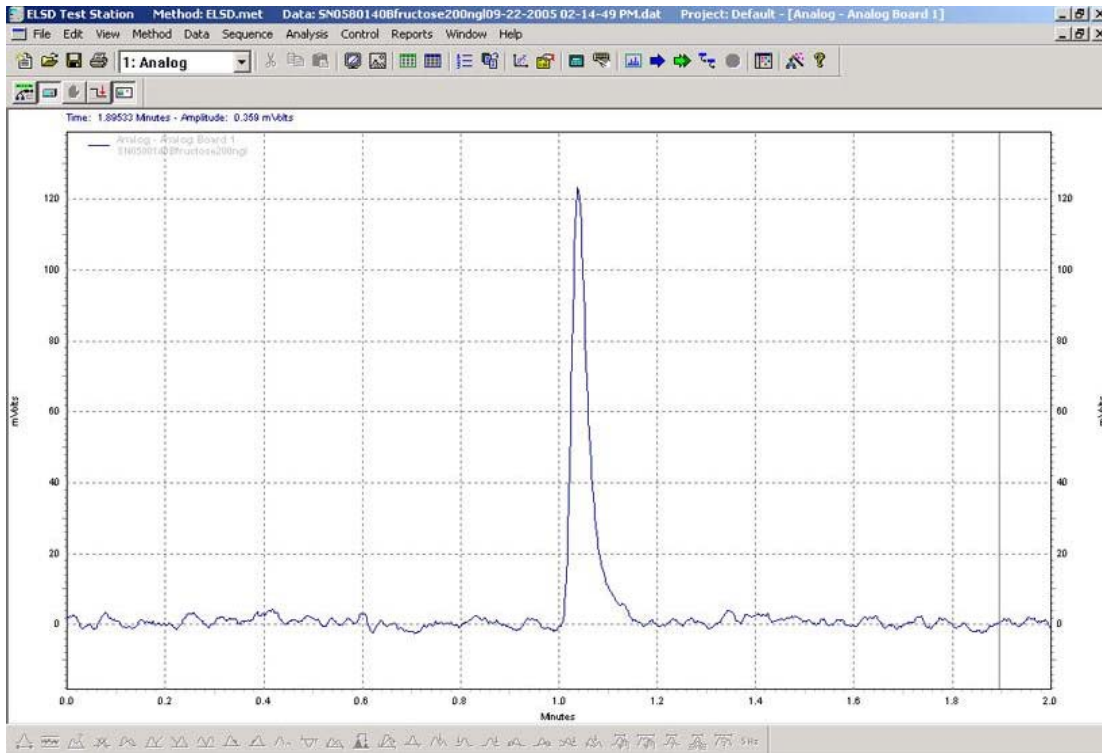
The acidification activity of lactic acid bacteria at the different steps of their production (fermentation, cooling, concentration, cryoprotection, freezing, or freeze-drying) and during storage differs depending on the strain considered and on the operating conditions [1, 2]. The freezing and freeze-drying step is especially critical as it negatively affects both viability and physiological state of the bacteria [3, 4]. The formation of ice crystals induces mechanical damage that leads to cellular death during freezing [5]. In addition, the crystallization of the water leads to a cryoconcentration of the solutes, which induces some osmotic damage [6]. Some agents such as those used in lyoprotection are of

undoubted importance for the survival of cells because they can act on biological functions in preserving the integrity of the lipid bilayer by the phenomenon of water replacement, vitrification (glass formation), and depression of membrane transition temperatures ( $T_m$ ), as reviewed in detail by Castro et al. [7, 8] and Champagne et al. [9]. The same observations with sucrose for survival of *Lb. coryniformis* Si3 were noticed by Schoug et al. [10]. Adding cryoprotective agents such as sorbitol, monosodium glutamate, and glycerol before freeze-drying process attenuated the damaging effects of freezing, thus improving the bacterial resistance to drying [11, 12]. This protective effect was ascribed to interactions between sorbitol and the membrane phospholipids during the first step of freeze-drying, freezing [13]. Because the

## Annexe 5 : Montage de la chromatographie HPLC couplé au ELSD et le chromatogramme

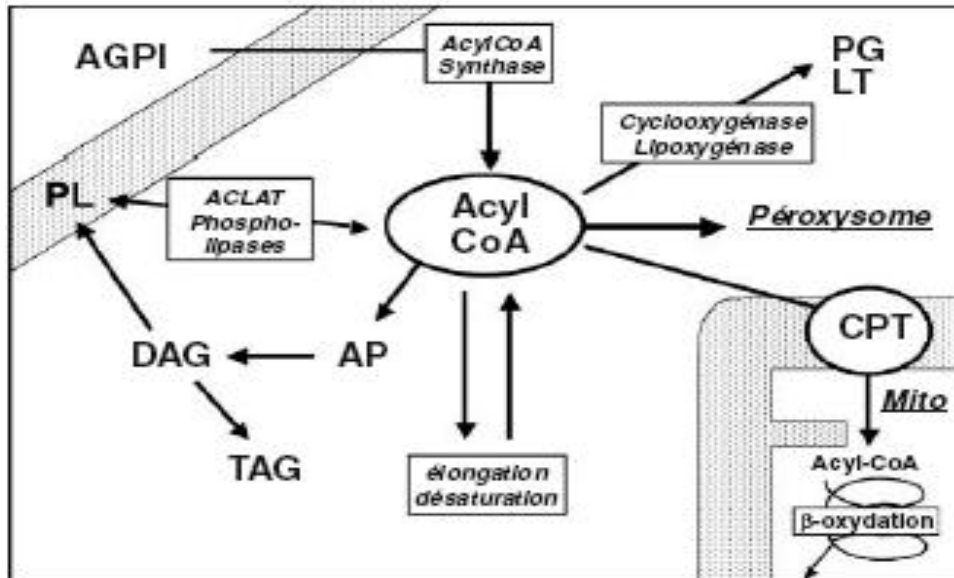


Montage d'analyse concernant la chromatographie HPLC couplé au ELSD utilisé pour l'analyse des phospholipides membranaires

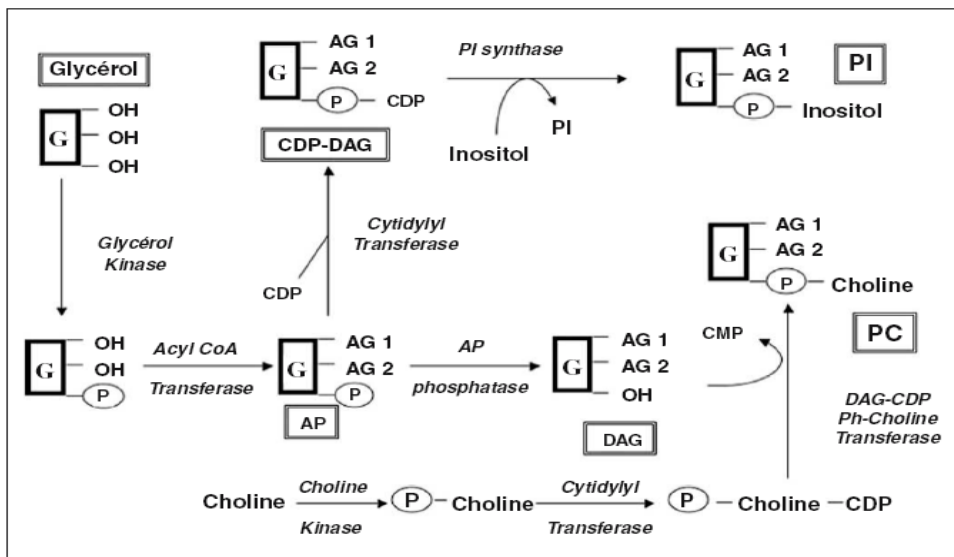


Chromatogramme type concernant la chromatographie HPLC couplé au ELSD utilisé pour l'analyse des phospholipides membranaires

## Annexe 6: Voies d'utilisation intracellulaire des acides gras et synthèse des phospholipides membranaires

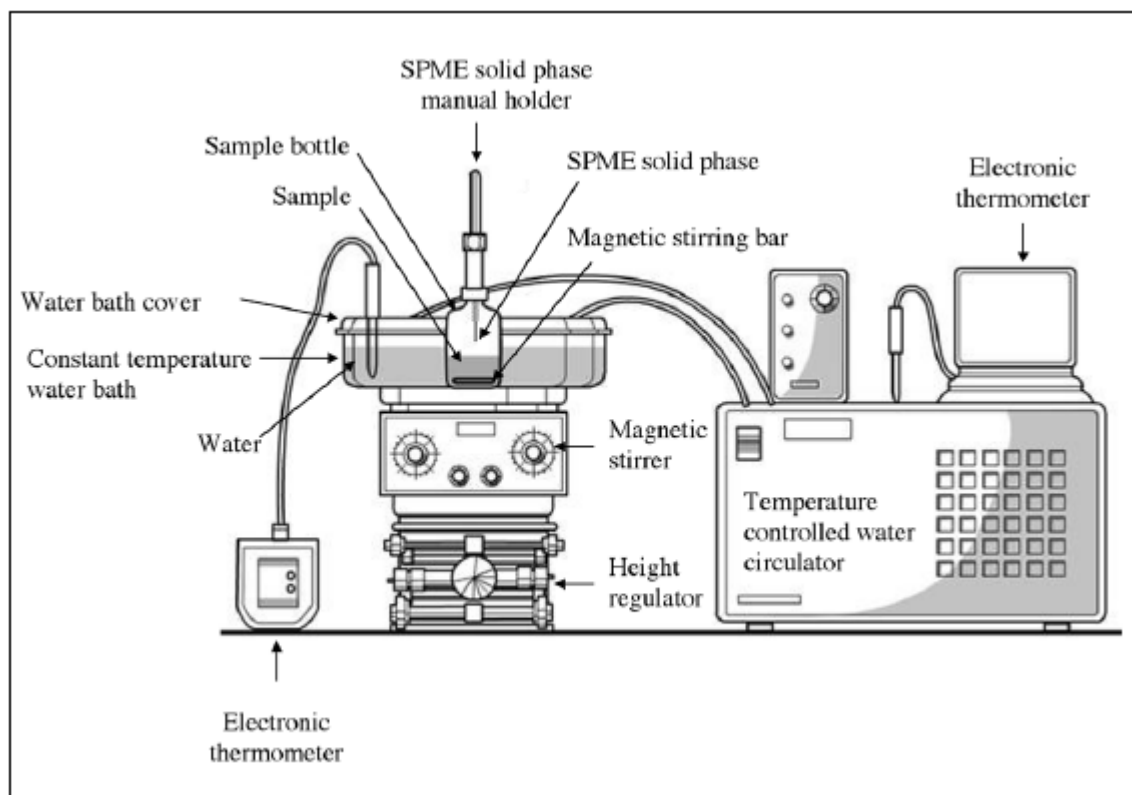


Représentation schématique des voies d'utilisation intracellulaire des acides gras. (AP : acide phosphatidique, DAG/TAG : di/triacylglycérol, PL : phospholipides, PCT : Palmitoyl Carnitine Transferase, ACLAT : Acyl-CoA Lysophospholipide Acyl Transférase, PG : prostaglandines, LT : leucotriènes).



Principales voies de synthèse des phospholipides membranaires. (G : glycérol ; DAG: diacylglycérol; AP: acide phosphatidique; PI: phosphatidylinositol; PC: phosphatidylcholine CDP-DAG: cytidyl di-phosphate-diacylglycérol).



**Annexe 7: Dispositif HPLC-SPME pour l'analyse des composés volatils**

Dispositif permettant de déterminer les composés volatils issus de la dégradation des acides gras polyinsaturés. Le montage sert à l'isolement des volatils, de contrôler la température et la vitesse d'agitation magnétique d'un échantillon au cours de l'analyse par la technique de SPME (ou headspace).

## Annexe 8 : Formule type milieu MRS



Aspects des lactobacilles en culture sur boîte de petri sur milieu MRS agar avec colorant

**FORMULE – TYPE Milieu MRS**

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

|  |         |
|--|---------|
| Polypeptone                                      | 10,00 g |
| Extrait de viande                                | 10,00 g |
| Extrait autolytique de levure                    | 5,00 g  |
| Glucose  | 20,00 g |
| Tween 80   | 1,08 g  |
| Phosphate dipotassique                           | 2,00 g  |
| Acétate de sodium                                | 5,00 g  |
| Citrate d'ammonium                               | 2,00 g  |
| Sulfate de magnésium                             | 0,20 g  |
| Sulfate de manganèse                             | 0,05 g  |
| pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,4 ± 0,2. |         |

**Annexe 9 : Appareillage pour la concentration et le séchage des cellules après la fermentation dans les réacteurs**

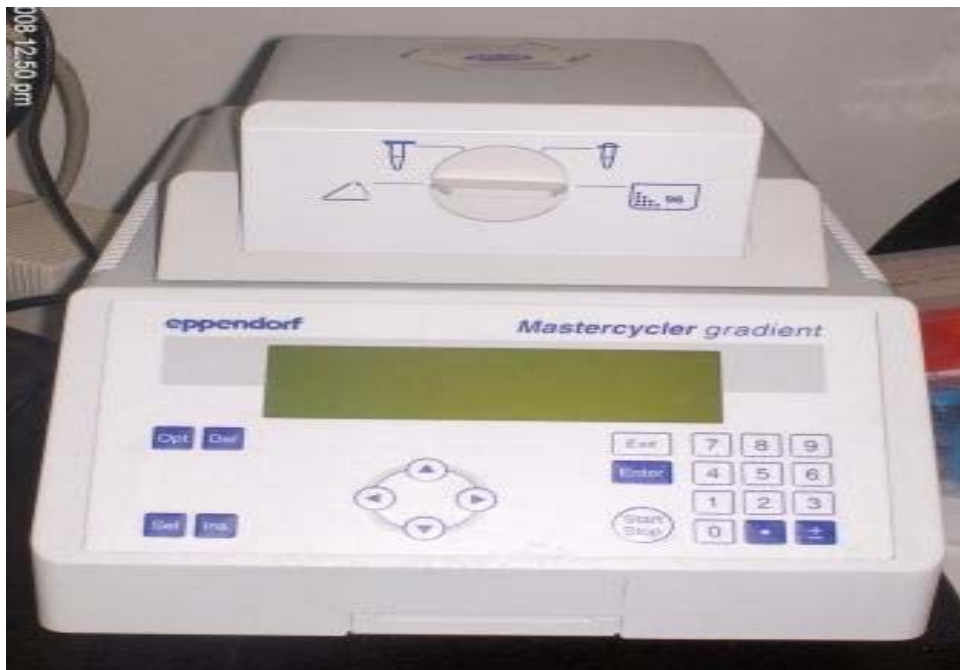


Centrifugeuse Beckman Avanti J25 servant à la concentration des cellules après la fermentation dans les réacteurs



Lyophilisateur Lyostar® à plateau servant à sécher les bactéries lactiques après la phase de concentration.

**Annexe 10 : Appareil servant à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**



Mastercycler (Eppendorf) appareil pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), utilisé dans le séquençage de l'ADN 16s de *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419

## Tableaux et figures

---

## Liste des tableaux

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 1.</b> Quelques substances utilisés comme cryoprotecteurs cellulaires (d'après Adjizian et al., 1987).....   | 23  |
| <b>Tableau 2.</b> Effet de la température de culture sur la composition en acides gras (%) chez <i>L. plantarum</i> .....   | 25  |
| <b>Tableau 3.</b> Peroxidation des lipides (produits des linoléates). Les caractéristiques des réactions chimiques et les produits spécifiques issus de l'oxydation des linoléates par différents mécanismes. ....                        | 31  |
| <b>Table 4.</b> Functional classification and anchor types.....   | 56  |
| <b>Table 5.</b> Some characteristics of the five homofermentative LAB isolates.....   | 83  |
| <b>Table 6.</b> Physiological characteristics: tolerance of the five LAB isolates to ranges of temperatures, lactic acid, NaCl concentrations and pH.....   | 86  |
| <b>Table 7.</b> Composition and modifications of membrane fatty acids (% of peaks areas) induced by growth temperature of <i>L. paracasei</i> ssp. LMG 9192 <sup>T</sup> and <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419.....                          | 106 |
| <b>Table 8.</b> Moisture content and survival of two strains of lactobacilli after freeze-drying with 12 g/L monosodium glutamate and 12 g/l sorbitol. Each value represents the mean of replicates from 2 freeze-drying experiments..... | 110 |
| <b>Table 9.</b> Dry cell weight of freeze-dried cells, conserved at 20°C and safe from oxygen and moisture. Water activity of freeze-dried cells, conserved at 20°C and safe from oxygen and moisture. ....                               | 112 |
| <b>Table 10.</b> Viability of <i>L. mesenteroides</i> and <i>Lb. plantarum</i> before and after freeze-drying.....  | 129 |
| <b>Table 11.</b> Cellular fatty acid composition of <i>L. mesenteroides</i> before and after freeze-drying.....   | 135 |
| <b>Table 12.</b> Cellular fatty acid composition of <i>Lb. plantarum</i> before and after freeze-drying.....  | 135 |
| <b>Table 13.</b> Moisture content and survival of freeze-dried <i>L. mesenteroides</i> and <i>Lb. plantarum</i> after 90-day storage .....  | 136 |
| <b>Table 14.</b> Moisture content and $C_{18:2}/C_{16:0}$ ratio for freeze-dried <i>L. mesenteroides</i> and <i>Lb. plantarum</i> after 90-day storage .....  | 137 |
| <b>Table 15.</b> Moisture content and $C_{18:3}/C_{16:0}$ ratio for freeze-dried <i>L. mesenteroides</i> and <i>Lb. plantarum</i> after 90-day storage .....  | 138 |

**Table 16.** Viability of *L. plantarum* CWBI-B1419 before and after freeze-drying. ....155

**Table 17.** Relative abundances of volatile compounds detected in freeze-dried *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 during storage. .... 158

**Table 18.** The main volatils compounds found in the dynamic headspace/ GC analysis of freeze-dried *L. plantarum* CWBI-B1419 during storage. .... 161

**Table 19.** HPLC Gradient Scheme. .... 175

**Table 20.** Survival after freeze-drying process at 20°C and 40°C for 90-day, kinetic parameters of growth and substrate consumption of *L. palntarum* CWBI-B1419 in batch culture ..... 176

**Tableau 21.** Caractéristiques physiologiques: la tolérance des cinq isolats de bactéries lactiques aux gammes de température, de l'acide lactique, les concentrations de NaCl et de pH. (cf tab.6 chap. II). .... 194

**Tableau 22.** Taux de survie de deux souches de lactobacilli après lyophilisation avec 12 g/l de mosodium glutamate et 12 g/l de sorbitol. Chaque valeur représente la moyenne des répétitions des deux expériences de lyophilisation ..... 196

## Liste des figures

---

- Figure 1.** Représentation schématique d'un produit en cours de lyophilisation. Symbole: S=interface de sublimation; E=zone externe poreuse; I=zone interne congelée (Simatos et al., 1994). ..... 18
- Figure 2.** Evolution du flux de chaleur ( $dQ/dt$ ) en fonction de la température ( $T$ ), mesurée par analyse calorimétrique différentielle. La température de transition vitreuse ( $T_g$ ,  $T_g$  midpoint) correspond à la médiane aux deux droites parallèles entre tangentes aux points ( $T_{g\text{onset}}$  et  $T_{g\text{endset}}$ ) au point d'inflexion de la courbe. .... 20
- Figure 3.** Facteurs influençant la survie des bactéries la lyophilisation. [Encadrés] : Depuis leur culture jusqu'à leur décongélation ou réhydratation (Besson et al., 1987). ..... 22
- Figure 4.** Réaction auto-catalytique de l'oxydation des acides gras insaturés, (Yin et al., 2007). ..... 28
- Figure 5.** Phase d'initiation ..... 28
- Figure 6.** Phase de propagation ..... 29
- Figure 7.** Phase de terminaison ..... 29
- Figure 8.** Schema de l'autooxydation (Chyau et al., 1999) ..... 29
- Figure 9.** Les différentes étapes de la réaction d'oxydation des linoléates (d'après Niki et al., 2005). ..... 30
- Figure 10.** Auto-oxydation et photo-oxydation des  $\Delta^5$ -stérols, (Fernades et al., 2007). ..... 32
- Figure 11.** Les principales voies de la lipoxygénase.- The mains lipoxygénase pathway. (Fauconnier, 1997). .... 33
- Figure 12.** Représentation schématique de l'autooxydation des lipides insaturés (Techniques de laboratoire N°2 - 2007). ..... 35
- Figure 13.** Homolactic acid fermentation pathway. In lactic fermentation by *Lactobacillus*, the substrate (glucose) is oxidized to pyruvate, and pyruvate becomes reduced to lactic acid. Redox balance is maintained by coupling oxidations to reductions within the pathway. .... 51
- Figure 14.** Pyruvate metabolism in *L. johnsonii* and *L. plantarum*. The figure is based on the pyruvate metabolism pathway from the KEGG database (Kanehisa et al., 2002). ..... 52



|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 15.</b> Schematic representation of the cell wall of Gram-negative bacteria showing several layers of polysaccharides and glycoconjugates.....   | 54  |
| <b>Figure 16.</b> Cell wall from Gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria lack the outer membrane and associated lipopolysaccharide (LPS) that is present in Gram-negative organisms. In Gram-positive bacteria, the peptidoglycan layer is thicker and contains teichoic acids.....   | 55  |
| <b>Figure 17.</b> Extracellular anchored and secreted proteins of <i>L. plantarum</i> . Numbers in parentheses are the number of predicted proteins of the different types. ....   | 56  |
| <b>Figure 18.</b> Domain composition of <i>L. plantarum</i> proteins predicted to be associated with the cell wall through LysM domains. Putative protein functions are listed below the ORF names (Boekhorst et al., 2006).....   | 57  |
| <b>Figure 19.</b> Domain composition of <i>L. plantarum</i> proteins predicted to be involved in the adherence to extracellular macromolecules. Putative protein functions are listed below the ORF names.....   | 58  |
| <b>Figure 20.</b> The structures of two phospholipids, (Berg et al., 2002). ....   | 60  |
| <b>Figure 21.</b> Biomass produced by three strains of <i>Lactobacilli</i> : (◆) <i>Spo05</i> , (■) <i>Spo04</i> and (▲) <i>Spo20</i> isolates over 42 h. ....   | 87  |
| <b>Figure 22.</b> Lactic acid produced by three strains of <i>Lactobacilli</i> : (◆) <i>Spo05</i> , (■) <i>Spo04</i> and (▲) <i>Spo20</i> isolates over 42 h.....  | 88  |
| <b>Figure 23.</b> pH of the cultures of three strains of <i>Lactobacilli</i> : (◆) <i>Spo05</i> , (■) <i>Spo04</i> and (▲) <i>Spo20</i> isolates over 42 h. ....   | 88  |
| <b>Figure 24.</b> Glucose consumption (mm) by three strains of <i>Lactobacilli</i> : (◆) <i>Spo05</i> , (■) <i>Spo04</i> and (▲) <i>Spo20</i> isolates over 42 h.....  | 89  |
| <b>Figure 25.</b> Lactic acid optical isomers comparison produced by three strains of <i>Lactobacilli</i> : <i>Spo05</i> , <i>Spo04</i> and <i>Spo20</i> with ■ D(-) Optical isomer and □ L(+) Optical isomer. ....  | 90  |
| <b>Figure 26.</b> Impact of storage time upon U/S ratio of freeze-dried lactobacilli during 120 days at room temperature in vacuum-sealed aluminium foil. Values are presented as means ± standard deviation (SD, n=4). (a) <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LMG 9192 <sup>T</sup> , (b) <i>L. plantarum</i> CWBI-B1419 <sup>T</sup> and (c) control (■), sorbitol (□) and monosodium glutamate (▣). .... | 107 |

- Figure 27.** Acidification activity of freeze-dried : (a) *L. plantarum* CWBI-B1419, (b) *L. paracasei* ssp. *casei* LMG 9192<sup>T</sup> and (c) control (□◆□), sorbitol (□■□) and monosodium glutamate (□▲□). Values are presented as means ± standard deviation (SD, n=4) ..... 108
- Figure 28.** Survival of freeze-dried lactobacilli during 120 days at room temperature in vacuum-sealed aluminium foil. Values are presented as means ± standard deviation (SD, n=4). (a) *L. paracasei* ssp. *paracasei* LMG 9192<sup>T</sup>, (b) *L. plantarum* CWBI-B1419 and (c) control (-◆-), sorbitol (-■-) and monosodium glutamate (-▲-). ..... 111
- Figure 29.** Survival of freeze-dried *L. mesenteroides* during storage at 4°C or 20°C. Symbols: ○ freeze-dried strain without cryoprotectants (P), ● freeze-dried strain with cryoprotectants (5% maltodextrine + 2% glycerol) (PC). Dotted lines for storage in vacuum-sealed aluminium foil, continuous lines for storage in opened white glass tube. Values represent means ± SD (n = 4)..... 131
- Figure 30.** Survival of freeze-dried *Lb. plantarum* during storage at 4°C or 20°C. Symbols: ○ freeze-dried strain without cryoprotectants (P), ● freeze-dried strain with cryoprotectants (5% maltodextrine + 2% glycerol) (PC). Dotted lines for storage in vacuum-sealed aluminium foil, continuous lines for storage in opened white glass tube. Values represent means ± SD (n = 4)..... 133
- Figure 31.**  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios of freeze-dried *L. mesenteroides* during 90-day storage at: 4 °C (A) or 20°C (B) in vacuum-sealed aluminium foil (a) or in opened white glass tube (b). Bars are means ± SD (n = 4) and represent the ratio between each fatty acid and the palmitic ( $C_{16:0}$ ) acid..... 140
- Figure 32.**  $C_{18:2}/C_{16:0}$  and  $C_{18:3}/C_{16:0}$  ratios of freeze-dried *Lb. plantarum* during 90-day storage at: 4 °C (A) or 20°C (B) in vacuum-sealed aluminium foil (a) or in opened white glass tube (b). Bars are means ± SD (n = 4) and represent the ratio between each fatty acid and the palmitic ( $C_{16:0}$ ) acid..... 141
- Figure 33.** Behaviour of freeze dried *Lactobacillus plantarum* CWBI-B1419 in function of survival rate and acidification activity during 90 days at a) 20°C or b) 40°C, with lithothamene (-●-) or without lithothamne (-■-). Values are presented as means ± standard deviation (SD, n=3). ..... 177
- Figure 34.** Free fatty acids profile of *Lactobacillus palntarum* CWBI-B1419 a) after freeze-drying without lithothamne®400, (C); b) after freeze-drying with lithothamne®400, (CL). ..... 178
- Figure 35.** Individual lipid class content (% of total lipids) of *L. palntarum* CWBI-B1419. Symbol :(□) freeze-dried strain without lithothamne, (■) freeze-dried strain with 8% lithothamne®. Values are represented as means ± standard deviation of triplicates. .... 179

**Figure 36.** Percentage composition of phospholipids classes in freeze-dried powder of *L. plantarum* CWBI-B1419. Symbols: ■ freeze-dried powder with lithothamne® (CL), □ freeze-dried powder without lithothamne® (C) at 30, 60 and 90 days..... 180

**Figure 37.** Calibration curves: mass of PL vs. ELSD response in 10 µL of injection volume..... 181

**Figure 38.** Dendrogramme montrant la position de la souche CWBI-B1419 dans le groupe des *Lactobacillus* spp. selon les alignements des séquences codant pour l'ARNr 16S (Dendrogramme réalisé avec le programme Ribosomal Data Project II)..... 195

**Figure 39.** Illustrations des mécanismes régissant l'altération des polyinsaturés aboutissant à la formation des composés volatils (d'après Niki et al., 2005).. ..... 202

# Liste des membres du jury

---

**Pr. Marianne Sindic : *Présidente du jury*** - Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires (GxABT); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique.  
**Courriel :** [Marianne.Sindic@ulg.ac.be](mailto:Marianne.Sindic@ulg.ac.be).

**Pr. Philippe Thonart : *Promoteur*** - CWBI-Unité des Bio-Industries (GxABT); Services de Technologie Microbienne (ULg); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique. **Courriel :** [bioindus.gembloux@ulg.ac.be](mailto:bioindus.gembloux@ulg.ac.be).

**Dr. Jacqueline Destain : *Co-promoteur*** - CWBI-Unité des Bio-Industries (GxABT); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique. **Courriel :** [J.Destain@ulg.ac.be](mailto:J.Destain@ulg.ac.be).

**Pr. Daniel Portetelle : *Membre*** - Unité de Biologie Animale et Microbienne (GxABT); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique. **Courriel :** [Daniel.Portetelle@ulg.ac.be](mailto:Daniel.Portetelle@ulg.ac.be)

**Pr. Georges Lognay : *Membre*** - Unité de Chimie Analytique (GxABT); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique. **Courriel :** [Georges.Lognay@ulg.ac.be](mailto:Georges.Lognay@ulg.ac.be).

**Pr. François Béra : *Membre*** - Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires (GxABT); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique. **Courriel :** [f.bera@ulg.ac.be](mailto:f.bera@ulg.ac.be).

**Dr. Sabine Danthine : *Rapporteur interne*** - Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires (GxABT); passage des Déportés 2, 5030 Gembloux Belgique.  
**Courriel :** [Sabine.Danthine@ulg.ac.be](mailto:Sabine.Danthine@ulg.ac.be).

**Pr. Carmen Socasiu : *Rapporteur externe*** - Department de Chimie et de Biochimie Agroalimentaire. Str. Mănăştur, nr. 3-5, 400372, Cluj-Napoca, România. **Courriel :** [csocaciu@usamvcluj.ro](mailto:csocaciu@usamvcluj.ro).

**Pr. Gnakri Dago : *Membre*** Université Régionale d'Enseignement Supérieur (URES-Daloa, Côte d'Ivoire). 02 B.P. 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire **Courriel :** [gnakri\\_dago@yahoo.fr](mailto:gnakri_dago@yahoo.fr).