

Promoteur :

Prof. Thonart Philippe

Centre Wallon de Biologie Industrielle

Université de Liège / Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (FSAGx), Belgique

Commission d'examen :

Prof. Joris Bernard

Université de Liège, Belgique

Président

Prof. Collin Sonia

Université Catholique de Louvain, Belgique

Examineur

Prof. Daube Georges

Université de Liège, Belgique

Examineur

Prof. Dommes Jacques

Université de Liège, Belgique

Examineur

Prof. Ndoye Ababacar

Institut de Technologie Alimentaire, Sénégal

Examineur

Prof. Wathelet Bernard

FSAGx, Belgique

Examineur

FACULTE DES SCIENCES
Centre Wallon de Biologie Industrielle

**La fermentation du manioc en gari dans l'Afrique
de l'Ouest : production d'un starter de bactéries
lactiques lyophilisées**

Année académique 2008-2009

Dissertation présentée par
Amenan YAO
en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

*A ma mère et mon père
A mon époux Soro Kafon*

REMERCIEMENTS

Au terme de cette formation doctorale, je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes morales et physiques qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent particulièrement :

Au Professeur *Philippe Thonart*, promoteur de cette thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, accepté de diriger ce travail et pour le soutien scientifique et moral qu'il n'a cessé de me prodiguer. J'ai été particulièrement touchée par sa rigueur scientifique et l'attention qu'il m'a accordée malgré ses multiples obligations.

A Madame et Messieurs les Professeurs *Marie-Laure Fauconnier, François Bera, Georges Lognay, Wathelet Bernard Wathelet, Michel Marlier, Moutairou Egounlety* pour m'avoir largement ouvert les portes de leurs services. Qu'ils reçoivent ici mes sincères remerciements pour les critiques scientifiques qui ont permis d'améliorer la qualité des publications scientifiques faisant partie de cette dissertation.

Aux Professeurs *Jacques Dommes, Georges Daube et Bernard Joris*, membres de mon comité de thèse pour leur disponibilité et leurs critiques qui ont beaucoup contribué à l'amélioration et l'avancement de mes travaux.

Aux membres des différents panels de lecteurs pour leurs commentaires et critiques scientifiques ayant permis d'améliorer les publications faisant partie de cette thèse.

Aux membres du jury qui ont accepté de consacrer leur temps pour évaluer ce travail.

Au personnel du Centre Wallon de Biologie Industrielle et de l'Unité des Bio-industries en Particulier, *Cécile Ek, Marina Chanay, Marguerite Demi, Jacqueline Destain, Jérémy Timsonnet, Yves Discart, Jean-Jacques Gilsoul, Sergs Hillisgsmann, Ahmed Sabri, Frédéric Weekers, Carine Dortu, Laurent Tarte* et aussi les nouveaux doctorants *Rasoul, Dora, Christopher, Julien, Laurent*, pour leur disponibilité chaque fois que le besoin s'en faisait sentir.

A *Maryse Hardenne, Vincent Hote et Dany Tristman* pour leur disponibilité, leur patience et leur joie de vivre. Qu'ils reçoivent ici mes sincères remerciements pour toute l'attention dont j'ai été l'objet.

Au personnel de la Bibliothèque des Sciences de l'Université de Liège, en particulier *Philippe Mottet, Caroline Collette* et *Joelle Samedi* pour leur aide dans la constitution des références bibliographiques de toutes les publications scientifiques et synthèses bibliographiques. Que *Philippe Mottet* reçoive mes remerciements les plus sincères pour tout le soutien qu'il m'a apporté durant tout mon parcours à l'Université de Liège.

Aux membres de l'unité Saint Benoît aux Portes d'Avroy, *Jean Marc Ista, Michelle* et *Jacqueline Dufays, Pierre Joiris, Monique Rasenfosse, Anne-Marie Delvenne, Anne-Marie Lemaire* pour leur accueil.

A mes aînées Docteurs es Science *Marie-Solange, Mireille, Rose* et *Korotoumou*, ainsi qu'aux doctorants Ivoiriens des Universités Belges pour leur soutien et leurs encouragements.

Aux responsables et enseignants de l'Université d'Abobo-Adjamé en Côte d'Ivoire, Professeurs *Etienne Ehilé, Patrice Kouamé, Georges Amani* et *Firmin Aboua* qui m'ont encouragée à entreprendre des études de doctorat.

A la direction de l'Orientation et des Bourses du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la République de Côte d'Ivoire ainsi qu'à l'Ambassade de Côte d'Ivoire près le Benelux pour le soutien financier accordé à la réalisation de cette thèse.

Je suis également redevable à mes parents, ma belle famille, ma grand-mère, mes cousins, mes oncles et tantes ainsi que mes amis qui n'ont cessé de me soutenir malgré l'éloignement. Que ma mère, mon Père, mon époux ainsi que mes frères et sœurs trouvent ici mes sincères remerciements pour leur soutien sans faille et leurs encouragements.

A toi 'Laurette', merci de m'avoir accueillie, soutenue et encouragée.

A toi Kafon, merci pour ta patience, ta compréhension et tout ton soutien.

A vous dont les noms ont été omis par inadvertance et qui avez contribué à la réalisation de cette thèse de doctorat et à notre formation.

LISTE DES ABBREVIATIONS

a_w	: Water activity
BHT	: Butylated hydroxytoluene
CFAs	: Cellular fatty acids
CFU	: Unit forming colonies
CnA	: Colnelenic acid
D	: Decimal reduction time (h)
DW	: Dry Weight
Ea	: Activation energy (J mole ⁻¹)
EC	: Electrical conductivity
EC _f	: Electrical conductivity after 4h rehydration
EC _i	: Electrical conductivity at the beginning of the experiment
EC	: Total electrical conductivity after autoclaving the sample during 20 min at 112°C
FAME	: Fatty acid methyl esters
HOD	: Hydroxy linoleic acid
HOT	: Hydroxy linolenic acid
HPOD	: Hydroperoxy linoleic acid
HPOT	: Hydroperoxy linolenic acid
k	: Rate constant (h ⁻¹)
k ₀	: Pre-exponential constant
KOT	: Keto linolenic acid
LAB	: Lactic acid bacteria
MDA	: Malondialdehyde
Me	: Esterified
N	: CFU/g at each storage time t
N ₀	: CFU/g DW at the end of freeze-drying or at the beginning of storage
N _c	: CFU/g DW before freeze-drying (at the end of centrifugation)
N _f	: CFU/g of the sample after 60 days storage at 4°C
N _{Lf}	: Proportion of viable cells before dehydration in glycerol solution
N _{Li}	: Proportion of viable cells after dehydration in glycerol solution
P	: Probability
P	: Cells without additives
PC	: Cells with cryoprotectants (maltodextrin+glycerol)

PCA	: Cells with cryoprotectants+ascorbic acid
PCAB	: Cells with cryoprotectants+ascorbic acid+BHT
PCB	: Cells with cryoprotectants+BHT
PUFAs	: Polyunsaturated fatty acids
R	: Ideal gas constant ($8.314 \text{ j mole } ^\circ\text{K}^{-1}$)
r^2	: Correlation coefficient
R^2	: R-squared
RH	: Relative humidity
T	: Absolute temperature ($^\circ\text{K}$)
t	: Sampling time or storage time (h)
t_0	: The end of freeze-drying
TBA	: 2-thiobarbituric acid
TBARS	: TBA-reactive substances
TCA	: Trichloroacetic acid
z	: Thermal death time parameter ($^\circ\text{C}$)

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	vii
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	ix
TABLE DES MATIERES.....	xi
RESUME / SUMMARY	17
AVANT-PROPOS.....	21
INTRODUCTION	23
Synthèse 1 (Article 1) : Objectif.....	25
Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle.....	27
Résumé/Summary	28
1.1. Introduction	29
1.2. Origine des bactéries lactiques	30
1.2.1. Produits non-alcoolisés	30
1.2.1.1. Produits à base de céréales.....	30
1.2.1.2. Produits à base de manioc.....	34
1.2.2. Boissons alcoolisées	35
1.3. Rôle des bactéries lactiques.....	36
1.3.1. Formation de l'arôme et de la saveur.....	36
1.3.2. Préservation et innocuité de l'aliment.....	37
1.3.3. Interaction avec d'autres micro-organismes	37
1.3.4. Influence sur la valeur nutritionnelle	38
1.3.5. Influence sur la structure de la matrice alimentaire	40
1.3.6. Propriétés probiotiques	40
1.4. Utilisation des bactéries lactiques comme cultures starters.....	41
1.4.1. Définition et critères de sélection	41
1.4.2. Avantages.....	42
1.4.3. Préparation et conservation.....	43
1.4.4. Perspectives	45
1.5. Conclusion.....	45
1.6. Bibliographie.....	46
Synthèse 2 : Objectif.....	55
Les bactéries lactiques : le genre Weissella.....	57

Résumé/Abstract.....	58
2.1. Introduction	59
2.2. Taxonomie.....	59
2.3. Origine et habitat.....	60
2.4. Caractéristiques générales	61
2.5. Caractéristiques structuraux	62
2.5.1. La paroi cellulaire	62
2.5.2. La membrane cytoplasmique	62
2.5.3. Les lipides membranaires	63
2.5.3.1. Les phospholipides.....	63
2.5.3.2. Les acides gras	64
2.6. Propriétés fonctionnelles	65
2.6.1. Dégradation des facteurs antinutritionnels.....	65
2.6.1.1. Les oligosaccharides	65
2.6.1.2. Les glucosides cyanogénétiques	66
2.6.2. Activité antimicrobienne.....	66
2.6.3. Production de composés aromatiques.....	67
2.6.4. Production de polysaccharides.....	68
2.7. Production et conservation	68
2.7.1. La fermentation.....	69
2.7.2. La concentration	69
2.7.3. La lyophilisation	69
2.8. Exemples d'utilisation.....	70
2.9. Conclusion.....	71
2.10. Références	71
OBJECTIFS DU TRAVAIL	79
EXPERIMENTATION ET PRESENTATION DES RESULTATS.....	83
Article 2 : Objectif	85
Production of freeze-dried lactic acid bacteria starter culture for cassava fermentation into gari.....	87
Abstract	88
3.1. Introduction	89
3.2. Materials and methods.....	90
3.2.1. Microorganisms and preparation of the seed bank	90
3.2.2. Assessment of ability to tolerate dehydration using the fluorescent technique	90
3.2.3. Production and freeze-drying.....	91

3.2.3.1. Development of inocula	91
3.2.3.2. Fermentation in a 20 L bioreactor	91
3.2.3.3. Concentration, treatment and freeze-drying	92
3.2.4. Analytical methods	92
3.2.4.1. Dry cell weight and water activity determinations	92
3.2.4.2. Survival	92
3.2.4.3. Acidification activity	93
3.2.5. Data analysis	93
3.3. Results and discussion	93
3.3.1. Assessment of desiccation tolerance of lactic acid bacteria	93
3.3.2. Survival of lactic acid bacteria after freeze-drying	97
3.3.3. Acidification activity	97
3.4. Conclusion	101
3.5. Acknowledgements	101
3.6. References	101
Article 3 : Objectif	107
<i>Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models</i>	<i>109</i>
Abstract	110
4.1. Introduction	111
4.2. Materials and methods	111
4.2.1. Micro-organisms and cultivation	111
4.2.2. Production and freeze-drying	112
4.2.3. Thermal treatment	112
4.2.4. Kinetics parameters	112
4.2.5. Statistical analysis	113
4.3. Results and discussion	113
4.4. Acknowledgements	117
4.5. References	117
Article 4 : Objectif	121
<i>Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried Weissella paramesenteroides LC11 during storage</i>	<i>123</i>
Abstract	124
5.1. Introduction	125
5.2. Materials and methods	126
5.2.1. Microorganism	126
5.2.2. Productions and storage	126
5.2.3. Water content and activity determinations	126

5.2.4. Survival and acidification activity	126
5.2.5. Analysis of cellular fatty acids.....	127
5.2.6. Analysis of oxylipins	127
5.2.7. Data analysis.....	128
5.3. Results	128
5.3.1. Change in survival and acidification activity due to storage	128
5.3.2. Change in polyunsaturated fatty acids due to storage.....	130
5.3.3. Oxylipins profiling during storage.....	133
5.4. Discussion	135
5.5. Acknowledgements	137
5.6. References	137
Article 5 : Objectif.....	143
<i>Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage and lipid degradation of freeze-dried Weissella paramesenteroides LC11 during storage.....</i>	145
Abstract	146
6.1. Introduction	147
6.2. Materials and methods.....	148
6.2.1. Microorganism.....	148
6.2.2. Productions, treatment and storage	148
6.2.3. Dry cell weight and water activity	148
6.2.4. Survival.....	149
6.2.5. Electrolyte leakage.....	149
6.2.6. Lipid oxidation.....	149
6.2.7. Total lipid extraction and fractionation.....	150
6.2.8. Analysis of fatty acids.....	150
6.2.9. Data analysis.....	150
6.3. Results	151
6.3.1. The effect of the protective compounds on survival	151
6.3.2. The effect of the protective compounds on electrolyte leakage.....	153
6.3.3. The effect of the protective compounds on lipid oxidation	154
6.3.4. The effect of the cryoprotectants+BHT mixture on fatty acids composition.....	156
6.4. Discussion	158
6.5. Acknowledgements	160
6.6. References	160
Article 6 : Objectif.....	165
<i>Changes in membrane permeability during rehydration of freeze-dried Weissella paramesenteroides LC11.....</i>	167
Abstract	168

7.1. Introduction	169
7.2. Materials and methods.....	169
7.2.1. Microorganism.....	169
7.2.2. Production and freeze-drying.....	170
7.2.3. Experimental procedure.....	170
7.2.4. Analysis	170
7.2.5. Data analysis.....	171
7.3. Results and discussion.....	171
7.4. References	176
CONCLUSIONS DES RESULTATS.....	179
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	185
LISTE DES PUBLICATIONS ET ACTIVITES SCIENTIFIQUES.....	205
ANNEXES	209

RESUME

Le ‘gari’, une semoule de manioc (*Manihot esculenta*, Crantz) fermentée, gélifiée et déshydratée, représente le produit alimentaire le plus populaire de l’Afrique de l’Ouest. Les bactéries lactiques constituent l’un des plus importants groupes de micro-organismes impliqués dans l’étape de la fermentation du manioc, principalement en raison de leurs rôles établis dans le développement de la saveur et la préservation des aliments obtenus. Dans le but de fournir au consommateur un produit sain, de qualité organoleptique constante et acceptable, des efforts d’amélioration et de contrôle de la fermentation du manioc ont été entrepris. Seize souches de bactéries lactiques ayant des caractéristiques technologiques appropriées, ont été précédemment isolées et sélectionnées au cours de la fermentation du manioc en vue de leur utilisation comme culture starter pour la production de ‘gari’. L’objectif de ce travail est de contribuer à un meilleur contrôle de la fermentation du manioc à travers la production d’un starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la production de ‘gari’.

A l’issue de la première partie du travail, les souches *Lactobacillus plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 et *Weissella paramesenteroides* LC11 ont été sélectionnées sur base de : (i) leur capacité à survivre après un test de déshydratation dans une solution de glycérol de concentration croissante suivi d’un marquage par des marqueurs fluorescents, (ii) leur taux de survie après la lyophilisation, (iii) leur capacité d’utilisation d’une source de carbone après la lyophilisation, (iv) leur stabilité au cours du stockage sous forme lyophilisée. Nous avons cependant noté que la plupart des souches lyophilisées perdaient plus de 50% de leur viabilité après 60 jours de stockage à basse température.

Dans la seconde partie du travail, nous avons essayé de comprendre l’un des mécanismes à l’origine de la perte de viabilité au cours du stockage des souches lyophilisées : l’oxydation des lipides membranaires. Pour ce faire, l’impact de la dégradation des acides gras polyinsaturés sur la survie cellulaire ou le pouvoir d’acidification de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11 a été évalué pendant 90 jours de stockage dans différentes conditions de stockage (différentes températures, présence ou absence d’air et d’humidité). Un dosage des produits primaires de dégradation des acides gras polyinsaturés a aussi été effectué pour les échantillons stockés dans des conditions d’aération. A l’issue de cette étude, une corrélation a été établie entre la perte de viabilité cellulaire et/ou du pouvoir d’acidification et la dégradation des acides gras polyinsaturés. Dans l’optique de confirmer ces résultats, l’effet de composés protecteurs tels que les cryoprotecteurs et/ou des antioxydants (acide ascorbique et/ou butyle hydroxytoluène) sur la viabilité cellulaire, l’intégrité membranaire et l’oxydation des lipides de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, ont été évalués pendant 90 jours de stockage dans des conditions d’aération et en présence d’humidité. Après le 90^{ème} jour de stockage, les acides gras membranaires totaux ainsi que ceux de la fraction polaire ont également été analysés. La présence des cryoprotecteurs et du butyle hydroxytoluène avait considérablement réduit la perte de viabilité et d’intégrité membranaire, ainsi que la dégradation des lipides de la fraction

polaire. Une possible relation entre l'oxydation des acides gras polyinsaturés, plus précisément ceux de la fraction polaire des lipides, et la perte de viabilité cellulaire au cours du stockage des souches lyophilisées, a été confirmée. Des corrélations entre l'oxydation des acides gras polyinsaturés de la fraction polaire des lipides et la perte d'intégrité cellulaire et, d'autre part, entre la perte d'intégrité cellulaire et la perte de viabilité cellulaire, ont été établies. Alors que les phénomènes d'oxydation des lipides se déroulaient au cours du temps, la perte de viabilité cellulaire survenait dès les premières heures du stockage. Les changements dans la perméabilité membranaire de la souche *W. paramesenteroides* LC11 ont ainsi été évalués 20h après la lyophilisation, à travers les déterminations du nombre de cellules viables et de la conductivité d'une solution de réhydratation dont nous avons fait varier la température, la concentration en sels (NaCl), protons et composés protecteurs (glycérol, saccharose, maltodextrine, glutamate monosodique). Une augmentation de la température et de la concentration en sels (NaCl) ou en glutamate monosodique, ainsi qu'une baisse de la concentration en protons entraînaient une augmentation de la concentration en substances ioniques dissoutes et une baisse du nombre de cellules viables. Cependant, une augmentation de la concentration en glycérol, sucrose ou maltodextrine entraînait une diminution de la concentration en substances ioniques dissoutes et un maintien de la viabilité cellulaire. Ces résultats nous suggèrent qu'il pourrait se produire une rupture cellulaire durant la déshydratation et que cette situation pourrait influencer la stabilité de la souche lyophilisée dès les premières heures du stockage.

SUMMARY

‘Gari’, a granular fermented, gelled and dehydrated cassava (*Manihot esculenta* Crantz) product, is the most popular food in West Africa. Lactic acid bacteria are one of the most important group of microorganisms involved in cassava fermentation, mainly because of their established functions in the development of flavor and food preservation. In order to provide the consumer with a healthy product of constant and acceptable organoleptic properties, efforts to improve and control the cassava fermentation were made. Sixteen strains of lactic acid bacteria with appropriate technological properties were previously isolated and selected during cassava fermentation, with a view to selecting appropriate starter cultures for ‘gari’ production. The scope of this work is to contribute to a better control of cassava fermentation through the production of a freeze-dried lactic acid bacteria starter culture for ‘gari’ production.

At the end of the first part of this work, the strains *Lactobacillus plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 and *Weissella paramesenteroides* LC11 were selected on the basis of: (i) their ability to survive after a dehydration test in a glycerol solution of increasing concentration followed by staining with fluorescent markers, (ii) their survival rate after the freeze-drying process, (iii) their ability to use a carbon source after freeze-drying, (iv) their stability during storage in the dried state. However, we noticed that most of the freeze-dried strains lost more than 50% of their viability after a 60-day storage period at low temperature.

In the second part of the work, we tried to understand one of the mechanisms that could explain the loss of viability during storage of freeze-dried strains: membrane lipid oxidation. Thus, the impact of polyunsaturated fatty acids degradation on the survival or acidification activity of the freeze-dried strain *W. paramesenteroides* was evaluated over 90 days storage under different storage conditions (different temperatures, in presence or absence of air and moisture). The polyunsaturated fatty acids primary degradation products were determinate for samples stored in aeration conditions. At the end of this work, a correlation between the loss of viability and/or acidification activity and polyunsaturated fatty acids degradation, was established. In order to confirm these results, the effect of protective compounds such as cryoprotectants and/or antioxidants [ascorbic acid and/or Butylated hydroxytoluene (BHT)] on the survival, membrane integrity and lipid oxidation of the freeze-dried strain *W. paramesenteroides* LC11 were investigated over 90-days of storage under aeration and moisture conditions. After the 90-day storage period, the fatty acid composition of the total lipid extract and the polar lipid fraction, were analysed. The presence of cryoprotectants and BHT slowed down the loss of viability and membrane integrity, as well as polar lipid degradation. A possible relation between polyunsaturated fatty acids oxidation, especially those of the polar lipid fraction and the loss of viability during storage of freeze-dried strain was confirmed. Correlations were established, between the oxidation of polyunsaturated fatty acids of polar lipid fraction and the loss of membrane integrity on one hand, and on the over hand, between the loss of membrane integrity and the loss of

viability. While lipid oxidation phenomena were found to increase with time, the loss of viability tended to occur during the early storage period. Changes in membrane permeability of the strain *W. paramesenteroides* LC11 were evaluated 20h after freeze-drying, through the determinations of the viable cells and conductivity of a rehydration solution, of which we varied the temperature, salts (NaCl), protons and protective compounds (glycerol, sucrose, maltodextrin, monosodium glutamate) concentration. An increase in the temperature and NaCl or monosodium glutamate concentration, as well as a decrease in protons concentration, resulted in an increase in the electrolyte leakage and a decrease in viable cells. However, an increase in glycerol, sucrose or maltodextrin resulted in a decrease in the electrolyte leakage and the maintenance of viable cells. These results suggest that cell rupture might occur during dehydration and that this situation could affect the stability of the freeze-dried strain in the early hours of storage.

AVANT-PROPOS

Le présent travail est subdivisé en trois parties : l'introduction, la présentation des études réalisées et une discussion générale.

Au sein de l'introduction nous aborderons le contexte, général et spécifique, dans lequel s'inscrit notre travail. Pour ce faire, un **article de synthèse (synthèse 1, article 1)** accepté dans les Annales de Médecine Vétérinaire, intitulé « **Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle** », décrira tout d'abord le rôle et l'utilisation actuelle des bactéries lactiques dans le processus de fabrication des produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest. Des solutions en vue de l'amélioration de la formulation et de la conservation des cultures bactériennes seront proposées. Cette introduction se poursuivra avec une mini-revue (**synthèse 2**) sur les bactéries lactiques du genre *Weissella* qui ont été identifiées au cours de la fermentation du manioc. Celle-ci consistera essentiellement en une mise à jour des données disponibles sur leur taxonomie, leur habitat, leurs caractéristiques générales, caractères structuraux et propriétés fonctionnelles, ainsi que leur production et conservation. Des exemples de leurs utilisations comme cultures starters seront fournis.

Les **études réalisées** seront présentées sous la forme d'articles scientifiques :

Etude première (article 2). « Production d'une culture starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la fermentation du manioc en gari » : évalue la capacité de 16 souches de bactéries lactiques à résister à la lyophilisation à travers l'étude de : (i) leur viabilité après une étape de déshydratation dans une solution de glycérol de concentration croissante suivi de leur marquage par des marqueurs fluorescents, (ii) leur viabilité après l'étape de la lyophilisation, (iii) leur capacité à utiliser une source de carbone (pouvoir d'acidification) après la lyophilisation.

Etude deuxième (article 3). « Analyse de la survie de bactéries lactiques lyophilisées à l'aide des modèles d'Arrhenius et de la valeur-z » : évalue la stabilité au cours du stockage de 12 souches de bactéries lactiques lyophilisées à des températures élevées (37°C et 55°C). Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus après 60 jours de stockage à basse température (4°C).

Etude troisième (article 4). « Incidence de la dégradation des acides gras polyinsaturés sur la survie et le pouvoir d'acidification au cours du stockage de la souche lyophilisée *Weissella paramesenteroides* LC11 » : étudie l'influence des conditions de stockage telles que la température (4°C ou 20°C), l'humidité et l'aération, pendant 90 jours, sur la viabilité, le pouvoir d'acidification et la composition en acides gras cellulaires d'une bactérie lactique lyophilisée. Un dosage des produits primaires de dégradation des acides gras polyinsaturés (hydroperoxydes des acides linoléique et linolénique), pour les échantillons stockés dans les conditions d'aération, a été aussi réalisé.

Etude quatrième (article 5). « Effet de composés protecteurs sur la survie, l'intégrité membranaire et la dégradation des lipides au cours du stockage de la souche lyophilisée *Weissella paramesenteroides* LC11 » : étudie l'influence de cryoprotecteurs et/ou antioxydants pendant 90 jours de stockage à deux températures (4°C ou 20°C) et une activité d'eau (0.23), sur la viabilité cellulaire, l'intégrité de la membrane cellulaire et la dégradation des lipides d'une souche lyophilisée. Après le 90^{ième} jour de stockage, les acides gras membranaires totaux ainsi que ceux de la fraction polaire des lipides ont également été étudiés.

Etude cinquième (article 6). « Les changements dans la perméabilité membranaire au cours de la réhydratation de la souche lyophilisée *Weissella paramesenteroides* LC11 » : étudie les changements dans la perméabilité cellulaire au cours de la réhydratation d'une souche lyophilisée. Ces changements ont été évalués à l'aide d'un dénombrement cellulaire et d'une détermination de la conductivité de la solution de réhydratation dont on fait varier la température, la concentration en sels, protons et composés protecteurs (glycérol, saccharose, maltodextrine, glutamate monosodique), ont été effectués.

En guise de clôture, une **discussion générale** rappellera et discutera les principaux résultats obtenus, montrera les principaux avancements des connaissances apportés et donnera des perspectives de recherche.

INTRODUCTION

Synthèse 1 (Article 1)

OBJECTIF

En Afrique de l'Ouest les matières premières amylacées telles que les tubercules et les céréales subissent une fermentation lactique avant leur consommation. Cette fermentation lactique assure au produit final des caractéristiques bien particulières d'arôme et de texture, ainsi qu'une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits. Une large gamme de produits alcoolisés et non-alcoolisés est obtenue et constitue la base de l'alimentation des populations. Depuis plusieurs années des efforts d'amélioration, de modernisation et de contrôle de la production de ces produits ont été entrepris. L'utilisation de cultures starters de bactéries lactiques au cours de la fermentation est de plus en plus courante. Un produit sain, de qualité constante et acceptable peut être ainsi obtenu. Ce document présente le bilan actuel de la contribution des bactéries lactiques dans le processus de production des produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest. Des perspectives d'utilisation des cultures starters de bactéries lactiques lyophilisées seront proposées.

Synthèse 1 (Article 1)

Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle

YAO A. A.^a, EGOUNLETY M.^b, KOUAME L. P.^c, THONART P.^a

^a Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité de Technologie Microbienne, Université de Liège, Sart-Tilman B40, B-4000 Liège, Belgique

^b Département de Nutrition & Sciences Alimentaires, Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin

^c Unité de Formation et de Recherches des Sciences et Technologie des Aliments, Université d'Abobo-Adjamé 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

Ann. Méd. Vét. Accepté

Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle

RESUME

Les aliments et boissons amylacés fermentés jouent un rôle majeur dans l'alimentation des populations de l'Afrique de l'Ouest. Les bactéries lactiques sont les micro-organismes dominants, essentiellement dans deux groupes de produits amylacés fermentés : les produits amylacés non-alcoolisés et les boissons alcoolisées. Ces produits sont en grande partie produits après une fermentation spontanée de céréales (mil, sorgho, maïs) ainsi que de tubercules (manioc) et leur qualité est très variable. Les principales fonctions des bactéries lactiques comprennent la production d'acides organiques et de composés aromatiques. La stimulation des levures, l'inhibition des micro-organismes pathogènes, l'amélioration de la qualité nutritionnelle, l'activité probiotique, l'élaboration de la texture de l'aliment et la dégradation des composés toxiques peuvent aussi être observés. Afin d'améliorer et de contrôler la production des produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest, et plus spécialement l'étape de la fermentation, l'utilisation de cultures starters purifiées de bactéries lactiques est de plus en plus courante.

Mots clés : bactéries lactiques, boissons et aliments amylacés, Afrique de l'Ouest, culture starter, fermentation

Lactic acid bacteria in West African starchy fermented foods or beverages : their current use

SUMMARY

Indigenous fermented starchy foods and beverages play a major role in the diet of African people. The predominant microorganisms are lactic acid bacteria, involved in basically two groups of starchy fermented products: non-alcoholic starchy products (foods and beverages) and alcoholic beverages. These products are to a great extent made by spontaneous fermentation of cereals (millet, sorghum, maize) as well as roots (cassava) and their quality is highly variable. The functions of lactic acid bacteria are mainly related to formation of aroma compounds. the stimulation of yeasts, improvement of nutritional value, probiotic effects, inhibition of undesired microorganisms, the development of the texture and the removal of toxic factors, may also be observed. In order to improve and control the production, especially the fermentation stage, of starchy fermented foods in West Africa, the introduction of purified lactic acid bacteria starter cultures is currently performed.

Keywords: Lactic acid bacteria, starchy foods and beverages, West Africa, starter culture, fermentation

1. Introduction

La fermentation lactique peut être définie comme un procédé de fermentation dans lequel interviennent un groupe de bactéries gram positive, non-sporulantes, immobiles, catalase-négatives, qui croissent sous des conditions anaérobies et utilisent les sources de carbones pour produire de l'acide lactique comme seul ou majeur acide organique. En Afrique de l'Ouest, la fermentation lactique a été traditionnellement développée pour une large gamme de matières premières essentiellement constituées d'amidon (plus de 80% de matière sèches) (Ketiku et Oyenuga, 1970). Ainsi, le manioc et les céréales telles que le maïs, le sorgho et le mil sont broyés et fermentés pour obtenir des produits non-alcoolisés (pâtes et bouillies) et des boissons alcoolisées qui sont connus sous différents noms dans les différents pays de l'Afrique de l'Ouest (Odunfa, 1985). Ces aliments et boissons fermentés, très populaires, contribuent à l'alimentation des populations et sont produits à l'échelle locale dans les foyers, les villages et par de petites unités de production (coopératives de femmes).

Des bactéries lactiques, des levures et moisissures ont été identifiées comme les principaux micro-organismes se développant au cours de la fermentation. Dans nombre de cas, au départ, après lavage de la matière première les bactéries lactiques sont peu nombreuses. Elles appartiennent essentiellement aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Beuchat, 1995). L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a été associée tout d'abord à l'élaboration de l'arôme et de la texture du produit final, mais également à l'obtention d'un produit sain grâce aux acides organiques produits. D'autres actions, et non des moindres, sont souvent rapportées. Par exemple, les propriétés probiotiques des bactéries lactiques et l'inhibition des bactéries pathogènes sont particulièrement importants, dès lors qu'il a été signalé que les aliments fermentés contribuaient à réduire la durée et la sévérité des diarrhées infantiles (Mensah *et al.*, 1990; Kimmons *et al.*, 1999).

Le problème majeur de l'ensemble de ces procédés traditionnels se situe au niveau de la qualité des différents aliments obtenus qui est très fluctuante. En effet, le processus fermentaire qui s'effectue spontanément grâce au développement de la microflore épiphyte, peut conduire à des produits d'une qualité organoleptique, microbiologique ou toxicologique indésirable. Pour pallier à ce problème, des études sont de plus en plus consacrées à l'isolement et à l'identification, au cours de la fermentation, de bactéries lactiques se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières en vue de leur utilisation comme des cultures starters (Olasupo *et al.*, 1996 ; Agati *et al.*, 1998 ;

Hounhouigan *et al.*, 1999 ; Sanni *et al.*, 2002 ; Kostinek *et al.*, 2005 ; Oguntoyinbo, 2007). Ces dernières se définissent comme des préparations microbiennes concentrées, d'au moins un micro-organisme, qui permettent de réaliser un meilleur contrôle de la fermentation ainsi qu'une standardisation du procédé de fabrication (Holzapfel, 2002). Le but visé à terme est de fournir au consommateur un produit sain, de qualité organoleptique constante et acceptable. Ce document présente une revue de l'utilisation actuelle des bactéries lactiques au cours de la production des produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest.

2. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été isolées des divers types de produits alimentaires (aliments, boissons) amylacés fermentés de l'Afrique de l'Ouest. La majeure partie de ces produits est obtenue après fermentation de céréales ou de racines alimentaires, principalement le manioc. Les produits amylacés Ouest-Africains obtenus après fermentation de la matière première, laquelle est généralement réalisée par des bactéries lactiques, peuvent en principe être divisés en deux groupes : les produits non-alcoolisés et les boissons alcoolisées. Le Tableau 1 indique le type de produit amylacé fermenté, la matière première, le nom de produit et le pays de consommation. La plupart de ces produits sont obtenus après une fermentation spontanée ou inoculation de la matière première avec une partie d'une précédente fermentation, comme c'est le cas dans la fermentation du manioc pour la production de l'agbelima, l'attiéké ou du placali et de la fermentation du sorgho pour la production du pito (Ekundayo, 1969 ; Amoa-Awua *et al.*, 1996 ; Toka *et al.*, 2008). Il a été largement démontré que les bactéries lactiques provenaient de la matière première ou de l'environnement (Steinkraus, 1983, 1997 ; Caplice et Fitzgerald, 1999). Les conditions environnementales, l'adaptation au substrat et l'utilisation répétée des mêmes ustensiles contribueraient à leur sélection.

2.1. Produits non-alcoolisés

2.1.1. Aliments à base de céréales

Les principales céréales utilisées comme matière première au cours des fermentations lactiques en Afrique de l'Ouest sont : le maïs, le sorgho et le mil (Tableau 1). Ces produits consistent essentiellement en des pâtes ou purées et des bouillies non-alcoolisées.

La pâte de maïs (*Zea mays*) fermentée, l'un des plus populaires aliments amylacés et fermentés, est utilisée au cours de la préparation d'une grande variété de plats comme aliment de base au Ghana, au Nigéria, au Togo et au Bénin, où ils constituent une proportion

importante de la ration alimentaire quotidienne (Owusu-Ansah *et al.*, 1980 ; Plahar et Leung, 1982 ; Chavan et Kadam, 1989 ; Olasupo *et al.*, 1996). La pâte de maïs fermentée obtenue après une fermentation spontanée se caractérise par une teneur en humidité de 50% et un pH final de 3,7. Le procédé traditionnel de production comprend : le lavage et le trempage des grains de maïs (24 h), la mouture, l'humidification de la pâte et la fermentation de la pâte (48-72 h). Le 'Ogi' et le 'mawè' sont deux produits traditionnels obtenus après fermentation des grains de maïs au Bénin, Ghana et au Nigéria ; ils sont principalement utilisés dans la préparation de nombreux plats et aliments de complément au lait maternel pour les bébés (Plahar et Leung, 1983 ; Hounhouigan *et al.*, 1993a; Iwuoha et Eke, 1996 ; Agati *et al.*, 1998). Le 'ogi' est une bouillie préparée par dilution de la pâte humide de maïs obtenue après trempage et mouture des grains, tandis que le 'Mawè' se présente sous la forme d'une pâte acide issue de la transformation des grains de maïs sec concassés. La microflore de la pâte fermentée de maïs pour la production de 'kenkey', 'banku', 'ogi' ou 'mawé' a été largement étudiée (Tableau 2). Il a été démontré que les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* constituaient la majorité de la microflore lactique (Steinkraus, 1983 ; Hounhouigan *et al.*, 1993b ; Johansson *et al.*, 1995). Les micro-organismes responsables de la fermentation spontanée du 'ogi-baba', une variante du 'ogi' obtenue après fermentation du sorgho au Nigéria, ont été isolés et identifiés. Les résultats ont montré que les bactéries lactiques présentes dans les grains non fermentés lors de l'étape initiale du trempage, appartenaient aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Odunfa et Adeyele, 1985). Dans des stades plus avancés du trempage, cette flore microbienne était constituée essentiellement par les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc*. Le 'banku', exclusivement obtenu à partir d'un mélange de maïs ou/et de manioc, est un autre produit fermenté largement consommé au Ghana dont la fermentation implique principalement des bactéries lactiques et des moisissures (Owusu-Ansah *et al.*, 1980 ; Beuchat, 1995).

En Afrique de l'Ouest, la majeure partie des bouillies fermentées non-alcoolisées sont produites à partir du mil (*Pennisetum glaucum*) (Tableau 1). Ces bouillies sont appelées 'bensaalga' au Burkina Faso, 'kunun-zaki' au Nigéria, 'koko' ou 'koko sour water' au Ghana et 'Gowé' au Bénin (Efiuvwevwere et Okano, 1995 ; Lei et Jakobsen, 2004 ; Tou *et al.*, 2006 ; Viera-Dalodé *et al.*, 2007). Elles sont souvent vendues très tôt le matin devant les maisons ou dans la rue et consommées par la population comme petit déjeuner.

Tableau 1 : Les principaux aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest

Type de produit	Matière première	Nom du produit	Pays de consommation	Références
Produits non-alcoolisés				
<i>Aliments à base de céréales</i>				
	Maïs	'kenkey'	Ghana, Nigéria	Chavan et Kadam , 1989; Olasupo <i>et al.</i> , 1996.
	Maïs et/ou manioc	'banku'	Ghana	Owusu-Ansah <i>et al.</i> , 1980.
	Maïs ou sorgho ou mil	'ogi-baba'	Nigéria	Odunfa et Adeyele, 1985; Chavan et Kadam, 1989 ; Iwuoha et Eke, 1996.
	Maïs	'ogi'	Bénin, Ghana	Plahar et Leung, 1983 ; Agati <i>et al.</i> , 1998.
	Maïs	'mawè'	Bénin, Togo	Hounhouigan <i>et al.</i> , 1993a, b.
	Mil	'ben-saalga'	Burkina-Faso	Tou <i>et al.</i> , 2006.
	Mil	'kunun-zaki'	Nigéria	Efiuvwevwere et Okano, 1995.
	Mil	'koko'	Ghana	Lei et Jakobsen, 2004.
	Sorgho	'gowé'	Bénin	Viéra-Dalodé <i>et al.</i> , 2007.
	Sorgho et /ou mil ou maïs	'obiolor'	Nigéria	Achi , 1990.
<i>Aliments à base de manioc</i>				
	Manioc	'agbelima'	Ghana, Togo, Bénin	Amoa-awua et Jakobsen, 1995 ; Amoa-Awa <i>et al.</i> , 1996 ; Lei <i>et al.</i> , 1999.
	Manioc	'attiéké'	Côte d'Ivoire	Assanvo <i>et al.</i> , 2006 ; Coulin <i>et al.</i> , 2006 ; Toka <i>et al.</i> , 2008.
	Manioc	'fufu'	Nigéria	Oyewole et odunfa 1990 ; Olasupo <i>et al.</i> , 1996; Sanni <i>et al.</i> , 2002.
	Manioc	'gari'	Ghana, Bénin, Togo, Nigéria, Côte d'Ivoire, Sierra Leone	Collard et Levi, 1959; Collard, 1963 ; Okafor, 1977 ; Kostinek <i>et al.</i> , 2005; Oguntinyinbo, 2007.
Boissons alcoolisées				
	Maïs et/ou sorgho	'pito'	Nigéria, Ghana	Ekundayo, 1969 ; Chavan et Kadam, 1989 ; Demuyakor et Ohta, 1991; Iwuoha et Eke, 1996.
	Sorgho et/ou manioc	'burukutu'	Nigéria	Chavan et Kadam, 1989.
	Sorgho ou mil	'dolo'	Burkina-Faso	Sawadogo-Lingani <i>et al.</i> , 2007.
	Sorgho	'tchoukoutou'	Bénin	Koyodé <i>et al.</i> , 2007.
	Sorgho et/ou maïs et/ou mil	'tchapalo'	Côte d'Ivoire	Amané <i>et al.</i> , 2005 ; Djè <i>et al.</i> , 2008.
	Sorgho	'otika'	Nigéria	Iwuoha et Eke, 1996.

Les principales étapes de la fabrication sont les suivantes : le lavage, le trempage des grains (première étape de la fermentation), le broyage suivi du tamisage de la farine humide, la décantation (seconde étape de la fermentation) et la cuisson.

Tou et collaborateurs (2006) ont indiqué qu'au cours de la production de 'ben-saalga', l'étape du trempage était principalement dominée par une fermentation alcoolique, tandis qu'une fermentation lactique s'opérait lors de l'étape de décantation. Ces auteurs ont par ailleurs indiqué que la pâte finalement produite avait un pH faible ($4,0 \pm 0,4$) et que sa microflore était dominée par des bactéries lactiques, avec un rapport bactérie amylolytique/bactérie de 12%.

Au Nigéria, des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* ont été identifiées comme micro-organismes dominants dans la production du 'kunun-zaki', une boisson non-alcoolisée produite à partir du mil et consommée dans un état actif de fermentation aussi bien par les adultes que les enfants (Efiuvwevwere et Okano, 1995). Récemment, les principales souches de bactéries lactiques responsables de la fermentation du koko, du kunun-zaki et du gowè ont été identifiées (Tableau 2).

Tableau 2 Les bactéries lactiques isolées au cours de la production d'aliments fermentés à base de céréales

Nom du produit	bactéries lactiques	Références
'kenkey'	<i>Lactobacillus brevis</i> K19, <i>Lactobacillus plantarum</i> K22, <i>Lactobacillus acidophilus</i> (K25 et K27), <i>Lactobacillus fermentum</i> K35	Olasupo <i>et al.</i> , 1996.
'ogi-baba'	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus lactis</i>	Odunfa et Adeyele, 1985.
'ogi'	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> O1, <i>Lactobacillus casei</i> O3, <i>Lactobacillus pentosus</i> O4, <i>Lactobacillus fermentum</i> O5, <i>Lactobacillus</i> sp. O6 <i>Lactobacillus fermentum</i> Ogi E1	Streinskraus, 1993 ; Johanson <i>et al.</i> , 1995. Olasupo <i>et al.</i> , 1996.
	<i>Lactobacillus raffinolactis</i> , <i>Pediococcus</i> sp., <i>Pediococcus pentasaceus</i> , <i>Lactobacillus planrarum</i> , <i>Lactobacillus suebicus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>	Agati <i>et al.</i> , 1998. Teniola <i>et al.</i> , 2005.
'mawè'	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> Mw2	Hounhouigan <i>et al.</i> , 1993b. Agati <i>et al.</i> , 1998.
'kunun-zaki'	<i>Lactobacillus plantarum</i> K1, K2 et K3, <i>Lactobacillus fermentum</i> K9	Sanni <i>et al.</i> , 2002.
'koko'	<i>Weissella confusa</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Lei et Jakobsen, 2004.
'gowé'	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Lactobacillus mucosae</i>	Viéra-Dalodé <i>et al.</i> , 2007.

2.1.2. Produits à base de manioc

Le Manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une culture importante pour laquelle le rôle potentiel des bactéries lactiques a largement été démontré. Depuis des siècles, les populations de l'Afrique de l'Ouest font subir aux tubercules de manioc une fermentation lactique avant leur consommation, dans le but d'éliminer une grande partie des glucosides cyanogénétiques potentiellement toxiques qu'ils contiennent. Les principales étapes du processus de transformation sont : l'épluchage, le lavage, le râpage et la fermentation (2-3 jours). La pâte obtenue peut être essentiellement utilisée telle quelle pour la cuisson d'aliment appelé 'agbelima' ou 'fufu', déshydratée, séchée, granulée, tamisée et cuite à la vapeur pour obtenir une semoule de manioc appelée 'gari' ou 'attiéké' (Tableau 1) (Amoa-Awua et Jakobsen, 1995 ; Amoa-Awa *et al.*, 1996 ; Olasupo *et al.*, 1996 ; Lei *et al.*, 1999 ; Sanni *et al.*, 2002 ; Toka *et al.*, 2008). Tous ces aliments se consomment avec diverses sauces ou du poisson frit au petit-déjeuner ou au déjeuner accompagné ou non d'autres plats. Parmi tous, le 'gari' est l'aliment le plus populaire et le plus consommé en Afrique de l'Ouest (Oduro *et al.*, 2000). Il représente essentiellement un aliment énergétique (334 cal/100 g de gari) avec une forte teneur en amidon et une faible teneur en lipides, protéines, vitamines et sels minéraux (Spickett *et al.*, 1982). La popularité du 'gari' dans les villes urbaines Ouest-Africaines, ces dernières années, a été associée à son faible prix, sa bonne stabilité sur de longues périodes de stockage, son faible volume (par rapport aux autres produits à base de manioc fermenté) et sa facilité de préparation pour la consommation. Sa popularité est aussi à l'origine de nombreuses tentatives de fabrications industrielles et fortification pour en améliorer la qualité nutritionnelle à travers l'ajout de soja, d'huile de palme et de lait de coco (Treillon, 1992).

Le procédé de fermentation diffère considérablement d'un aliment à l'autre. La fermentation réalisée dans le cas de l'attiéké, du gari ou de l'agbelima s'opère de façon naturelle dans la pulpe de manioc, tandis que celle du fufu se réalise lors de l'immersion des tubercules épluchés et coupés dans des pots contenant de l'eau ou un cours d'eau. La production d'attiéké ou d'agbelima implique l'utilisation d'un inoculum provenant d'une précédente fermentation. Au Ghana cet inoculum est appelé localement 'kudeme'. Il a été démontré que la microflore du 'kudeme' était constituée majoritairement d'espèces de bactéries lactiques (Amoa-Awua et Jakobsen, 1995).

L. plantarum (51%), *L. brevis* (16%), *Leuc. mesenteroides* (1%) ont été identifiées comme les principales bactéries lactiques associées à la fermentation de l'agbelima (Amoa-Awua *et al.*, 1996). Récemment, la microflore impliquée dans la fermentation du manioc pour la production d'attiéké a été étudiée (Coulin *et al.*, 2006). *Leuc. mesenteroides* subsp.

mesenteroides (20% de l'ensemble des bactéries lactiques) a été identifiée au début de la fermentation. Dans des stades plus avancés de la fermentation, cette espèce a été remplacée par les espèces, *L. salivarius* et *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (présentes à 20% et 16%, respectivement), ainsi que *L. fermentum* et *L. confusus* (présentes à 12% et 10%, respectivement). *L. plantarum* (81%), *Leuc. mesenteroides* (16%), *L. fermentum* (15%), *L. brevis* (9%), *L. caprophilus* (5%), *L. lactis* (4%), *Leuc. lactis* (3%) et *L. bulgaricus* (1%) ont été identifiées comme les espèces de bactéries lactiques impliquées dans la fermentation du manioc pour la production de 'fufu' au Nigéria (Oyewole & Odunfa, 1990). Un peu plus tard, les travaux de Olasupo et collaborateurs (1996) ont permis d'identifier *Lactobacillus*, *L. plantarum* F1, F2, *L. casei* L3 et *L. brevis* F4 comme les espèces dominantes au cours de la production de 'fufu'.

Alors qu'Okafor (1977) indiquait que le genre *Leuconostoc* était le genre de bactérie lactique le plus fréquemment rencontré au cours de la fermentation du manioc pour la production de 'gari', Kostinek et collaborateurs (2005, 2007) ainsi qu'Oguntoyinbo (2007) identifiaient, respectivement, *L. plantarum*, *Leuc. fallax* et *L. fermentum* ainsi que *L. plantarum*, *L. fermentum* et *Leuc. mesenteroides* comme les espèces dominantes.

2.2. Boissons alcoolisées

Les plus étudiées des boissons alcoolisées d'Afrique de l'Ouest sont les bières produites à partir du sorgho (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Sorghum guineense*) (Steinkraus, 1983 ; Iwuoha et Eke, 1996). La bière de sorgho est connue sous divers noms tels que 'pito' ou 'burukutu' au Ghana et au Nigéria, 'otika' au Nigéria, 'dolo' au Burkina-Faso, 'tchapalo' en Côte d'Ivoire et 'tchoukoutou' au Bénin (Ekundayo, 1969 ; Chavan et Kadam, 1989 ; Demuyakor et Ohta, 1991 ; Iwuoha et Eke, 1996 ; Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007 ; Amané *et al.*, 2005 ; Kayodé *et al.*, 2007 ; Djè *et al.*, 2008). La production de la bière de sorgho en Afrique de l'Ouest comprend : le maltage du sorgho, le séchage, le broyage, la fermentation lactique, la cuisson, le brassage et la fermentation alcoolique. La bière de sorgho produite en Afrique de l'Ouest diffère de la bière traditionnelle d'orge en plusieurs points : (i) avant la cuisson, le moût est spontanément fermenté par les bactéries lactiques qui donnent un goût tout à fait acide à la bière finale, (ii) cette bière a une consistance assez épaisse en raison d'une grande quantité d'éléments solides (5-7 %) et une teneur en alcool plutôt basse (2-3 % v/v), (iii) elle est consommée dans un état actif de fermentation et a donc une durée de vie limitée

(Amané *et al.*, 2005). *Lactobacillus sp.* et *Leuc. mesenteroides* et *Lactococcus spp.* ont été les principaux micro-organismes identifiés, respectivement lors de la fermentation du sorgho pour la production de ‘pito’ et ‘burukutu’ au Nigéria (Ekundayo, 1969 ; Faparusi *et al.*, 1973). Des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont également été identifiées au cours de la fermentation du ‘pito’ au Ghana (van der Aa Kühle *et al.*, 2001). Récemment, la flore microbienne dominante au cours de la transformation du ‘dolo’ et du ‘pito’ sur quatre sites de productions, au Burkina-Faso et au Ghana a été étudiée (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007). Les résultats ont montré que *L. fermentum* était l’espèce dominante tout le long du procédé, y compris au cours de l’acidification. *L. delbrueckii ssp. delbrueckii*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Ped. acidilactici* ont été aussi détectés mais dans une moindre mesure. Les principaux micro-organismes impliqués dans la fermentation du ‘tchoukoutou’ au Bénin ont été identifiés comme des bactéries lactiques qui appartiennent exclusivement au genre *Lactobacillus* (Kayodé *et al.*, 2007).

3. Rôle des bactéries lactiques

3.1. Formation de l’arôme et de la saveur

L’analyse bibliographique montre que très peu de travaux ont été consacrés à l’étude des composés aromatiques volatiles des aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest. L’acétoïne et ses dérivés ainsi que certains composés aromatiques (1-propanol, acétate d’isoamyle, acétate d’éthyle, 3-méthyl-1-butanol, acétoïne) les principaux composés volatils identifiés, respectivement, dans la pâte de maïs fermentée et ‘l’agbelima’, proviendraient de l’action des bactéries lactiques et donneraient au produit ses caractéristiques organoleptiques (Halm *et al.*, 1993 ; Amoa-Awua *et al.*, 1996).

La conversion des sources de carbone en des acides organiques, alcools et autres composés d’arôme tels que des esters et des composés carbonylés a été étudiée au cours de la fermentation lactique pour la production d’aliments et de boissons fermentés. Les principaux composés caractéristiques de la saveur de la pâte fermentée de maïs ont été identifiés comme étant les acides lactique, acétique, propionique et butyrique (Plahar et Leung, 1982 ; Halm *et al.*, 1993). Ces auteurs ont aussi montré que leur concentration était importante dans l’élaboration du goût acide et piquant ainsi que l’acceptabilité de l’aliment. Ekundayo (1969) faisait observer que le goût piquant des bières ‘pito’ et ‘burukutu’ pourrait être dû à l’acide lactique produit par les bactéries lactiques présentes dans le moût de fermentation. Hounhouigan et collaborateurs (1993a, b) ont indiqué que l’étape de la fermentation pourrait

donner au ‘mawè’ son goût caractéristique. Les propriétés organoleptiques dominantes du ‘tchapalo’ produit en Côte d’Ivoire ont été récemment étudiées (Djè *et al.*, 2008). Les acides oxalique, citrique, malique, lactique, fumarique et propionique ont été détectés durant la phase de fermentation alcoolique et leur présence pourrait être due à l’action des bactéries lactiques.

3.2. Préservation et innocuité de l’aliment

La fermentation est une méthode de conservation des aliments. Les bactéries lactiques produisent plusieurs composés antimicrobiens naturels, à savoir : des acides organiques (lactique, acétique, formique, phényl-lactique, caproïque), le dioxyde de carbone, le peroxyde d’hydrogène, le diacétyle, l’éthanol et des bactériocines (Messens et De Vuyst, 2002). La production d’acides organiques au cours de la fermentation entraîne une réduction importante du pH, qui associée à la formation de composés antimicrobiens détermine la stabilité microbienne des produits ainsi que la motilité des bactéries pathogènes et d’autres micro-organismes. Les travaux de Mensah et collaborateurs (1991) et ceux d’Annan-Prah et Agyeman (1997) ont suggéré que la pâte de maïs fermentée pour la production de ‘kenkey’ au Ghana pourrait constituer une importante barrière contre le développement de bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. Plusieurs travaux ont montré que les acides organiques produits durant la fermentation du ‘pito’ au Ghana, du ‘tchapalo’ en Côte d’Ivoire et du ‘ben-saalga’ au Burkina-Faso, conféraient au produit d’avoir une bonne stabilité microbienne (Tou *et al.*, 2006 ; Djè *et al.*, 2008). L’action des bactéries lactiques au cours de la fermentation contribue également à l’élimination de composés toxiques comme les glucosides cyanogénétiques du manioc (Holzapfel, 2002). Amoa-Awua et collaborateurs (1996) ont également rapporté qu’il se produisait une détoxification significative du manioc au cours de la production d’‘agbélima’ au Ghana.

3.3. Interaction avec d’autres micro-organismes

Dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest, les bactéries lactiques coexistent souvent avec d’autres micro-organismes. Des exemples de produits amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest, où la coexistence des bactéries lactiques avec d’autres micro-organismes a été rapportée, sont indiqués dans le Tableau 3. Les bactéries lactiques et les levures sont les micro-organismes dominants généralement rencontrés dans la plupart des produits fermentés à base de céréales et de manioc en Afrique de l’Ouest

(Ekundayo 1969 ; Hounhouigan *et al.*, 1993a ; Lei *et al.*, 1999 ; Oyewole, 2001 ; Kayodé *et al.*, 2007). Le développement des bactéries lactiques pourrait être stimulé par la présence de composés azotés solubles et de facteurs (vitamines B, CO₂, pyruvate, propionate, succinate, acétate) produits par les levures (Nout 1991 ; Leroi et Pidoux, 1993). De plus, l'environnement acide créé par les bactéries lactiques favoriserait la croissance des levures. Ainsi l'alcool produit par la levure, les acides produits par les bactéries et l'anaérobiose induite par la fermentation, permettraient de supprimer les champignons filamenteux et les bactéries associées à la détérioration des aliments (Mensah *et al.*, 1991). Une production de 3,0% d'alcool et d'acides organiques (lactique, acétique, formique) après inoculation de cultures pures de *Candida* sp., *Geotrichum candidum* et *Lactobacillus* sp. au cours de la production de 'pito' au Nigéria a été démontrée (Ekundayo, 1969). L'action des levures et des bactéries au cours de la fermentation du sorgho a permis d'obtenir un 'tchoukoutou' avec un pH et un goût caractéristique (Kayodé *et al.*, 2007). Oyewole (2001) avait signalé que la croissance de la souche *L. plantarum* avait été considérablement améliorée par la présence de *C. krusei* au cours de la fermentation du manioc pour la production de 'fufu'. Au cours de la fermentation du manioc pour la production d'agbelima, une co-culture de *L. plantarum* et *C. tropicalis* permettait une dégradation plus rapide de la linamarine contrairement à une monoculture constituée de chacune des souches (Lei *et al.*, 1999).

3.4. Influence sur la valeur nutritionnelle

L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a aussi un impact sur la valeur nutritionnelle des produits fermentés de l'Afrique de l'Ouest, à travers la réduction de facteurs antinutritionnels qui affectent la biodisponibilité des minéraux. Récemment, les travaux de Kayodé et collaborateurs (2007) ont montré que l'étape de fermentation contribuait à une réduction significative de la teneur en phytates au cours de la production de 'tchoukoutou'. La réduction de la teneur en phytates (approximativement 95%) observée, serait due à l'action des bactéries lactiques et de *Saccharomyces cerevisiae* (ajouté comme ferment au cours de la fermentation). Parallèlement à ces modifications, une meilleure solubilité du fer a été observée, et une corrélation entre la solubilité du fer et celle des phytates a été établie ($R^2 = 0,85$). A la fin du processus de production du 'ben-saalga', des réductions de 75% et 83% des teneurs en phytates et raffinose ont été respectivement observées (Tou *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Association entre les bactéries lactiques et d'autres micro-organismes dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest

Type de produit	Nom du produit	Micro-organismes ^a	Références
Produits non –alcoolisés			
<i>Aliments à base de céréales</i>			
	'banku'	BA ^b , Levures, moisissures	Beuchat, 1983.
	'ogi-baba'	BA, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida krusei</i>	Akinrele, 1970.
	'ogi'	BA, <i>Corynebacterium</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Candida mycoderma</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhodoturula</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	Sanni <i>et al.</i> , 2002.
	'kunun-zaki'	BA, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Efiuvwevwere et Okano, 1995.
	'gowé'	BA, <i>Kluyveromyces marxianus</i> et <i>Pichia anomala</i>	Viéra-Dalodé <i>et al.</i> , 2007.
	'obiolor'	BA, <i>Bacillus</i> spp., levures	Achi, 1990.
<i>Aliments à base de manioc</i>			
	'agbelima'	BA, <i>Candida tropicalis</i> BA, <i>Bacillus</i> spp.	Amoa-Awua et Jakobsen, 1995. Lei <i>et al.</i> , 1999.
	'attiéké'	BA, <i>Bacillus</i> spp., levures, moisissures BA, <i>Candida tropicalis</i>	Assanvo <i>et al.</i> , 2006. Coulin <i>et al.</i> , 2006.
	'gari'	BA, <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Geotrichum candidum</i>	Collard et Levi, 1959 ; Collard, 1963.
Boissons alcoolisées			
	'pito'	BA, <i>Candida</i> sp., <i>Geotrichum candidum</i>	Ekundayo, 1969.
	'burukutu'	BA, <i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chavan et Kadam, 1989.
	'tchoukoutou'	BA, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Koyodé <i>et al.</i> , 2007.

^a les micro-organismes autres que les bactéries lactiques identifiés au cours de la fermentation

^b BA : bactéries lactiques

3.5. Influence sur la structure de la matrice alimentaire

L'analyse bibliographique montre que très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de l'impact de la fermentation sur la structure des produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest. Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires seraient probablement responsables du gonflement et de la structure poreuse du 'mawè' par le biais d'une production de gaz (CO₂) (Nago et Hounhouigan, 1990). Cette structure poreuse du 'mawè' est souhaitable, car elle facilite la désintégration des particules au cours de la préparation d'un autre produit dérivé l'aklui' (bouillie parsemée de grumeaux). La fermentation du manioc pour la production d'agbelima' permettrait au produit d'avoir à la fois son goût et sa texture caractéristique (Amoa-Awua et Jakobsen, 1995).

3.6. Propriétés probiotiques

En 2001, un comité d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (Food and Agricultural Organization, FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définissait les probiotiques comme des micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2001). Cette dernière définition comprend les hôtes tant humains qu'animaux et ne se limite plus aux activités de la microflore colique, mais concerne aussi d'autres parties du corps et certains paramètres immunologiques. L'aptitude à être actif dans le site d'action visé et à apporter un réel bénéfice pour le consommateur détermine donc la véritable efficacité d'un probiotique. Les souches de bactéries lactiques probiotiques proviennent des aliments et appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion du lactose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention ou le raccourcissement de la durée de la diarrhée (notamment les diarrhées provoquées par le rotavirus et par *Clostridium difficile*), la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale et la prévention du cancer n'ont toutefois été démontrées que pour un nombre limité de souches. Ces effets sur la santé peuvent s'expliquer par des mécanismes tels que certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de peroxyde d'hydrogène, acides organiques et peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur

l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire. Si certains de ces effets sur la santé sont déjà largement établis, d'autres ne le sont pas du tout encore (De Vuyst *et al.*, 2004). Ainsi, les perspectives d'utilisation des produits amylacés et fermentés comme source de probiotiques sont immenses en Afrique de l'Ouest. Malheureusement, très peu d'études ont jusqu'à présent montré des preuves d'un effet probiotique lié à l'ingestion des aliments fermentés Ouest-Africains. Une seule étude a analysé l'impact de l'utilisation de la bouillie de mil appelée 'koko' associée à l'administration d'antibiotiques sur la diarrhée infantile au Ghana (Lei *et al.*, 2006). Les résultats ont montré que l'administration du traitement n'avait aucun effet sur la fréquence des selles et la durée de la diarrhée les cinq premiers jours. Cependant, une légère amélioration a été notée au bout de deux semaines chez les enfants traités (bouillie + antibiotiques) contrairement à ceux qui n'ont pas reçu la bouillie ou les antibiotiques. Ces auteurs concluaient que le 'koko' associé aux antibiotiques jouerait un rôle important dans la prévention des diarrhées et gastro-entérites aiguës chez les enfants et qu'il pourrait aider à réduire la diarrhée persistante.

4. Utilisation des bactéries lactiques comme cultures starters

4.1. Définition et critères de sélection

Les cultures starters peuvent être définies comme des préparations microbiennes concentrées constituées de un ou plusieurs micro-organismes viables, se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières et capables d'induire les changements désirés dans le substrat (Holzapfel, 1997). L'introduction de cultures starters de bactéries lactiques au cours de la fermentation doit tenir compte des critères d'amélioration du procédé de transformation et de la qualité des produits à travers: (i) une accélération des activités métaboliques (acidification ou production d'alcool), (ii) l'amélioration et le contrôle du processus de fermentation, (iii) la formation des caractéristiques organoleptiques désirées, (iv) une amélioration de la sécurité et la réduction des risques hygiéniques et toxicologiques (Holzapfel, 1997). Selon ce dernier, la sélection des souches doit aussi tenir compte des interactions possibles dans des cultures mixtes, de leur comportement dans des conditions définies et sur la matière première. Toujours selon le même auteur, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir, notamment : (i) la compétitivité, la viabilité et la survie, (ii) l'antagonisme avec les agents pathogènes et la flore microbienne de détérioration, (iii) le taux de production d'acide ou d'alcool, (iv) les modifications organoleptiques, (v) les métabolites primaires de la fermentation, (vi) la dégradation des facteurs antinutritionnels, (vii) la détoxification, (viii) les

propriétés probiotiques. En ce qui concerne les produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest, une importance a été accordée à la sélection des bactéries lactiques sur la base de leurs propriétés fonctionnelles à savoir : l'activité amylolytique (production d' α -amylase), la production de bactériocines et de peroxyde d'hydrogène, l'utilisation de sucres indigestibles (raffinose, stachyose), la réduction des composés cyanogènes et la réduction rapide du pH (dès les premières heures de la fermentation) (Sanni *et al.*, 2002 ; Kostinek *et al.*, 2005 ; Oguntoyinbo, 2007). Parmi toutes, l'activité amylolytique est fréquemment choisie comme le principal critère de sélection de la souche (Olasupo *et al.*, 1996 ; Agati *et al.*, 1998 ; Hounhouigan *et al.*, 1999 ; Sanni *et al.*, 2002). La capacité d'une bactérie lactique amylolytique, sur une matière première amylacée, à améliorer la disponibilité des sources d'énergie pour les autres bactéries lactiques non-amylolytiques, à contribuer à une rapide diminution du pH et à fournir des propriétés rhéologiques désirées au produit, sont les principales raisons qui militent en faveur de ce choix.

4.2. Avantages

Depuis plusieurs années les efforts d'amélioration, de modernisation et de contrôle de la production de la majeure partie des aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest, étaient portés sur les aspects technologiques (mécanisation, conditionnement et stockage du produit fini) et nutritionnels (ajout de protéines et vitamines) (Adeniji et Potter, 1978 ; Owusu-Ansah *et al.*, 1980 ; Plahar et Leung, 1983). Actuellement, les fermentations spontanées sont de plus en plus remplacées par de nombreux essais d'inoculation avec des starters de micro-organismes (bactéries lactiques et/ou levures). Les exemples de produits amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest où des souches de bactéries lactiques ont été isolées et, par la suite utilisées avec succès comme cultures starters (associées à d'autres micro-organismes ou non) au cours de la fermentation, sont indiqués dans le Tableau 4. Ces essais ont montré des changements notables aussi bien au cours de la fermentation qu'au niveau du produit fini, comparés à ceux réalisés ou obtenus selon le procédé traditionnel. La réduction du temps de fermentation, l'inhibition des micro-organismes pathogènes et l'obtention d'un produit de qualité organoleptique acceptable et reproductible sont les changements majeurs souvent obtenus. Par exemple, Songré-Ouattara et collaborateurs (2009) viennent de montrer que l'inoculation de la farine de mil enrichie d'arachide avec la souche amylolytique *L. plantarum* A6, au cours de la préparation de 'ben-saalga' au Burkina-Faso, permet d'obtenir une bouillie de haute densité énergétique, de consistance liquide et de qualité

constante. Pour ces auteurs, l'utilisation des bouillies ainsi obtenues permettrait d'améliorer les apports en énergie et nutriments essentiels des enfants pendant la période de sevrage. L'utilisation d'une culture starter permet dans l'ensemble de réaliser un meilleur contrôle de la fermentation et une standardisation du procédé de fabrication. Ainsi un produit sain, de qualité organoleptique constante et acceptable peut être fourni au consommateur. Les possibilités de relancer l'agriculture par la transformation locale des produits vivriers, de répondre à l'alimentation urbaine en favorisant la fourniture de produits traditionnels ainsi que la création potentielle d'emplois et la génération de revenus, sont entre autres des avantages socio-économiques à ne pas négliger.

4.3. Préparation et conservation

La majeure partie des bactéries lactiques utilisées comme cultures starters dans les produits fermentés de l'Afrique de l'Ouest est introduite au cours de la fermentation sous la forme d'une suspension fraîche de cellules (Tableau 4). En général, l'inoculum est obtenu après 24h de croissance (bouillon Man Rogosa Sharp) d'une colonie isolée sur milieu gélosé, suivi d'une centrifugation et d'une dilution dans une solution salée stérile pour obtenir la concentration voulue. La conservation de ces suspensions microbiennes, dans un état actif, sur de longues périodes est une étape cruciale pour une pratique uniforme de la fermentation. Malheureusement, très peu d'études ont jusqu'à présent réalisé des essais de conservation des micro-organismes utilisés comme cultures starters en Afrique de l'Ouest. Okafor et collaborateurs (1999) ont étudié la survie, seul ou en combinaison, de *L. coryneformis*, *L. delbrueckii* et *Saccharomyces* sp., isolés au cours de la production de 'gari', sur des substrats amylacés déshydratés (igname, manioc, taro, riz, 'gari') comme support de conservation de ces micro-organismes. Après 16 semaines de stockage, 75% à 85% des micro-organismes avaient survécu dans l'igname, le taro et le manioc, tandis que 40% à 65% avaient survécu dans le riz et le 'gari'. Le stockage à basse température (4°C) des souches dans l'igname, le manioc et le taro n'améliorait pas la survie contrairement à un stockage à température ambiante. Cependant des améliorations de 10% et 20% de la viabilité des souches étaient obtenues, respectivement, pour un stockage à 4°C dans le riz et le 'gari'.

Table 4 : Les souches utilisées comme cultures starters dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest

Type de produit	Nom du produit	Micro-organismes ^a	Préparation du starter	Changement notés ^b	Références
Produit non –alcoolisés					
<i>Aliments à base de céréales</i>					
	'kenkey'	<i>Lactobacillus fermentum</i> LB-11	poudre lyophilisée	(1), (2), (3)	Annan <i>et al.</i> , 2003.
	'ogi'	<i>L. acidophilus</i> DK77 et <i>L. pentosus</i> DK99		(4), (5), (12)	Olukoya <i>et al.</i> , 1994.
	'mawè'	<i>Lactobacillus fermentum</i> ou <i>Lactobacillus brevis</i>	suspension fraîche de cellules	(6), (10)	Hounhouigan <i>et al.</i> , 1999.
	'ben-saalga'	<i>Lactobacillus plantarum</i> 6.1 ou <i>Lactobacillus plantarum</i> A6	suspension fraîche de cellules	(7), (8), (9)	Songré-Ouattara <i>et al.</i> , 2009
<i>Boisson à base de céréales</i>					
	'gowé'	<i>Lactobacillus fermentum</i> L025 et <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y815	suspension fraîche de cellules	(1), (11)	Viéra-Dalodé <i>et al.</i> , 2008.
<i>Aliments à base de manioc</i>					
	'agbelima'	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> et <i>Leuconostoc mesentroides</i>	suspension fraîche de cellules	(4), (11) ^c	Amoa-Awua <i>et al.</i> , 2005.
	'fufu'	<i>Lactobacillus plantarum</i> F1 et <i>Lactobacillus brevis</i> OG1	suspension fraîche de cellules	(4), (12)	Ogunbanwo <i>et al.</i> , 2004.
	'gari'	<i>Lactobacillus plantarum</i> SL14, SL19 <i>Lactobacillus delbruckii</i> , <i>Lactobacillus coryneformis</i> et <i>Saccharomyces</i> sp.	suspension fraîche de cellules	(13) (1), (13), (14), (15)	Sobowale et Oyewole, 2008. Okafor <i>et al.</i> , 1998 a, b
Boisson alcoolisée					
	'pito'	<i>Lactobacillus plantarum</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	suspension fraîche de cellules	(1), (6), (11)	Orji <i>et al.</i> , 2003

^a Les bactéries lactiques et d'autres micro-organismes^b Comparé au procédé traditionnel de fabrication (fermentation spontanée) ou au produit obtenu par le procédé traditionnel^c Lorsque la pâte de manioc fermentée est additionnée de la pâte de maïs fermentée

(1) réduction du temps de fermentation, (2) importante production d'acides lactique, (3) croissance rapide de la flore lactique, (4) inhibition de micro-organismes pathogènes, (5) réduction de la durée et de l'intensité de la diarrhée infantile, (6) meilleur control du procédé de production, (7) acidification rapide, (8) importante hydrolyse partielle de l'amidon, (9) produit de qualité constante, (10) produit de qualité constante et moins apprécié, (11) caractéristiques organoleptiques acceptables, (12) amélioration de la stabilité du produit, (13) bonne appréciation du produit, (14) réduction importante des composés cyanogènes, (15) amélioration de la teneur en lysine.

4.4. Perspectives

La suppression du stade de préparation de l'inoculum constituerait un réel progrès pour les unités de production locales, dans la mesure où elles pourraient disposer de suspensions bactériennes concentrées suffisamment actives pour être ajoutées directement à la matière première en lieu et place du levain traditionnel. De plus, pour qu'une suspension concentrée de bactéries lactiques puisse être utilisée directement dans le processus de fabrication, il est essentiel que le peuplement et l'activité de cette suspension soient non seulement très élevés mais également très stables dans le temps. Il a été démontré que des techniques de déshydratation telles que la lyophilisation permettent de conserver la viabilité et l'activité des souches de bactéries lactiques sur de longues périodes de conservation (Champagne *et al.*, 1991 ; King *et al.*, 1993). Dans une étude réalisée au Sénégal, Totté et collaborateurs (2005) ont étudié la possibilité de réaliser la fermentation contrôlée du mil pour la production de 'céré', 'ciakri' et 'array' à l'aide d'une bactérie lactique lyophilisée. Les résultats de l'étude ont permis l'élaboration d'un guide pour l'utilisation du starter lyophilisé en vue de l'amélioration des produits fermentés traditionnels à base de mil au Sénégal. Par ailleurs, ces auteurs ont aussi indiqué que l'utilisation de cette bactérie lyophilisée était une alternative très efficace, d'une grande commodité d'emploi et d'un coût réduit (moins de 5% du prix de revient) pour les unités de production locales. L'utilisation de bactéries lactiques lyophilisées au cours de production de produits fermentés en Afrique de l'Ouest pourrait être envisagée afin de dissocier l'étape de leur préparation de celle de leur utilisation.

5. Conclusion

Les bactéries lactiques sont les micro-organismes dominants retrouvés au cours de la fermentation de la majeure partie des aliments ou boissons amylacés fermentés de l'Afrique de l'Ouest. Leurs principales fonctions comprennent la production d'acides organiques, d'alcool et de composés aromatiques ainsi que d'autres effets tels que la stimulation des levures, l'inhibition des micro-organismes pathogènes, l'amélioration de la qualité nutritionnelle, les propriétés probiotiques, l'élaboration de la texture de l'aliment et la dégradation des composés toxiques. Afin d'améliorer et de contrôler le processus de production et particulièrement l'étape de la fermentation, des cultures starters sont de plus en plus utilisées. Cependant, la plupart de ces cultures starters sont introduites au cours de la fermentation sous la forme de suspensions bactériennes fraîches difficiles à conserver sur de

longues périodes. Pour pallier à ce problème, l'utilisation de cultures starters lyophilisées, actives et stables au cours de leur stockage, pourrait être envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHI O.K. Microbiology of 'obiolor', a Nigerian fermented non-alcoholic beverage. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, **69**, 321-325.
- ADENIJI A.O., POTTER N.N. Properties of 'ogi' powders made from normal, fortified and opaque-2 corn. *J. Food Sci.*, 1978, **43**, 1571-1574.
- AGATI V., GUYOT J.P., MORLON-GUYOT P., TLAMOND P., HOUNHOUIGAN D.J. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, **85**, 512-520.
- AKINRELE I.A. Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *J. Sci. Food Agric.*, 1970, **21**, 619-625.
- AMANE N.D., ASSIDJO N.E., GBONGUE M.A., BOHOUSOU K., CARDOT P. Caractérisation physico-chimique d'une bière traditionnelle Ouest Africaine, Le Tchapalo. *Agr. Afr.*, 2005, **17**, 143-152.
- AMOA-AWUA W.K.A., JAKOBSEN M. The role of *Bacillus* species in cassava fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, **79**, 250-256.
- AMOA-AWUA W.K.A., APPOH F.E., JAKOBSEN M. Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **31**, 87-98.
- AMOA-AWUA W.K., OWUSU M., FEGLO P. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **21**, 1201-1207.
- ANNAN N.T., POLL L., SEFA-DEDEH S., PLAHAR, W.A., JAKOBSEN, M. Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **94**, 462-474.
- ANNAN-PRAH A., AGYEMAN, J. A. Nutrient content and survival of selected pathogenic bacteria in kenkey used as a weaning food in Ghana. *Acta Trop.*, 1997, **65**, 33-42.
- ASSANVO J.B., AGBO G.N., BEHI Y.E.N., COULIN P., FARAH Z. Microflora of traditional starter made from cassava for 'attiéké' production in Dabou (Côte d'Ivoire). *Food Control*, 2006, **17**, 37-41.
- BEUCHAT L.R. Indigenous fermented foods. In : Rehm H.-J., Reed G., Puhler A. Studler P. (Eds.), *Biotechnology*. Verlag Chemie : Weinheim, 1995, 5005-559.
- CAPLICE E., FITZGERALD G.F. Food fermentations, role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **50**, 131-149.

- CHAMPAGNE C.P., GARDNER N., BROCHU E., BEAULIEU Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1991, **24**, 118-128.
- CHAVAN J. K., KADAM S.S. Nutritional improvement of cereals by fermentation. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 1999, **28**, 349-400.
- COLLARD P., LEVI A. A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, 1959, **183**, 620.
- COLLARD P. A species of *Corynebacterium* isolated from fermenting cassava roots. *J. Appl. Bacteriol.*, 1963, **26**, 115.
- COULIN P. FARAH, Z. ASSANVO J., SPILLMANN H., PUHAN Z. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **106**, 131-136.
- DE VUYST L., AVONTS L., MAKRAS E. Probiotics, prebiotics and gut health. In : Remacle C., Reusens (Eds.), *Functional Foods : Ageing and Degenarative disease*. Woodhead Publishing: Cambridge, 2004, 416-482.
- DEMUYAKOR B., OHTA Y. Characteristics of pito yeasts from Ghana. *Food Microbiol.*, 1991, **8**, 183-193.
- DJE M.K., N'GUESSAN K.F., DJENI T.N., DADIE T.A. Biochemical Changes during alcoholic fermentation in the production of 'tchapalo', a traditional sorghum beer. *Int. J. Food Eng.*, 2008, **4**, 44-50.
- EFIUVWEVWERE B.J.O., AKONA O. The microbiology of 'kunun-zaki', a cereal beverage from northern Nigeria, during the fermentation (production) process. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **11**, 491-493.
- EKUNDAYO J.A. The production of 'pito', a Nigerian fermented beverage. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1969, **4**, 217-225.
- FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria (2001). <http://www.who.int/foodsafety/publications>.
- FAPARUSI S.I., OLOFINBOBA M.O., EKUNDAYO, J.A. The microbiology of burukutu beer. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 1973, **13**, 563-568.
- HALM M., LILLIE A., SORENSEN A.K., JAKOBSEN M. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *Int. J. Food Microbiol.*, 1993, **19**, 135-143.
- HOLZAPFEL W.H. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*, 1997, **8**, 241-258.
- HOLZAPFEL W.H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **75**, 197-212.
- HOUNHOUIGAN D. J., NOUT M.J.R., NAGO C.M., HOUBEN J.H., ROMBOUTS F.M. Composition and microbiological and physical attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1993, **28**, 513-517.

- HOUNHOUIGAN D.J., NOUT M.J.R., NAGO C.M., HOUBEN J.H., ROMBOUTS F.M. Characterisation and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Microbiol.*, 1993, **18**, 279-287.
- HOUNHOUIGAN D.J., NOUT M.J.R., NAGO C.M., HOUBEN J.H., ROMBOUTS F.M. Use of starter cultures of lactobacilli and yeast in the fermentation of mawè, an African maize product. *Trop. Sci.*, 1999, **39**, 220-226.
- IWUOHA C.I., EKE O.S. Nigerian indigenous fermented foods, their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status. *Food Res. Int.*, 1996
- JOHANSON M.L., SANNI A., LÖNNER C., MOLLIN G. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of Lactobacilli from Nigerian 'ogi', and the occurrence of starch fermenting strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 1995, **25**, 159-168.
- KAYODÉ A.P.P., HOUNHOUIGAN J.D., NOUT M.J.R. Impact of brewing process operations on phytates, phenolic compounds and in vitro of iron and zinc in opaque sorghum beer. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 2007, **40**, 834-841.
- KETIKU A.O., OYENUGA V.A. Preliminary Report on the Carbohydrates Constituents of Cassava root and yam tuber. *Nig. J. Sci.*, 1970, **4**, 25-30.
- KIMMONS J.E., BROWN K.H., LARTEY A., COLLISON E., MENSAH P.P., DEWEY K.G. The effects of fermentation and/or vacuum flask storage on the presence of coliforms in complementary foods prepared in Ghana. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 1999, **50**, 195-201.
- KING V.A.-E., SU J.T. Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. *Process Biotech.*, 1993, **28**, 47-52.
- KOSTINEK M., SPECHT I., EDWARD V.A., SCHILLINGER U., HERTEL C., HOLZAPFEL W.H., FRANZ C.M.A.P. 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.
- KOSTINEK M., SPECHT I., EDWARD V.A., PINTO C., EGOUNLETY M., SOSSA C., MBUGUA S., DORTU C., THONART P., TALJAARD L., MENGU M., FRANZ C.M.A.P., HOZAPFEL W. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **114**, 342-351.
- LEI V., AMOA-AWUA W.K.A., BRIMER L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **53**, 169-184.
- LEI V., JAKOBSEN M. Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *J. Appl. Microbiol.*, 2004, **96**, 384-397.

- LEI V., FRIIS H., MICHAELSEN K.F. Spontaneously fermented millet product as a natural probiotic treatment for diarrhoea in young children, An intervention study in Northern Ghana. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **110**, 246-253.
- LEROI F., PIDOUX M. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentis* isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Bacteriol.*, 1993, **74**, 54-60.
- MENSAH P., TOMKINS A.M., DRASAR B.S., HARRISON T.J. Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning foods in Ghana. *Lancet*, 1990, **336**, 140-143.
- MENSAH P., TOMKINS A.M., DRASAR B.S., Harrison T.J. Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **70**, 203-210.
- MESSENS W., DE VUYST L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **72**, 31-43.
- NAGO C.M., HOUNHOUIGAN D.J. La technologie traditionnelle de transformation du maïs en pâte fermentée au Bénin. FSA-IRAT-CEE : Bénin, 1990, 30 p.
- NOUT M.J.R. Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas. *Int. J. Food Microbiol.*, 1991, **12**, 217-224.
- ODUNFA S.A. African fermented foods. In : Wood B. J. B. (Eds.), Microbiology of fermented foods. Elsevier Applied Science Publishers : London and New-York, 1985, 155-191.
- ODUNFA S.A., ADEYELE S. Microbiological changes during the traditional production of ogi-baba, a West African fermented Sorghum Gruel. *J. Cereal Sci.*, 1985, **3**, 173-180.
- ODURO I., ELLIS W.O., DZIEDZOAVE N.T., NIMAKO-YEBOAH K. Quality of gari from selected processing zones in Ghana. *Food Control*, 2000, **11**, 297-303.
- OGUNBANWO S.T., SANNI, A.I., OLINUDE, A.A. Effect of bacteriogenic *Lactobacillus* spp. on the shelf life of fufu, a traditional fermented cassava product. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **20**, 57-63.
- OGUNTOYINBO F.A. Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of a solid state fermentation of cassava during traditional gari' production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **23**, 1425-1432.
- OKAFOR N. Microorganisms associated with cassava fermentation for 'gari' production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1977, **42**, 279-284.
- OKAFOR N., UMEH C., IBENEGBU C., OBIZOBAB I., Nnamb N. Improvement of garri quality by the inoculation of microorganisms into cassava mash. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **40**, 43-49.
- OKAFOR N., UMEH C., IBENEGBU C. Amelioration of garri, a cassava-based fermented food by the inoculation of microorganisms secreting amylase, lysine and linamarase into cassava mash. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **14**, 835-838.
- OKAFOR N., AZUBIKE C., IBENEGBU C. Carriers for starter cultures for the production of garri, a fermented food derived from cassava. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **15**, 231-234.

- OLASUPO N.A., OLUKOYA D.K., Odunfa S.A. Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Nahrung*, 1996, **40**, S. 44-46.
- OLUKOYA D.K., EBIGWEI S.I., OLASUPO N.A., OGUNJIMI A.A. Production of DogiK, an improved Ogi (Nigerian Fermented Weaning Food) with Potentials for Use in Diarrhoea Control. *J. Trop. Pediatrics*, 1994, **40**, 108-113.
- ORJI M.U., MBATA T.I., ANICHE G.N., Ahonkhai I. The use of starter cultures to produce 'Pito', a Nigerian fermented alcoholic beverage. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **19**, 733-736.
- OWUSU-ANSAH J., VAN DE VOORT F.R., BEDIAKO-AMOA B. Banku - its degree of gelatinization and development of a quick cooking product. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1980, **13**, 131.
- OYEWOLE O.B., ODUNFA S.A. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, **68**, 145-152.
- OYEWOLE O.B. Characteristics and significance of yeasts involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **65**, 213-218.
- PLAHAR W.A., LEUNG H.K. Effect of moisture content on the development of carboxylic acids in traditional maize dough fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 1982, **33**, 555-558.
- PLAHAR W.A., LEUNG H.K. Composition of Ghanaian fermented maize meal and the effect of soy fortification on sensory properties. *J. Sci. Food Agric.*, 1983, **34**, 407- 411.
- SANNI A.I., MORLON-GUYOT J., GUYOT J.P. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **72**, 53-62.
- SAWADOGO-LINGANI H., LEI V., DIAWARA B., NIELSEN D.S., MØLLER P.L., TRAORÉ A.S. JAKOBSEN M. The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 765-777.
- SOBOWALE A.O., OYEWOLE O.B. Effect of lactic acid fermentation of cassava on functional and sensory characteristics of fufu flour. *J. Food Process. Preserv.*, 2008, **32**, 560-570.
- SONGRE-OUATTARA L.T., MOUQUET-RIVIER C., ICARD-VERNIÈRE C., ROCHETTE I., DIAWARA B., GUYOT J.P. Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **130**, 258-264.
- SPICKETT R.G.W., SQUIRES J.A., WARD J.B. Gari from Nigeria. *Colonial Plant Anim. Products*, 1955, **5**, 230-238.
- STEINKRAUS K.H. Handbook of Indigenous Fermented Foods. Marcel Dekker : New York, 1983, 250 p.
- STEINKRAUS K.H. Classification of fermented food, worldwide review of household fermentation technique. *Food Control*, 1997, **8**, 311-317.

- TENIOLA O.D., HOLZAPFEL W.H., ODUNFA S.A. Comparative assessment of fermentation techniques useful in the processing of ogi. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **21**, 39-43.
- TOKA M.D., DJÉNI T.N., DJE M.K. Improved Process of Cassava Processing into 'Attiéké', a Traditional Food Product of Côte D'Ivoire. *Int. J. Food Eng.*, 2008, **4**, 24-29.
- TOTTE A., TINE E., LEITE N., LAURENT L., SEYE N., ROBLAIN D., THONART P. Guide de terrain pour la fermentation contrôlée du mil. Graphart : Gembloux, 2005, 47 p.
- TOU E.H., GUYOT J.P., MOUQUET-RIVIER C., ROCHETTE I., COUNIL E., TRAORÉ A.S., TRÈCHE S. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **106**, 52-60.
- TREILLON R. L'innovation technologique dans les pays du sud, le cas de l'agro-alimentaire. Karthala : Paris, 1992, 268 p.
- VAN DER AA KUHLE A., JESPERSEN L., GLOVER R.L.K., DIAWARA B., JAKOBSEN M. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeast*, 2001, **18**, 1069-1079.
- VIEIRA-DALODÉ G., JESPERSEN L., HOUNHOUIGAN D.J., MOLLER P.L., NAGO C.M., JAKOBSEN M. Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production from sorghum in Bénin. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 342-349.
- VIEIRA-DALODE G., MADODE Y.E., HOUNHOUIGAN D.J., JESPERSEN L., JAKOBSEN M. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts as inoculum enrichment for the production of gowé, a sour beverage from Benin. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2008, **2**, 179-186.

Synthèse 2

OBJECTIF

Des bactéries lactiques des genres *Lactobacillus*, *Weissella* et *Leuconostoc* ont été précédemment isolées au cours de la fermentation du manioc pour la production de 'gari' (Kostinek *et al.*, 2005). Nous nous intéresserons ici au genre *Weissella*. Les bactéries lactiques appartenant au genre *Weissella* sont isolées de sources très diverses et ont longtemps été considérées comme appartenant au genre *Leuconostoc*. Les récentes avancées en biologie moléculaire ont permis de clarifier la phylogénie des bactéries regroupées au sein du genre *Weissella*. Leurs rôles dans la production de substances antimicrobiennes ainsi que dans la formation de l'arôme et de la texture de certains produits alimentaires expliquent l'intérêt grandissant qui leur est accordé. Cette mini-revue présente une mise à jour des données disponibles en ce qui concerne leur taxonomie, leur habitat, leurs caractéristiques générales, caractères structuraux et propriétés fonctionnelles, ainsi que leur production et conservation. Des exemples de leurs utilisations comme cultures starters seront fournis.

Référence

Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. 2005. 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.* 28: 527-540.

Synthèse 2

Les bactéries lactiques : le genre *Weissella*

Yao A. A.^a et Thonart P.^{a,b}

^a Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité de Technologie Microbienne, Université de Liège, Sart-Tilman B40, B-4000 Liège, Belgique

^b Unité des Bio-industries, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgique

Les bactéries lactiques : le genre *Weissella*

Résumé

Cette mini-revue présente une mise à jour des données sur les bactéries lactiques du genre *Weissella*, en ce qui concerne leur taxonomie, leur habitat, leurs caractéristiques générales, caractères structuraux et propriétés fonctionnelles, ainsi que leur conservation et production. Des exemples d'utilisations actuelles de ces bactéries comme cultures starters dans les aliments ainsi que comme probiotiques, sont fournis.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Weissella*, acides organiques, culture starter, fermentation, composés aromatiques.

Lactic acid bacteria : the *Weissella* genus

Abstract

This review presents up to date comprehensive data about *Weissella*, relative to their taxonomy, habitat, general characteristics, structural characteristics and functional properties as well as their production and conservation. Some examples of their current use as starter cultures in food and as probiotics are indicated.

Keywords : Lactic acid bacteria, *Weissella*, organic acids, starter culture, fermentation, aroma compounds.

1. Introduction

Les espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles se présentant par paires ou courtes chaînes, anaérobies facultatives, catalases négatives, hétéro-fermentaires strictes. En se basant sur les méthodes traditionnelles d'identification des souches (caractérisation phénotypique, méthodes physico-chimiques), les bactéries du genre *Weissella* ont longtemps été considérées comme appartenant au genre *Leuconostoc*. Les bactéries du genre *Leuconostoc* ou *Weissella* se différencient des autres bacilles hétéro-fermentaires par la présence d'une alanine et/ou une sérine dans le pont interpeptidique du peptidoglycane (Collins *et al.*, 1993). Cependant, il est plus difficile de faire la différence entre les bactéries du genre *Leuconostoc* et celles du genre *Weissella*. Les récentes avancées en biologie moléculaire ont permis de clarifier la phylogénie des bactéries regroupées au sein du genre *Weissella* (Collins *et al.*, 1993).

Les espèces du genre *Weissella* sont des micro-organismes qu'on trouve dans l'environnement, généralement dans les végétaux. A partir de cet environnement naturel, ils peuvent être disséminés dans différents produits tels le lait cru, les produits viandoux et le sucre de canne (Samelis *et al.*, 2000 ; Björkroth *et al.*, 2002). Des espèces du genre *Weissella* ont également été isolées du sol, des eaux usées, de la boue de machines utilisées dans l'industrie laitière, dans les plantes des régions désertiques, ainsi que de la bouche, des fèces et de l'intestin de l'homme et des animaux (Holzapfel et van Wyk 1982 ; Kandler *et al.*, 1983 ; Björkroth *et al.*, 2002). Certaines espèces de *Weissella* ont été occasionnellement isolées de prélèvements soumis à des laboratoires de bactériologie et de plusieurs hémocultures (Olano *et al.*, 2001). Dans la très grande majorité des cas, les souches de *Weissella* sp. sont associées à d'autres bactéries et/ou sont isolées chez des patients souffrant de pathologies chroniques et sont généralement considérées comme non pathogènes.

Leurs rôles dans la production de substances antimicrobiennes ainsi que dans la formation de l'arôme et de la texture de certains produits alimentaires, expliquent l'intérêt grandissant qui leur est accordé.

2. Taxonomie

Des études phylogénétiques, basées sur les séquences des ARNr 16S et 23S, ont montré que les espèces du genre *Leuconostoc* sont hétérogènes et peuvent être divisées en trois groupes : un groupe comprenant *Leuc. paramesenteroides*, un groupe formé par *Leuc. oeni* (actuellement reclassé dans le genre *Oenococcus*) et un groupe rassemblant *Leuc.*

mesenteroides (espèce type du genre) ainsi que les autres espèces du genre *Leuconostoc* (Martinez-Murcia et Collins 1990 ; Martinez-Murcia *et al.*, 1993). Ces études révélaient également que cinq espèces hétéro-fermentaires du genre *Lactobacillus* (*L. confusus*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. minor* et *L. viridescens*) étaient apparentées à *Leuc. paramesenteroides*. En 1993, Collins *et al.* réalisent une étude taxonomique sur des souches bactériennes ressemblant à des *Leuconostoc* sp. et isolées de saucissons secs fabriqués en Grèce. L'étude des séquences des ARNr 16S permet de classer ces souches dans le groupe constitué par *Leuc. paramesenteroides* et les cinq espèces de lactobacilles hétéro-fermentaires. En se basant sur les résultats de leur étude et sur les résultats des études antérieures, Collins *et al.* transfèrent l'ensemble de ces espèces dans le nouveau genre *Weissella* et ils proposent la création de six nouvelles espèces (*W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. viridescens* et *W. paramesenteroides*) pour reclasser *L. confusus*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. minor*, *L. viridescens* et *Leuc. paramesenteroides* ainsi que la création d'une nouvelle espèce (*W. hellenica*) pour les souches isolées de saucissons grecs. Ultérieurement, six nouvelles espèces, *W. cibaria*, *W. ghanensis*, *W. kimchii*, *W. koreensis*, *W. soli* et *W. thailandensis*, ont été placées dans le genre *Weissella*. Ces six taxons ont été inclus dans le genre *Weissella* sur la base des résultats des homologues ADN-ADN et du séquençage des ARNr 16S. En 2004, Ennahar et Cai montrent que *W. cibaria* et *W. kimchii* constituent une unique espèce, qui en fonction des règles de priorité, doit être appelée *W. cibaria*. Ainsi, il y a actuellement 12 espèces dans le genre *Weissella*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. ghanensis*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. soli*, *W. thailandensis*, *W. viridescens*.

3. Origine et habitat

Les bactéries lactiques appartenant au genre *Weissella* sont isolées de sources très diverses. Nous nous intéresserons ici aux souches isolées dans les produits alimentaires. Différentes espèces de *Weissella* ont été isolées des végétaux frais, végétaux et produits céréaliers fermentés, produits carnés et charcuteries ainsi que des poissons fermentés et produits laitiers comme indiqué dans le Tableau 1. L'espèce *W. paramesenteroides* est abondante dans les végétaux frais et semble jouer un rôle dans les premières phases de la fermentation des ensilages. *W. halotolerans*, *W. hellenica* et *W. viridescens* sont couramment isolées de viandes séchées ou fumées ou de produits de charcuterie comme les saucissons

secs. *W. viridescens* peut être responsable d'un verdissement des produits carnés (Samelis *et al.*, 1998). Ce verdissement résulte de la production bactérienne d'eau oxygénée et d'une exposition à l'oxygène de l'air qui provoquent une oxydation de la myoglobine. Un peu plus récemment, les espèces *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. viridescens* et *W. paramesenteroides* ont été isolées du lait cru appelé 'iben' au Maroc (Ouadghiri *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Exemples d'espèces de *Weissella* isolées dans les produits alimentaires

Espèces	Origine	Références
<i>Weissella cibaria</i>	'plaa-Som' (poissons fermentés rentrant dans la préparation de repas), Thaïlande	Srionnual <i>et al.</i> , 2007
<i>Weissella paramesenteroides</i>	gari (semoule de manioc fermentée), manioc fermenté, Bénin, Kenya	Kostinek <i>et al.</i> , 2005, 2007
<i>Weissella confusa</i>	'gowé' (boisson non alcoolisée à base de sorgho fermentée), Bénin 'koko' (bouillie de millet fermentée), Ghana Lait de brebis, Iran 'kule naoto' (lait fermenté), Kenya cannes à sucre, de jus de carottes fèves de cacao fermentées, Ghana	Viéra-Dalodé <i>et al.</i> , 2007 Lei et Jakobsen 2004 Mortazavi <i>et al.</i> , 2007 Mathara <i>et al.</i> , 2004 Björhroth <i>et al.</i> , 2002
<i>Weissella ghanensis</i>		Camu <i>et al.</i> , 2007 ; De Bruyne <i>et al.</i> , 2008
<i>Weissella thailandensis</i>	plaa-Som (poissons fermentés rentrant dans la préparation de repas), Thaïlande	Tanasupawat <i>et al.</i> , 2000
<i>Weissella viridescens</i>	jambon, charcuteries	Milbourne, 1983
<i>Weissella koreensis</i>	kimchi (plat de légumes fermentés à base de chou, radis, navet ou concombres), Corée	Lee <i>et al.</i> , 2002

4. Caractéristiques générales

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*W. paramesenteroides* peut produire une pseudo-catalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative. Ce sont des bactéries hétéro-fermentaires strictes ; elles fermentent les hexoses (voie hétéro-fermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase) en acide lactique, acide acétique ou éthanol et dioxyde de carbone et dégradent les pentoses (voie hétéro-fermentaire de la glycéraldéhyde-3-phosphate / pyruvate kinase / lactate déshydrogénase) en acide acétique et en acide lactique. Ces bactéries produisent du dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose et du gluconate. Ce sont également des bactéries anaérobies facultatives, chimio-organotrophes, capables de croître à 15°C et ayant des exigences nutritionnelles complexes. Les *Weissella* sp. ont une bonne croissance sur un

bouillon MRS (Man Rogosa Sharp) et les colonies obtenues sur milieu MRS gélifié sont rondes, légèrement convexes, à contour régulier, peu luisantes et leur diamètre est inférieur à 1mm.

5. Caractères structuraux

L'examen d'une bactérie lactique met en évidence 5 parties essentielles : la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et l'appareil nucléaire (chromosome et plasmide). L'analyse de ces composés cellulaires est devenue un instrument essentiel pour la classification et l'identification des bactéries. Nous nous intéresserons ici à la composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries lactiques du genre *Weissella*.

5.1 La paroi cellulaire

C'est une enveloppe de 20 à 40 nm d'épaisseur, perméable à l'eau, aux sels minéraux et aux métabolites, qui confère à chaque bactérie sa forme caractéristique et sa résistance mécanique. Elle est principalement constituée de peptidoglycane ou de muréine (Figure 1). Le peptidoglycane forme autour de la cellule un filet à mailles plus ou moins serrées qui entoure la bactérie à la manière d'un sac. Ce réseau est composé de chaînes de glycanes reliées entre elles par des chaînons peptidiques. Les chaînons peptidiques sont constitués d'unités tétrapeptidiques reliées entre elles par des ponts interpeptidiques. La structure du peptidoglycane est importante pour la taxonomie des bactéries à Gram positif et notamment des *Weissella*. Les bactéries du genre *Leuconostoc* ou *Weissella* se différencient des autres bacilles hétéro-fermentaires par la présence d'une alanine et/ou une sérine dans le pont interpeptidique du peptidoglycane (Collins *et al.*, 1993). La paroi cellulaire comporte aussi d'autres constituants : acides gras cellulaires (1 à 2%), enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, acides téchoïques, acides lipotéchoïques, protéines, polysaccharides, etc.

5.2 La membrane cytoplasmique

C'est une enveloppe souple de 7 à 9 nm immédiatement adjacente à la face interne de la paroi dont elle se distingue par un espace périplasmique clair. Elle contient principalement des phospholipides (30 à 40 %) et des protéines (60 à 70 %). Elle isole le cytoplasme du milieu extérieur, et constitue une barrière hydrophobe et osmotique. L'eau et les petites

molécules hydrophiles diffusent librement, tandis que les plus grosses molécules hydrophiles la franchissent par l'intermédiaire de transporteurs protéiques (ou perméases). Outre son rôle de barrière, la membrane exerce de multiples fonctions grâce aux nombreuses enzymes qui lui sont associées : enzymes des chaînes respiratoires, perméases, ATPases, phosphotransférases, enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi et des pili, etc. Elle joue donc un rôle de régulateur dans le métabolisme de la cellule (Yeagle 1993).

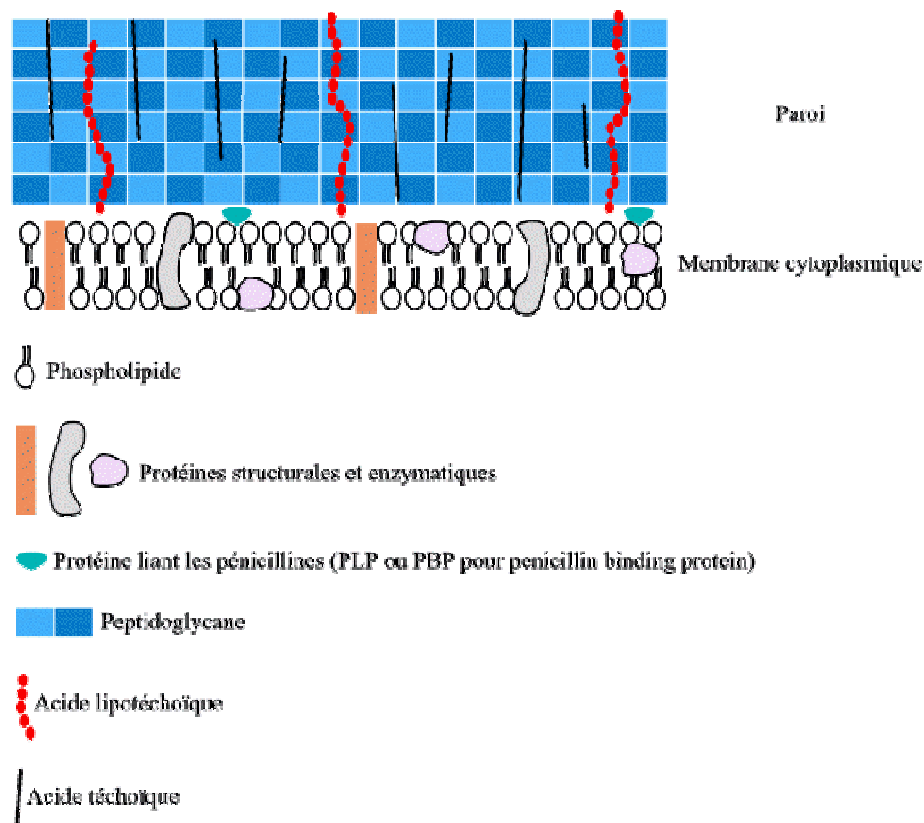


Figure 1 Schéma de la paroi d'une bactérie à Gram positif

5.3 Les lipides membranaires

5.3.1 Les phospholipides

Ce sont les constituants majeurs de la membrane cytoplasmique (30-40% de la masse). Ils sont essentiellement formés d'un glycérol lié à deux acides gras et à un groupement phosphate (glycérophospholipides). Les phospholipides diffèrent les uns des autres par le type d'acides gras rattachés au glycérol. Généralement, un des deux acides gras est saturé et l'autre ne l'est

pas. Ils diffèrent aussi par différents groupements chimiques qui peuvent se rattacher au groupement phosphate. La portion glycérol et phosphate de la molécule est dite hydrophile (qui aime l'eau) alors que les acides gras sont hydrophobes (qui n'aime pas l'eau). Les plus importants des glycérophospholipides sont : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylglycérol (PG), diphosphatidylglycérol (DPG). le PG (80-94% du total des phospholipides) et le DPG (5-9%) ont été identifiés comme les principaux phospholipides de la membrane cellulaire de *W. paramesenteroides* DSM 20288^T (Limonet *et al.*, 2004).

5.3.2 Les acides gras

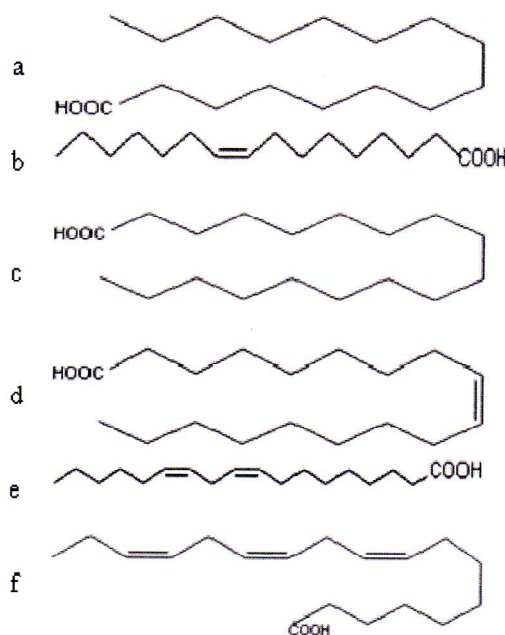


Figure 2 : Les principaux acides gras cellulaires des bactéries lactiques du genre *Leuconostoc/Weissella*. (a) acide palmitique, (b) acide palmitoléique, (c) acide stéarique, (d) acide oléique, (e) acide linoléique, (f) acide linolénique.

Un acide gras est une molécule formée d'une chaîne de carbones liés à des hydrogènes (hydrocarbure) terminée par un groupement acide (COOH). Les acides gras sont dits saturés lorsque les liaisons entre les carbones sont simples (pas de doubles liaisons) et monoinsaturés ou polyinsaturés lorsqu'ils comportent respectivement, une ou plusieurs doubles liaisons. L'étude des profils d'acides gras de membrane cellulaire par chromatographie en phase gazeuse permet de différencier les espèces *W. virididescens*, *W. paramesenteroides*, *W. hellenica* d'autres espèces non-identifiables de *Weissella* dans la viande (Samelis *et al.*, 1998). Les principaux acides gras de la membrane des bactéries lactiques du genre *Leuconostoc/Weissella* ont été identifiés. Ce sont principalement des acides gras saturés [acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0)], monoinsaturés [acides palmitoléique (C16:1), oléique (C18:1)] et polyinsaturés [acides linoléique (C18:2), linolénique (C18:3)] (Figure 2) (Samelis *et al.*, 1998 ; Coulibaly *et al.*, 2009).

6. Propriétés fonctionnelles

La production de métabolites et la dégradation de certaines substances par les bactéries du genre *Weissella*, sont des propriétés qui permettent d'améliorer la qualité et la stabilité des produits alimentaires.

6.1 Dégradation des facteurs antinutritionnels

6.1.1 Les oligosaccharides

Les céréales et plus spécialement les légumes contiennent des oligosaccharides tels que le raffinose et le stachyose qui peuvent causer des flatulences, diarrhées et indigestion chez l'homme. Ces oligosaccharides ne sont pas totalement ou pas du tout éliminés durant les étapes de production de l'aliment (germination, trempage, fermentation) ou la cuisson. Les liaisons α -D-galactosidiques peuvent être hydrolysées par les α -galactosidases produites par les bactéries lactiques du genre *Weissella* (Millière *et al.*, 1989). Des études récentes ont montré que seules les souches appartenant aux genres *Leuconostoc/Weissella* isolées au cours de la fermentation du manioc, pouvaient à la fois utiliser le raffinose et le stachyose contrairement aux espèces *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* et *L. fermentum* (Kostinek *et al.*, 2007).

6.1.2 Les glucosides cyanogénétiques

La linamarine et la lotaustraline sont les glycosides cyanogénétiques du manioc (*Manihot esculenta* Crantz). L'hydrolyse de ceux-ci par la linamarase endogène du manioc libère l'acide cyanhydrique (HCN) dont la toxicité a largement été démontrée. Plusieurs travaux ont été menés dans le souci de trouver des solutions pour réduire la quantité de composés cyanogènes à des teneurs acceptables. Il a été démontré que la quantité de linamarase endogène du manioc ainsi que les étapes de transformation traditionnelles (broyage, pressage, cuisson, séchage) étaient insuffisantes pour permettre une dégradation complète des glycosides cyanogénétiques (Ikediobi et Onyike 1982). Par ailleurs, il a été observé par les mêmes auteurs, que l'ajout de linamarase exogène durant la fermentation permettait de réduire la toxicité des aliments et enfin, il a déjà été mis en évidence que certains microorganismes (levures, bactéries, champignons) étaient capables de dégrader la linamarine (Ikediobi et Onyike 1982 ; Okafor et Ejiofor 1986, 1990). La linamarase est une β -glucosidase qui a son optimum d'activité à pH 5,5 – 6 et qui est détruite à 72°C (Bourdoux *et al.*, 1980). Des travaux récents ont montré que les souches *W. paramesenteroides* LC18, LC11 isolées au cours de la fermentation du manioc exprimaient une activité β -glucosidase (Kostinek *et al.*, 2007). Ainsi, l'inoculation du manioc avec une souche de *Weissella*, possédant une activité linamarase, devrait permettre d'améliorer les performances d'hydrolyse de la linamarine et de la lotaustraline durant la fermentation et diminuer ainsi la toxicité des aliments obtenus.

6.2 Activité antimicrobienne

La production d'acides lactique et acétique par les bactéries du genre *Weissella* (hétéro-fermentaires strictes) entraîne une réduction notable du pH (< 4.2) et constitue un facteur important d'innocuité et de stabilité de l'aliment (Caplice et Fitzgerald 1999). Sous leur forme dissociée, ces acides organiques traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel de membrane annulé (Cabo *et al.*, 2002). Ainsi, l'accumulation d'acides organiques est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire. D'autre part, en condition acide, la compétitivité des bactéries lactiques se trouve améliorée, étant donné leur plus grande tolérance aux bas pH extra et intracellulaires. Les effets antimicrobiens dus à l'acidification du milieu revêtent donc une importance capitale dans le processus de conservation des aliments fermentés.

Plusieurs travaux ont aussi indiqué la production par les bactéries du genre *Weissella* d'autres métabolites qui auraient des caractères antimicrobiens : le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Holzapfel 1997 ; Paludan-Müller *et al.*, 2002 ; Kostinek *et al.*, 2007 ; Srimonni *et al.*, 2007). Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un puissant agent antimicrobien grâce à son effet bactéricide direct. Plusieurs études ont été menées sur les bactériocines produites par les bactéries lactiques. Par exemple, les bactériocines produites par les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* sont de petits peptides non modifiés, thermostables, appartenant à la classe IIa des bactériocines et capables d'inhiber en plus des bactéries lactiques, différentes bactéries à Gram positif, notamment des *Clostridium*, *Bacillus* ainsi que différentes souches de *Listeria monocytogenes* (Ennahar *et al.*, 2000). Il semblerait que l'activité bactéricide se produise au niveau de la membrane cellulaire (Schillinger et Holzapfel 1990). Malheureusement, la caractérisation des bactériocines des *Weissella* demeure encore rare ou incomplète. Srimonni et collaborateurs (2007) viennent de mettre en évidence chez la souche *W. cibaria* 110 isolée du 'plaa-som' de Thaïlande, la production de la weissellicin 110, peptide de faible poids moléculaire (3.5 Da), thermostable et qui contient 27 acides aminés dans sa séquence N-terminale. La weissellicin 110 n'a aucune similarité avec les autres bactériocines connues, inhibe les bactéries lactiques d'espèces proches mais n'a aucun effet contre *L. monocytogenes*. Il est à noter cependant, qu'il existe très peu d'applications développées des bactériocines dans l'alimentation humaine.

6.3 Production de composés aromatiques

Les composés volatils tels que l'acétate, l'éthanol, le diacétyl et l'acétaldéhyde contribuent à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques de certains produits fermentés (kéfir, yaourt, beurre). Le dioxyde de carbone contribue à l'élaboration de la texture lisse du babeurre. Tous ces composés sont des produits issus de l'utilisation des hydrates de carbone et du citrate par les bactéries lactiques hétéro-fermentaires (Vedamuthu 1994). Des travaux récents ont montré que les souches *W. paramesenteroides* LC18, LC11 isolées au cours de la fermentation du manioc possédaient une faible activité lipolytique (activités phosphatase alcaline, estérase, estérase lipase et lipase), et n'exprimaient aucune activité protéase (activités trypsine et α -chymotrypsine) (Kostinek *et al.*, 2007). Cependant, ces mêmes souches exprimaient de fortes activités peptidases telles que : les activités leucine arylamidase, valine arylamidase et cystéine arylamidase. Des starters de bactéries lactiques possédant une faible

activité protéinase et une forte activité peptidase contribuent à réduire l'amertume du lait et à améliorer sa texture (Arora *et al.*, 1990).

6.4 Production de polysaccharides

Les bactéries lactiques élaborent et excrètent dans le milieu de culture des polysaccharides tels que les dextranes (exopolysaccharides). Le dextrane est un homopolysaccharide qui est produit traditionnellement par croissance des bactéries du genre *Leuconostoc* en présence d'un donneur, le saccharose, et d'un accepteur approprié (qui contient des résidus α -D-glucosyle). D'autres bactéries lactiques appartenant aux genres *Weissella*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* peuvent aussi produire des dextranes (Cerning 1994). Récemment, les structures des dextranes produites par *W. confusa* E392 ont été comparées à celles produites par *Leuc. citreum* E.492 et *Leuc. mesenteroides* B512F. La souche *W. confusa* E392 montrait une meilleure croissance et une meilleure production de dextranes que les deux autres souches (Maina *et al.*, 2008). Les dextranes produites par *W. confusa* E392 comportaient moins de résidus α -D-glucosyle que celles produites par les deux autres souches. Les dextranes produites par les bactéries lactiques utilisées dans la fabrication de divers laits fermentés jouent un rôle essentiel dans le comportement rhéologique et la texture de ces produits laitiers.

7. Production et conservation

Actuellement, Les bactéries lactiques du genre *Weissella* sont produites de façon commerciale, sous une forme concentrée, congelée ou lyophilisée. L'activité biologique des bactéries lactiques commercialisées est fortement dépendante de la température de stockage : plus la température est basse, meilleure est la conservation et plus longue est la durée de vie de la suspension bactérienne. Ainsi sous la forme congelée elles sont conservées, à une température inférieure ou égale à -40°C alors que, sous la forme lyophilisée, une conservation à une température de stockage de 4°C est couramment appliqué. La production de suspensions bactériennes lyophilisées constitue donc une alternative intéressante à la production de suspensions bactériennes congelées puisqu'elle implique une température de conservation plus élevée, donc moins coûteuse. De plus, les volumes de produit distribué sont beaucoup plus faibles, ce qui génère des économies au niveau du transport. Pratiquement, le mode habituel de production et de conservation des bactéries lactiques concentrées lyophilisées comporte trois étapes : (i) une étape de fermentation permettant la multiplication des bactéries

dans un milieu de culture, (ii) la concentration des bactéries multipliées à l'étape (i) et (iii) la lyophilisation.

7.1 La fermentation

Elle est réalisée en culture discontinue et à une température régulée. Le pH est régulé, par addition de neutralisant, à une valeur généralement comprise entre 5,5 et 7,0, selon l'espèce considérée. Lorsqu'un niveau élevé de population bactérienne est atteint (de 10^9 à 10^{10} cellules par mL), le milieu de culture est refroidi à une température comprise entre 4°C et 15°C, afin de ralentir les activités métaboliques.

7.2 La concentration

La biomasse obtenue à la fin de la fermentation est ensuite concentrée par centrifugation ou par filtration tangentielle. Cette étape de la procédure permet de séparer partiellement les cellules du milieu de culture, également appelé milieu fermenté ou surnageant de fin de culture. Les cellules concentrées sont reprises dans un milieu de conditionnement adapté servant à protéger les bactéries contre les effets dommageables des traitements de conservation ultérieurs. Ce milieu de protection est appelé milieu de cryoprotection. Il est composé d'une partie du milieu fermenté, qui n'est pas totalement éliminé par la centrifugation, et de molécules de protection qui permettent une meilleure préservation de la viabilité cellulaire. Les molécules de protection citées dans la littérature sont nombreuses ; il s'agit de mono- ou de disaccharides, de polymères, de polyols, d'acides organiques ou de leurs sels, d'acides aminés ou de leurs sels, de protéines et de vitamines (Champagne *et al.*, 1991).

7.3 La lyophilisation

Elle se définit comme une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans un produit. Elle occupe cependant une place originale au regard des techniques de déshydratation puisqu'elle permet d'obtenir des suspensions bactériennes concentrées de haute qualité dont la viabilité et l'activité sont en général bien conservées sur de longues périodes. La transition de la suspension bactérienne de l'état congelé à l'état déshydraté, en l'absence d'une forte proportion d'eau, réduit les possibilités de développement des réactions d'altérations. Un

autre avantage technologique majeur de la lyophilisation repose sur la capacité de la suspension bactérienne lyophilisée à se réhydrater instantanément. La technique de lyophilisation fait appel à deux opérations qui jouent un rôle d'égale importance : la congélation et la sublimation. La congélation a non seulement pour objet de préserver les propriétés et la fraîcheur de la suspension bactérienne traitée et d'éviter son altération chimique, mais intervient également lors de l'étape de sublimation. En effet, la congélation entraîne la formation de cristaux de glace dont la sublimation communique au produit une structure poreuse qui facilite la réhydratation. La forme et les dimensions des cristaux de glace affectent la vitesse de séchage et par la suite le coût de l'opération. La couche poreuse qui se forme à la surface du produit en cours de dessiccation agit comme une barrière à la pénétration vers l'intérieur de la chaleur, en même temps qu'à l'évacuation de la vapeur d'eau ; cette résistance est particulièrement marquée lorsque les pores sont très fins, résultant de la formation de très petits cristaux de glace. D'autre part, la forme et les dimensions des cristaux de glace influencent la texture de la suspension bactérienne déshydratée. Par ailleurs, la formation de cristaux de glace au cours de la congélation ou la facilité de réhydratation des suspensions cellulaires lyophilisées pourrait, respectivement, entraîner des changements dans la perméabilité cellulaire des souches lyophilisées au cours de la réhydratation ou les rendre particulièrement sensibles aux phénomènes d'oxydation au cours de leur stockage (Brennan *et al.*, 1986 ; Simatos *et al.* 1994).

8. Exemples d'utilisations

Les perspectives d'utilisation des bactéries lactiques du genre *Weissella* comme source de probiotiques sont immenses en raison de leur innocuité et de leur bonne adhésion à la muqueuse intestinale ainsi que leur bonne stabilité en milieu acide. Récemment, une rapide baisse de la teneur en isoflavones glycosilées ainsi qu'une augmentation de l'activité β -glucosidase et de la teneur en isoflavones aglycones, ont été observées après l'inoculation du lait de soja avec une culture mixte de *Streptococcus infantarius* 12 et *Weissella* sp. 4 (Chun *et al.*, 2008). L'utilisation du lait de soja fermenté ainsi obtenu pourrait permettre une réduction des risques de ménopause, de cancer du sein, d'accidents vasculaires et d'ostéoporose. Des études ont démontré la possibilité d'utilisation de souches de *W. cibaria*, isolées de la salive des enfants, comme probiotique dans la cavité buccale de l'homme (Kang *et al.*, 2006). Les résultats ont démontré que ces souches pouvaient inhiber, aussi bien in vivo qu'in vitro, la production de composés soufrés volatiles responsables de la mauvaise haleine.

De récentes utilisations de souches de *Weissella* comme cultures starters dans la production des aliments ont été rapportées. Les propriétés mécaniques de pâtes à pizza ont été évaluées, avant et après leurs inoculations avec un starter de micro-organismes à activités protéolytiques (*L. sakei* T56, *W. paramesenteroides* A51, *Candida krusei* G271) ou non-protéolytiques (*L. sakei* T58, *W. paramesenteroides* A58, *Saccharomyces cerevisiae* T22) (Pepe *et al.*, 2003). Une meilleure viscoélasticité et une meilleure fermeté ont été obtenues avec le starter de micro-organismes à activités protéolytiques. Des souches de *W. cibaria*, productrices d'exopolysaccharides ont été utilisées, en monoculture ou en cultures mixtes, comme starters au cours de la production de pains (Zotta *et al.*, 2008 ; Schawb *et al.*, 2008). Leur utilisation comme source de prébiotiques, lors de la production de pains sans gluten, pourrait être envisagée.

9. Conclusion

Les bactéries lactiques du genre *Weissella* ont un rôle d'épuration microbienne en raison de la production d'acides lactique et acétique, de peroxyde d'hydrogène, ainsi que par la synthèse de bactériocines. Elles permettent aussi l'amélioration de la qualité organoleptique, nutritionnelle ainsi que la texture des aliments à travers la synthèse ou la dégradation de composés. Toutes ces propriétés favorisent leurs utilisations récentes comme cultures starters dans la production des aliments.

Références

- Arora G., Lee, B.H., Lamoureux M. 1990. Characterisation of enzyme profiles of *Lactobacillus casei* species by rapid APIZYM system. J. Dairy Sci. 73: 264-273.
- Barrow G. I., Feltham R.K.A. 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge, Cambridge University Press.
- Björkroth K.J., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel W.H., Korkeala H.J., Vandamme P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 141-148.
- Bourdoux P., Manita M., Hanson A., Ermans A.M. 1980. Cassava toxicity: the role of linamarin. In Role of Cassava in the Etiology of endemic goitre and cretinism. Ermans A.M., Mbulamoko, N.M., Delange F., Ahluwalia, R.(eds) Ottawa, Canada, IDRC: 133-152.
- Brennan M., Wanismail B., Ray B. 1986. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Prot. 49: 47-53.

- Cabo M.L., Braber A.F., Koenraad P.M. 2002. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. J. Food Prot. 65: 1309-1316.
- Camu N., De Winter T., Verbrugghe K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J.S., Vancanneyt M., De Vuyst L. 2007. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. Appl. Env. Microbiol. 73: 1809-1824.
- Caplice E., Fitzgerald G. F. 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol. 50: 131-149.
- Cerning J. 1994. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques. de Roissart H., Luquet F.M. (Eds.). Paris, France, Loriga. 1: 309-327.
- Champagne C., Gardner E., Brochu E., Beaulieu Y. 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. Can. Inst. Sci. Technol. J. 24: 118-128.
- Chun J., Kim J.S., Kim J.H. 2008. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. Food Chem. 109: 278-284.
- Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S. 1993. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol 75: 595-603.
- Coulibaly I., Yao, A.A., Lognay G., Destain J., 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
- De Bruyne K., Camu N., Lefebvre K., De Vuyst L., Vandamme P. 2008. *Weissella ghanensis* sp nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2721-2725.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. 2000. Class Ila bacteriocins: Biosynthesis, structure, and activity. FEMS Microbiol. Rev. 24: 85-106.
- Ennahar S., Cai, Y. 2004. Genetic evidence that *Weissella kimchii* is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 463-465.
- Holzappel W.H., van Wyk, E.P. 1982. *Lactobacillus kandleri* sp. nov., a new species of the subgenus *Betabacterium* with glycine in the peptidoglycan. Zentbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. C3: 495-502.
- Holzappel W.H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. Food Control 8: 241-258.
- Ikedioji C.O., Onyike E. 1982. Linanlarase activity and detoxification of cassava (*Manihot esculenta*) during fermentation for gari production. Agric. Biol. Chem. 46: 1667- 1669.

- Kandler O., Schillinger U., Weiss N. 1983. *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom. rev. Syst. Appl. Microbiol. 4: 280-285.
- Kang M.-S., Kim B.-G.; Chung J., Lee Y. C., Oh J.S. 2006. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. J. Clin. Periodontol. 33: 226-232.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A. P. 2005. 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. 28: 527-540.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A. P., Hozapfel W. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. Int. J. Food Microbiol. 114: 342-351.
- Lee J.S., Lee K.C., Ahn J.S., Mheen T.I., Pyun Y.R., Park Y.H. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1257-1261.
- Lei V., Jakobsen M. 2004. Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. J. Appl. Microbiol. 96: 384-397.
- Limonet M., Cailliez-Grimal C., Linder M. 2004. Cell envelope analysis of insensitive, susceptible or resistant strains of *Leuconostoc* and *Weissella* genus to *Leuconostoc mesenteroides* FRN52 bacteriocins." FEMS Microbiol. Lett. 241: 49-55.
- Maina N.H., Tenkanen M., Maaheimo H., Juvonen, R., Virkki L. 2008. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. Carbohydr. Res. 343: 1446-1455.
- Martinez-Murcia A., Collins M.D. 1990. A phylogenic analysis of the genus *leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. 70: 73-84.
- Martinez-Murcia A. J., Haldand N.M., Collins M.D. 1993. Phylogenetic analysis of some *leuconostocs* and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. J. Appl. Bacteriol. 74: 532-541.
- Matharaa J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Holzapfel W.H. 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. Int. J. Food Microbiol. 94: 269– 278.
- Milbourne K. 1983. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. Meat Sci. 9: 113-119.
- Milliere J.B., Mathot A.G., Schmitt P., Divies C. 1989. Phenotypic characterisation of *Leuconostoc* species. J. Appl. Bacteriol 67: 529-542.
- Mortazavi A., Ghandi A., Barouei J., Moussavi M., 2007. Diversity of lactic acid bacteria isolated from kurdish ewe's milk cheese. Aust. J. Dairy Technol. 62: 185-190.

- Nawar W. W. 1996. Lipids. Food chemistry. R. Fennema Owen (Eds). New york, Marcel Dekker, Inc. 1: 225-319.
- Okafor N., Ejiofor M.A.N. 1985. The linamarase of *Leuconostoc mesenteroides*: Production, isolation and some properties. J. Sci. Food Agric. 36: 669-678.
- Okafor N., Ejiofor A.O. 1986. The microbial breakdown of linamarin in fermenting pulp of cassava (*Manihot esculenta* Crantz. MIRCEN J. 2: 327-338.
- Okafor N., Ejiofor A.O. 1990. Rapid detoxification of cassava mash by a yeast simultaneously producing linamarase and amylase. Process Biochem. Int. 25: 82-86.
- Olano A., Chua J., Schroeder S., Minari A., La Salvia M., Hall G. 2001. *Weissella confusa* (basionym: *Lactobacillus confusus*) bacteria: a case report. J. Clin. Microbiol. 39: 1604- 1607.
- Ouadghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P., Naser S., Gevers D., Lefebvre K., Swings J., Amar M. 2008. Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'Iben'. J. Appl. Microbiol. 106: 486 - 495.
- Paludan-Müller C., Madsen M., Sophanodora P., Gram L., Moller P.L. 2002. Fermentation and microflora of plaasom, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. Int. J. Food Microbiol. 73: 61-70.
- Pepe O., Villani F., Oliviero D., Greco T., Coppola S. 2003. Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough. Int. J. Food Microbiol. 84: 319-326.
- Samelis J., Rementzis J., Tsalalidou E., Metaxopoulos J. 1998. Usefulness of rapid GC analysis of cellular fatty acids for distinguishing *Weissella viridescens*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* and some non-identifiable, arginine *Weissella* strains of meat origin. Syst. Appl. Microbiol. 21: 260-265.
- Samelis J., Kakouri A., Rementzis J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 degrees C. Food Microbiol. 17: 329-340.
- Schillinger U., Holzapfel W.H. 1990. Antibacterial activity of Carnobacteria. Food Microbiol. 7: 305-310.
- Schwab C., Mastrangelo M., Corsetti A., Ganzle M. 2008. Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. Cereal Chem. 85: 679-684.
- Simatos D.L.M., Blond G., Morice M. 1994. Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation. In : Lorica, H. de Roissart et F. M. Luquet (eds.). Bactéries lactiques. Lorica, 555-571.
- Srionnual S., Yanagida F., Lin L.-H., Hsiao K.-N., Chen Y.-S. 2007. Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. Appl. Env. Microbiol 73: 2247-2250.

- Tanasupawat S., Shida O., Okada S., Komagata K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1479-1485.
- Vedamuthu E. R. 1994. The Dairy Leuconostoc: Use in Dairy Products. *J. Dairy Sci.* 77: 2125- 2131.
- Vieira-Dalodé G., Jespersen L., Hounhouigan J., P Moller P.L., Nago C.M., Jakobsen M. 2007. Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé production from sorghum in Bénin. *J. Appl. Microbiol.* 103: 342-349.
- Yeagle P. 1993. Functions of cell membrane. *The membranes of cells.* Yeagle P. (2nd ed). London, Academic Limited Press: 3-11.
- Zotta T., Piraino P., Parente E., Salzano G., Riccardi A. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for Corsetto, a traditionnal bread produced in Basilicata. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1785-1795.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les bactéries lactiques constituent l'un des plus importants groupes de micro-organismes impliqués dans la transformation des aliments, principalement en raison de leurs rôles établis dans le développement de la saveur et la préservation des aliments. En Afrique, la plupart des aliments traditionnels amylacés sont fermentés avant leur consommation et il a été largement démontré que les bactéries lactiques représentaient la flore microbienne la plus importante impliquée dans cette étape. Parmi ceux-ci, le 'gari', une semoule de manioc (*Manihot esculenta*, Crantz) fermentée et déshydratée, constitue le principal aliment de base des populations de l'Afrique de l'Ouest. La popularité de ce produit dans les villes urbaines Ouest-Africaines a été associée à son faible coût, sa longue durée de conservation ainsi que sa facilité de stockage et de préparation. Cependant, la fermentation du manioc pour la production de 'gari' se fait encore de façon spontanée et à l'échelle familiale. Le résultat de tout ceci, entre autres, est généralement associé à un produit fini de qualité hygiénique non satisfaisante et variable. Ainsi, de nombreux efforts ont été entrepris dans le but d'isoler et sélectionner des bactéries lactiques ayant les caractéristiques technologiques désirées en vue de leur utilisation comme starter au cours de la fermentation du manioc pour la production de 'gari'. L'utilisation d'une culture starter de bactéries lactiques pourrait contribuer à une standardisation du procédé de production ainsi qu'à l'obtention d'un 'gari' sain et de qualité organoleptique constante. Par ailleurs, la préparation des cultures starters représente une opération délicate et coûteuse pour les unités de production Ouest-Africaines de 'gari'. En effet, elle constitue une charge importante en investissements (laboratoires, cuves de fermentation) et en main d'œuvre spécialisée. L'utilisation des cultures starters déshydratées, directement dans la pulpe de manioc pourrait être envisagée et constituerait une alternative d'une grande commodité d'emploi. Ce travail s'inscrit dans le cadre de la sélection d'un starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la fermentation du manioc en vue de la production de 'gari'.

Dans ce contexte, 139 souches de bactéries ont été précédemment isolées au cours de la fermentation du manioc en Afrique du Sud, en Allemagne, au Bénin ainsi qu'au Kenya (Kostinek *et al.*, 2005). Les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc fallax* et *L. fermentum* représentaient la majeure partie de la flore lactique. Les résultats de cette étude ont également indiqué la présence des espèces *L. brevis*, *Leuc. pseudomesenteroides* et *Weissella paramesenteroides* au cours de la fermentation. Parmi ces souches, 8 *L. plantarum*, 3 *L. pentosus*, 2 *W. paramesenteroides*, 2 *L. fermentum* et 1 *Leuc. mesenteroides* ssp.

mesenteroides ont finalement été sélectionnées pour la production d'un starter pour le 'gari' sur la base de leurs propriétés biochimiques (Kostinek *et al.*, 2007). Toutes ces souches montraient une acidification rapide et pouvaient produire des bactériocines et/ou du peroxyde d'hydrogène. Tandis qu'aucune activité α -amylase n'était détectée, la plupart des souches exprimaient une forte activité β -glucosidase. Seules quelques-unes parmi elles exprimaient une activité tannase. En général, les souches du genre *Leuconostoc* ou *Weissella* étaient capables d'utiliser le stachyose et le raffinose contrairement aux autres souches.

La première partie de notre étude consistera en l'évaluation de la technique de lyophilisation comme méthode de déshydratation pour la production d'un starter de bactéries lactiques pour la fermentation du manioc en vue de la production de 'gari'. Une première sélection des 16 souches de bactéries lactiques reçues, sera opérée sur la base de leur taux de survie après un test accéléré de déshydratation et celui obtenu à la fin de la lyophilisation ainsi que leur capacité à utiliser une source de carbone (pouvoir d'acidification) après la lyophilisation (**article 2**). Une deuxième sélection sera opérée sur la base de leur stabilité au cours du stockage sous la forme lyophilisée (**article 3**).

La stabilité des starters de bactéries lactiques au cours de leur stockage sous la forme déshydratée est un facteur très important pour leur usage industriel (Thonart *et al.*, 1989). De ce fait la technique de déshydratation utilisée doit être à même de garantir une bonne stabilité des cultures dans le temps en termes de viabilité et d'activité fonctionnelle. La lyophilisation a été couramment utilisée à cette fin, mais cette technique entraîne des effets secondaires indésirables, tels que la perte de viabilité cellulaire et d'activité au cours du stockage. Dans la seconde partie de notre étude, nous analyserons certains mécanismes à l'origine de la perte de viabilité et du manque de stabilité au cours du stockage des souches lyophilisées. Il avait été suggéré que la perte de viabilité au cours du stockage des bactéries lyophilisées était due à l'oxydation des lipides membranaires. Nous essayerons d'approfondir nos connaissances sur les phénomènes d'oxydation des lipides membranaires au cours du stockage des bactéries lyophilisées. Cette étude sera menée sur l'une des souches sélectionnées dans la première partie de notre étude. Pour ce faire, nous étudierons l'influence des conditions de stockage sur la viabilité (survie, activité d'acidification) et les lipides membranaires d'une souche lyophilisée pendant 90 jours, afin de pouvoir établir une possible relation entre l'oxydation des lipides et la perte de viabilité cellulaire (**article 4**). Au cours de la même période de stockage, l'impact de composés protecteurs tels que les cryoprotecteurs et/ou des antioxydants sur la viabilité de la souche lyophilisée sera évalué, dans le but de pouvoir établir ou confirmer une possible relation entre l'oxydation des lipides et la perte de viabilité cellulaire

d'une part, et entre l'oxydation des lipides et la perte de l'intégrité cellulaire d'autre part (**article 5**). Enfin, nous analyserons les changements dans la perméabilité membranaire de la même souche, quelques heures après la lyophilisation, dans le souci de trouver une explication à la perte de viabilité de la souche lyophilisée durant les premières heures du stockage (**article 6**).

Références

- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. 2005. 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.* 28: 527-540.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A., Hozapfel W.H. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 342-351.
- Thonart P., Destain J., Rikir R., Sandron P. 1989. La Biotechnologie : un outil pour l'agro-alimentaire. *Nouvelles Sci. Technol.* 7: 31-42.

EXPERIMENTATION ET PRESENTATION DES RESULTATS

Article 2

OBJECTIF

16 souches de bactéries lactiques, 8 *Lactobacillus plantarum*, 3 *L. pentosus*, 2 *Weissella paramesenteroides*, 2 *L. fermentum* et 1 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ont été précédemment isolées et sélectionnées pour la production d'un starter pour le 'gari' sur base de leurs propriétés biochimiques (Kostinek *et al.*, 2005, 2007). Toutes ces souches ont montré une acidification rapide du milieu de culture, une forte activité β -glucosidase et étaient capables d'utiliser le raffinose. Certaines parmi elles pouvaient produire des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène, montraient une activité tannase et pouvaient utiliser le stachyose. L'objectif dans ce travail sera d'évaluer la lyophilisation comme méthode de séchage pour l'élaboration d'un starter de bactéries lactiques en vue de la production de 'gari'. La présente étude constitue la première étape de la sélection et consistera en l'évaluation de la capacité des 16 souches de bactéries lactiques à résister à la lyophilisation. Trois critères de sélection ont été définis : (i) la capacité à survivre après un test de déshydratation dans une solution de glycérol de concentration croissante suivi d'un marquage par des marqueurs fluorescents, (ii) un taux de survie et une concentration cellulaire élevés après la lyophilisation, (iii) la capacité et la vitesse d'utilisation d'une source de carbone (pouvoir d'acidification) par la souche lyophilisée.

Références

- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. 2005. 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. 28: 527-540.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A., Holzapfel W.H. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. Int. J. Food Microbiol. 114: 342-351.

Article 2

Production of freeze-died lactic acid bacteria starter culture for cassava fermentation into *gari*

Amenan A. Yao ¹, Carine Dortu ², Moutairou Egounlety ³, Cristina Pinto ⁴, Vinodh A. Edward ⁴, Melanie Huch (née Kostinek) ⁵, Charles M.A.P. Franz ⁵, Willhelm Holzapfel ⁵, Samuel Mbugua ⁶, Moses Mengu ⁷, Philippe Thonart ^{1,2}.

¹ Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, B-4000 Liège, Belgium.

² Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium

³ University of Bénin, Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin

⁴ Council for Scientific and Industrial Research, CSIR Biosciences, Meiring Naude Road, Brummeria, 0184 Pretoria, South Africa

⁵ Max Rubner Institute for Nutrition, Haid-und-Neu-Strasse 9, D-76131 Karlsruhe, Germany

⁶ University of Nairobi, University Way, Ghandhi Building 2, Nairobi, Kenya

⁷ Botswana Technology Center, 10062 Machel Drive, Gaborone, Botswana

Afr. J. Biotechnol., Accepté

Production of freeze-died lactic acid bacteria starter culture for cassava fermentation into *gari*

Abstract

Sixteen lactic acid bacteria, eight *Lactobacillus plantarum*, three *L. pentosus*, 2 *Weissella paramesenteroides*, two *L. fermentum* and one *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* were previously isolated from cassava fermentation and selected on the basis of their biochemical properties with a view to selecting appropriate starter cultures during cassava fermentation for *gari* production. In this study, the potential of these pre-selected strains as suitable freeze-dried cultures was evaluated. Their ability to tolerate the freeze-drying process was assessed by dehydration in a glycerol solution of increasing concentration, followed by staining with two fluorescent markers: rhodamine 123 and propyidium iodide. Twelve strains that recovered more than 50% of their population value after visualisation on an epi-fluorescent microscope were produced in a bioreactor and freeze-dried. The technological characteristics identified after the freeze-drying process, were a high cell concentration or high survival rate. The ability of the freeze-dried strains to recover their acidification activity was evaluated through the determination of the pH, titratable acidity (% lactic acid/g Dry Weight) and cell count over 24 h on MRS broth. Ultimately, the strains *L. plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 and *W. paramesenteroides* LC11 were selected to be developed as freeze-dried starter cultures for *gari* production.

Keywords: freeze-drying, *gari*, lactic acid bacteria, fermentation, starter culture, cassava, developing countries, fermented food

INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important food crop for millions of people in developing countries. In West Africa, it is traditionally processed into a range of products with various local names. One of the most popular foods derived from fermented cassava is *gari*, consumed by nearly 200 million people in West Africa (Okafor and Ejiofor, 1990). Its cheapness, longer shelf-life, lower bulk (compared with other cassava products) and ease of preparation for consumption account for its increasing popularity in the urban areas. The traditional production of *gari* includes: peeling, grating, fermentation at ambient temperature and pressing, sieving and roasting ('garification'). It is now fairly well accepted that the flavour, quality, hygiene and safety of *gari* result from the fermentative activities of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts during the fermentation stage. Various investigations on the microbiology of cassava fermentation for *gari* production have been done. The dominant LAB belongs to *Lactobacillus plantarum* (the most predominant species), *Lactobacillus fermentum* and *Leuconostoc/Weissella* (Kostinek et al., 2005; Oguntoyinbo, 2007; Okafor, 1977). Unfortunately, most of West Africa's fermented foods and beverages, including *gari*, are produced at household level or on a small industrial scale and therefore tend to be of varying quality and stability. Thus, the use of a preparation containing a large number of variable microorganisms is recommended, as this would lead to a rapid acidification of the product and inhibit the growth of spoilage and pathogenic bacteria (Holzapfel, 2002), as well as to a product with consistent quality.

The industrial use of LAB starter cultures in the food industry depends on the concentration and preservation technologies used, which are required to guarantee the long-term delivery of stable cultures in terms of viability and functional activity (Carvalho et al., 2002). The freeze-drying process has commonly been used for this purpose. The dehydration of LAB imposes environmental stress on the bacterial cells, such as freezing, drying, long-term exposure to low-water activities and rehydration. Microbial survival during this process depends on many factors, including the intrinsic resistance traits of the strains, initial concentration of microorganisms, growth conditions, drying medium and protective agents, freezing rate, storage conditions (temperature, atmosphere, relative humidity) and rehydration conditions (Andersen et al., 1999; Carvalho et al., 2002; Desmons et al., 1998; Morgan et al., 2006). To date, relatively few LAB have been isolated from starchy fermented foods in Africa and used as starter cultures. Guiraud et al. (1998), Guiraud and Raimbault (1993) and Kimaryo et al. (2000) mentioned the use of the amylolytic *L. plantarum* as a starter culture during cassava fermentation for *gari* and *kivunde*, respectively. Okafor et al. (1998)

inoculated *L. coryneformis* and *Saccharomyces* sp. as a starter culture in cassava mash for *gari* production. The survival of these microorganisms was studied when placed alone or mixed in different carriers (Okafor, 1999). As for *gari*, while the occurrence of the LAB starter culture was frequently reported, no detailed information was available on their production in the dried state.

Previously, eight *L. plantarum*, three *L. pentosus*, two *W. paramesenteroides*, two *L. fermentum* and one *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* strains had been isolated during cassava fermentation and they were then pre-selected as starter cultures for *gari* production on the basis of suitable technological characteristics (production of α -amylase, β -glucosidase, tannase, antimicrobials, and fermentation of raffinose and/or stachyose) and their ability to ferment cassava (based on the acidification rate during cassava fermentation) (Kostinek et al., 2007). The aim of this study was to evaluate the potential of these pre-selected strains for use as suitable freeze-dried starter cultures during cassava fermentation for *gari* production. For this purpose, the ability of the 16 strains to tolerate the freeze-drying process was first assessed by dehydration in a glycerol solution of increasing concentration, followed by staining with fluorescent markers. The ability of the surviving strains (more than 50% survival rate) to provide a freeze-dried powder with a high cell concentration (survival rate) and to grow on MRS broth after dehydration (rapid acidification, high growth) was evaluated. This study formed part of an EU project aimed at improving the quality and nutritional value of *gari* through the use of starter cultures and fortification with soybean and coconut milk.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and preparation of the seed bank

The LAB *L. plantarum* G2/11, G2/25, G3/29, VE20, VE36, VE65b, VE82 and Lb50, *L. pentosus* G5/18, Lb61 and Lb68, *W. paramesenteroides* LC11 and LC18, *L. fermentum* G2/10 and G3/5, and *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* KMROG2 used in this study were provided by the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology (Karlsruhe, Germany). Each strain was inoculated in MRS broth and incubated at 30°C for 18 h. The cells obtained after centrifugation (2500×g, 20 min) were maintained in 50% (v/v) glycerol and frozen at -80°C.

Assessment of ability to tolerate dehydration using the fluorescence technique

The ability of the strains to tolerate the freeze-drying process was assessed by counting dead and viable cells under an epi-fluorescent microscope after dehydration with a glycerol solution of increasing concentration and staining with fluorescent markers. Two fluorescent dead/live markers, 1.25 mM rhodamine 123 and 1.25 mM propidium iodide, were used to stain cells, following the method described by Sow and Thonart (2003). Some 50 µl of each seed bank was inoculated in 150 ml MRS broth and incubated at 30°C for 17 h. The cell pellets obtained after centrifugation (2500×*g*, 20 min) were re-suspended in 1 ml peptone salt water (final concentration 10⁹ cfu/ml) and dehydrated in a graded glycerol solution as described here; 1 ml of 90% (w/w) glycerol was added to the cell suspension, homogenised and allowed to stand for 15 min at room temperature. The same procedure was repeated four times and the cell suspension obtained was concentrated by centrifugation at 3500×*g* for 3 min. Cell suspension without glycerol was used as the control. Epi-fluorescence examination was made after staining 50 µl of the obtained cell suspension with 5 µl of each marker for 5 min in the dark. After centrifugation at 3500×*g* for 30 s, cell suspensions were observed twice and re-suspended in 100 µl or 200 µl of peptone salt water for dehydrated cells or the control, respectively. Counts and visualisation were carried out using a transmitted light microscope (Axioscop2.mot, ZEISS) equipped with an epi-fluorescent system that had a HAL 100 halogen illuminator for transmitted-light illumination. The exciting filter was set at 560 nm and 480 nm, and the barrier filter at 631 nm and 527 nm, for propidium iodide and rhodamine 123, respectively. Dehydration and staining were performed in duplicate for each strain. The number of dead or viable cells was calculated by counting cells at 100× magnification under the microscope during epi-fluorescence. Two readings were carried out for each sample and the average number of cells (dead and viable) was recorded.

Production and freeze-drying

Development of inocula

Flasks containing 300 ml MRS medium were inoculated from 50 µl of the seed bank. The flasks were incubated on a rotary shaker at 30°C and 75 rpm for 15 h. Flasks of 1 l containing MRS medium were inoculated from the inocula of 300 ml and incubated in a rotary shaker at 30°C and 75 rpm for 10h.

Fermentation in a 20 L bioreactor

A 20 l bioreactor (16 l effective volume) was inoculated from a flask of 1 L that had been previously prepared (see inocula section, above). Agitation was performed at a speed of 80 rpm to keep the fermentation broth homogeneous. The temperature and pH were set to 37°C or 30°C and 7.0 or 6.0 with 4N KOH for *L. plantarum* and *L. pentosus* strains or *W. paramesenteroides*, *L. fermentum* and *L. mesenteroides* strains, respectively. No control of oxygen concentration was performed during the fermentation. All fermentation was done in duplicate and the average values recorded.

Concentration, treatment and freeze-drying

The culture was stopped after 17 h during the early stationary stage, cooled down to 4°C by the circulation of cold water in the double jacket of the bioreactor and then concentrated 20 times by centrifugation (3000×g, 30 min). The cell suspension was supplemented with 2% (w/w) and 5% (w/w) maltodextrin as protective compounds. The 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 (30 h), followed by 15 h at 0.15 mbar. Freeze-dried powders were stored in aluminium foil packets which were vacuum-sealed and then stored at -20°C until further analysis.

Analytical methods

Dry cell weight and water activity determinations

The dry cell weights of the dried powders were determined at the end of freeze-drying after drying at 105°C until constant weight was achieved. The water activities (a_w) of the glycerol solution and dried samples after freeze-drying were measured with a Novasina (Novasina, Pfäffikon, Switzerland) water activity meter.

Survival

The viable counts were obtained using the plate count method after 48 h at 30°C with MRS-agar medium (pH 7.0 or 6.0 for *L. plantarum* and *L. pentosus* strains or *W. paramesenteroides*, *L. fermentum* and *L. mesenteroides* strains, respectively). The percentage survival after staining with the fluorescent dead/live markers (rhodamine 123 and propidium iodide) was calculated as follows: Survival (%) = $100 \times N_{Lf} / N_{Li}$, where N_{Li} is the proportion of viable cells after dehydration in a glycerol solution and N_{Lf} is the proportion of viable cells

before dehydration in a glycerol solution. The proportion of viable cells was determined by the ratio between green cells and green cells + red cells.

The percentage survival of the strains after the freeze-drying process was expressed as follows: Survival (%) = $N_0/N_c \times 100$, where N_0 is the CFU/g DW at the end of freeze-drying and N_c is the CFU/g DW before freeze-drying (at the end of centrifugation).

Acidification activity

Acidification was carried out at 30°C in 150 ml MRS broth (pH 7) inoculated with 1% of 10^7 cfu/g DW of the freeze-dried sample. The pH and total titratable acidity (% lactic acid/g DW) were determined in duplicate after 8, 16 and 24 h, using the AOAC method (1997). Some 10 ml of distilled water was homogenised with 10 ml of the inoculated broth, and the pH was measured. The titratable acidity was obtained by titration with 0.1 N NaOH, using 1% phenolphthalein as the indicator. Cell counts were obtained after 16 h culture using the plate count method.

Data analysis

The pH and titratable acidity after 16 h culture were expressed as change in pH (Δ pH) and titratable acidity (Δ LA) compared with those obtained immediately after freeze-drying. The production in the bioreactor was done in duplicate. Data were compared using Tukey's honestly significant difference (Statistica 8.0, StatSoft Inc., 2007). The level of significance was determined at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Assessment of desiccation tolerance of lactic acid bacteria

The ability of the 16 strains to tolerate the freeze-drying process was assessed by counting dead and viable cells under an epi-fluorescent microscope after dehydration in a glycerol solution of increasing concentration (from 1ml to 5ml) and staining with two fluorescent markers (rhodamine 123 and propyidium iodide). The a_w was measured after each addition of glycerol, respectively (Figure 1). An increase in glycerol concentration was associated with a decrease in the a_w from 0.8 to 0.3. The impact of the decrease in the a_w on the viability of the strains was studied after staining with the fluorescent markers and was compared with that of the control (cells without dehydration).

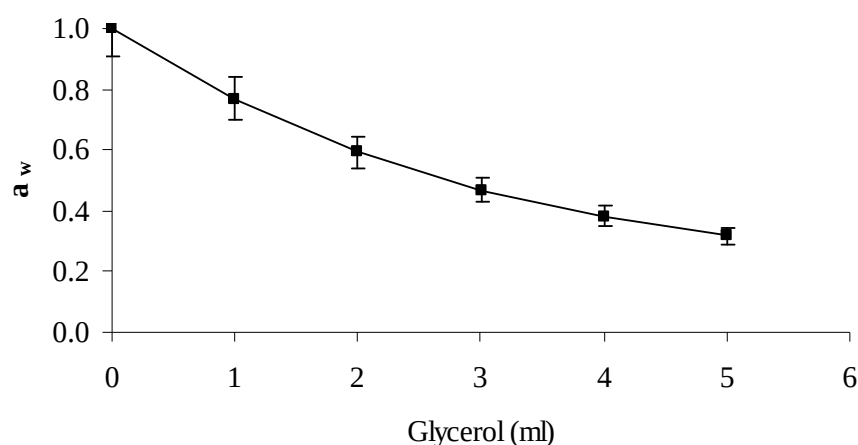


Figure 1. Interrelationships between the water activity (a_w) and glycerol concentration. Values are means $\pm$ standard deviation (SD, $n = 4$).

Figure 2 A, B, C shows the result of the visualisation under an epi-fluorescent microscope for *L. plantarum* VE36, *L. fermentum* G3/5 or *L. pentosus* G5/18. With the two fluorescent markers, living cells appeared green because they tended to accumulate the rhodamine 123 (positively charged) in the cytoplasm (negatively charged). It is now well established that a bacterial cell with an intact energy state is metabolically active, and therefore viable. The dead cells appeared red because their damaged cytoplasmic membrane left propidium iodide, which was fixed on the nucleic acids. Propidium iodide and rhodamine123 are most commonly used as indicators for cell death or cells with compromised membrane and cells with an intact membrane (i.e., membrane potential), respectively (Rault et al., 2008; Sow and Thonart, 2003). The change in the a_w in the environment of the bacteria had a significant effect on their viability, and this varied from one strain to another, as shown in Table 1. Most of the strains (12 out of 16) survived or recovered more than 50% of their population value, whereas four strains (*L. plantarum* G3/29, Lb50, *L. pentosus* G5/18, Lb68) had very low survival rates ($\leq 10\%$). In an earlier study, Poirier et al. (1997) used a progressive water activity decrease in a water-glycerol solution to test the mechanical resistance of the cell wall for *L. plantarum* and *Leuc. mesenteroides*. Sow and Thonart (2003) indicated a loss of viability of 40-100% for LAB after 7 days of dehydration in a water glycerol solution with an a_w of 0.17. As the freeze-drying process imposes an exposure to low-water activities on the

bacterial cells, we decided to select the strains with more than 50% survival for production in the bioreactor. The results obtained and reported here are only approximate, since the final a_w of the water glycerol solution in our study (0.3) was higher than that obtained generally for freeze-dried lactic acid powders (0.1 -0.2) (Cheftel and Cheftel, 1980). However, the dehydration technique, followed by staining with fluorescent markers, remains a fast method for screening and predicting the desiccation tolerance of LAB (Sow and Thonart, 2003).

Table 1. The survival after dehydration in a glycerol solution of increasing concentration and staining with the fluorescent markers ^a

Strains	Proportion of viable cells (N_L) ^b		Survival (%)
	before dehydration	After dehydration	
<i>L. plantarum</i> VE82	0.98 ± 0.03	0.50 ± 0.08	51.1 ± 8.9 a
<i>L. plantarum</i> VE 65b	0.99 ± 0.01	0.51 ± 0.08	51.2 ± 4.7 a
<i>L. plantarum</i> VE 20	1.00 ± 0.01	0.81 ± 0.08	81.0 ± 9.6 bc
<i>L. plantarum</i> VE 36	1.00 ± 0.05	0.71 ± 0.05	71.0 ± 5.5 c
<i>L. plantarum</i> G2/11	0.98 ± 0.01	0.80 ± 0.05	81.8 ± 6.2 cb
<i>L. plantarum</i> G2/25	0.97 ± 0.01	0.91 ± 0.05	93.1 ± 5.0 b
<i>L. plantarum</i> G3/29	0.98 ± 0.03	0.17 ± 0.07	17.1 ± 5.5 d
<i>L. plantarum</i> Lb50	1.00 ± 0.02	0.10 ± 0.04	10.2 ± 4.4 d
<i>L. pentosus</i> G5/18	0.98 ± 0.02	0.07 ± 0.02	6.7 ± 2.1 d
<i>L. pentosus</i> Lb61	0.99 ± 0.01	0.60 ± 0.05	60.3 ± 5.4 ac
<i>L. pentosus</i> Lb68	1.00 ± 0.02	0.14 ± 0.03	14.0 ± 3.5 d
<i>W. paramesenteroides</i> LC11	0.99 ± 0.02	0.72 ± 0.06	73.0 ± 6.7 c
<i>W. paramesenteroides</i> LC18	0.99 ± 0.01	0.70 ± 0.02	70.5 ± 3.0 c
<i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. mesentroides KMROG2	0.99 ± 0.01	0.50 ± 0.07	50.2 ± 7.5 a
<i>L. fermentum</i> G3/5	0.99 ± 0.02	0.54 ± 0.06	54.6 ± 6.6 a
<i>L. fermentum</i> G2/10	0.96 ± 0.02	0.78 ± 0.03	82.0 ± 3.9 c

Within the same column, means followed by different letters are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

^a rhodamine 123 and propyidium iodide

^b N_L represents the ratio between green cells and green cells + red cells. Green cells, cells with rhodamine 123 or viable cells; red cells, cells with propyidium iodide or damaged cells.

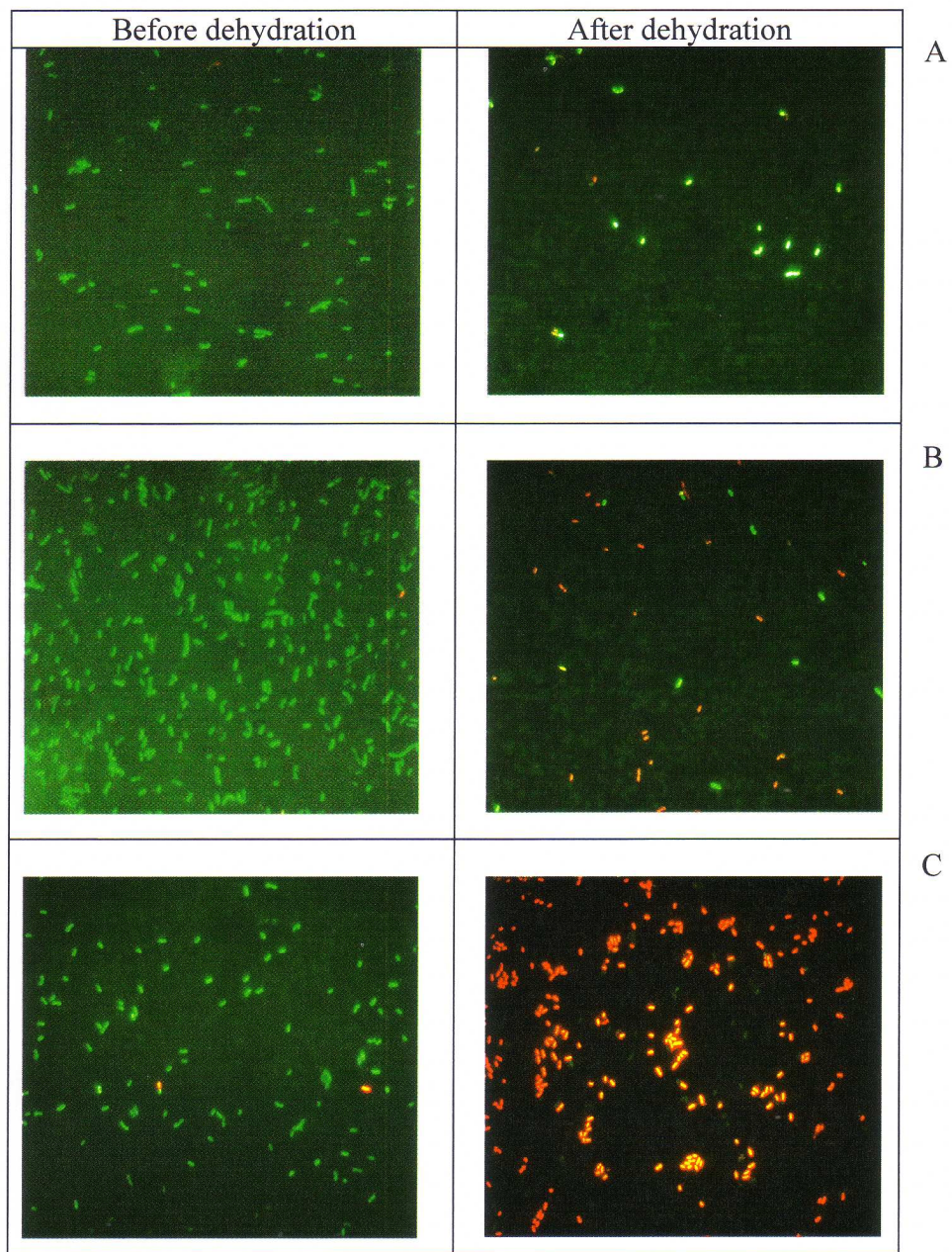


Figure 2. Epi-fluorescent microscope visualisation of *L. plantarum* VE36 (A), *L. fermentum* G3/5 (B) or *L. pentosus* G5/18 (C) before and after dehydration in a glycerol solution of increasing concentration, followed by staining with two fluorescent markers: rhodamine123 (green cells) and propyidium iodide (red cells).

Survival of lactic acid bacteria after freeze-drying

The 12 selected strains were produced in the bioreactor, concentrated 20 times by centrifugation, supplemented with cryoprotectants (5% maltodextrin, 2% glycerol) and freeze-dried. Table 2 shows the viable counts during the process and the survival after the freeze-drying process. Freeze-drying proved effective in achieving high viable cells ($> 10^9$). The preservation of microorganisms by freeze-drying has been mentioned in relation to preserving high cell suspension that contains more than 10^8 cells/ml (Miyamoto-Shinohara et al., 2000). Various survival rates were obtained immediately after the freeze-drying. *L. plantarum* and *L. pentosus* strains survived or recovered more than 32% of their population value, whereas *Leuconostoc*, *Weissella* and *L. fermentum* strains had a low biomass yield ($<16\%$). Our results accord with those reported by Vedamuthu (1994) who found that low survival rates after freeze-drying were obtained with *Leuconostoc* strains compared with *Lactococcus* or *Lactobacillus* strains in the same conditions. Freezing and drying from the frozen state caused a decrease in viability (Castro et al., 1997). This effect was less evident in the strains *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. pentosus* LB61, probably because of the elimination of the most sensitive part of the cell population during the freezing stage. At the end of freeze-drying, the rate of dry matter in the lyophilized powders was nearly 95% (Table 2), with an a_w of 0.1 (data not shown). Béal and Corrieu (1994) and Ishibashi et al. (1985) showed that the stability of dried LAB during storage was better in the 0.1-0.2 a_w zone, with a dry-matter rate of almost 96%. The strains *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. pentosus* Lb61 could constitute a starter culture, or are of interest in cassava fermentation because of their ability to provide a freeze-dried powder with a high cell concentration.

Acidification activity

To evaluate the ability of the freeze-dried strains to recover their acidification activity after dehydration, the pH and titratable acidity (% lactic acid/g DW) were measured and determined over 24 h on MRS broth, respectively. Figure 3 A, B, C shows the pH and titratable acidity for *L. plantarum* VE36, *W. paramesenteroides* LC11 and *L. pentosus* Lb61, respectively.

Table 2. Viable count during production, survival after freeze-drying and moisture content of the dried samples

Strains	Moisture content of the dried powder (%)	Cell count (cfu/g DW)		Survival (%)
		before freeze-drying	After freeze-drying	
<i>L. plantarum</i> VE82	4.3 ± 0.5 a	1.8 × 10 ¹²	6.7 × 10 ¹¹	37.2 ± 5.0 ac
<i>L. plantarum</i> VE 65b	5.1 ± 0.3 a	1.5 × 10 ¹¹	6.2 × 10 ¹⁰	41.3 ± 4.5 a
<i>L. plantarum</i> VE 20	5.0 ± 0.7 a	2.0 × 10 ¹²	9.2 × 10 ¹¹	46.8 ± 2.9 a
<i>L. plantarum</i> VE 36	5.6 ± 0.2 a	7.2 × 10 ¹¹	6.9 × 10 ¹¹	97.3 ± 7.2 b
<i>L. plantarum</i> G2/11	5.3 ± 0.7 a	1.7 × 10 ¹	7.6 × 10 ¹⁰	44.5 ± 1.9 a
<i>L. plantarum</i> G2/25	5.6 ± 0.1 a	8.1 × 10 ¹⁰	6.5 × 10 ¹⁰	79.9 ± 1.3 b
<i>L. pentosus</i> Lb61	5.5 ± 0.3 a	4.6 × 10 ¹⁰	3.5 × 10 ¹⁰	76.7 ± 6.5 b
<i>W. paramesenteroides</i> LC11	4.8 ± 0.2 a	2.6 × 10 ¹³	4.9 × 10 ¹²	18.0 ± 2.4 c
<i>W. paramesenteroides</i> LC18	5.3 ± 0.7 a	1.5 × 10 ¹³	2.1 × 10 ¹²	14.2 ± 3.9 c
<i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. mesentroides KMROG2	5.0 ± 0.7 a	1.4 × 10 ¹³	1.9 × 10 ¹²	13.9 ± 4.2 c
<i>L. fermentum</i> G3/5	4.2 ± 0.5 a	3.5 × 10 ¹⁰	3.8 × 10 ⁹	11.3 ± 1.6 c
<i>L. fermentum</i> G2/10	5.1 ± 0.6 a	5.6 × 10 ¹²	6.9 × 10 ¹¹	12.7 ± 3.0 c

Within the same column, means followed by different letters are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

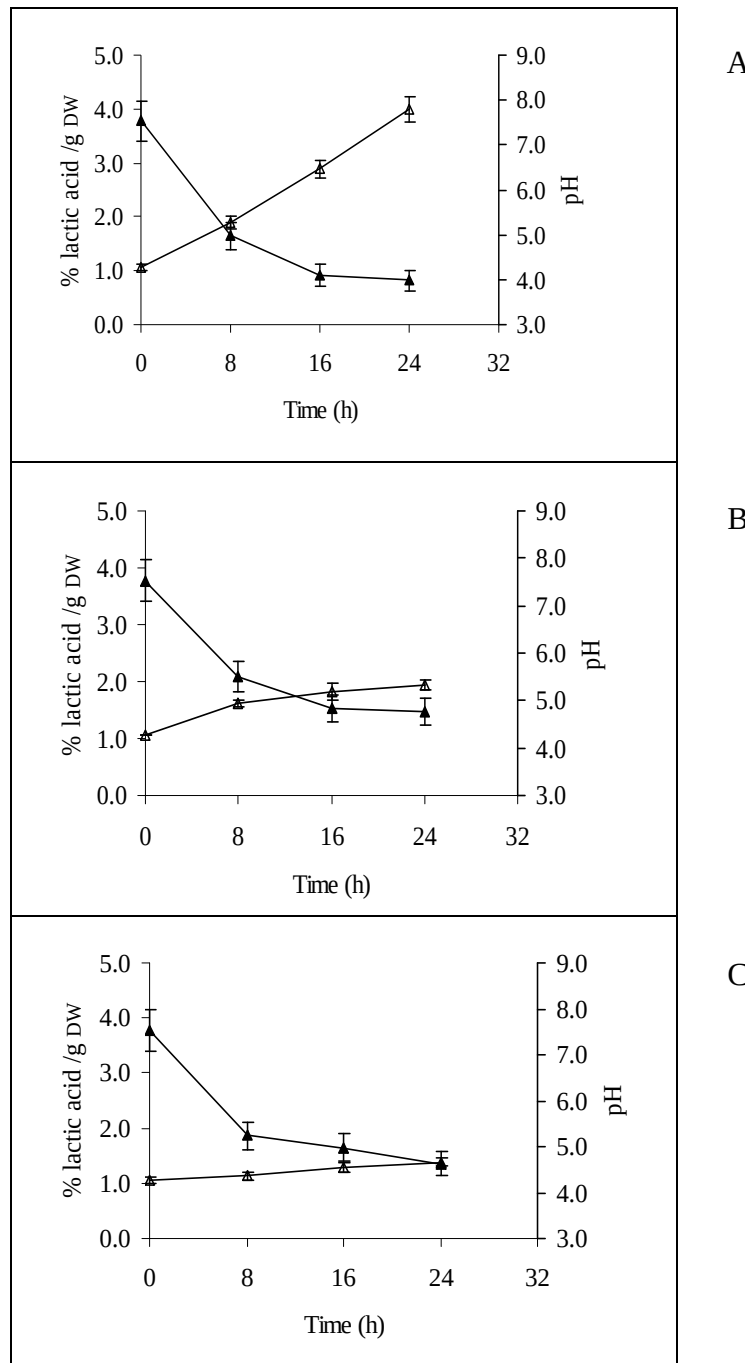


Figure 3. The pH (▲) and titratable acidity (% lactic acid/g DW) (Δ) of freeze-dried *L. plantarum* VE36 (A), *W. paramesenteroides* LC11 (B) or and *L. pentosus* Lb61 (C). Values are presented as means $\pm$ SD ($n = 4$).

The pH and the titratable acidity decreased and increased as the incubation time increased, respectively. After the 16 h incubation period, the pH and the titratable acidity were compared with those obtained immediately after freeze-drying and expressed as a change in pH (Δ pH) and acidification activity (Δ LA) (Table 3).

The change in pH and titratable acidity after 16 h incubation were significantly higher for MRS broth inoculated with *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. fermentum* G2/10 strains than for those inoculated with the other strains ($P < 0.05$). For example, the change in pH or titratable acidity for MRS broth inoculated with *L. plantarum* G2/25 was 1.2- and 1.7-fold higher, respectively, than that inoculated with *L. pentosus* Lb61. After the 16 h incubation period, the cell count was significantly higher for MRS broth inoculated with the *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. fermentum* G2/10 strains than for those inoculated with the other strains ($P < 0.05$) (Table 3).

Table 3. The change in pH (Δ pH) or titratable acidity (Δ lactic acid) and the viable count after 16 h incubation in MRS broth

Strains	Δ pH ^a	Δ LA ^b	Cell count (cfu/g DW)
<i>L. plantarum</i> VE82	2.84 $\pm$ 0.06 ac	1.05 $\pm$ 0.16 a	5.1 $\times 10^8$ a
<i>L. plantarum</i> VE 65b	2.90 $\pm$ 0.11 abc	0.85 $\pm$ 0.03 ace	2.5 $\times 10^8$ a
<i>L. plantarum</i> VE 20	2.92 $\pm$ 0.24 abc	1.03 $\pm$ 0.18 ae	4.3 $\times 10^8$ a
<i>L. plantarum</i> VE 36	3.43 $\pm$ 0.07 bcd	1.82 $\pm$ 0.12 b	8.5 $\times 10^8$ ad
<i>L. plantarum</i> G2/11	2.54 $\pm$ 0.04 a	0.44 $\pm$ 0.06 ce	1.6 $\times 10^8$ a
<i>L. plantarum</i> G2/25	3.20 $\pm$ 0.23 c	2.24 $\pm$ 0.07 b	6.1 $\times 10^9$ b
<i>L. pentosus</i> Lb61	2.57 $\pm$ 0.14 a	0.23 $\pm$ 0.04 ce	2.3 $\times 10^7$ a
<i>W. paramesenteroides</i> LC11	2.71 $\pm$ 0.17 a	0.77 $\pm$ 0.14 ace	4.3 $\times 10^8$ a
<i>W. paramesenteroides</i> LC18	2.86 $\pm$ 0.08 a	0.72 $\pm$ 0.09 ace	3.2 $\times 10^8$ a
<i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. mesentroides KMROG2	2.61 $\pm$ 0.13 a	1.01 $\pm$ 0.07 ae	2.3 $\times 10^8$ a
<i>L. fermentum</i> G3/5	2.72 $\pm$ 0.06 a	0.56 $\pm$ 0.05 e	4.4 $\times 10^7$ c
<i>L. fermentum</i> G2/10	3.84 $\pm$ 0.05 d	1.51 $\pm$ 0.10 b	1.1 $\times 10^9$ d

Within the same column, means followed by different letters are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

^a values compared with those obtained immediately after freeze-drying. Initially, the pH value of MRS broth was 7.5.

^b values compared with those obtained immediately after freeze-drying. Initially, the titratable acidity of MRS broth was approximately 1.06 % lactic acid/g DW ($n = 12$).

An important characteristic for potential starter strains is their ability to acidify their environment rapidly, as the acid production and the accompanying decrease in pH are known to extend the lag phase of sensitive organisms, including food-borne pathogens (Smulders et al., 1986). Leroy and De Vuyst (2004) reported that the direct addition of a selected starter culture to raw materials resulted in dominance by the best-adapted strains. We conclude that the strains *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. fermentum* G2/10 could constitute starter

cultures or are of interest in cassava fermentation because of their rapid acidification and high growth in MRS broth after dehydration.

CONCLUSION

In this study, the potential of 16 pre-selected LAB for use as suitable freeze-dried starter cultures during cassava fermentation for *gari* production was assessed. The strains, *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. pentosus* Lb61 were selected on the basis of their high cell concentration and high survival rate after freeze-drying. The strains *L. plantarum* VE36, G2/25 and *L. fermentum* G2/10 were shown to be capable of a rapid acidification and high growth in MRS broth after the dehydration process. In addition, the strains *L. plantarum* VE36 and *W. paramesenteroides* LC11 was previously selected on the basis of their stability over 2 months at 4°C in their dried state (Yao et al., 2008). All these strains was shown previously to be capable of fermenting the indigestible sugars stachyose and raffinose (Kostinek et al., 2007). They also showed presumptive bacteriocin activity and two of these presumptive bacteriocin-producing strains (*L. plantarum* VE36 and *L. fermentum* G2/10) were able to produce hydrogen peroxide. Ultimately, the strains *L. plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 and *W. paramesenteroides* LC11 were selected for development as starter cultures and are currently being evaluated, either alone or in combination, in soy-palm oil cassava mash fermentation for *gari* production in Bénin.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the grant for this study by the European Commission within the framework of the INCO-RTD Programme. The study was carried out partly under the project 'Improving the quality and nutritional status of *GARI* through the use of starter cultures and fortification with soybean, palm oil and coconut milk (ICA4-CT-2002-10058)'. The study does not necessarily reflect the project's views and does not anticipate the Commission's future policy in this area.

References

- Andersen AB, Fog-Petersen MS, Larsen H, Skibsted LH (1999). Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as related to physical state of freezing matrix. *Lebensm.-Wiss. und-Technol.* 32:540-547.
- AOAC (1997). Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

- Béal C, Corrieu G (1994). 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. Technol.* 27:86-92.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnol. Lett.* 24:1587-1591.
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1997). Evidence of membranes damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 82:87-94.
- Cheftel JC, Cheftel H (1980). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. In: Cheftel JC, Cheftel H (3rd eds), Lavoisier, Paris, 381p.
- Desmons S, Krhours H, Evrard P, Thonart P (1998). Improvement of lactic cell production. *Appl. Bioch. Biotechnol.* 70-72:513-525.
- Giraud E, Raimbault M (1993). Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 62:77-82.
- Guiraud E, Champailier A, Moulard S, Raimbault M (1998). Development of a miniaturized selective counting strategy of lactic acid bacteria for evaluation of mixed starter culture in a model cassava fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84:444-450.
- Holzapfel WH (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8:241-258.
- Holzapfel WH (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75:197-212.
- Ishibashi N, Tatematsu I, Shimamura S, Tomita M, Okonogi S (1985). Effect of water activity on the viability of freeze-dried bifidobacteria and lactic acid bacteria. In: International Institute of Refrigeration (IIR-IIF) (eds) *Fundamentals and Applications of Freeze-drying to biological Materials, Drugs and Foodstuffs*, Commission C1, Tokyo, pp227-232.
- Kimario VM, Massawe GA, Olasupo NA, Holzapfel WH (2000). The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of kivunde, a traditional Tanzanian food product. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 179-190.
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CMAP (2005). 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.* 28:527-540.
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S, Dortu C, Thonart P, Taljaard L, Mengu M, Franz CMAP, Hozapfel WH (2007). Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 114:342-351.

- Leroy F, De Vuyst L (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* 15:67-78.
- Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y (2000). Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. *Cryobiology* 4:251-255.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J. Microbiol. Meth.* 66:183-193.
- Oguntoyinbo FA (2007). Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional gari production. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 23:1425-1432.
- Okafor N (1977). Microorganisms associated with cassava fermentation for gari production. *J. Appl. Bacteriol.* 42:279-284.
- Okafor N, Ejiofor AO (1990). Rapid detoxification of cassava mash by a yeast simultaneously producing linamarase and amylase. *Process Biochem. Int.* 25:82-86.
- Okafor N, Umeh C, Ibenegbu C (1998). Amelioration of garri, a cassava-based fermented food by the inoculation of microorganisms secreting amylase, lysine and linamarase into cassava mash. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 14:835-838.
- Okafor N, Azubike C, Ibenegbu C (1999). Carriers for starter cultures for the production of garri, a fermented food derived from cassava. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 15:231-234.
- Poirier I, Maréchal P-A, Gervais P (1997). Effects of the kinetics of water potential variation on bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 82:101-106.
- Rault A, Bouix M, Béal C (2008). Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:559-570.
- Smulders FJM, Barendsen P, van Logtestijn JG, Mossel DAA, van Der Marel GM (1986). Lactic acid: consideration in favour of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21:419-436.
- Sow MRD, Thonart P (2003). Suitable selection of probiotic by osmotic treatment and fluorescent coloration. In: University of Liège (eds): Proceedings from the III Bioforum conference, Liège, Belgium, p110.
- Vedamuthu ER (1994). The Dairy Leuconostoc: Use in Dairy Products. *J. Dairy Sci.* 77:2125-2131.
- Yao AA, Bera F, Franz CAMP, Holzapfel WH, Thonart P (2008). Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models. *J. Food Prot.* 71:431-434.

Article 3

OBJECTIF

16 souches de bactéries lactiques, 8 *Lactobacillus plantarum*, 3 *L. pentosus*, 2 *Weissella paramesenteroides*, 2 *L. fermentum* et 1 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ont été précédemment isolées et sélectionnées pour la production d'un starter pour le 'gari' sur base de leurs propriétés biochimiques (Kostinek *et al.*, 2005, 2007). Toutes ces souches montraient une acidification rapide du milieu de culture, une forte activité β -glucosidase et étaient capables d'utiliser le raffinose. Certaines parmi elles pouvaient produire des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène, montraient une activité tannase et pouvaient utiliser le stachyose. L'objectif dans ce travail sera d'évaluer la lyophilisation comme méthode de séchage pour l'élaboration d'un starter de bactéries lactiques pour la production de 'gari'. Dans une première sélection, les 16 souches avaient été soumises à un test de déshydratation dans une solution de glycérol de concentration croissante suivi de leur marquage avec des marqueurs fluorescents (**article 2**). 12 souches avaient obtenu plus de 50% de taux de survie et ont été produites en fermenteur puis lyophilisées. Parmi toutes, les souches *L. plantarum* VE36, G2/25 et *L. pentosus* Lb61 ont obtenu des concentrations cellulaires et taux de survie les plus élevés après l'étape de lyophilisation. Les souches lyophilisées *L. plantarum* VE36, G2/25 et *L. fermentum* G2/10 ont montré une capacité de croissance plus élevée et un taux d'acidification plus rapide sur un milieu MRS comparé aux résultats obtenus pour les autres souches. La présente étude constitue la seconde étape de la sélection et consistera en l'évaluation de la stabilité des 12 souches lyophilisées au cours du stockage, à travers l'utilisation de tests de stockage accélérés. Les estimations de taux de survie lors du stockage des souches à des températures élevées seront comparées à celles obtenues après 60 jours de stockage à basse température (4°C). La sélection des souches sera réalisée sur la base du meilleur taux de survie au cours du stockage.

Références

- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. 2005. 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. 28: 527-540.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A., Holzapfel W.H. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting fermenting cassava for selection as starter cultures. Int. J. Food Microbiol. 114: 342-351.

Article 3

Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models

A. A.Yao¹, F. Bera ³, C. Franz ⁴, W. Holzapfel ⁴, P. Thonart ^{1, 2}

¹ Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Service de Technologie Microbienne, Université de Liège (ULg), Sart Tilman, B40, B-4000 Liège, Belgium.

² Unité des bio-industries, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), 5030 Gembloux, Belgique.

³ Unité de Technologie des industries agro-alimentaires, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSagx), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium.

⁴ Federal Research Centre for Nutrition and Food, Institute of Hygiene and Toxicology, Haid-und Neu-Strasse 9, D-76131 Karlsruhe, Germany

J. Food. Prot. (2008) 71: 431-434

Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models

Abstract

Survival rate of five freeze-dried bacteria species, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Weisella paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus fermentum*, was described in terms of reaction rate constants (D or k) and temperature sensitivity of rate constants (z or E_a). The freeze-dried strains were stored under vacuum at 55°C, 37°C and 4°C for 168 h, 17 days and 2 months respectively. D value decreased or k increased with an increase of the storage temperature. Either z value or the inactivation energy (E_a) of the reaction was not significantly different ($p > 0.05$) for all the strains, suggesting that thermal inactivation of the freeze-dried lactic acid bacteria may occur by the same mechanism. Therefore, it was possible to compare rate constants of survival for the freeze-dried strains studied.

Keywords : survival rate, z value, decimal reduction time, activation energy, lactic acid bacteria, storage stability, starter culture, mathematical models.

INTRODUCTION

Mathematical modelling techniques are commonly used to predict inactivation of spoilage bacteria and food borne pathogens (1, 8). More recently, attention has been paid to the bio-kinetics of beneficial food grade microorganisms, such as lactic acid bacteria. The z-value model was used to estimate the effect of temperature on biological parameters of *Lactobacillus pentosus* IGLAC01 (6). In this model heat resistance is described by two parameters: D and z. D is the time needed to reduce viable numbers by tenfold or one log unit at a specified temperature, and z is the temperature change needed to bring about a tenfold change in D. There is another method to describe the thermal inactivation of microbes which is based on chemical reaction kinetics. The model usually used to describe the temperature dependence of the rate constant of inactivation (k) is the Arrhenius equation in which the key parameter is the activation energy (E_a). Using Arrhenius model, it was shown that stability at low temperature of a freeze-dried lactic acid bacteria may be quantitatively predicted on the results of short-term degradation studies at high temperature (2, 5). Furthermore, the physico-chemical state of freeze-dried bacteria was well correlated to temperature (3). It is now well established that the shelf life of freeze-dried cultures is highly dependent on the storage temperature. The stability of a lactic starter during storage is a very important factor for its industrial use. Consequently, the z-value and Arrhenius models are useful aids in the evaluation of freeze-dried cultures stability during storage. It is possible for the predictions of the models to be similar, but comparison of the models has never been done for freeze-dried lactic cultures. Hence, the objectives of this study were to characterize and compare the kinetic predictions of the models for 12 freeze-dried lactic acid bacteria stored under vacuum and held at 55, 37 and 4°C. This work constitutes a secondary screening of these preselected strains as suitable starter in the production of African fermented food such as gari. Previously, these strains were isolated during the fermentation of fortified bitter cassava and selected as the basis for suitable technological characteristics and ability to ferment cassava (4).

MATERIALS AND METHODS

Micro-organisms and cultivation

Strains used throughout this study were lactic acid bacteria obtained from the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology, Karlsruhe, Germany. The bacterial strains were 6 *Lactobacillus plantarum* (VE 82, VE 65b, VE 20, VE 36, G2/11,

G2/25), *Lactobacillus pentosus* Lb 61, 2 *Weissella paramesenteroides* (LC11, LC18), *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* Kenya M Rog 2 and 2 *Lactobacillus fermentum* (G3/5, G2/10). The cell pellets obtained after 16h in MRS broths were resuspended in 5 ml (50% v/v) glycerol and frozen at -80°C.

Production and freeze-drying

Fermentation studies were carried out in a 20 L bioreactor (Biolafite, Saint Germain en Laye, France) with 16L working volume. The bioreactor was inoculated (6.0%, v/v) with a 12 h culture. 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.

Thermal treatment

Freeze-dried cultures were stored in aluminium foil packets which were vacuum-sealed for accelerated storage test at 55°C and 37°C. At 55°C, samples were removed at 4 h intervals from 4 to 168h of exposure; at 37°C after 48 h interval from 48 to 408 h of exposure. Freeze-dried samples were also stored at 4°C to determine the number of survivors each 15 days during 2 months. Percent survival after 60 days storage at 4°C was calculated as $100 \times N_f/N_0$. At the end of freeze-drying, water content was about 5.4 ± 1.60 % with water activity of about (a_w) 0.09 ± 0.01 for all the freeze-dried samples. These two parameters were stable as all the samples were stored under vacuum.

Kinetics parameters

For an irreversible first-order reaction at a constant temperature, the time dependant kinetic parameter can be expressed as the *D*-value as followed:

$$\log N = \log N_0 - (1/D) t \quad (1)$$

The *z*-value represents a temperature range between which *D* value changes ten-folds and can be calculated from the *D* values as shown below:

$$\log D_2 = -1/z (T_2 - T_1) + \log D_1 \quad (2)$$

The time dependant kinetic parameter can also be expressed as *k*, which is inversely related to the decimal reduction time (*D*) as followed:

$$k = 2.303/D \quad (3)$$

The rate constant of temperature can be described by the Arrhenius model:

$$\text{Log } k / k_0 = - E_a / (RT) \quad (4)$$

Statistical analysis

Productions in bioreactor were done in duplicate and cell counts were repeated twice. The Kruskal-Wallis test for ANOVA was carried out using the software STATISTICA 7.1 (StatSoft Inc., France, 2005) taking 5% as level of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

The stability of the freeze-dried cultures largely depended on the storage temperature. Accelerated stability testing using the Arrhenius and z-value relationships is often employed for stability parameters identification as a function of temperature. At each storage temperature, linear regressions were conducted for Log_{10} (cfu/g) survivors vs. storage time according to Eqs. (1).

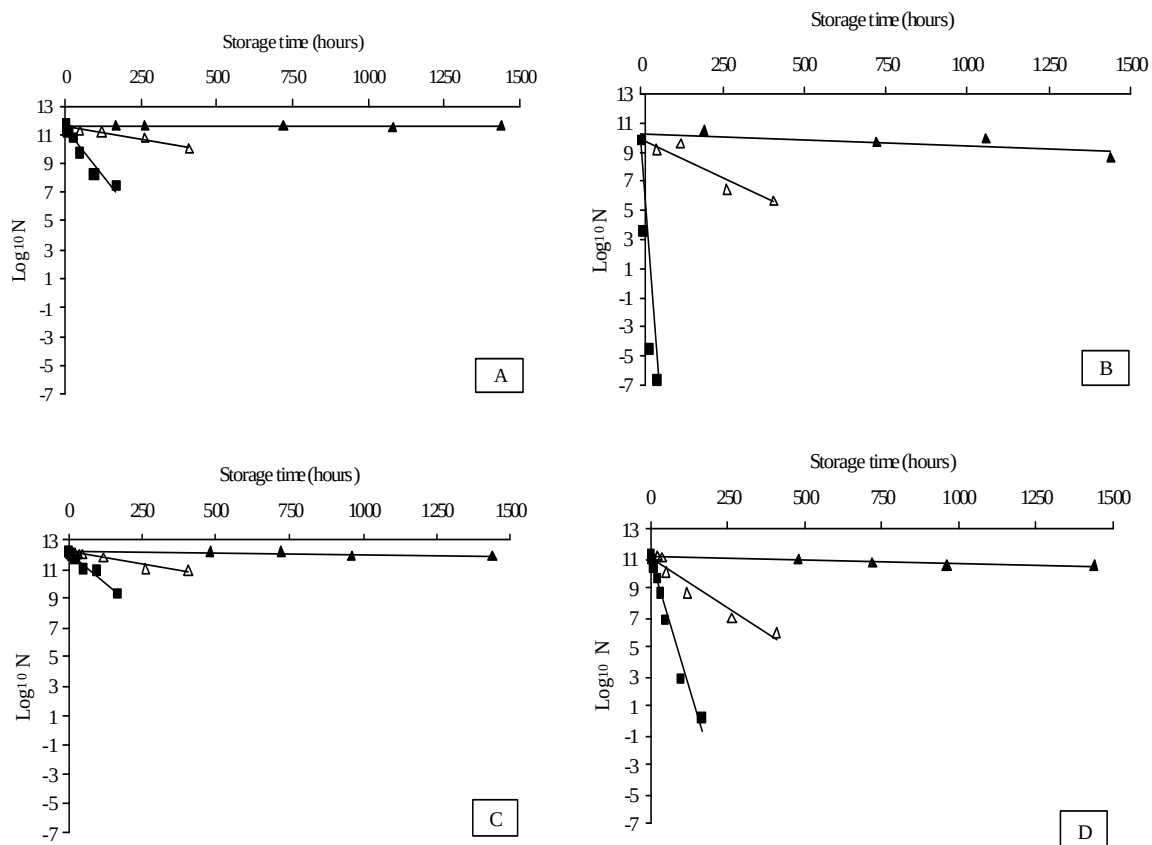


Figure 1: Thermal mortality curves of freeze-dried lactic acid bacteria *Lb. plantarum* VE36 (A), *Lb. fermentum* G3/5 (B), *W. paramesenteroides* LC11 (B), *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Kenya M Rog 2 (D) at: $\blacktriangle$ 4°C, $\triangle$ 37°C, $\blacksquare$ 55°C. Each point represents the mean of three (at least) and four (to the maximum) counts.

Table 1: Decimal reduction time (*D*) or rate constant (*k*) for freeze-dried lactic acid bacteria from 4 to 55°C ^a

Strains	Storage temperature (°C)	D (h)	<i>r</i> ²
<i>Lb. plantarum</i> VE 82	4	2060	0.82
	37	98	0.78
	55	8	0.91
<i>Lb. plantarum</i> VE 65b	4	1229	0.85
	37	92	0.83
	55	10	0.86
<i>Lb. plantarum</i> VE 20	4	4803	0.85
	37	180	0.90
	55	13	0.99
<i>Lb. plantarum</i> VE 36	4	25527	0.98
	37	262	0.93
	55	10	0.97
<i>Lb. plantarum</i> G2/11	4	2348	0.82
	37	82	0.83
	55	8	0.86
<i>Lb. plantarum</i> G2/25	4	3752	0.84
	37	99	0.92
	55	10	0.93
<i>Lb. pentosus</i> Lb 61	4	2724	0.92
	37	65	0.80
	55	6	0.84
<i>W. paramesenteroides</i> LC11	4	55534	0.85
	37	303	0.97
	55	27	0.90
<i>W. paramesenteroides</i> LC18	4	3685	0.96
	37	325	0.81
	55	43	0.93
<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> Kenya M Rog 2	4	2106	0.87
	37	62	0.95
	55	7	0.88
<i>Lb. fermentum</i> G3/5	4	1577	0.87
	37	23	0.88
	55	2	0.92
<i>Lb. fermentum</i> G2/10	4	4507	0.87
	37	132	0.81
	55	13	0.90

^a Results are the mean of three to four determinations.

For all the strains studied, cell survival curves present a log linear relation between the number of colony forming units and incubation time. Figure 1 shows thermal mortality curves of freeze-dried lactic acid bacteria *Lb. plantarum* VE36, *Lb. fermentum* G3/5, *W. paramesenteroides* LC 11 and *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Kenya M Rog2, at

different temperatures. Similar plots were obtained for the others strains at the same storage temperature. As storage temperature increases, mortality of cultures also increases during storage. Kinetic parameter D or k , calculated from Eqs. (1) or Eqs. (3) respectively, are summarized in Table 1. D values decreased or k values increased with an increase in storage temperature demonstrating an increase in mortality at higher temperatures. Low survival for freeze-dried lactic acid bacteria at higher storage temperature has been recognized by several researchers (9, 10). These results basically confirm the literature, but do suggest different temperature-mortality plots as a function of the strain.

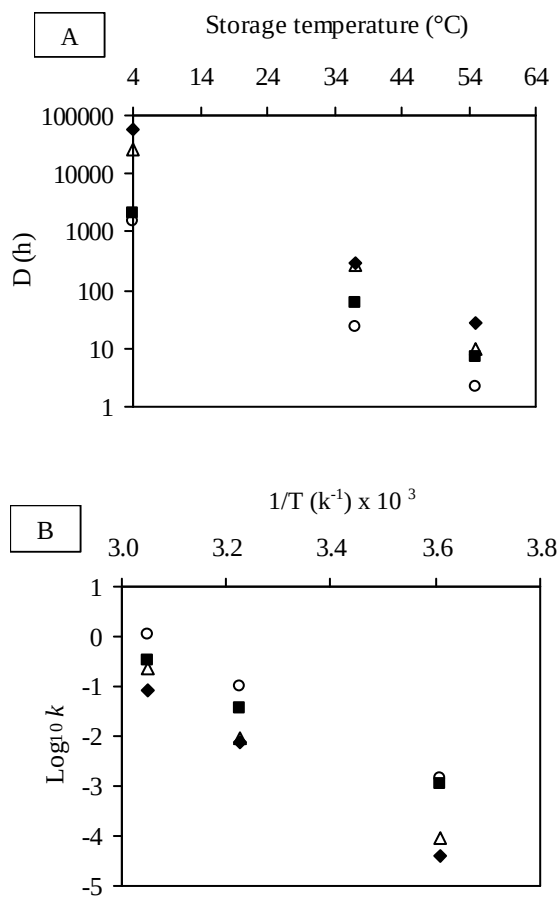


Figure 2: Determination of decimal reduction temperature or z (A) or Arrhenius activation energy or E_A (B) of freeze-dried lactic acid bacteria: Δ *Lb. plantarum* VE36, $\circ$ *Lb. fermentum* G3/5, $\blacklozenge$ *W. paramesenteroides* LC11 and $\blacksquare$ *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Kenya M Rog 2. Each point represents the mean of three (at least) and four (to the maximum) counts.

We plotted $\text{Log}_{10} D$ (h) vs. their corresponding storage temperatures for all the strains. Figure 2A shows the $\text{Log}_{10} D$ (h) vs. storage temperatures (°C) from 4 to 55°C for freeze-dried *Lb. plantarum* VE36, *Lb. fermentum* G3/5, *W. paramesenteroides* LC11 and *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Kenya M Rog 2. Similar plots were obtained for the others strains. z values was calculated according to Eqs. (2) for all strains. Arrhenius plots are shown in Figure 2B relating the rate constant k to the reciprocal absolute temperature of freeze-dried

Lb. plantarum VE36, *Lb. fermentum* G3/5, *W. paramesenteroides* LC11 and *L. mesenteroides* spp. *mesenteroides* Kenya M Rog 2. Arrhenius activation energy (E_a) of the thermal inactivation was calculated from Eqs. (4) for all strains. Similar plots were obtained for the others strains. Arrhenius activation energy (E_a) of the thermal inactivation was calculated from Eqs. (4) for all strains. Most of the z-values (average z-value = $20.2^\circ\text{C} \pm 3.4$) or E_a obtained (average $E_a = 9.1 \text{ Kcal mol}^{-1} \pm 1.5$) are not significantly different ($p > 0.05$) as shown in Table 2.

Table 2 : z- or E_a - value for thermal treatment of freeze-dried lactic acid bacteria from 4 to 55°C (results are the mean of three to four determinations).

Strains	z value ($^\circ\text{C}$)**	E_a (Kcal mol^{-1})*
<i>Lb. plantarum</i> VE 82	21.5 ± 0.5 a	8.3 ± 0.4 a
<i>Lb. plantarum</i> VE 65b	24.9 ± 0.8 a	7.2 ± 0.5 a
<i>Lb. plantarum</i> VE 20	20.2 ± 0.8 a	8.8 ± 0.4 a
<i>Lb. plantarum</i> VE 36	15.2 ± 0.3 a ¹	11.8 ± 0.7 a ¹
<i>Lb. plantarum</i> G2/11	20.9 ± 0.9 a	8.5 ± 0.6 a
<i>Lb. plantarum</i> G2/25	19.8 ± 0.6 a	9.0 ± 0.8 a
<i>Lb. pentosus</i> Lb 61	19.3 ± 0.7 a	9.3 ± 1.2 a
<i>W. paramesenteroides</i> LC11	15.3 ± 0.7 a ²	11.7 ± 0.7 a ²
<i>W. paramesenteroides</i> LC18	26.9 ± 0.7 a ^{1, 2}	6.6 ± 0.9 a ^{1, 2}
<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> Kenya M Rog 2	20.8 ± 0.9 a	8.6 ± 0.5 a
<i>Lb. fermentum</i> G3/5	17.8 ± 0.4 a	10.0 ± 0.7 a
<i>Lb. fermentum</i> G2/10	20.2 ± 0.5 a	8.8 ± 0.9 a

The Kruskal-Wallis test yielded P-values as shown: * $p = 0.005$; ** $p = 0.001$

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

Letters with the same subscript in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

The z or activation energy (E_a) values of the thermal inactivation are inter-related, both representing temperature sensitive parameters of rate constant (7). In a previous work, authors showed average sensitivity (in order of 20 kcal/mol) to temperature variation of two freeze-dried *Lactococcus lactis* SLT6NT and SLT6T strains stored from 4 to 37°C (10). By taking into account of this, it could be suggested that thermal inactivation of freeze-dried lactic acid bacteria may occur by the same mechanism. Viability of the freeze-dried strains was determined after 60 days at 4°C as shown in Figure 3. Most of the freeze-dried strains had stability of approximately 40% after 60 days. However, high viable counts were obtained for the freeze-dried *W. paramesenteroides* LC 11 (89.6 %) and *Lb. plantarum* VE 36 (94.9%) strains. While temperature-dependence indicator z or activation energy (E_a) values were somewhat similar, the rate kinetic parameters (D or k values), particularly at 4°C , were

different between two strains *W. paramesenteroides* LC 11, *Lb. plantarum* VE 36 and the others. Higher D-value is associated clearly with increased stability during storage at a constant temperature. We can conclude that *Lb. plantarum* VE36 and *W. paramesenteroides* LC11 strains could constitute starters or are of interest in cassava fermentation for gari production. These results demonstrated that the z-value or Arrhenius models could be used to predict storage stability of freeze-dried lactic acid bacteria at various temperatures.

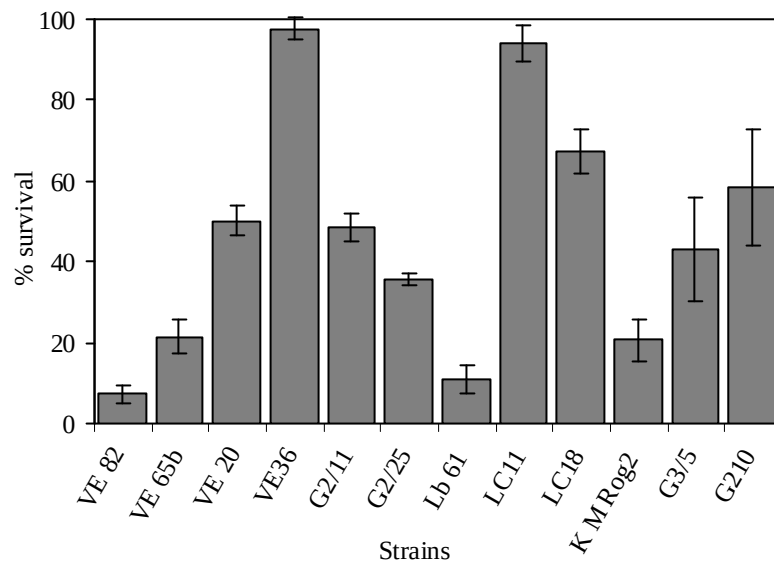


Figure 3: Survival of freeze-dried lactic acid bacteria after 60 days storage at 4°C.

ACKNOWLEDGEMENTS

Commission within the framework of the INCO RTD Programme is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Bertolatti, D., S.J. Munyard, W.B.Grubb, C.W. Binns. 2001. Thermal inactivation of antimicrobial resistant Gram-positive cocci in chicken meat: D and z value determinations. *Int. J. Environ. Health Res.* 11:257-266.
2. Desmons, S., S. Zgouli, J. Destain, P. Thonart. 1997. Freeze-drying of a lactic acid bacteria: *Lactobacillus acidophilus*. *Meded. Fac. Landbouwkde Toegepaste Biol. Wet. Univ. Gent* 62:1713-1716.

3. Higl, B., L. Kurtmann, C.U. Carlsen, J. Ratjen, P. Först, L.H. Skibsted, U. Kulozik, J. Risbo. 2007. Impact of Water activity, Temperature, and Physical State on the Storage Stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose Matrix. *Biotechnol. Prog.* 23:794-800.
4. Kostinek M., I. Specht , V.A. Edward, C. Pinto, M. Egounlety, C. Sossa, S. Mbugua, C. Dortu, P. Thonart, L. Taljaard, M. Mengu, C. M. A. P. Franz, W. Hozapfel. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 114:342-351.
5. Legrand-Sow, N. 2004. Sélection et caractérisation de bactéries lactiques d'origine africaine en vue d'une utilisation comme probiotiques, Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Ph D thesis, Gembloux, p. 217.
6. Lopez, F.N.A., M.C.D. Quinatana, A.G., Fernandez. 2006. The use of a D-optimal design to model the effects of temperature, NaCl, type and acid concentration on *Lactobacillus pentosus* IGLAC01. *J. Appl. Microbiol* 101:913-926.
7. Nourian, F., H.S. Ramaswamy, A.C. Kushalappa. 2003. Kinetic changes in cooking quality of potatoes stored at different temperatures. *J. Food Eng.* 60:257-266.
8. Nunes, R. V., K.R. Swartzel, D.F. Ollis. 1993. Thermal evaluation of food processes - the role of a reference temperature. *J. Food Eng.* 20:1-15.
9. Teixeira, P., H. Castro, F.C. Mohacsi, R. Kirby. 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J. Appl. Microbiol.* 83:219-226.
10. Ziadi, M., Y. Touhami, M. Achour, P. Thonart, A. Hamdi. 2005. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. *Biochem. Eng. J.* 24:141-145.

Article 4

OBJECTIF

16 souches de bactéries lactiques ont été précédemment isolées et sélectionnées pour la production d'un starter pour le 'gari'. Dans l'optique de produire un starter de bactéries lactiques lyophilisées, ces souches ont été évaluées dans la première partie de notre étude sur base de (**articles 2 et 3**) : (i) leur capacité à survivre après le test accéléré de déshydratation, (ii) un taux de survie élevé après la lyophilisation, (iii) leur capacité et leur vitesse d'utilisation d'une source de carbone (pouvoir d'acidification) après la lyophilisation, (iv) leur stabilité au cours du stockage sous forme déshydratée. Les souches *Lactobacillus plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 et *Weissella paramesenteroides* LC11 ont finalement été retenues pour le développement d'une culture starter pour la production de 'gari'. L'autre fait marquant de la précédente étude a été la perte importante de viabilité (50%) observée chez la plupart des souches, après 60 jours de stockage à 4°C (**article 3**). L'objectif dans la seconde partie de notre travail, sera d'essayer 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 depuis longtemps retenu l'attention des chercheurs. Nous essaierons ici, de fournir des résultats expérimentaux en vue d'appuyer l'hypothèse selon laquelle, il existerait une relation entre l'oxydation des lipides membranaires et la perte de viabilité cellulaire ou du pouvoir d'acidification d'une bactérie lyophilisée au cours du stockage. Pour ce faire, l'influence des conditions de stockage (température, humidité, aération) sur la viabilité, le pouvoir d'acidification et la composition en acides gras cellulaires de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, ont été évalués pendant 90 jours.

Article 4

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

A. A. Yao · P. Thonart

Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-I. Coulibaly · P. Thonart

Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

G. Lognay

Analytical Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

M-L. Fauconnier

Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

Appl. Microbiol. Biotechnol. (2008) 79: 1045-1052

Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage

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 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

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 *Lb. 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 nitrogen compared with storage at 30°C or in air, respectively (Andersen et al. 1999). A higher percentage of survival was noted for both *S. thermophilus* and *Lb. acidophilus* stored at 4°C than at 25°C (Wang et al. 2004). Membrane lipid oxidation was suggested as the cause of cell death during storage. Castro et al. (1995, 1996) found damage to the cell membrane during the storage of *Lactobacillus bulgaricus* in the presence of air, high relative humidity and high storage temperature. Dimmick and Heckly (1961) found a strong similarity between loss of viability and increase in free-radical concentration during the storage of *Serratia marcescens*. Marshall et al. (1974) supported the hypothesis that reactions between carbonyl compounds and cellular components are a major cause of mortality during the storage of dried micro-organisms.

To date, no paper, however, has clearly identified the cellular fatty acids which are oxidized during the storage of freeze-dried bacteria. Lipids in living organisms, particularly the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of cell membranes, are described as being extremely susceptible to oxidative stress (Halliwell and Chirico 1993). Under oxidative conditions, molecular oxygen was introduced into linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids, leading to the formation of the corresponding hydroperoxy PUFAs: hydroperoxy octadecadienoic acid (HPOD) and hydroperoxy octadecatrienoic acid (HPOT) (Nawar 1996). Linoleic and linolenic hydroperoxides are very unstable and decompose to form secondary products collectively termed “oxylipins”: hydroxy PUFAs, divinyl ether PUFAs and Oxo PUFAs (Nawar 1996; Laine et al. 2006). In order to gain more knowledge about the relationship between lipid oxidation and the viability or activity of freeze-dried bacteria, *Weissella paramesenteroides* was stored at 4 or 20°C in vacuum-sealed aluminium foil or glass tubes with $a_w = 0.11$ or 0.23. The cell concentration, acidification activity and linoleic/palmitic

(18:2/16:0) or linolenic/palmitic (18:3/16:0) ratio were determined over a 90-day storage period. The accumulation of derived-oxylipins of linoleic and linolenic acids during the storage of the dried strain in glass tubes was also followed. Previously, *W. paramesenteroides* LC11 had been isolated during cassava fermentation and was selected as a suitable starter culture for gari production (Kostinek et al. 2005; Kostinek et al. 2007; Yao et al. 2008).

Materials and Methods

Microorganism

The lactic acid bacteria *W. paramesenteroides* LC11 was provided by the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology (Karlsruhe, Germany). The strain was inoculated in MRS broth and incubated at 30°C for 18h. Cells obtained after centrifugation (2500 ×g, 20 min) were maintained in 50% (v/v) glycerol and frozen at -80°C.

Productions and storage

The strain was grown in 500 l bioreactor containing MRS medium for 18h and then concentrated 20 times by centrifugation. 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 (30 h) followed by 15h at 0.15 mbar. Freeze-dried powders of about 2 ±0.5 g were stored in 20 ml glass tubes over 90 days at 4 and 20°C in desiccators over the following saturated salt solutions of constant water activities (a_w): LiCl (0.11), CH₃COOK (0.23). Control samples, at each temperature, were stored in aluminium foil packets which were vacuum-sealed.

Water content and activity determinations

The water content (g H₂O/100 g Dry Weight) of the freeze-dried 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, respectively.

Survival and acidification activity

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 10⁷ cfu ml⁻¹ of the freeze-dried

sample. The total titratable acidity (% lactic acid/g DW) was determined after 18h, according to the AOAC method (1997).

Analysis of cellular fatty acids

Total lipids were extracted overnight from dried cells (1g) with ethanol-ether (3:1v/v) mixture according to an adaptation of the method of Ito et al. (1969). Ethanol/ether extracts were pooled, filtered, and then evaporated and concentrated under reduced pressure 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 sulfuric acid (10%) and 0.5 ml of n-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 (10 m long., 0.25 mm diam., 0.25 µm film) 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 150°C, and then from 150°C to 240°C at 4°C/min with a final hold of 10 min at 240°C. FAME were identified by comparing their retention times with standard mixtures FAME MIX 47885U (Supelco, Bellefonte, USA). The fatty acid relative content (%) was estimated as a percentage of the total peak area using a DP 700 integrator (Spectra physics). The percentage of each fatty acid was normalized by expressing it as a ratio of the percentage of palmitic (16:0) acid for two reasons: (i) 16:0 had the highest percentage content at most points compared with other fatty acids; and (ii) 16:0 did not change significantly during storage. All the chemicals used were analytical grade and supplied by Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany).

Analysis of oxylipins

Total oxylipins profiling during storage was analysed in three replicates and as described previously by Laine et al. (2006). For the extraction of free oxylipins, (6Z, 9Z, 11E, 13S)-13-hydroxy-6, 9, 11-octadecatrienoic acid (Larodan Fine Chemicals, Malmo, Sweden) was used as an internal standard and about 2 g of frozen material was added to 20 ml of extraction medium [isoheptane: 2-propanol, 3:2 (v/v) with 0.0025% (w/v) BHT]. For the extraction of esterified oxylipins, triolein was used as an internal standard and about 0.5 g of frozen

material was added to 20 ml of extraction medium. In the first step, oxylipins were purified by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). This was performed on an EC250/2 Nucleosil 120-5 C18 column (250 mm long., 2.1 mm diam., 5µm film; Macherey & Nagel, Easton, PA). Straight-phase HPLC for separation of hydroperoxy fatty acids, hydroxy fatty acids, and keto fatty acids was performed on a Zorbax Rx-SIL column (150mm long., 2.1 mm diam., 5µm long; Agilent technologies, USA) with n-hexane: 2-propanol: acetic acid (100: 1: 0.1, v/v) as a solvent system at a flow rate of 0.2 ml/min. The injection volume was 25 µl. For detection of the hydroperoxy and hydroxy fatty acids, the absorbance was recorded at 234 and 270 nm, respectively.

Data analysis

Productions in bioreactor were done in duplicate. Data were compared by Turkey's honestly significant difference (Statistica 7.1, StatSoft Inc., 2005). The level of significance was determined at $P < 0.05$.

Results

Change in survival and acidification activity due to storage

Lactic acid bacteria *W. paramesenteroides* was produced in the bioreactor, freeze-dried and held at 4 or 20°C in vacuum-sealed aluminium foil or glass tubes with $a_w = 0.11$ or 0.23 for 90 days. It was found that, regardless of packaging mode or storage temperatures, the survival and acidification activity of the freeze-dried strain decreased as the storage time increased (Fig. 1a,b). However, after the 90 day storage period, a significantly higher viable population and acidification activity were noted in the freeze-dried powder held at 4°C or under vacuum than at 20°C or in glass tubes, respectively ($P < 0.05$) (Table 1). For example, the viable population of the freeze-dried strain held in vacuum-sealed aluminium foil or glass tubes with $a_w = 0.23$ was reduced from an initial population of 8.6×10^{11} cfu/g to 8.0×10^{11} or 4.4×10^8 cfu/g with a survival percentage of 92.8% or less than 0.1% after 90 days at 4°C, respectively. After 90 days at 20°C in the same conditions, the viable population was about 6.4×10^{11} or 5.3×10^7 cfu/g with a survival of 74.8% or less than 0.01%, respectively. Similarly, acidification activity of the freeze-dried strain held in vacuum-sealed aluminium foil or glass tubes with $a_w = 0.23$, reflected by a decrease of 24% or 60% after a 90-day storage period at 20°C, was also lower than that obtained at 4°C (14% or 34%), respectively (Fig.1a,b; Table 1). In addition, the viability and acidification activity were significantly higher for the freeze-

dried strain in glass tubes with $a_w = 0.11$ compared with those obtained in glass tubes with $a_w = 0.23$ ($P < 0.05$). At the end of freeze-drying, the water content of freeze-dried sample was 3.6 ± 0.6 g H₂O/100 g DW with $a_w 0.09 \pm 0.01$. After the 90-day storage period, the water content for samples stored at 4 or 20°C in glass tubes with $a_w = 0.23$ was significantly higher (approximately 0.6-fold) than that of samples stored in glass tube and $a_w = 0.11$ ($P < 0.05$). As expected, water content for samples stored under vacuum did not change significantly during storage (Table 1) ($P > 0.05$).

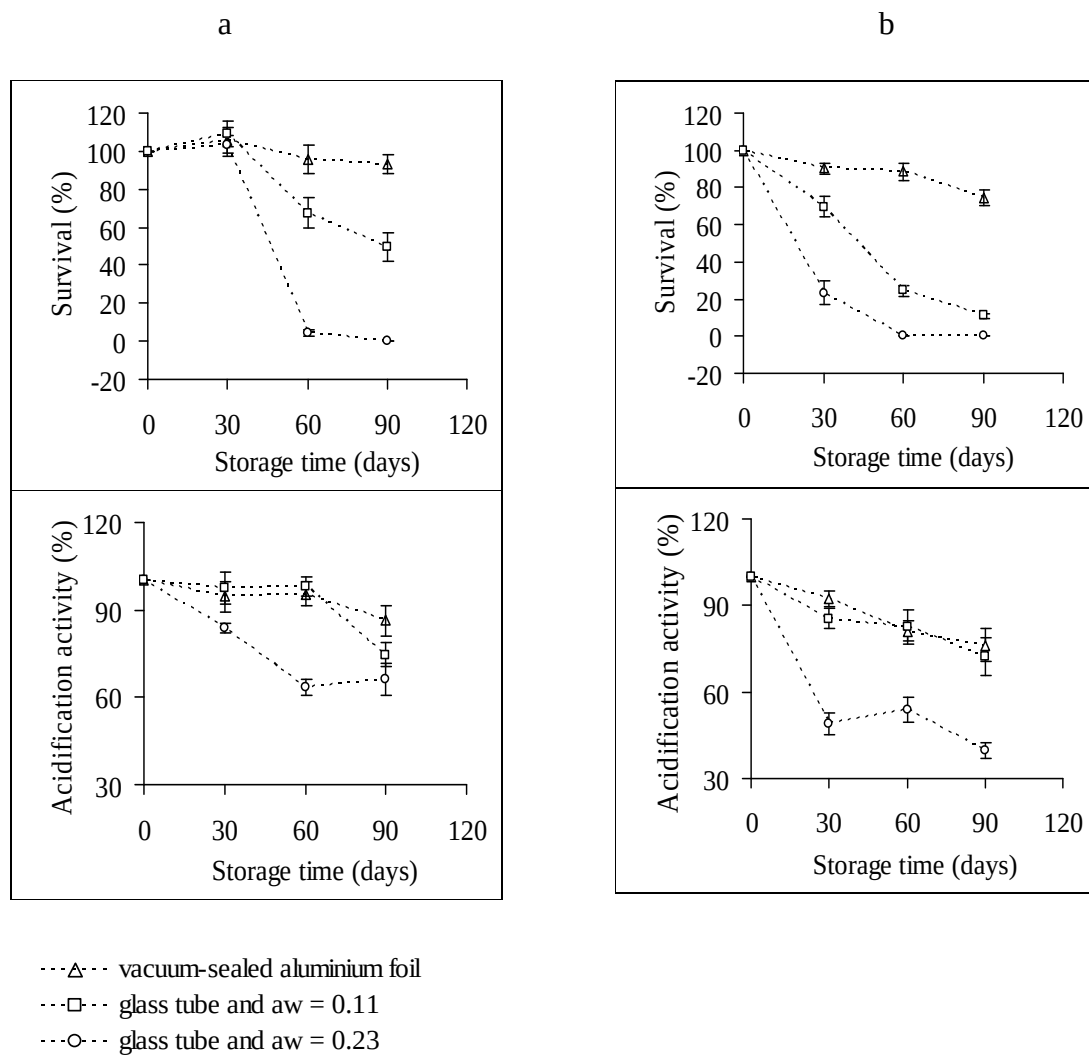


Fig.1 The survival and acidification activity of freeze-dried *W. paramesenteroides* during 90 days at (a) 4°C or (b) 20°C. Values are presented as means $\pm$ standard deviation (SD, $n = 4$).

Table 1 Survival, acidification activity of freeze-dried *W. paramesenteroides* and water content of dried samples after 90-day storage

Storage Temperature (°C)	Container	Moisture content (%)	Survival		acidification activity	
			cfu/g	(%) ^a	% lactic acid/g	(%)
4	Vacuum-sealed aluminium foil	3.6 ± 0.6 ^a	8.0*10 ¹¹	92.8 ± 5.0 ^a	0.7 ± 0.06	86.4 ± 6.8 ^a
	glass tubes with a _w = 0.11	6.6 ± 0.2 ^b	4.5*10 ¹¹	53.4 ± 7.7 ^b	0.6 ± 0.01	74.5 ± 1.0 ^a
	glass tube with a _w = 0.23	11.4 ± 0.6 ^c	4.4*10 ⁹	≤ 0.1 ^c	0.5 ± 0.04	66.2 ± 5.4 ^b
20	Vacuum-sealed aluminium foil	3.6 ± 0.6 ^a	6.4*10 ¹¹	74.8 ± 4.2 ^d	0.6 ± 0.04	76.2 ± 5.6 ^a
	glass tubes with a _w = 0.11	7.1 ± 0.5 ^b	8.9*10 ¹⁰	10.8 ± 0.9 ^e	0.6 ± 0.08	72.5 ± 4.6 ^a
	glass tubes with a _w = 0.23	11.2 ± 0.3 ^c	5.3*10 ⁷	< 0.01 ^c	0.3 ± 0.02	39.7 ± 2.8 ^c

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

^a Percentage compared with those obtained immediately after freeze-drying. Initially, freeze-dried sample with a water content of 3.6 g H₂O/100 g Dry Weight contained 8.6*10¹¹ cfu/g of *W. paramesenteroides* and had 0.8 % lactic acid/g.

3.2 Change in polyunsaturated fatty acids due to storage

Six cellular fatty acids, namely palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids, were identified (Table 2). The percentage of 16:0 remained high and did not change significantly during storage, as described earlier under Materials and Methods. Therefore, the percentages of the other fatty acids were expressed as a ratio between each fatty acid and the 16:0. 16:1/16:0, 18:0/16:0 and 18:1/16:0 ratios did not change significantly during storage (data not shown) ($P > 0.05$). The main modification observed, was a decrease in the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratio (Fig. 2a,b). However, a significantly higher 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratio was noted for the freeze-dried strain held at 4°C than at 20°C (Table 2) ($P < 0.05$). For example, at the end of freeze-drying the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios were 0.02 and 0.10, respectively. After the 90-day storage period in glass tubes with a_w = 0.11 or 0.23, the 18:2/16:0 ratio decreased from the original value by 24% or 48%, with a ratio reduction of only 0.005 or 0.009 at 4°C (Fig. 2a, b; Table 2) compared with a larger decrease from the original value by 33% or 63% with a ratio reduction of 0.001 or 0.013 at 20°C, respectively.

Table 2 Fatty acids and linoleic/palmitic (18:2/16:0) or linolenic/ palmitic (18:3/16:0) ratios after 90-day storage

Fatty acid (s)	Storage temperature (°C)					
	4			20		
	Container					
	Vacuum-sealed aluminium foil	glass tubes with a _w = 0.11	glass tubes with a _w = 0.23	Vacuum-sealed aluminium foil	glass tubes with a _w = 0.11	glass tubes with a _w = 0.23
	Percentage of total ^a					
16:0	51.8 ± 1.3	52.6 ± 1.6	54.2 ± 1.9	53.0 ± 1.5	53.4 ± 2.4	53.3 ± 1.6
16:1	7.3 ± 0.3	8.6 ± 0.6	9.1 ± 0.9	7.6 ± 0.4	7.1 ± 0.6	7.9 ± 1.5
18:0	8.4 ± 0.5	9.3 ± 0.4	9.5 ± 0.7	9.9 ± 1.1	9.3 ± 0.8	9.8 ± 0.5
18:1	26.5 ± 2.1	26.0 ± 1.2	24.8 ± 1.2	23.7 ± 2.1	27.4 ± 2.1	27.8 ± 2.3
18:2	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1
18:3	5.2 ± 0.2	2.7 ± 0.4	2.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0.1
Σ	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	100 × Ratio ^b					
18:2/16:0	1.7	1.2	0.8	1.7	1.1	0.6
18:3/16:0	9.9	5.1	3.7	9.4	4.2	1.7
	Percentage of initial ratio ^c					
18:2/16:0	99.3 ± 5.3 ^a	75.5 ± 5.5 ^b	51.5 ± 3.7 ^c	97.7 ± 5.4 ^{ab}	67.3 ± 6.8 ^{bc}	37.2 ± 5.6 ^c
18:3/16:0	94.5 ± 1.1 ^a	50.2 ± 3.8 ^b	38.5 ± 4.9 ^c	89.8 ± 0.8 ^a	41.9 ± 2.3 ^b	18.0 ± 2.2 ^d

Values not sharing the same superscript letter within horizontal line are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

^a Percentage of total fatty acids content

^b Values represent ratio between each fatty acid and the palmitic acid (16:0)

^c Percentage compared with those obtained immediately after freeze-drying. Initially, 18:2/16:0 and 18:3/16:0 acid ratios were 0.02 and 0.10, respectively.

The 18:3/16:0 ratio decreased from the original value by 50% or 61% with a ratio reduction of only 0.05 or 0.07 at 4°C (Fig. 2a,b; Table 2) compared with a larger decrease from the original value by 58% or 82% with a ratio reduction of 0.06 or 0.09 at 20°C, respectively. The 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio in glass tubes with $a_w = 0.23$ was approximately 0.5- or 0.7-fold higher than that observed in glass tubes with $a_w = 0.11$, respectively. The 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios for the freeze-dried strain held in vacuum-sealed aluminium foil did not change significantly after the 90-day storage period at 4 or 20°C ($P > 0.05$).

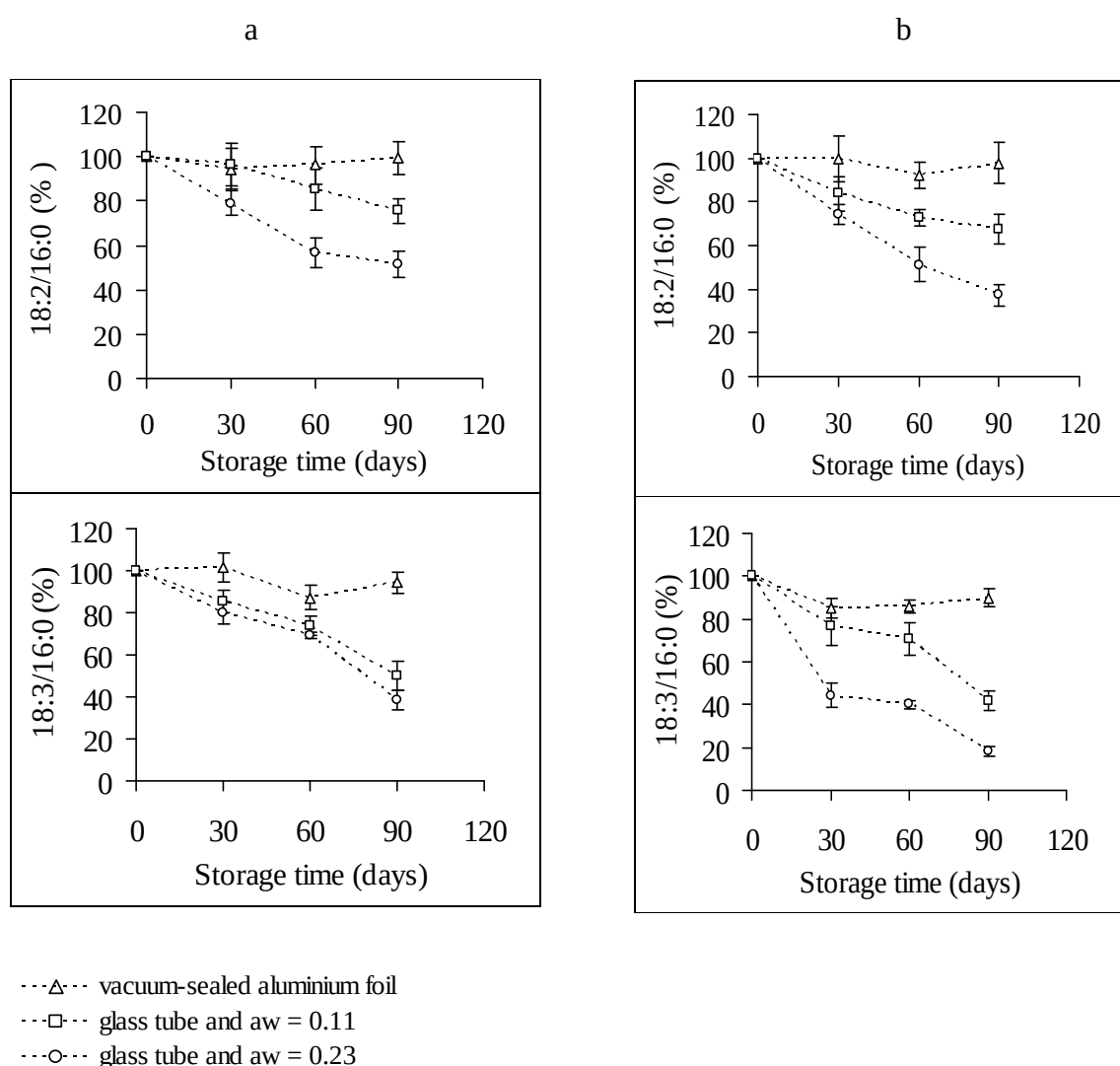


Fig. 2 The linoleic/ palmitic (18:2/16:0) and linolenic/ palmitic (18:3/16:0) ratio of freeze-dried *W. paramesenteroides* during 90 days at (a) 4°C or (b) 20°C. Values are presented as means $\pm$ SD ($n = 4$) and represent the ratio between each fatty acid and the palmitic (16:0) acid.

Oxylipins profiling during storage

Free (unesterified) and esterified oxylipins were analysed during the storage of freeze-dried *W. paramesenteroides* in glass tubes with $a_w = 0.11$ or 0.23 . During storage at $a_w = 0.11$, the main oxylipins identified were esterified hydroperoxy PUFAs and hydroxy PUFAs as shown in Fig. 3.

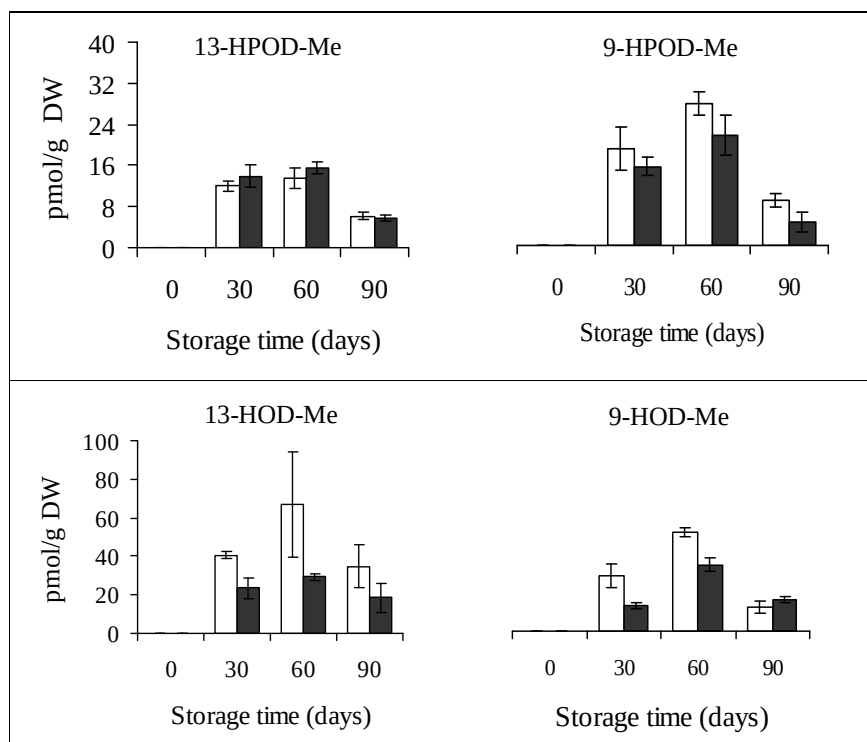


Fig. 3 Esterified oxylipin of freeze-dried *W. paramesenteroides* during 90 days in glass tubes with $a_w = 0.11$ at 4°C (white bars) or 20°C (black bars). Bars are presented as means $\pm$ SD ($n = 3$). Me: esterified, DW: dry weight

13-hydroperoxy-linoleic acid (13-HPOD-Me) accumulates transiently between the 30th and 60th day of storage at 4 or 20°C (from about 12 or 14 pmol/g DW to 14 or 15 pmol/g DW, respectively). During the same time and under the same storage temperatures, 9-hydroperoxy-linoleic acid (9-HPOD-Me) showed the same transient accumulation as that observed for the 13-HPOD-Me (from about 20 or 17 pmol/g DW to 30 or 23 pmol/g DW, respectively). 13- and 9-hydroxy-linoleic acid (13- and 9-HOD-Me) showed the same transient accumulation as

that observed for the 13- and 9-HPOD-Me. During storage in glass tubes with $a_w = 0.23$, esterified and free oxylipins were detected.

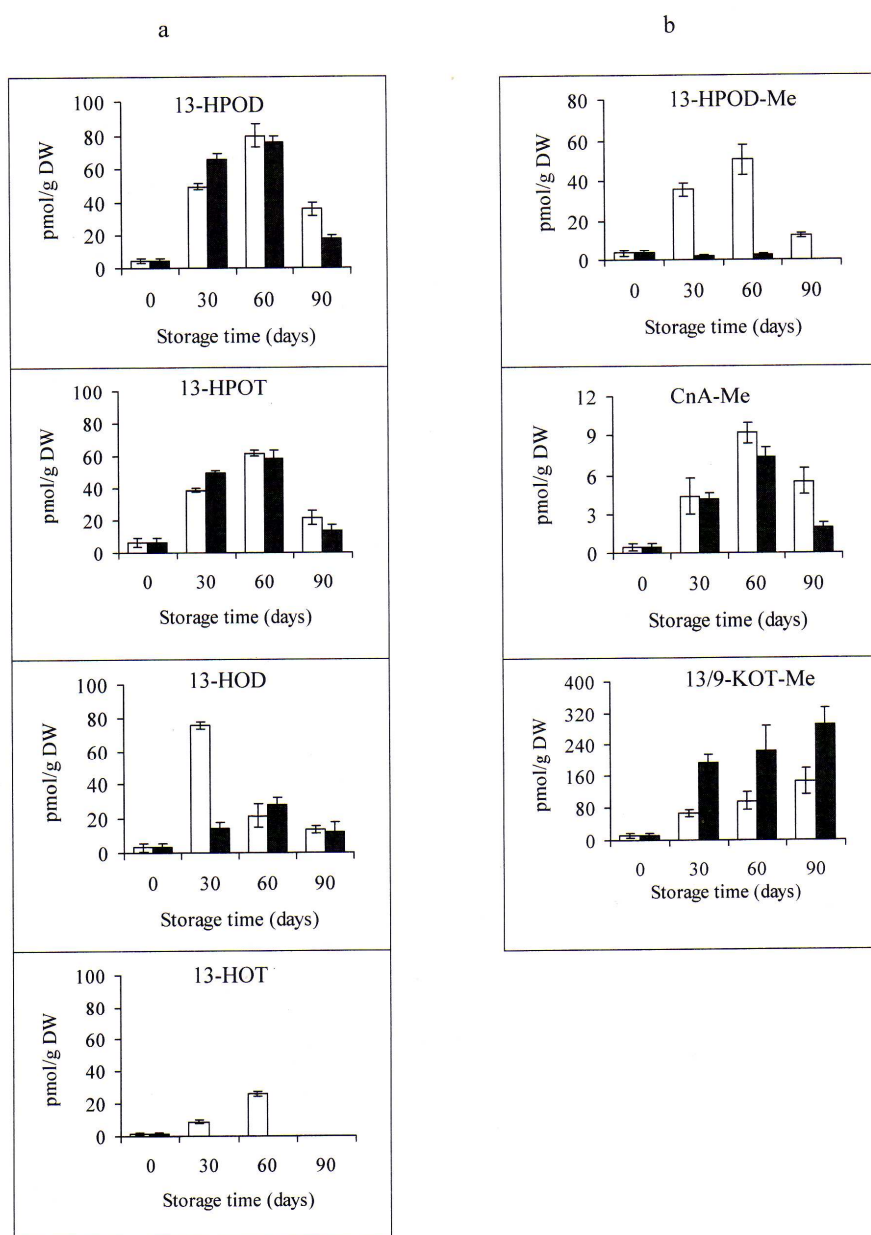


Fig. 4 Free (a) and esterified (b) oxylipin of freeze-dried *W. paramesenteroides* during 90 days in glass tubes with $a_w = 0.23$ at 4°C (white bars) or 20°C (black bars). Bars are presented as means $\pm$ SD ($n = 3$). Me: esterified, DW: dry weight

The main free oxylipins identified were 13-HPOD, 13-hydroperoxy-linolenic acid (13-HPOT), 13-HOD and 13-hydroxy-linolenic acid (13-HOT), as shown in Fig. 4a. 13-HPOD and 13-HPOT accumulated transiently between the 30th and 60th day of storage at 4 or 20°C. 13-HOD and 13-HOT decreased between the 60th and 90th day of storage at 4 or 20°C (from about 22 or 28 pmol/g DW to 14 or 12 pmol/g DW and from about 26 or 0 pmol/g DW to 0 or 0 pmol/g DW, respectively). With regard to esterified oxylipins, we detected 13-HPOD-Me, divinyl ether PUFAs (colnelenic acid, CnA-Me) and oxo PUFAs (keto linolenic acid, KOT-Me), as shown in Fig. 4b. 13-HPOD-Me and CnA-Me accumulated transiently between the 30th and 60th day of storage at 4 or 20°C. Because we could not separate the 9- and 13-derivatives of KOT-Me, we expressed the amounts as the sum of both compounds. 13/9-KOT-Me increased from day 30 and remained at that level till the end of our study. 13/9-KOT-Me increased from about 67 or 192 pmol/g DW to 145 or 289 pmol/g DW during storage at 4 or 20°C, respectively.

Discussion

Freeze-dried *W. paramesenteroides* was stored at 4 or 20°C in vacuum-sealed aluminium foil or glass tubes with $a_w = 0.11$ or 0.23. Viable count and acidification activity were used as a measure of viability. Significant alterations in viable cell and acidification activity of the freeze-dried strain were observed during the storage period. The results are consistent with the conclusions reached by Fayed et al. (1986) who showed a decrease in viable count and acid producing activity of freeze-dried lactic acid bacteria during storage. However, after the 90-day storage period, a higher viable population and acidification activity were noted for freeze-dried *W. paramesenteroides* held at 4°C or in glass tubes with $a_w = 0.11$ than at 20°C or in glass tubes with $a_w = 0.23$, respectively. A better percentage of survival of freeze-dried bacteria during storage at low temperature had been reported previously (Champagne et al. 1996; Wang et al. 2004). The choice of optimal water content during storage is crucial for the stability of dried cultures. The effect of temperature and water activity on acidification activity or survival was in agreement with results reported by other authors who had investigated different freeze-dried strains (Castro et al. 1995; Andersen et al. 1999; Higl et al. 2007). Ishibashi et al. (1985) and Béal and Corrieu (1994) showed that the stability of dried lactic acid bacteria in storage was better in the 0.1-0.2 a_w zone with a dry matter rate of almost 96%. The effect of visible light and/or air on the survival and acidification activity of the freeze-dried strain was demonstrated in the control sample. Better survival percentages and

acidification activity were obtained after the 90-day storage period for freeze-dried *W. paramesenteroides* stored under vacuum and in the dark. It is now well established that storage under vacuum or inert gases gives better stability of freeze-dried cultures compared with aeration conditions (Andersen et al. 1999). Oxygen radicals can damage cell membrane phospholipids (Sigler et al. 1999).

Cellular fatty acids of *W. paramesenteroides* were palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. All these acids had been identified previously in cellular membrane of lactic acid bacteria (Sow et al. 2005) and freeze-dried acetic acid bacteria (Ndoye et al. 2007). The main modifications observed in cellular fatty acid composition of freeze-dried *W. paramesenteroides* during storage in glass tubes were a decrease in the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios. Lower 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios were found for *W. paramesenteroides* after the 90-day storage period at 20°C in glass tubes with $a_w = 0.23$. A full comparison of the data from the present study with those from previous studies is difficult; Cyclopropane (Cyclo 19:0) and 18:1 or Cyclo 19:0 were unsaturated fatty acids identified, rather than 18:2 or 18:3 (Castro et al. 1996; Shoug et al. 2008). Other sources of discrepancy between our results and some data in the literature arise from the different drying methods or the use of protective agents (Teixeira et al. 1996).

The significant increase in 18:2 or 18:3 hydroperoxides was closely correlated with 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio decrease during storage of freeze-dried *W. paramesenteroides* in glass tubes. These results are consistent with the conclusions reached by Krasowska et al. (2002), who showed that linoleic and linolenic acid hydroperoxides play a major role in lipid peroxidation. In summary, we observed four different kinetics of oxylipin appearance during storage. (i) Hydroperoxy fatty acids: they accumulate transiently during storage peaking on the 60th day. Afterwards, they might have decompose into hydroxy and oxo PUFAs. Hydroperoxy fatty acids were rapidly converted mainly into the corresponding hydroxy PUFAs. (ii) Hydroxy PUFAs: they showed the same transient accumulation as that of the hydroperoxides PUFAs. It is unclear as to what they became after degradation. (iii) Divinyl ether PUFAs: they accumulated transiently during storage peaking at the 60th day and might have decomposed into their corresponding oxo fatty acids. (iv) Oxo PUFAs: they start to accumulate from day 30. Whether they were further degraded remains unclear as they did seem to be rather stable, their amounts having stayed the same during the storage. As to whether the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 degradations differed under the two humidity conditions, the following remarks can be made. At $a_w = 0.23$ there was a large decline in the 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio which was correlated with an increase in unesterified and esterified oxylipins:

KOT-Me accumulated rapidly and 13-HPOD (i.e. 13-HPOT) or 13-HOD (i.e. 13-HOT) accumulated and levelled off during storage. In contrast, only 13- or 9-HPOD-Me (i. e. 13- or 9-HOD-Me) were detected at $a_w = 0.11$. The differences could be attributed to (i) a substantial hydrolysis of cellular lipids during storage at high humidity, resulting in free fatty acid production; (ii) a faster decrease in the 18:3/16:0 ratio; and (iii) a faster decomposition of the 9-hydroperoxides. In a previous study Zhang et al. (2007) showed that, an unsaturated fatty acid compound with more double bounds (and/or conjugated double bonds) would be more readily oxidized. The absence of 13-HOT and 13-HPOD-Me observed at 20°C in glass tubes with $a_w = 0.23$ might be related to a high rate of oxidation, giving rise to more significant changes. Hydroperoxides are thermally unstable, decomposing into numerous secondary products (Nawar 1996). A large decrease in the 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio and a rapid accumulation of linoleic or linolenic acids oxylipins during storage of freeze-dried *W. paramesenteroides* at 20°C in glass tubes with $a_w = 0.23$ might be enough to cause higher cell death and/or loss of metabolic activity. Our results confirm the importance that needs to be attached to the control of temperature, atmosphere and residual moisture content of freeze-dried cultures in order to optimize survival and activity during storage.

Acknowledgements

We thank Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology, Karlsruhe, Germany for providing *W. paramesenteroides* LC11.

References

- Andersen AB, Fog-Petersen MS, Larsen H, Skibsted LH (1999) Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as Related to Physical State of Freezing Matrix. *Lebensm-Wiss u-Technol* 32: 540-547
- AOAC (1997) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC USA
- Beal C, Corrieu G (1994) 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 +Technol* 27: 86-92
- Bozoglu TF, Ozilgen M, Bakir U (1987) Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying. *Enz Microbiol Technol* 9: 531-537
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 172-176

- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1996) Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol Lett* 18: 99-104
- Champagne CP, Mondou F, Raymond Y, Roy D (1996) Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res Int* 29: 555-562
- Dimmick RL, Heckly RJ (1961) Free radical formation during storage of freeze dried *Serratia marcescens*. *Nature* 192: 776
- Fayed EO, Sultan NE, Yassien NI, Shehata AE (1986) The effect of lyophilisation on viability and activity of lactic acid bacteria cultivated in whey treated with certain proteolytic enzymes. *Egypt J Food Sc* 14: 313-322
- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: Its mechanisms, measurement, and significance. *Am Clin Nutr* 57: 715s-724s
- Higl B, Kurtmann L, Carlsen CU, Ratjen J, Först P, Skibsted LH, Kulozik U, Risbo J (2007) Impact of water activity, temperature and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnol Prog* 23: 794-800
- Ishibashi N, Tatematsu I, Shimamura S, Tomita M, Okonogi S (1985) Effect of water activity on the viability of freeze-dried bifidobacteria and lactic acid bacteria. *I I R-I I F Commission C1 Tokyo Japan 1985/1*, pp 227-232
- Ito M, Connor WE, Blanchette EJ, Treadwell CR, Vahounny GV (1969) Inhibition of lymphatic absorption of cholesterol by cholestane-3 β ,5,6 β -triol. *J Lipid Res* 10: 694-702
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CMAP (2005) 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* 28: 527-540
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S, Dortu C, Thonart P, Taljaard L, Mengu M, Franz CMA, Hozapfel WH (2007) Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int J Food Microbiol* 114: 342-351
- Krasowska L, Chmielewska L, Gapa D, Prescha A, Vachova L, Sigler K (2002) Viability and formation of conjugated dienes in plasma membrane lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosacharoomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis* and *Candida albicans* exposed to hydrophilic, amphiphilic and hydrophobic pro-oxidants. *Folia Microbiol* 47: 145-151
- 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
- Marshall BJ, Goote GG, Scott WJ (1974) A study of factors affecting the survival of dried bacteria during storage. *Div Food Res Tech Pap* 39: 1-29
- Nawar WW (1996) Lipids. In: Fennema OR (eds) *Food chemistry*, 3rd edn. Marcel Decker, New York, pp 225-319

- Ndoye B, Weekers F, Diawara B, Guiro AT, Thonart P (2007) Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa. *J food Eng* 79: 1374-1382
- Schoug A, Fischer J, Heipieper HJ, Shnürer J, Hakansson S (2008) Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 175-181
- Sigler K, Chaloupka J, Brozmanova J, Stadler N, Höfer M (1999) Oxidative stress in microorganisms-I. *Folia Microbiol* 44: 587-624
- Sow NM, Dubois-Dauphin R, Roblain D, Guiro A-T, Thonart P (2005) Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *Afr J Biotechnol* 4: 409-421
- Teixeira PC, Castro MH, Kirby RM (1996) Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett Appl Microbiol* 22: 34-38
- Wang Y-C, Yu R-C, Chou C-C (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int J Food Microbiol* 93: 209-217
- Yao AA, Bera F, Franz CAMP, Holzapfel W, Thonart P (2008) Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models. *J Food Prot* 71: 431-434
- Zhang W, Shi Bi, Shi Jeff (2007) A theoretical study on autoxidation of unsaturated fatty acids and antioxidant activity of phenolic compounds. *J Am Leather Chem Assoc* 102: 99-105

Article 5

OBJECTIF

Dans l'objectif d'essayer de comprendre certains mécanismes à l'origine de la perte de stabilité des souches lyophilisées au cours du stockage, la souche *Weissella paramesenteroides* LC11, précédemment sélectionnée pour le développement d'une culture starter pour la production de 'gari' (**articles 2 et 3**), a été soumise à différentes conditions de stockage (température, aération, humidité) pendant 90 jours (**article 4**). Des pertes de la viabilité cellulaire et du pouvoir d'acidification ainsi que des baisses dans les rapports acide linoléique (C18 :2)/acide palmitique (C16:0) et acide linolénique (C18:3)/acide palmitique (C16:0) ont été observées au cours du stockage. Une meilleure stabilité (viabilité cellulaire, pouvoir d'acidification) ainsi que des rapports C18:2/C16:0 et C18:3/C16:0 plus élevés ont été obtenus pour les échantillons stockés à basse température et en l'absence d'oxygène (i.e. humidité). Une accumulation de produits primaires de dégradation des acides linoléique et linolénique a été observée pour les échantillons stockés en présence d'oxygène et d'humidité. A l'issue de cette étude, une corrélation a été établie entre la perte de viabilité cellulaire ou du pouvoir d'acidification et la dégradation des acides gras polyinsaturés. L'objectif de la présente étude est de pouvoir confirmer les résultats de la précédente étude d'une part, et d'établir une possible relation entre l'oxydation des lipides et la perte de l'intégrité cellulaire de la souche d'autre part. L'impact de composés protecteurs tels que les cryoprotecteurs et/ou des antioxydants sur la viabilité cellulaire, l'intégrité cellulaire et la dégradation des lipides de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, ont été évalués pendant 90 jours de stockage, dans des conditions renouvelables d'aération et d'humidité. Après le 90^{ième} jour de stockage, les acides gras membranaires totaux ainsi que ceux de la fraction polaire ont également été analysés.

Article 5

Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage

Yao, Amenan A.¹, Bernard Wathelet² and Philippe Thonart^{1,3}

¹ Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, B-4000 Liège, Belgium

² Industrial Biological Chemistry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

³ Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

J. Microbiol. Biotechnol. (2009), In press

Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage

Abstract

The effect of cryoprotectants (maltodextrin+glycerol) and cryoprotectants+antioxidant [ascorbic acid and/or Butylated hydroxytoluene (BHT)] mixtures on the survival, electrolyte leakage and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage was investigated and compared with that of the control (cells without additives) over a 90-day storage period at 4 or 20°C in glass tubes with water activity (a_w) of 0.23. The survival, electrolyte leakage and lipid degradation were evaluated through colony counts, electrical conductivity and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content, respectively. The fatty acids composition was determined by gas chromatography, in both the total lipid extract and the polar lipid fraction, and compared with that of the control after the 90-day storage period. As the storage proceeded, increases in leakage value and TBARS content, as well as a decrease in viability, were observed. After 90 days storage, the major fatty acids found in both the total lipid extract and the polar lipid fraction were palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids. The survival, leakage value, TBARS content and 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio were the greatest for the protected strain held at 4°C. Cells with the cryoprotectants+BHT mixture showed the highest percentage of survival and 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio in both lipid extracts, as well as the lowest leakage value and TBARS content after the 90-day storage period. Drying cells with the cryoprotectants+BHT mixture considerably slowed down polar lipid degradation and loss of membrane integrity, resulting in improved viability during storage.

Key words: Antioxidant, Cryoprotectants, Electrolyte leakage, Lactic acid bacteria, Lipid oxidation, Starter culture

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) for the food industry are commonly freeze-dried for long-term storage. It is now well established that technical parameters such as freezing conditions, rehydration conditions and the presence of protective compounds affect cell survival [27]. Many other 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 an unacceptably high loss of viable cells due to deteriorative chemical reactions. Membrane lipid oxidation was suggested as the cause of cell death during the storage of *Lactobacillus bulgaricus* in the presence of air, high relative humidity and high storage temperature [2, 3]. Oxygen radicals could damage the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of cell membrane phospholipids [6]. Recently, a relationship between loss of viability and change in linoleic/palmitic (18:2/16:0) or linolenic/palmitic (18:3/16:0) ratio of freeze-dried LAB during storage were reported [5, 25]. It was previously reported that free radical chain reaction, which took place during PUFAs oxidation, might lead to the formation of lipid hydroperoxydes which might be decomposed in many secondary products, such as malonic dialdehyde (MDA) [16]. MDA has been identified as the product of PUFAs oxidation that reacts with thiobarbituric acid (TBA) to produce red species collectively termed 'thiobarbituric acid reactive substances' (TBARS) [17]. Apart from chemical damage, cell membranes were also prone to physical damage: changes in phospholipids composition had been related to an increase in membrane permeability, affecting membrane integrity [22]. Thus, UV-absorbing materials, membrane lipids and ions might have leaked from the cells during rehydration [10]. Previously, Martos *et al.* [15] used conductimetry to evaluate the performance of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* during rehydration in milk.

Membrane lipid degradation could be minimized by preventive measures, such as the use of antioxidants. Butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid are currently used to control lipid oxidation in the food industry. Although BHT functions by interfering with the free radical mechanism, ascorbic acid and its derivatives function as antioxidants by protecting double bounds and scavenging oxygen [19]. Teixeira *et al.* [21] found that ascorbic acid and monosodium glutamate provided significant protection to *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* when stored at 4°C. Another form of additives widely used to protect LAB during drying and storage are cryoprotectants. The beneficial effect of the addition of glycerol and maltodextrin either alone [4, 18] or in combination [5] has been clearly associated with

high viability after freeze-drying rather than increased stability during storage. In such a case, the incorporation of an appropriate cryoprotectants-antioxidant mixture could protect the dried bacteria against the degradation that could occur during storage. To the best of our knowledge, no work has been reported that establishes the effect of cryoprotectants (glycerol, maltodextrin) in combination with antioxidants (ascorbic acid, BHT) on the viability, electrolyte leakage and lipid degradation of dried bacteria during storage.

We have previously shown that the survival of freeze-dried *W. paramesenteroides* LC11 was the greatest during storage in aluminium foil (sealed under vacuum) or in glass tubes with water activity (a_w) of 0.11 compared with storage in glass tubes or glass tubes with $a_w = 0.23$, respectively [25]. The aim of this work was to study the effect of cryoprotectants (glycerol, maltodextrin), alone or in combination with antioxidants (BHT and/or ascorbic acid) on the viability, electrolyte leakage and lipid degradation of *W. paramesenteroides* stored at 4 or 20°C in glass tubes with $a_w = 0.23$. The electrolyte leakage and lipid degradation were studied by measuring the electrical conductivity during rehydration and TBARS content, respectively. The effect of the mixtures after 90 days storage on the 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio in both the total lipid extract and the polar lipid fraction was determined and compared with that of the control. Previously, *W. paramesenteroides* LC11 had been isolated during cassava fermentation and was selected as a suitable starter culture for gari production [12, 13, 26].

Materials and Methods

Microorganism

The LAB *W. paramesenteroides* LC11 was provided by the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology (Karlsruhe, Germany). The strain was inoculated in MRS broth and incubated at 30°C for 18 h. Cells obtained after centrifugation (2500×*g*, 20 min) were maintained in 50% (v/v) glycerol and frozen at -80°C.

Productions, treatment and storage

The strain was grown in a 500 l bioreactor containing MRS medium for 18 h, concentrated 20 times by centrifugation, and then the following mixtures were added: (PC), cryoprotectants (maltodextrin [50 mg/g]+glycerol [20 mg/g]); (PCA), cryoprotectants+ascorbic acid [0.2 mg/g]; (PCB), cryoprotectants+BHT [0.075 mg/g]; (PCAB), cryoprotectants+ascorbic acid [0.2 mg/g]+BHT [0.075 mg/g]). Cell suspensions without protective compounds were used as the control (P). The cell suspensions were freeze-dried in a Low freeze-drier (Leybold,

Belgium) as described by Yao *et al.* [25]. Freeze-dried powders of about 2 ± 0.5 g were stored in 20 ml glass tubes for 90 days at 4 and 20°C in a desiccator over potassium acetate (CH_3COOK) as a saturated salt solution with $a_w = 0.23$.

Dry cell weight and water activity

The dry cell weight was determined after drying in a convection oven (105°C) until constant weight and the results were the mean of four determinations. a_w of the saturated salt solution was confirmed using a Novasina (Novasina, Pfäffikon, Switzerland) water activity meter.

Survival

The viable counts were obtained using the plate count method after 48 h at 30°C. Percentage survival was calculated as $100 \times N/N_0$, where N is the CFU/g DW at a given time and N_0 is the CFU/g DW at the end of freeze-drying.

Electrolyte leakage

For the analysis, 0.5 g of powder was soaked in Milli Q water (10 ml) for 4 h at room temperature. The electrical conductivity (ms/cm.g DW) of the solution was measured using a ProfiLine Multi 197i (WTW GmbH, Weilheim, Germany) conductivity meter. Total conductivity was obtained after autoclaving the samples at 112°C for 20 min. The results were expressed as percentage of total conductivity.

Lipid oxidation

Lipid oxidation was estimated as TBARS content, following the method described by Raharjo *et al.* [17], and modified as described here. Freeze-dried samples (1 g of powder), 25 μl of 3 mM BHT and 40 ml of 5% (w/v) aqueous trichloroacetic acid (TCA) were homogenized in a blender for 1 min. The supernatant obtained after centrifugation ($2500 \times g$, 10 min) was filtered into a 50 ml volumetric flask. The volume of the filtrate was adjusted to 50 ml with 5% (w/v) TCA. A 2 ml portion of the filtrate was mixed with 2 ml of 80 mM TBA at 96°C in a water bath for 60 min. The samples were then put on ice to stop the reaction. After cooling, 150 μl of 37% HCl and 2 ml *n*-butanol were added. The TBA-MDA complex was extracted from the upper phase after decanting, using a Pasteur-pipette, and the absorbance was recorded at 530

nm. The TBARS content was expressed as mg eq. MDA/g DW using an extinction coefficient of $1.48 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20].

Total lipids extraction and fractionation

The total lipids were extracted overnight from dried cells (1g) with an ethanol-ether (3:1 v/v) mixture, as described by Yao *et al.* [25]. Ethanol/ether extracts were pooled, filtered and then evaporated and concentrated under reduced pressure at 35°C. The polar lipid fraction was obtained from the total lipid extract, using the acetone precipitation method described by Vandana *et al.* [23] and modified as follows: total lipid extract was dissolved in 2 ml acetone, mixed for 1 min, and left on ice 1 h; the acetone layer, containing non-polar lipids, was decanted; and then the same procedure was repeated three times and acetone was removed under reduced pressure at 35°C. Thereafter, the acetone-insoluble precipitate, enriched in phospholipids, was dried under vacuum. The phospholipid extract (polar lipid fraction) was dissolved in an ethanol-ether (3:1v/v) mixture and then stored at -80°C until further analysis.

Analysis of fatty acids

The fatty acids composition, in both the total lipid extract and the polar lipid fraction, was determined after the 90-day storage period. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from the lipid extracts and identified using a gas chromatographic analysis as described by Yao *et al.* [25]. The fatty acid relative content (%) was estimated as a percentage of the total peak area. The percentage of linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids were normalized by expressing it as a ratio of the percentage of palmitic (16:0) acid [25].

Data analysis

Production in the bioreactor was done in duplicate. In order to estimate the impact of storage conditions on the electrolyte leakage or lipid oxidation (TBARS content), only the newly released electrolyte or produced MDA-TBA complex was taken into account and expressed in relative terms as $(EC_t - EC_0)/g$ or $(MDA_t - MDA_0)/g$ DW, where EC_0 or MDA_0 and EC_t or MDA_t represent electrical conductivity or TBARS content at the end of freeze-drying and at each storage time, respectively. The data were compared using Tukey's honestly significant difference (Statistica 7.1, StatSoft Inc., 2005). The level of significance was determined at $P < 0.05$.

Results

The effect of the protective compounds on survival

The LAB *W. paramesenteroides* was produced in a bioreactor, added with different mixtures as protective compounds, then freeze-dried and held at 4 or 20°C in glass tubes with $a_w = 0.23$ for 90 days. The effects of the cryoprotectants (maltodextrin+glycerol) and cryoprotectants+antioxidant (ascorbic acid and/or Butylated hydroxytoluene (BHT)) mixtures on the survival were compared with those of the control (cells without protective compounds).

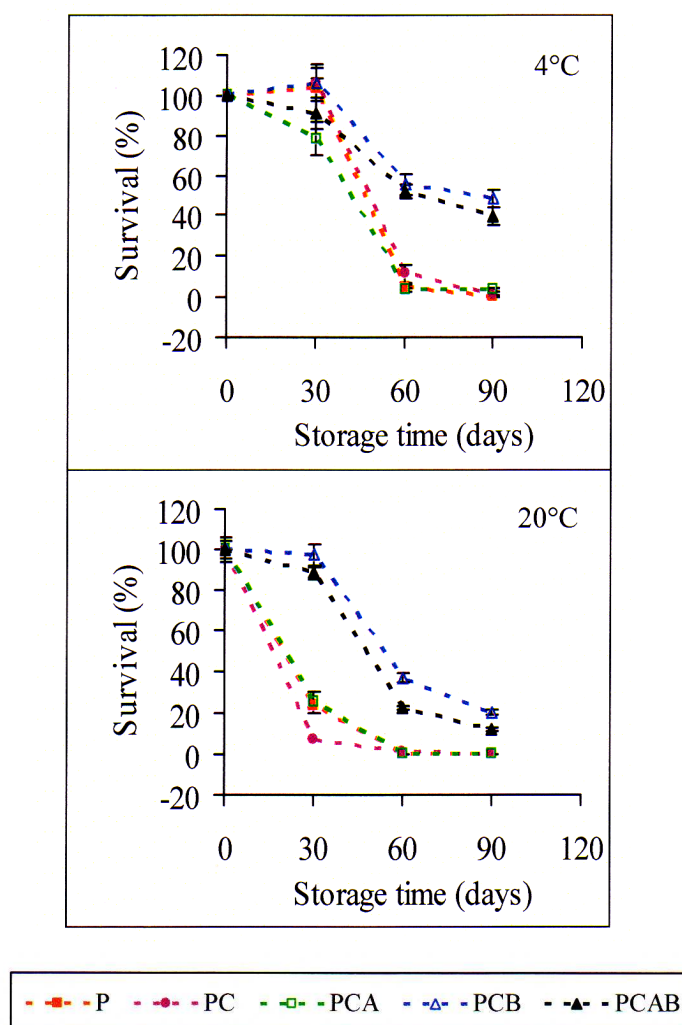


Fig.1. The effect of protective compounds on the survival of freeze-dried *W. paramesenteroides* stored for 90 days in a glass tube with $a_w = 0.23$. P, control; PC, cells with cryoprotectants (maltodextrin+glycerol); PCA, cells with cryoprotectants+ascorbic acid; PCB, cells with cryoprotectants+BHT; PCAB, cells with cryoprotectants+ascorbic acid+BHT. Values are presented as means $\pm$ standard deviation (SD, $n = 4$).

Table 1 The effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, TBARS content of freeze-dried *W. paramesenteroides* and water content of dried samples after 90-day storage

Storage Temperature (°C)	Treatment ^a	Moisture content (%)	Survival		Electrolyte leakage		TBARS
			cfu/g DW	(%) ^b	Electrical conductivity (ms/cm g DW)	(%) ^c	(mg/kg DW) ^d
4	P	11.4 ± 0.6 ^{a*}	4.4*10 ⁹	≤ 0.1 ^a	98.0 ± 3.0	13.9 ± 0.9 ^{ac}	2.0 ± 0.4 ^a
	PC	12.3 ± 0.3 ^a	4.1*10 ⁹	0.8 ± 0.2 ^a	81.3 ± 4.6	13.5 ± 1.5 ^{ac}	2.1 ± 0.3 ^{ac}
	PCA	12.2 ± 0.8 ^a	2.7*10 ¹⁰	3.7 ± 0.6 ^a	72.6 ± 1.4	13.4 ± 2.1 ^{ac}	4.0 ± 0.7 ^b
	PCB	12.7 ± 0.3 ^a	2.6*10 ¹¹	48.1 ± 4.5 ^b	70.9 ± 3.2	7.5 ± 0.9 ^a	0.8 ± 0.3 ^c
	PCAB	12.4 ± 0.7 ^a	3.2*10 ¹¹	39.4 ± 3.3 ^c	69.3 ± 3.9	9.5 ± 1.2 ^a	4.2 ± 0.9 ^b
20	P	11.2 ± 0.3 ^a	5.3*10 ⁷	< 0.01 ^a	101.9 ± 5.2	32.2 ± 2.7 ^b	2.8 ± 0.6 ^a
	PC	12.5 ± 0.4 ^a	4.5*10 ⁷	≤ 0.01 ^a	83.5 ± 3.0	22.6 ± 2.0 ^c	2.8 ± 0.5 ^{ab}
	PCA	12.3 ± 0.8 ^a	1.9*10 ⁸	≤ 0.03 ^a	78.5 ± 4.7	28.8 ± 3.3 ^{bc}	6.1 ± 0.9 ^d
	PCB	12.5 ± 0.9 ^a	1.1*10 ¹¹	20.2 ± 4.6 ^d	75.3 ± 4.0	9.7 ± 0.8 ^a	1.4 ± 0.3 ^{ac}
	PCAB	11.8 ± 0.8 ^a	1.0*10 ¹¹	12.2 ± 1.5 ^d	76.4 ± 1.9	20.4 ± 3.1 ^{ac}	6.3 ± 1.1 ^d

cfu, unit forming colonies

*a-d Values not sharing the same superscript letter within vertical line are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

^a P, control; PC, cryoprotectants (maltodextrin+glycerol); PCA, cryoprotectants+ascorbic acid; PCB, cryoprotectants+BHT; PCAB, cryoprotectants+ascorbic acid+BHT

^b Percentage compared with those obtained after freeze-drying. Initially, P, PC, PCA, PCB or PCAB with a water content of 3.6, 4.3, 4.0, 3.9 or 3.7 g H₂O/100 g DW contained 8.6*10¹¹, 5.6*10¹¹, 7.7*10¹¹, 6.0*10¹¹ or 9.0*10¹¹ cfu/g of *W. paramesenteroides*, respectively

^c Values compared with those obtained after freeze-drying. Initially the electrical conductivity for P, PC, PCA, PCB or PCAB was 80.2, 66.2, 67.9, 67.2 or 67.5 ms/cm g DW and represented 84.3, 83.1, 89.4, 76.0 or 84.7% of total electrolyte (after 20 min at 112°C), respectively

^d Values compared with initial values. TBARS value at the end of freeze-drying for P, PC, PCA, PCB or PCAB was 0.07, 0.09, 0.08, 0.09 or 0.12 mg/kg DW, respectively

It was found that, regardless of storage temperatures and treatments, the survival of the treated strain decreased as the storage time increased (Fig. 1). However, after the 90-day storage period, a significantly higher viable population was noted in dried samples held at 4°C, compared with those stored at 20°C ($P < 0.05$) (Table 1). Survival rates were significantly higher for PCB compared with those of PC, PCA or PCAB after 90 days storage. For example, the viable population for PCB was reduced from an initial population of 6.0×10^{11} cfu/g to 2.6×10^{11} or 1.1×10^{11} cfu/g with a survival of 48% or 20% after 90 days at 4°C or 20°C, respectively. After 90 days at 4°C or 20°C, the survival rates for PC and PCA were statistically the same and did not differ significantly from that of the control ($P > 0.05$). Among the mixtures tested, the one that resulted in the highest survival was the association of cryoprotectants with BHT. At the end of freeze-drying, the water content for P, PC, PCA, PCB or PCAB was 3.6 ± 0.6 , 4.3 ± 0.4 , 4.0 ± 0.3 , 3.9 ± 0.5 or 3.9 ± 0.5 g H₂O/100 g DW with $a_w = 0.09 \pm 0.01$, respectively. After the 90-day storage period at 4°C and 20°C, the water content did not differ significantly among the samples ($P > 0.05$) (Table 1).

The effect of the protective compounds on electrolyte leakage

The electrolyte leakage for both treated samples and the control increased with the storage time (Fig. 2). Decreases in membrane integrity were observed, and this was reflected in the increased amount of electrolyte leaking from the cell during rehydration. However, after the 90-day storage period, a significantly lower leakage value was noted in dried samples held at 4°C or with BHT, compared with those stored at 20°C or the other protective compounds (cryoprotectants, ascorbic acid), respectively ($P < 0.05$) (Table 1). For example, the leakage value for PCB increased from the original value by 7.5% with an electrical conductivity of only 70.9 ms/cm g at 4°C, compared with a larger increase from the original value by 9.7% with an electrical conductivity of 75.3 ms/cm g at 20°C after 90 days at 4°C or 20°C, respectively (Fig. 2, Table 1). After the 90-day storage period at 4 or 20°C, the leakage value for PCB was approximately 6% or 22% lower than that of the control, respectively. In the same conditions, the leakage value for PC and PCA were statistically the same and did not differ significantly from that of the control ($P > 0.05$). The lowest leakage value after 90 days storage was obtained with the cryoprotectants+BHT mixture.

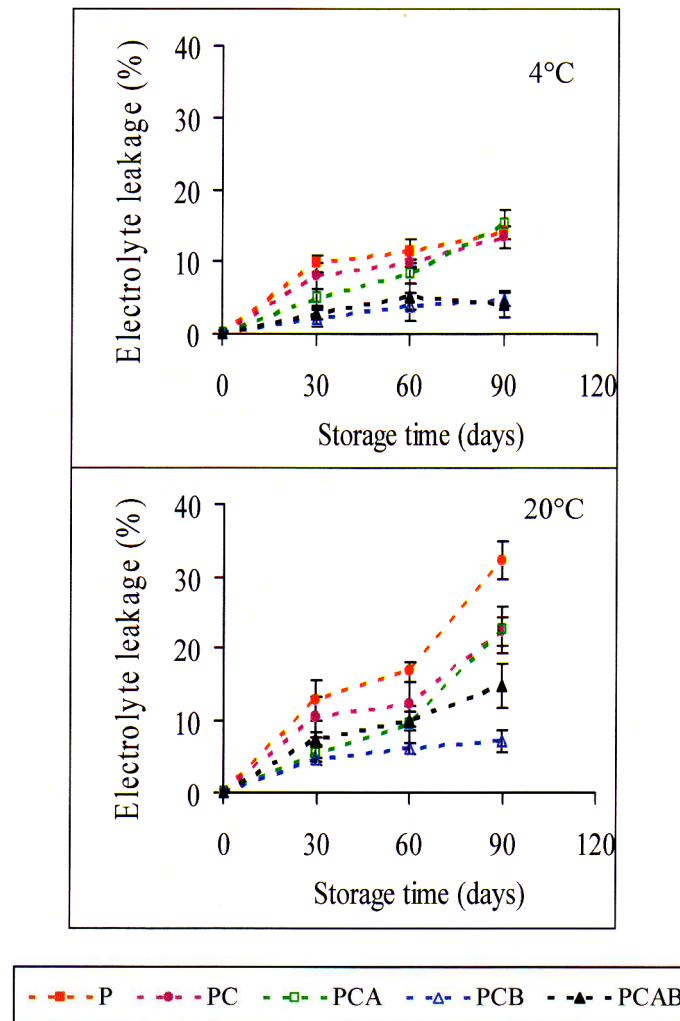


Fig.2. The effect of protective compounds on the electrolyte leakage of freeze-dried *W. paramesenteroides* stored for 90 days in a glass tube with $a_w=0.23$. P, control; PC, cells with cryoprotectants (maltodextrin+glycerol); PCA, cells with cryoprotectants+ascorbic acid; PCB, cells with cryoprotectants+BHT; PCAB, cells with cryoprotectants+ascorbic acid+BHT. The electrolyte leakage values represent the difference compared with initial values. Values are presented as means $\pm$ SD ($n = 4$).

The effect of the protective compounds on lipid oxidation

The effect of the four mixtures on lipid oxidation (TBARS content) during the storage of freeze-dried *W. paramesenteroides* is shown in Fig. 3 and Table 1. The TBARS content increased during the storage period; however, the level of lipid oxidation for samples stored at 4°C or PCB mixture was significantly lower compared with those stored at 20°C or the other

samples (P, PCA, PCAB), respectively ($P < 0.05$). After the 90-day storage period at 4 or 20°C, the TBARS content for PCB was approximately 1.2% or 1.4% lower than that of the control, respectively. On the contrary, the TBARS content for PCA and PCAB were 2.0% or 3.4% and 2.2% or 3.6% higher than that of the control, respectively (Table 1). The TBARS content did not change significantly between PC and the control ($P > 0.05$). The highest protection against lipid oxidation during storage was obtained with the cryoprotectants+BHT mixture.

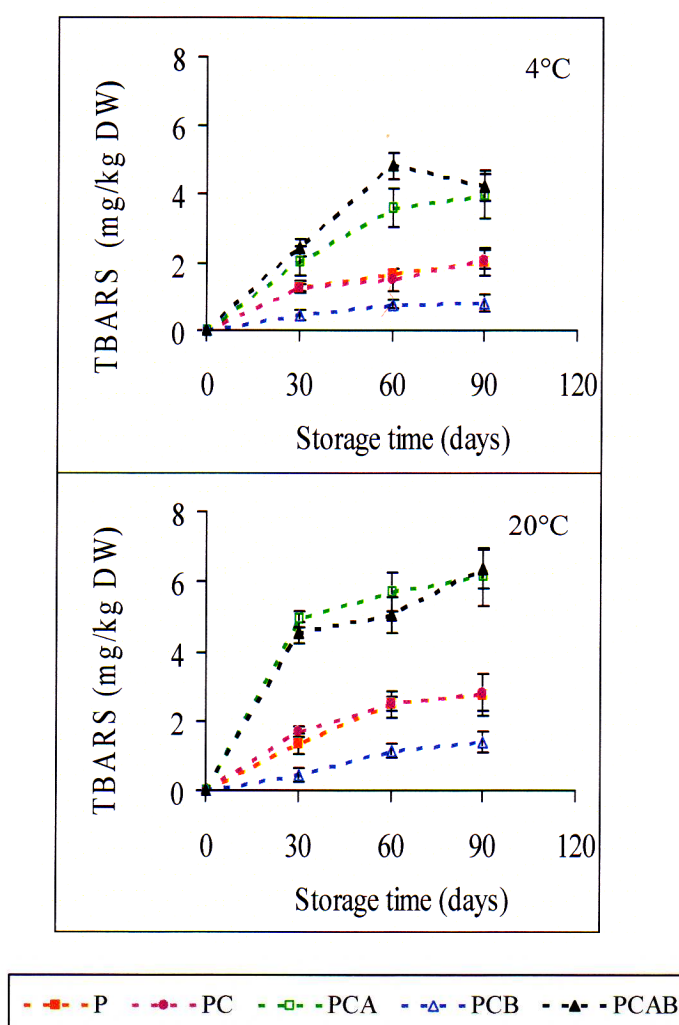


Fig.3. The effect of protective compounds on the TBARS content of freeze-dried *W. paramesenteroides* stored for 90 days in a glass tube with $a_w = 0.23$. P, control; PC, cells with cryoprotectants (maltodextrin+glycerol); PCA, cells with cryoprotectants+ascorbic acid; PCB, cells with cryoprotectants+BHT; PCAB, cells with cryoprotectants+ascorbic acid+BHT. The TBARS values represent the difference compared with initial values. Values are present as means $\pm$ SD ($n = 4$).

The effect of the cryoprotectants+BHT mixture on fatty acids composition

The protective effect of the cryoprotectants+BHT mixture on the fatty acids composition of the total lipid extract and the polar lipid fraction was compared to that of the control after the 90-day storage period (Table 2, Table 3). In both the total lipid extract and polar lipid fraction, the major fatty acids found were palmitic (16:0), oleic (18:1), stearic (18:0), palmitoleic (16:1), linolenic (18:3) and linoleic (18:2) acids. The percentage of 16:0 remained high and did not change significantly during storage, as described earlier under Materials and Methods. Therefore, the percentages of the other fatty acids were expressed as a ratio between each fatty acid and the 16:0. The 16:1/16:0, 18:0/16:0 and 18:1/16:0 ratios did not change significantly during the storage period (data not shown).

Table 2 The effect of the cryoprotectants+BHT mixture on fatty acids composition of the total lipid extract after 90-day storage

Fatty acid (s)	Storage temperature (°C)			
	4		20	
	P	PCB	P	PCB
Percentage of total ^a				
16:0	54.2 ± 1.9	54.3 ± 0.5	53.3 ± 1.6	54.0 ± 1.1
16:1	9.1 ± 0.9	5.2 ± 0.3	7.9 ± 1.5	5.1 ± 1.7
18:0	9.5 ± 0.7	12.2 ± 1.4	9.8 ± 0.5	12.0 ± 1.3
18:1	24.8 ± 1.2	22.5 ± 0.8	27.8 ± 2.3	24.9 ± 1.1
18:2	0.4 ± 0.0	2.1 ± 0.4	0.3 ± 0.1	1.6 ± 0.6
18:3	2.0 ± 0.3	3.7 ± 0.7	0.9 ± 0.1	2.3 ± 0.4
Σ	100.0	100.0	100.0	100.0
100 × Ratio ^b				
18:2/16:0	0.8	3.9	0.6	2.9
18:3/16:0	3.7	6.9	1.7	4.2
Percentage of initial ratio ^c				
18:2/16:0	51.5 ± 3.7 ^{a*}	83.2 ± 4.7 ^b	37.2 ± 5.6 ^a	61.9 ± 6.4 ^c
18:3/16:0	38.5 ± 4.9 ^a	73.8 ± 3.5 ^b	18.0 ± 2.2 ^c	45.0 ± 5.2 ^a

P, control; PCB, cells with cryoprotectants+BHT

Palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2), and linolenic (18:3) acids

*a-c Values not sharing the same superscript letter within horizontal line are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

^a Percentage of total fatty acids content

^b Values represent ratio between each fatty acid and the 16:0

^c Percentage compared with those obtained after freeze-drying. Initially, 18:2/16:0 and 18:3/16:0 acid ratios for P or PCB were 0.02 and 0.10 or 0.05 and 0.10, respectively

Table 3 The effect of cryoprotectants+BHT mixture on fatty acids composition of the polar lipid fraction after 90-day storage

Fatty acid (s)	Storage temperature (°C)			
	4		20	
	P	PCB	P	PCB
Percentage of total ^a				
16:0	51.1 ± 2.3	53.6 ± 1.1	54.3 ± 1.0	53.0 ± 1.0
16:1	9.5 ± 1.4	6.3 ± 0.8	8.4 ± 0.9	6.5 ± 1.1
18:0	11.5 ± 1.1	11.3 ± 0.9	11.8 ± 0.8	12.5 ± 0.9
18:1	26.6 ± 2.1	23.6 ± 1.2	24.7 ± 1.7	25.1 ± 0.8
18:2	0.6 ± 0.2	2.2 ± 0.7	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2
18:3	1.1 ± 0.3	2.8 ± 0.4	0.7 ± 0.2	1.8 ± 0.5
Σ	100.0	100.0	100.0	100.0
100 × Ratio ^b				
18:2/16:0	1.2	4.2	0.7	2.0
18:3/16:0	2.2	5.3	1.2	3.3
Percentage of initial ratio ^c				
18:2/16:0	44.6 ± 5.6 ^{ac*}	82.6 ± 5.8 ^b	24.1 ± 5.0 ^a	40.0 ± 3.9 ^c
18:3/16:0	27.4 ± 1.7 ^a	61.7 ± 2.8 ^c	15.0 ± 3.2 ^c	38.7 ± 4.4 ^d

P, control; PCB, cells with cryoprotectants+BHT

Palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2), and linolenic (18:3) acids.

*^{a-d} Values not sharing the same superscript letter within horizontal line are significantly different $P < 0.05$ (Tukey HSD test, $n = 4$)

^a Percentage of total fatty acids content

^b Values represent ratio between each fatty acid and the 16:0

^c Percentage compared with those obtained after freeze-drying. Initially, 18:2/16:0 and 18:3/16:0 acid ratios for P or PCB were 0.03 and 0.09 or 0.06 and 0.09, respectively

The main modification observed, was a decrease in the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratio (data not shown). After the 90-day storage period, the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios for samples stored at 4°C were significantly higher than for those stored at 20°C ($P < 0.05$) (Table 2, Table 3). For example, the 18:3/16:0 ratio in the total lipid extract or the polar lipid fraction of PCB decreased from the original value by 26% or 55%, with a ratio reduction of only 0.03 or 0.04 at 4°C compared with the larger decrease from the original value by 38% or 61% with a ratio reduction of 0.06 at 20°C, respectively. After 90 days at 4 or 20°C, the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios in the total lipid extract of PCB were 32% or 25% and 35% or 27% higher than those of the control, respectively.

Similarly, the 18:2/16:0 and 18:3/16:0 ratios in the polar lipid fraction of PCB were 38% or 16% and 34% or 24% higher than those of the control, respectively. After the 90-day storage period, the cryoprotectants, cryoprotectants+ascorbic acid and cryoprotectants+ascorbic acid+BHT mixtures showed lower 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio in both the total lipid extract and polar lipid fraction and there was no significant difference from those of the control (data not shown).

Discussion

The effect of cryoprotectants (maltodextrin+glycerol) and cryoprotectants+antioxidant (ascorbic acid and/or BHT) mixtures on the viability, electrolyte leakage and lipid degradation (TBARS content) of freeze-dried *W. paramesenteroides* stored in glass tubes was investigated and compared with that of the control. Significant alterations in the viable cell of the protected strain, but lower than that of the control, were observed during the storage period. However, differences in the viability of the protected strain were observed, indicating different protective abilities of the mixtures used. The cryoprotectants+BHT mixture was the best protectant after 90 days storage at 4 and 20°C, giving a cell viability of about 48% and 20% compared with 0.1% and 0.01% for the control, respectively. Our results showed that the storage temperature and moisture were critical parameters affecting the survival of the strain. A better percentage of survival of freeze-dried bacteria during storage at low temperatures [24] and in the 0.1-0.2 a_w zone with a dry-matter rate of almost 96% [11] had been reported previously. Our results also showed that neither the cryoprotectants mixture nor the control significantly improved survival during storage. Coulibaly *et al.* [5] demonstrated that *Lactobacillus plantarum* CWBI-B534 cell recoveries ranged from 97% after freeze-drying, using a 5% maltodextrin+ 2% glycerol mixture. It is now well established that cryoprotectants are almost indispensable when freezing and drying microorganisms, but the contribution of these compounds to the stability of dried microorganisms during storage has been discussed [7]. After the 90-day storage period, cellular fatty acids in both the total lipid extract and the polar lipid fraction of *W. paramesenteroides* were palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids. All these acids had been identified previously in the cellular membrane of freeze-dried LAB [5]. As the storage proceeded, increases in leakage value and TBARS content were observed, with a corresponding decrease in viable cell.

However, lowest TBARS content and leakage value, as well as highest percentage survival and 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio in the polar lipid fraction of PCB, were obtained after 90°C days at 20°C. These results suggest that the cryoprotectants+BHT mixture could increase oxidative tolerance by reducing membrane lipid damage. The protection bestowed by the cryoprotectants+BHT mixture could derive from a reaction between the peroxy or oxy-free radicals and the antioxidant (BHT). It was reported that antioxidants scavenge chain-carrying peroxy radicals, and reduce the formation of the radicals that increase membrane leakage [1]. After 90 days at 20°C, while TBARS content for PCA or PCAB (sample containing ascorbic acid) was approximately 3.4% or 3.6% higher than that of the control, the amount of electrolytes leaking from the cell during rehydration was 3.5% or 11.8% lower than that of the control, respectively. This could be because ascorbic acid was much more susceptible to degradation than BHT during storage. Our results are in complete agreement with those of Hayashi *et al.* (1985) [8] who reported that ascorbic acid-protein mixtures of low moisture content stored in aerobic conditions became red, resulting from an amino-carbonyl reaction of oxidized ascorbic acid. Furthermore, the significance and specificity of the TBA reaction has been previously discussed [14]. A full comparison of the data from the present study with those from previous studies is difficult. Some sources of discrepancy between our results and the data in the literature arise from the different microorganisms and storage conditions, as well as from the nature and concentrations of protective compounds used [4, 21].

We could suggest that a large reduction in the 18:2/16:0 or 18:3/16:0 ratio in the polar lipid fraction of *W. paramesenteroides* after 90 days storage at 20°C might contribute to the greater TBARS content and derive partly from polar lipid degradation. It is possible that the breakdown of polar lipids as a consequence of lipid oxidation with the accumulation of MDA might lead to the loss of membrane integrity. Loss of membrane structure might therefore result in electrolyte leakage and, ultimately, in loss of viability. This hypothesis is in agreement with previous studies, as Castro *et al.* [2] have shown that the decline in viability during the storage of freeze-dried *lactobacilli* could be attributed to further membrane damage by oxidation, and as proposed by Selmer-Olsen *et al.* [18]. In addition, Borsos-Motovina and Blake [1] showed that electrolyte leakage could be a measure of the loss of membrane integrity from membrane damage. Altogether, the results from the present study and those from our previous work on PUFAs degradation during storage of the freeze-dried *W. paramesenteroides* [5, 25] are in agreement with the motion that membrane lipid degradation and survival of freeze-dried bacteria might be related. A rapid decrease in viability tended to occur during the early storage period, while changes in TBARS content and leakage value of

the dried strain were found to increase with time. Mechanical damage, linked to intracellular ice formation and recrystallization during freezing, might affect the integrity of the cell structure [9]. Solutes might leak from injured cells more rapidly during rehydration because the membrane could be mechanically ruptured by the dehydration treatment or because the permeability of an intact membrane could be altered. To make this distinction, changes in membrane permeability of *W. paramesenteroides* after freeze-drying need to be assessed. In addition, further research is needed to identify the polar lipids which are oxidized or degraded during the storage of freeze-dried strain.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology (Karlsruhe, Germany) for providing *Weissella paramesenteroides* LC11, I. Coulibaly, M. Harden for their technical support on fatty acids analysis and P. Mottet for his help during preparation of the manuscript.

References

1. Borsos-Matovina, V. and T. J. Blake. 2001. Seed treatment with the antioxidant Ambiol enhances membrane protection in seedlings exposed to drought and low temperatures. *Trees* **15**: 163-167.
2. Castro, H. P., P. M. Teixeira, and R. Kirby R. 1996. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol. Lett.* **18**: 99-104.
3. Castro, H. P., P. M. Teixeira, and R. Kirby. 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 172-176.
4. Champagne, C. P., F. Mondou, Y. Raymond, and D. Roy. 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **29**: 555-562.
5. Coulibaly, I., A. A. Yao, G. Lognay, J. Destain, 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.
6. Halliwell, B. and S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: Its mechanisms, measurement, and significance. *Am. Clin. Nutr.* **57**: 715s-724s.
7. Hamoudi, L., J. Goulet, and C. Ratti. 2007. Effect of protective agents on the viability of *Geotricum candidum* during freeze-drying and storage. *Food Microbiol. Food Saf.* **72**: M45-M49.

8. Hayashi, T., A. Terao, S. Ueda, and M. Namiki. 1985. Red pigment formation by the reaction of oxidized ascorbic acid and protein in a food model system of low moisture content. *Agrc. Biol. Chem.* **49**: 3139-3144.
9. Heckly, R. J. 1985. Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Dev. Ind. Microbiol.* **26**: 379-395.
10. Hurst, A. 1977. Bacterial injury: a review. *Can. J. Microbiol.* **23**: 936-944.
11. Ishibashi, N., I. Tatematsu, S. Shimamura, M. Tomita, and S. Okonogi. 1985. *Effect of water activity on the viability of freeze-dried bifidobacteria and lactic acid bacteria*, pp. 227-232. I. R.-I. I. F. Commission C1, Tokyo, Japan.
12. Kostinek, M., I. Specht, V. A. Edward, C. Pinto, M. Egounlety, C. Sossa, S. Mbugua, C. Dortu, P. Thonart, L. Taljaard, M. Mengu, C. M. A. P. Franz, and W. H. Hozapfel. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **114**: 342-351.
13. Kostinek, M., I. Specht, V. A. Edward, U. Schillinger, C. Hertel, W. H. Hozapfel and C. M. A. P. Franz. 2005. 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.* **28**: 527-540.
14. Lefèvre, G., M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle, D. Bonnefont-Rousselot, J. P. Cristol, P. Thérond, and J. Torrelles. 1998. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann. Biol. Clin.* **56**: 305-319.
15. Martos, G. I., A. P. Ruiz Holgado, G. Oliver, and G. F. De Valdez. 1999. Use of conductimetry to evaluate *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* subjected to freeze-drying. *Milchwissenschaft* **54**: 128-130.
16. Raharjo, S. and J. N. Sofos. 1993. Methodology for measuring malondialdehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Sci.* **35**: 145-169.
17. Raharjo, S., J.N. Sofos, and G. R. Schmidt. 1992. Improved speed, specificity, and limit determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 2182-2185.
18. Selmer-Olsen, E., S. E. Birkeland, and T. Sørhaug. 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.
19. St Angelo, A. J. 1996. Lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**: 175-224.
20. Tarladgis, B.O., A. M. Pearson, and L. R. Jr Dugan. 1964. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods: (II) formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *J. Sci. Food Agric.* **15**: 602-607.
21. Teixeira, P.C., M.H. Castro, F. X. Malcata, and R. M. Kirby. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray drying. *J. Dairy Sci.* **78**: 1025-1031.

22. van Ginkel, G. and A. Sevanian. 1994. Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. *Methods Enzymol.* **233**: 273-288.
23. Vandana, V., M. S. L. Karuna, P. Vijayalakshmi, and R. B. N. Prasad. 2001. A simple method to enrich phospholipid content in commercial soybean lecithin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**: 555-556.
24. Wang, Y.-C., R.-C. Yu, and C.-C. Chou. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int. J. Food Microbiol.* **93**: 209-217.
25. Yao, A. A., I. Coulibaly, 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.
26. Yao, A. A., F. Bera, C. M. A. P. Franz, W. H. Holzapfel, and P. Thonart P. 2008. Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models. *J. Food Prot.* **71**: 431-434.
27. Zhao, G. and G. Zhang. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 333-338.

Article 6

OBJECTIF

Dans l'objectif d'essayer de comprendre certains mécanismes à l'origine de la perte de stabilité des souches lyophilisées au cours du stockage la souche *Weissella paramesenteroides* LC11, précédemment sélectionnée pour le développement d'une culture starter pour la production de 'gari' (**articles 2 et 3**), a été soumise à différentes conditions de stockage (température, aération, humidité) pendant 90 jours (**article 4**). A l'issue de cette étude, une corrélation a été établie entre la perte de viabilité cellulaire ou du pouvoir d'acidification et la dégradation des acides gras polyinsaturés. Dans l'optique de confirmer ces résultats, l'impact de composés protecteurs tels que les cryoprotecteurs et/ou des antioxydants (acide ascorbique et/ou butyle hydroxytoluène) sur la viabilité cellulaire, l'intégrité cellulaire et la dégradation des lipides de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, ont été évalués pendant 90 jours de stockage (**article 5**). Les échantillons ont été stockés dans des tubes en verre eux-mêmes stockés à une activité d'eau de 0.23 et entreposés à 4°C ou 20°C. Après le 90^{ième} jour de stockage, les acides gras membranaires totaux ainsi que ceux de la fraction polaire ont également été analysés. La présence des cryoprotecteurs et du butyle hydroxytoluène avait considérablement réduit la dégradation des lipides de la fraction polaire au cours du stockage de la souche *W. paramesenteroides* LC11. Il s'en était suivi une meilleure intégrité cellulaire et une meilleure viabilité cellulaire. Une possible relation entre l'oxydation des acides gras polyinsaturés, plus précisément ceux de la fraction polaire des lipides, et la perte de viabilité cellulaire au cours du stockage des souches lyophilisées, a pu être confirmée. Des corrélations entre, l'oxydation des acides gras polyinsaturés de la fraction polaire des lipides et la perte d'intégrité cellulaire au cours du stockage d'une part, la perte d'intégrité cellulaire et la perte de viabilité cellulaire d'autre part, ont été établies. Nous avons cependant noté que la perte de viabilité cellulaire survenait dès les premières heures du stockage, que la souche soit protégée ou non. L'objectif de la présente étude est d'essayer de comprendre certains mécanismes à l'origine de la perte de viabilité cellulaire durant les premières heures du stockage. Pour ce faire, les changements dans la perméabilité cellulaire de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11 ont été étudiés, à travers les déterminations du nombre de cellules viables et de la conductivité d'une solution de réhydratation dont on a fait varier la température, la concentration en sels, protons et composés protecteurs (glycérol, saccharose, maltodextrine, glutamate monosodique).

Article 6

Changes in membrane permeability during rehydration of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11

Amenan A. Yao ¹ and Philippe Thonart ^{1, 2}

¹ Wallon Center for Industrial Biology, Microbial Technology Unit, University of Liège, Sart-Tilman B40, B-4000 Liège, Belgium.

² Wallon Center for Industrial Biology, Bio-Industry Unit, Gembloux Agricultural University, Passage des déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium.

Ind. Biotechnol. Soumis

Changes in membrane permeability during rehydration of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11

Abstract

The objective of this study was to assess changes in membrane permeability during rehydration of freeze-dried *W. paramesenteroides* LC11. Viability was assessed using the electrical conductivity measurement (ms/cm/g dry weight) and the plate count method (cfu/g dry weight). The symptoms of injury included an increase in the electrolyte leakage during the first 4 h of rehydration in Milli Q water and a decrease in the survival rate, suggesting an increase in membrane permeability during dehydration. An increase in the temperature, NaCl or monosodium glutamate concentration and a decrease in H^+ concentration resulted in an increase in the electrolyte leakage and a decrease in the survival rate. However, a decrease in the electrolyte leakage was observed with increasing glycerol, sucrose or maltodextrin and resulted in the maintenance of cell viability. Regression analysis showed that, overall, there was a good correlation between the survival rate and electrolyte leakage ($R^2 > 0.90$). These results indicate that the dehydration of bacteria might increase both the incidence of cell rupture during rehydration and the membrane permeability of the rehydrated strain. Change in membrane permeability might lead to electrolyte leakage during rehydration and, ultimately, cell death. The electrolyte leakage assay, a quick and inexpensive method, could be used to evaluate dried bacteria resistance to dehydration.

Keywords: electrolyte leakage, lactic acid bacteria, freeze-drying, membrane integrity, starter culture, viability

Introduction

Freeze drying is commonly used to produce concentrated lactic acid bacteria (LAB) starter cultures for the food industry. After dehydration, one population of microorganisms might be killed, another population might survive (non-injured), and a third might be sub-lethally injured.¹ It is now generally agreed that the cell membrane is the component most commonly affected after a sub-lethal injury. Leakage of the cell membrane was indirectly evident by an increase in cellular components such as enzymes and UV-absorbing materials in the surrounding medium after rehydration of dried cells, or by an increase in the cells' sensitivity to chemicals such as NaCl, oxgall and lysozyme.^{2, 3, 4} However, the effect of water loss on the structure of membrane is not well understood. Ultrastructural studies have indicated that a substantial alteration of membrane structure occurs in dried *Lactobacillus acidophilus* and *Lb. helveticus*.^{2, 5} To define these changes precisely, it would be necessary to determine the nature of the metabolic lesion induced immediately after the dehydration process, and to control such changes through the use of additives. Most studies performed to determine the efficiency of conservation methods are based on the survival rate of freeze-dried bacteria. These methods, however, do not provide information about the metabolically damaged bacteria. Cell viability can also be determined by measuring the electrochemical characteristics of the culture medium, which are related to both the number and the metabolic activity of the microorganisms in a sample.⁶ Change in conductance was used to evaluate the performance of freeze-dried *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and LAB in milk.^{6, 7} Such measurements, however, have never been performed in combination with the survival rate to assess the change in membrane permeability during rehydration of freeze-dried LAB. Solutes might leak from injured cells more rapidly during rehydration because the membrane has been mechanically ruptured by the dehydration treatment or because the permeability of an intact membrane has been altered. To make this distinction, the effects of the pH, temperature, NaCl or glycerol concentration, and sucrose, maltodextrin or monosodium glutamate concentration on the electrolyte leakage or survival during rehydration of the freeze-dried *W. paramesenteroides* were investigated. Previously, *W. paramesenteroides* LC11 had been isolated during cassava fermentation and was selected as a suitable starter culture for gari production.^{8, 9}

Materials & methods

Microorganism

The LAB *W. paramesenteroides* LC11 was provided by the Federal Research Centre for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology (Karlsruhe, Germany) and produced as described previously. The strain was inoculated in MRS broth and incubated at 30°C for 18h. Cells obtained after centrifugation (2500 ×g, 20 min) were maintained in 50% (v/v) glycerol and frozen at -80°C.

Production and freeze-drying

The strain was grown in a 20 l bioreactor containing MRS medium for 18 h, concentrated 20 times by centrifugation, and then 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 (30 h) followed by 15h at 0.15 mbar.

Experimental procedure

In order to determine the time course of electrolyte leakage during rehydration, 0.5 g of the dried sample (original concentration about 4.8×10^{12} cfu/g dry weight) was soaked in 10 ml Milli Q water for 8 h at room temperature. Samples were sampled every 2 h and analyzed for conductivity and viability. For the next steps of the experimental procedure 0.5 g was soaked in 10 ml Milli Q water for 2h, and then transferred into 10 ml Milli Q water for 4 h that had been obtained according to the designed parameter. The effect of each parameter was evaluated through conductivity and viable counts determinations in 20 ml total Milli Q water after 6 h (total experimental time) at room temperature. The effect of temperature was studied from 20°C to 40°C at 5°C intervals. The effect of pH was studied in a 10 ml buffer solution (0.1 M KH_2PO_4 solution adjusted with 0.1 N NaOH) at pH 5.8, 6.2, 6.6, 7.0 and 7.4. The effect of glycerol, NaCl, sucrose, maltodextrin or monosodium glutamate concentration was studied at 5, 15, 20, 30 and 40 g/l. All the experiments were carried out aseptically 20 h after the freeze-drying process.

Analyses

The electrical conductivity (ms/cm/g DW) of the solution was measured using a ProfiLine Multi 197i (WTW GmbH, Weilheim, Germany) conductivity meter. Total conductivity was obtained after autoclaving the samples at 112°C for 20 min. The viable counts were obtained using the plate count method after 48 h at 30°C with MRS-agar medium (pH 6.0). The dry cell weight was determined after drying at 105°C until constant weight.

Data analysis

The percentage leakage was calculated using the ratio $(EC_f - EC_i) / (EC_{total} - EC_i) \times 100$. The percentage leakage was expressed as percentage of total electrolytes after autoclaving the samples for this reason; after autoclaving, we expect that cells die, that means at first stage a decrease of the cells' membrane electrochemical potential to zero, which will result in a transient decrease of the total conductivity (dead cells) and ultimately to a full leakage of intracellular metabolites to the medium compared to the initial conductivity (i. e. experimental conductivity) (cells alive). The percentage survival was calculated as $N/N_0 \times 100$. A regression analysis was made between the percentage leakage and the percentage survival, and the goodness-of-fit was confirmed by the R^2 . Productions in the bioreactor were done in duplicate and the analyses were repeated twice ($n = 4$). The data were compared using Tukey's honestly significant difference (Statistica 7.1, StatSoft Inc., 2005). The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results and discussion

The leakage of electrolytes from the freeze-dried *W. paramesenteroides* bacteria during rehydration in Milli Q water was a function of time (Figure 1).

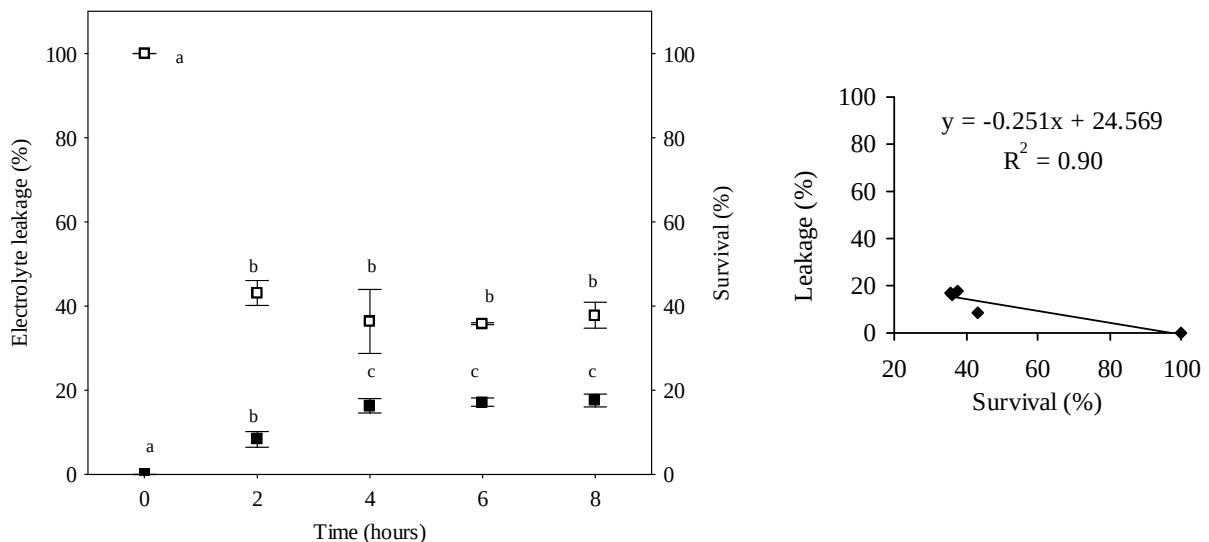


Figure 1. Electrolyte leakage (■) and survival (□) during rehydration of freeze-dried *W. paramesenteroides* in Milli Q water. Values are presented as means $\pm$ standard deviation (SD, $n = 4$). Mean values with a different letter for each parameter are significantly different (Tukey HSD test, $P < 0.05$).

During the rehydration period, the percentage leakage increased significantly between the 2nd and 4th hour (from about 8% to 14% of total electrolytes) and then remained fairly constant up to 8 h ($P < 0.05$). The viable population of the freeze-dried strain was reduced from an initial population of 4.8×10^{12} cfu DW (viable count at the end of freeze-drying) to 1.8×10^{12} cfu DW with a percentage survival of $36 \pm 5.4\%$ after 4 h of rehydration. There was a good correlation between the electrolyte leakage and survival, as shown by the $R^2 (\geq 0.9)$ of the regression analysis. Our work suggests that 4 h was an appropriate time for an accurate measurement of electrolyte leakage from dried cells, since beyond this time there was no further increase in electrolytes efflux. In this way, the method became less time-consuming for routine work. The increase in the percentage leakage indicated that changes in membrane permeability of the dried strain might be induced by the dehydration treatment. It is possible that loss of membrane structure could lead to electrolyte leakage during rehydration and, ultimately, cell death. Our findings accord with the conclusion reached by others authors who showed that membrane damage was a catalyst of *Lb. acidophilus* death during drying.² Because of an increase in cell rupture as a result of dehydration treatment the freeze-dried cells were incubated for 2 h before experiments. The percentage leakage increased significantly from 20°C to 40°C by 13% of total electrolytes, with a decrease in viable population of about 32% (Figure 2A) ($P < 0.05$). An increase in the percentage leakage, with an increase in the rehydration temperature, would occur if the integrity of the membrane was altered. An increase in NaCl or glycerol concentrations (from 5 g/l to 40 g/l) was associated with a decrease in osmotic pressure from -3.6 to -4.2 Pa or from -3.2 to -5.3 Pa, respectively (data not shown). The osmotic pressure data given are only approximate, since they do not take into consideration those of the dried powder. The percentage leakage increased with increasing NaCl concentration and could indicate that electrolytes efflux might be imposed by the osmotic gradient (Figure 2B). While an increase in NaCl concentration was associated with a decrease in viability, that of glycerol resulted in the maintenance of cell viability or a better viability (Figure 2C). For example, 7% leakage and 40% survival rate were achieved with 40 g/l glycerol, compared with 81% leakage and 3% survival rate with 40 g/l NaCl, after 4 h of rehydration. The sensitivity of the freeze-dried *W. paramesenteroides* to an increase in NaCl concentration could also indicate damage to cell membrane components. It is possible that the presence of glycerol makes the bacterial membrane less permeable and therefore it might improve the viability.

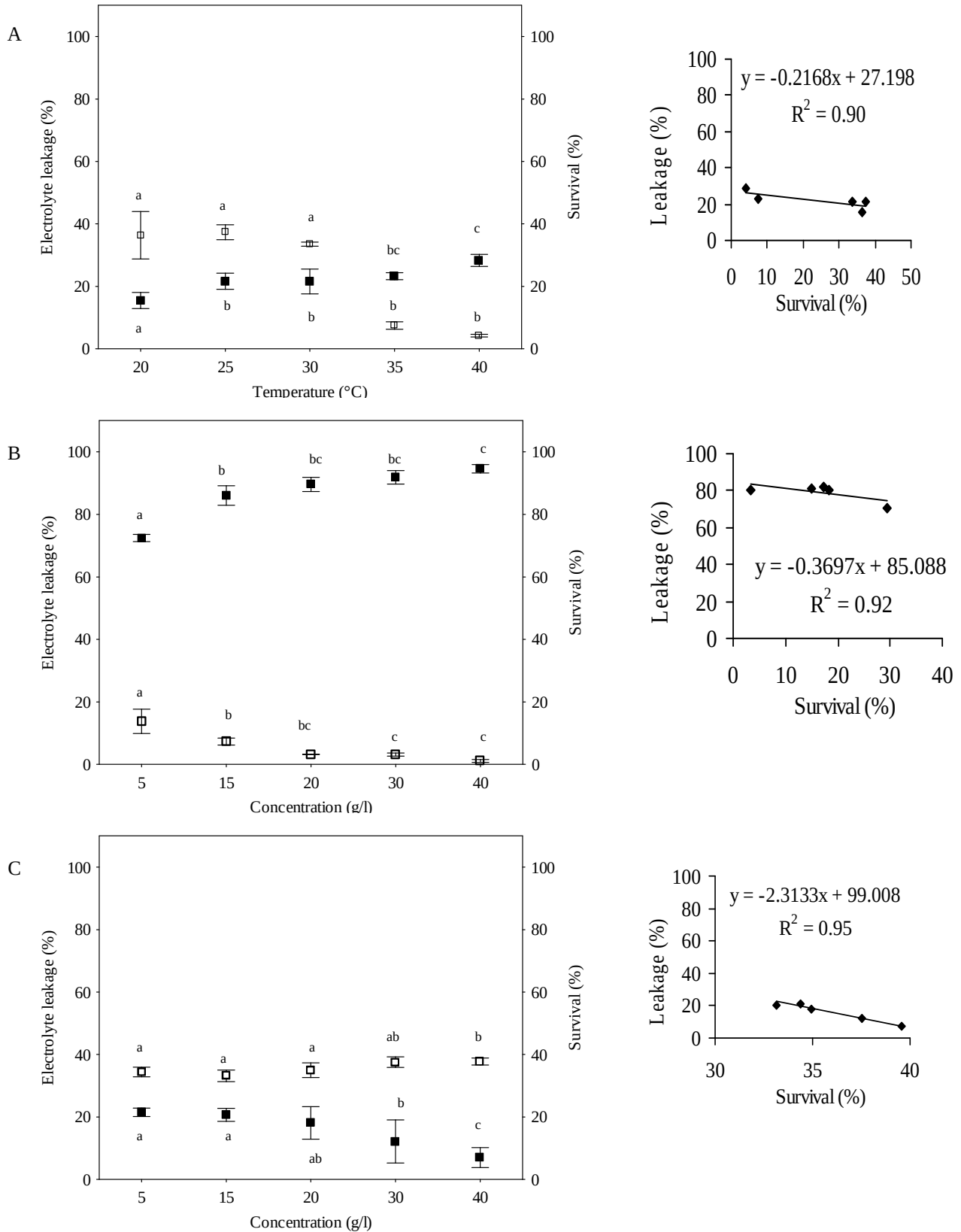


Figure 2. Effect of temperature (A) and NaCl (B) or glycerol (C) concentration on electrolyte leakage (■) and survival (□) during rehydration of freeze-dried *W. paramesenteroides*. Values are presented as means $\pm$ SD ($n = 4$). Mean values with a different letter for each parameter are significantly different (Tukey HSD test, $P < 0.05$).

Figure 3A or figure 3B shows that the percentage leakage decreased as the concentration of sucrose or maltodextrin increased (from 5g/l to 40 g/l), respectively. At 40 g/l concentration, a higher percentage survival and a lower percentage leakage were obtained with maltodextrin (48% and 1%, respectively), followed by sucrose (45% and 4%, respectively). These results are consistent with those obtained above on the effect of an increase in glycerol concentration. In contrast, an increase in monosodium glutamate concentration resulted in an increase in the percentage leakage and a decrease in viability in the same range of concentration (Figure 3C). Sucrose, maltodextrin and monosodium glutamate are commonly used as protective compounds in the freeze-drying process.^{10, 11} Our results suggest that increasing the number of OH groups in the rehydration solution might make the membrane less permeable to electrolytes and could improve or maintain the viability, possibly by protecting membrane phospholipids. These results accord with those reported by other authors, who have shown that the direct interaction between sucrose and membrane might contribute to the protective effects of sucrose on the dried cells of *Lb. bulgaricus*.¹¹ It has been suggested that OH groups of sugar and/or polyalcohol could replace water and could interact with phospholipids to maintain membrane integrity.¹² In addition, it has been reported that most injured cells could be repaired in the presence of a selective agent.¹³ The percentage leakage or survival increased or decreased with decreasing H^+ concentration in the solution, respectively (Figure 4). For example, the percentage leakage increased significantly from pH 6.6 to 7.4 by 13% of total electrolytes with a decrease in the viable population of about 5% ($P < 0.05$). The dehydration stress could increase the rate of passive diffusion across the phospholipid bilayer. In cell membranes, K^+ and Na^+ are believed to be transported across the plasma membrane by an ionic pump which transports K^+ into the cell and Na^+ out of it, in both cases, against its electrochemical gradient.¹⁴ This results in a difference in chemical potential across the membrane, which represents a delicate balance in selective permeability and concentration gradients. An increase in membrane permeability might lead to a decrease in electrical charge across the membrane and, ultimately, cell death. Alternatively, an increase in electrolyte leakage would occur if the activity or the efficiency of the transport system had been altered. Whether or not these changes are related to the freeze-drying process remains to be established.

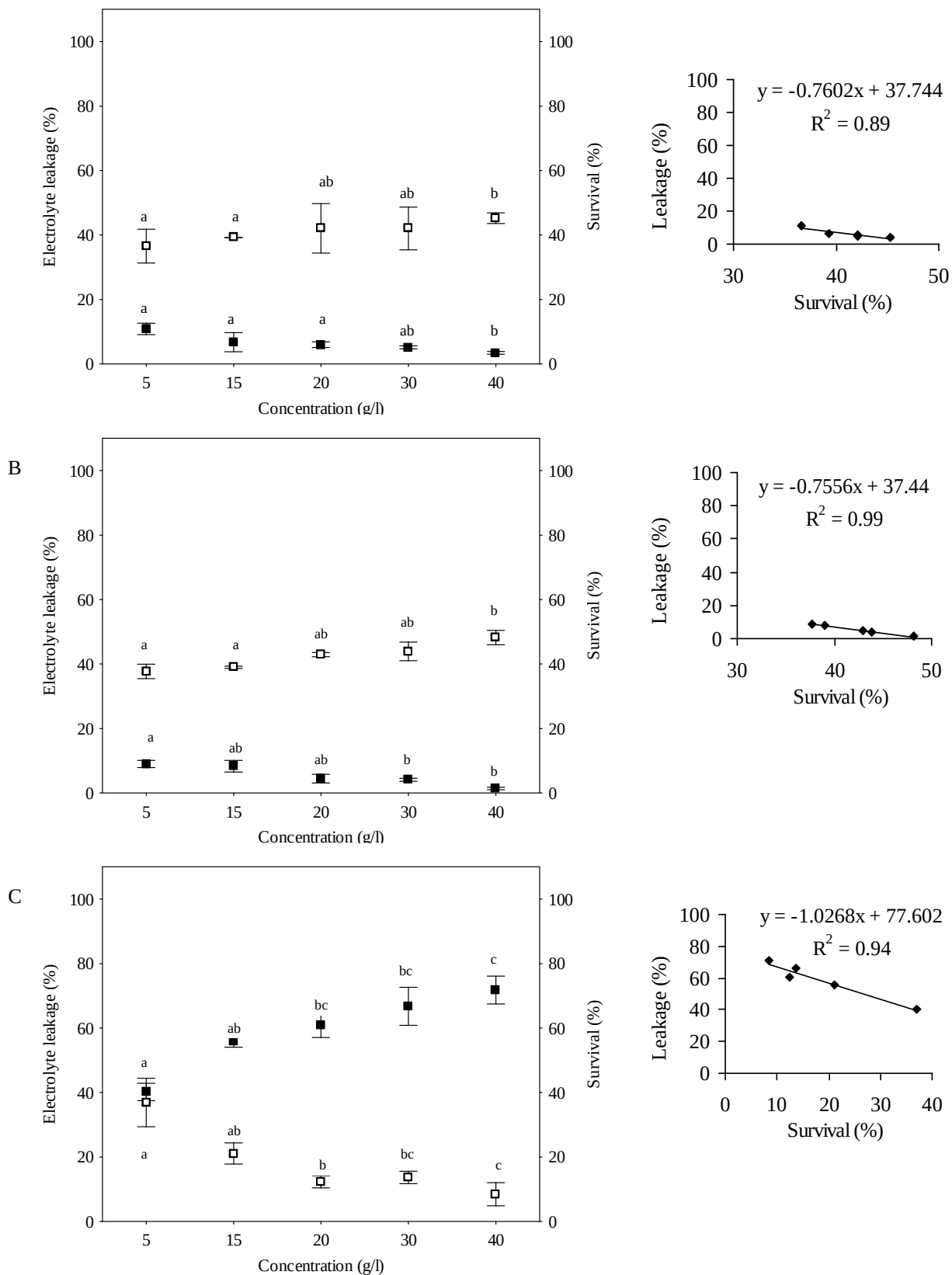


Figure 3. Effect of sucrose (A), maltodextrin (B) and monosodium glutamate (C) concentration on electrolyte leakage (■) and survival (□) during rehydration of freeze-dried *W. paramesenteroides*. Values are presented as means $\pm$ SD ($n = 4$). Mean values with a different letter for each parameter are significantly different (Tukey HSD test, $P < 0.05$).

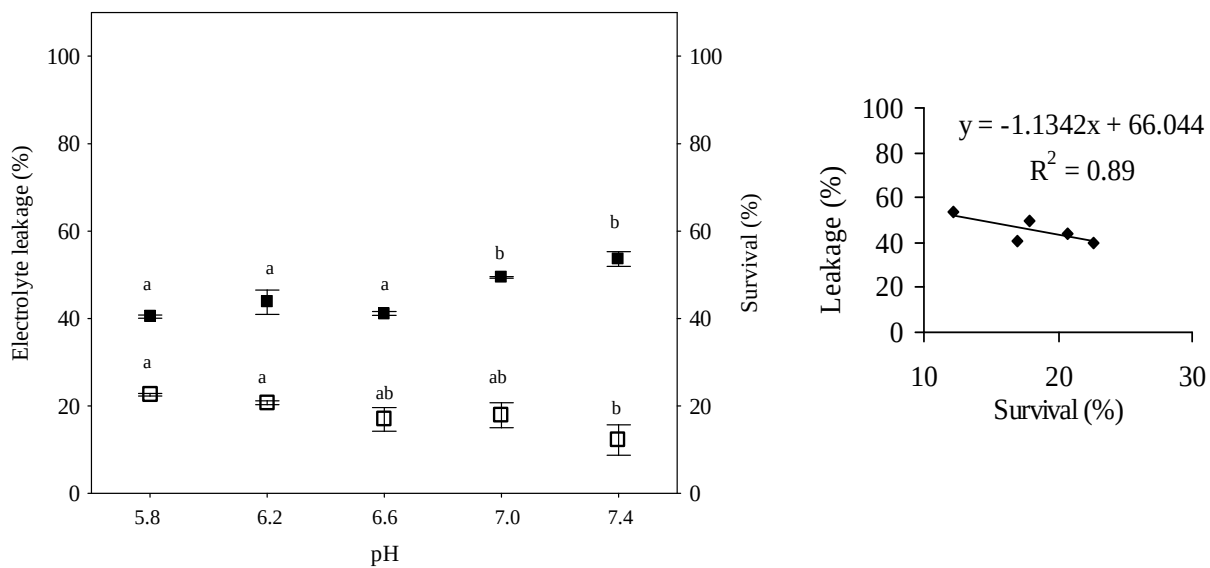


Figure 4. Effect of external pH on electrolyte leakage (■) and survival (□) during rehydration of freeze-dried *W. paramesenteroides* in Milli Q water. Values are presented as means $\pm$ SD ($n = 4$). Mean values with a different letter for each parameter are significantly different (Tukey HSD test, $P < 0.05$).

References

1. Wu VCH and Fung DYC. Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. *J Food Sci* 66(4), 580-583 (2001).
2. Brennan M, Wanismaïl B, and Ray B. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Prot* 49(1), 47-53 (1986).
3. Selmer-Olsen E, Birkeland SE, and Sørhaug T. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *J Appl Microbiol* 87(3), 429-437 (1999).
4. Teixeira P, Castro H, and Kirby R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Appl Microbiol* 78(4), 456-462(1995).
5. Santivarangkna C, Wenning M, Foerst P, and Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J Appl Microbiol* 102(3), 748-756 (2007).
6. Lanzaova M, Muchetti G, and Neviani E. Analysis of conductance changes as a growth index of lactic acid bacteria in milk. *J Dairy Sci* 76(1), 20-28 (1993).
7. Martos GI, Ruiz Holgado AP, Oliver G, and De Valdez GF. Use of conductimetry to evaluate *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* subjected to freeze-drying. *Milchwissenschaft* 53(3), 128-130 (1998).

8. Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S, Dortu C, Thonart P, Taljaard L, Mengu M, Franz CMAP, and Hozapfel WH. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int J Food Microbiol* 114(3), 342-351 (2007).
9. Yao AA, Bera F, Franz CMAP, Holzapfel WH, and Thonart P. Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-value models. *J Food Prot* 71(2), 431-434 (2008).
10. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, and Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 14(10), 835-847 (2004).
11. Oldenhof H, Wolkers WF, Fonseca F, Passot S, and Marin M. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ Fourier transformed infrared spectroscopy study. *Biotechnol Prog* 21(3), 885-892 (2005).
12. Cereijido M and Rotunno CA. Fluxes II - The role of the membrane. In: Introduction to the study of biological membranes. Cereijido M and Rotunno CA, 80-111. Gordon and Breach, New York, (1970).
13. Jay JM et al. Culture, Microscopic, and Sampling Methods. In: Modern food microbiology. Jay JM et al (7th ed.), 217-240. Springer, New York, (2005).
14. Yeagle PL. Transport. In: The Membranes of cells. Yeagle PL (2nd ed.), 231-258. Academic Press, New York, (1993).

CONCLUSIONS DES RESULTATS

16 souches de bactéries lactiques, 8 *Lactobacillus plantarum*, 3 *L. pentosus*, 2 *Weissella paramesenteroides*, 2 *L. fermentum* et 1 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ont précédemment été isolées et sélectionnées pour la production d'un starter pour le 'gari' (Kostinek *et al.* 2007).

Dans la première partie de notre étude, notre travail a consisté en l'évaluation de la technique de lyophilisation comme méthode potentielle de séchage pour la production d'un starter de bactéries lactiques déshydratées pour le 'gari' (**articles 2 et 3**).

Une première sélection a été faite sur la base de 3 critères (**article 2**) : (i) la capacité à survivre après le test accéléré de déshydratation, (ii) un taux de survie élevé après la lyophilisation, (iii) la capacité et la vitesse d'utilisation d'une source de carbone (pouvoir d'acidification) par la souche lyophilisée. De cette étude, nous pouvons retenir que 12 souches (sur 16 au total) ont obtenu plus de 50% de taux de survie après le test accéléré de déshydratation et ont été produites en fermenteur puis lyophilisées. Parmi toutes, les souches *L. plantarum* VE36, G2/25 et *L. pentosus* Lb61 ont obtenu des concentrations cellulaires et taux de survies les plus élevées après l'étape de lyophilisation. Les souches lyophilisées *L. plantarum* VE36, G2/25 et *L. fermentum* G2/10 ont montré une capacité de croissance plus élevée et un taux d'acidification plus rapide sur un milieu MRS comparé aux résultats obtenus pour les autres souches.

Dans une deuxième sélection, la stabilité au cours du stockage des 12 souches lyophilisées a été évaluée (**article 3**). Les souches lyophilisées et conservées dans des sachets sous vide ont été stockées à différentes températures (4°C, 37°C et 55°C). Des échantillons ont été prélevés à des intervalles de temps bien définis pour la détermination de la survie cellulaire. Les estimations de survie obtenues lors du stockage des souches à 37°C et 55°C ont été comparées aux taux de survie obtenus après 60 jours de stockage à 4°C. De cette étude il ressort deux remarques importantes : (i) la température de stockage influençait la survie des souches, (ii) les estimations de taux de survie lors du stockage des souches aux températures élevées ont été confirmées par les valeurs de survies obtenues lors du stockage à basse température, (iii) la plupart des souches perdaient plus de 50% de leur viabilité après 60 jours de stockage à 4°C. Les souches *W. paramesenteroides* LC11 et *L. plantarum* VE36 ont obtenu les taux de survie les plus élevés (90% et 94%, respectivement) après 60 jours de stockage à 4°C.

Il avait été démontré précédemment que les souches *L. plantarum* VE36, G2/25, *L. pentosus* Lb61, *L. fermentum* G2/10 et *W. paramesenteroides* LC11 pouvaient utiliser des sucres indigestibles (stachyose, raffinose) et exprimer une activité bactériocine (Kostinek *et al.* 2007). Les souches *L. plantarum* VE36 et *L. fermentum* G2/10 pouvaient en plus produire du peroxyde d'hydrogène.

En tenant compte de tout ce qui précède, les souches *L. plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 et *W. paramesenteroides* LC11 ont finalement été retenues pour le développement d'une culture starter et sont actuellement évaluées, séparément ou en combinaison, au cours de la fermentation de la pulpe de manioc pour la production de 'gari' enrichi d'huile de palme et de soja au Bénin.

L'une des conclusions importantes de l'étude précédente (**article 3**) était que la plupart des souches avaient une survie d'environ 40% après 60 jours de stockage à 4°C. L'un des nos objectifs dans la seconde partie de notre étude a donc été de comprendre certains mécanismes à l'origine de la perte de viabilité et du manque de stabilité en fonction du temps des souches lyophilisées.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons donc essayé d'approfondir nos connaissances sur les phénomènes d'oxydation des lipides membranaires au cours du stockage des bactéries lactiques lyophilisées (**articles 4 et 5**). L'influence des conditions de stockage (température, humidité, aération) sur la viabilité (survie, pouvoir d'acidification) et les acides gras membranaires de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, a été évaluée pendant 90 jours de stockage (**article 5**). Les échantillons ont été stockés dans des sachets en aluminium fermés sous vide ou dans des tubes en verre eux-mêmes stockés à deux activités d'eau différentes (0.11 et 0.23) et entreposés à 4°C ou 20°C. Un dosage des produits primaires de dégradation des acides gras polyinsaturés (hydroperoxydes des acides linoléique et linolénique), pour les échantillons stockés dans les conditions d'aération, a été aussi réalisé. Des pertes notables de viabilité cellulaire et du pouvoir d'acidification ont été observées pendant le stockage. Concomitamment à ces modifications, des baisses dans les rapports acide linoléique (C18 : 2)/acide palmitique (C16:0) et acide linolénique (C18:3)/acide palmitique (C16:0) ont aussi été observées. Cependant, après le 90^{ième} jour de stockage, une meilleure viabilité cellulaire, un meilleur pouvoir d'acidification ainsi que des rapports C18:2/C16:0 et C18:3/C16:0 plus élevés ont été obtenus pour les échantillons stockés à basse température et en l'absence d'oxygène (i.e. humidité). Pour les échantillons stockés en présence d'oxygène et d'humidité, nous avons observé une apparition temporelle et une accumulation de produits

primaires de dégradation des acides linoléique et linolénique. Les vitesses d'apparition ou de disparition et d'accumulation de ces composés étaient d'autant plus grandes qu'étaient élevées la température et/ou l'humidité pendant le stockage. Ces résultats nous suggèrent des corrélations possibles entre : (i) les conditions de stockage et la perte de viabilité cellulaire ou la perte du pouvoir d'acidification, (ii) les conditions de stockage et la baisse du rapport C18:2/C16:0 ou C18:3/C16:0, (iii) la baisse du rapport C18:2/C16:0 ou C18:3/C16:0 et l'accumulation des hydroperoxydes des acides linoléique ou linolénique, (iv) la perte de viabilité cellulaire ou du pouvoir d'acidification et la dégradation des acides gras polyinsaturés.

Dans le souci de confirmer les résultats obtenus dans la précédente étude, l'influence de composés protecteurs sur la viabilité cellulaire, l'intégrité cellulaire et la dégradation des lipides de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, a été évaluée pendant 90 jours de stockage (**article 5**). Après le 90^{ième} jour de stockage, les acides gras membranaires totaux ainsi que ceux de la fraction polaire ont également été étudiés. La dégradation des lipides a été évaluée par le biais du dosage des composés secondaires de dégradation des acides gras polyinsaturés (les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique). L'intégrité cellulaire a été évaluée à l'aide d'une détermination des substances ioniques dissoutes après réhydratation de l'échantillon. Les échantillons ont été stockés dans des tubes en verre eux-mêmes stockés à une activité d'eau de 0.23 et entreposés à 4°C ou 20°C. Les composés protecteurs étaient comme ci-après désignés : cryoprotecteurs (glycérol et maltodextrine) et/ou antioxydants [acid ascorbique et/ou butyle hydroxytoluène (BHT)]. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le contrôle (cellules lyophilisées sans composés protecteurs). Des pertes de viabilité cellulaire ainsi que des augmentations de la concentration des produits secondaires de dégradation des acides gras polyinsaturés et des substances ioniques dissoutes, ont été observées au cours du stockage. Ces changements survenaient dès les premières heures du stockage et ont été observés pour tous les échantillons. Toutefois, après le 90^{ième} jour de stockage, une meilleure viabilité cellulaire ainsi que de plus faibles concentrations en substances ioniques dissoutes et de composés réagissant avec l'acide thiobarbiturique, ont été observées pour les échantillons stockés à 4°C et additionnés de cryoprotecteurs+BHT. Pour les mêmes échantillons et pour la même période, des rapports C18:2/C16:0 et C18:3/C16:0 plus élevés, aussi bien pour les lipides totaux que ceux de la fraction polaire, ont été observés. De cette étude nous pouvons conclure que la présence des cryoprotecteurs et du BHT a considérablement réduit la dégradation des lipides de la fraction polaire au cours du stockage de la souche *W. paramesenteroides* LC11. Il s'en est suivi une meilleure intégrité cellulaire et

une meilleure viabilité cellulaire. Ces résultats nous indiquent à nouveau une possible relation entre l'oxydation des acides gras polyinsaturés, plus précisément ceux de la fraction polaire des lipides, et la perte de viabilité cellulaire au cours du stockage des souches lyophilisées. Ces résultats nous suggèrent aussi des corrélations possibles entre : (i) l'oxydation des acides gras polyinsaturés de la fraction polaire des lipides et la perte d'intégrité cellulaire au cours du stockage, (ii) la perte d'intégrité cellulaire et la perte de viabilité cellulaire.

Nous avons cependant noté que la perte de viabilité cellulaire survenait dès les premières heures du stockage, que la souche soit protégée ou non. Dans la dernière partie de notre étude, nous avons essayé de trouver une explication à la perte de viabilité les premières heures du stockage. Pour ce faire, les changements dans la perméabilité cellulaire au cours de la réhydratation de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11, ont été évalués (**article 6**). L'intégrité cellulaire a été évaluée à travers les déterminations du nombre de cellules viables et de la conductivité d'une solution de réhydratation dont on a fait varier la température, la concentration en sels, protons et composés protecteurs (glycérol, saccharose, maltodextrine, glutamate monosodique). Toutes les expériences ont été réalisées 20h après l'opération de séchage. Une baisse du nombre de cellules viables et une augmentation de la concentration en substances ioniques dissoutes, ont été observées durant les 4 premières heures de la réhydratation dans de l'eau Milli Q. Une augmentation de la température et de la concentration en sels (NaCl) ou en glutamate monosodique, ainsi qu'une baisse de la concentration en protons entraînaient une augmentation de la concentration en substances ioniques dissoutes et une baisse du nombre de cellules viables. Cependant, une augmentation de la concentration en glycérol, sucrose et maltodextrine entraînaient une diminution de la concentration en substances ioniques dissoutes et un maintien de la viabilité cellulaire. Ces résultats nous indiquent qu'il pourrait se produire une rupture cellulaire durant la déshydratation. Une corrélation entre la perte de viabilité cellulaire et les changements dans la perméabilité membranaire de la souche a été faite.

Références

- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. 2005. 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.* 28: 527-540.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A., Holzapfel W.H. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 342-351.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les cultures starters de bactéries lactiques introduites au cours de la fermentation du manioc dans l'Afrique de l'Ouest contribuent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés obtenus tel que le 'gari'. Malheureusement, leurs utilisations par les unités de production locales demeurent encore inexistantes et limitent ainsi la production du 'gari' à une plus grande échelle. Aussi, cette thèse s'inscrit dans le cadre de la sélection d'un starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la fermentation du manioc en vue de la production de 'gari'. Pour ce faire, certains aspects méritent d'être mieux cernés tels que :

- L'intérêt de l'utilisation d'une culture starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la production de 'gari',
- Les caractéristiques d'une culture starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la production de 'gari',
- Les précautions à prendre au cours de la conservation des cultures starters lyophilisées pour la production de 'gari'.

Au cours de cette discussion, nous évaluerons comment notre étude permet de répondre à ces préoccupations. Enfin, les limites de notre étude seront évoquées et quelques pistes de recherches seront apportées.

L'intérêt de l'utilisation d'une culture starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la production de 'gari'

En Afrique, la plupart des aliments traditionnels sont fermentés avant leur consommation. Parmi ceux-ci, le 'gari', une semoule de manioc fermentée, représente l'aliment de base le plus populaire en Afrique de l'Ouest. La popularité de ce produit dans les villes urbaines Ouest Africaines a été associée à son faible coût, sa longue durée de conservation ainsi que sa facilité de stockage et de préparation. A l'instar de la majorité des produits traditionnels africains, l'étape de la fermentation au cours de la production du 'gari' se fait encore de façon spontanée et le produit final se caractérise par une qualité hygiénique et organoleptique non satisfaisante et variable. L'inoculation du manioc avec un starter de bactéries lactiques se caractérisant par des propriétés technologiques appropriées permettrait d'assurer la maîtrise de la fermentation.

Dans l'optique de réaliser un meilleur contrôle et une standardisation des procédés de production des produits fermentés, plusieurs espèces de bactéries lactiques ont été isolées et identifiées comme principaux micro-organismes impliqués dans la fermentation du manioc en

Afrique (Okafor, 1977 ; Guiraud *et al.*, 1993 ; Amoa-Awua *et al.*, 1996 ; Olasupo *et al.*, 1996 ; Kostinek *et al.*, 2005, 2007). Certaines d'entre elles ont été utilisées comme cultures starters au cours d'essais expérimentaux pour la production d'aliments fermentés. Une souche amylolytique de *Lactobacillus plantarum* A6 a été utilisée comme culture starter au cours de la fermentation du manioc pour la production de 'gari' et 'kivunde' (Guiraud *et al.*, 1993 ; Guiraud *et al.*, 1995 ; Kimaryo *et al.*, 2000). Les résultats obtenus ont montré que cette souche pourrait jouer un rôle significatif dans le développement des qualités organoleptiques ainsi que dans la conservation et la standardisation du produit obtenu, grâce aux quantités élevées d'acide lactique produites et à la baisse rapide du pH qui en résulte. Une amélioration notable dans la détoxification du manioc au cours de la production de 'kivunde' a été également observée. Des souches de bactéries lactiques associées ou non à d'autres micro-organismes ont été utilisées en cultures mixtes au cours de la fermentation du manioc pour la production de 'fufu', 'agbelima' et 'gari' (Okafor *et al.*, 1998 a, b ; Ogunbanwo *et al.*, 2004 ; Amoa-Awua *et al.*, 2005 ; Sobowale et Oyewole, 2008). Dans l'ensemble, une réduction du temps de fermentation, une inhibition des micro-organismes pathogènes, une standardisation du procédé de fabrication ainsi qu'un produit de qualité organoleptique constante et acceptable, ont été obtenus.

Malgré l'efficacité démontrée, l'utilisation des cultures starters de bactéries lactiques par les unités de production locales demeure encore inexistante. Outre les considérations d'ordres économiques, la disponibilité de la culture starter est la raison majeure avancée. En Afrique de l'Ouest, la préparation des cultures starters de bactéries lactiques destinées à la production de produits fermentés tels que le 'gari', est une opération délicate et coûteuse. Elle constitue pour les unités de production locales une charge importante en investissements (laboratoire, matériel, cuves de fermentation) et en main-d'œuvre spécialisée. De plus, cette préparation des starters n'est pas sans aléas. Aussi bien au stade de l'entretien des souches au laboratoire, qu'au stade de la préparation proprement dite du starter, des contaminations diverses peuvent se produire, qui peuvent avoir pour résultat un mauvais développement des bactéries et éventuellement des fabrications défectueuses. L'Afrique de l'Ouest pourrait s'inspirer de l'exemple de l'Europe, où l'utilisation des inoculum concentrés déshydratés simplifie beaucoup la tâche des utilisateurs, favorise l'obtention d'une meilleure régularité des fabrications et permet de réaliser l'ensemencement direct de la matière première. Cette technique d'ensemencement direct avec des ferments concentrés déshydratés est très répandue dans les industries utilisatrices des bactéries lactiques. Des cultures starters sont utilisées, sous une forme lyophilisée ou congelée pour la conservation, le développement de l'arôme, la

formation et la conservation de la couleur des produits carnés à longue durée de fabrication (charcuterie, produits de salaison crus).

Dans le cas du ‘gari’, notre étude a permis la sélection des souches *L. plantarum* VE36, G2/25, *L. fermentum* G2/10 et *Weissella paramesenteroides* LC11, précédemment isolées et sélectionnées au cours de la fermentation du manioc, en vue de leur utilisation comme cultures starters lyophilisées (**articles 2 et 3**) (Tableau 1). Les 4 souches lyophilisées ont été évaluées, séparément ou en combinaison, au cours de la fermentation de la pulpe de manioc pour la production de ‘gari’ enrichi d’huile de palme et de soja au Bénin (Egounlety *et al.*, 2008). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la pulpe de manioc (contrôle). Un ‘gari’ fortifié de qualité organoleptique satisfaisante et constante a pu être obtenu après 8 à 12h de fermentation de la pâte de manioc additionnée de starter lyophilisé, contrairement à un ‘gari’ de qualité variable obtenu après 24h de fermentation pour le contrôle. L’inoculation des cultures starters lyophilisées, directement dans la pâte de manioc, est une alternative d’une grande commodité d’emploi et d’un coût acceptable pour les unités de production locales (environ 18% du prix de revient) qui a permis le démarrage à Ouèdo (Bénin) d’un atelier pilote de fabrication de ‘gari’ enrichi (Egounlety, 2007). La suppression du stade de préparation du starter constituerait un réel progrès pour les unités de production Ouest-Africaines de ‘gari’, dans la mesure où elles pourraient disposer de suspensions bactériennes concentrées suffisamment actives pour être ajoutées directement à la pâte de manioc en lieu et place du levain traditionnel. L’amélioration de la qualité du ‘gari’ dans les unités de production locales pourrait ainsi contribuer au développement du secteur agro-industriel de la sous-région Ouest-Africaine.

Les caractéristiques d’une culture starter de bactéries lactiques lyophilisées pour la production de ‘gari’

Comme nous nous sommes précédemment interrogés sur l’intérêt de rechercher une culture starter lyophilisée pour la production de ‘gari’, nous pouvons nous interroger à présent sur les caractéristiques que devrait avoir un tel starter. Dans le cas du ‘gari’, pour lequel on recherche principalement une préparation microbienne suffisamment active pendant une période assez longue pour assurer une réduction de la teneur en facteurs antinutritionnels et une acidification importante ainsi qu’une inhibition des micro-organismes indésirables, nous pouvons définir un ensemble de critères que devrait présenter le starter utilisé :

Tableau 1 : Les caractéristiques technologiques et de production des 4 souches de bactéries lactiques sélectionnées

Caractéristiques	Souches			
	<i>L. plantarum</i> VE36	<i>L. plantarum</i> G2/25	<i>W. paramesenteroides</i> LC11	<i>L. fermentum</i> G2/10
Technologiques ^a				
Acidification				
pH < 5,3 après 6h	+	+	-	+
pH < 3,9 après 48h	-	+	-	-
Production de H ₂ O ₂	+	-	+	+
Production de bactériocines	+	-	+	+
activité β -glucosidase	+	+	+	-
Utilisation de sucres indigestibles				
raffinose	+	+	+	+
stachyose	-	-	+	-
Activité tannase	-	-	-	+
Activité α -amylase	-	-	-	-
Production ^b				
Résistance à la déshydratation (% survie)	71,0 $\pm$ 5,5	93,1 $\pm$ 5,0	73,0 $\pm$ 6,7	82,0 $\pm$ 3,9
Rendement de production ^c				
teneur en humidité (%)	5,6 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,6
concentration cellulaire	6,9 $\times 10^{11}$	6,5 $\times 10^{10}$	4,9 $\times 10^{12}$	6,9 $\times 10^{11}$
taux de survie (%)	97,3 $\pm$ 7,2	79,9 $\pm$ 1,3	18,0 $\pm$ 2,4	12,7 $\pm$ 3,0
Activité acidifiante ^d				
changement en acidité lactique (%)	1,8	2,2	0,7	1,5
concentration cellulaire	8,5 $\times 10^8$	6,1 $\times 10^9$	3,2 $\times 10^8$	1,1 $\times 10^9$
Stabilité au cours du stockage (% de survie) ^e	97,6 $\pm$ 2,7	35,7 $\pm$ 1,6	94,1 $\pm$ 3,5	58,5 $\pm$ 5,9

(+) positif, (-) négatif

Les valeurs représentent la moyenne de 4 déterminations $\pm$ écart type

^a Selon Kostinek *et al.*, (2005, 2007)

^b Selon cette étude (articles 2 et 3)

^c Après la lyophilisation

^d Après 16h de culture sur milieux MRS

^e Après 60 jours de stockage à 4°C

(1) Critères technologiques

- développement rapide afin de s'imposer sur le développement de la microflore naturelle et surtout sur celui des micro-organismes indésirables
- diminution rapide du pH
- production de bactériocines et de peroxyde d'hydrogène
- réduction des facteurs antinutritionnels majeurs du manioc
- capacité à métaboliser l'amidon (principale source de carbone disponible)

(2) Critères de production

- résistance à la déshydratation
- rendement en biomasse
- activité acidifiante
- haute concentration cellulaire
- stabilité au cours du stockage

Notre étude a permis la sélection des souches qui répondaient le mieux à ces différents critères. Le Tableau 1 nous présente les caractéristiques technologiques des 4 souches sélectionnées, telles que précédemment indiquées par Kostinek *et al.* (2005, 2007). La durée de conservation des produits est augmentée grâce à la présence d'acide lactique, et dans certains cas d'acide acétique, et limite considérablement le développement des micro-organismes indésirables ou pathogènes par leurs propriétés antiseptiques reconnues, ainsi que par la diminution du pH. Pour que l'action stabilisatrice soit efficace, il faut que l'acidification soit rapide et que dès les premières heures de la fermentation, le pH s'abaisse en dessous de 4,0 (Raimbault, 1995). Si l'acidification initiale n'est pas assez rapide, certains germes pathogènes ou indésirables peuvent se développer partiellement, se maintenir et faire dévier ou évoluer ultérieurement le produit, pendant la conservation. L'action inhibitrice des bactéries lactiques sur les micro-organismes indésirables ou pathogènes se manifeste aussi à travers leur capacité à accumuler du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. La majeure partie des souches sélectionnées dans notre étude est capable de réaliser une acidification rapide de la matière première et de produire des bactériocines ainsi que du peroxyde d'hydrogène.

L'importance de la capacité des bactéries lactiques à réduire la teneur en facteurs antinutritionnels majeurs susceptibles de limiter l'acceptabilité et l'utilisation du manioc, n'est plus à démontrer. La majeure partie des souches sélectionnées dans notre étude est capable d'exprimer une activité β -glucosidase (Tableau 1). L'activité β -glucosidase ou linamarase

exprimée par les bactéries lactiques contribuerait à l'hydrolyse de la linamarine, principal composant des substances cyanogénétiques contenues dans le manioc (Okafor et Ejiofor, 1990 ; Guiraud *et al.*, 1992). Ainsi l'inoculation de la pâte de manioc avec des bactéries lactiques exprimant une activité β -glucosidase devrait permettre d'améliorer les performances d'hydrolyse de la linamarine durant la fermentation et diminuer la toxicité du 'gari' obtenu. Par ailleurs, la capacité de telles bactéries à utiliser le raffinose et/ou le stachyose ainsi qu'à produire une activité tannase pourrait, respectivement, fournir d'autres sources d'hydrates de carbone et améliorer la disponibilité des protéines du manioc.

Compte tenu de la forte teneur en amidon (80%) des racines de manioc, il est souhaitable que les bactéries lactiques de la culture starter soient capables d'exprimer une activité α -amylase, afin d'améliorer la dépolymérisation de l'amidon en des structures plus simples facilement métabolisables en acide lactique. Une meilleure digestibilité de l'amidon ainsi qu'un produit fini ayant une forte valeur énergétique pourrait ainsi être obtenu. Etant donné qu'aucune des souches sélectionnées dans notre étude ne peut exprimer d'activité α -amylase, cette fonction pourrait être réalisée par les amylases endogènes du tubercule de manioc. Les travaux de Jansen *et al.* (1981) ont montré que la dépolymérisation des molécules d'amidon pourrait aussi survenir au cours de la cuisson du 'gari' qui provoque l'éclatement des grains d'amidon et la rupture des chaînes constitutives mais aussi accélère considérablement l'activité des amylases endogènes du tubercule frais. Toutefois, les bactéries lactiques pourraient exprimer d'autres amylases (amyloglucosidase) bien que l'activité α -amylase soit l'activité amylolytique la plus souvent rapportée dans la littérature (Champ *et al.*, 1983 ; Scheirlinck *et al.*, 1989 ; Guiraud *et al.*, 1991)

Tout ce qui précède ne signifie pas que la détoxification, l'acidification rapide de la matière première, l'inhibition des micro-organismes indésirables et la capacité à métaboliser l'amidon soient le fait des seules bactéries lactiques, ni même qu'elles soient indispensables à ces différentes activités. Cependant, le fait qu'elles possèdent ces capacités milite en faveur de leur présence dans les techniques de transformation du 'gari'.

La sélection des bactéries lactiques pour un ensemencement direct dans la matière première doit se faire non seulement en fonction de leurs caractéristiques technologiques mais également en fonction de certaines caractéristiques de production. Le Tableau 1 nous présente les caractéristiques de production des 4 souches sélectionnées. La capacité des bactéries lactiques à survivre à un traitement de conservation est une caractéristique importante dès lors que les techniques de déshydratation telles que la lyophilisation pourraient altérer la membrane cytoplasmique des souches et causer, de ce fait, des perturbations de l'activité

métabolique qui leur seraient souvent fatales (Becker et Rapoport, 1987). La résistance des bactéries lactiques à la lyophilisation est variable selon les genres et les espèces et peut être évaluée à l'aide de techniques rapides de déshydratation qui permettent de prédire le comportement des souches lors de l'étape ultérieure de séchage (Font de Valdez *et al.*, 1986). Dans notre étude, les 4 souches sélectionnées montrent un taux de viabilité de plus de 70% après un test de déshydratation dans une solution de glycérol de concentration croissante suivi d'un marquage avec des marqueurs fluorescents (**article 2**).

Le rendement en biomasse des bactéries est quant à lui, l'un des premiers critères qui doit être pris en compte dans leur sélection. En effet, une souche, même technologiquement intéressante, ne présente guère d'intérêt si elle ne peut pas être produite en quantité importante. De plus, d'un point de vue économique, il est important de produire des souches donnant un maximum de biomasse en un minimum de temps. Ce rendement correspond dans notre étude au rapport entre la quantité de cellules viables obtenue après la lyophilisation et celle obtenue avant la lyophilisation (**article 2**). Les rendements en biomasse obtenus après la lyophilisation pour les souches *L. plantarum* VE36 et G2/25 sont significativement plus élevés (plus de 80%) que ceux obtenus pour les souches *W. paramesenteroides* LC11 et *L. fermentum* G2/10 (environ 12%) comme le montre le tableau 1, et cela malgré des concentrations cellulaires élevées et pratiquement identiques.

La mesure du nombre de cellules viables (viabilité) et l'aptitude d'une suspension bactérienne concentrée à produire rapidement de l'acide lactique à partir d'une source de carbone (activité acidifiante), permettent d'apprécier sa 'qualité'. L'activité acidifiante des cultures starters de bactéries lactiques est un critère qui conditionne les caractéristiques organoleptiques du 'gari' ainsi que son aptitude à la conservation. Cette activité dépend à la fois du nombre de cellules bactériennes présentes dans l'unité de volume de la suspension ainsi que de leurs état physiologique, ce dernier étant lui-même fonction de nombreux facteurs liés à l'espèce ou même à la souche bactérienne, aux conditions de culture et traitements éventuels subis par les cellules, comme l'ont montré les travaux de Champagne et Gagne (1987). L'activité acidifiante (acidité lactique, concentration cellulaire) des souches sélectionnées dans notre étude a été évaluée après 16h de culture sur milieu MRS et comparée à celle obtenue immédiatement après la lyophilisation (**article 2**). Nous avons recherché à nous rapprocher le plus possible de l'ensemencement réalisé dans les unités de production locales (concentration de l'inoculum, température d'incubation). D'une façon générale, nous avons observé une plus grande vitesse d'acidification lors de l'incubation du milieu de culture avec les souches *L. plantarum* VE36, G2/25 et *L. fermentum* G2/10. Ainsi l'inoculation de la

pâte de manioc avec ces souches permettrait d'assurer au 'gari' une bonne innocuité et une bonne stabilité durant son stockage.

La stabilité des souches au cours de leur stockage représente un enjeu économique majeur dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, pour qu'une suspension concentrée de bactéries lactiques puisse être utilisée directement au cours de la fabrication des produits alimentaires, il est essentiel que le peuplement et l'activité de cette suspension soient non seulement très élevés mais aussi très stables dans le temps. De plus, la conservation des suspensions bactériennes actives pendant des périodes assez longues permet de dissocier leur préparation de leur utilisation. La stabilité des bactéries lactiques lyophilisées, au cours de leur stockage, peut être évaluée à l'aide de test de dégradation accélérée. Il fait appel à des données expérimentales qui décrivent la perte de viabilité des souches à des températures élevées. Les résultats obtenus sont ensuite utilisés pour extrapoler le comportement des souches à une température de conservation plus basse pendant une durée de conservation déterminée. En général, dans notre étude, les estimations de taux de survie obtenues lors du stockage des souches à 37°C et 55°C ont été confirmées par les valeurs de survie obtenues après 60 jours à 4°C (**article 3**). Les résultats des travaux d'Ishibashi *et al.* (1985) ont aussi démontré que le test accéléré de stockage était un bon outil de prédiction de la stabilité des bactéries lactiques lyophilisées pendant de longues périodes de stockage.

Les poudres de bactéries lactiques lyophilisées sélectionnées dans notre étude, en raison de leur richesse en cellules (voisine ou supérieure à 10^{10} /g) et de leur bonne stabilité après 60 jours de stockage à 4°C (en moyenne 29% de perte de viabilité) (**articles 2 et 3**) (Tableau 1), offrent aux unités de production de 'gari' des possibilités nouvelles de transformation du manioc. Avec de telles suspensions bactériennes, il est désormais possible de mettre en œuvre desensemencements 10 à 100 fois plus grands que ceux obtenus avec l'inoculum traditionnel. Une dominance de la flore bactérienne additionnée à la pâte de manioc ainsi qu'une accélération importante de la fermentation, peuvent ainsi être obtenus. Cela a été démontré au cours de la fermentation du manioc avec les souches lyophilisées, *L. plantarum* G2/25 et *L. fermentum* G2/10, sélectionnées dans notre étude (Huch *et al.*, 2008). En effet, l'utilisation de ces souches lyophilisées à des concentrations de 1×10^{10} UFC/Kg au cours de la fermentation (unité formant colonies/g), a entraîné un développement 10 à 100 fois plus important du nombre de bactéries lactiques par rapport à celui observé pour la pâte sans inoculum lyophilisé.

Les précautions à prendre au cours de la conservation des cultures starters lyophilisées pour la production de ‘gari’

Les propos qui précèdent mettent en lumière les possibilités offertes par l'utilisation, dans les unités de production de ‘gari’, de suspensions de bactéries lactiques lyophilisées. Il est désormais possible d'utiliser directement au cours de la fermentation du manioc, des suspensions bactériennes suffisamment actives et susceptibles d'être conservées sur de longues périodes. Un ‘gari’ sain, de qualité constante et acceptable ainsi qu'une standardisation du procédé de fabrication peuvent ainsi être obtenus. Cependant, un tel résultat ne peut être obtenu qu'en respectant certaines conditions, dont nous montrerons l'intérêt dans ce qui va suivre.

La lyophilisation est une opération de déshydratation qui consiste à éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans le produit. Comme nous l'indique le tableau 1, les valeurs de teneur en humidité des poudres lyophilisées sont de l'ordre de 5% en moyenne à la fin de la lyophilisation. Elles traduisent une bonne conduite de la lyophilisation qui aboutit à des suspensions bactériennes peu hydratées et stables pendant le stockage. En effet, il a été démontré qu'une faible teneur en humidité (de l'ordre de 4-5%) des suspensions bactériennes concentrées, réduisait les possibilités de développement de réactions d'altération et autorisait une conservation à long terme des poudres lyophilisées (Marin et René, 2000). Néanmoins, des pertes de viabilité et d'activité significatives ont été signalées au cours du stockage des bactéries lactiques lyophilisées (Fayed *et al.*, 1986). Des dommages cellulaires importants tels que les modifications de la solubilité de certaines protéines, dans la perméabilité cellulaire ou de la molécules d'ADN, pourraient être à l'origine de cette situation (Becker et Rapoport, 1987 ; Livense *et al.*, 1994). Cependant, les faibles teneurs en humidité des suspensions bactériennes lyophilisées, nous amènent à penser que cette instabilité serait due à une altération de type chimique plutôt que biochimique. Cette hypothèse est en accord avec les observations de nombreux auteurs qui ont étudié l'influence de facteurs tels que la température, l'exposition à la lumière, à l'humidité et à l'air sur la survie et/ou le pouvoir d'acidification des bactéries lactiques lyophilisées. Bozoglu *et al.* (1995) ont observé que les pertes de viabilité au cours du stockage de *L. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en présence d'air et d'humidité étaient plus importantes que celles observées en l'absence d'air. Un peu plus tard, Castro *et al.* (1995) ont observé un meilleur taux de survie de *L. bulgaricus* au cours du stockage à une faible humidité relative (11%) et à 4°C, contrairement, respectivement, à un stockage à une humidité relative élevée (59%) et à 20°C. De plus, S.

thermophilus a montré des taux d'acidification significativement plus faibles au cours de son stockage à 20°C ou en présence d'air, que ceux observés au cours de son stockage à 5°C ou en l'absence d'air (Andersen *et al.*, 1996). Les informations obtenues à partir de ces études ainsi que de bien d'autres encore, ont été utilisées en vue de définir des conditions adéquates de stockage ; un stockage à l'abri de la lumière, de l'air ainsi qu'à une basse température améliore la stabilité des bactéries lactiques lyophilisées. Fort de tous ces constats et après avoir observé que la présence d'antioxydants améliorerait la survie cellulaire, Castro *et al.* (1995, 1996) ont suggéré que l'instabilité des bactéries lactiques lyophilisées au cours du stockage pourrait être due à des phénomènes d'oxydation. D'autres auteurs avaient également supposé, indirectement, que la mortalité cellulaire et les phénomènes d'oxydation cellulaire pouvaient être liés. Dimmick et Heckly (1961) ou Marshall *et al.* (1974) avaient indiqué, respectivement, que l'interaction entre les composés carbonylés et les composants cellulaires ou l'augmentation de la concentration cellulaire en radicaux libres, coïncidait avec la perte de viabilité cellulaire des bactéries lyophilisées au cours de leur stockage. Notre étude a permis d'identifier précisément les constituants cellulaires impliqués dans ces phénomènes d'oxydations membranaires (**articles 4 et 5**). Une baisse des rapports acide linoléique (C18:2)/acide palmitique (C16:0) et acide linolénique (C18:3)/acide palmitique (C16:0) ainsi que l'accumulation des produits primaires de dégradation du C18:2 ou C18:3 ont été observées au cours du stockage de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11 dans des conditions d'aération, en présence d'une humidité et une température élevées (**article 4**). Ces résultats viennent d'être confirmés par ceux de Coulibaly *et al.* (2009) qui indiquent également des baisses des rapports C18:2/C16:0 ou C18:3/C16:0 chez les souches lyophilisées *L. plantarum* CWBI-B534 et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Kenya MRog2, au cours de leur stockage dans les mêmes conditions. Tout comme ces auteurs, 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. Cette instabilité serait justifiée, dès lors que ce serait les acides gras de la fraction polaire des lipides membranaires qui seraient oxydés, comme nous l'avons observé dans notre étude (**article 5**). Nous avons supposé à cette occasion, que la dégradation des acides gras polyinsaturés de la fraction polaire des lipides entraînerait des perturbations dans la perméabilité cellulaire, qui elle-même conduirait à la perte de viabilité cellulaire et/ou du pouvoir d'acidification de la souche *W. paramesenteroides* LC11. Cette hypothèse est en accord avec celle de Van Ginkel et Sevanian (1994) et de Livense *et al.* (1994), qui ont indiqué que tout changement au niveau

des phospholipides, constituants majoritaires de la fraction lipidique polaire de la membrane cellulaire, affecterait la perméabilité de cette dernière et conduirait à la mort cellulaire. Par ailleurs, la grande sensibilité à l'oxydation des acides gras polyinsaturés de la fraction polaire a été confirmée lorsque nous avons comparé l'effet de la présence de composés protecteurs (cryoprotecteurs + antioxydants) sur la viabilité, l'intégrité cellulaire, l'oxydation des lipides ainsi que l'évolution du rapport C18:2/C16:0 ou C18:3/C16:0 de la souche lyophilisée *W. paramesenteroides* LC11. Nous avons pu observer une meilleure viabilité cellulaire, une réduction de la perte d'intégrité cellulaire et de l'oxydation des lipides ainsi qu'un rapport C18:2/C16:0 ou C18:3/C16:0 plus élevé.

Nos résultats ont apporté des preuves expérimentales aux hypothèses précédemment formulées et selon lesquelles : (i) l'exposition à l'air, à une forte humidité ainsi qu'à une température élevée influencerait la stabilité des bactéries lactiques lyophilisées au cours de leur stockage, (ii) la perte de viabilité cellulaire et/ou du pouvoir d'acidification des bactéries lactiques lyophilisées seraient liées. De plus, ils confirment l'importance que revêt le contrôle des conditions de stockage des cultures starters lyophilisées en vue de leur utilisation pour la production de 'gari' dans l'Afrique de l'Ouest.

Limites de l'étude et perspectives de recherches

Il est important de rappeler que notre étude s'inscrit dans un objectif plus large de l'amélioration de la qualité du 'gari'. En conséquence, si elle montre d'un point de vue pratique que la standardisation du procédé de fabrication de 'gari' est possible, grâce à l'utilisation des cultures starters lyophilisées, à condition d'appliquer des conditions de stockage adéquates, il faudra cependant dans le futur étendre les essais d'inoculations dans d'autres unités de production de la sous région Ouest-Africaine afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

D'une façon générale il n'existe pas encore de cultures starters lyophilisées commercialisées pour la production de 'gari' en Afrique de l'Ouest. Des études sont donc nécessaires pour définir les potentialités de l'utilisation d'une culture starter lyophilisée en tenant compte, dans chaque pays, des indicateurs de performance tels que : (i) la longue tradition et l'acceptation générale de la fermentation spontanée, (ii) le rapport coût/bénéfice, ainsi que (iii) l'amélioration des conditions d'hygiène et de salubrité.

La production de 'gari' s'intègre de plus en plus dans l'espace économique Ouest-Africain. Pour répondre à la demande urbaine, des filières s'organisent et des groupements de

transformation naissent, tels que celui de Ouèdo (Bénin) cité plus haut. Dans ce contexte le ‘gari’ doit être considéré comme un fait social global. C'est-à-dire qu'il faut désormais s'intéresser non seulement au produit fini mais également au processus d'approvisionnement des matières premières (tubercules de manioc), à la transformation de la matière première, à la distribution, à la vente et à la consommation dans un contexte économique et social donné, mais susceptible d'évolution. A cet égard, (i) seule l'analyse des pratiques de production et de vente du ‘gari’, et des stratégies familiales, de groupes ou locales (pays de la sous région Ouest-Africaine) qui les sous entendent, ainsi que (ii) l'étude des motivations des consommateurs urbains et de leurs besoins permettront d'envisager des essais de transpositions à l'échelle semi-industrielle en tenant compte des besoins des transformatrices, des vendeurs et autres intermédiaires de la filière ‘gari’.

D'un point de vue fondamental, notre étude a permis de confirmer l'importance du contrôle des conditions de stockage au cours de la conservation des cultures starters lyophilisées. Nous avons apporté des supports expérimentaux à l'hypothèse selon laquelle les phénomènes d'oxydations membranaires et la perte de viabilité cellulaire et/ou du pouvoir d'acidification des bactéries lyophilisées au cours de leur stockage, étaient liés. Nous avons alors suggéré que cette instabilité pourrait être due aux changements qui affectaient l'intégrité cellulaire, à la suite de l'oxydation des acides gras membranaires des lipides de la fraction polaire. L'identification de ces derniers ainsi que l'étude de l'impact de tels changements sur leurs structures, aideraient à une meilleure compréhension des phénomènes d'oxydation membranaires. Cependant, cette hypothèse seule ne pourrait suffire à expliquer la baisse de viabilité cellulaire et/ou du pouvoir d'acidification dès les premières heures du stockage de la souche *W. paramesenteroides* LC11. Deux constatations nous amènent à penser que cette situation pourrait s'expliquer par l'apparition de modifications au niveau de la perméabilité cellulaire de la souche *W. paramesenteroides* à la suite de la lyophilisation (**article 6**) : d'une part, l'augmentation de la concentration en sels ou glutamate monosodique, 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 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 vivantes. De plus, les résultats d'autres travaux ont indiqué des changements dans la perméabilité et la structure de la membrane cellulaire, ainsi que la perte du matériel génétique et des protéines au cours de la réhydratation des bactéries

lyophilisées (Sinskey et Silverman, 1970 ; Brennan *et al.*, 1986 ; Teixeira *et al.*, 1995 ; Selmer-Olsen *et al.*, 1999 ; Santivarangkna *et al.*, 2007). Pour pallier à ces inconvénients des méthodes de protection ont été envisagées. L'effet protecteur de certains sucres sur la structure de la membrane cellulaire au cours de la déshydratation est maintenant bien connu (Oldenhof *et al.*, 2005). Il a été par exemple démontré que, dans des conditions de stress, la présence du saccharose permettait de réduire les changements dans la structure des phospholipides que pouvait entraîner la déshydratation (van den Bogaart *et al.*, 2007). En revanche, l'action des composés protecteurs sur les états énergétiques et physiologiques de la cellule bactérienne restent encore mal connus. L'étude de la force motrice des protons (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.

Références

- Amoa-Awua W.K.A., Appoh F.E., Jakobsen M. 1996. Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int. J. Food Microbiol.* 31: 87-98.
- Amoa-Awua W.K., Owusu M., Feglo P. 2005. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1201-1207.
- Andersen A.B., Fog-Petersen M.S., Larsen H., Skibsted L.H. 1999. Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as Related to Physical State of Freezing Matrix. *Lebensm.-Wiss. u; - Technol* 32: 540-547.
- Beker M.J., Rapoport A.I. 1987. Conservation of yeasts by dehydration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 35: 127-171.
- Bozoglu T.F., Ozilgen M., Bakir U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying. *Enz Microbiol Technol* 9: 531-537.
- Brennan M., Wanismail B., Ray B. 1986. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Prot.* 49: 47-53.
- Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 172-176.
- Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. 1996. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol Lett* 18: 99-104.
- Champ M., Szytli O., Raibaud P., Aït-Abdelkader N. 1983. Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 487-493.

- Champagne C., Gagne D. 1987. Activité acidifiante de trois souches de *Streptococcus thermophilus* cultivées sur milieux tamponnés commerciaux. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 20: 34-37.
- Coulibaly I., Yao A.A., Lognay G., Destain J., 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.
- Dimmick R.L., Heckly R.J. 1961. Free radical formation during storage of freeze-dried *Serratia marcescens*. *Nature* 192: 776.
- M. Egounlety, 2007. Improving the quality and nutritional status of *gari* through the use of starter cultures and fortification with soybean, palm oil and coconut milk. Final six month Report, GARISECURE Project, 49p.
- Egounlety M., Adjakidjè A., Ségbédji C. M., Yao A.A., Dortu C., Thonart P., Pinto C., Franz C., Holzapfel W., Mbugua S. M., Mengu M., Aaen T. 2008. Evaluation of freeze-dried lactic acid bacteria starter cultures in fermentation of cassava mash fortified with soybean and palm oil for production of fortified *gari*. World Congress of Food Science and Technology, Shanghai, China, 19-23 October.
- Fayed E.O., Sultan N.E., Yassien N.I., Shehata A.E. 1986. The effect of lyophilisation on viability and activity of lactic acid bacteria cultivated in whey treated with certain proteolytic enzymes. *Egypt. J. Food Sc.* 14: 313-322.
- Font de Valdez G., Savoy de Giori G., Pesce de Ruiz H.A., Olivier G. 1986. Stability of freeze-dried lactic acid bacteria during storage. *Microbiol. Alim.Nutr.* 4: 237-240.
- Giraud E., Brauman A., Keleke S., Lelong B., Raimbault M. 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 379-383.
- Giraud E., Raimbault M. 1993. Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 62: 77-82.
- Guiraud E., Gosselin L., Raimbault M. 1992. Degradation of cassava linamarin by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Lett.* 14: 593-598.
- Guiraud E., Brauman A., Keleke S., Gosselin L., Raimbault M. 1995. Contrôle de la fermentation du manioc pour un meilleur *gari* : utilisation d'un starter de *Lactobacillus plantarum* à activité linamarase et amylase. In : Agbor E.T., Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S.(ed). *Transformation alimentaire du manioc*. Paris: ORSTOM p. 353-365.
- Huch M., Hanak A., Specht I., Dortu C., Thonart P., Mbugua S., Holzapfel W.H., Hertel C., Franz C.M.A.P. 2008. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentation for *Gari* production. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 258-267.
- Ishibashi N., Tatematsu I., Shimamura S., Tomita M., Okonogi S. 1985. 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.R.-I.I.F.) International Institute of Refrigeration. Tokyo, Japan, Commission C1. 227-232.

- Jansen G.R., Odeen L., Tribelhorn R.E., Harper J.M. 1981. The calorie densities of gruels made from extruded corn-soy blends. *Food Nutr. Bull.* 3: 39-44.
- Kimaryo V.M., Massawe G.A., Olasupo N.A., Holzapfel W.H. 2000. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of "kivunde", a traditional Tanzanian food product. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 179-190.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. 2005. 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.* 28: 527-540.
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A.P., Holzapfel W. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 342-351.
- Lievense 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.
- Marin M., René F. 2000. Lyophilisation. *Techniques de l'ingénieur* F-3240: 1-9.
- Marshall B.J., Goote G.G., Scott W.J. 1974. A study of factors affecting the survival of dried bacteria during storage. *Div. Food Res. Tech. Pap.* 39: 1-29.
- Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Olinude A.A. 2004. Effect of bacteriocinogenic *Lactobacillus* spp. on the shelf life of fufu, a traditional fermented cassava product. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 57-63.
- Okafor N. 1977. Microorganisms associated with cassava fermentation for 'gari' production. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 279-284.
- Okafor N., Ejiofor A. 1990. Rapid detoxification of cassava mash fermenting for garri production following incubation with a yeast simultaneously producing linamarase and amylase. *Process Biochem. Int.* 25: 82-86.
- Okafor N., Umeha C., Ibenegbua C., Obizobab I., Nnamb N. 1998 . Improvement of garri quality by the inoculation of microorganisms into cassava mash. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 43-49.
- Okafor N., Umeh C., Ibenegbu C. 1998. Amelioration of garri, a cassava-based fermented food by the inoculation of microorganisms secreting amylase, lysine and linamarase into cassava mash. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 835-838.
- Olasupo N.A., Olukoya D.K., Odunfa S.A. 1996. Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Nahrung* 40: S. 44-46.
- Oldenhof H., Wolkers W.F., Fonseca F., Passot S., Marin M. 2005. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnol. Prog.* 21: 885-892.

- Raimbault M. 1995. Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc. In : Agbor Egbe T., Agbor E., Brauman A., Griffon D., Trèche S. (ed.). *Transformation alimentaire du manioc = Cassava food processing*. Paris : ORSTOM p. 259-275.
- 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.
- Scheirlinck T., Mahillon J., Joos, H., Dhaese P., Michiels F. 1989. Integration and Expression of oL-Amylase and Endoglucanase Genes in the *Lactobacillus plantarum* Chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2130-2137.
- Selmer-Olsen E., Birkeland S.E., Sørhaug 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.
- Sinskey T.J., Silverman G.J. 1970. Characterization of Injury Incurred by *Escherichia coli* up on Freeze-Drying. *J. Bacteriol.* 101: 429-437.
- Sobowale A.O., Oyewole O.B. 2008. Effect of lactic acid fermentation of cassava on functional and sensory characteristics of fufu flour. *J. Food Process. Preserv.* 32: 560-570.
- Teixeira P., Castro H., Kirby R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Appl. Microbiol.* 78: 456-462.
- van den Bogaart G., Hermans N., Krasnikov V., de Vries A.H., Poolman B. 2007. On the decrease in lateral mobility of phospholipids by sugars. *Biophys. J.* 92: 1598-1605.
- van Ginkel G., Sevanian, A. 1994. Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. *Methods Enzymol.* 233: 273-288.

LISTE DES PUBLICATIONS ET ACTIVITES SCIENTIFIQUES

Expériences depuis l'obtention du diplôme de second cycle

2008 : Stage d'une journée sur la rédaction des articles scientifiques en anglais sous la direction du Professeur Jacques Piette et du réseau des doctorants de l'ULg, Amphithéâtre Welsch, Université de Liège, Belgique

2006 : Stage d'un mois effectué sous la direction du Professeur Moutairou Egounlety, dans le laboratoire de Nutrition et Sciences Alimentaires de la Faculté des sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

2004 : Stage d'un mois effectué sous la direction du Professeur Mireille Dosso, dans le laboratoire de Microbiologie et de Sécurité des Aliments, de l'Institut Pasteur d'Abidjan, Côte d'Ivoire.

2003 : Stage de 6 mois effectué sous la direction du Professeur Philippe Thonart, dans le laboratoire de Technologie Microbienne du Centre Wallon de Biologie Industrielle, de l'Université de Liège, Belgique

Publications scientifiques

Publication en premier auteur

Yao A. A., Thonart P. Changes in membrane permeability during rehydration of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11. *Ind. Biotechnol.*, Submitted.

Yao A.A., Egounlety M., Kouame L. P., Thonart P. Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, Accepté.

Yao A.A., Dortu C., Egounlety M., Pinto C., Vinodh A. E., Huch (née Kostinek) M., Franz, C. M. A. P., Holzapfel W., Mbugua S. M., Mengu M., Thonart P. Production of freeze-dried lactic acid bacteria starter culture for cassava fermentation into *gari*. *Afr. J. Biotechnol.*, Accepted.

Yao A.A., Wathelet B., Thonart P. 2009. Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *J. Microbiol. Biotechnol.* : In press

Yao A.A., Coulibaly I, Lognay G., Fauconnier M-L, Thonart P. 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

Yao A.A., Bera F., Franz C., Holzapfel W., Thonart P. 2008. Survival Rate Analysis of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria Using the Arrhenius and z-Value Models. *J. Food Prot.* 71: 431-434.

Publication en co-premier auteur

Coulibaly I., Yao A.A., Lognay G., Destain J., 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.

Présentation orale

Séminaire, 25 Février 2009, Université de Liège (Belgique). Les facteurs anti-nutritionnels du manioc n'empêchent pas sa valorisation alimentaire.

Communications à des congrès

Egounlety M., Adjakidjè A., Ségbédji C. M., Yao A.A., Dortu C., Thonart P., Pinto C., Franz C., Holzapfel W., Mbugua S. M., Mengu M., Aaen T. 2008. Evaluation of freeze-dried lactic acid bacteria starter cultures in fermentation of cassava mash fortified with soybean and palm oil for production of fortified gari. World Congress of Food Science and Technology, Shanghai, China, 19-23 October.

Yao A.A., Coulibaly I., Lognay G., Fauconnier M.-L., Thonart P. 2008. Oxilipin profiling during storage of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11. Food Micro, ghent, Belgium, 11-12 September.

Egounlety M., Adjakidjè A., Ségbédji C. M., Yao A.A., Dortu C., Kostinek M., Franz C., Thonart P., Holzapfel W. and Mengu M. 2007. Towards the industrialization of traditional African fermented foods: a case study of fortified gari in Benin. Atelier international « Potentialités à la transformation du manioc (*Manihot esculenta* crantz) en Afrique de l'Ouest », Abidjan, Côte d'Ivoire, 4-7 Juin.

Egounlety M., Adjakidjè A., Yao A.A., Dortu C., Thonart P. 2006. Production du gari ordinaire par inoculation de cultures de *Lactobacillus plantarum*. Affiche présentée au 13^{ème} Congrès IUFoST¹, Nantes, France, 17-21 Septembre.

Pinto, C., Edward V., Dortu C., Thonart P., Yao A.A., Egounlety M., Mbugua S., Kostinek M., Franz C.M., Holzapfel W., Aaen T., Mengu M. 2006. Amélioration de la qualité et de la valeur nutritionnelle du gari par l'utilisation des levains et la fortification avec le soja, l'huile de palme et le lait de coco. Food Micro, Bologna, Italie, 28-31 Août.

Thonart P., Dortu C., Yao A.A., Vindoh E., Pinto C., Egounlety M., Kostinek M., Franz C M., Mbugua S., Mengu M., Holzapfel W. H. 2006. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains for their use as starter cultures during fortified cassava fermentation for the production of gari. Food Micro, Bologna, Italie, 29 August -2 September.

Dortu C., Thonart P., Pinto C., Edward C.M.S.T., Yao A.A., Egounlety M., Mbugua S., Kostinek M., Franz C.M., Holzapfel W., Mengu M., Aaen T. 2006. Improving the quality and

¹IUFoST : International Union of Food Science and Technonlogy

nutritional status of *Gari* through the use of starter cultures and fortification with soybean, palm oil and coconut milk. Food Micro, Bologne, Italie, 29 August -2 September.

Yao A.A., Dortu C., Holzapfel W., Franz C. M., Mbugua S., Egounlety M., Edward C.M.S.T., Pinto C., Mengu M., Thonart P. 2006. Study of lactic bacteria for their use as starter cultures during cassava fermentation for gari production. Bioforum, Liège, Belgium, 17 May.

Yao A.A., Dortu C., Holzapfel W., Franz C. M., Mbugua S., Egounlety M., Edward C.M.S.T., Pinto C., Mengu M., Thonart P. 2006. Freeze-drying of lactic acid bacteria as starter cultures for gari production. Bioforum, Liège, Belgium, 17 May.

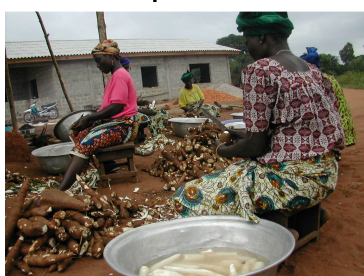
Participation à des réunions scientifiques

1. Thirteenth Conference on Food Microbiology, 2008, 11-12 September/ghent, Belgium
2. Bioforum, 2007, 11 October/Liège, Belgium
3. Bioforum, 2006 17 May/Liège, Belgium
4. Eleventh Conference on Food Microbiology, 2006, 14-15 September/ghent, Belgium

ANNEXES



(1) Tubercules de manioc



(2) Epluchage



(3) Lavage



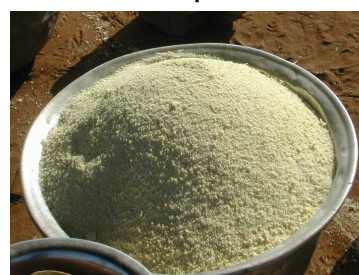
(4) Broyage



(5) Fermentation



(6) Garification et cuisson



(7) Gari cuit

Annexes 1 : Les principales étapes de la production traditionnelle de 'gari'



A



B



C

Annexe 2 : Stockage des poudres lyophilisées de *Weissella paramesenteroides* LC11 ; (A) dans des sachets en aluminium fermés sous vide, (B) à une activité d'eau de 0.23 et à une température de 20°C, (C) à une activité d'eau de 0.11 et à une température de 4°C.

