



Influence of harvesting and concentration conditions on the physiological state and cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cfl1

Fernanda Streit

► To cite this version:

Fernanda Streit. Influence of harvesting and concentration conditions on the physiological state and cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cfl1. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0040 . pastel-00004299

HAL Id: pastel-00004299

<https://pastel.hal.science/pastel-00004299>

Submitted on 19 Mar 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°/ / / / / / / / / / /

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Génie Microbiologique

*présentée et soutenue publiquement
par*

Fernanda STREIT

le 18 juin 2008

INFLUENCE DES CONDITIONS DE RECOLTE ET DE CONCENTRATION SUR L'ETAT PHYSIOLOGIQUE ET LA CRYOTOLERANCE DE LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS CFL1

Directeur de thèse : Catherine BEAL

*Travail réalisé à : AgroParisTech, INRA, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires
F-78850 Thiverval-Grignon*

Devant le jury :

Mme Catherine BEAL	Professeur, AgroParisTech, Grignon	Examineur
M. Jean-François CAVIN	Professeur, ENSBANA, Dijon	Rapporteur
M. Georges CORRIEU	Directeur de Recherches, INRA, Grignon	Examineur
M. Franck GRATTEPANCHE	Chercheur, ETH Zurich	Examineur
Mme Muriel MERCIER-BONIN	Chargé de Recherches, INRA, Toulouse	Rapporteur

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Grignon, initialement sous la direction de Monsieur Georges CORRIEU et plus récemment sous la direction de Madame Michèle MARIN. Je les remercie sincèrement tous les deux pour leur accueil au sein du laboratoire et aussi pour leurs conseils et soutien scientifique tout au long de mon travail.

Je remercie la CAPES (Fondation subordonnée au Ministère de l'Education du Brésil) pour son soutien financier à travers ma bourse d'étude.

Je voudrais remercier particulièrement Madame Catherine BEAL, professeur à l'AgroParisTech, pour son encadrement, ses conseils et ses critiques, toujours constructives. Ces quasi quatre ans ont été pour moi une période de grand apprentissage et elle a été partie active de cette évolution. Je lui dois aussi un grand merci pour sa confiance, sa motivation et sa compréhension. Ce manuscrit représente plusieurs heures de réunions, de discussions, de partage, de questionnements, toujours très enrichissantes. Merci, Catherine, pour tout le temps que tu as dédié à mon travail.

Je remercie vivement Monsieur Jean François CAVIN, Professeur à l'ENSBANA, Dijon et Madame Muriel MERCIER-BONIN, Chargé de Recherches à INRA, Toulouse qui me font l'honneur d'assumer la charge de rapporteur de cette thèse. Je remercie également M. Franck GRATTEPANCHE, Chercheur à ETH, Zurich, de bien vouloir évaluer ce travail.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Jérôme DELETTRE pour son aide et, surtout, sa disponibilité pour m'avoir fait connaître le monde de l'électrophorèse bidimensionnelle. Je garderai un très bon souvenir de sa personne, toujours agréable et prêt à m'aider à trouver une solution aux problèmes scientifiques mais aussi personnels. Merci, merci.

Ma plus sincère gratitude à Fernanda FONSECA. Plus qu'un exemple professionnel, j'admire son courage, sa détermination et sa joie de vivre. Merci pour tous tes conseils et pour ton amitié. Te adoro ! Merci aussi à Violaine ATHES pour toute son aide et ses précieux conseils pour la mise en place du module de microfiltration.

Un merci spécial à Elisabeth MALTESE, pour sa disponibilité, sa volonté, son soutien et sa rigueur... Son aide a été primordiale pour l'amélioration de mon français. Muito obrigada !

Ce travail n'aurait pas été le même sans la complicité de plusieurs personnes avec qui j'ai partagé le bureau. Un énorme merci à Mathieu SERVAES et Gisèle CHAMMAS, deux personnes magnifiques. Leur aide, scientifique et personnelle, a été précieuse pour pouvoir surmonter des moments pas toujours faciles et avec qui j'ai eu le plaisir de partager les moments de bonheur. Avec des passages plus courts, mais aussi importants, je remercie l'amitié de Aline (enfin arrivée ☺), Amine, Monserrathe, Reine, Zacharie et Xavier.

Au cours de cette thèse, j'ai eu de la chance de rencontrer des personnes spéciales, sans lesquelles mon séjour en France n'aurait pas été le même. Grand bisous à Alain, Anne, Anne-Sophie, Aurélie, Clém, Françoise, Haythem, Julie Bailly, Julie Hubo, Marjolaine, Michel, Mikael, Pawinee (« normal » !!!), Roselyne, Sam, Stéphanie (Cenard, Herrault et Passot), Sophie Chassagne, Sophie Magnan, Soulaf (« Habibi »), Teresita, Thomas et tous ceux que ma mémoire, parfois courte, a pu oublier. Bien sûr, je ne pourrais pas oublier Madame La Baronne et son anti-dépresseur !!! Vous allez tous me manquer !

Enfin, un merci tout spécial à ma famille et à mon chéri. Sans leurs encouragements et leur compréhension, je ne serais pas arrivée là. C'est dur de rester loin de vous... Amo vocês !

Table de matières

LISTE DES PUBLICATIONS.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	10
CHAPITRE I - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I.1 Applications des bactéries lactiques et probiotiques.....	13
I.1.1 Définitions.....	13
I.1.2 Applications	13
I.1.3 Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées.....	14
I.2 Production de ferments lactiques	15
I.2.1 Evolution des techniques d'ensemencement	15
I.2.2 Avantages de l'utilisation des ferments concentrés	16
I.2.3 Formes commerciales des ferments lactiques	16
I.2.4 Procédé de production des ferments lactiques concentrés	17
I.2.4.1 Préparation et prétraitement des milieux de culture.....	17
I.2.4.2 Préparation de l'inoculum.....	18
I.2.4.3 Fermentation.....	18
I.2.4.4 Refroidissement et récolte des ferments	19
I.2.4.5 Concentration des cellules	20
I.2.4.6 Cryoprotection.....	20
I.2.4.7 Congélation ou lyophilisation.....	21
I.2.4.8 Conditionnement et mélange.....	22
I.2.4.9 Stockage, distribution et utilisation	22
I.3 Qualité technologique des ferments lactiques concentrés	23
I.3.1 Méthodes d'évaluation de la qualité technologique des ferments lactiques concentrés	23
I.3.1.1 Viabilité	23
I.3.1.2 Activité acidifiante	23
I.3.1.3 Autres propriétés technologiques et activités métaboliques.....	28
I.3.2 Facteurs influençant la qualité des bactéries lactiques concentrées congelées	32
I.3.2.1 Type de microorganisme	32
I.3.2.2 Milieu de culture	33
I.3.2.3 Conditions de culture.....	33
I.3.2.4 Age de la culture	35
I.3.2.5 Refroidissement des cellules.....	35

I.3.2.6	Concentration.....	36
I.3.2.7	Cryoprotection.....	38
I.3.2.8	Influence de la congélation.....	39
I.3.2.9	Stockage.....	42
I.3.3	Conclusion.....	42
I.4	Réponses physiologiques des cellules aux stress	43
I.4.1	Etude des changements au niveau de la membrane cellulaire.....	45
I.4.1.1	Fonctions et structure de la membrane	45
I.4.1.2	Modifications de la structure membranaire	46
I.4.1.3	Méthodes pour caractériser la membrane cellulaire	48
I.4.2	Changements au niveau du métabolisme cellulaire	49
I.4.2.1	Transcriptomique	51
I.4.2.2	Protéomique.....	52
I.4.2.3	Métabolomique.....	53
I.4.3	Facteurs influençant l'état physiologique des bactéries lactiques.....	55
I.4.3.1	Effet des conditions environnementales sur la composition en acides gras membranaires des bactéries lactiques et conséquences sur leurs fonctionnalités	55
I.4.3.2	Effet des conditions environnementales sur le protéome des bactéries lactiques et conséquences sur leurs fonctionnalités.....	63
I.5	Conclusion générale.....	72
CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES.....		73
II.1	Production de ferments lactiques concentrés.....	73
II.1.1	Microorganisme utilisé	73
II.1.2	Milieu de culture.....	73
II.1.3	Fermentation.....	73
II.1.3.1	Equipements et conditions de culture.....	73
II.1.3.2	Suivi et contrôle des fermentations.....	74
II.1.3.3	Arrêt des fermentations	76
II.1.3.4	Refroidissement et récolte.....	76
II.1.4	Concentration des suspensions bactériennes.....	76
II.1.4.1	Concentration par centrifugation	76
II.1.4.2	Concentration par microfiltration.....	77
II.1.5	Stabilisation	77
II.1.6	Techniques analytiques	77
II.1.6.1	Détermination de la concentration bactérienne.....	77
II.1.6.2	Analyse des constituants du milieu.....	78

II.2	Mesure de l'activité acidifiante	78
II.2.1	Système expérimental	78
II.2.2	Protocole de mesure.....	80
II.2.3	Mesure de l'activité acidifiante spécifique	80
II.2.3.1	Définition	80
II.2.3.2	Perte d'activité acidifiante spécifique au cours de l'étape de concentration	80
II.2.3.3	Perte de l'activité acidifiante spécifique au cours de la congélation	81
II.2.3.4	Perte de l'activité acidifiante spécifique au cours du stockage à -20 °C.....	81
II.3	Microfiltration tangentielle	83
II.3.1	Description du système de microfiltration	83
II.3.1.1	Module	83
II.3.1.2	Mesure du flux de perméat.....	85
II.3.2	Calcul des paramètres caractéristiques de la microfiltration.....	85
II.3.3	Caractérisation du module de microfiltration	86
II.3.3.1	Détermination de la résistance hydraulique.....	86
II.3.3.2	Etalonnage de la pompe	87
II.3.3.3	Relations entre les paramètres réglables du module et les variables caractéristiques de la microfiltration	88
II.3.4	Nettoyage et décontamination du système de microfiltration.....	90
II.3.4.1	Nettoyage.....	90
II.3.4.2	Décontamination	91
II.4	Analyse de la composition en acides gras membranaires	91
II.4.1	Lavage des cellules	92
II.4.2	Méthylation et extraction	92
II.4.3	Analyse des acides gras méthylés par chromatographie en phase gazeuse.....	92
II.4.4	Identification des composés.....	93
II.4.5	Quantification des teneurs relatives en acides gras membranaires.....	94
II.5	Analyse protéomique	94
II.5.1	Principe.....	94
II.5.2	Extraction et purification des protéines.....	95
II.5.2.1	Lavage et lyse des cellules	95
II.5.2.2	Dosage des protéines	95
II.5.2.3	Purification de l'échantillon	95
II.5.3	Première dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle	96
II.5.3.1	Focalisation isoélectrique	96
II.5.3.2	Equilibration	97
II.5.4	Deuxième dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle	97

II.5.4.1	Nettoyage et montage des plaques de gel	97
II.5.4.2	Préparation d'un gel d'acrylamide	97
II.5.4.3	Migration	98
II.5.5	Coloration des gels	98
II.5.6	Acquisition et analyse d'images	98
II.5.6.1	Numérisation des images	98
II.5.6.2	Analyse d'images	98
II.5.6.3	Comparaison des gels obtenus dans des conditions différentes	99
II.5.7	Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF	100
II.5.7.1	Principe	100
II.5.7.2	Protocole expérimental	101
II.5.7.3	Traitements des résultats	101
II.6	Plans d'expériences	101
II.6.1	Plan d'expériences de type CCRD	102
II.6.2	Effet d'une acidification en fin de fermentation	104
II.6.2.1	Influence du pH sur la croissance de <i>Lb. bulgaricus</i> CFL1	104
II.6.2.2	Description du plan d'expériences n°1	105
II.6.2.3	Effet du type d'acide utilisé pour l'acidification	106
II.6.2.4	Effet d'une remontée du pH à 6 après acidification	107
II.6.3	Effet des conditions de centrifugation	107
II.6.3.1	Description du plan d'expériences n°2	107
II.6.3.2	Effet de la température de centrifugation	108
II.6.4	Effet des conditions de microfiltration tangentielle	108
II.6.4.1	Description du plan d'expériences n°3	109
II.6.4.2	Comparaison entre microfiltration tangentielle et centrifugation	110
II.7	Traitements statistiques	110
II.7.1	Régressions linéaires	110
II.7.2	Régressions linéaires multivariées	110
II.7.3	Analyses de variance (ANOVA)	111
II.7.4	Analyses en composantes principales (ACP)	111
CHAPITRE III - RESULTATS ET DISCUSSION		113
III.1	Influence d'une acidification en fin de fermentation sur la cryotolérance de <i>Lb. bulgaricus</i> CFL1	113
III.1.1	Contexte et objectifs	113
III.1.2	Publication 1. L'acidification améliore la cryotolérance de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1	114

III.1.3 Conclusion.....	124
III.2 Influence d'une acidification en fin de fermentation sur les réponses physiologiques au niveau de la membrane et du protéome, liées à une meilleure cryotolérance de <i>Lb. bulgaricus</i> CFL1.....	125
III.2.1 Contexte et objectifs	125
III.2.2 Publication 2. L'adaptation acide de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> induit des réponses physiologiques, au niveau de la membrane et du cytoplasme, responsables d'une meilleure cryotolérance.....	126
III.2.3 Conclusion.....	147
III.3 Influence des conditions de concentration par centrifugation sur la cryotolérance de <i>Lb. bulgaricus</i> CFL1	148
III.3.1 Contexte et objectifs	148
III.3.2 Publication 3. Effet des conditions de centrifugation sur la cryotolérance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> CFL1	149
III.3.3 Conclusion.....	163
III.4 Effet des conditions de microfiltration tangentielle sur l'état physiologique et les propriétés technologiques de <i>Lb. bulgaricus</i> CFL1	164
III.4.1 Contexte et objectifs	164
III.4.2 Publication 4. Les conditions de microfiltration induisent des changements de la cryotolérance de <i>Lb. bulgaricus</i> , correspondant à des réponses physiologiques différentes des cellules	165
III.4.3 Analyse des changements du protéome de <i>Lb. bulgaricus</i> CFL1 en fonction des conditions de microfiltration	186
III.4.4 Conclusion.....	191
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199
ANNEXES.....	215

Liste des publications

Publications dans des revues à comité de lecture

- F. Streit, G. Corrieu, C. Béal. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology*, 128 (3) 659-667. 2007.
- F. Streit, J. Delettre, G. Corrieu, C. Béal. Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1071-1080. 2008.
- F. Streit, G. Corrieu, C. Béal. Effect of centrifugation conditions on the cryotolerance of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1. *Food and Bioprocess Technology*. (accepté pour publication). 2008.
- F. Streit, A. Bchir, V. Athès, J. Delettre, G. Corrieu, C. Béal. Microfiltration conditions induce changes to *Lb. bulgaricus* cryotolerance in response to physiological changes. Soumis.

Communications lors de congrès

Communications affichées

- F. Streit. One acid adaptation increases the cryotolerance of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 cells. Journées de l'Ecole Doctorale ABIES, Paris, France, 8 – 9 mars 2006. Prix de meilleur poster.
- F. Streit, G. Corrieu, C. Béal. Effect of an acidification on the *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 cells resistance to freezing. 14^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques, CBL 2006, Paris, France, 17 – 19 mai 2006.
- F. Streit, G. Corrieu, C. Béal. Acid adaptation improves cryotolerance of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1. 43rd Annual Meeting of Society for Cryobiology, CRYO 2006, Hamburg, Allemagne, 24 – 27 juillet 2006. Financé par l'Ecole Doctorale ABIES.
- F. Streit, G. Corrieu and C. Béal. Des acides gras membranaires sont de bons indicateurs de la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1. 15^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques, CBL 2007, Rennes, France, 13 – 15 novembre 2007.

Communications orales

- F. Streit, F. Fonseca, G. Corrieu, C. Béal. Cryotolerance of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 is related to membrane fatty acid composition. 44rd Annual Meeting of Society for Cryobiology, CRYO 2007, Lake Louise, Alberta, Canada, 28 juillet – 1 août 2007. Financé par la « Society for Cryobiology ».
- F. Streit. Influence of process conditions on cryotolerance of concentrated *Lb. bulgaricus* starters. 2nd European Workshop on Food Engineering and Technology, Massy, France, 26 – 27 mai 2008.

Liste des abréviations

2D	electrophorèse bidimensionnelle
μ	viscosité d'un fluide (Pa.s)
a	pente de la droite représentant la densité de flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)
ACP	analyse en composantes principales
ADN	acide désoxyribonucléique
AGM	acides gras membranaires
ANOVA	analyse de variance
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
CCRD	central composite rotatable design (plan centré isovariant par rotation)
C/S	rapport entre la concentration en acides gras membranaires cycliques et saturés
CS	vitesse de rotation de la centrifugeuse (g)
CSP	cold shock proteins (protéines de choc thermique froid)
CF	condition de microfiltration
Cond	conductivité électrique ($mS.cm^{-1}$)
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CPG	chromatographie en phase gazeuse
dCond	variation de conductivité électrique à V_{mCond} ($mS.cm^{-1}$)
dCond/dt	vitesse de variation de la conductivité électrique ($mS.cm^{-1}.min^{-1}$)
DE	expression différentielle d'une protéine
dm/dt	vitesse de consommation de soude ($g.min^{-1}$)
dNaOH	consommation de soude correspondant à V_{mNaOH} (g)
DSC	differential scanning calorimetry (analyse enthalpique différentielle)
$d\tau_{spe}$	perte d'activité acidifiante spécifique pendant la concentration ($min.(\log(UFC.mL^{-1}))^{-1}$)
dtf_{spe}	perte d'activité acidifiante spécifique pendant la congélation ($min.(\log(UFC.mL^{-1}))^{-1}$)
D	durée de centrifugation (min)
DE_{120}	débit à l'eau ($L.h^{-1}$)
dpH/dt	vitesse d'acidification ($UpH.min^{-1}$)
F	fréquence de pompage (Hz)
FAME	fatty acid methyl esters (esters méthyliques d'acides gras)

HSP	heat shock proteins (protéines de choc thermique chaud)
J	densité de flux de perméat ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)
KT	coefficient permettant de standardiser la valeur de la température à 20°C pendant la vérification du nettoyage du module de microfiltration
k_{spe}	vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique au cours du stockage ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}).\text{j}))^{-1}$)
kDa	unité de masse moléculaire des protéines
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
GMPA	UMR Génie et microbiologie des procédés alimentaires
mNaOH	masse de soude consommée (g)
MALDI-TOF	désorption-ionisation laser assistée par matrice – temps de vol
MF	facteur de modification de l'intensité des protéines
MCF	facteur de concentration massique
<i>P</i>	valeur de probabilité critique (%)
P_{PE}	pression absolue du perméat à l'entrée de la membrane (bars)
P_{PS}	pression absolue du perméat à la sortie de la membrane (bar)
P_{RE}	pression absolue du rétentat à l'entrée de la membrane (bar)
P_{RS}	pression absolue du rétentat à la sortie de la membrane (bar)
pH _m	pH correspondant à la vitesse maximale d'acidification (upH)
pI	point isoélectrique
PM_1	pression à l'entrée de la membrane de microfiltration (bar)
PM_2	pression à la sortie du système de microfiltration (bar)
<i>Q</i>	débit de recirculation dans le module de microfiltration ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)
R^2	coefficient de corrélation
RE1	expression relative d'une protéine dans les gels de référence
RE2	expression relative d'une protéine dans les gels de comparaison
R_H	résistance hydraulique de la membrane (m^{-1})
<i>S</i>	section transversale de la membrane (m^2)
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
SAB	sérum albumine bovine
SDS	sodium dodécylsulfate
<i>T</i>	température (°C)
$t_{365_{\text{spe}}}$	activité acidifiante spécifique après 365 jours de stockage à -20°C ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}).\text{j}))^{-1}$)
$t_{\text{ac}_{\text{spe}}}$	activité acidifiante spécifique avant concentration ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}).\text{j}))^{-1}$)
$t_{\text{c}_{\text{spe}}}$	activité acidifiante spécifique après concentration ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}).\text{j}))^{-1}$)

t_{spe}	activité acidifiante spécifique après congélation ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$)
$tpH_{5,8}$	temps nécessaire pour atteindre le pH 5,8 (min)
$tpH_{5,8_{spe}}$	temps nécessaire pour atteindre le pH 5,8 rapporté au log de la concentration en biomasse ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$)
tpH_i	temps nécessaire pour atteindre un pH_i donné (min)
t_m	temps nécessaire pour atteindre V_m (min)
T_m	température de transition lipidique ($^{\circ}\text{C}$)
t_{mCond}	temps pour atteindre V_{mCond} (min)
t_{mNaOH}	temps pour atteindre V_{mNaOH} (min)
TMP	transmembrane pression (pression transmembranaire) (bar)
t_s	durée de stockage à -20°C (j)
t_{spe}	activité acidifiante spécifique ($\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$)
t_{Vm}	durée nécessaire pour atteindre les vitesses maximales de consommation de soude et d'augmentation de la conductivité (min)
UFC	unités-formant-colonie
U/S	rapport entre la concentration en acides gras membranaires insaturés et saturés
v	vitesse tangentielle (m.s^{-1})
V_m	vitesse maximale d'acidification (upH.min^{-1})
V_{mCond}	vitesse maximale de variation de la conductivité électrique ($\text{mS.cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
V_{mNaOH}	vitesse maximale de consommation de soude (g.min^{-1})
X	concentration bactérienne (UFC.mL^{-1})

Introduction générale

Les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé animale et humaine.

La production de ferments lactiques, située en amont de leurs applications, représente une activité industrielle importante. Produites par fermentation, généralement en cultures pures et en conditions contrôlées, les bactéries lactiques sont soumises à différentes opérations unitaires lors de leur production industrielle : refroidissement, concentration, cryoprotection, congélation ou lyophilisation et stockage à basse température. Or, l'objectif majeur de cette filière industrielle est de produire des concentrés bactériens de qualité élevée, c'est-à-dire, comportant un nombre élevé de cellules viables, présentant une reprise d'activité maximale lors de leur utilisation, capables d'être conservés le plus longtemps possible et bien reproductibles. Cependant, les étapes de la production des ferments induisent différents types de stress (nutritionnel, acide, thermique, osmotique, oxydatif, mécanique) qui sont à l'origine d'une dégradation de l'état physiologique des cellules, avec des conséquences directes sur la qualité technologique des ferments. Il est donc nécessaire de bien maîtriser tout l'ensemble de ces opérations pour obtenir des ferments présentant des propriétés technologiques optimales lors de leur utilisation.

Parmi les différentes opérations qui se succèdent lors du procédé de production des bactéries lactiques, la congélation est une étape critique pour le maintien de la qualité des ferments. L'exposition des cellules à des contraintes thermiques et physico-chimiques (osmotique, pH,...) au cours de cette étape agit négativement sur la survie et l'activité des bactéries et génère donc un stress important. Pour tenter de limiter et de mieux maîtriser ces phénomènes de dégradation, il est possible de jouer sur les conditions de stabilisation (cryoprotection et congélation) comme le fait, par exemple, l'équipe de Fernanda Fonseca au sein du laboratoire GMFA. En parallèle, différents travaux visent à comprendre les mécanismes physiologiques à l'origine de ces dégradations. Par exemple, des cellules cultivées dans un environnement acide ou à une faible température développent des mécanismes d'adaptation et démontrent une meilleure résistance (meilleure survie et meilleure activité) après l'étape de congélation et au cours du stockage sous forme congelée. La mise en contact des cellules avec un stress modéré leur permet en effet de s'adapter aux conditions défavorables, et donc de mieux résister à une situation de stress plus intense, comme celle qu'elles rencontrent lors de la congélation. En effet, en réaction à ces différentes conditions, les cellules développent des réponses physiologiques, principalement

au niveau membranaire et au niveau cytoplasmique. Ces réponses adaptatives semblent donc une voie intéressante pour l'amélioration de la cryotolérance des cellules. Les résultats actuellement disponibles décrivent principalement l'effet de conditions environnementales adverses (pH, température, composition du milieu au cours de la fermentation) pour modifier la résistance des bactéries lactiques à la congélation. En revanche, l'effet de stress modérés liés aux étapes de récolte et de concentration sur la résistance des cellules à la congélation et tout au long du stockage, ainsi que sur leur état physiologique, n'est pas encore connu.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de comprendre comment la résistance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1, soumise à un stress caractérisé par la congélation et le stockage sous forme congelée, est influencée par les étapes de récolte et de concentration. La première partie du travail porte sur l'étude de l'effet d'une acidification en fin de fermentation, avant le refroidissement. Dans un deuxième temps, l'influence des conditions de concentration par centrifugation sont analysées. La troisième partie de ce travail étudie les conséquences de la concentration des cellules par microfiltration tangentielle. Enfin, l'analyse des changements d'état physiologique des cellules suite à ces différentes conditions opératoires, par l'étude de leur composition en acides gras membranaires et de leur protéome, est réalisée. Avec ces résultats, l'objectif est d'identifier les mécanismes de réponse physiologique des cellules qui sont à l'origine de leur comportement, et de définir des conditions opératoires ayant un effet positif sur l'activité et la cryotolérance des cellules.

Ce mémoire de thèse est structuré en trois chapitres.

Une revue bibliographique, qui présente les applications des bactéries lactiques et décrit le procédé de production des concentrés bactériens, compose le chapitre I. Le concept de qualité des ferments, avec les méthodes permettant sa détermination et les principaux facteurs influençant cette qualité sont également présentés. Les réponses physiologiques des bactéries lactiques à une modification de leur environnement ou à un stress, sont ensuite analysées. Enfin, les méthodes permettant de déterminer et de quantifier ces réponses sont exposées, ce qui permet de présenter une analyse plus approfondie des changements connus au niveau de la composition en acides gras membranaires et du protéome cellulaire.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit décrit les principales méthodes appliquées pendant cette étude. Il présente les protocoles, les critères d'études retenus et les analyses statistiques réalisées. La description, la mise en place et le fonctionnement du module de microfiltration tangentielle sont également précisés.

Les résultats obtenus sont regroupés au chapitre III et sont discutés dans quatre parties différentes, structurées autour de quatre publications, dont trois sont acceptées.

La première partie présente les résultats de l'effet d'une préadaptation acide des cellules, en fin de fermentation, sur les paramètres technologiques liés à la résistance à la congélation et au stockage à -20°C de *Lb. bulgaricus* CFL1. L'effet de cinq pH et de cinq durées d'acidification est analysé à l'aide d'un plan d'expériences de type CCRD. L'influence du type d'acide utilisé pour effectuer l'acidification, ainsi que d'une remontée du pH à 6,0 avant congélation est également étudiée.

La deuxième partie des résultats vise à comprendre les mécanismes biologiques qui expliquent les différents niveaux de cryotolérance obtenus après acidification. Dans ce but, elle analyse les réponses physiologiques de *Lb. bulgaricus* CFL1, au niveau métabolique (protéomique) et au niveau de la membrane (composition en acides gras membranaires), en relation avec leur activité acidifiante et leur cryotolérance.

La troisième partie du travail a comme objectif de quantifier l'influence des conditions de centrifugation sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1. Trois paramètres liés à l'opération unitaire de centrifugation sont étudiés : trois niveaux différents de vitesse de rotation et de durée, ainsi que deux températures de centrifugation. L'effet combiné des conditions de centrifugation et d'une adaptation acide en fin de fermentation est également analysé.

La quatrième et dernière partie des résultats porte sur l'étude de l'effet des conditions de microfiltration sur les performances du procédé de concentration, mais également sur la résistance de *Lb. bulgaricus* CFL1 aux étapes de concentration, congélation et stockage à -20°C. Dans ce but, cinq valeurs de vitesse tangentielle et de pression transmembranaire sont testées, afin de définir la meilleure combinaison permettant d'obtenir des concentrés bactériens performants et cryotolérants. Les réponses physiologiques (composition en acides gras membranaires et protéome) des cellules, au regard de ces conditions, sont également étudiées.

Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail et de les analyser de façon plus globale, à la fois en termes de cryotolérance et de réponses physiologiques. Le manuscrit se conclut en présentant les principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

Chapitre I - Synthèse Bibliographique

I.1 Applications des bactéries lactiques et probiotiques

I.1.1 Définitions

Trouver une définition simple pour le terme « bactérie lactique » représente un exercice difficile. Selon Axelsson (1998), ce groupe de bactéries regroupe des bacilles et des coques à Gram positif, non sporulés, catalase négative, dépourvus de cytochrome, à métabolisme fermentaire, anaérobies mais parfois aérotolérants, fermentant les sucres en produisant principalement de l'acide lactique. Du fait de l'amplitude de cette définition, plusieurs genres de bactéries appartient à cette famille : *Aerococcus*, *Alloioococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella* (Pot, 2008). Elles sont toutes considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), exceptées certaines espèces d'entérocoques et certains ont obtenu le statut QPS (Quality Presumption of Safety).

Parmi ces bactéries, les bactéries probiotiques représentent les « microorganismes vivants qui, à travers leur ingestion à une certaine concentration, exercent un effet positif sur la santé humaine au-delà de la nutrition traditionnelle » (Guarner et Schaafsma, 1998). La concentration conseillée pour obtenir un effet bénéfique pour la santé est de l'ordre de 10^8 à 10^9 UFC par jour, et une consommation journalière de 100 g de lait fermenté contenant 10^6 UFC.g⁻¹ apporte cette concentration (Sondergaard, 2005).

I.1.2 Applications

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (Axelsson, 1998). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle.

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale.

Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (Daly *et al.*, 1998 ; Hugenholtz *et al.*, 2002). Selon Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998), la

fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de mille produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité.

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Wisselink *et al.*, 2002). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (Rodriguez *et al.*, 2003) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (Langella *et al.*, 2001).

1.1.3 Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées

L'utilisation des bactéries lactiques ou probiotiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes :

- Activité acidifiante : la transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (Frank et Hassan, 1998 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998) ;
- Production de métabolites d'intérêt : selon les espèces et selon les souches, les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites tels que l'acide acétique, l'éthanol, des arômes (diacétyl, acétaldéhyde...), des bactériocines (activité antimicrobienne), des exopolysaccharides, des enzymes (protéases, peptidases, lipases...) et du CO₂ (formation d'ouvertures dans les fromages) (Béal *et al.*, 2008 ; Frank et Hassan, 1998 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998) ;
- Propriétés enzymatiques : les activités protéolytique et peptidasique sont importantes car elles déterminent la capacité des bactéries lactiques à utiliser la fraction azotée du milieu. L'activité lysozymique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (Béal *et al.*, 2008) ;
- Propriétés spécifiques aux probiotiques : en plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (Da Cruz *et al.*, 2007 ; Ouwehand *et al.*, 2002). De plus, elles présentent des propriétés thérapeutiques spécifiques à chaque souche, principalement en termes d'activités immunostimulantes et anti-diarrhéiques ;
- Critères de performance : indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, les bactéries lactiques doivent être résistantes aux bactériophages, aux traitements

mécaniques, à la congélation ou à la lyophilisation et au stockage. Elles doivent également être tolérantes aux inhibiteurs de la croissance (antibiotiques, acidité, éthanol, chlorure de sodium) (Béal *et al.*, 2008).

1.2 Production de ferments lactiques

Le procédé de production de ferments lactiques concentrés, à l'échelle industrielle, comporte différentes étapes. L'établissement du cahier de charge pour la production d'un ferment lactique varie selon le type d'ensemencement envisagé ainsi que le type de microorganisme et la forme de stabilisation utilisée.

L'objectif de ce paragraphe est, dans un premier temps, de présenter brièvement l'évolution des techniques d'ensemencement des ferments lactiques, pour ensuite décrire leurs caractéristiques, les différentes formes commerciales possibles et finir avec une description des étapes du procédé de production des ferments lactiques concentrés.

1.2.1 Evolution des techniques d'ensemencement

Historiquement, l'utilisation industrielle des ferments lactiques se faisait grâce à la technique du « pied de cuve », où une partie du produit fermenté était conservé pour ensemer les fermentations suivantes. La nécessité d'un contrôle plus précis du procédé de fabrication et de la qualité finale du produit, ajoutée à une meilleure connaissance des propriétés technologiques des souches, a permis de développer, à partir des années 1920, la méthode d'ensemencement par précultures (Lejard *et al.*, 1994). A partir d'un échantillon liquide et en respectant les étapes successives de propagation, le ferment est multiplié jusqu'au volume nécessaire pour l'inoculation du produit. Cette méthode a permis une amélioration significative dans la conduite du procédé et la standardisation du produit final, par comparaison à la méthode du pied de cuve. Par contre, elle présente des inconvénients, concernant le risque de contamination des cultures et de mutation des souches. De plus, son coût est élevé, car elle nécessite du personnel spécialisé ainsi que des installations permettant de faire le « scale up » des précultures (Béal *et al.*, 2008 ; Smith, 2001 ; Tamime et Robinson, 1999). De plus, selon Tamime et Robinson (1999), cette méthode n'est pas appropriée dans le cas d'utilisation de cultures mixtes, car le maintien des proportions entre les souches est difficile.

Les ferments lactiques ont été produits pour la première fois sous forme concentrée et congelée au cours des années 1965-1970, et commercialisés, sur le marché américain, par les compagnies Boll-Hansen et Marshall-Miles (Maruejols et Caigniet, 1983), permettant ainsi l'ensemencement semi-direct ou direct des cuves de fabrication. Ce type de ferment a commencé à être produit, en France, à partir de 1978 par les sociétés Boll-Hansen et Eurozyme (Maruejols et Caigniet, 1983).

1.2.2 Avantages de l'utilisation des ferments concentrés

Grâce aux techniques de concentration, qui permettent l'obtention de 10^{10} à 10^{12} UFC.g⁻¹ (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998), ces ferments présentent des avantages intéressants, qui ont conduit au développement de la filière de production des ferments concentrés. Selon, Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998) et Béal *et al.* (2008), ces avantages se résument ainsi :

- Simplicité de leur utilisation ;
- Amélioration du contrôle de la fabrication ;
- Obtention de produits plus réguliers, due à la standardisation des cinétiques d'acidification, la régularité et la reproductibilité des productions ;
- Limitation des risques de contamination et des infections phagiques ;
- Flexibilité de l'organisation de la fabrication ;
- Réduction et meilleure maîtrise des coûts de production ;
- Possibilité de réalisation de mélanges précis entre les souches.

1.2.3 Formes commerciales des ferments lactiques

Les ferments lactiques utilisés dans le domaine agro-alimentaire sont généralement fournis aux utilisateurs sous trois formes physiques : liquide, congelée ou lyophilisée (Tamime et Robinson, 1999).

Pour des raisons de facilité de conservation, de transport et d'utilisation, la forme liquide a été largement supplantée par les formes congelées et lyophilisées. Ces dernières réduisent en effet le nombre de cultures intermédiaires en usine. Les ferments liquides restent, cependant, encore utilisés par certaines fromageries (Béal *et al.*, 2008).

La lyophilisation est une technique de stabilisation qui permet le stockage des bactéries à 4 °C ou -18 °C. L'intérêt de la lyophilisation des ferments lactiques est lié au fait que, grâce à la réduction de volume par rapport aux bactéries congelées, les coûts de stockage et de transport sont inférieurs. De plus, les cellules peuvent être stockées à température ambiante pendant plusieurs jours et sont plus facilement manipulables. Cependant, la lyophilisation implique des étapes et des équipements supplémentaires par rapport à la congélation, ce qui la rend plus coûteuse. De plus, cette technique n'est pas applicable à tous les ferments, en raison de l'importante sensibilité de certaines bactéries à la déshydratation.

Finalement, la congélation est actuellement la technique de conservation des bactéries lactiques la plus utilisée dans le domaine agro-alimentaire. Par rapport à la lyophilisation, elle permet une reprise d'activité plus rapide des ferments et présente un coût de fabrication inférieur à celui des ferments lyophilisés. Cependant, elle induit aussi des pertes de viabilité, inégalement maîtrisées jusqu'à présent. De plus, les ferments congelés nécessitent une attention spéciale par rapport au maintien de la chaîne du froid lors de leur transport et leur stockage. Il est aussi

préconisé que les bactéries congelées soient stockées à des températures inférieures à -45 °C, afin d'assurer la stabilité de la qualité et de l'activité des ferments.

1.2.4 Procédé de production des ferments lactiques concentrés

La production industrielle des ferments lactiques concentrés congelés est actuellement réalisée dans des unités de production spécifiques, selon un procédé impliquant plusieurs étapes (Béal *et al.*, 2008). La figure I.1 présente les différentes étapes de production des ferments lactiques concentrés qui sont décrites par la suite.

1.2.4.1 Préparation et prétraitement des milieux de culture

Le choix du milieu de culture des bactéries est important et doit prendre en compte des contraintes d'ordre physiologiques et technologiques. Si la composition du milieu varie selon les besoins nutritifs particuliers de chaque souche, il doit toujours contenir une source carbonée (généralement du lactose dans le cas des applications dans l'industrie laitière) et une source azotée (extraits de levure, par exemple) (Frank et Hassan, 1998). Sa complémentation avec des composés particuliers comme, par exemple, le Tween 80 ou des éléments minéraux peut être réalisée avec l'objectif d'améliorer leur croissance et de rendre les cellules plus résistantes aux étapes de concentration et stabilisation (Fonseca *et al.*, 2001 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). En plus de l'obtention d'un bon rendement en biomasse, les milieux doivent aussi présenter de bonnes caractéristiques de solubilité de leurs composants et de stabilité à la chaleur (Lejard *et al.*, 1994).

A la suite de sa préparation, le milieu de culture doit subir un traitement thermique pour éliminer les microorganismes contaminants. Ce traitement thermique est généralement réalisé par l'exposition du milieu de culture à une température élevée (entre 90 °C et 140 °C) pendant une durée prédéterminée. Le couple température/temps doit être optimisé pour éliminer les microorganismes contaminants sans trop modifier la composition du milieu (Béal *et al.*, 2008). Il est ensuite refroidi à la température de fermentation et son pH est ajusté à la valeur optimale pour la culture de la souche.

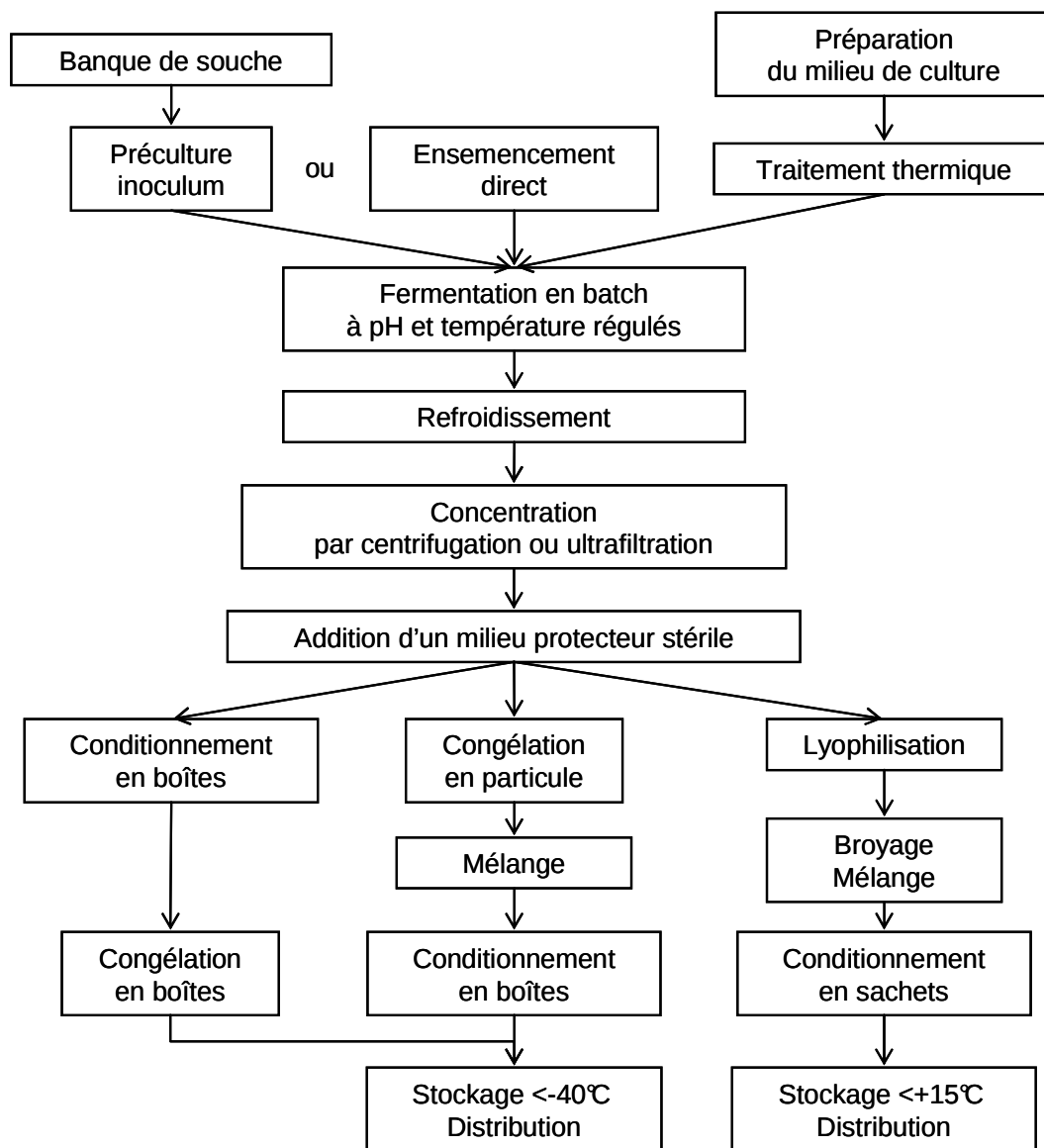


Figure I.1 : schéma de production des ferments lactiques concentrés (d'après Béal *et al.*, 2008)

I.2.4.2 Préparation de l'inoculum

Les souches utilisées pour inoculer les fermenteurs sont généralement conservées sous forme congelée (stockées sous vapeur d'azote ou à -80 °C), ou sous forme lyophilisée (stockées à 4 °C ou à -20 °C).

L'inoculation est effectuée, soit par ensemencement direct, en utilisant des bactéries congelées ou lyophilisées, soit à partir d'une préculture préalablement incubée. La majorité des productions de ferments est effectuée en cultures pures.

I.2.4.3 Fermentation

La fermentation est une des étapes clé de la production des ferments. Elle est généralement conduite en discontinu (batch) ou éventuellement en continu avec recyclage des cellules (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998).

Son objectif est d'obtenir à la fois une quantité de bactéries la plus élevée possible et présentant une activité métabolique (généralement activité acidifiante) la plus élevée possible. Selon cet objectif, la fermentation est conduite en conditions contrôlées de température, pH et agitation, aux conditions optimales pour la croissance de la souche (Frank et Hassan, 1998). La croissance des bactéries est favorisée quand la température est maintenue constante et égale à la valeur optimale pour le développement des cellules. Par contre, si l'objectif principal est la production d'acide lactique ou de bactériocines, les fermentations doivent être conduites à des températures inférieures à la température optimale de croissance (Béal *et al.*, 2008). La culture peut être conduite à pH libre ou régulé. La régulation du pH peut être réalisée, soit par l'ajout d'un neutralisant externe, soit par un contrôle interne à travers l'utilisation d'un milieu tamponné. Une production de biomasse entre 5 et 7 fois supérieure est ainsi obtenue pour les cultures à pH régulé par rapport aux cultures à pH libre (Cachon *et al.*, 1998). L'agitation doit être suffisante pour maintenir l'homogénéité du milieu, et favoriser le contrôle de la température et la neutralisation du milieu. Comme les bactéries lactiques sont anaérobies, elle ne doit cependant pas être excessive pour éviter l'incorporation d'oxygène et limiter la production de peroxyde d'hydrogène, toxique pour les cellules (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). L'effet négatif de l'oxygène sur la croissance des bactéries lactiques peut être minimisé si les cultures sont conduites en anaérobiose partielle ou totale, grâce à l'introduction de CO₂ ou d'azote gazeux en tête du fermenteur (Béal *et al.*, 2008).

La fermentation se déroule jusqu'au moment prédéfini comme étant le meilleur pour l'arrêt de la culture. Ce moment peut être établi comme l'instant représentant la consommation complète d'un constituant du milieu (source de carbone, par exemple) ou comme celui où les cellules se trouvent dans un état physiologique donné. Par exemple, Wang *et al.* (2005b) récoltent les cellules de *Lb. acidophilus* RD758 trois heures après avoir atteint la vitesse maximale de consommation du neutralisant. Si Fonseca *et al.* (2001), qui ont analysé l'effet de l'arrêt de la culture en phase exponentielle et en phase stationnaire de souche de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*, n'ont observé aucun effet sur la résistance des cellules à la congélation, il semble cependant que ce facteur joue un rôle sur la qualité des ferments.

1.2.4.4 Refroidissement et récolte des ferments

A la fin de la fermentation, le milieu fermenté est refroidi à une température comprise entre 15 °C et 20 °C, selon la souche et le procédé utilisé. Ce refroidissement permet de stopper l'activité métabolique des cellules afin de les préserver dans l'état physiologique obtenu à la fin de la culture.

La récolte est généralement effectuée à l'aide d'une pompe, qui permet le passage du milieu fermenté dans un échangeur de chaleur, associé à un circuit de refroidissement adapté.

1.2.4.5 Concentration des cellules

L'objectif de cette étape est de séparer les cellules bactériennes du milieu de culture afin d'obtenir une concentration bactérienne la plus élevée possible dans un volume réduit. Les facteurs de concentration se situent entre 10 et 40, permettant ainsi l'obtention d'une concentration cellulaire comprise entre 10^9 et 10^{11} UFC.mL⁻¹ (Béal *et al.*, 2008).

La centrifugation est la méthode de concentration la plus largement utilisée à l'échelle industrielle (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). Les techniques de séparation par membrane (microfiltration et ultrafiltration) peuvent aussi être utilisées (Grandison et Finnigan, 1996). Selon Boyaval (1992) et Béal *et al.* (2008), les taux de concentration obtenus dépendent fortement de la capacité des bactéries à se séparer de leur milieu, de la viscosité du milieu (production d'exopolysaccharides par les cellules ou non) et des conditions opératoires. Le tableau I.1 résume les caractéristiques des différentes méthodes utilisées pour la concentration des bactéries. Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur l'effet des conditions de concentration sur la séparation et sur la qualité des cellules. Le paragraphe I.3.2.6 présente plus de détails sur ce sujet.

Tableau I.1 : principe et caractéristiques des méthodes utilisées pour la concentration des bactéries lactiques

Méthodes	Principe de séparation	Paramètres importants	Avantages / Inconvénients	Références
Centrifugation	Basé sur la différence de densité entre les cellules et le milieu	• Viscosité du milieu • Température • Caractéristiques de l'équipement (mode batch ou continu) • Durée	+ Mise en œuvre facile - Récupération incomplète des cellules (< 90 %) - Coût de fonctionnement élevé	Boyaval <i>et al.</i> (1987) Béal <i>et al.</i> (2008)
Filtration sur membrane	Basé sur la sélectivité de la membrane et dépend de l'action d'un gradient de pression	• Température • Pression • Porosité de la membrane • Débit de circulation du milieu • Surface membranaire	+ Récupération totale des cellules + Meilleure viabilité - Réduction de la densité de flux de perméat pendant le procédé - Colmatage de la membrane doit être minimisé - Investissement initial élevé	Boyaval <i>et al.</i> (1987) Grandison et Finnigan (1996) Carrère et Blaszkow (2001)

+ : avantage ; - : inconvénient

1.2.4.6 Cryoprotection

Afin de réduire les effets nocifs de la congélation et du stockage sur les cellules, cette étape vise la protection des concentrés bactériens grâce à l'ajout de substances dites « cryoprotectrices » (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). Ces substances, qui doivent être peu volatiles, solubles dans l'eau et n'avoir aucun caractère toxique, ont des origines diverses : polyols

(glycérol, sorbitol), sucres (lactose, saccharose), protéines laitières (lait écrémé, caséines), acides aminés (glutamate), antioxydants (ascorbate) ou macromolécules (maltodextrines) (Béal *et al.*, 2008). Les cryoprotecteurs sont groupés en deux classes :

- Cryoprotecteurs intracellulaires : ce sont des substances de faible poids moléculaire (< 100 Da) qui pénètrent à l'intérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration de l'ordre de la mole/L et agissent principalement lors d'une congélation lente. Le plus important représentant de cette catégorie est le glycérol ;
- Cryoprotecteurs extracellulaires : ce sont des substances de haut poids moléculaire (>10000 Da) qui se concentrent à l'extérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration plus faible, de l'ordre de la millimole/L, et sont indiqués lors des congélations rapides. Parmi les molécules les plus utilisées de cette catégorie se trouvent le lactose, le saccharose, le tréhalose, la maltodextrine, le dextrane et l'amidon.

Selon leur origine, ces substances protègent des cellules en permettant de :

- réduire l'activité de l'eau cellulaire ;
- minimiser l'effet négatif d'un gradient osmotique ;
- minimiser la formation de glace intracellulaire ;
- minimiser la croissance des cristaux de glace ;
- protéger les lipides cellulaires contre les processus oxydatifs ;
- stabiliser la conformation native des protéines membranaires.

Pour obtenir des cellules plus résistantes après l'addition d'un cryoprotecteur, cette étape doit être effectuée entre 10 et 15 °C, car cette zone de températures correspond à un bon compromis entre le blocage métabolique des cellules et la fluidité du mélange protecteur (Lejard *et al.*, 1994).

1.2.4.7 Congélation ou lyophilisation

Cette étape a pour objectif de stabiliser les concentrés bactériens pour pouvoir les conserver sur le long terme.

La congélation est, actuellement, la technique de conservation des bactéries lactiques la plus utilisée dans le domaine agroalimentaire. Elle peut être réalisée en blocs ou en particules de 2 à 5 mm. Une bonne maîtrise de cette opération est nécessaire pour éviter ou minimiser les pertes de viabilité liées à l'abaissement de la température et à la formation de glace au cours de la congélation.

Les concentrés bactériens peuvent aussi être conservés par lyophilisation. Au cours de la lyophilisation, les cellules sont soumises à des contraintes plus importantes (Maruejols et Caigniet, 1983) et, de manière générale, les cellules sont moins résistantes à la lyophilisation qu'à la congélation. Les ferments stabilisés par lyophilisation doivent être réhydratés avant d'être

inoculés dans les fermenteurs. Cette méthode est particulièrement intéressante dans les situations où le transport et le stockage à des températures négatives sont difficiles (Frank et Hassan, 1998).

Les avantages et les inconvénients de ces deux méthodes de stabilisation ont été décrits au paragraphe I.2.3. Comme la congélation a été choisie pour effectuer la stabilisation des cellules dans ce travail, les paragraphes qui suivent sont dédiés à cette méthode, sans entrer plus dans les détails sur la lyophilisation.

I.2.4.8 Conditionnement et mélange

Après congélation, les concentrés bactériens congelés sont conditionnés dans des emballages métalliques pour la congélation en blocs ou dans des boîtes en carton paraffiné pour la congélation en particules. Avant le conditionnement final, et en accord avec l'application envisagée, les souches peuvent être mélangées dans des proportions bien définies au moyen de mélangeurs mécaniques. En plus de garantir une bonne stérilité au moment du mélange, les mélangeurs doivent assurer une précision de l'ordre de 1 % (Lejard *et al.*, 1994). Le mélange doit être effectué à une température proche de -60 °C.

I.2.4.9 Stockage, distribution et utilisation

Pour garantir la bonne préservation des ferments lactiques, une attention spéciale doit être portée au maintien de la chaîne du froid (Béal *et al.*, 2008 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). Les températures de distribution et de stockage, chez le producteur, le transporteur et l'utilisateur, doivent être inférieures à -55 °C. En effet, la conservation des ferments lactiques à des températures comprises entre -20 °C et -40 °C n'empêche pas complètement le déroulement de certaines réactions (chimiques, physiques et enzymatiques), surtout dues à une faible mais réelle mobilité moléculaire de la matrice (Fonseca *et al.*, 2001 ; Smith, 2001). Lors de la conservation, une diminution du taux de survie et/ou de l'activité métabolique des cellules est généralement observée. Cependant, pour une température inférieure ou égale à -55 °C, la stabilité des ferments lactiques peut atteindre plusieurs mois (Béal *et al.*, 2008).

Au moment de l'utilisation des ferments concentrés et congelés, un contrôle de l'asepsie pendant l'inoculation doit être réalisé pour garantir le bon développement de la souche et l'obtention du produit avec les propriétés désirées.

Finalement, le procédé de production des ferments lactiques est relativement simple, comparé aux procédés de production de biomolécules, notamment dans le domaine pharmaceutique où les étapes de récupération du produit d'intérêt sont beaucoup plus élaborées. Par contre, comme pour tout procédé lié à un matériel biologique, chaque étape doit être maîtrisée au maximum, en vue de limiter la dégradation de la qualité finale du produit.

1.3 Qualité technologique des ferments lactiques concentrés

La qualité d'un ferment lactique concentré et congelé est directement liée à son application. D'après le paragraphe I.1.3, les critères déterminant la qualité d'un ferment sont à la fois d'ordre technologique (concentration en cellules viables, production de métabolites, résistance aux phages) ou physiologique (résistance aux stress, vitesse de reprise de l'activité métabolique).

Dans ce paragraphe, les principales méthodes permettant de caractériser la qualité technologique des ferments lactiques sont décrites. Dans un deuxième temps, les facteurs qui peuvent affecter cette qualité sont analysés.

1.3.1 Méthodes d'évaluation de la qualité technologique des ferments lactiques concentrés

Les propriétés technologiques des ferments lactiques et le maintien de ces propriétés sont très importants notamment pour assurer la bonne reproductibilité du procédé et la qualité du produit. Pour cela, les producteurs et les utilisateurs de ferments lactiques ont à leur disposition différentes méthodes permettant de réaliser le contrôle et le suivi de la qualité des ferments.

1.3.1.1 Viabilité

Pour toutes les applications de ferments lactiques, et en particulier pour les ferments probiotiques, l'obtention d'une concentration élevée en cellules viables est primordiale. La détermination de cette concentration cellulaire est donc systématique. Plusieurs méthodes sont disponibles pour déterminer la viabilité des ferments lactiques : dénombrement sur milieux gélosés, microscopie directe, microscopie d'épifluorescence, cytométrie en flux couplée à l'épifluorescence, ATP-métrie. Parmi ces méthodes, le dénombrement sur milieux gélosés est la méthode de référence. Cependant, la cytométrie en flux couplée à l'épifluorescence est une méthode rapide et très prometteuse pour la mesure de la viabilité (Rault *et al.*, 2007). Le tableau I.2 résume ces méthodes, en précisant leurs avantages et inconvénients.

1.3.1.2 Activité acidifiante

L'activité acidifiante des bactéries lactiques représente leur principale activité métabolique. Elle s'accompagne d'autres activités qui peuvent présenter un intérêt selon le type d'application du ferment, comme les activités aromatisante, texturante, protéolytique et gazogène (Béal *et al.*, 2008). Liée au métabolisme central de ces bactéries, l'activité acidifiante caractérise aussi leur état physiologique. Plusieurs méthodes sont disponibles pour la mesurer.

Tableau I.2 : différentes méthodes de mesure de la viabilité des ferments lactiques (adapté de Wang, 2005)

Méthodes	Principes	Avantages	Inconvénients	Références
Dénombrement sur milieux gélosés	- Milieu gélosé sélectif - Température optimale - Atmosphère appropriée	- Mesure effective du nombre de cellules (ou colonies) cultivables	- Détermination du nombre d'UFC plutôt que du nombre de cellules - Important délai pour l'obtention des résultats (24 à 72h)	Fernandez Murga <i>et al.</i> (1998) Breeuwer et Abee (2000)
Microscopie directe	- Coloration des cellules - Analyse microscopique	- Permet une analyse morphologique - Rapide	- Lourdeur de mise en œuvre - Pas de distinction entre cellules viables et non viables	Beveridge et Davies (1983) Malone <i>et al.</i> (2002)
Microscopie d'épifluorescence	- Marquage des cellules par un fluorochrome - Observation microscopique	- Analyse morphologique - Distinction des cellules vivantes et mortes	- Lourdeur de mise en œuvre - Coût élevé des fluorochromes	Bunthof <i>et al.</i> (2000)
Cytométrie en flux couplée à l'épifluorescence	- Marquage des cellules par un fluorochrome - Passage des bactéries dans une cellule de mesure - Détection des particules fluorescentes	- Comptage des cellules individuelles - Distinction des cellules vivantes et mortes - Rapidité de mise en œuvre (10 à 30 min) - Analyse d'un très grand nombre de cellules	- Investissement coûteux - Coût élevé des fluorochromes - Technicité élevée	Breeuwer et Abee (2000) Bunthof et Abee (2002) Ananta <i>et al.</i> (2004) Rault <i>et al.</i> (2007)
ATP-métrie	- Extraction de l'ATP intracellulaire - Réaction enzymatique et mesure de la lumière émise, corrélée à la concentration en cellules viables	- Sensibilité de la méthode - Rapidité de mise en œuvre	- Nécessité d'une standardisation rigoureuse - Corrélation difficile avec le nombre de microorganismes - Coût élevé des réactifs	Jakubczak et Leclerc (1980) Béal <i>et al.</i> (2008)

Acidité titrable et pH-métrie

L'acidité titrable est une méthode traditionnelle qui permet de déterminer l'acidité du produit (en degrés Dornic) grâce à un titrage de sa concentration en acide lactique. Cette technique ne peut cependant pas être utilisée en ligne et souffre d'une grande marge d'erreur, liée à l'appréciation par l'opérateur de la zone de virage de l'indicateur coloré.

La mesure du pH d'une culture est une méthode plus rapide et plus simple pour mesurer son acidité. Cette technique exige une attention particulière par rapport au nettoyage, à la régénération et à l'étalonnage des électrodes de pH.

Ces deux méthodes sont considérées comme statiques, car elles ne prennent pas en compte la dynamique de la culture.

Conductivité électrique

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques pendant la fermentation est responsable d'une réduction du pH du milieu de culture et d'une augmentation de sa conductivité électrique, due à l'accumulation des ions lactate (Latrille *et al.*, 1992). Selon ces auteurs, la mesure de la conductivité électrique du milieu permet, indirectement, d'estimer les concentrations cellulaires, en substrat et en produits. Carvalho *et al.* (2003b) ont ainsi montré que le suivi de la conductivité électrique au cours de la fermentation est une méthode rapide et reproductible, qui permet de vérifier l'effet des conditions de production sur la qualité finale du ferment.

Métabolisme des sucres

L'analyse de l'acidification d'un milieu due à la fermentation de certains sucres, par exemple du glucose ou du lactose, permet d'estimer rapidement l'activité d'un ferment. Les résultats sont exprimés soit, par la vitesse maximale d'acidification (Lievense *et al.*, 1990) soit, par la variation du pH après une période de temps donnée (Gatto *et al.*, 1993). Ces méthodes ne sont cependant pas utilisées dans l'industrie, car elles n'ont pas été corrélées à la viabilité bactérienne.

Cinétiques d'acidification CINAC

Corrieu *et al.* (1988) ont développé un système pour la caractérisation de l'activité acidifiante des bactéries lactiques (système CINAC). Basé sur le suivi en ligne et en temps réel du pH d'un milieuensemencé, ce système permet l'acquisition automatique des données et l'obtention de descripteurs originaux dont les valeurs caractérisent les souches utilisées et leurs conditions de mise en œuvre (Picque *et al.*, 1992 ; Spinnler et Corrieu, 1989).

Un exemple de cinétique d'acidification d'un ferment lactique ensemencé dans du lait, montrant l'évolution du pH et de sa vitesse d'évolution (dpH/dt), est présenté à la figure I.2. A partir de ces courbes, cinq descripteurs peuvent être déterminés : la vitesse maximale d'acidification (V_m , en $u.pH.min^{-1}$), le temps (t_m , en min) et le pH (pH_m , en u.pH) correspondant à V_m , ainsi que les intervalles de temps (dt_{50} , en min) et de pH (dpH_{50} , en u.pH) pour lesquels la vitesse est supérieure à $V_m/2$. D'autres descripteurs, correspondant aux temps ($tpHi$, en min) nécessaires pour atteindre un pHi donné, sont également utilisés (Chammas *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2005a).

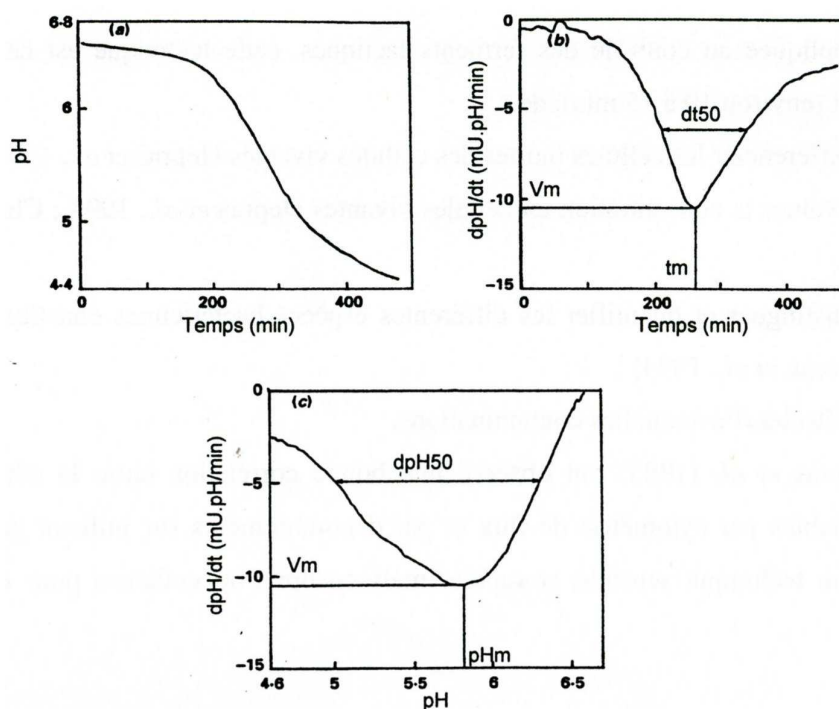


Figure I.2 : évolution du pH et de la vitesse d'acidification (dpH/dt) lors de l'incubation de *Lactobacillus bulgaricus* CNRZ 398 dans du lait à 40 °C (d'après Spinnler et Corrieu, 1989)

- (a) évolution du pH en fonction du temps
- (b) évolution de la vitesse d'acidification (dpH/dt) en fonction du temps
- (c) évolution de la vitesse d'acidification (dpH/dt) en fonction du pH

Le descripteur pH_m est relativement constant pour une souche donnée, quelle que soit la concentration cellulaire initiale (Picque *et al.*, 1992). En revanche, les descripteurs V_m , t_m et $tpHi$ dépendent de la concentration cellulaire, de l'état physiologique des bactéries et de conditions telles que la composition du milieu de culture et la température (Béal et Corrieu, 1994). Ces trois descripteurs permettent donc de caractériser les propriétés acidifiantes des ferments. La figure I.3 montre ainsi la relation entre la concentration bactérienne initiale et le temps pour atteindre pH 5,5 ($tpH_{5,5}$) lors d'une acidification du lait par *Lb. acidophilus* RD758 (Wang *et al.*, 2005a). Lorsque la concentration bactérienne augmente, l'acidification du lait à pH 5,5 est obtenue plus rapidement. Les descripteurs de

temps t_m et tp_{Hi} sont plus sensibles aux conditions de production et donc, plus souvent retenus (Picque *et al.*, 1992 ; Spinnler et Corrieu, 1989 ; Wang *et al.*, 2005a).

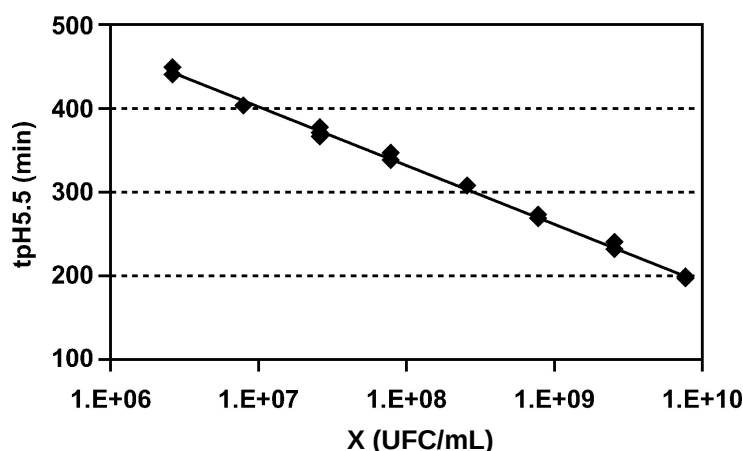


Figure I.3 : relation linéaire entre l'activité acidifiante ($tp_{H5,5}$, en min) et la concentration bactérienne (X , en $UFC.mL^{-1}$) pour *Lactobacillus acidophilus* RD758 (d'après Wang *et al.*, 2005a)

Le système CINAC permet de traiter simultanément un grand nombre d'échantillons avec une grande diversité d'objectifs. Il est largement répandu chez les industriels producteurs de ferments, ainsi que chez les utilisateurs. Cette méthode a été déjà utilisée pour atteindre différents objectifs :

- classer les bactéries lactiques en fonction de leur activité acidifiante (Chammas *et al.*, 2006 ; Picque *et al.*, 1992) ;
- analyser l'effet des conditions de culture sur l'activité acidifiante des bactéries lactiques (Wang *et al.*, 2005a) ;
- évaluer l'effet de différentes étapes du procédé de production des ferments sur la dégradation de leur activité acidifiante (Fonseca *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2005b) ;
- étudier la résistance des bactéries lactiques à la congélation ou à la lyophilisation (Béal *et al.*, 2001a ; Fonseca *et al.*, 2003 ; Monnet *et al.*, 2003).

Perte d'activité acidifiante

L'effet négatif des étapes de stabilisation, comme la congélation, la lyophilisation et le stockage des bactéries lactiques sur leur viabilité et leur activité acidifiante, est bien connu (Fonseca *et al.*, 2003 ; Rault *et al.*, 2007).

Une méthode pour quantifier la perte d'activité acidifiante des bactéries lactiques au cours de la congélation et du stockage a été proposée par Fonseca *et al.* (2000). Selon cette méthode, une relation linéaire entre l'activité acidifiante (tp_{Hi} , en min) et la durée de stockage (t_s , en jours) peut être établie (figure I.4).

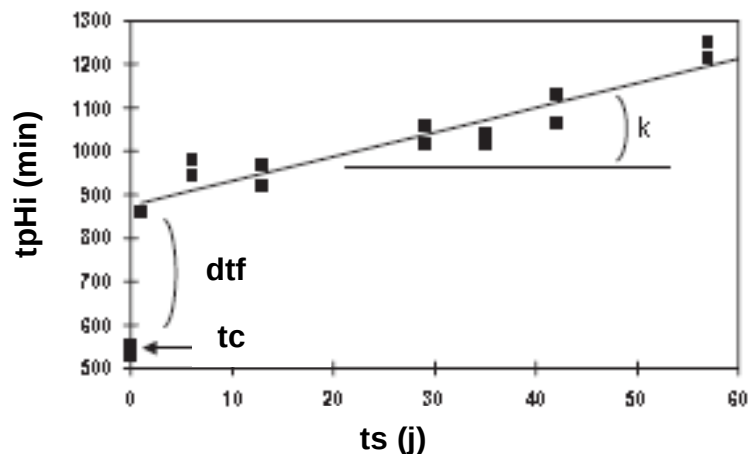


Figure I.4 : schéma de la méthode de quantification de la perte d'activité acidifiante des ferments lactiques pendant la congélation et au cours du stockage à l'état congelé (d'après Fonseca *et al.*, 2003)

tpHi : temps nécessaire pour atteindre le pH (en min)

ts : temps de stockage (en jour)

tc : tpHi avant congélation (en min)

dtf : perte d'activité acidifiante au cours de la congélation (en min)

k : vitesse de perte d'activité acidifiante au cours du stockage (en min/j)

Elle permet de quantifier, indépendamment, la résistance des cellules à la congélation (paramètre dtf) et au stockage (paramètre k). L'analyse de ces deux paramètres permet de quantifier la sensibilité des cellules, respectivement, à la congélation et au stockage. Plus dtf est grand, plus importante est la perte d'activité acidifiante au cours de la congélation. De la même manière, plus k est élevé, plus faible est la résistance des cellules au stockage.

Cette méthode a été utilisée et validée avec différentes souches, différents cryoprotecteurs et différentes conditions de stabilisation et de stockage, essentiellement par les équipes de l'UMR GMPA qui dispose de la technologie (tableau I.3).

I.3.1.3 Autres propriétés technologiques et activités métaboliques

D'autres propriétés et d'autres activités métaboliques que l'acidification peuvent avoir un intérêt particulier selon l'application recherchée pour les bactéries lactiques. Parmi ces propriétés, la production d'arômes, d'exopolysaccharides, d'enzymes protéolytiques ou de CO₂ constituent les exemples les plus importants (Béal *et al.*, 2008). Leur détermination peut, dans certains cas, permettre de caractériser les ferments lactiques. Le tableau I.4 présente un résumé de ces propriétés technologiques, avec les principales méthodes permettant leur évaluation. Nous limiterons notre propos à ce tableau.

Tableau I.3 : principales études utilisant la méthode de quantification de la perte d'activité acidifiante de ferments concentrés congelés ou lyophilisés (d'après Wang, 2005).

Bactéries	Cryoprotecteurs	Conditions de stabilisation	Mesures réalisées	Références
<i>St. thermophilus</i>	Glycérol	Congélation et stockage à -20 °C	Effet du pH de fermentation et de l'addition d'acide oléique sur la cryotolérance des cellules	Béal <i>et al.</i> (2001a)
<i>Lb. acidophilus</i>	Surnageant de culture, additionné de maltose, maltodextrine et d'antioxydants	Lyophilisation et stockage à 4 °C, 25 °C ou 37 °C	Effet de la présence d'antioxydant et de l'activité de l'eau sur la résistance des cellules à la lyophilisation et au stockage à différentes températures	Béal <i>et al.</i> (2001b)
<i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i>	Glycérol	Congélation à -70 °C et -196 °C Stockage à -20 °C et -70 °C	Effet de différentes conditions opératoires (13 facteurs) sur la cryotolérance des cellules	Fonseca <i>et al.</i> (2001)
<i>Lb. bulgaricus</i>	Ascorbate de sodium, bétaine, sucrose, maltodextrine, glycérol, lactose, maltose, glutamate de sodium	Congélation et stockage à -20 °C	Effet de différents cryoprotecteurs sur la cryotolérance des cellules	Fonseca <i>et al.</i> (2003)
<i>Lb. bulgaricus</i>	Aucun	Congélation à -16 °C	Sélection de souches cryotolérantes après 30 cycles de congélation-décongélation	Monnet <i>et al.</i> (2003)
<i>Lb. acidophilus</i>	Aucun	Congélation et stockage à -20 °C	Effet des conditions de fermentation (pH et température) sur la cryotolérance des cellules	Wang <i>et al.</i> (2005a)
<i>Lb. acidophilus</i>	Aucun	Congélation et stockage à -20 °C	Effet de paliers de refroidissement sur la cryotolérance et l'état physiologique des cellules	Wang <i>et al.</i> (2005b)
<i>Lb. bulgaricus</i>	Glycérol	Trois protocoles de congélation Stockage à -20 °C et -80 °C	Effet des cinétiques de congélation et de la température de stockage sur la cryotolérance des cellules	Fonseca <i>et al.</i> (2006)

Tableau I.4 : autres propriétés technologiques et activités métaboliques intéressantes pour l'industrie et principales méthodes permettant de les caractériser (d'après Wang, 2005)

Propriétés technologiques	Produits du métabolisme témoins de l'activité	Méthodes d'évaluation	Références
Activité aromatisante	Acide lactique, acétaldéhyde (yaourt), diacétyl (beurre et crème), acides gras libres (fromages affinés), acide acétique, éthanol, composés soufrés	- Dosages des acides organiques par CLHP - Dosages enzymatiques (acétaldéhyde et acides L ou D lactique) - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) - Olfactométrie couplée à la CPG - Evaluation sensorielle	Degorge-Dumas <i>et al.</i> (1986) Ott <i>et al.</i> (1997) Smit <i>et al.</i> (2002) Helinck <i>et al.</i> (2004) Guerzoni <i>et al.</i> (2007) Chammas <i>et al.</i> (2006)
Activité texturante	Molécules de caséine agrégées par l'action de l'acide lactique Exopolysaccharides, glucanes, fructosanes, polysaccharides complexes constituant la capsule cellulaire	- Etude des propriétés rhéologiques de la culture en milieu liquide à l'aide de pénétromètres, viscosimètres, entonnoir de Posthumus - Quantification de la production d'exopolysaccharides - Evaluation sensorielle des propriétés texturantes	Béal <i>et al.</i> (1999) Petry <i>et al.</i> (2003) Chammas <i>et al.</i> (2006) Schiraldi <i>et al.</i> (2006)
Activité protéolytique	Enzymes protéolytiques (protéases, peptidases pariétales, membranaires et cytoplasmiques)	- Dosage par colorimétrie des groupements aminés libérés - Dosage d'enzymes spécifiques (aminopeptidases) par colorimétrie et galeries API - Analyse électrophorétique des protéines du milieu - Identification et dosage des peptides par CLHP	De Giori <i>et al.</i> (1985) Thiboutot <i>et al.</i> (1995)
Activité gazogène	CO ₂ produit par les ferments lactiques hétérofermentaires	- Titration - Dosage enzymatique ou colorimétrique - Méthodes d'extraction couplées à la CPG - Détermination du volume de CO₂ produit	Spinnler <i>et al.</i> (1987) Spinnler <i>et al.</i> (1989) Ostlie <i>et al.</i> (2005)
Activité inhibitrice	Acide lactique, autres acides organiques, diacétyl, éthanol, peroxyde d'hydrogène, bactériocines	- Mesure du diamètre des zones d'inhibition obtenues par diffusion en milieu gélosé ensemencé avec un microorganisme test sensible - Méthodes des dilutions successives	Taniguchi <i>et al.</i> (1994) Pellegrini <i>et al.</i> (2001) Rodriguez <i>et al.</i> (2003) Olivares <i>et al.</i> (2006b)

continue...

Tableau I.4 : ...continue

Propriétés technologiques	Produits du métabolisme témoins de l'activité	Méthodes d'évaluation	Références
Activité β -galactosidase	σ -nitrophénol	- Dosages enzymatiques - Dosages colorimétriques	Gilliland et Lara (1988) Brashears et Gilliland (1995)
Potentiel d'oxydo-réduction	Substances réductrices, enzymes d'oxydoréduction	- Observation visuelle ou mesure spectrophotométrique du virage d'un indicateur d'oxydo-réduction (résazurine) - Mesure potentiométrique de l'hydrogène dégagé ou de l'oxygène absorbé - Dosage du NADH ₂ (coenzyme respiratoire réduit) par spectrophotométrie de fluorescence - Mesure de l'inhibition de l'autooxydation de l'ascorbate	Aubert <i>et al.</i> (2002) Cachon <i>et al.</i> (2002) Talwalkar et Kailasapathy (2003) Saide et Gilliland (2005)
Résistance aux basses températures	Caractérisation de la sensibilité des ferments	- Exposition des cellules à des basses températures et analyse de leur viabilité avant et après choc thermique froid	Panoff <i>et al.</i> (1995) Wang <i>et al.</i> (2005b)
Résistance aux températures élevées	Caractérisation de la sensibilité des ferments	- Exposition des cellules à des températures élevées et analyse de leur viabilité avant et après choc thermique chaud	Heller (2001) Parente et Cogan (2004) Saarela <i>et al.</i> (2004)
Résistance aux bactériophages	Caractérisation de la sensibilité des ferments	- Mise en culture du ferment avec différents phages - Comparaison de l'acidification en présence et en absence de phages (technique Nizo)	Stadhouders (1986)
Propriétés prophylactiques et thérapeutiques	Ferments probiotiques	Examens <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (humain et animaux) de : - Capacité d'adhésion et colonisation de l'intestin - Effet sur les fonctions intestinales (fréquence et caractéristiques des fèces) - Réduction de la flatulence	Sanders et Klaenhammer (2001) Ouwehand <i>et al.</i> (2002) De Vries <i>et al.</i> (2006) Olivares <i>et al.</i> (2006a) Cano <i>et al.</i> (2007)
Résistance à l'acidité	Ferments probiotiques	Analyse de la survie des cellules après un choc acide	Guillouard <i>et al.</i> (2004) Saarela <i>et al.</i> (2005) Mättö <i>et al.</i> (2006)
Résistance à la bile	Inhibition de la croissance bactérienne	Dénombrement sur milieux gélosés contenant des concentrations variables de sels biliaires	Klaenhammer et Kleeman (1981) Johnson <i>et al.</i> (1984) Brashears et Gilliland (1995)

1.3.2 Facteurs influençant la qualité des bactéries lactiques concentrées congelées

Comme cela a été brièvement abordé au paragraphe 1.2.4, les différentes étapes du procédé de production des ferments lactiques ont une influence directe sur la qualité finale des concentrés bactériens. L'objectif de ce chapitre est d'analyser les connaissances sur l'impact de chaque étape de ce procédé, ainsi que du microorganisme en lui-même, sur les propriétés technologiques des ferments lactiques. Une bonne connaissance de ces effets permettrait d'établir les meilleures conditions de production pour obtenir des ferments lactiques concentrés et congelés avec une bonne activité technologique.

1.3.2.1 Type de microorganisme

Le premier facteur qui doit être pris en compte est le genre et l'espèce bactérienne. La grande diversité de taille, de morphologie et de complexité des structures cellulaires des bactéries lactiques est à l'origine de leur comportement variable au regard de leur résistance au procédé et du maintien de leur qualité au cours du stockage.

Fonseca *et al.* (2001) ont montré que les cellules de *S. thermophilus* résistent mieux à l'étape de congélation que les cellules de *Lb. bulgaricus*. Le même comportement a été observé par Bozoğlu *et al.* (1987) après lyophilisation. To et Etzel (1997) ont observé que les cellules de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* présentent une meilleure activité acidifiante après congélation et lyophilisation que les cellules de *S. thermophilus* et *Lb. pseudopantarum*. Selon Simatos *et al.* (1994), une telle différence de comportement aux étapes de conservation est liée à la taille des cellules. Des microorganismes de grande taille ou de structure complexe sont caractérisés par une résistance plus faible que les cellules de petite taille ou de structure simple. Selon Fonseca *et al.* (2000), les microorganismes qui présentent un rapport surface sur volume cellulaire élevé démontrent généralement une bonne survie à la congélation.

Ces différences de résistance, observées entre les genres et espèces, existent aussi entre différentes souches de la même espèce. Gilliland et Lara (1988) ont montré que trois souches de *Lactobacillus acidophilus*, congelées et stockées à -196 °C pendant 28 jours, présentent une perte de viabilité équivalente mais que la stabilité de l'activité enzymatique β -galactosidase de ces concentrés bactériens varie selon les souches. Plus récemment, Rault *et al.* (2007) observent des différences de résistance à la congélation et au stockage pour quatre souches de l'espèce *Lb. delbrueckii*.

I.3.2.2 Milieu de culture

Le choix du milieu de culture pour la croissance et la résistance d'une bactérie est important. Comme cela a été décrit au paragraphe I.2.4.1, ce choix est fait en tenant en compte des besoins particuliers du microorganisme (source de carbone, d'azote, besoins de vitamines...) et des aspects technologiques du procédé (type de traitement thermique, filtration éventuelle) (Béal *et al.*, 2008).

Certains travaux ont montré que la supplémentation du milieu de culture avec certains composés peut être un bon outil pour améliorer la résistance des bactéries lactiques aux contraintes liées à leur procédé de production. Une augmentation de la résistance à la congélation de *S. thermophilus* CFS2 et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 a été observée après ajout de 1 g.L⁻¹ de Tween 80 au milieu de culture (Fonseca *et al.*, 2001). Cet effet positif du Tween 80, et plus largement des acides gras insaturés ou de leurs précurseurs, sur la résistance des cellules aux étapes de concentration, congélation et séchage, a été décrit par plusieurs auteurs (Béal *et al.*, 2001a ; Carvalho *et al.*, 2003a ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Smittle *et al.*, 1974). La présence de ces composés dans le milieu de culture est responsable d'une concentration plus élevée d'acides gras insaturés dans la membrane cellulaire. Avec un ratio entre acides gras insaturés et saturés plus élevé, la température de transition de phase des lipides de la membrane est moins élevée, ce qui conduit à une perméabilité plus grande de la membrane (Russell, 2002 ; Russell *et al.*, 1995). Cette perméabilité plus importante serait à l'origine de la meilleure résistance des cellules. Plus de détails sur la relation entre la membrane et la résistance des cellules aux étapes de conservation seront présentés au paragraphe I.4.3.1.

I.3.2.3 Conditions de culture

Une fois le milieu de culture défini, les conditions optimales pour le développement de la bactérie (température, pH, neutralisant, instant d'arrêt,...) doivent être déterminées. Ces facteurs, en plus de conditionner la croissance et l'activité des cellules, peuvent avoir un effet sur leur résistance aux étapes de conservation ultérieures.

Température

La fermentation est généralement réalisée à une température proche de la température optimale de croissance des cellules (Béal *et al.*, 1989). Selon Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998), une réduction ou une augmentation de la température de la culture par rapport à la température optimale de la bactérie, surtout pour les bactéries thermophiles, affecte leur stabilité pendant la congélation, la lyophilisation et le stockage. Cet effet a été démontré par Wang *et al.* (2005a) pour la souche *Lactobacillus acidophilus* RD758. Avec des fermentations conduites à trois températures différentes (30, 37 et 42 °C), ces auteurs

observent que les cellules cultivées à 30 °C (température inférieure à leur température optimale de 37 °C) ont mieux résisté à la congélation et ont maintenu une activité acidifiante élevée après 365 jours de stockage à -20 °C. Fernán dez Murga *et al.* (2000) ont également montré que les cellules de *Lb. acidophilus* CRL640, cultivées à 25 °C, sont plus résistantes à la congélation que les cellules cultivées à 37 °C. Leur taux de survie est de 67 % au lieu de 16 %.

Contrôle et conditions de maintien du pH de la culture

Trois points importants doivent être analysés par rapport au pH de la culture : sa régulation éventuelle, le niveau de pH et le type d'agent neutralisant utilisé. Pendant la production des ferments lactiques, le pH de la culture est généralement régulé à la valeur optimale pour la croissance des cellules (Lejard *et al.*, 1994). En effet, la conduite de la fermentation à pH régulé permet l'obtention de cultures plus concentrées (10^{10} cellules.mL⁻¹) qu'à pH libre (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). En plus d'une augmentation du niveau de biomasse, les cellules obtenues à pH régulé sont aussi plus résistantes que celles produites à pH libre (Gaudreau *et al.*, 2006). Gilliland (1976) a observé que des cellules de *Streptococcus* produites en conditions de pH régulé ont mieux survécu à la congélation à -17 °C que les cellules cultivées à pH libre. Le même comportement a été décrit, par Bâati *et al.* (2000), pour des cellules de *Lb. acidophilus* congelées et stockées -80 °C. Enfin, Linders *et al.* (1997a) ont observé que les cellules de *Lactobacillus plantarum* P743 cultivées à pH régulé maintiennent une activité résiduelle plus importante après séchage que les cellules produites sans contrôle de pH (37 % au lieu de 19 %).

Certains auteurs observent que la résistance des cellules aux étapes de conservation dépend du pH auquel la culture est conduite. Les cellules de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, cultivées à pH 5, sont plus résistantes à la lyophilisation que les cellules cultivées à leur pH optimal (pH 6) (Palmfeldt et Hahn-Hägerdal, 2000). Un résultat similaire a été obtenu par Béal *et al.* (2001a) qui rapportent l'effet positif d'une fermentation conduite à pH acide (pH 5,5) sur la résistance à la congélation de *Streptococcus thermophilus* CFS2. Wang *et al.* (2005a) ont montré que les cellules de *Lb. acidophilus* RD758, cultivées à pH 5, sont plus résistantes à la congélation et au stockage sous forme congelée que les cellules cultivées à pH 6 (pH optimal) ou à pH 4,5. Ces résultats indiquent qu'une fermentation conduite à un pH trop acide, loin du pH optimal des cellules, a un effet négatif sur leur résistance. Cela s'explique par le fait qu'une diminution du pH extracellulaire empêche les cellules de maintenir leur pH intracellulaire à une valeur adéquate pour les réactions métaboliques (Hutkins et Nannen, 1993).

Le type de neutralisant utilisé pour contrôler le pH de la culture affecte aussi la résistance des bactéries aux étapes de conservation. L'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) est

souvent cité dans la littérature comme étant le meilleur neutralisant pour la production des ferments lactiques (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998 ; Vasiljevic *et al.*, 2005 ; Zannini *et al.*, 2005). Une augmentation de la concentration en biomasse de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, ainsi que de la production d'exopolysaccharides, a été obtenue en utilisant NH₄OH pour le contrôle du pH au lieu de NaOH ou de KOH (Vasiljevic *et al.*, 2005). En revanche, Fonseca *et al.* (2001) observent que la cryotolérance des cellules de *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* est plus importante quand le contrôle du pH de la culture est réalisé avec de la soude (NaOH) au lieu de l'ammoniaque (NH₄OH).

1.3.2.4 Age de la culture

L'instant auquel la culture est arrêtée, qui caractérise l'âge de la culture, influence très fortement la capacité des cellules à survivre et à retrouver une activité métabolique élevée. Il peut être critique pour certaines souches (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998). D'une manière générale, les cellules récoltées en début de phase stationnaire sont plus résistantes à la congélation que celles récoltées en cours de phase exponentielle (Morgan *et al.*, 2006 ; Morice *et al.*, 1992 ; Péter et Reichart, 2001). Selon Morgan *et al.* (2006), la limitation en substrat, lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire, induit certains changements physiologiques, responsables de la meilleure résistance des cellules aux étapes de stabilisation. Pour certains auteurs (Lorca et Font de Valdez, 1999 ; Morice *et al.*, 1992), les cellules en phase exponentielle sont moins résistantes que les cellules en phase stationnaire, car elles sont en phase de division, donc plus vulnérables aux conditions de stress. Les résultats de différents auteurs montrent que ce comportement est lié à l'espèce bactérienne ainsi qu'à la souche. Selon Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998), la récolte des lactocoques est recommandée en fin de la phase exponentielle tandis qu'une perte rapide d'activité est observée pour les cellules de *S. thermophilus* récoltées dans un état avancé de la phase stationnaire. Par contre, Brashears et Gilliland (1995) n'observent pas de différence de survie pendant le stockage à -196 °C entre les cellules de trois souches de *Lactobacillus acidophilus* récoltées en phase exponentielle ou en phase stationnaire. Le même comportement a été obtenu par Fonseca *et al.* (2001) avec des cellules de *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus*. En revanche, Wang (2005) a comparé la résistance des cellules de *Lb. acidophilus* RD758 récoltés en début de phase stationnaire et 3 h après l'épuisement de la source de carbone. Les résultats ont montré que les cellules soumises au stress nutritionnel ont mieux résisté à la congélation et au stockage sous forme congelée.

1.3.2.5 Refroidissement des cellules

La première étape de la récolte des cellules a pour objectif de stopper les réactions biologiques (croissance et production d'acide lactique) grâce à une réduction rapide de la

température jusqu'à 10 ou 15 °C. En plus de son rôle lié à l'arrêt de la fermentation, l'étape de refroidissement permet, dans certains cas, d'améliorer la résistance des ferments aux diverses contraintes des étapes de récolte et conservation (Béal *et al.*, 2008).

Les conditions de refroidissement influent sur la capacité des cellules à retrouver leur activité métabolique. Un stockage à 15 °C, pendant 2 h, a un effet négatif sur l'activité acidifiante et la résistance de *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* pendant la congélation et pendant le stockage sous forme congelée (Fonseca *et al.*, 2001). En revanche, Panoff *et al.* (1995) ont étudié l'effet du maintien des cellules de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 à différentes températures (16, 8 et 4 °C) pendant différentes durées (de 1 h à 7 jours). Ils ont observé qu'une meilleure résistance à la congélation à -20 °C est obtenue pour les cellules refroidies à 8 °C et maintenues à cette température pendant 48 h. Un refroidissement plus modéré, avec une réduction de la température de fermentation de 37 °C à 30 °C pendant 60 min, a été suffisant pour améliorer la survie de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB à la congélation et au stockage à -20 °C pendant 10 et 45 jours (De Urraza et De Antoni, 1997). Broadbent et Lin (1999) ont montré qu'un maintien des cellules de *Lactococcus lactis* à 10 °C, pendant 2 h, a un effet positif sur leur survie à la congélation et à la lyophilisation. Ils observent cependant une différence de comportement selon les souches étudiées. Enfin, la résistance des cellules de *Lb. acidophilus* RD758 au stockage sous forme congelée a été améliorée significativement suite à un refroidissement à 26 °C pendant 8 h avant les étapes de concentration et de congélation (Wang *et al.*, 2005b).

1.3.2.6 Concentration

Concernant l'étape de concentration des cellules, deux facteurs sont importants pour la qualité technologique des ferments lactiques et doivent être bien maîtrisés : le type de procédé de concentration utilisé et la concentration en biomasse finale.

Deux types de procédés sont utilisés pour la concentration des cellules : la centrifugation ou la filtration sur membrane (ultra ou microfiltration). Ces deux procédés génèrent l'application de fortes pressions sur les cellules, jusqu'à atteindre plusieurs centaines ou milliers de Pa. Selon Champagne *et al.* (1991), certaines souches ne résistent pas au stress causé par la pression pendant leur concentration par centrifugation. Si les cellules peuvent garder une bonne viabilité et activité juste après l'étape de concentration, elles présentent une forte sensibilité aux étapes ultérieures de stabilisation.

Procédé de centrifugation

Le principe de la séparation par centrifugation consiste à augmenter la force de gravité, grâce à l'application d'une force centrifuge, pour séparer deux phases, soit solide-liquide, soit liquide-liquide (Todaro, 1997). Plus simplement, il s'agit d'une séparation par

sédimentation accélérée par la force centrifuge. Dans le cas des bactéries lactiques, la séparation est plus efficace lorsque la différence de densité entre les cellules et le milieu de culture est élevée (Boyaval *et al.*, 1987). Deux facteurs principaux influent sur la qualité de la séparation : la vitesse de rotation et la durée de centrifugation. La température est également un facteur important qui doit être pris en compte (Béal *et al.*, 2008).

Les effets des contraintes de pression sur la résistance des cellules lors de l'étape de concentration et aux étapes de conservation ont été peu étudiés. Selon Malone *et al.* (2002), ces contraintes génèrent des dommages physiques au niveau des membranes, une lyse cellulaire et, en conséquence, une inactivation des cellules. Seulement deux publications ont été trouvées dans la littérature sur l'étape de concentration. Champagne et Gardner (2002) ont démontré que le mode de conduite de la centrifugation (continu ou discontinu) n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules de *Leuconostoc mesenteroides* à la fin de la concentration. Bozoğlu *et al.* (1987) ont obtenu des résultats similaires puisque, après concentration à 7000 rpm, pendant 30 min à 0 °C, les bactéries *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* conservent leur viabilité. En revanche, rien n'a été trouvé dans la littérature à propos de l'effet des paramètres de centrifugation (vitesse de rotation, durée, température) sur la viabilité et l'activité des cellules, après concentration et au cours des étapes de conservation.

Procédé de filtration à membrane

Les procédés à membranes, comme l'ultrafiltration et la microfiltration, sont une alternative à la centrifugation. Le principe de cette opération repose sur l'effet d'une force motrice, appliquée de part et d'autre de la membrane, permettant ainsi la séparation du fluide traité en deux fractions : le rétentat, contenant les particules concentrées, et le perméat, représentant le liquide libre des particules (Athès *et al.*, 2006).

Caractérisés par leur pression transmembranaire et leur vitesse tangentielle, ces procédés exercent deux forces différentes sur les cellules : celle liée à la pression du système et celle provenant du cisaillement du fluide à l'intérieur du module. Ces deux forces induisent un stress différent de celui produit pendant la concentration par centrifugation.

Les procédés de séparation par membrane, en particulier l'ultrafiltration, sont souvent utilisés pour la recirculation des cellules pendant les fermentations en continu (Boyaval *et al.*, 1998). La première application aux bactéries lactiques a été décrite par Amen et Cabau (1982) : l'ultrafiltration est utilisée pour séparer les cellules du milieu fermenté. Ce dernier, qui contient des composés toxiques pour le développement des bactéries est aussi éliminé. Cependant, l'effet des conditions d'ultrafiltration ou de microfiltration (vitesse tangentielle, pression transmembranaire) sur la survie des cellules pendant ce procédé et sur leur résistance pendant les étapes de conservation n'est pas encore renseigné.

Niveau de concentration en biomasse

Plusieurs auteurs ont montré qu'une haute concentration cellulaire permet aux cellules de mieux résister à l'étape de congélation (Berner et Viernstein, 2006 ; Bozoğlu *et al.*, 1987). Kilara *et al.* (1976) ont montré que les bactéries *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus* et *Lc. lactis* sont plus résistantes à la congélation quand une concentration initiale élevée de cellules est utilisée. Mais ce n'est pas le cas chez *Lb. acidophilus*. Ce comportement est expliqué par une plus grande interaction entre les cellules, due à une réduction de la surface de chaque cellule qui est exposée à l'environnement (Bozoğlu *et al.*, 1987). En augmentant la biomasse initiale de 10^9 à 10^{10} UFC.mL⁻¹, Berner et Vernstein (2006) ont obtenu un accroissement significatif de la résistance de *Lactococcus lactis* à la lyophilisation (30 % au lieu de 0,02 %).

Fonseca (communication personnelle) a montré l'effet de différents rapports de concentration cellules/surnageant de fin de culture (R, en g/g) sur la survie et l'activité acidifiante de *Lb. bulgaricus* CFL1 à la congélation et au stockage sous forme congelée. Un rapport compris entre 0,5 à 1 g/g (correspondant à 10^{10} à 10^{12} UFC.mL⁻¹) semble être favorable, tandis que des cellules trop diluées ($R < 0,5$ g/g, inférieur à 10^9 UFC.mL⁻¹) ou trop concentrées ($R > 1$ g/g, supérieur à 10^{12} UFC.mL⁻¹) présentent une forte perte d'activité acidifiante pendant la congélation. La gamme favorable à la résistance s'élargit à de plus faibles concentrations ($R > 0,3$ g/g, correspondant à 10^9 UFC.mL⁻¹) en présence de glycérol à 10 %. Enfin, De Loecker *et al.* (1998) montrent un effet négatif de la congélation d'une suspension avec une trop haute concentration cellulaire ($> 10^{12}$ UFC.mL⁻¹). Selon ces auteurs, la réduction excessive de l'espace extracellulaire et un manque de protecteur (concentration et facilité d'accès) expliqueraient cette sensibilité.

I.3.2.7 Cryoprotection

Les cellules concentrées sont mélangées, avant leur congélation ou leur lyophilisation, à des composés dit « cryoprotecteurs » ou « lyoprotecteurs ». Le type de composé utilisé dépend largement du type de microorganisme (Font de Valdez *et al.*, 1983 ; Péter et Reichart, 2001), mais aussi du procédé de conservation choisi. Si une grande variété de composés est utilisée, les plus appliqués à l'échelle industrielle sont le lactose et le saccharose, le glutamate monosodique, l'ascorbate de sodium et le glycérol (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998).

Fonseca *et al.* (2000) ont étudié l'effet du glycérol sur la cryotolérance de quatre bactéries lactiques : *S. thermophilus* PB18, *S. thermophilus* CFS2, *Lb. lactis* CFL3 et *Lb. bulgaricus* CFL1. Ils observent un effet positif du glycérol sur la résistance à la congélation des souches de *Lactobacillus* mais pas des souches de *Streptococcus*, ce qui était expliqué par la résistance naturelle des souches de *Streptococcus*. L'ajout du glycérol a permis

également d'obtenir une meilleure résistance de ces quatre bactéries lactiques au stockage sous forme congelée. Ces résultats sont intéressants car ils montrent que l'effet d'un cryoprotecteur ne se résume pas à l'étape de congélation et qu'il est nécessaire aussi pour le bon maintien de la qualité des ferments tout au long de leur stockage. L'effet positif du glycérol comme agent cryoprotecteur a été confirmé par ces mêmes auteurs dans des travaux ultérieurs (Béal *et al.*, 2001a ; Fonseca *et al.*, 2001). Fonseca *et al.* (2003) ont, en outre, étudié neuf cryoprotecteurs différents (ascorbate de sodium, bétaine, sucrose, maltodextrine, glycérol, lactose, maltose, glutamate de sodium et tréhalose), seuls ou en mélange, sur la résistance de *Lb. bulgaricus*. Pour l'étape de congélation, la meilleure résistance a été obtenue avec les cryoprotecteurs caractérisés par une faible température de congélation ($T_f < -6,5\text{ °C}$), comme la bétaine, le glutamate de sodium et le glycérol. Par contre, pendant le stockage, seul l'ascorbate de sodium et le glycérol ont permis une meilleure résistance des cellules.

Plus récemment, la survie des cellules de *Lactococcus lactis* à la congélation à -80 °C , après addition de différents cryoprotecteurs, a été étudiée par Berner et Viernstein (2006). Parmi 18 cryoprotecteurs, classés comme composés inorganiques, sucres, polymères et milieux complexes, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le saccharose et les milieux complexes composés de lait écrémé ou de MRS.

1.3.2.8 Influence de la congélation

Du fait des phénomènes thermiques, mécaniques et physico-chimiques intervenant lors de la congélation des concentrés bactériens, cette étape du procédé est considérée comme critique pour la qualité finale des ferments lactiques. Parmi ces phénomènes, l'abaissement de la température, la cristallisation de l'eau et la cryoconcentration des solutés affectent fortement la survie et la reprise d'activité des cellules (Fonseca *et al.*, 2000). Afin de minimiser l'effet nocif induit par ces phénomènes, les paramètres de congélation (vitesse et température de congélation) doivent être optimisés en fonction de la souche et des contraintes auxquelles les cellules sont soumises en amont de cette étape.

Vitesse de congélation

La vitesse de congélation d'une suspension bactérienne est un paramètre important. Elle doit être maîtrisée pour éviter ou minimiser la dégradation cellulaire, liée, d'une part, à la formation de glace intracellulaire et, d'autre part, au phénomène de cryoconcentration. La vitesse optimale de congélation (figure I.5) doit être suffisamment lente pour éviter la formation de glace intracellulaire et, en même temps, suffisamment rapide pour minimiser l'effet négatif de l'environnement sur les cellules (McGann, 1978).

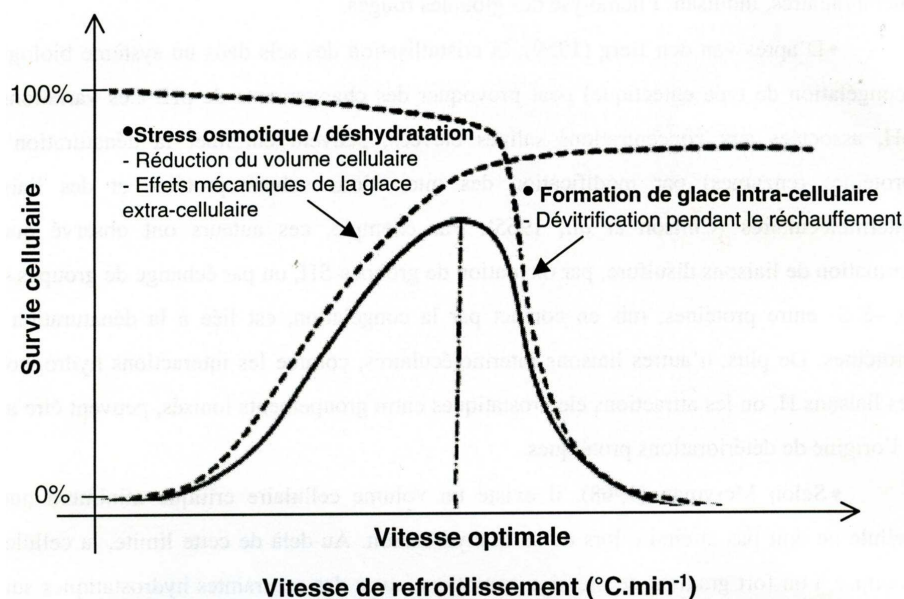


Figure I.5 : effet de la vitesse de refroidissement sur la survie d'une cellule selon la théorie de Mazur (1970) proposant l'existence d'une vitesse optimale de refroidissement, compromis entre au moins deux mécanismes indépendants (stress osmotique/déshydratation et formation de glace intracellulaire) qui varient en sens inverse (d'après Mazur, 1970).

Certains auteurs ont étudié l'effet de la vitesse de congélation sur les propriétés technologiques des bactéries lactiques. Baumann et Reinbold (1966) ont montré qu'une vitesse de congélation rapide ($130\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) permet une meilleure conservation de l'activité acidifiante de 13 souches de *Streptococcus*. De la même façon, Fonseca *et al.* (2001) démontrent qu'une vitesse de congélation de $300\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ (au lieu de $3,5\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) augmente l'activité des cellules de *S. thermophilus* CFS2 et *Lb. bulgaricus* CFL1 après congélation et stockage sous forme congelée. L'effet positif d'une congélation rapide ($> 200\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ au lieu de $2\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) et d'un stockage à basse température ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ au lieu de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) sur la survie et l'activité acidifiante de huit souches de *Lactobacillus acidophilus* a été confirmé par Foschino *et al.* (1996). Selon Wolfe et Bryant (2001), une congélation rapide diminue considérablement les réactions physico-chimiques et biochimiques due à la formation d'une structure microcristalline.

En étudiant l'effet de la vitesse de congélation et de la vitesse de décongélation sur la survie de *Lb. acidophilus* ATCC 4356, Bâati *et al.* (2000) ont observé qu'une congélation lente, avec des paliers successifs de température, suivie d'une décongélation lente, a permis une survie importante des cellules (74 % au lieu de 43 % pour la congélation directe de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ils observent que la plus grande perte de viabilité des cellules se produit entre $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces résultats sont en accord avec ceux de Wolfe et Bryant (2001), qui affirment que la zone de température responsable des dommages cellulaires se situe entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Plus récemment, une étude sur l'effet de la cinétique de congélation sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1 dans une solution de glycérol a été réalisée par Fonseca *et al.* (2006). La figure I.6 montre les trois protocoles de congélation analysés. Les résultats après congélation montrent que la meilleure survie et la meilleure activité acidifiante ont été obtenues pour les échantillons soumis au protocole FP3 (congélation dans l'azote liquide), suivi par le protocole FP2 (nucléation manuelle pendant les 10 min à -5 °C, suivi par congélation dans l'azote liquide). Les auteurs démontrent qu'une vitesse de congélation élevée couplée à l'utilisation du glycérol, empêche la formation de glace intracellulaire. Par contre, lors des protocoles FP2 et FP1 (congélation à une vitesse de 5 °C/min), la présence de glace intracellulaire a été observée.

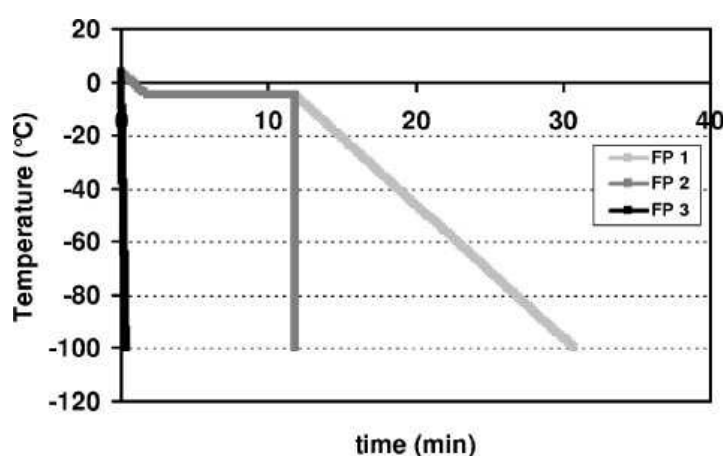


Figure I.6 : trois protocoles de congélation étudiés par Fonseca *et al.* (2006) pour la stabilisation de *Lb. bulgaricus* CFL1 dans une solution de glycérol (10 %)

Un des phénomènes souvent décrit comme étant la cause de la mort cellulaire au cours de la congélation à haute vitesse est la formation de glace intracellulaire, théorie proposée par Mazur (1970) et valable pour différents types de cellules. Récemment, cette théorie a été remise en question par les résultats présentés par Fonseca *et al.* (2006). Ils montrent que, pour les congélations rapides (dans l'azote liquide), il n'y a pas de formation de glace intracellulaire pendant la congélation de *Lb. bulgaricus* CFL1. Ces auteurs proposent que la perte d'activité des cellules est liée à un déséquilibre osmotique.

Température de congélation

L'effet de la température de congélation des cellules est aussi un paramètre important pour bien maîtriser la qualité finale des concentrés bactériens.

L'idéal pour la bonne conservation des cellules congelées est que la congélation soit conduite à des températures les plus faibles possibles. Cependant, certains résultats indiquent que la température de congélation optimale est fortement liée au microorganisme

considéré. En étudiant neuf microorganismes différents, Péter et Reichart (2001) observent qu'une congélation à -25 °C est meilleure pour la survie de certains microorganismes (*Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* et *Candida utilis*) alors qu'une congélation à -196 °C est préférable pour d'autres (*Pseudomonas fluorescens*, *Mucor racemosus* et *Aspergillus niger*).

1.3.2.9 Stockage

La température de stockage sous forme congelée doit être bien maîtrisée. Les auteurs préconisent généralement une température de stockage basse (<-40 °C) (Béal *et al.*, 2008 ; Fonseca *et al.*, 2001 ; Tamime et Robinson, 1999). Par contre, des contraintes d'ordre financier (coût du stockage à basse température) doivent être prises en compte et la recherche d'une température optimale, permettant le meilleur compromis entre qualité technologique et coût de production, est souvent nécessaire.

La survie et l'activité acidifiante de plusieurs souches de *Lb. acidophilus* au cours du stockage à -30 °C ou -80 °C, pendant 9 mois, ont été étudiées par Foschino *et al.* (1996). Les souches sont plus résistantes quand le stockage est effectué à -80 °C, alors que la survie des cellules diminue à -30 °C. Fonseca *et al.* (2001) obtiennent des cellules de *Lb. bulgaricus* CFL1 et *S. thermophilus* CFS2 plus résistantes à -70 °C qu'à -20 °C, avec une perte d'activité acidifiante environ 50 % inférieure à celle observée à -20 °C.

Selon les travaux de Fonseca *et al.* (2006), menés avec *Lb. bulgaricus* CFL1, stockée à deux températures différentes (-20 °C ou -80 °C) pendant un mois, aucune perte d'activité et de viabilité n'est observée pour les échantillons stockés à -80 °C, indépendamment du protocole de congélation appliqué. Par contre, l'activité acidifiante et la viabilité des cellules sont affectées pour les échantillons stockés à -20 °C. L'amplitude des pertes est liée au protocole de congélation utilisé. Contrairement à ce qui a été observé à l'issue de la congélation, le protocole FP1 génère des cellules plus résistantes au stockage à -20 °C, alors que la congélation rapide (FP3) est responsable d'une faible résistance des cellules au stockage. Les auteurs expliquent un tel comportement par un déséquilibre osmotique pendant la décongélation des échantillons.

1.3.3 Conclusion

L'objectif de la production de ferments lactiques concentrés est d'obtenir une préparation caractérisée par une concentration élevée en cellules actives pour permettre une reprise d'activité la plus rapide et la mieux maîtrisée possible. Pour cela, chacune des étapes du procédé de production de ces ferments doit être maîtrisée et contrôlée, afin de minimiser les pertes d'activité, tout en gardant une bonne productivité.

Ce chapitre a permis de synthétiser les efforts de recherche qui ont été faits pour mieux comprendre l'effet du type de microorganisme, de la composition du milieu de culture, des conditions de fermentation, des cryoprotecteurs, de la congélation et du stockage sur la qualité des ferments lactiques.

Ces différents facteurs sont à l'origine d'une grande variabilité au niveau de la qualité des ferments. Toutefois, leurs effets sont eux-mêmes très variables, principalement à cause du facteur « souche » étudié. De plus, un manque de connaissances sur l'effet des conditions opératoires lors de l'étape de concentration sur l'activité des cellules a été mis en évidence. Enfin, l'étude de l'interaction entre plusieurs facteurs intervenant dans le procédé de production de bactéries lactiques serait également intéressante.

1.4 Réponses physiologiques des cellules aux stress

Comme cela a été décrit aux paragraphes 1.2.4 et 1.3.2, pendant la production des ferments lactiques, les bactéries sont soumises à différents stress et leur résistance à ces stress varie selon plusieurs facteurs. Selon Panoff *et al.* (1998), un « stress » représente toutes les modifications des paramètres environnementaux et opératoires qui génèrent des réponses physiologiques chez les microorganismes.

Deux concepts sont importants pour l'analyse et la compréhension d'un stress : le concept d'intensité et le concept de cinétique. Les cellules peuvent être soumises à des stress dits mineurs, modérés ou létaux et elles réagissent différemment à ces conditions. Par exemple, les cellules exposées à un stress mineur, vont réduire leur taux de croissance mais vont être capables de s'adapter au nouvel environnement. Quand le stress devient un peu plus intense (stress modéré), la croissance peut être drastiquement réduite et les cellules adaptent leur métabolisme énergétique avec l'objectif de survivre. Enfin, dans une situation de stress léthal, une grande mortalité cellulaire est observée. Dans ce cas, les bactéries survivantes développent des mécanismes leur permettant de retrouver un état cellulaire actif lorsqu'elles sont, par la suite, exposées à des conditions environnementales plus favorables. L'intensité du stress perçu par les cellules comprend aussi la notion de cinétique d'application du stress. Par exemple, un changement brusque dans l'environnement, même si l'intensité de ce changement est faible, peut être ressenti par les cellules comme un stress fort, car elles n'ont pas eu le temps de s'adapter. Par contre, un changement lent et progressif avec une intensité forte, peut donner aux cellules l'opportunité de développer des mécanismes d'adaptation et, donc, de mieux résister.

Afin de mieux comprendre les réponses physiologiques des bactéries lactiques aux différents types de stress auxquelles elles sont soumises, l'objectif de ce paragraphe est de décrire les principales réponses physiologiques des cellules et les méthodes permettant

l'évaluation de ces réponses. Par la suite, l'effet de différents facteurs sur l'état physiologique des bactéries lactiques sera présenté.

Selon Bunthof (2002), la notion d'état physiologique des cellules est importante car elle permet de les caractériser autrement et plus complètement que par le concept traditionnel de cultivabilité. Cet auteur présente un schéma expliquant cette notion d'état physiologique, en relation avec certaines caractéristiques mesurables des cellules (figure I.7).

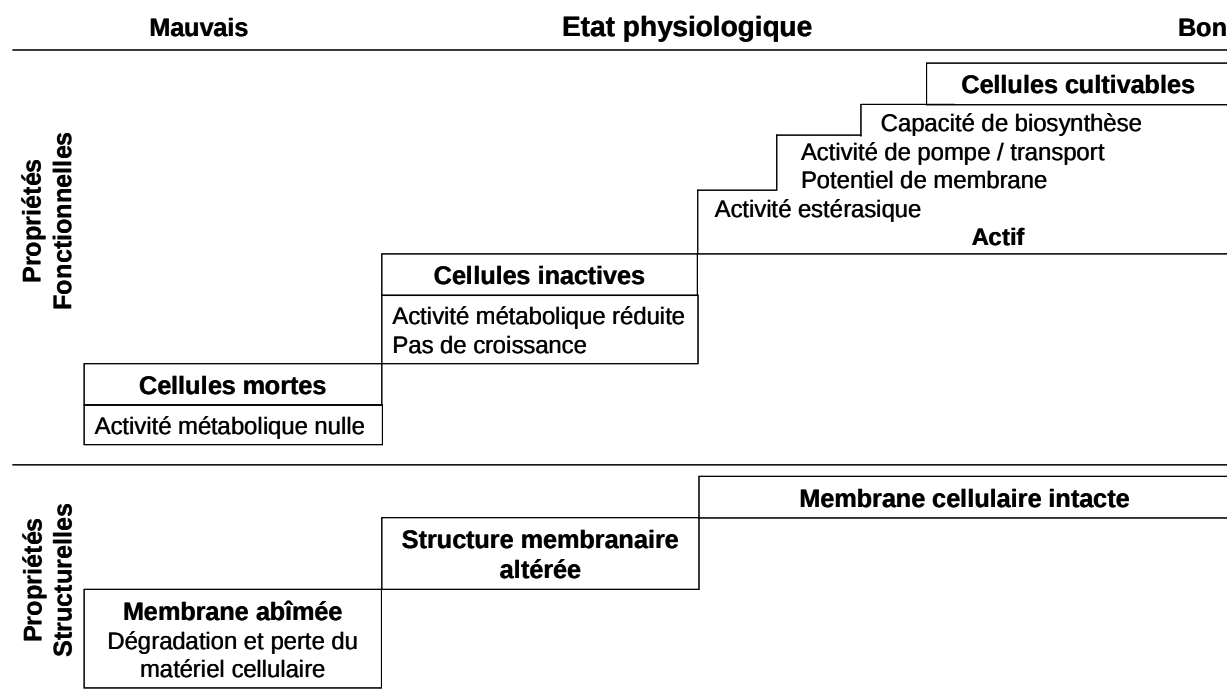


Figure I.7 : représentation schématique de la relation entre les propriétés fonctionnelles et structurelles des cellules selon les différents états physiologiques (adapté de Bunthof, 2002)

Selon ce schéma, les cellules cultivables, ayant un bon état physiologique, présentent à la fois une bonne activité métabolique et une structure membranaire intacte. A l'opposé, un mauvais état physiologique est synonyme de cellules avec une structure cellulaire abîmée et une activité métabolique détériorée, voir inexistante (cellules mortes). Les cellules dites inactives (ou viables mais non cultivables) présentent une activité métabolique réduite par rapport aux cellules cultivables. Elles ont une structure membranaire intacte (mais avec une fluidité altérée), présentent des altérations dans leur teneur en ARN et ADN et démontrent une perte de cultivabilité. La principale caractéristique de ce type de cellules est liée au fait que, si elles sont exposées à une condition environnementale favorable, leur activité métabolique peut reprendre et les cellules peuvent « ressusciter » (McDougald *et al.*, 1998).

D'après ces considérations, les modifications de l'état physiologique des bactéries lactiques peuvent être perçues par des changements aux niveaux de leur membrane

cellulaire, de leur composition en protéines cytoplasmiques et de leur ARN. Dans les paragraphes suivants, les principales méthodes permettant l'analyse de ces changements sont présentées.

1.4.1 Etude des changements au niveau de la membrane cellulaire

1.4.1.1 Fonctions et structure de la membrane

Les membranes biologiques sont des structures permettant de délimiter les cellules et leurs organites du milieu extracellulaire. Dans le cas des bactéries à Gram positif, la seule structure membranaire est la membrane cytoplasmique. Elle a un rôle de barrière, permettant la séparation entre le cytoplasme cellulaire et l'environnement extérieur et, donc, le maintien des compositions différentes entre le cytosol et le milieu externe. Ce maintien est réalisé grâce à la régulation sélective des flux (de nutriments, de métabolites, d'ions,...) entre le cytoplasme et le milieu extérieur ; il permet le bon fonctionnement cellulaire (Carvalho *et al.*, 2004 ; Chu-Ky *et al.*, 2005 ; Russell *et al.*, 1995). Dans les situations où la structure membranaire n'est pas intacte, le maintien du gradient électrochimique n'est pas possible et le potentiel de membrane, ainsi que son gradient de pH, se dégradent (Bunthof, 2002).

La membrane cytoplasmique est composée de lipides, de protéines et de sucres. Parmi les lipides membranaires (phospholipides, glycolipides, sphingolipides et stérols), les phospholipides sont particulièrement importants, car ils sont responsables de la structure de la bicouche lipidique, selon le modèle de mosaïque fluide de Singer et Nicholson (1972) (figure 1.8). Avec un caractère amphiphile, les phospholipides possèdent une partie hydrophile (constituée par une molécule de glycérol et de phosphate) et une partie lipophile (composée par des acides gras). Cette structure contrôle la diffusion des composés organiques polaires (sucre, acides aminés...), et permet le passage des solutés hydrophobes ou de petite taille (CO₂, éthanol). Les phospholipides présents dans la composition de la membrane d'un microorganisme sont composés généralement de 14 à 20 molécules de carbone, associées selon une structure saturée ou insaturée, avec des ramifications ou un cycle propane (Denich *et al.*, 2003). Les protéines de la membrane cellulaire ont une structure globulaire en α -hélice. Elles peuvent être partiellement insérées dans la membrane ou complètement traverser la bicouche lipidique (Lehninger, 1981) (figure 1.8). Le rôle principal de ces protéines consiste à faciliter les échanges entre les milieux intra- et extra-cellulaire.

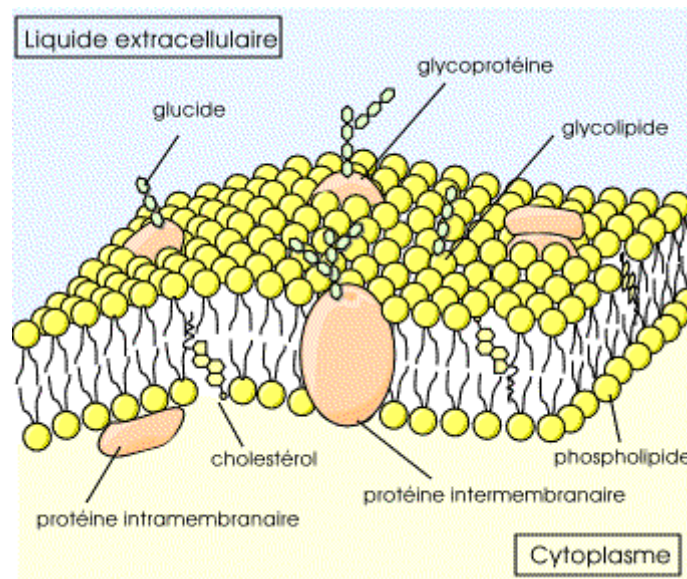


Figure 1.8 : structure de la membrane cytoplasmique selon le modèle mosaïque fluide (d'après <http://homepage.mac.com/ltbo/images/membrane.GIF>)

Les protéines, ainsi que les acides gras, peuvent se déplacer librement à l'intérieur de cette structure, créant ainsi des zones plus ou moins fluides et permettant des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Des stérols (par exemple, le cholestérol) peuvent être éventuellement insérés à l'intérieur de cette bicouche, minimisant la variation de la fluidité membranaire (Taylor, 2007).

Selon ces informations, des changements au niveau de la structure de la membrane ont une influence directe sur la fluidité membranaire, donc sur la capacité d'échanges et de régulation des flux et donc sur l'état physiologique des cellules.

1.4.1.2 Modifications de la structure membranaire

La structure membranaire est la première cible de détérioration de l'état physiologique de cellules lors d'une situation de stress (Béal *et al.*, 2008). Par exemple, les basses températures lors de la stabilisation des cellules par congélation, modifient les propriétés des molécules hydrophobes (lipides et acides gras) de la membrane et les interactions solvant-protéines (Chilson *et al.*, 1965). Cela se traduit par une diminution de la stabilité des interactions hydrophobes au sein des membranes, par une modification de la configuration des protéines membranaires pouvant entraîner leur dénaturation (Mazur, 1970), et par des changements de composition en acides gras des membranes bactériennes (Béal *et al.*, 2001a). L'altération de la membrane cytoplasmique est liée, principalement, à des modifications de sa composition lipidique. Dans une situation de stress, les bactéries adaptent cette composition afin de maintenir une fluidité membranaire permettant de réaliser les échanges cellulaires (Russell *et al.*, 1995). La fluidité de la membrane est donc un autre

paramètre important permettant de différencier les cellules cultivables des cellules inactives (figure I.7). Ainsi, ces deux catégories de cellules présentent une structure membranaire intacte mais des différences de fluidité.

La membrane est considérée comme fluide, c'est-à-dire dans un état actif, quand la bicouche lipidique se trouve à l'état liquide-cristalin. En revanche, la fluidité diminue lorsque la structure passe à l'état gel (figure I.9). L'état de la membrane (liquide-cristalin ou gel) a des conséquences sur la distribution des protéines à l'intérieur de la bicouche. Selon Taylor (2007), les protéines ont tendance à se réarranger et à se concentrer dans les zones en état liquide-cristalin, plus favorables thermodynamiquement à leur activité, que dans les zones en état gel. Ces différences s'expliquent par des différences de conformation des acides gras membranaires.



Figure I.9 : représentation de la structure d'une membrane à l'état liquide-cristaline (a) et à l'état gel (b) (d'après Wolfe et Bryant, 2001).

En effet, la fluidité membranaire est intimement liée à la conformation des chaînes des acides gras ainsi qu'à la taille du groupe polaire (Denich *et al.*, 2003). Plus les chaînes sont ordonnées (comme, par exemple, pour les acides gras saturés), plus l'interaction entre elles est forte, ce qui limite leur mobilité et diminue donc la fluidité de la structure. En revanche, lorsque la conformation des chaînes d'acides gras devient désordonnée, les interactions sont moins fortes et donc la fluidité membranaire augmente. De cette façon, la fluidité de la membrane est directement liée à la composition relative des acides gras à longue et courte chaînes, des acides gras branchés, des niveaux de saturation des acides gras, ainsi que des acides gras en configuration *cis* ou *trans* (Schoug *et al.*, 2007 ; Trevors, 2003). De plus, selon la taille de la tête polaire des phospholipides, la transition de phase (phase lamellaire à phase hexagonale) peut avoir lieu (figure I.10). Ces structures sont transitoires et ponctuelles et sont considérées comme essentielles pour le maintien de l'activité cellulaire, car elles sont liées au phénomène de fusion membranaire (Morein *et al.*, 1996).

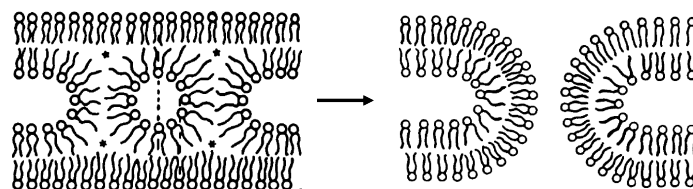


Figure I.10 : représentation schématique de la fusion membranaire (d'après Siegel,1986).

Les bactéries sont capables, par des réactions biochimiques, de modifier la conformation et la structure de ces acides gras, pour maintenir leur fluidité membranaire à un niveau adéquat, leur permettant de résister aux conditions environnementales adverses auxquelles elles sont soumises. Un tel phénomène est considéré comme une « adaptation homéovisqueuse » (Denich *et al.*, 2003). La figure I.11 montre, de façon schématique, l'évolution de la fluidité membranaire en fonction de sa composition en différents acides gras.

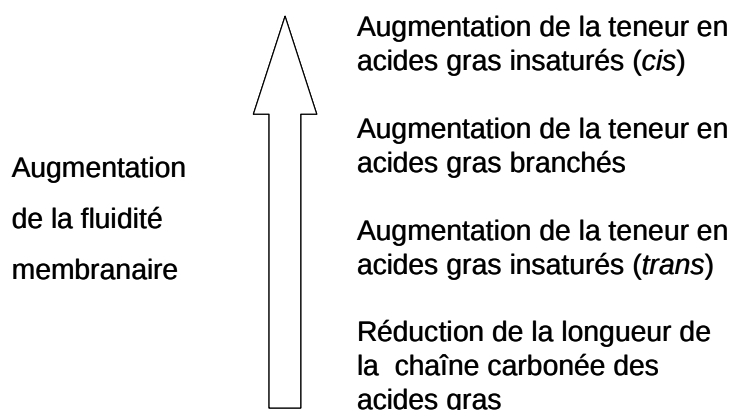


Figure I.11 : évolution de la fluidité membranaire selon le type d'acides gras présents dans la membrane (adapté de Russel, 2002)

I.4.1.3 Méthodes pour caractériser la membrane cellulaire

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la structure et les propriétés de la membrane cellulaire, utilisant des mesures biologiques ou physiques.

Une des méthodes permettant la caractérisation de la membrane au niveau biologique est l'analyse des acides gras membranaires par chromatographie en phase gazeuse. Elle permet de connaître la composition en acides gras présents dans les phospholipides de la membrane. Par analyse différentielle de la composition mesurée sur des cellules ayant subi des traitements différents, il est alors possible de déterminer indirectement l'effet de ces traitements sur la fluidité membranaire. Une autre méthode de caractérisation biologique implique une mesure de l'intégrité membranaire ou du potentiel de membrane par épifluorescence, couplée à la cytométrie en flux.

Les méthodes de mesure physique de la membrane portent principalement sur la quantification de la fluidité de la membrane, ce qui permet d'évaluer ses variations en fonction des conditions environnementales. L'analyse de la température de transition lipidique peut être déterminée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Cette analyse permet de caractériser la température de transition lipidique et, donc, la fluidité membranaire à une température donnée. La fluidité membranaire peut aussi être évaluée directement par anisotropie de fluorescence. Selon cette méthode, l'intensité de fluorescence d'une sonde fluorescente (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène), insérée dans la membrane, représente proportionnellement la rigidité membranaire.

Le tableau I.5 résume le principe, les avantages et les inconvénients de ces quatre méthodes, ainsi que le contexte dans lequel elles ont été utilisées.

Dans ce travail, la méthode de caractérisation de la composition en acides gras membranaires par chromatographie en phase gazeuse a été retenue pour analyser les changements de la membrane cellulaire en réponse aux modifications du procédé. En effet, cette méthode permet d'évaluer les changements de la composition de la membrane dus aux stress environnementaux, et de lier de tels changements aux altérations de la fluidité membranaire (Béal *et al.*, 2001a ; Wang *et al.*, 2005b).

1.4.2 Changements au niveau du métabolisme cellulaire

Pour mieux résister aux différents stress liés au procédé ou aux changements des conditions environnementales, les cellules peuvent modifier leur activité métabolique. L'analyse de ces changements métaboliques permet de comprendre quelles réponses physiologiques les cellules développent face à des conditions adverses.

D'après la figure I.7, des différences d'activité métabolique sont observées selon l'état physiologique des cellules. Ainsi, les cellules cultivables se caractérisent par une activité de biosynthèse élevée, liée à un système enzymatique et de production d'énergie actif. A l'inverse, dans le cas des cellules inactives, les systèmes métaboliques (activité de pompe, potentiel de membrane et conversions enzymatiques) sont modifiés pour utiliser moins d'énergie, afin de permettre aux cellules de survivre en conditions de stress (McDougald *et al.*, 1998). De tels systèmes peuvent être activés dans des situations où le développement cellulaire n'est plus possible (Bunthof, 2002). Enfin, les cellules mortes se caractérisent par la perte de la totalité des différentes fonctions métaboliques.

Tableau I.5 : principe et caractéristiques des principales méthodes utilisées pour la caractérisation de la membrane cellulaire

Méthodes	Principes	Avantages	Inconvénients	Applications	Références
Chromatographie en phase gazeuse	- Méthylation et extraction des acides gras membranaires - Quantification par chromatographie en phase gazeuse - Identification par comparaison avec des bases de données	- Informe sur une réponse biologique des cellules - Résultats corrélés avec la fluidité membranaire	- Lourdeur et longueur de mise en œuvre (~ 4 h / analyse) - Identification des acides gras imparfaite (position des insaturations, isomérisation <i>cis trans</i>)	Détermination de la composition en acides gras membranaires	Smittle <i>et al.</i> (1974) Rozès <i>et al.</i> (1993) Béal <i>et al.</i> (2001a)
Cytométrie en flux couplée à l'épifluorescence	- Marquage des cellules par un fluorochrome - Passage des bactéries dans un cytomètre de flux - Détection des particules fluorescentes	- Rapide et facile - Chaque cellule est analysée individuellement - Permet la séparation des cellules selon les différentes populations observées	- Difficile à utiliser sur des matrices complexes - Coût élevé des équipements - Coût des fluorochromes	Selon le type de fluorochrome utilisé : - intégrité de la membrane - potentiel de membrane	Bunthof et Abee (2002) Ananta <i>et al.</i> (2005) Rault <i>et al.</i> (2007)
Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	- Mesure par infrarouge de la fréquence et de la largeur de la bande représentant l'élongation symétrique des liaisons C-H des groupements méthylènes - Dérivation des résultats obtenus pour calculer T_m	- Facile - Non invasive - Résultats corrélés avec la composition en acides gras membranaires	- Lourdeur du traitement de données - Coût de l'équipement	Détermination de la température de transition de la phase gel à la phase cristalline (T _m)	Crowe <i>et al.</i> (1989) Linders <i>et al.</i> (1997b) Oldenhof <i>et al.</i> (2005)
Anisotropie de fluorescence	- Marquage des cellules avec 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) - Mesure de la fluorescence à 340 (excitation) et 431 nm (émission)	- Le DPH a une fluorescence intense, ne se lie pas à des protéines et est sensible à l'état physiologique de la membrane - N'affecte pas la survie des cellules - Possibilité de réaliser des cinétiques	- Mesure globale, n'informant pas sur les modifications intracellulaires	Détermination de la fluidité membranaire (inversement proportionnelle à l'anisotropie)	Tourdot-Maréchal <i>et al.</i> (2000) Chu-Ky <i>et al.</i> (2005) Martos <i>et al.</i> (2007)

Le choix de la méthode utilisée pour étudier les changements métaboliques des cellules dépend du type de réponse envisagé. Deux niveaux de réponse peuvent être identifiés : le niveau génomique, par l'étude des modifications de l'expression des gènes et le niveau cytoplasmique, qui s'intéresse aux modifications de la synthèse des protéines et aux modifications du métabolisme cellulaire. Les méthodes permettant d'analyser ces différentes réponses sont décrites aux paragraphes suivants.

1.4.2.1 Transcriptomique

Le transcriptome d'une cellule correspond à sa définition moléculaire précise à un moment donné et il est basé sur l'expression de l'ensemble des ARN messagers d'une cellule (Renault, 2008). Il est un reflet instantané de l'activité cellulaire et, donc, varie au cours de son évolution et selon l'environnement dans lequel elle évolue (Schena *et al.*, 1998). L'étude de l'effet de facteurs intrinsèques et extrinsèques sur les voies métaboliques permet d'établir leur influence sur l'état physiologique des cellules et de mieux comprendre le fonctionnement cellulaire. L'analyse du changement de l'état physiologique, via l'analyse des changements dans l'expression des gènes, est possible par la technique des puces à ADN, qui permet de quantifier l'expression de l'ensemble des gènes d'une cellule (Chich, 2001).

Cette méthode implique l'existence de puces à ADN préalablement construites, et donc, la connaissance du génome du microorganisme étudié. Après purification et éventuelle amplification de l'ARN de la cellule, il est marqué avec un marqueur fluorescent et mis en contact avec les sondes portées par la puce (figure I.12). Lors de cette étape d'hybridation, les acides nucléiques marqués vont s'apparier avec les sondes ADN. La fluorescence au niveau de chaque sonde est alors quantifiée au moyen de tubes photomultiplicateurs ou d'une caméra CCD (*charge-coupled device*). Les valeurs obtenues pour chaque sonde sont ensuite traitées aux moyens d'outils informatiques pour caractériser l'échantillon et identifier les gènes exprimés différemment (Cholet, 2006).

Le principal avantage de cette méthode est lié au fait que, en une seule manipulation, il est possible d'obtenir l'expression globale des gènes des cellules (Panchaud *et al.*, 2007). Par contre, c'est une méthode lourde à mettre en œuvre, coûteuse et très sensible aux biais liés au manipulateur. La nécessité de connaître le génome du microorganisme pour pouvoir bien identifier les gènes constitue une limite à son utilisation. Enfin, il faut noter que cette méthode n'apporte pas d'information sur le contrôle post-transcriptomique de l'expression des gènes, ni sur les changements au niveau de la synthèse ou de la dégradation des protéines (Lee, 2001 ; Yarmush et Jayaraman, 2002).

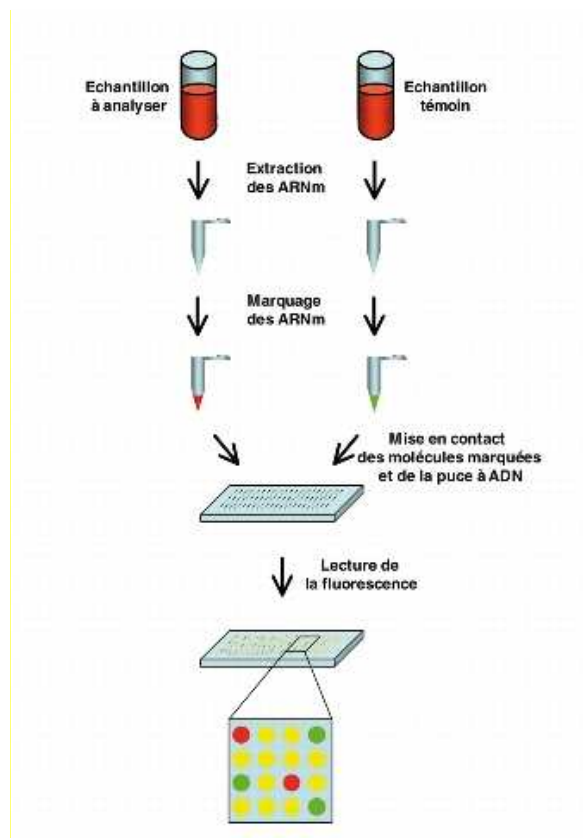


Figure I.12 : représentation schématique des différentes étapes de l'analyse transcriptomique (d'après <http://maladiedegaucher.canalblog.com/archives/2007/10/14/6535549.html>)

I.4.2.2 Protéomique

Le protéome représente la totalité des « protéines exprimées par le génome » d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme (Pennington *et al.*, 1997). La méthode utilisée pour déterminer le protéome est connue sous le nom de protéomique (Yarmush et Jayaraman, 2002).

Développée, en 1975, par O'Farrell, l'électrophorèse bidimensionnelle est aujourd'hui la méthode la plus souvent utilisée pour la caractérisation du protéome cellulaire (Chich, 2001). L'approche la plus courante dans le cadre de l'étude de l'état physiologique des cellules, consiste à établir le protéome de référence du microorganisme pour, ensuite, analyser de façon différentielle les changements consécutifs aux altérations environnementales par rapport à la condition de référence. Elle consiste, dans un premier temps, à extraire et à purifier les protéines afin d'obtenir une mixture complexe contenant les protéines présentes dans le microorganisme à un moment précis. Dans un deuxième temps, les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire. Cette séparation génère une carte où les protéines sont distribuées dans l'espace selon leur point isoélectrique et leur poids

moléculaire. Cette carte représente le protéome du microorganisme, qui est alors analysé grâce à des logiciels d'analyse d'images. L'étape suivante comprend la caractérisation et l'identification de chaque protéine individuellement. A cet effet, les protéines sont extraites du gel, hydrolysées et analysées par spectroscopie de masse (MALDI-TOF). La séquence de peptides obtenue est comparée avec les bases de données disponibles en vue de l'identification de la protéine.

La qualité de l'identification est proportionnelle à la connaissance disponible sur le génome du microorganisme étudié (Cash, 1998 ; Pennington *et al.*, 1997). En ce que concerne les bactéries lactiques, le séquençage du génome de différentes espèces a été finalisé (Klaenhammer *et al.*, 2002). Le premier génome complet d'une bactérie lactique, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, a été publié par Bolotin *et al.* (2001). Plus récemment, le génome de *Lactobacillus bulgaricus* ATCC11842 a été publié par Van de Guchte *et al.* (2006), ce qui permet un niveau d'identification des protéines de cette espèce tout à fait correct.

Des difficultés subsistent toutefois. Certaines protéines ne se solubilisent pas facilement (Yarmush et Jayaraman, 2002), ce qui rend leur séparation imparfaite. Les protéines de haut (>200kDa) ou faible (<10kDa) poids moléculaire ne sont pas toujours séparées correctement. Enfin, la lourdeur, la durée et le coût des analyses sont des facteurs restrictifs pour une application plus ample de cette méthode.

1.4.2.3 Métabolomique

L'étude par métabolomique a pour objectif de comprendre, d'identifier et de quantifier le comportement des métabolites intracellulaires d'un échantillon biologique (Steuer *et al.*, 2003 ; Weckwerth et Fiehn, 2002). Selon Ott *et al.* (2003), le « métabolome » représente la totalité des métabolites de faible poids moléculaire à l'intérieur d'une cellule, résultant de l'activité des protéines dans l'environnement cellulaire. Il décrit aussi le profil ou « *fingerprint* » des métabolites dans un tissu ou un organisme. Le métabolome reflète donc l'évolution du métabolisme des cellules, en prenant en compte leur âge et les facteurs environnementaux. Complémentaire des approches génomiques et protéomiques, cette méthode permet l'étude de l'interaction entre les gènes et leurs produits respectifs, en analysant leur rôle biologique dans différentes conditions environnementales. De plus, elle permet d'analyser les produits résultants de l'action d'une enzyme, et informe donc sur leur activité (Weckwerth et Fiehn, 2002).

L'analyse du métabolome se fait en deux étapes : séparation des métabolites puis détection (Ott *et al.*, 2003 ; Weckwerth et Fiehn, 2002). La séparation des métabolites est réalisée principalement par chromatographie (CPG, HPLC), mais aussi par électrophorèse.

Une fois séparés, ils sont détectés par spectroscopie de masse ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'analyse par RMN a l'avantage de ne pas nécessiter de séparation et de permettre la quantification de plusieurs composés en une seule analyse. Par contre, en terme de sensibilité, les techniques de spectroscopie de masse sont plus performantes.

Par l'analyse métabolomique de cellules soumises à différents types de stress, il est aussi possible d'identifier les principales voies métaboliques qui sont modifiées à la suite d'un stress. De cette façon, il est possible de connaître la réorientation du métabolisme suite à un changement environnemental. Dans le cas des bactéries lactiques, une telle approche est intéressante pour analyser l'effet de différentes conditions environnementales sur la capacité d'une cellule à produire des arômes ou d'autres métabolites d'intérêt. Raynaud *et al.* (2005) ont étudié le comportement métabolique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* LD61, cultivée dans du lait, en fonction de l'autoacidification du milieu et d'une réduction de la température, afin de mieux maîtriser la reproductibilité des fermentations. En étudiant la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 en culture continue dans différentes conditions d'acidification, Even *et al.* (2003) ont observé un effet important de l'acidification sur l'activité glycolytique des cellules. En conditions acides, le taux spécifique de consommation de glucose est augmenté, permettant ainsi un plus grand apport d'énergie. L'augmentation du taux de glycolyse peut être liée à une augmentation de la concentration en enzymes ou à la régulation de l'activité enzymatique par une régulation métabolique. Selon les auteurs, l'effet négatif du pH sur l'activité enzymatique a été compensé par l'effet de la régulation métabolique.

Cette méthode requiert des équipements lourds et coûteux (HPLC, CPG, électrophorèse, RMN, spectrométrie de masse,...), ainsi que des moyens bio-informatiques considérables. En conséquence, l'analyse du métabolome est réalisée généralement au sein de plate-formes techniques dédiées (Renault, 2008).

Parmi les méthodes de caractérisation du métabolisme cellulaire, la protéomique a été retenue dans cette étude pour analyser les variations de l'état physiologique des cellules en fonction des altérations réalisées lors des procédés. Elle permet d'obtenir des informations intéressantes sur la réorganisation du métabolisme cellulaire et de faire le lien avec différents travaux déjà réalisés sur les bactéries lactiques (Lim *et al.*, 2001 ; Prasad *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2005b).

1.4.3 Facteurs influençant l'état physiologique des bactéries lactiques

Après avoir présenté l'effet de différents facteurs biologiques et environnementaux sur la qualité technologique des bactéries lactiques concentrées et congelées (paragraphe 1.3.2), ce paragraphe a pour objectif de décrire l'effet de ces facteurs, représentant différents types de stress, sur la composition en acides gras membranaires et sur le protéome cellulaire des bactéries lactiques. Ces informations sont utiles pour comprendre les différences de résistance des cellules en fonction des conditions environnementales et des différents stress auxquelles elles sont soumises pendant leur production.

1.4.3.1 Effet des conditions environnementales sur la composition en acides gras membranaires des bactéries lactiques et conséquences sur leurs fonctionnalités

Différentes études sont disponibles dans la littérature concernant la composition en acides gras membranaires (AGM) des cellules. Selon leurs objectifs, elles peuvent être réparties en deux groupes :

- des études qui décrivent les changements de composition de la membrane suite à une modification de l'environnement des cellules ;
- des études où les informations relatives à la composition de la membrane, dans une condition environnementale donnée, sont utilisées pour expliquer et comprendre les différences de comportement des cellules face à différents types de stress.

Dans certains cas, ces changements interviennent quand les cellules sont placées dans des conditions où leur métabolisme est actif. Il s'agit donc d'une réponse active des cellules à leur environnement, principalement lorsque la température est suffisamment élevée (activation des enzymes et réarrangement de la structure membranaire). Dans d'autres cas, les cellules peuvent subir des modifications passives, notamment au cours de leur congélation ou de leur stockage (par exemple, oxydation des lipides).

Les résultats présentés ci-dessous concernent principalement la composition en acides gras de la membrane (AGM) qui influence la fluidité membranaire. Par la suite, l'effet de différentes conditions environnementales sur cette composition est présenté. Enfin, une analyse de la relation entre composition en AGM des cellules et leur résistance à différentes conditions de stress est proposée.

Effet de la composition du milieu

La composition du milieu de fermentation correspond à la première situation environnementale susceptible de provoquer des changements de la composition membranaire des bactéries lactiques. L'ajout de Tween 80 (ou d'autres acides gras ou de

précurseurs d'acides gras), dans le milieu utilisé pour la croissance des cellules, démontre un effet positif sur la fluidité membranaire dans plusieurs études (Béal *et al.*, 2001a ; Carvalho *et al.*, 2003a ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Smittle *et al.*, 1974). L'addition de tels composés permet aux cellules d'accumuler plus d'acides gras insaturés dans leur structure membranaire, ce qui engendre un rapport entre les acides gras insaturés et saturés (U/S) plus élevé, et donc des cellules avec une membrane plus fluide (Russell, 2002 ; Russell *et al.*, 1995). Par exemple, Guillot *et al.* (2000) ont obtenu des cellules de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 avec un rapport U/S plus élevé quand les cellules ont été cultivées en présence de Tween 80. Béal *et al.* (2001a) ont observé une augmentation du rapport U/S de *Streptococcus thermophilus* CFS2 cultivé en présence de 1 g.L⁻¹ d'acide oléique. Une telle augmentation est liée à des concentrations en C18:1 et C20:1 plus élevées ainsi qu'à un contenu en C14:0, C16:0 et C18:0 réduit. Selon Smittle *et al.* (1974), quatre souches de *Lactobacillus bulgaricus* présentent une concentration en C18:1 et cycC19:0 plus élevée suite à l'addition d'oléate de sodium dans le milieu de culture. A l'opposé, les cellules cultivées en absence d'oléate de sodium se caractérisent par une membrane plus riche en acides gras saturés, donc moins fluide.

La concentration en éthanol est une autre composante du milieu de culture importante pour les bactéries lactiques responsables de la fermentation malolactique du vin. Teixeira *et al.* (2002) ont étudié les changements dans la membrane de *Oenococcus oeni* DSM10519 suite à une exposition à l'éthanol. Ils observent une augmentation de la concentration en cycC19:0 et une réduction de la concentration en C18:1. Ces modifications génèrent une diminution de la fluidité membranaire et permettent aux cellules de s'adapter à cet environnement. Ceci est confirmé par Chu-Ky (2005), qui observe une augmentation significative de la concentration en C16:0 et cycC19:0 et une réduction de moitié du contenu en C16:1 et C18:1 pour *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 cultivé en présence de 8 % d'éthanol.

Le dernier aspect, lié au milieu de culture, correspond aux limitations de substrat en fin de fermentation, c'est-à-dire à un phénomène de déprivation nutritionnelle. Wang (2005) a montré que le maintien des cellules en présence d'une faible concentration résiduelle en lactose (1,2 g.L⁻¹) induit un changement significatif dans la membrane de *Lb. acidophilus* RD758. Les cellules présentent une teneur plus élevée en acides gras insaturés et branchés, assurant ainsi une fluidité membranaire accrue.

Effet de la température de culture

La température est un facteur qui présente une forte influence sur la composition membranaire. En conduisant des cultures de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 à une température de 40 °C au lieu de 30 °C, Guillot *et al.* (2000) ont observé une diminution

de la concentration en C16:0 et une augmentation des teneurs en C18:1 et cycC19:0, représentant un rapport U/S plus élevé.

L'effet de différentes températures de culture (25, 30, 37 et 40 °C) sur la membrane de *Lactobacillus acidophilus* CRL640 a été étudié par Fernandez Murga *et al.* (2000). Ces auteurs observent une augmentation des concentrations en C16:0 et C18:2 et une réduction des teneurs en C18:0,10-OH et cycC19:0 pour les cellules cultivées à 25 °C par rapport aux autres températures. Par contre, aucun changement significatif n'est observé dans le rapport entre les acides gras insaturés et saturés (U/S), indiquant que la fluidité membranaire n'est pas significativement modifiée.

Wang *et al.* (2005a) ont conduit des cultures de *Lactobacillus acidophilus* RD758 à une température inférieure (30 °C) ou supérieure (42 °C) à la température optimale de croissance (37 °C) et ont analysé l'effet sur la membrane cellulaire. Les cellules cultivées à 30 °C présentent un rapport U/S plus élevé, conséquence d'une teneur élevée en C16:0 et cycC19:0 et d'une faible concentration en C18:0. Casadei *et al.* (2002) ont étudié l'effet de la réduction de la température de culture sur la composition membranaire de *Escherichia coli* NCTC8164 récolté en phase de croissance exponentielle ou stationnaire. Une augmentation des teneurs en acides gras insaturés (C16:1 et C18:1) et une réduction de la concentration des acides gras saturés (C16:0) a été obtenue en conséquence de la réduction de la température de culture, indépendamment de la phase de croissance.

Comme le montrent les résultats obtenus par Fernandez Murga *et al.* (2000) et Wang *et al.* (2005a), ces résultats ne peuvent pas être généralisés car l'adaptation de la membrane selon les conditions de culture est une réponse souche et espèce dépendante. Ceci est parfaitement illustré par Russel *et al.* (1995) qui ont analysé les différences de comportement de la membrane selon la température de culture, pour différentes souches de *Listeria monocytogenes* et *Lactobacillus plantarum*. Une réduction de la température de 30 °C à 7 °C augmente la concentration en C15:0 et réduit celle en C17:0 dans la membrane de *L. monocytogenes*. Une telle réduction de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras induit une réduction du point de fusion des lipides, ce qui permet de maintenir la fluidité membranaire à basse température. Une légère augmentation de la concentration en C18:1 a été aussi observée. Par contre, pour la bactérie *Lb. plantarum*, la principale réponse à cette réduction de température correspond à une augmentation de la concentration en acides gras insaturés.

Effet du pH de culture

Le pH auquel la culture est conduite correspond à un autre facteur, lié aux conditions de culture, ayant un effet important sur la composition en acides gras membranaires. En réalisant des cultures à pH acide (pH 4,5 ou 5,0) au lieu de pH 6,0, Wang *et al.* (2005a) ont

obtenu des cellules de *Lactobacillus acidophilus* RD758 avec une concentration plus élevée en C16:0 et cycC19:0 et une teneur réduite en C18:0. Ces changements dans la composition membranaire se traduisent par un rapport U/S plus élevé. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par Béal *et al.* (2001a), qui indiquent que les cellules de *Streptococcus thermophilus* CFS2 ont un rapport U/S plus élevé quand la culture est conduite à pH 5,5 au lieu de pH 6,5.

Effet de la pression

Selon Bartlett (2002), les lipides membranaires sont sensibles aux effets de la pression. Une augmentation de la pression induit une réorganisation des chaînes lipidiques, provoquant ainsi une augmentation de la température de transition de phase des lipides. Ils démontrent ainsi que *Photobacterium profundum*, une bactérie isolée des fonds sous-marins, augmente sa concentration en C18:1 et C20:5 et réduit celle en C16:1 en réponse à une augmentation de la pression (de 0,1 à 28 MPa). Cependant, aucun résultat n'a été trouvé sur la relation entre la composition en acides gras membranaires des bactéries lactiques et leur résistance à la pression. Seuls, Casadei *et al.* (2002) montrent que les cellules de *E. coli* ayant une concentration plus importante en C16:1 et C18:1 et une teneur plus faible en C16:0 donc, une membrane plus fluide, sont plus résistantes aux traitements à haute pression (400 MPa).

Effet d'un changement osmotique

Lors de l'exposition de bactéries lactiques à un changement osmotique, des conséquences sur la composition en acides gras membranaires ont été observées. Guillot *et al.* (2000) ont cultivé *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 en présence de 0,3 M de NaCl. De telles conditions génèrent une diminution de la teneur en C18:1 et une augmentation de la concentration en cycC19:0 dans les membranes bactériennes. Comme ces changements ont été proportionnels, ils n'ont pas conduit à une altération du rapport U/S. L'effet de l'osmolalité du milieu a été étudié par Tymczyszyn *et al.* (2005). Ces auteurs ont analysé les changements dans la composition de la membrane de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA333, cultivé sur milieu MRS, avec une osmolalité variable, liée à l'ajout ou non de 2,5 % de polyéthylène glycol. Une augmentation des concentrations des acides gras C16:0 et C18:1 a été observée pour les cellules cultivées dans le milieu ayant une haute osmolalité, alors que les concentrations en C16:1 et cycC19:0 ont diminué.

Effet de la température en fin de fermentation

Tout comme la température de culture, les stress thermiques induisent des changements dans la composition de la membrane des cellules. Les faibles températures liées au refroidissement des cellules ou l'exposition des cellules à des températures élevées à la fin de la fermentation sont des exemples de stress thermiques. Broadbent et Lin (1999) démontrent l'altération de la composition en AGM de quatre souches de *Lactococcus lactis* soumises, à la fin de la fermentation, à un choc thermique froid (10 °C pendant 1, 2, 3 ou 4 h) ou chaud (42 °C pendant 25 min). L'exposition des cellules à une température élevée a surtout augmenté la concentration en cycC19:0 et réduit la teneur en C18:1, sans changement significatif du rapport U/S en comparaison avec les cellules de référence. Par contre, les cellules soumises au choc froid présentent un rapport U/S plus élevé, lié à une augmentation de la concentration en C16:1 et cycC19:0. En étudiant différentes températures (15 à 37 °C) et durées (0 à 8 h) de refroidissement, Wang *et al.* (2005b) ont observé un changement principalement dans la concentration en cycC19:0 et dans le rapport U/S. La figure I.13 montre le comportement de ces deux descripteurs selon les conditions de refroidissement. Plus la température est faible, plus élevées sont les valeurs obtenues pour ces deux paramètres. L'effet de la durée est plus marqué sur la concentration en cycC19:0, où un minimum est trouvé aux environs de 4 h.

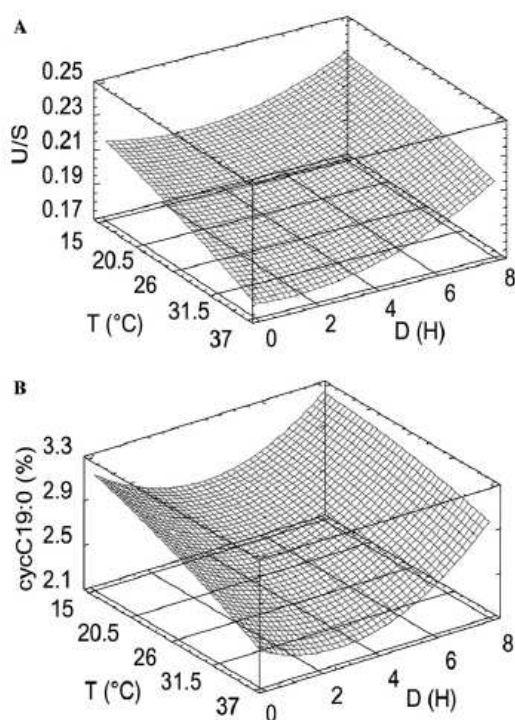


Figure I.13 : surface de réponse représentant l'effet de la température (T) et de la durée (D) de refroidissement sur le rapport U/S et la concentration en cycC19:0 chez *Lb. acidophilus* RD758 (Wang *et al.*, 2005b)

Relation entre la composition en AGM et les réponses technologiques des bactéries lactiques

Plusieurs auteurs ont montré que les propriétés technologiques des bactéries lactiques, et notamment la résistance à certaines conditions de stress, peuvent être liées à des changements de la composition en AGM des cellules. Par exemple, comme décrit auparavant, Wang *et al.* (2005a) ont étudié l'effet de la température (30, 37 et 42 °C) et du pH (4,5, 5,0 et 6,0) de culture sur la composition en AGM de *Lactobacillus acidophilus* RD758. Ils ont combiné ces deux facteurs et ont observé qu'une fermentation conduite à pH acide modéré (pH 5,0) et à 30 °C conduit à des cellules cryotolérantes à -20 °C. Ces cellules sont, en outre, caractérisées par une faible concentration en C18:0, mais des teneurs élevées en C16:0 et cycC19:0, et un rapport U/S plus élevé que celui obtenu pour la condition de référence (pH 6,0 à 37 °C). Ces auteurs ont identifié l'existence d'une forte corrélation entre la composition de la membrane et la cryotolérance des cellules à -20 °C. Ils expliquent que les cellules résistantes à la congélation présentent un rapport U/S élevé, donc une membrane fluide, grâce à des concentrations élevées en C16:0 et cycC19:0. De la même façon, la résistance des cellules pendant le stockage sous forme congelée est liée à une haute concentration en cycC19:0.

Comme cela a été indiqué précédemment, plusieurs conditions environnementales peuvent affecter la composition de la membrane cellulaire. L'objectif du tableau I.6 est de résumer les résultats de la littérature sur les conséquences de ces différentes conditions environnementales sur la composition en AGM des bactéries lactiques ainsi que sur leur effet respectif sur les propriétés fonctionnelles des cellules.

Ce tableau traduit une grande diversité de résultats, liée en grande partie à l'utilisation de bactéries différentes. Il souligne le caractère très « souche dépendant » des effets observés. Cela est confirmé par Gomez Zavaglia *et al.* (2000) qui présentent une relation intéressante entre la concentration en acides gras insaturés et la résistance à la congélation de différentes espèces de *Lactobacillus*. Ces auteurs ont observé que, pour les souches contenant une concentration en acides gras insaturés initialement élevée (entre 66 et 70 %), l'augmentation de la concentration en cycC19:0 réduit leur résistance à la congélation. Par contre, les souches ayant un contenu en acides gras insaturés naturellement plus faible (entre 42 et 49 %) présentent une meilleure résistance à la congélation avec l'augmentation de cycC19:0. Étant donné que le changement de la composition en AGM est un phénomène souche dépendant, l'effet d'une telle composition sur les propriétés fonctionnelles des cellules l'est aussi. Ceci explique pourquoi il est difficile de généraliser les résultats obtenus.

Tableau I.6 : effet des conditions environnementales sur la composition en AGM des bactéries lactiques et conséquences sur leurs fonctionnalités

Microorganismes	Conditions environnementales	Changements dans la composition en AGM (par rapport à la condition de référence)	Conséquences sur les fonctionnalités des cellules	Références
<i>Lb. bulgaricus</i>	Ajout d'oléate de sodium dans le milieu de culture	Teneur plus élevée en C18:1 et cycC19:0	- Meilleure résistance à la congélation dans l'azote liquide - Forte corrélation entre la survie des cellules et la concentration en cycC19:0	Smittle <i>et al.</i> (1974)
<i>Lc. lactis</i>	Changement de la température en fin de culture : - 10 °C pendant 2 h - 42 °C pendant 25 min	Choc thermique froid : - Ratio U/S plus élevé Choc thermique chaud : - Augmentation de la concentration en cycC19:0 et réduction du teneur en C18:1	- Meilleure cryotolérance à -60 °C et augmentation de la survie après lyophilisation pour les deux chocs thermiques - Résultats souche dépendants	Broadbent et Lin (1999)
<i>Lb. acidophilus</i>	Température de culture (25, 30, 37 et 40 °C)	- Augmentation de la concentration en C16:0 et C18:2 - Réduction des teneurs en C18:0,10-OH et cycC19:0	Meilleure résistance à la congélation à -20 °C pour les cellules cultivées à 25 °C (67 % au lieu de 16 %)	Fernandez Murga <i>et al.</i> (2000)
<i>S. thermophilus</i>	Ajout d'acide oléique dans le milieu de culture	- Augmentation des teneurs en C18:1 et C20:1 - Diminution du contenu en C14:0, C16:0 et C18:0	Acide oléique montre un effet positif sur la résistance des cellules au stockage sous forme congelée à -20 °C	Béal <i>et al.</i> (2001a)
<i>S. thermophilus</i>	Réduction du pH de culture (5,5 au lieu de 6,5)	Rapport U/S plus élevé	La réduction du pH de la culture induit des cellules plus cryotolérantes	Béal <i>et al.</i> (2001a)
<i>Oenococcus oeni</i>	Culture en présence de 8 % d'éthanol	- Concentrations accrues en C16:0 et cycC19:0 - Diminution des teneurs en C16:1 et C18:1	Meilleure survie des cellules soumises à 14 % d'éthanol pendant 30 min	Chu-Ky (2005)

continue...

Tableau I.6 : ...continue

Microorganismes	Conditions environnementales	Changements dans la composition en AGM (par rapport à la condition de référence)	Conséquences sur les fonctionnalités des cellules	Références
<i>Lb. acidophilus</i>	Epuisement du lactose dans le milieu de culture	Augmentation des teneurs en acides gras insaturés et branchés	La déprivation permet aux cellules d'être plus cryotolérantes à -20 °C	Wang (2005)
<i>Lb. acidophilus</i>	Refroidissement en fin de fermentation	Comportements de cycC19 :0 et U/S décrits dans la figure I.13	Meilleure cryotolérance à -20 °C après refroidissement à 26 °C pendant 8 h	Wang <i>et al.</i> (2005b)
<i>Lb. coryniformis</i>	pH et température de culture : - pH 5,5 et 34 °C (référence) - pH 4,5 et 30 °C (acide et froid) - pH 5,5 et 42 °C (chaud)	Dans les deux conditions testées : - Augmentation de la teneur en C18:1 - Réduction de la teneur en cycC19:0 - Rapport U/S plus élevé	Résistance à la lyophilisation : - Réduite pour la culture à pH 4,5 et 30 °C (38 % de survie au lieu de 67 %) - Egale à la culture de référence pour les cellules cultivées à une température élevée	Schoug <i>et al.</i> (2007)

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que l'analyse des cellules bactériennes, par détermination de leur composition en acides gras membranaires, permet d'obtenir des informations intéressantes pour expliquer leur comportement dans différentes conditions environnementales ou de stress. Les réponses observées traduisent un phénomène d'adaptation des cellules au niveau de leur membrane. On observe que cette adaptation n'est pas une réponse spécifique à un seul type de stress. Comme cela est décrit au tableau I.6, les altérations de la membrane cellulaire à la suite d'un changement de l'environnement (par exemple, température, pH et composition du milieu de culture), ont des conséquences sur la sensibilité des cellules face à d'autres types de stress ultérieurs. Ce phénomène est connu comme une adaptation croisée. Les résultats présentés dans ce paragraphe montrent que les changements au niveau de la concentration des acides gras sont observés essentiellement sur les acides gras C16:0, C16:1, C18:1 et cycC19:0. Ces molécules permettent aux cellules d'avoir une fluidité membranaire plus adaptée à la situation de stress, ce qui leur confère ainsi une meilleure résistance à leur environnement.

1.4.3.2 Effet des conditions environnementales sur le protéome des bactéries lactiques et conséquences sur leurs fonctionnalités

Depuis une dizaine d'années, plusieurs travaux ont été publiés sur le protéome cellulaire des bactéries lactiques. Certaines études sont focalisées sur la caractérisation du protéome de référence des cellules, tandis que d'autres analysent l'effet des conditions environnementales sur la synthèse différentielle des protéines. L'analyse des changements du protéome des cellules, soumises à un stress modéré préalable (stress adaptatif), constitue une autre approche intéressante. Dans ce paragraphe, un bilan des principaux résultats relatifs à ces trois approches est proposé.

Caractérisation du protéome de référence des bactéries lactiques

La synthèse des protéines est essentielle pour la vie et l'activité des cellules et la connaissance de leur protéome est nécessaire pour bien comprendre leur métabolisme. Plusieurs souches et espèces de bactéries lactiques ont été caractérisées au niveau de leur protéome cytoplasmique.

Le protéome de *Streptococcus thermophilus* PB18 a été publié par Perrin *et al.* (2000). 270 spots ont été détectés. La majorité d'entre eux a été localisée dans la région des poids moléculaires (PM) compris entre 30 et 70 kDa et des points isoélectriques (pI) situés entre 4,6 et 5,4.

Selon Champomier-Vergès *et al.* (2002), 56 % du protéome de *Lactococcus lactis* IL1403 est constitué de protéines acides (pI entre 3,4 et 7,0), 33 % de protéines avec un pI

supérieur à 9,0, et moins de 10 % des protéines sont localisées entre les pI 7,0 et 9,0. En étudiant le protéome de cette souche, Guillot *et al.* (2003) ont identifié 238 protéines appartenant au protéome acide (pI entre 4,0 et 7,0), caractérisées par des poids moléculaires situés entre 7 et 133 kDa. En étudiant la région des pI compris entre 4,0 et 7,0, et de façon plus précise, la région des pI situés entre 4,5 et 5,5, Gitton *et al.* (2005) ont identifié 330 protéines chez *Lactococcus lactis* NCDO763. Le nombre plus élevé de protéines identifiées par rapport au travail précédent est lié à une meilleure résolution du gel dans la région des pI entre 4,5 et 5,5, permettant une séparation et une extraction plus précise des protéines.

Le protéome de *Lactobacillus acidophilus* RD758 est constitué par 185 protéines, avec des poids moléculaire situés entre 11,5 et 79,9 kDa et des pI compris entre 4,5 et 6,8 (Wang, 2005). L'auteur observe une majorité des protéines dans la région des poids moléculaires situés entre 35 et 75 kDa et de pI compris entre 4,7 et 6,0. En analysant le protéome de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Gouesbet *et al.* (2002) ont observé la présence de 1190 spots avec des poids moléculaire compris entre 150 et 14 kDa et des pI entre 4,0 et 7,0.

Selon ces différents résultats, il apparaît une certaine diversité des protéines produites, selon le microorganisme analysé, à la fois en nombres et au niveau de leurs caractéristiques. En outre, il est à noter que sur les gels, il est courant d'observer la même protéine dans différents spots, correspondant à des isoformes qui apparaissent à la suite de la préparation des gels (Len *et al.*, 2004).

Une fois le protéome de référence établi et les protéines identifiées, celles-ci sont groupées et classées selon leur fonction et le type de métabolisme dans lequel elles sont impliquées (Budin-Verneuil *et al.*, 2005 ; Gitton *et al.*, 2005 ; Guillot *et al.*, 2003). D'une manière générale, les protéines reconnues appartiennent à la voie de la glycolyse, aux métabolismes du pyruvate, des carbohydrates, des acides aminés, des protéines de stress, des nucléotides, de l'ADN et de l'ARN, ainsi que de l'interconversion d'énergie, de la biosynthèse des vitamines, des acides gras, des précurseurs de peptidoglucanes, etc...

Effet des conditions environnementales sur le protéome des bactéries lactiques

Le protéome des bactéries peut être fortement modifié selon leurs conditions de culture. L'étude des modifications du protéome cellulaire en fonction des conditions environnementales est donc importante pour comprendre les mécanismes de réponse à l'environnement mis en place par les cellules. Cette approche rend possible l'identification des principales voies métaboliques affectées par ces conditions ou par des stress. Selon Champomier-Vergès *et al.* (2002), les protéines dont la synthèse est affectée en conditions de stress peuvent être groupées en trois familles :

- Protéines du métabolisme général : représentant l'ensemble de protéines liées à la production d'énergie (glycolyse) et au maintien du métabolisme de base des cellules (métabolisme azoté, lipidique) ;
- Protéines de stress général : ce sont les protéines qui ne sont pas induites spécifiquement par un stress donné, mais qui apparaissent à la suite de différents types de stress ; elles sont liées au repliement, à la désagrégation et à la dégradation de l'ADN et des protéines endommagées par le stress ;
- Protéines de stress spécifique : elles regroupent les protéines induites spécifiquement dans une condition de stress précise.

Les études actuellement publiées comparent, pour l'essentiel, l'effet sur le protéome cellulaire de l'assimilation de différents substrats, de la phase de croissance des cellules et de leur exposition à un choc thermique chaud, osmotique, acide et haute pression.

Guillot *et al.* (2003) ont analysé le protéome de *Lactococcus lactis* NCDO763, cultivé sur un milieu à base de lactose, par rapport au protéome de cellules cultivées sur glucose. La synthèse de 19 protéines, parmi lesquelles six enzymes liées à l'assimilation du galactose, a été augmentée d'un facteur minimum de 3. Par contre, neuf protéines ont été sous-synthétisées, cinq de ces protéines étant impliquées dans le métabolisme de synthèse de la pyrimidine. Palmfeldt *et al.* (2004) ont étudié le protéome de *Lactococcus lactis* IL1403 cultivé en présence de glucose ou de maltose. Quand les cellules sont cultivées sur glucose, plusieurs enzymes liées au métabolisme du maltose voient leur synthèse diminuer par répression catabolique. Par contre, en présence de maltose, les enzymes du métabolisme des sucres sont sur-synthétisées. De plus, ces auteurs observent une réduction de la synthèse de deux protéines dans les cellules cultivées en absence d'acides aminés : la protéine de transport maltose ABC transporteur et la pyruvate kinase. Ces résultats traduisent bien une adaptation du métabolisme des cellules selon les conditions environnementales auxquelles elles sont soumises.

Rechinger *et al.* (2000) ont étudié l'effet de la phase de croissance, exponentielle ou stationnaire, sur le protéome de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 cultivé dans du milieu MRS. Le volume total de spots ne varie pas entre les deux phases de croissance. Par contre, les résultats montrent que, pour les cellules récoltées en phase stationnaire, seulement 95 protéines sont visualisées, soit beaucoup moins que pour les cellules issues de la phase exponentielle (203 protéines visibles). Ces auteurs ont également analysé les protéines produites tout au début d'une culture dans du lait (30 min après ensemencement). Ils détectent 47 protéines, caractérisées par un faible poids moléculaire (inférieur à 15 kDa) et un faible pI (inférieur à 5,3). La comparaison des trois phases de croissance démontre une augmentation de l'intensité des protéines GroEL et GroES, entre le

début de la fermentation et la phase stationnaire, traduisant ainsi une adaptation des cellules selon les phase.

Kilstrup *et al.* (1997) ont étudié l'effet d'un choc thermique chaud (43 °C) et d'un choc osmotique (2,5 % de NaCl) sur le protéome du *Lactococcus lactis* MG1363 cultivé à 30 °C dans un milieu chimiquement défini. Ils visualisent plus de 400 protéines, parmi lesquelles 17 voient leur synthèse augmenter après le choc thermique. Celles dont la synthèse est la plus accrue ont été identifiées comme GroES, GroEL et DnaK, protéines appartenant au groupe des « *heat shock proteins* » (HSP). La seule protéine sur-synthétisée après le choc osmotique est également une HSP. Ces protéines ont comme fonction d'aider au repliement et/ou à la dégradation des protéines dénaturées à la suite du choc thermique.

Wang (2005) a analysé l'effet de la température de culture sur le protéome de *Lb. acidophilus* RD758. En comparant les protéines des cellules cultivées à 42 °C et à 37 °C, il montre que, pour cette souche, la température de culture ne présente pas un fort effet sur le protéome. En effet, seulement trois protéines ont été sur-synthétisées (dont deux identifiées comme la triose-phosphate isomérase et le facteur d'élongation Tu) et une protéine sous-synthétisée (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) pour la température la plus élevée.

Lim *et al.* (2000) ont comparé le protéome de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* VI1010 cultivé à pH 6 et 4,75 et ont observé que la synthèse de trois HSP (GroES, GroEL et DnaK) est augmentée à pH 4,75. Len *et al.* (2004) ont analysé l'effet du pH de la culture (pH 7 ou 5) sur le protéome de la bactérie *Streptococcus mutans* LT11. Parmi les 199 spots présentant un changement d'intensité, l'identification de 167 protéines a été possible et 61 protéines ont été associées à la réponse adaptative des cellules. D'une manière générale, les cellules cultivées à pH acide voient une augmentation de la synthèse des protéines de leur métabolisme énergétique, de la transcription de l'ADN et de la traduction de l'ARN, de la synthèse des protéines ribosomales et des protéines de stress (DnaK et GroEL). Frees *et al.* (2003) ont étudié l'effet d'une réduction du pH à la fin d'une culture conduite à pH optimal sur la synthèse de protéines de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. La synthèse de 23 protéines a été accrue après une diminution du pH de 6,8 à 5,5 ou 4,5. Il s'agit de protéines de stress (GroES, GroEL et DnaK), de protéines du complexe Clp (ClpE-ATPase), ainsi que de protéines antérieurement identifiées par Kilstrup *et al.* (1997) comme caractéristiques de l'adaptation aux chocs thermique chaud ou osmotique (Hsp14, Hsp17, Hsp26 et Ssp21). Plus récemment, Wang (2005) a analysé l'effet du pH de la culture sur le protéome de *Lb. acidophilus* RD758. La synthèse de trois protéines est augmentée quand les cellules sont cultivées à pH 5,0 au lieu de 6,0, tandis que trois protéines sont sous-synthétisées et sept protéines sont absentes en condition acide. En analysant le protéome de cellules cultivées à un pH encore plus acide (pH 4,5), Wang (2005)

observe que huit protéines sont sur-synthétisées, six sont sous-synthétisées et neuf protéines sont complètement absentes dans le protéome des cellules cultivées à pH 4,5. Ces résultats montrent l'importance de l'effet du pH de la culture sur le protéome cellulaire.

Récemment, intéressé par les réponses spécifiques des microorganismes aux traitements à haute pression, Hörmann *et al.* (2006) ont comparé le protéome de *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451^T soumis à une pression de 80 MPa (30 °C, 1 h) avec celui des cellules soumises à d'autres types de stress (12,5 °C ou 43 °C ou 1,9 % NaCl ou pH 3,7). 16 protéines ont eu leur synthèse affectée à la suite du traitement à haute pression : neuf protéines sont sur-synthétisées tandis que la synthèse de sept protéines est réduite de 50 %. Ce comportement est similaire à celui des cellules soumises aux stress thermique froid, chaud et osmotique. De plus, la synthèse de la protéine Clp protease a été modifiée seulement pour les cellules soumises au stress haute pression sans être affectée par les autres stress analysés. Ce résultat indique que cette protéine peut être considérée comme une réponse spécifique au stress à haute pression.

Le changement du protéome des cellules, face à différentes conditions environnementales, se produit selon des cinétiques différentes. Par exemple, Kilstrup *et al.* (1997) ont montré que, suite à un choc thermique chaud, la synthèse des HSP est fortement induite (entre 35 et 45 fois par rapport aux cellules de référence) dans les dix premières minutes de stress, puis leur synthèse se réduit. De façon différente, les protéines sur-synthétisées après 15 à 25 min ont un taux d'induction inférieur (entre 2 et 18 fois) mais leur synthèse est maintenue constante pendant 40 min de stress. Lim *et al.* (2000) ont également étudié la cinétique de synthèse des HSP. La synthèse de ces protéines, suite à un choc acide, est élevée pendant les 15 premières minutes (facteur d'induction compris entre 2,5 et 7), et se poursuit pendant les 15 à 30 min suivantes (facteur d'induction compris entre 5,5 et 22). Ces résultats indiquent que les protéines dites de stress thermique chaud sont aussi responsables de l'adaptation des cellules à d'autres conditions de stress, mais selon une cinétique de synthèse différente.

Relation entre le protéome des bactéries lactiques et leur résistance à différents stress

L'importance de la synthèse de protéines pour modifier la résistance des cellules à une situation de stress a été démontrée par Broadbent et Lin (1999) et De Angelis *et al.* (2001 ; 2004). Ces auteurs ont étudié l'effet de l'addition de certaines substances responsables d'une inhibition de la synthèse des protéines (érythromycine, chloramphénicol) sur la survie de bactéries lactiques soumises, respectivement, à une adaptation thermique froide ou chaude et à une adaptation acide. Les résultats montrent que l'effet positif des adaptations sur la résistance des cellules disparaît après traitement par les antibiotiques.

Ces résultats confirment que la synthèse des protéines est bien un des mécanismes développés par les cellules pour mieux s'adapter à des conditions de stress.

Des changements dans la synthèse protéique, comme réponse à une situation de stress, peuvent conduire à une meilleure adaptation des cellules à ces conditions, et donc à un meilleur maintien de leurs propriétés technologiques face aux conditions adverses. Comprendre ces changements peut donner des informations intéressantes pour prévoir les conditions opératoires à mettre en œuvre, afin d'obtenir des cellules avec des caractéristiques technologiques données.

Le tableau I.7 résume les résultats des principaux travaux publiés sur « l'adaptation homologue ». Dans ce cas, le protéome est utilisé pour expliquer l'effet de l'application d'un stress modéré ou d'une adaptation permettant d'augmenter la résistance des cellules au même type de stress. D'autres études ont porté sur des adaptations croisées ou hétérologues. Dans ce cas, l'adaptation à un type de stress est utilisée pour augmenter la résistance des cellules à un autre stress. Les principaux résultats sont présentés au tableau I.8. Ces deux tableaux ne sont pas exhaustifs mais ils regroupent les travaux les plus pertinents réalisés dans leur domaine respectif.

Toutes ces études, portant sur l'analyse du protéome des cellules en relation avec leur comportement, permettent de conclure que cette technique donne des informations intéressantes sur le métabolisme des cellules, mais aussi sur les mécanismes qu'elles utilisent pour s'adapter face à des conditions adverses. Dans certaines situations, il est possible d'identifier des réponses spécifiques à un stress donné, mais les réponses les plus souvent décrites ne sont pas « stress spécifique ». C'est notamment le cas des protéines initialement identifiées comme étant spécifiques au stress thermique chaud (HSP) qui sont largement responsables des réponses de cellules à d'autres types de stress.

Tableau I.7 : différentes conditions d'adaptation homologue utilisées pour améliorer la résistance des bactéries lactiques à un stress et conséquences sur le protéome cellulaire.

Microorganismes	Conditions		Résultats de l'adaptation		Références
	d'adaptation	de stress	sur la résistance au stress	sur le protéome	
<i>Lc. lactis</i>	pH 5,5, 30 min	Choc acide (pH 3,9, 48 h)	Meilleure survie au choc acide	33 protéines sur-synthétisées (DnaK, GroEL, etc.) mais réponse indépendante de la synthèse de protéines	Hartke <i>et al.</i> (1996)
<i>Lb. bulgaricus</i>	pH 4,75, 30 min	Choc acide (pH 3,6, 30 min)	Survie au choc acide 250 fois plus importante pour les cellules adaptées	30 protéines sur-synthétisées dont GroES, GroEL et DnaK Synthèse nécessaire pour la résistance acide des cellules	Lim <i>et al.</i> (2001)
<i>Lb. bulgaricus</i>	50 °C, 30 min	Choc thermique chaud (65 °C, 10 min)	Meilleure survie au choc thermique (1 à 3 log supérieure, selon la souche)	Synthèse plus importante des protéines GroEL et DnaK	Gouesbet <i>et al.</i> (2001) Gouesbet <i>et al.</i> (2002)
<i>Lb. acidophilus</i>	pH 5,0, 60 min (milieu synthétique ou complexe)	Choc acide (pH 3,0)	Meilleure tolérance au choc acide en milieu complexe	Induction de la synthèse de protéines HSP (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL)	Lorca <i>et al.</i> (2002)
<i>Lb. plantarum</i>	42 °C, 1 h phase exponentielle ou stationnaire	Pasteurisation (72 °C, 90 s)	Augmentation de la thermotolérance après adaptation Pas de différence entre phases exponentielle et stationnaire	Induction différente selon la phase de croissance (31 protéines en phase exponentielle et 18 en phase stationnaire) 9 protéines identifiées	De Angelis <i>et al.</i> (2004)
<i>Lb. bulgaricus</i>	pH 4,75, 30 min	Choc acide (pH 3,6, 30 min)	Résistance variable selon la souche Augmentation de la résistance de 5 à 200 fois	50 protéines sur-synthétisées 21 identifiées (HSP, ATPaseF ₀ F ₁ , protéines du métabolisme général)	Guillouard <i>et al.</i> (2004)
<i>Lb. acidophilus</i>	Refroidissement (15 °C à 33,8 °C pendant 0 – 8 h)	Congélation et stockage à -20 °C	Meilleure cryotolérance après adaptation à 26 °C pendant 8 h	4 protéines sur-synthétisées 1 protéine sous-synthétisée	Wang <i>et al.</i> (2005b)

Tableau I.8 : différentes conditions d'adaptation hétérologue utilisées pour améliorer la résistance des bactéries lactiques à un stress et conséquences sur le protéome cellulaire.

Microorganismes	Conditions		Résultats de l'adaptation		Références
	d'adaptation	de stress	sur la résistance au stress	sur le protéome	
<i>Lc. lactis</i>	42 °C, 25 min 10 °C, 1 - 4 h	Congélation à -60 °C, 24 h Lyophilisation	Meilleure survie après 25 min à 42 °C ou 2-3 h à 10 °C	8 Csp (<i>cold shock protein</i>) et 12 protéines HSP (DnaK, GroEL, etc.) sur- synthétisés	Broadbent et Lin (1999)
<i>Lb. acidophilus</i>	Cultures à 25 °C ou 37 °C Phase exponentielle et stationnaire	pH 3,0, 60 min Congélation (-20 °C, 24 h) 20 % éthanol, 30 min NaCl 3M, 24 h H ₂ O ₂ 10mM, 60 min 60 °C, 60 min Epuisement du glucose	Réduction de la température de culture induit une résistance accrue à tous les stress	3 protéines sur-synthétisées a 25 °C 1 protéine sur-synthétisée en phase stationnaire 1 protéine sur-synthétisée après épuisement du glucose Cinétique de synthèse des protéines varie selon la phase de croissance	Lorca et Font de Valdez (1999)
<i>St. mutans</i>	pH 5,5, 2 h 42 °C, 2 h NaCl 0,2 M, 2 h H ₂ O ₂ 2 mM, 2 h stress nutritionnel, 2 h	pH 3,5, 2 h	Meilleure survie au choc acide après adaptation à pH 5,5, NaCl et stress nutritionnel	Identification de protéines spécifiques à chaque type d'adaptation oxydation = 15 protéines acide = 25 protéines stress nutritionnel = 11 protéines osmotique = 10 protéines thermique = 6 protéines	Svensäter <i>et al.</i> (2000)
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	pH 5,0, 1 h	pH 3,4, 0-10 h Croissance à 10 °C Croissance avec 5 % NaCl	Effet positif sur la résistance au choc acide, sur la croissance à 10 °C et en présence de NaCl	Induction de la synthèse de GrpE	De Angelis <i>et al.</i> (2001)

continue...

Tableau I.8 : ...continue

Microorganismes	Conditions		Résultats de l'adaptation		Références
	d'adaptation	de stress	sur la résistance au stress	sur le protéome	
<i>Lb. acidophilus</i>	pH régulé (6,0) pH libre (jusqu'à pH 4,5)	pH 3,0, 60 min Congélation (-20 °C, 24 h) 20 % éthanol, 30 min NaCl 3M , 24 h H ₂ O ₂ 10mM, 60 min 60 °C, 60 min Lyophilisation	Meilleure résistance aux chocs acide, congélation, éthanol, oxydatif et lyophilisation après culture à pH libre	7 protéines sur-synthétisées, liées à l'entrée des cellules en phase stationnaire (indépendamment du contrôle de pH) 9 protéines sur-synthétisées, liées à l'acidification dû à la conduite de la culture à pH libre	Lorca et Font de Valdez (2001)
<i>Lb. rhamnosus</i>	50 °C, 30 min (phase exponentielle et stationnaire) NaCl 0,6 M	Séchage convectif suivi par stockage à 30 °C	Meilleure résistance des cellules adaptées à 50 °C en phase stationnaire et au choc osmotique	Synthèse différente selon la phase de croissance et le type de stress appliqué Identification de protéines liées au stress thermique et à la glycolyse	Prasad <i>et al.</i> (2003)
<i>Lb. acidophilus</i>	Culture à pH 5,0 et 30 °C (au lieu de pH 6,0 et 37 °C)	Congélation et stockage à -20 °C	Meilleur maintien de l'activité acidifiante des cellules pendant la congélation et le stockage sous forme congelée à pH 5,0	10 protéines nouvellement synthétisées après adaptation 2 protéines sur-synthétisées 1 protéine sous-synthétisée	Wang (2005)
<i>Lb. acidophilus</i>	Epuisement du lactose dans le milieu de culture	Congélation et stockage à -20 °C	Meilleur maintien de l'activité acidifiante des cellules pendant la congélation et le stockage sous forme congelée après déprivation	11 protéines nouvellement synthétisées après adaptation 9 protéines complètement absentes après adaptation 1 protéine sur-synthétisée 10 protéines sous-synthétisées	Wang (2005)

I.5 Conclusion générale

Un des principaux enjeux de l'industrie productrice de ferments lactiques consiste à obtenir des concentrés bactériens de qualité. Cela signifie des ferments avec une concentration cellulaire élevée, hautement viables et actifs à l'issue de leur procédé de production et de stabilisation, et capables de maintenir leurs caractéristiques technologiques jusqu'au moment de leur utilisation.

Comme cela a été décrit au paragraphe I.3.2, plusieurs facteurs liés à la production de ces concentrés bactériens sont responsables de la dégradation de leur viabilité et de leur activité technologique. De nombreux travaux ont été réalisés afin de minimiser ces dégradations et de comprendre les mécanismes qui en sont responsables (paragraphe I.4), en étudiant notamment les acides gras membranaires et le protéome cytoplasmique. De plus, la mise en place de procédures visant à adapter les cellules, soit de façon homologue, soit de façon hétérologue, constitue une approche particulièrement intéressante. Cependant, si plusieurs stratégies ont déjà été proposées pour limiter ces phénomènes de dégradation (conditions de fermentation, de cryoprotection, de congélation,...), les conditions de récolte et de concentration sont encore peu renseignées.

Dans ce contexte, ce travail portera plus particulièrement sur l'étude de l'effet d'adaptations, réalisées lors de la récolte et de la concentration des cellules, sur l'activité acidifiante, la survie et la cryotolérance d'une souche de bactérie lactique, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. La mise en place d'une acidification en fin de fermentation, ainsi que l'étude des conditions de centrifugation et de microfiltration lors de la concentration permettront de définir des conditions favorables à l'expression des fonctionnalités cellulaires. Enfin, l'analyse des réponses physiologiques, par le dosage des acides gras membranaires et la caractérisation du protéome cytoplasmique contribueront à expliquer les phénomènes observés.

Chapitre II - Matériel et Méthodes

II.1 Production de ferments lactiques concentrés

II.1.1 Microorganisme utilisé

La souche de bactérie lactique utilisée au cours de cette étude est *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 (*Lb. bulgaricus*, INRA, Thiverval-Grignon, France). Les échantillons pour inoculation sont stockés sous forme congelée à -80 °C dans du MRS additionné de 12,5 % de glycérol.

Avant inoculation, les cellules sont précultivées deux fois. Pour la première préculture, 5 mL de MRS liquide (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) sont inoculés avec 10 µL de l'échantillon congelé, puis incubés à 42 °C pendant 24 h. A la suite, 100 µL de cette préculture sont transférés dans 5 mL de MRS liquide, lesquels sont incubés à 42 °C pendant 8 h avant l'ensemencement du fermenteur.

II.1.2 Milieu de culture

La base du milieu de culture utilisé pour les fermentations est composée de 60 g.L⁻¹ de poudre de lactosérum doux (Eurosérum, Port-sur-Saône, France). Après reconstitution, le pH du lactosérum est ajusté à 5 avec H₂SO₄ 50 % et traité thermiquement (110 °C, 20 min) afin de précipiter les protéines sériques. Le précipité est séparé par centrifugation (17 000 g, 20 min) et le surnageant est filtré sur papier filtre de 0,45 µm de rétention. Après filtration, le milieu est complété avec 20 g.L⁻¹ de lactose (Prolabo, Briare-le-Canal, France) et 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure (Organotechnie, La Courneuve, France). Le milieu complété est stérilisé dans le fermenteur à 110 °C pendant 20 min.

II.1.3 Fermentation

II.1.3.1 Equipements et conditions de culture

Les fermentations sont réalisées en cultures pures discontinues, dans un bioréacteur de 2,2 L (LSL-Biolafitte, St Germain-en-Laye, France) dont 1,8 L utile (figure II.1). Le fermenteur est équipé avec un axe d'agitation tournant à 100 tours/min, d'une sonde de pH stérilisable (Ingold, Paris, France) et d'une sonde de conductivité électrique reliée à un transmetteur Mycom CLM 151 (Endress Hauser, Huningue, France).

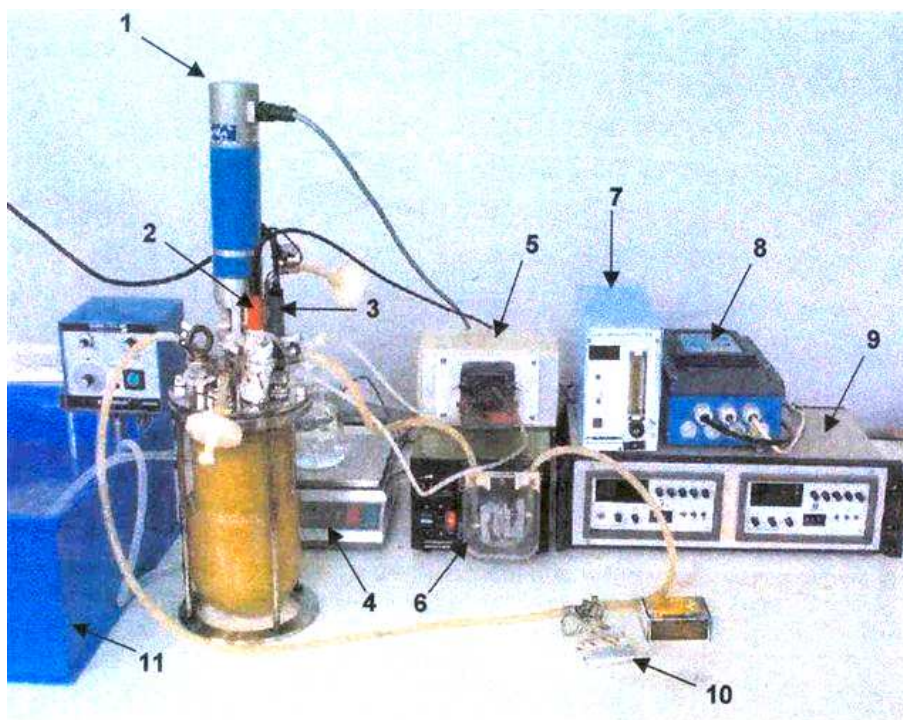


Figure II.1 : bioréacteur de 2,2 L utilisé lors des cultures de *Lb. bulgaricus* CFL1

- 1 : moteur d'agitation
- 2 : sonde de pH
- 3 : sonde de conductivité électrique
- 4 : balance permettant de mesurer la masse de soude ajoutée
- 5 : pompe péristaltique servant à ajouter la soude
- 6 : pompe péristaltique servant au soutirage de milieu lors des prélèvements
- 7 : variateur de vitesse d'agitation
- 8 : transmetteur de conductivité électrique
- 9 : régulateur du pH
- 10 : système de prélèvement stérile
- 11 : bain-marie thermostaté

Au cours de la fermentation, la température est réglée à $42 \pm 0,5$ °C par circulation d'eau chaude dans la double enveloppe du bioréacteur. Le pH est régulé à 6 par ajout d'une solution de soude (NaOH 6 %) (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) à l'aide d'une pompe péristaltique commandée par un régulateur Demca (3B101, Promatex, Quinssaines, France).

II.1.3.2 Suivi et contrôle des fermentations

Le suivi des fermentations est effectué par la pesée en continu de la masse de soude utilisée et par la mesure de l'évolution de la conductivité électrique du milieu.

La soude nécessaire pour la régulation du pH (mNaOH, en g) est placée sur une balance électrique. Grâce au logiciel WCinac-Indus (GMPA, INRA, Grignon) les données sont enregistrées et visualisées sur ordinateur en temps réel (figure II.2). Avec les données de diminution de la masse de soude due à sa consommation pour la régulation du pH, le logiciel calcule trois descripteurs caractérisant le profil des fermentations :

- V_{mNaOH} : vitesse maximale de consommation de soude (en $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) ;
- t_{mNaOH} : temps pour atteindre V_{mNaOH} (en min) ;
- d_{NaOH} : consommation de soude correspondant à V_{mNaOH} (en g).

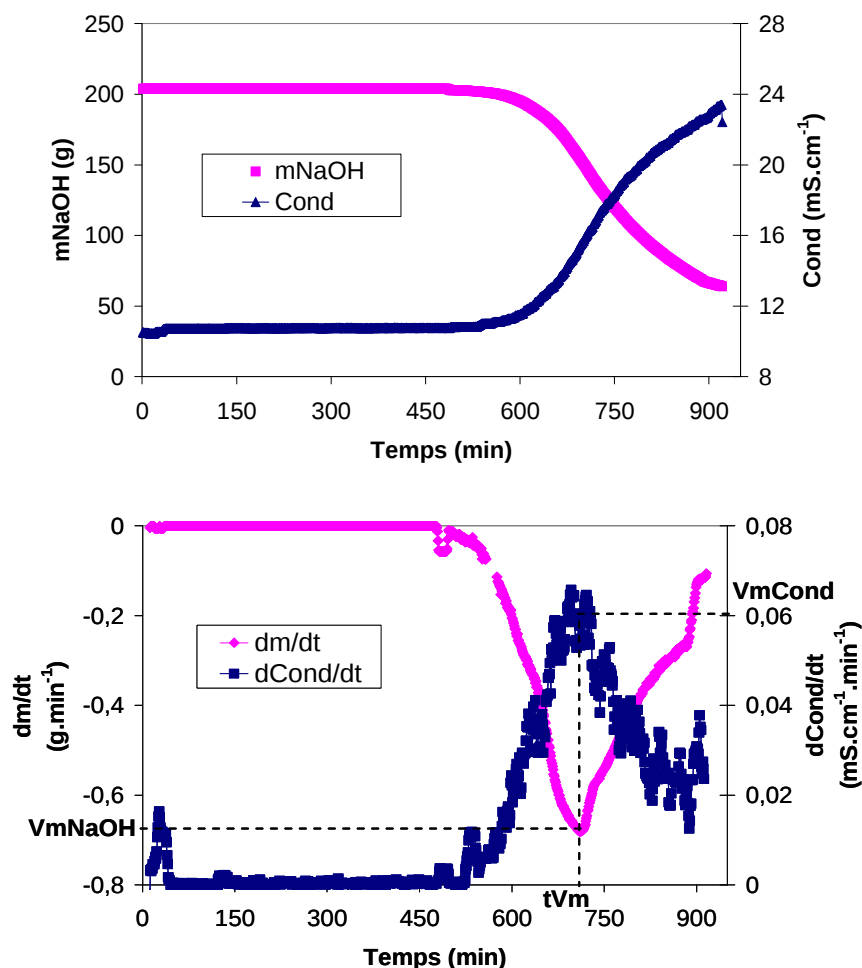


Figure II. 2 : évolution de la consommation de soude, de la conductivité électrique et des vitesses correspondantes en fonction du temps de fermentation, de *Lb. bulgaricus* CFL1 à 42 °C et pH 6.

m_{NaOH} : masse de soude consommé (en g)

$Cond$: conductivité électrique du milieu (en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$)

dm/dt : vitesse de consommation de soude (en $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$)

V_{mNaOH} : vitesse maximale de consommation de soude (en $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$)

$dCond/dt$: vitesse de variation de la conductivité électrique (en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

V_{mCond} : vitesse maximale de variation de la conductivité électrique (en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

La conductivité électrique du milieu de culture ($Cond$, en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) évolue en fonction de la concentration en lactate de sodium, elle-même fonction de la soude ajoutée pour neutraliser l'acide lactique produit. Ainsi, la mesure de conductivité électrique renseigne directement sur la concentration en lactate, indépendamment du volume du réacteur. Avec les données de l'évolution de la conductivité du milieu, le logiciel fournit trois descripteurs qui caractérisent le profil des fermentations :

- VmCond : vitesse maximale de variation de la conductivité électrique (en $\text{mS.cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ;
- tmCond : temps pour atteindre VmCond (en min) ;
- dCond : variation de conductivité à VmCond (en mS.cm^{-1}).

II.1.3.3 Arrêt des fermentations

Afin d'obtenir des cellules dans un état physiologique similaire, les fermentations sont arrêtées 180 min après la fin de la phase exponentielle de croissance, soit en phase stationnaire. L'entrée en phase stationnaire est déterminée par l'instant où les vitesses de consommation de soude (VmNaOH) et de variation de conductivité électrique (VmCond) sont maximales, en valeur absolue.

II.1.3.4 Refroidissement et récolte

En fin de culture, la suspension cellulaire est refroidie à 15 °C par immersion du fermenteur dans l'eau glacée pendant environ 15 min, puis récoltée stérilement. La régulation du pH est maintenue pendant le refroidissement. Au cours de certains plans d'expériences, les cellules sont soumises à une acidification avant l'étape de refroidissement (voir paragraphe II.6.2).

II.1.4 Concentration des suspensions bactériennes

II.1.4.1 Concentration par centrifugation

Le milieu récolté est centrifugé dans une centrifugeuse Beckman (J2-21M/E, Villepinte, France) pendant 30 min à 17 000 g et 4 °C. Le culot et le surnageant sont séparés puis remélangés dans des proportions permettant d'obtenir le facteur de concentration désiré. Pour les trois plans d'expériences, des facteurs de concentration massique différents ont été retenus (tableau II.1). Les conditions de centrifugation ont, en outre, varié lors du plan d'expériences n°2 (voir paragraphe II.6.3).

Tableau II.1 : facteurs de concentration massique retenus selon les plans d'expériences

Plan d'expériences	Facteur de concentration
n°1	15
n°2	5
n°3	2,5

II.1.4.2 Concentration par microfiltration

Dans le cadre du plan d'expériences n°3, les cellules sont concentrées par microfiltration tangentielle. Une description détaillée du module de microfiltration, y compris les protocoles de nettoyage et désinfection, est présentée au paragraphe II.3.

La microfiltration des suspensions bactériennes est effectuée en mode batch avec recirculation du rétentat, jusqu'à obtention d'un facteur de concentration massique de 2,5. Les paramètres opératoires (vitesse tangentielle et pression transmembranaire) sont précisés au paragraphe II.6.4. Pour minimiser le réchauffement de la suspension bactérienne du à son passage à travers la pompe et aux frottements dans le système, la température est maintenue entre 15 °C et 20 °C par circulation d'eau glacée dans la double enveloppe de la cuve d'alimentation et de l'échangeur de chaleur du système.

II.1.5 Stabilisation

La suspension cellulaire concentrée et homogénéisée est répartie dans des cryotubes (500 µL par tube). Afin d'accélérer les phénomènes de dégradation de viabilité et d'activité acidifiante, aucun cryoprotecteur n'est ajouté à ce niveau.

Les échantillons sont congelés directement à -20 °C, à une vitesse de congélation de l'ordre de 1 °C.min⁻¹ (Fonseca, 2001). Ils sont conservés à une température de stockage de -20 °C, pendant 1 à 180 jours. Conserver les ferments à -20 °C permet d'accélérer les phénomènes de détérioration, qui seraient plus lents à des températures inférieures (Fonseca *et al.*, 2001).

Une partie de la suspension cellulaire est, par ailleurs, conservée à -80 °C pour les analyses protéomiques et les dosages des acides gras membranaires.

Avant leur utilisation, les échantillons sont décongelés à 30 °C pendant 5 min dans un bain-marie thermostaté.

II.1.6 Techniques analytiques

II.1.6.1 Détermination de la concentration bactérienne

La concentration bactérienne est déterminée par mesure de cultivabilité sur milieu MRS gélosé (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) (70,3 g.L⁻¹) après ensemencement en masse. Les boîtes sont incubées sous atmosphère anaérobie (GENbox anaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) à 42 °C pendant 72 h. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par unité de volume (UFC.mL⁻¹) et correspondent à la moyenne géométrique d'au moins trois comptages.

Les mesures sont réalisées en début et fin de fermentation, ainsi que lors de chaque analyse d'activité acidifiante.

II.1.6.2 Analyse des constituants du milieu

Les concentrations en lactose, galactose, glucose et acide lactique sont déterminées sur des échantillons prélevés au début et à la fin de la fermentation, par chromatographie liquide de haute performance (HPLC).

Les échantillons sont dilués deux fois dans de l'acide trichloro-acétique (TCA 24 %, Prolabo, Paris, France) afin de précipiter les protéines. Ils sont centrifugés à 14 000 *g* pendant 30 min. Les surnageants sont ensuite filtrés sur une membrane de 0,22 µm de diamètre de pore (Sartorius, Goettingen, Allemagne) et conservés à 4 °C.

Juste avant l'analyse, les filtrats sont dilués 5 fois dans de l'eau Milli-Q®. De l'acide propionique 1 % est utilisé comme étalon interne. Un volume de 20 µL d'échantillon est injecté (injecteur automatique Waters 717 plus, Millipore, Molsheim, France) sur une colonne échangeuse de cations (colonne Aminex Ion Exclusion HPX-87 H 300×7,8 mm, Biorad, Richmond, USA). La phase mobile (H₂SO₄ 0,005 M) circule à un débit de 0,6 mL.min⁻¹ (pompe LC-6A, Shimadzu, Courtaboeuf) et la colonne est maintenue à 35 °C. Les composés sont détectés par réfractométrie (réfractomètre différentiel Waters 410, Millipore) et les résultats enregistrés et traités par le logiciel Millenium (Waters Associates). Les composés sont identifiés par leur temps de rétention et les concentrations sont directement calculées à partir de l'étalon interne et d'une solution de référence contenant du lactose, du galactose, du glucose et de l'acide lactique à 5 g.L⁻¹. Les résultats sont exprimés en g.L⁻¹.

II.2 Mesure de l'activité acidifiante

L'activité acidifiante des ferments est mesurée, à différents stades de leur production, à l'aide du système CINAC, développé au LGMPA (Corrieu *et al.*, 1988). Les mesures permettent de quantifier la perte d'activité acidifiante lors de la congélation et au cours du stockage (Fonseca *et al.*, 2000).

II.2.1 Système expérimental

Le système CINAC utilisé dans ce travail est constitué de quatre parties fonctionnelles (figure II.3) :

- un bain thermostaté régulé à ± 0,05 °C ;
- 30 sondes de pH (Ingold, Paris, France) et 2 sondes de température (Prosensor, Armenvillers, France) ;

- une interface électronique constituée de quatre cartes. Une carte analogique, composée de 32 transmetteurs (développée au LGMPA et fabriquée par Ysebeart, Frépillon, France), assure la mise en forme du signal de chaque sonde (entre 0 et 10 V). Trois autres cartes numériques, de type OPTO 22 (Tekelec Airtronic, Sèvres, France), permettent la conversion numérique/analogique, la gestion des actionneurs pour la régulation, la communication entre l'ordinateur et les autres cartes ;
- un ordinateur relié à l'interface et fonctionnant avec le logiciel WCinac.

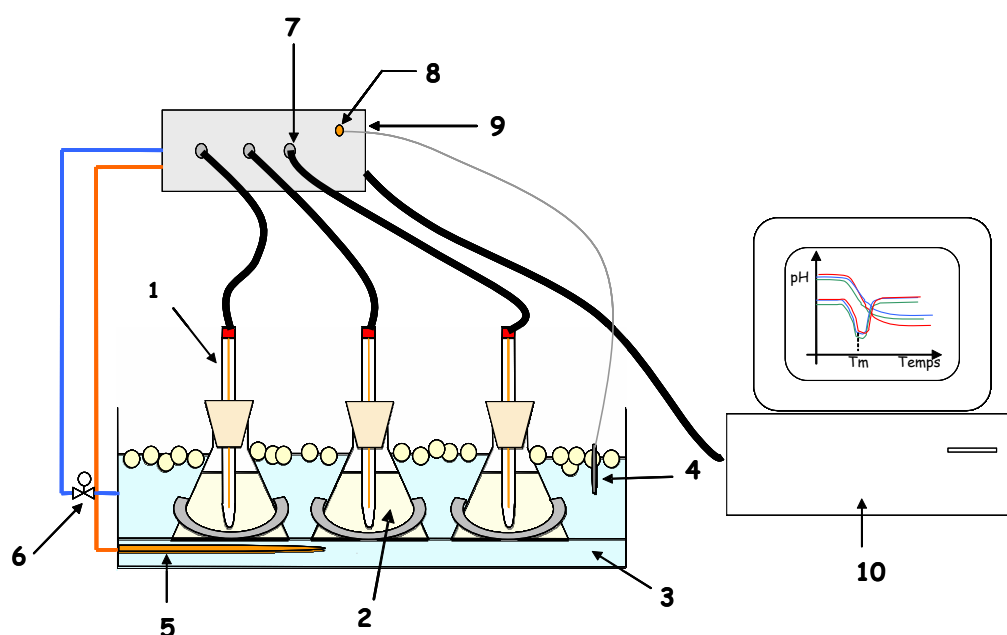


Figure II.3 : schéma simplifié du dispositif CINAC (d'après Wang, 2005)

- 1 : électrode de pH
- 2 : fiole contenant du lait ensemencé
- 3 : bain-marie thermostaté
- 4 : sonde de température
- 5 : résistance chauffante
- 6 : électrovanne d'admission d'eau froide
- 7 : transmetteur de pH
- 8 : transmetteur de température
- 9 : interface électronique
- 10 : micro-ordinateur

Le logiciel WCinac effectue simultanément, sur toutes les voies, l'étalonnage des sondes de pH en deux points, l'acquisition et le stockage des données de pH selon une période prédéfinie, la régulation de la température du bain thermostaté, le calcul en temps réel de la vitesse d'acidification et des descripteurs, ainsi que les représentations graphiques. Il réalise aussi la conversion des données sous des formats compatibles avec d'autres logiciels.

II.2.2 Protocole de mesure

Du lait écrémé, reconstitué (100 g.L⁻¹) à partir de lait en poudre (EPI Ingrédients, Ancenis, France) est utilisé comme milieu de culture pour la mesure de l'activité acidifiante. Le lait est réparti en fioles de 150 mL puis stérilisé pendant 20 min à 110 °C. Il est stocké à 4 °C avant son utilisation, au plus tard 72 h après la stérilisation.

Chaque fiole contenant 150 mL de lait est placée 30 min avant utilisation dans le bain thermostaté pour une mise à la température d'incubation. L'activité acidifiante est mesurée dans du lait inoculé avec un volume fixé de bactéries (100 µL) et la culture se déroule à 42 °C. Pour la mesure d'activité acidifiante des échantillons avant l'étape de concentration (plans d'expériences n°2 et 3), le facteur de concentration massique est pris en compte pour déterminer le volume d'échantillon à inoculer dans chaque fiole.

L'acquisition des données de pH est réalisée toutes les 3 min, pendant environ 24 h, jusqu'à un pH inférieur à 4. Tous les essais sont triplés. Le descripteur d'activité acidifiante retenu est le temps nécessaire pour atteindre pH 5,8 (tpH5,8, en min).

II.2.3 Mesure de l'activité acidifiante spécifique

II.2.3.1 Définition

Comme décrit auparavant par Béal et Corrieu (1994), les descripteurs tpHi sont fortement dépendants de la concentration cellulaire. Dans ce contexte, pour éliminer l'influence du facteur concentration cellulaire lors de la discussion des résultats, nous avons défini un descripteur caractérisant l'activité acidifiante spécifique des cellules. Il est calculé comme le rapport entre tpH5,8 et le logarithme de la concentration cellulaire de l'échantillon (en min.(log(UFC.mL⁻¹))⁻¹).

$$t_{spe} = \frac{tpH_{5,8}}{\log(UFC.mL^{-1})} \quad (\text{éq. II.1})$$

Dans cette étude, ce descripteur est déterminé avant concentration, après concentration mais avant congélation, après congélation et au cours du stockage sous forme congelée. Les résultats obtenus permettent de calculer les pertes d'activité acidifiante spécifique pendant les étapes de concentration, congélation et stockage.

II.2.3.2 Perte d'activité acidifiante spécifique au cours de l'étape de concentration

Pour les plans d'expériences n°2 et 3, la perte d'activité acidifiante spécifique pendant l'étape de concentration (d_{tp_{spe}}, en min.(log(UFC.mL⁻¹))⁻¹) est un paramètre

important pour comparer les différentes conditions de concentration étudiées. Pour quantifier cette perte, l'activité acidifiante spécifique est mesurée :

- avant concentration et en considérant le facteur de concentration massique pour déterminer le volume d'échantillon à inoculer. Le paramètre obtenu est appelée tac_{spe} (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$) ;
- après concentration par centrifugation ou microfiltration, et avant congélation. La variable obtenue à cette étape est appelée tc_{spe} (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$).

Avec ces deux mesures, dtc_{spe} est obtenu par simple différence :

$$dtc_{spe} = tc_{spe} - tac_{spe} \quad (\text{éq. II.2})$$

Quand tc_{spe} n'est pas significativement différent de tac_{spe} , alors $dtc_{spe} = 0$ et il n'y a pas de perte d'activité pendant la concentration. A l'opposé, plus la valeur de dtc_{spe} est élevée, plus la perte d'activité acidifiante spécifique pendant la concentration est grande.

II.2.3.3 Perte de l'activité acidifiante spécifique au cours de la congélation

La perte d'activité acidifiante spécifique pendant l'étape de congélation (dtf_{spe} , en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$) est un des paramètres permettant de caractériser la cryotolérance des cellules. Elle est calculée à partir de l'activité acidifiante spécifique de la suspension bactérienne après congélation, tf_{spe} (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$), par différence avec l'activité acidifiante spécifique mesurée avant congélation (tc_{spe}) :

$$dtf_{spe} = tf_{spe} - tc_{spe} \quad (\text{éq. II.3})$$

La variable dtf_{spe} prend toujours une valeur supérieure ou égale à zéro. Quand tf_{spe} n'est pas significativement différent de tc_{spe} , alors $dtf_{spe} = 0$ et il n'y a pas de perte d'activité pendant la congélation.

II.2.3.4 Perte de l'activité acidifiante spécifique au cours du stockage à -20 °C

Fonseca *et al.* (2000) proposent une méthode pour quantifier la perte d'activité acidifiante au cours du stockage des bactéries lactiques. Cette méthode est appliquée ici pour déterminer le descripteur caractérisant la vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique des cellules au cours de leur stockage (k_{spe} , en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}.\text{j}^{-1}$). En effet, la perte d'activité acidifiante spécifique au cours du stockage à -20 °C est représentée par une augmentation linéaire de t_{spe} en fonction du temps de stockage (figure II.4).

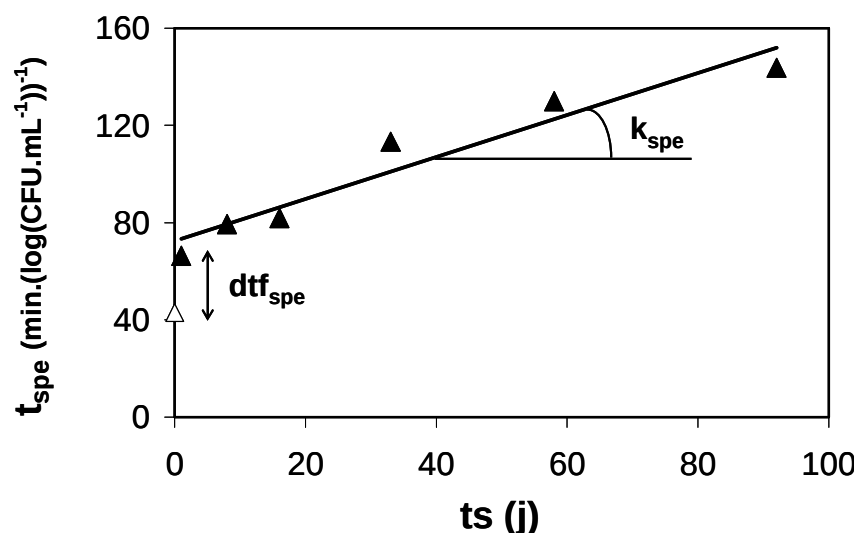


Figure II.4 : schéma de la méthode de quantification de la perte d'activité acidifiante spécifique des ferments lactiques pendant la congélation et au cours du stockage à l'état congelé de *Lb. bulgaricus* CFL1

dtf_{spe} : perte d'activité acidifiante spécifique pendant l'étape de congélation

k_{spe} : la vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique des cellules au cours de leur stockage

t_{spe} : activité acidifiante spécifique

ts : durée de stockage

La méthode consiste à établir et à quantifier la relation linéaire entre l'activité acidifiante spécifique (t_{spe} , en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$) et la durée de stockage (ts , en jours). Dans ce but, l'activité acidifiante spécifique est mesurée à différents moments :

- après congélation, au premier jour de stockage. La variable mesurée à cette étape correspond à tf_{spe} (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$) ;
- au cours du stockage à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pendant plusieurs semaines. Les variables obtenues à cette étape sont appelées ti_{spe} , où i est le nombre de jours de stockage à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$).

Les résultats relatifs à chaque condition expérimentale font l'objet de régressions linéaires de type :

$$t_{spe} = tf_{spe} + k_{spe} \cdot ts \quad (\text{éq. II.4})$$

où k_{spe} est la pente de la régression linéaire (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) et tf_{spe} l'ordonnée à l'origine (en $\text{min.}(\log(\text{UFC.mL}^{-1}))^{-1}$). Les régressions linéaires sont déterminées à l'aide du logiciel Excel (paragraphe II.7.1).

La pente k_{spe} représente la vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique pendant le stockage. Une pente élevée indique une diminution rapide de l'activité acidifiante spécifique, signifiant que la suspension bactérienne testée est sensible aux conditions de stockage.

En combinant les paramètres caractérisant la perte d'activité acidifiante spécifique pendant la congélation, décrits précédemment, l'équation caractérisant la perte d'activité acidifiante s'écrit :

$$t_{spe} = tc_{spe} + dtf_{spe} + k_{spe} \cdot ts \quad (\text{éq. II.5})$$

Si l'on considère, en outre, la perte d'activité acidifiante spécifique pendant l'étape de concentration, l'équation devient :

$$t_{spe} = tac_{spe} + dtc_{spe} + dtf_{spe} + k_{spe} \cdot ts \quad (\text{éq. II.6})$$

Cette dernière équation permet de visualiser simultanément et de façon individualisée les effets des différentes étapes de traitement des cellules sur l'activité acidifiante spécifique : valeur initiale (tac_{spe}), pertes pendant la concentration (dtc_{spe}) et la congélation (dtf_{spe}) et vitesse de perte pendant le stockage (k_{spe}).

II.3 Microfiltration tangentielle

II.3.1 Description du système de microfiltration

II.3.1.1 Module

Le système de microfiltration utilisé est constitué d'un module mono tubulaire (T.I.A., Bollène, France) associé à une membrane minérale en alumine α (50 cm² de surface membranaire) et représenté à la figure II.5. Ce système est composé de deux parties principales : alimentation du système et recirculation du rétentat.

La partie alimentation comprend une cuve en inox (T.I.A., Bollène, France) d'un volume utile de 2 L, équipée d'une double enveloppe connectée à une circulation de fluide thermostaté permettant de maintenir la température du fluide à microfiltrer à 15°C. Un thermomètre (JUMO, Fulda, Allemagne) permet de mesurer la température au sein du système.

La circulation du fluide dans le système est assurée par une pompe volumétrique (Bodin, Bléré, France). La variation de la fréquence de pompage (de 18 à 50 Hz) est réalisée par un variateur de fréquence (modèle ATV31 CU11 M2, Télémécanique, Rueil Malmaison, France). La vanne V_1 (GEMU, Ingelfinger, Allemagne) permet de régler la pression à la sortie du système (PM_2). Par contre, la pression à l'entrée du module membranaire (PM_1) ne se règle pas et dépend des pertes de charge selon la pression à la sortie du système (PM_2) et

le débit dans l'installation. Les pressions relatives à l'entrée de la membrane (PM_1) et à la sortie du système (PM_2) sont mesurées par deux manomètres (WIKA, Saint-Mitre-les-Remparts, France) et ne doivent pas dépasser 0,5 MPa. Les pertes de charges ne peuvent être calculées précisément dans ce système. Toutefois, une estimation a été effectuée (annexe 1) et montre qu'elles sont négligeables au regard des pressions transmembranaires appliquées. La vanne V_2 (GEMU, Ingelfinger, Allemagne) permet de vidanger le module et de récupérer le rétentat concentré lorsque la microfiltration est terminée. Un réservoir est utilisé pour collecter le perméat au cours de la microfiltration, permettant ainsi de déterminer sa densité de flux pendant la concentration (paragraphe II.3.1.2).



Figure II.5 : module de microfiltration tangentielle utilisé pour la concentration de *Lb. bulgaricus* CFL1

- 1 : Réservoir d'alimentation thermostaté
- 2 : Vanne V_2
- 3 : Vanne V_1
- 4 : Manomètre à la sortie de la membrane (mesure de PM_2)
- 5 : Manomètre à l'entrée de la membrane (mesure de PM_1)
- 6 : Pompe volumétrique
- 7 : Variateur de fréquence de la pompe
- 8 : Sortie du perméat
- 9 : Module de microfiltration
- 10 : Echangeur de chaleur
- 11 : Thermomètre
- 12 : Réservoir de collecte du perméat

Ce module de microfiltration est utilisé avec une membrane minérale tubulaire (Membralox, Pall Exekia, Bazet, France), caractérisée par une longueur de 25 cm et un rayon intérieur de 0,7 cm, représentant une surface filtrante de 50 cm². Les membranes minérales sont intéressantes car elles supportent des températures allant jusqu'à 90 °C et résistent à une gamme de pH allant de 1 à 13. Nous disposons de deux membranes de diamètre de pores différent (0,1 et 0,2 µm) qui seront utilisées séparément. Le système permet également de les associer en série.

II.3.1.2 Mesure de la densité de flux de perméat

Toutes les 30 min, la masse de perméat, récupéré pendant dix minutes de microfiltration, a été pesée et le résultat converti en débit (en L.h⁻¹). La densité de flux du perméat est, par la suite, obtenue en divisant le débit de perméat par la surface de la membrane (0,005 m²). Pour déterminer le moment précis où le facteur de concentration massique désiré est atteint, la masse totale de perméat est prise en compte.

II.3.2 Calcul des paramètres caractéristiques de la microfiltration

Les deux paramètres qui caractérisent un procédé de microfiltration tangentielle sont la pression transmembranaire (TMP, en Pa) et la vitesse tangentielle (v , en m.s⁻¹).

La pression transmembranaire représente la force motrice du système, permettant la séparation entre le perméat et le rétentat. Elle est calculée selon l'équation suivante :

$$TMP = \left[\frac{(P_{RE} - P_{PE}) + (P_{RS} - P_{PS})}{2} \right] \quad (\text{éq. II.7})$$

où P_{RE} = pression absolue du rétentat à l'entrée de la membrane (en Pa), P_{PE} = pression absolue du perméat à l'entrée de la membrane (en Pa), P_{RS} = pression absolue du rétentat à la sortie de la membrane (en Pa) et P_{PS} = pression absolue du perméat à la sortie de la membrane (en Pa).

Dans ce module de microfiltration, le circuit du perméat n'est pas pressurisé et donc, P_{PE} et P_{PS} sont voisines de 0,1 MPa. Dans le circuit du rétentat, la pression à l'entrée de la membrane est égale à PM_1 (en Pa), tandis que la pression à la sortie de la membrane est considérée comme étant la moyenne entre la pression à l'entrée de la membrane (PM_1 , en Pa) et la pression à la sortie du système (PM_2 , en Pa). Selon ces considérations et tenant compte que ce système mesure des pressions relatives, l'équation II.7 devient :

$$TMP = \left(\frac{PM_1 + \left(\frac{PM_2 + PM_1}{2} \right)}{2} \right) \quad (\text{éq. II.8})$$

L'autre paramètre important en microfiltration est la vitesse tangentielle (v , en m.s^{-1}). Cette vitesse est appliquée au fluide à microfiltrer et correspond au rapport entre le débit de recirculation du module (Q , en $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) et la section transversale de la membrane (S , en m^2), selon l'équation :

$$v = \frac{Q}{S} \quad (\text{éq. II.9})$$

Plus le débit appliqué est grand, plus la vitesse tangentielle est élevée. A l'inverse, s'il est nécessaire de diminuer la vitesse tangentielle, il convient d'augmenter la section de la membrane ou de diminuer le débit.

II.3.3 Caractérisation du module de microfiltration

Avant utilisation du module, il est nécessaire de caractériser la résistance hydraulique des membranes et d'effectuer l'étalonnage de la pompe.

II.3.3.1 Détermination de la résistance hydraulique

En conditions de perméation à densité de flux constant (membrane propre), la loi de Darcy, applicable pour les milieux poreux, est vérifiée :

$$J = \frac{TMP}{\mu \cdot R_H} \quad (\text{éq. II.10})$$

où J représente la densité de flux de perméat (en m.s^{-1}) et μ , est la viscosité du perméat (en Pa.s). On définit ainsi la résistance hydraulique (R_H , en m^{-1}), paramètre représentant l'inverse de la perméabilité membranaire. Pour la déterminer, des mesures de la densité de flux de perméat (J , en $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) pour différentes fréquences de pompage affichées (30, 40 et 50 Hz) et pour différentes pressions à la sortie du système (de 0 à 0,3 MPa) ont été réalisées avec de l'eau osmosée. Chaque mesure a été répétée trois fois. La résistance hydraulique est obtenue à partir du graphique de la densité de flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire (figure II.6) en utilisant la relation suivante :

$$R_H = \frac{1}{\mu \cdot a} \quad (\text{éq. II.11})$$

où μ est la viscosité de l'eau osmosée ($\mu = 10^{-3}$ Pa.s) et a , la pente de la droite représentant la densité de flux de perméat en fonction de la TMP. Plus la pente est élevée, plus la résistance hydraulique est faible, donc plus la membrane est perméable.

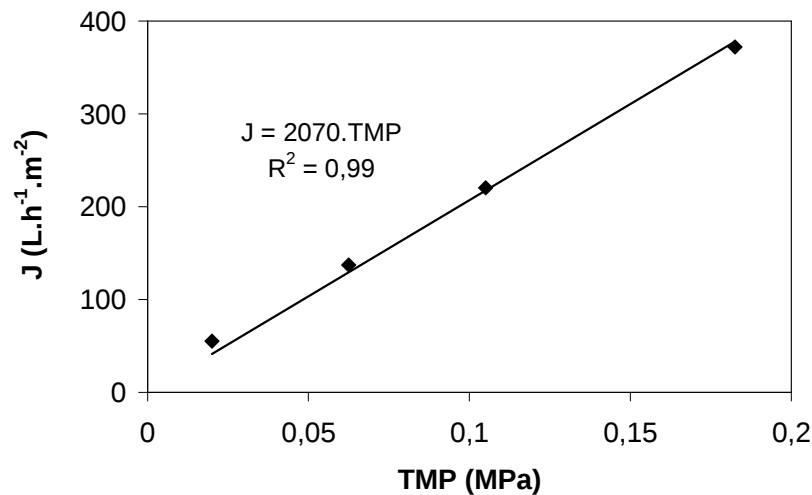


Figure II.6 : courbe utilisée pour la détermination de la résistance hydraulique de la membrane à 0,1 μm de diamètre de pore pour la fréquence de 50 Hz
 J : densité de flux de perméat (en $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)
 TMP : pression transmembranaire (en MPa)

Cette démarche expérimentale a été réalisée pour les deux membranes disponibles au laboratoire (0,1 et 0,2 μm de diamètre de pore) et pour deux fréquences de pompage différentes (30 et 50 Hz). Comme le flux de perméat est exprimé en $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, les conversions d'unités ont été prises en compte pour obtenir les valeurs de R_H en m^{-1} . Les valeurs obtenues pour la résistance hydraulique moyenne des membranes 0,1 μm et 0,2 μm sont $1,74 \cdot 10^{12} \text{ m}^{-1}$ et $6,4 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-1}$, respectivement.

II.3.3.2 Etalonnage de la pompe

Un étalonnage préalable de la pompe est nécessaire pour obtenir les valeurs de la vitesse tangentielle (v , en m.s^{-1}) dans le système, selon les différentes conditions de fréquence et de pression transmembranaire appliquées. Il consiste à déterminer la relation entre la fréquence de pompage (F , en Hz) et la PM_2 sur le débit de recirculation du module (Q , en $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$). A cet effet, le débit d'eau osmosée (en $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) est mesuré pour différentes fréquences de pompage ($F = 18, 23, 28, 35, 41$ et 50 Hz) et différentes pressions relatives à la sortie du système ($\text{PM}_2 = 0, 0,1, 0,2$ et 0,3 MPa), chaque mesure étant répétée au moins cinq fois. La figure II.7 présente le comportement du débit de circulation selon les différentes conditions de fréquence et PM_2 . Les valeurs de v correspondant aux débits de circulation obtenus à partir de chaque combinaison de fréquence et de PM_2 sont obtenues par l'équation II.9.

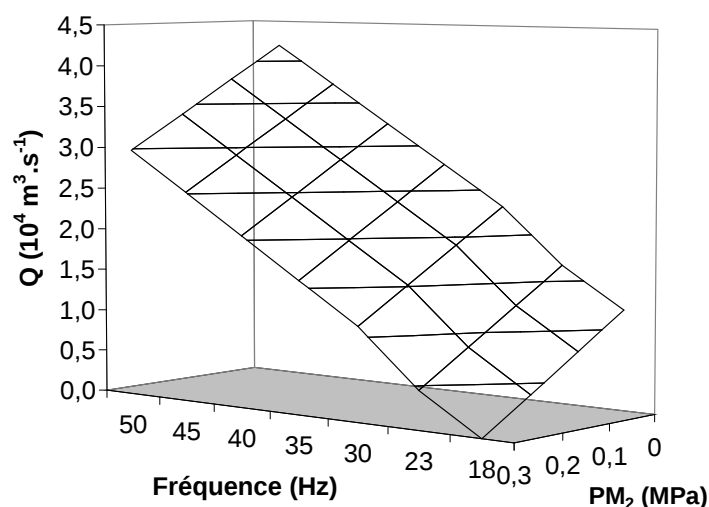


Figure II.7 : représentation tridimensionnelle du comportement du débit de circulation dans le système (Q) en fonction de la fréquence de pompage (F) et de la pression à la sortie du système (PM₂)

Quelques mesures ont également été réalisées avec le milieu de fermentation pour vérifier l'existence d'un possible changement de comportement lié au fluide utilisé. Selon les résultats obtenus, aucun changement n'a été observé.

II.3.3.3 Relations entre les paramètres réglables du module et les variables caractéristiques de la microfiltration

Comme décrit auparavant, les deux paramètres réglables dans le module de microfiltration sont la fréquence de la pompe (F, en Hz) et la pression à la sortie du système (PM₂, en Pa). Il est important de noter que ces deux paramètres ont une influence sur le débit de circulation du rétentat, et donc sur la valeur de la vitesse tangentielle, ainsi que sur la pression à l'entrée du système, et donc sur la pression transmembranaire. Pour quantifier cette influence, les résultats obtenus pour la résistance hydraulique des membranes et l'étalonnage de la pompe sont utilisés pour établir deux modèles représentant, respectivement, la pression transmembranaire (TMP, en Pa) et la vitesse tangentielle (v, en m.s⁻¹), en fonction de F et de PM₂. Les modèles sont obtenus par régression linéaire multiple des données à l'aide du logiciel Statgraphics® Plus 3.0 (paragraphe II.7.2).

Relation entre F et PM₂ sur la TMP

Le modèle décrivant le comportement de la pression transmembranaire en fonction de la fréquence de la pompe (F) et de la pression à la sortie du système (PM₂) s'écrit :

$$TMP = -31727 + 2851,6 \cdot F + 0,9 \cdot PM_2 \quad (R^2 = 0,99) \quad (\text{éq. II.12})$$

La figure II.8 montre la représentation en trois dimensions de ce polynôme. On observe que, plus la fréquence de la pompe et la PM_2 augmentent, plus la pression transmembranaire du système est importante.

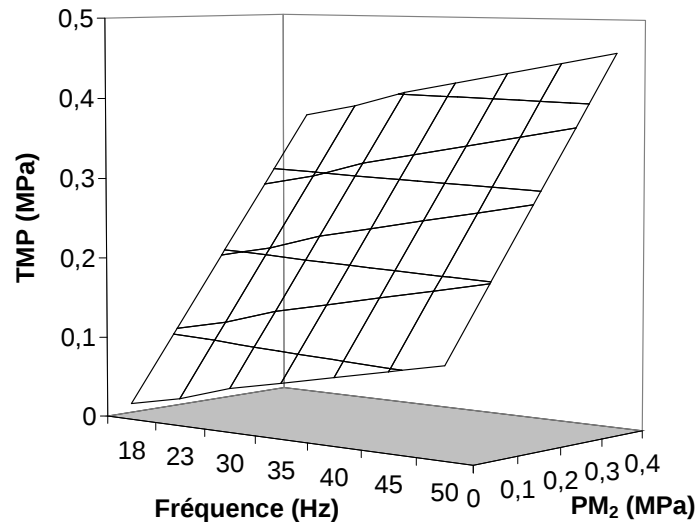


Figure II.8 : représentation tridimensionnelle du polynôme caractérisant la pression transmembranaire (TMP) en fonction de la fréquence de pompage (F) et de la pression à la sortie du système (PM_2).

Relation entre F et PM_2 sur la v

Le modèle décrivant le comportement de la vitesse tangentielle en fonction de la fréquence de la pompe (F) et de la pression à la sortie du système (PM_2) s'écrit :

$$v = -1,274 + 0,24334 \cdot F - 1045 \cdot 10^{-5} \cdot PM_2 \quad (R^2 = 0,98) \quad (\text{éq. II.13})$$

La représentation de ce polynôme peut être visualisée à la figure II.9. Plus la fréquence de la pompe augmente, plus la vitesse tangentielle est élevée. Par contre, plus la pression à la sortie du système est augmentée, plus la vitesse tangentielle est faible. Ce comportement est lié au fait que, pour augmenter PM_2 , on actionne la fermeture de la vanne V_1 , ce qui induit une diminution du débit dans l'installation.

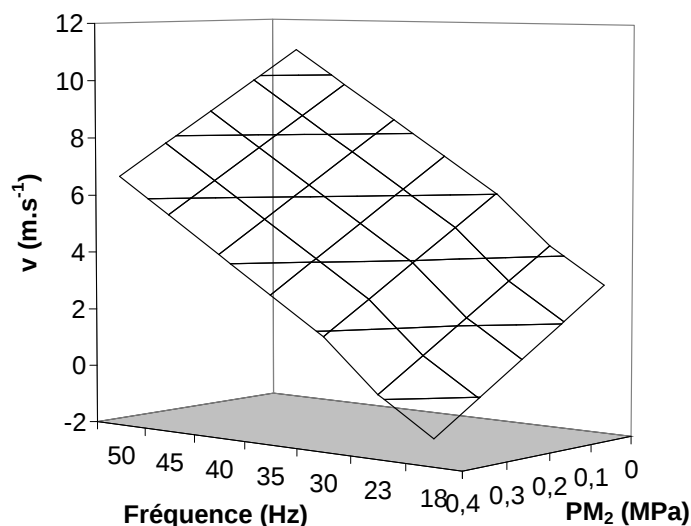


Figure II.9 : représentation tridimensionnelle du polynôme caractérisant la vitesse tangentielle (v) en fonction de la fréquence de pompage (F) et de la pression à la sortie du système (PM_2).

II.3.4 Nettoyage et décontamination du système de microfiltration

Après chaque utilisation du module de microfiltration, il est nécessaire de nettoyer le système pour retrouver les propriétés de la membrane propre, c'est-à-dire, retrouver la même densité de flux de perméat initial (obtenu avec de l'eau). Avant chaque utilisation, une étape de décontamination chimique est réalisée pour éviter la contamination des suspensions bactériennes lors de leur concentration. Les procédures opératoires de nettoyage et de décontamination ont été établies en prenant comme base les indications fournies par le fabricant.

II.3.4.1 Nettoyage

A la fin de son utilisation, le module de microfiltration est complètement vidé et rincé à l'eau osmosée jusqu'à l'obtention d'un perméat clair. Il est ensuite nettoyé selon les différentes étapes de nettoyage présentées à la figure II.10.

Le nettoyage consiste, dans un premier temps, en un lavage avec une solution basique d'ULTRASIL 25F (Henkel, Boulogne-Billancourt, France) dilué à 1 %. Ce nettoyage alcalin permet la dissolution de la couche colmatante organique (Arguello *et al.*, 1998). Cette opération est réalisée deux fois, à deux températures différentes (45 °C et 80 °C). Le premier lavage basique permet d'éliminer les particules présentes à la surface des pores de la membrane et le deuxième, d'éliminer les particules à l'intérieur des pores. Après neutralisation de la membrane avec de l'eau osmosée, un lavage acide à 30 °C pendant 15 min est réalisé avec une solution d'acide nitrique à 0,2 %. Cette étape permet de

dissoudre les composés inorganiques (Arguello *et al.*, 1998). Un dernier rinçage à l'eau osmosée est effectué jusqu'à la neutralisation complète.

Le protocole détaillé du nettoyage se trouve en annexe 2.

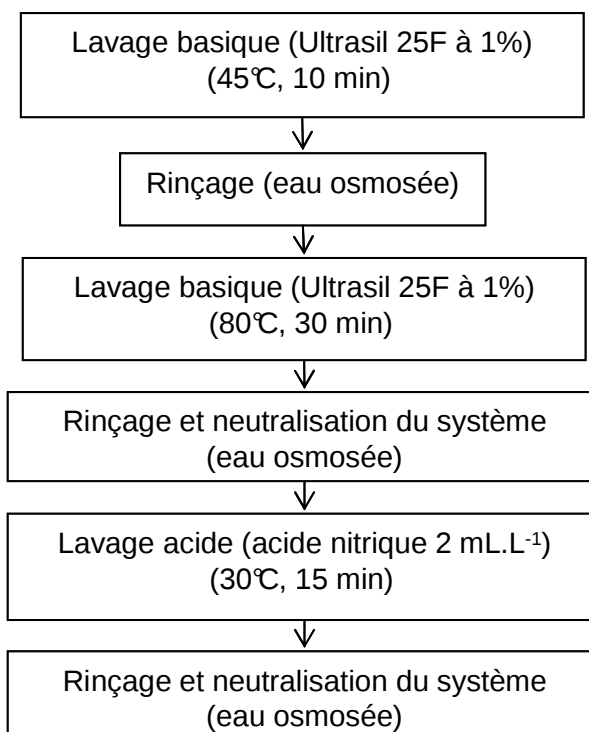


Figure II.10 : séquence des différentes étapes de la procédure de nettoyage du module de microfiltration tangentielle

II.3.4.2 Décontamination

La décontamination du module de microfiltration est effectuée juste avant son utilisation, à l'aide d'une solution contenant 200 mg.L⁻¹ d'eau de javel dissoute dans de la soude (10 g.L⁻¹). La décontamination est réalisée pendant 30 min à une température inférieure à 20 °C afin d'éviter la corrosion du module par l'hypochlorite de sodium (Arguello *et al.*, 1998). Un rinçage à l'eau osmosée stérile est ensuite effectué jusqu'à la neutralisation.

Le protocole détaillé de décontamination peut être consulté en annexe 3.

II.4 Analyse de la composition en acides gras membranaires

La composition en acides gras membranaires des cellules de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 est déterminée par la méthode d'analyse des esters méthyliques d'acides gras, développée par Rozès *et al.* (1993) et adaptée par Béal *et al.* (2001a). Cette méthode est structurée en quatre étapes : préparation des cellules, extraction/méthylation, analyse par chromatographie en phase gazeuse et traitement des

résultats. Deux extractions ont été réalisées pour chaque échantillon et chaque extraction est analysée deux fois en chromatographie gazeuse. Au total, pour chaque échantillon, l'analyse est donc répétée quatre fois.

II.4.1 Lavage des cellules

Les échantillons de ferments concentrés sont décongelés 5 min à 30 °C puis répartis dans des tubes Eppendorf de 2 mL, à raison de 1 g par tube environ. Ils subissent une première centrifugation (14 000 *g*, 30 min, 4 °C) pour éliminer le milieu de culture. Les cellules sont ensuite lavées deux fois par centrifugation (14 000 *g*, 30 min, 4 °C) dans 1 mL de Tris 50 mM pH 8,8 (Biorad, Marnes la coquette, France).

II.4.2 Méthylation et extraction

Environ 0,5 à 0,8 g de culot cellulaire propre sont pesés précisément dans un tube en verre. Toutes les étapes qui suivent sont conduites dans de l'eau glacée.

La méthylation se fait par addition de 1,5 mL d'une solution saturée (1 M) de méthoxyde de sodium (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) dans du méthanol RPE (Carlo Erba, Val de Reuil, France). Le mélange est agité 1,5 min au vortex à vitesse maximale. Les acides gras méthylés sont extraits par ajout de 1 mL d'hexane (capillary grade RS, Carlo Erba) auquel est ajouté 1 mL de méthyl ester undécanoate (0,1 g.L⁻¹ dans l'hexane, Sigma) comme étalon interne. Après 5 min d'agitation, suivies de 5 min de décantation dans l'eau glacée, la phase supérieure dans laquelle se trouvent les acides gras méthylés est prélevée et répartie dans des tubes en verre contenant une pincée de sulfate de sodium. Les tubes sont sertis et stockés à -80 °C jusqu'à leur analyse.

II.4.3 Analyse des acides gras méthylés par chromatographie en phase gazeuse

La méthylation des acides gras permet de les rendre volatils, ce qui rend leur analyse par chromatographie en phase gazeuse possible (Rozès *et al.*, 1993). Les esters méthyliques des différents acides gras se répartissent entre la phase mobile (gaz inerte) et la phase stationnaire (polymère de haut point de fusion) suivant leur coefficient de partage. Ils sont ensuite élués successivement en fonction de leur différence d'affinité avec la phase stationnaire.

Dans ce travail, les échantillons sont analysés par un chromatographe en phase gazeuse (HP 6890, Hewlett Packard, Avondale, PA), équipé d'une colonne capillaire polaire

(BPX 70, 60 m*0,25 mm, SGE, Victoria, Australie). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,2 mL.min⁻¹. Le volume d'échantillon injecté est de 2 µL. La température de l'injecteur est de 250 °C et la durée d'une analyse est de 111 min. Le programme de température du four est le suivant : 65 °C pendant 1 min, puis montée de 65 °C à 230 °C à raison de 1,5 °C.min⁻¹. Le détecteur est un spectromètre de masse (Agilent 5973, Hewlett Packard, Avondale, PA) utilisé en mode « scan » (de 30 à 400 unités de masse atomique).

A titre d'exemple, un chromatogramme issu de l'extraction des acides gras membranaires de *Lb. bulgaricus* CFL1, cultivé à 42 °C et pH 6, est présenté à la figure II.11.

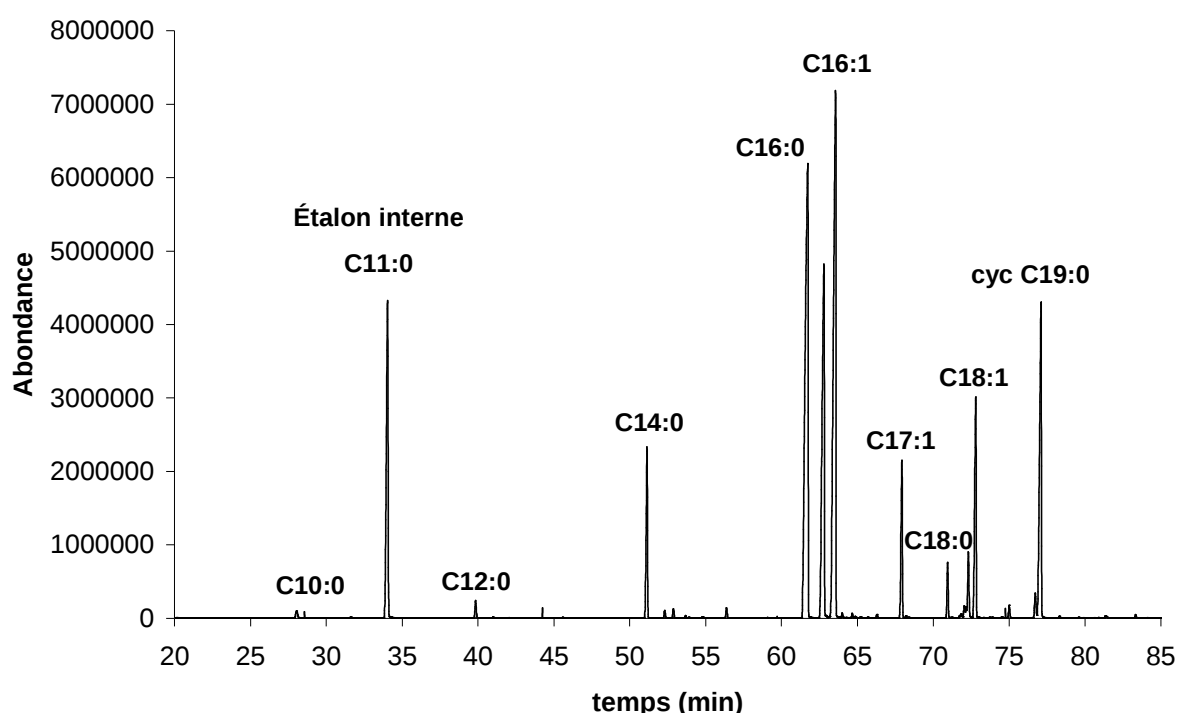


Figure II.11 : chromatogramme des acides gras membranaires extraits de *Lb. bulgaricus* CFL1 cultivé à 42 °C et pH 6

II.4.4 Identification des composés

L'identification des composés se fait, d'une part à l'aide d'étalons externes et d'autre part, grâce aux spectres de masse.

Deux principaux étalons externes contenant chacun un mélange d'acide gras saturés et insaturés, sont utilisés :

- 37 Component FAME Mix (FAME 37, Supelco, Bellefonte, PA) ;
- Bacterial Acid Methyl Ester CP Mix (BAME, Supelco, Bellefonte, PA).

Ces standards sont dilués 40 fois dans l'hexane puis stockés à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse parallèlement aux

échantillons et selon le même protocole. Les temps de rétention des acides gras méthylés sont alors comparés à ceux des standards.

Pour confirmer les identifications faites avec les étalons externes et compléter celles-ci, les spectres de masse de chaque pic sont comparés avec des banques de données (NIST/02 Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD).

II.4.5 Quantification des teneurs relatives en acides gras membranaires

Pour s'affranchir de la variabilité liée aux différences de volume injecté, les aires de chaque pic sont rapportées à l'aire du pic de l'étalon interne. L'analyse quantitative s'est montrée infructueuse car le rendement d'extraction des acides gras membranaires n'est pas maîtrisé. Les teneurs en acides gras membranaires sont donc exprimées en pourcentage de la quantité totale d'acides gras extraits. Ce pourcentage est calculé comme le rapport de la surface du pic considéré sur la somme des surfaces de tous les pics.

A partir de la composition en acides gras membranaires, des ratios rapportant les différentes catégories d'acides gras (insaturés, cycliques) à la teneur en acides gras saturés sont calculés.

II.5 Analyse protéomique

II.5.1 Principe

L'analyse protéomique permet d'étudier l'expression globale des protéines d'une bactérie dans un état physiologique donné. C'est une méthode utile pour construire une banque de protéomes pour des bactéries d'intérêt (Cash, 1998). L'analyse différentielle de l'expression des protéines peut aussi permettre de démontrer l'existence de mécanismes de réponse et d'adaptation physiologiques. Par exemple, dans le cas des bactéries lactiques, des réponses adaptatives à des stress divers s'expliquent par des expressions différentes de protéines spécifiques (Lim *et al.*, 2001 ; Perrin *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2005b).

L'analyse protéomique s'effectue par la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) qui permet de séparer, visualiser et quantifier des protéines sur un gel d'acrylamide, selon leur pH isoélectrique (pI) et leur poids moléculaire (PM) (O'Farrell, 1975). Les protéines séparées peuvent ensuite être identifiées, soit par détermination de leur séquence N terminale, soit par analyse de leur spectre de masse, avec, par exemple, la technique MALDI-TOF (Griffin *et al.*, 2001), en comparaison avec une banque de données.

La première étape d'une analyse protéomique consiste à extraire les protéines cytoplasmiques des cellules. Puis, intervient la focalisation isoélectrique (séparation en première dimension, selon le pI des protéines). Les protéines sont ensuite séparées, en deuxième dimension, par migration sur un gel SDS-page, selon leur poids moléculaire. Enfin, elles sont visualisées par coloration et les gels obtenus sont scannés et analysés à l'aide de logiciels spécialement conçus.

II.5.2 Extraction et purification des protéines

II.5.2.1 Lavage et lyse des cellules

Après décongélation, le concentré bactérien est lavé comme décrit auparavant au paragraphe II.4.1 pour l'analyse des acides gras membranaires. Les cellules sont ensuite lysées par broyage dans un tampon Tris-EDTA (50mM - 1mM, pH 8,8) (Sigma), à raison de 1 mL de tampon pour 0,2 g culot lavé, dans un tube contenant 0,6 g de billes de broyage de 0,1 mm de diamètre (Biospec Products, Batlesville, Etats-Unis). Ce mélange est broyé trois fois pendant 20 secondes à l'aide d'un broyeur Bio101 (Savant Instruments, Holbrook, Etats-Unis), à une vitesse de 6,5. Entre chaque broyage, l'échantillon est plongé pendant 5 min dans de l'eau glacée. Une centrifugation est ensuite effectuée (24 000 g, 15 min, 4 °C) pour éliminer les cellules non broyées et les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré puis congelé à -80 °C jusqu'à son utilisation.

II.5.2.2 Dosage des protéines

Afin de normaliser la quantité de protéines qui sera utilisée lors de l'électrophorèse, il est nécessaire de connaître la quantité de protéines extraites. La teneur en protéines totales est déterminée par la méthode de Bradford, à l'aide du réactif « Coomassie protein assay reagent » (Pierce, Rockford, IL). Le principe et le protocole de cette méthode sont présentés à l'annexe 4.

II.5.2.3 Purification de l'échantillon

Deux étapes permettent d'éliminer les composés cellulaires susceptibles d'interférer avec l'analyse protéomique.

- Traitement à l'endonucléase

Un échantillon contenant 300 µg de protéines, dont le volume dépend de la concentration des protéines extraites, est prélevé. 50 U d'endonucléase (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) et 0,2 µL de sulfate de magnésium 1 M (WWR Prolabo, Leuven, Belgique) sont ajoutés. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 min. Cette étape permet d'éliminer

les acides nucléiques, grâce à l'enzyme endonucléase qui est capable d'hydrolyser une liaison phosphodiester à l'intérieur d'un nucléotide.

- Précipitation à l'acétone

L'acétone contribue à la précipitation des protéines et extrait les lipides et les autres composés liposolubles (les sels et les polysaccharides) qui peuvent interférer avec l'analyse. Un volume d'acétone, 5 à 10 fois supérieur au volume de l'échantillon (excès d'acétone), est ajouté et homogénéisé par retournement à 4 °C. Le mélange est placé à -20 °C, pendant 5 à 15 min, puis centrifugé (24 000 g, 10 min, 4 °C). Après l'élimination du surnageant, le culot protéique est séché par retournement sur du papier absorbant pendant 5 min.

II.5.3 Première dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle

II.5.3.1 Focalisation isoélectrique

La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pH isoélectrique. L'emploi d'agents de réduction, de détergents et d'ampholytes, inclus dans un tampon de focalisation isoélectrique, permet de solubiliser les protéines et de les ioniser. Les agents utilisés dans cette étude et leurs fonctions sont présentés à l'annexe 5. Ils ne doivent pas modifier le point isoélectrique (pI) des molécules mais doivent supporter le haut voltage appliqué lors de la première dimension.

La première dimension s'effectue dans des bandelettes de gel d'acrylamide déshydraté (« strips ») selon un gradient de pH. Les protéines chargées (négativement ou positivement) se déplacent, sous l'action d'un champ électrique, pour atteindre leur pI où la charge nette des protéines est égale à 0.

Pratiquement, 300 µg de protéines purifiées sont solubilisées dans 350 µL de tampon de focalisation (annexe 5). La suspension protéique est déposée dans une rainure de la plaque (Biorad) en évitant les bulles d'air. Un strip de 17 cm couvrant une gamme de pH allant de 4 à 7 (Biorad), préalablement décongelé, est mis en contact avec l'échantillon. La partie acide du strip (+) se situe à gauche de la plaque de focalisation (notée +). Le strip est recouvert d'huile minérale, pour éviter l'évaporation de l'échantillon, puis déposé dans le portoir de focalisation (Protean IEF Cell, Biorad), thermostaté à 20 °C.

La focalisation se déroule à 20 °C selon le programme présenté à l'annexe 6. Une réhydratation active est réalisée sous faible voltage (50V) pendant 11 h afin de permettre aux protéines d'entrer dans la matrice du gel. Elle permet de réduire le temps de procédure et de faciliter la pénétration des grosses protéines. Après la réhydratation, la focalisation est effectuée en augmentant la tension par paliers, afin de limiter l'influence des composants ioniques des échantillons et l'élévation de la température du strip. Enfin, le courant est

maintenu à 8000 V pendant 7 h 30 min, pour garantir une résolution et une séparation performantes des protéines.

A l'issue de la focalisation, le strip est rincé avec de l'eau milliQ. Il peut être conservé à -80 °C ou subir directement l'étape d'équilibration.

II.5.3.2 Equilibration

Il est nécessaire de solubiliser les protéines focalisées dans un tampon contenant du sodium dodecyl sulfate (SDS). L'équilibration se fait en plaçant le strip successivement dans le tampon E1 (annexe 7) pendant 15 min pour réduire les groupements sulfhydrylate, puis dans le tampon E2 (annexe 7) pendant 20 min pour alcaliniser les groupements sulfhydrylate, à température ambiante et sous agitation. Entre chaque bain, le strip est rincé avec de l'eau milliQ.

II.5.4 Deuxième dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle

La première dimension a permis de séparer les protéines en fonction de leur pI. La seconde dimension va les séparer en fonction de leur poids moléculaire (PM). Le SDS, présent dans le gel d'acrylamide, est un agent anionique. Il se fixe sur les protéines et masque leur charge propre, en formant un complexe avec une charge nettement négative. Le gel d'acrylamide fonctionne donc comme un tamis moléculaire : la migration d'une protéine sur le gel varie en fonction du poids moléculaire de la protéine et de la concentration en acrylamide.

II.5.4.1 Nettoyage et montage des plaques de gel

Les plaques sont préalablement nettoyées trois fois sous l'eau du robinet et avec une solution de détergent (Alconox, Sigma). Elles sont rincées avec de l'eau milliQ, puis séchées sur du papier absorbant. Enfin, un nettoyage à l'alcool est effectué afin d'éliminer toutes traces d'humidité. Les plaques sont ensuite dressées sur un portoir, en portant une attention particulière à la pose des joints afin d'éviter les fuites.

II.5.4.2 Préparation d'un gel d'acrylamide

La solution de gel est préparée selon la composition donnée à l'annexe 8. Juste avant de couler le gel, du persulfate d'ammonium (0,5 %) (Sigma) et du Temed (0,032 %) (Biorad) sont ajoutés dans la solution, comme catalyseurs de la polymérisation du gel. Le gel est ensuite coulé entre les plaques et un peigne, permettant le dépôt du strip et la création d'un puit pour insérer le marqueur de poids moléculaire, est ajouté. La polymérisation est totale après 2 h à température ambiante.

II.5.4.3 Migration

Après la polymérisation, le strip est déposé en haut du gel, partie acide (+) vers la droite. Il est maintenu en place par l'ajout de 2 mL d'agarose (Sigma) (1 % dans le tampon de migration).

Le dépôt d'un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, 10–250 kD, Biorad) dans un puit à côté du strip, permet de déterminer les masses des protéines sur le gel. Pratiquement, 200 ng de marqueur sont ajoutés dans la rainure de marquage du gel de migration. Ces protéines de marquage vont migrer avec les protéines du strip sur le gel.

Après 10 min (temps nécessaire à la polymérisation de l'agarose), le gel est déposé dans la cuve d'électrophorèse contenant 1,5 L de tampon de migration dans la chambre inférieure et 400 mL dans la chambre supérieure. Un maintien préalable du courant à 5 mA pendant 15 min permet de stabiliser le gel (pré-run), permettant aux protéines de bien migrer du strip vers le gel de deuxième dimension. La migration se déroule à 14 °C selon le programme présenté à l'annexe 6.

II.5.5 Coloration des gels

A la suite de la migration, les protéines séparées sur le gel sont colorées afin de visualiser les spots en vue de l'acquisition de l'image.

Après rinçage du gel dans de l'eau milliQ, pendant 15 min sous agitation douce (table d'agitation, mouvement pendulaire), la coloration est effectuée, pendant 1 h, dans du bleu de Coomassie colloïdal (Biorad). Le gel est ensuite rincé deux fois, pendant 1 h, dans de l'eau milliQ.

II.5.6 Acquisition et analyse d'images

II.5.6.1 Numérisation des images

Il est nécessaire de numériser les spots observés sur les gels afin de les analyser avec un système d'analyse d'images. La numérisation est réalisée avec un scanner (GS800™, Biorad), préalablement étalonné dans les gris.

II.5.6.2 Analyse d'images

L'analyse est effectuée à l'aide du logiciel de traitement d'images PDQuest (Biorad). Il permet d'identifier la position de chaque spot protéique, de quantifier son intensité, de comparer des spots entre eux et de faire des analyses statistiques.

Un traitement primaire de l'image sert à bien aligner l'image scannée. L'augmentation des contrastes de l'image permet ensuite une meilleure visualisation des spots présents sur le gel et un amoindrissement du bruit de fond (l'intensité relative des spots entre eux ne varie pas). Après un calibrage en termes de taille des spots, de sensibilité et de bruit de fond, le logiciel détecte les spots présents sur le gel. Une étape de nettoyage est alors nécessaire : elle vise à éliminer les spots d'intensité trop faible pour être évalués correctement, ou situés dans des zones à fort bruit de fond. Afin d'obtenir une image représentative de la condition étudiée, une comparaison de trois gels obtenus dans la même condition est effectuée, en sélectionnant sur chaque gel, les spots communs et en créant des points d'ancrage. Au cours de cette étape, il est possible d'affiner encore le nettoyage.

Le pH du strip varie de façon linéaire. Pour quantifier les pI, il est donc possible de positionner un spot ayant un pI acide proche de pH 4, un autre ayant un pI basique proche de pH 7 et au moins un troisième de pI intermédiaire (pH 5 à 6), préalablement connus. Un marqueur de poids moléculaire est inclus sur le gel, afin de permettre l'identification des masses des protéines. Enfin, quatre spots de référence, situés aux quatre extrémités d'une image, permettent de déterminer les valeurs de poids moléculaire et de pI de tous les spots présents sur le gel.

II.5.6.3 Comparaison des gels obtenus dans des conditions différentes

Pour comparer des gels issus de deux conditions expérimentales différentes, un « matchset » est constitué à partir de tous les gels correspondant aux deux conditions (2 séries de 3 gels au minimum). Les gels sont comparés en fonction des niveaux de gris et des surfaces de chaque spot, en déterminant 3 variables :

- RE1 : expression relative qui renseigne sur la surface et l'intensité de gris d'un spot dans les gels de référence ;
- RE2 : expression relative qui renseigne sur la surface et l'intensité de gris d'un spot dans les gels de comparaison ;
- DE : expression différentielle, correspondant au rapport des RE du même spot dans les deux séries de gels comparés : $DE = RE2/RE1$;

Quatre types d'analyse sont alors effectués :

- une analyse statistique (test de student) pour identifier les spots statistiquement différents dans les deux séries de gel, en tenant compte de la variabilité entre les gels ;
- une analyse qualitative qui permet de mettre en évidence des spots présents uniquement sur l'une des deux séries de gels ;

- une analyse quantitative qui permet de comparer la densité des spots présents sur les deux séries de gels, selon trois niveaux de différence :
 - $DE \geq 2$, le spot est sur-synthétisé dans la série 2 ;
 - $0,5 < DE < 2$, le spot est considéré comme identique sur les deux séries de gels ;
 - $DE \leq 0,5$, le spot est sur-synthétisé dans les gels de référence.
- une analyse booléenne permet enfin de sélectionner les spots en commun, issus à la fois des analyses statistiques et des analyses qualitatives ou quantitatives.

A l'issue des analyses, une vérification visuelle des spots est toujours nécessaire. Ensuite, les données relatives aux spots retenus lors des analyses sont collectées dans un fichier qui regroupe le numéro du spot, sa masse moléculaire, son point isoélectrique et sa densité normalisée, pour l'ensemble des gels traités.

II.5.7 Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF

II.5.7.1 Principe

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice – Temps de Vol) permet d'identifier des peptides et des protéines après hydrolyse. Son principe consiste à effectuer une désorption-ionisation qui a pour but d'ioniser les molécules, qui passent ainsi de l'état solide à l'état gazeux, en appliquant des impulsions laser.

Appliquée à la caractérisation de protéines, la méthode requiert une hydrolyse trypsique préalable qui permet l'obtention de peptides. L'échantillon est alors déposé sur une matrice dont le rôle est de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par les rayons laser et d'absorber l'énergie transmise par le faisceau. La matrice, porteuse de plusieurs échantillons, est alors bombardée par le laser, permettant aux peptides intacts d'être ionisés.

Une fois les ions formés, ils sont accélérés à haute tension (20 KV) et envoyés jusqu'au détecteur. Les ions, ayant une énergie cinétique fixe, circulent à des vitesses différentes selon la masse de la molécule : les ions ayant une masse élevée transitent plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. L'appareil mesure le temps que mettent les ions pour atteindre le détecteur (temps de vol) et l'associe à leur rapport masse/charge (m/z). Le signal est ensuite visualisé en spectre et enregistré sous la forme d'une liste de masses (Lay Jr., 2000).

II.5.7.2 Protocole expérimental

Tous les essais d'identification des protéines ont été effectués au sein de la plateforme protéomique PAPSS (Plateau d'Analyse Protéomique par Séquençage et Spectrométrie de Masse, INRA, Jouy-en-Josas) de l'unité de Biochimie Bactérienne. Le protocole expérimental a été développé par Guillot *et al.* (2003).

Les spots de protéines issus de l'électrophorèse bidimensionnelle sont excisés, puis lavés avec 30 μL d'un mélange 1:1 (v:v) de carbonate d'ammonium (50 mM, Biochemica, Fluka, Steinheim, Allemagne) et d'acétonitrile (Merk, Paris, France) puis séchés pendant 30 min (Sécheur Speed-vac, Savant, Hicksville, NY). Ils sont ensuite réhydratés avec 50 mM de carbonate d'ammonium contenant 13 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de trypsine porcine, à 37 °C pendant 12 h. Le surnageant de la solution réhydratée et hydrolysée est utilisé directement pour l'analyse MALDI-TOF.

Les échantillons sont déposés sur une matrice composée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans 0,1 % d'acide trifluoroacétique et 500 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acétonitrile). Ils sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur un appareil Voyager DE STR Instrument (Applied Biosystems, Farmingham, MA), comme décrit par Guillot *et al.* (2003). Une calibration interne est réalisée avec deux peptides issus de la trypsine, de masses égales à 842,5 et 2211,1 Da.

II.5.7.3 Traitements des résultats

Les peptides sont identifiés à partir des listes de masses monoisotopiques obtenues expérimentalement. Ces listes sont ensuite comparées avec les listes incluses dans des bases de données en utilisant le programme MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>). Trois bases locales (*Lc. Lactis*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus thermophilus*) et deux bases de données publiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA365 et ATCC 11842, Van de Guchte *et al.* (2006), NCBI INR) sont utilisées. La précision sur la masse est de 15 à 30 ppm. Il faut identifier au minimum quatre peptides et obtenir une couverture de séquence supérieure à 20 % pour confirmer un résultat d'identification. La concordance entre les masses moléculaires et points isoélectriques des valeurs théoriques et expérimentales est également vérifiée.

II.6 Plans d'expériences

Trois plans d'expériences ont été mis en œuvre au cours de la thèse, afin de déterminer l'influence de plusieurs conditions opératoires sur la cryotolérance et les réponses physiologiques de *Lb. bulgaricus* CFL1.

Le premier plan d'expériences est dédié à l'étude d'une acidification en fin de fermentation. Il consiste à évaluer les effets du pH et de la durée d'acidification sur la résistance des cellules à la congélation et au stockage sous forme congelée (paragraphe II.6.2). L'effet de l'acidification sur les réponses physiologiques des cellules, au niveau métabolique (protéomique) et au niveau de la membrane (composition en acides gras membranaires) est également analysé.

L'objectif du deuxième plan d'expériences est de quantifier l'influence des conditions de centrifugation sur la cryotolérance des cellules. La vitesse de rotation, la durée et la température de centrifugation ont été plus particulièrement étudiées (paragraphe II.6.3).

Au cours du plan d'expériences n°3, l'effet des conditions opératoires de microfiltration est évalué sur la résistance des cellules à l'étape de concentration, ainsi que pendant la congélation et le stockage sous forme congelée (paragraphe II.6.4). Les changements physiologiques (protéomique et acides gras membranaires) observés à la suite de conditions de microfiltration différentes sont analysés.

II.6.1 Plan d'expériences de type CCRD

Un plan d'expériences centré isovariant par rotation (CCRD, de l'anglais Central Composite Rotatable Design) sert à étudier les effets de plusieurs facteurs simultanément et de leurs interactions éventuelles. Il permet de caractériser les effets simples et quadratiques, ainsi que les interactions entre les facteurs étudiés. Il permet de réduire le nombre d'essais, de quantifier la variance expérimentale et d'exprimer chaque variable expliquée au moyen d'un modèle quadratique linéaire, fonction des facteurs étudiés et de leurs interactions.

Un CCRD est basé sur la mise en œuvre d'une matrice d'expériences qui comporte trois catégories d'essais. Chaque essai est défini par des conditions expérimentales exprimées en variables centrées réduites (ou codées). Cette transformation permet de ramener les différentes conditions testées à la même échelle. La matrice du plan d'expérience se définit dans l'espace par un cercle, dans le cas d'un plan à deux facteurs (figure II.12).

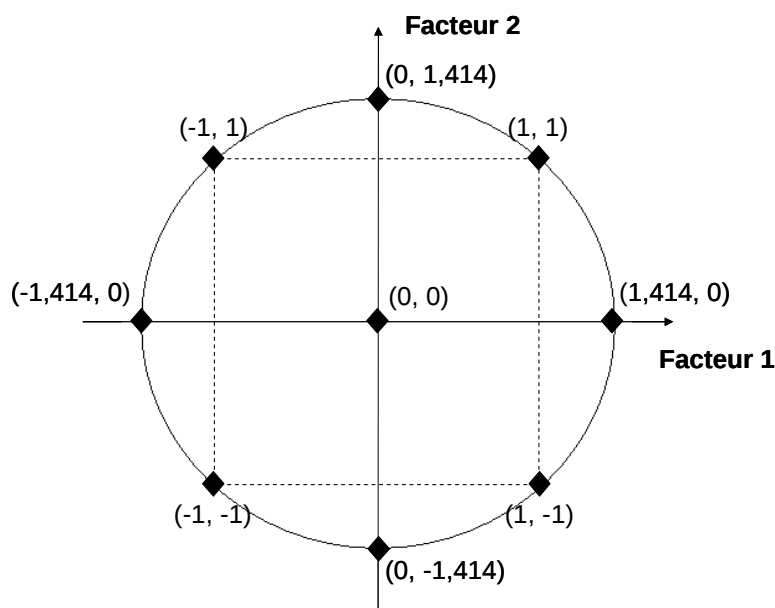


Figure II.12 : représentation schématique du plan d'expériences centré isovariant par rotation (CCRD)

Le nombre total d'essais (N) correspond à la somme des essais de trois catégories :

$$N = N_C + N_F + N_E$$

- N_C : répétitions de l'essai réalisé dans les conditions du point central, définies par la valeur codée 0 de chaque facteur. Ces expériences se situent au centre de la représentation graphique du plan expérimental. Elles permettent l'étude de la variance expérimentale ;
- $N_F (= 2^k)$: essais effectués dans le plan factoriel de la représentation graphique. Ils résultent de toutes les combinaisons possibles entre les facteurs de valeur codée +1 ou -1 ;
- $N_E (= 2 \cdot k)$: essais réalisés dans les conditions extrêmes du plan. Ils sont définis par la combinaison d'un facteur dont la valeur codée est fixée à la valeur codée $+\alpha$ ou $-\alpha$ et d'un facteur caractérisé par la valeur codée 0 ;
- k : représente le nombre de facteurs à tester. Il est égal à 2 dans notre cas.

Le terme α caractérise l'étendue du domaine expérimental. Pour un plan CCRD à deux facteurs, sa valeur est

$$\alpha = 2^{k/4} = 1,414$$

Les valeurs prises par les différents niveaux de chaque facteur testé (points centraux et points factoriels) sont calculées à partir d'un pas. Celui-ci est choisi de telle sorte que le domaine expérimental ait une réalité pratique, permettant de conclure sur l'effet de chaque variable. Elles sont déterminées à l'aide de l'équation suivante :

$$X = X_0 \pm P \cdot X_C \quad (\text{éq. II.14})$$

où X représente la valeur réelle de la condition expérimentale, X_0 est la valeur affectée au point central, X_C est la valeur codée de X, et P est le pas.

Pour chaque variable expliquée (Z), une régression linéaire multivariable (paragraphe II.7.2) d'ordre 2 est effectuée en fonction des facteurs testés (F_1 et F_2). Elle permet d'établir des polynômes de la forme :

$$Z = C + a_1.F_1 + a_2.F_2 + a_{11}.F_{11}^2 + a_{22}.F_{22}^2 + a_{12}.F_1.F_2 \quad (\text{éq. II.15})$$

Les paramètres C, a_1 , a_{11} , a_2 , a_{22} et a_{12} sont les coefficients des polynômes. Ils sont estimés par la méthode des moindres carrés.

La qualité d'ajustement des régressions est appréciée par le coefficient de corrélation multiple (R^2). Ce coefficient s'interprète comme la proportion de variabilité expliquée par l'équation de régression. S'il est proche de 1, l'ajustement est bon. S'il est voisin de 0, les écarts entre les valeurs observées et ajustées sont du même ordre que l'écart entre les valeurs observées et leur moyenne, ce qui signifie que le modèle ne se justifie pas.

II.6.2 Effet d'une acidification en fin de fermentation

Le premier plan d'expériences a pour objectif d'étudier l'effet d'un pallier à pH acide en fin de fermentation, sur l'aptitude de la bactérie lactique *Lb. bulgaricus* CFL1 à résister à la congélation et au stockage sous forme congelée à -20 °C.

II.6.2.1 Influence du pH sur la croissance de *Lb. bulgaricus* CFL1

Afin de déterminer au préalable les pH optimal et extrêmes pour la croissance de *Lb. bulgaricus* CFL1, une série de fermentations à pH régulé (pH 4,5 ; 5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 et 7,5) a été réalisée. Pour chacune d'elles, le temps pour atteindre la fin de la phase exponentielle de croissance, la concentration en biomasse produite, ainsi que les vitesses de consommation de soude et de variation de la conductivité ont été déterminés. Le tableau II.2 montre les résultats obtenus pour les fermentations conduites aux différents pH. Le meilleur pH pour la conduite de la fermentation est celui qui permet d'obtenir à la fois une concentration élevée en biomasse, avec des vitesses importantes et un temps de fermentation le plus court possible.

Les résultats obtenus montrent que les pH supérieurs ou égaux à 7,0 ou trop acides (pH 4,5) ne sont pas favorables à la croissance de la bactérie. Dans ces trois conditions, les vitesses maximales d'acidification (en valeur absolue) et la production de biomasse sont faibles. Le pH 6,0 semble être le plus favorable pour cette souche car, dans cette condition, la consommation de soude, les vitesses ainsi que la production de biomasse sont élevées. Pour ces raisons, dans la suite du travail, les fermentations ont été conduites à pH 6,0.

Tableau II.2 : paramètres caractérisant la croissance de *Lb. bulgaricus* CFL1 lors de fermentations conduites à différents pH

Paramètre	pH						
	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
tm	3000	851	723	825	809	759	1500
ΔNaOH	12,32	55,12	37,35	48,55	59,84	29,96	21,01
ΔCond	1,04	5,12	3,63	4,70	5,70	2,60	1,19
VmNaOH	-0,045	-0,441	-0,340	-0,723	-0,490	-0,450	-0,010
VmCond	0,011	0,046	0,036	0,072	0,048	0,044	0,008
X	-	21,6	18,7	29,8	18,1	8,2	-

tm : temps nécessaire pour atteindre Vm (min) ; ΔNaOH : masse de soude consommée pour atteindre tm (g) ; ΔCond : variation de la conductivité électrique pour atteindre tm (mS.cm^{-1}) ; VmNaOH : vitesse maximale de consommation de soude (g.min^{-1}) ; VmCond : vitesse maximale de variation de la conductivité électrique ($\text{mS.cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ; X : biomasse produite à tm pour 1,8 L de milieu (g)

II.6.2.2 Description du plan d'expériences n°1

L'adaptation acide de *Lb. bulgaricus* CFL1 est effectuée en fin de fermentation, en faisant varier le pH et la durée (D) d'acidification (figure II.13), juste avant le refroidissement des cellules, c'est-à-dire à 42 °C. Le plan d'expériences utilisé est de type CCRD (Central Composite Rotatable Design) (paragraphe II.6.1).

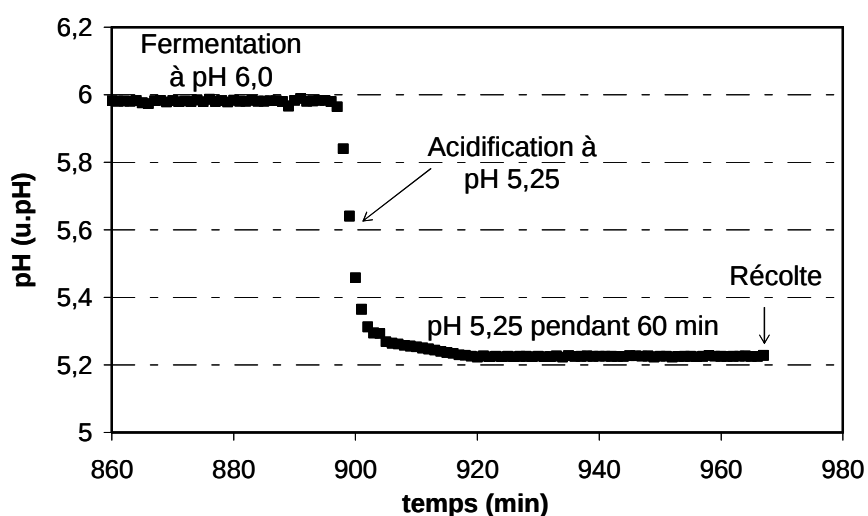


Figure II.13 : évolution du pH lors de l'acidification à pH 5,25 pendant 60 min de *Lb. bulgaricus* CFL1 en fin de fermentation conduite à pH 6

Les conditions d'acidification retenues ont été choisies à partir de résultats préliminaires ainsi que de données bibliographiques. Elles sont présentées au tableau II.3. L'essai A5 est doublé afin d'estimer la reproductibilité des résultats.

Tableau II.3 : matrice du plan d'expériences n°1 de type « CCRD » à 2 facteurs mis en œuvre pour l'étude de l'effet du pH et de la durée d'une acidification en fin de fermentation sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1

Essai	Matrice du plan d'expériences		Matrice des expériences	
	pH _c	D _c	pH	D (min)
A1	-1	-1	4,7	10
A2	-1	1	4,7	50
A3	1	-1	5,8	10
A4	1	1	5,8	50
A5	0	0	5,25	30
A6	-1,414	0	4,5	30
A7	+1,414	0	6,0	30
A8	0	-1,414	5,25	0
A9	0	+1,414	5,25	60

pH_c : valeur codée du pH; D_c : valeur codée de la durée; D: durée d'acidification

Les effets des facteurs (pH et D) sont évalués sur l'activité acidifiante spécifique mesurée après concentration (tc_{spe}), ainsi que sur les pertes d'activité dues à la congélation (dtf_{spe}) et au stockage à -20 °C (k_{spe}). Afin de déterminer les changements induits par l'acidification sur l'état physiologique des cellules, des analyses de la composition en acides gras membranaires et du protéome cellulaire sont également réalisés pour les cellules soumises à la condition optimale d'acidification et à la condition de référence (sans acidification).

Les effets du pH et de la durée d'acidification ont été quantifiés par analyse de variance, complétée par des tests de comparaisons multiples de moyennes, établis au seuil de signification donné par l'analyse de variance (95 %, 99 % ou 99,9 %), selon le test de Newman-Keuls (paragraphe II.7.3).

II.6.2.3 Effet du type d'acide utilisé pour l'acidification

Des essais ont été réalisés pour analyser l'influence du type d'acide utilisé pour l'acidification du milieu en fin de fermentation, sur la résistance des cellules à la congélation et au stockage à -20 °C. Les acides considérés sont l'acide chlorhydrique (HCl) et l'acide sulfurique (H₂SO₄).

Dans ce but, deux fermentations sont effectuées à pH 6. En fin de fermentation (Vm + 3 heures), le milieu fermenté est acidifié à pH 5,25, avec HCl 36 % ou H₂SO₄ 90 %, et deux échantillons sont prélevés (0 et 30 min après acidification).

L'effet du type d'acide est évalué sur l'activité acidifiante spécifique après concentration (tc_{spe}) ainsi que sur les pertes d'activité acidifiante spécifique dues à la congélation (dtf_{spe}) et au stockage à -20 °C (k_{spe}).

Les effets du type d'acide et de la durée d'acidification ont été quantifiés par analyse de variance, complétée par des tests de comparaisons multiples de moyennes, établis au

seuil de signification donné par l'analyse de variance (95 %, 99 % ou 99,9 %), selon le test de Newman-Keuls (paragraphe II.7.3).

II.6.2.4 Effet d'une remontée du pH à 6 après acidification

Il importe de déterminer si l'effet de l'acidification sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1 est dû aux conséquences physiologiques de l'acidification des cellules ou aux conséquences liées au pH acide du milieu. Dans ce but, l'effet du pH du milieu au moment de la congélation, sur l'activité acidifiante spécifique de *Lb. bulgaricus* CFL1, a été analysé.

Le milieu est acidifié en fin de fermentation à pH 5,25 avec H₂SO₄ 90 % et les cellules sont maintenues dans cette condition pendant 0, 30 et 60 min. Après récolte, les cellules sont divisées en deux parties : une partie pour laquelle le pH n'est pas modifié (maintenu à pH 5,25) et l'autre partie où le pH est remonté à pH 6 avant les étapes de concentration et congélation.

Les paramètres caractérisant l'activité acidifiante spécifique sont évalués avant et après congélation, ainsi qu'au cours du stockage sous forme congelée.

Les effets d'une telle remontée du pH avant concentration et congélation ainsi que de la durée d'acidification sont évalués par des analyses de variance, complétées par des tests de comparaisons multiples de moyennes, établis au seuil de signification donné par l'analyse de variance (95 %, 99 % ou 99,9 %), selon le test de Newman-Keuls (paragraphe II.7.3).

II.6.3 Effet des conditions de centrifugation

Le deuxième plan d'expériences vise à étudier l'effet des conditions de centrifugation sur la résistance de *Lb. bulgaricus* CFL1 aux étapes de concentration, congélation et stockage sous forme congelée à -20 °C.

II.6.3.1 Description du plan d'expériences n°2

Les effets de la vitesse de rotation (CS, en g) et de la durée de centrifugation (D, en min) ont été évalués sur les paramètres caractérisant l'activité acidifiante spécifique de *Lb. bulgaricus* CFL1 pendant les étapes de concentration, congélation et stockage. Les différentes conditions de centrifugation utilisées ont été choisies à partir des données disponibles dans la bibliographie et des limites expérimentales des centrifugeuses disponibles au laboratoire. Elles sont présentées au tableau II.4. Les essais C1 et C9 sont doublés.

Tableau II.4 : matrice du plan d'expériences n°2 mis en œuvre pour l'étude de l'effet de la vitesse de rotation et de la durée de centrifugation sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus*

Essais	Matrice du plan d'expérience		Matrice d'expériences	
	CS _c	D _c	CS (g)	D (min)
C1	-1	-1	3 000	15
C2	-1	0	3 000	30
C3	-1	1	3 000	45
C4	0	-1	10 000	15
C5	0	0	10 000	30
C6	0	1	10 000	45
C7	1	-1	17 000	15
C8	1	0	17 000	30
C9	1	1	17 000	45

CS_c : valeur codée de la vitesse de rotation; D_c : valeur codée de la durée; CS : vitesse de rotation ; D: durée de centrifugation

Les effets des facteurs sont quantifiés sur l'activité acidifiante spécifique mesurée en fin de fermentation (tac_{spe}), sur les pertes d'activité dues aux étapes de concentration (dte_{spe}), de congélation (dtf_{spe}) et de stockage à -20 °C (k_{spe}), ainsi que sur l'activité acidifiante spécifique après 365 jours de stockage à -20 °C (t365_{spe}).

Les effets de la vitesse de rotation et de la durée de centrifugation sont évalués par des analyses de variance, complétées par des tests de comparaisons multiples de moyennes, établis au seuil de signification donné par l'analyse de variance (95 %, 99 % ou 99,9 %), selon le test de Newman-Keuls (paragraphe II.7.3).

II.6.3.2 Effet de la température de centrifugation

L'effet de la température de centrifugation sur l'activité acidifiante spécifique de *Lb. bulgaricus* CFL1 a également été analysé. Dans ce but, le milieu fermenté est divisé en deux parties, toutes deux concentrées à 17 000 g pendant 30 min, mais à deux températures différentes (4 ou 15 °C).

L'influence de la température est évaluée sur les paramètres caractérisant l'activité acidifiante spécifique (tac_{spe}, dte_{spe}, dtf_{spe}, k_{spe}, t365_{spe}). Ces effets sont déterminés en comparant les moyennes des descripteurs obtenus à différentes températures, en tenant compte des intervalles de confiance respectifs.

II.6.4 Effet des conditions de microfiltration tangentielle

La troisième et dernière partie de cette thèse a pour objectif d'étudier l'effet des conditions de concentration par microfiltration tangentielle, sur la résistance de *Lb. bulgaricus* CFL1 aux étapes de concentration, congélation et stockage sous forme congelée à -20 °C.

II.6.4.1 Description du plan d'expériences n°3

Un plan d'expériences a permis de décrire l'impact de la vitesse tangentielle (v) et de la pression transmembranaire (TMP) initiales mises en œuvre lors des microfiltrations, sur la résistance des cellules aux différentes étapes du procédé. Le tableau II.5 présente les conditions de microfiltration retenues, choisies à partir de la littérature et en considérant les limites opératoires du module expérimental de microfiltration tangentielle disponible au laboratoire. Les essais CF2 et CF5 sont doublés. Il convient de noter que ces conditions sont maîtrisées en début de microfiltration mais qu'elles varient au cours du procédé, en raison notamment des phénomènes de colmatage.

Tableau II.5 : matrice d'expériences mises en œuvre pour l'étude de l'effet de la vitesse tangentielle et de la pression transmembranaire sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1

Essai	Matrice d'expériences	
	v (m.s ⁻¹)	TMP (MPa)
CF1	5.00	0.26
CF2	3.25	0.26
CF3	3.25	0.42
CF4	1.50	0.26
CF5	3.25	0.10
CF6	4.49	0.37
CF7	4.49	0.15
CF8	2.01	0.15
CF9	2.01	0.37

v : vitesse tangentielle ; TMP : pression transmembranaire

Les effets des facteurs sont évalués sur l'activité acidifiante spécifique mesurée en fin de fermentation (tac_{spe}), sur les pertes d'activité dues aux étapes de concentration (drc_{spe}), de congélation (dtr_{spe}) et de stockage à -20 °C (k_{spe}), ainsi que sur l'activité acidifiante spécifique après 365 jours de stockage à -20 °C ($t365_{spe}$).

Une analyse en composantes principales (ACP) est réalisée sur l'ensemble des variables caractérisant l'activité acidifiante spécifique, en considérant les différentes conditions opératoires étudiées, à l'aide du logiciel *StatBox* 6.7 (Grimmer Soft, Neuilly-sur-Seine, France) (paragraphe II.7.4).

Afin de déterminer l'effet des conditions de microfiltration sur l'état physiologique des cellules, des analyses de la composition en acides gras membranaires et du protéome cellulaire sont également effectuées. Pour cela, les cellules soumises aux conditions de microfiltration conduisant à des résistances extrêmes à la concentration et à la congélation sont analysées.

II.6.4.2 Comparaison entre microfiltration tangentielle et centrifugation

L'effet du type de procédé de concentration (centrifugation ou microfiltration) est quantifié sur les différents paramètres caractérisant l'activité acidifiante spécifique des cellules ($t_{ac_{spe}}$, dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} , $t_{365_{spe}}$). Dans ce but, une partie des cellules de chaque fermentation est concentrée par centrifugation (17 000 g, 30 min, 4 °C) parallèlement à chaque condition de microfiltration. Ces échantillons sont concentrés selon le même facteur de concentration massique, puis traités et analysés de la même façon que ceux obtenus par microfiltration.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne de toutes les répétitions réalisées. Ces moyennes sont comparées aux moyennes obtenues pour les différentes conditions de microfiltration étudiées, permettant ainsi de quantifier les différences de comportement des cellules selon le mode de concentration employé.

II.7 Traitements statistiques

Selon le plan d'expériences considéré, différents traitements statistiques ont été réalisés afin de quantifier les effets des facteurs étudiés.

II.7.1 Régressions linéaires

Afin de quantifier la vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique des échantillons pendant leur stockage à -20 °C (k_{spe}), des régressions linéaires sont réalisées à partir des données expérimentales à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft Corporation).

Les valeurs de k_{spe} sont retenues quand le coefficient d'ajustement des données (R^2) est supérieur à 0,7. Pour garantir la bonne signification des résultats, une analyse de la répartition des résidus est faite pour assurer qu'ils sont répartis en format normalisé. De même, lorsque que zéro est compris dans la zone de l'intervalle de confiance, la pente est considérée nulle.

II.7.2 Régressions linéaires multivariées

Dans le cas du plan d'expériences n°1, des régressions linéaires multivariées sont réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics® Plus 3.0 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA). Le principe de ce type de régression est que la relation entre la variable dépendante et les variables indépendantes est représentée par une équation qui contient un terme exprimant le poids de la somme des valeurs des variables indépendantes, plus un terme couvrant l'erreur des effets non expliqués.

La valeur de R^2 est analysée pour vérifier le bon ajustement de l'équation au jeu de données. Lorsque la valeur de R^2 est supérieure à 0,7, l'ajustement est considéré comme bon et le modèle peut être retenu.

II.7.3 Analyses de variance (ANOVA)

Des analyses de variance sont effectuées avec le logiciel Statgraphics® Plus 3.0 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA) afin de déterminer l'effet de différents facteurs, sur les paramètres caractérisant l'activité acidifiante spécifique des cellules.

L'ANOVA est une méthode statistique utilisée pour étudier les différences de moyenne entre populations. Elle permet de comparer les moyennes de différents groupes et de dire si, parmi ces groupes, au moins un d'entre eux diffère des autres. Mais cette méthode ne permet pas d'identifier le(s) groupe(s) statistiquement(s) différent(s). Dans ce travail, des ANOVA à deux facteurs ont été réalisées : les groupes (conditions expérimentales) se distinguent par deux facteurs qualitatifs (pH et durée d'acidification, par exemple).

Les résultats se présentent sous la forme d'un tableau où, pour chaque facteur ainsi que pour les interactions entre les facteurs (dans le cas d'ANOVA à deux facteurs ou plus), une valeur de probabilité P est associée. Une valeur de P inférieure à 0,05 (ou 5 %) indique un effet significatif du facteur (ou de l'interaction) à 95 %. En revanche, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre deux moyennes, si la valeur de P est supérieure à 5 %. Enfin, plus la valeur de P est petite, plus important est l'effet du facteur en question.

Dans le cas où l'ANOVA montre un effet significatif à au moins 5 % ($P \leq 0,05$), l'analyse est complétée par un test de comparaisons multiples de moyennes de Newman-Keuls. Ce test permet de quantifier, pour chaque descripteur, les différences significatives entre les niveaux de chaque facteur, à partir des moyennes correspondant à chaque valeur de chaque facteur. Dans une situation avec plusieurs individus, ce test permet de grouper ceux qui ne sont pas considérés comme statistiquement différents.

II.7.4 Analyses en composantes principales (ACP)

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée à l'aide du logiciel StatBox™ v6.7 (Grimmersoft, Neuilly-sur-Seine, France). Il s'agit d'une technique de traitement des données, permettant de représenter visuellement les proximités entre les individus et entre les variables. Elle permet d'évaluer le comportement d'une variable par rapport aux autres variables et d'établir des corrélations entre elles.

Dans une première étape, les variables représentant la plus grande variance sont groupées pour former le premier axe. Le deuxième axe représente la prochaine plus grande variance et ainsi de suite, jusqu'au moment où toute la variance des données est

représentée. L'analyse des valeurs propres de chaque axe permet d'identifier le nombre d'axes nécessaires pour bien expliquer la variance des données étudiées. Une fois les axes d'études choisis, les variables sont positionnées dans un espace bidimensionnel, selon le comportement de leur variance par rapport aux axes en question. Lorsque des variables sont représentées par deux points proches, cela signifie qu'elles se comportent de façon similaire.

Dans une deuxième phase, les individus sont positionnés par rapport aux variables. Des individus caractérisés par des valeurs de coordonnées proches d'une variable sont caractérisés par un comportement similaire à la variable en question, et aussi entre eux.

Pendant l'analyse des résultats d'une ACP, il est nécessaire de faire attention à la position des variables et des individus par rapport aux axes pour pouvoir bien expliquer les différences de comportements observés. Avant d'analyser les résultats, il est conseillé d'identifier l'axe majoritaire qu'explique chaque variable et chaque individu.

Chapitre III - Résultats et discussion

III.1 Influence d'une acidification en fin de fermentation sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1

III.1.1 Contexte et objectifs

Comme décrit précédemment dans la synthèse bibliographique, plusieurs travaux ont été réalisés en vue d'améliorer la résistance des bactéries lactiques à l'étape de congélation, qui est considérée comme critique pour le maintien de la qualité des cellules. Les résultats correspondant à l'adaptation des cellules avant leur congélation semblent particulièrement intéressants, même s'ils conduisent à une dégradation de la productivité des procédés de production de ferments.

Dans ce contexte, l'objectif de la première partie de cette thèse vise à étudier l'effet d'une préadaptation acide des cellules, en fin de fermentation, sur la résistance à la congélation et au stockage sous forme congelée à -20 °C de *Lb. bulgaricus* CFL1. De cette façon, une amélioration de la cryotolérance des cellules, tout en gardant une bonne productivité du procédé, est attendue. Dans ce but, le travail a été conduit en quatre étapes, dont les objectifs sont de :

- caractériser l'effet de cinq pH et de cinq durées d'acidification, à l'aide d'un plan d'expériences, sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1 ;
- identifier les conditions d'acidification optimales, permettant de maximiser la résistance des cellules aux étapes de stabilisation ;
- analyser l'effet du type d'acide utilisé pour effectuer l'acidification du milieu fermenté, sur la cryotolérance des cellules ;
- analyser l'impact du pH de congélation sur le comportement des cellules pendant la congélation.

La cryotolérance des cellules a été caractérisée par leur activité acidifiante spécifique initiale ($t_{c_{spe}}$), leur perte d'activité acidifiante spécifique pendant la congélation (dtf_{spe}) et leur vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique pendant le stockage sous forme congelée (k_{spe}).

Les résultats obtenus font objet d'une première publication parue dans « Journal of Biotechnology » (Streit *et al.*, 2007) qui constitue la partie III.1.2.

III.1.2 Publication 1. L'acidification améliore la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1

Résumé

L'effet d'une acidification du milieu fermenté en fin de culture a été analysé sur la croissance et la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1, comme une nouvelle approche pour mieux préserver les bactéries lactiques. La cryotolérance a été déterminée par la perte d'activité acidifiante spécifique pendant la congélation et le stockage sous forme congelée. Grâce à la mise en œuvre d'un plan d'expériences, la condition d'acidification optimale pour améliorer la cryotolérance a été déterminée. Elle correspond à un pH de 5,15 maintenu pendant 30 min. Ces conditions ont permis d'obtenir, en outre, une productivité élevée en biomasse. L'acide sulfurique, lorsqu'il est utilisé pour l'acidification, conduit à des cellules plus cryotolérantes que l'acide chlorhydrique. De plus, la remontée du pH après l'acidification diminue légèrement l'effet du choc acide, et augmente la cryotolérance des cellules. En conséquence, il est possible de conclure que l'augmentation de la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1 est liée à une adaptation physiologique pendant les 30 min d'acidification à pH 5,15.

Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1

Fernanda Streit^a, Georges Corrieu^a, Catherine Béal^{b,*}

^a INRA, UMR 782, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, CBAI, 78850 Thiverval-Gignon, France

^b INA P-G, UMR 782, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, CBAI, 78850 Thiverval-Gignon, France

Received 30 August 2006; received in revised form 23 October 2006; accepted 15 November 2006

Abstract

The effect of acidification of the fermented broth at the end of the culture was examined on the growth and the cryotolerance of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1, as a new means to better preserve lactic acid bacteria. Cryotolerance was investigated by evaluating the loss of specific acidification activity during freezing and frozen storage. An experimental design made it possible to determine optimal acidification conditions that improved cryotolerance, such as pH 5.15 for 30 min. These conditions were also conducive to high biomass productivity. By considering the type of acid used, H₂SO₄ enabled us to obtain cells with better cryotolerance, as compared to HCl. It was also observed that increasing the pH after acidification slightly minimised the acid shock, thus improving cryotolerance. Moreover, it was concluded that this improvement was related to a physiological adaptation of *L. bulgaricus* CFL1 during the 30-min acidification at pH 5.15.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Acid adaptation; Acidification activity; Cryotolerance; Lactic acid bacteria

1. Introduction

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* is a Gram-positive lactic acid bacterium that has the major

technological property of producing lactic acid from anaerobic lactose fermentation of milk. This function is responsible for the worldwide application of this species in the production of yogurt (Guillouard et al., 2004), cheese and other fermented products (De Urraza and De Antoni, 1997).

During industrial production of starter cultures, bacteria are subjected to different types of stress, which result in the loss of viability and metabolic activity, membrane damage and morphological cell changes (Bâati et al., 2000; Ouvry et al., 2002; Saarela et al., 2005). These stresses arise from the bacterial

Abbreviations: dk_{spe} , loss of specific acidification activity during freezing; k_{spe} , rate of loss of specific acidification activity during frozen storage; t_{spe} , specific acidification activity; tc_{spe} , specific acidification activity before freezing; tf_{spe} , specific acidification activity after freezing; t_s , time of storage

* Corresponding author. Tel.: +33 1 3081 5485;

fax: +33 1 3081 5597.

E-mail address: beal@grignon.inra.fr (C. Béal).

0168-1656/\$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jbiotec.2006.11.012

environment (thermic, acid, nutritional and osmotic stresses) or from the starter production process (mechanical, hypothermic, osmotic and oxidative stresses). Among them, cold stress is of particular interest as it concerns all kinds of cells when they are subjected to a stabilisation process, either during starter production or for culture collections.

To more effectively withstand these adverse conditions, lactic acid bacteria develop different stress-sensing systems and defences that permit them to resist harsh conditions and sudden environmental changes (Van de Guchte et al., 2002). These physiological changes are referred to as stress responses. Moreover, according to Panoff et al. (1995) and Kim et al. (1999), adaptative responses appear when bacteria are exposed to moderate levels of stress. They allow the cells to acquire increased tolerance when they are subsequently submitted to higher levels of the same stress or of another stress (cross-protection) (Sanders et al., 1999).

Adapting bacterial cells to cold stress is advantageous since it can improve their further cryotolerance. A first approach concerns homologous adaptation, which consists in leaving the cells at a moderately low temperature before freezing or freeze-drying. By studying the effect of incubation temperature on cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758, Wang et al. (2005a) achieved a better cryoresistance at -20°C when the cells were cultivated at low temperatures ($30\text{--}37^{\circ}\text{C}$ instead of 42°C). Panoff et al. (1995) studied the influence of cold adaptation on the cryotolerance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. They showed that a preincubation of the cells at 8°C for 48 h increased their cryotolerance at -20°C , with 95% of cell survival, whereas 4°C was not effective due to an inhibition of stress protein synthesis. The effect of the incubation of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* at suboptimal temperatures before freezing at -20°C was studied by De Urraza and De Antoni (1997). They showed that incubating the cells at 30°C for 60 min made them more resistant to freezing at -20°C after 10 and 45 days of storage. The influence of cooling temperature and duration on the resistance to freezing and frozen storage at -20°C of *L. acidophilus* RD758 was studied by Wang et al. (2005b). They found that a cooling time of 8 h at a moderate temperature (28°C) allowed obtaining more cryotolerant cells, especially during frozen storage. The authors explained this cryoadaptation by two combined

physiological responses: changes in the membrane fatty acid composition and thus, in membrane fluidity and an increased synthesis of four proteins.

Another approach consists in applying a moderate acid stress to lactic acid bacteria, in order to increase their cryotolerance by heterologous adaptation. Palmfeldt and Hahn-Hägerdal (2000) compared the effect of two culture pH values on the viability of freeze-dried cells of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. They found that cells cultivated at pH 5 were more resistant to freeze-drying, as compared to pH 6, and that these effects were more important for stationary phase cells. More recently, Wang et al. (2005a) improved the cryotolerance of *L. acidophilus* RD758 during freezing and frozen storage at -20°C , by cultivating the cells at pH 5 instead of pH 6. They attributed this improvement to a higher cycC19:0 relative concentration in membrane fatty acids. Finally, Bâti et al. (2000) demonstrated that exposure of *L. acidophilus* to pH 5.5 induced an increase in intracellular protein level that was related to a better survival rate after freezing at -80°C .

On the basis of these results, improvement of the cryotolerance of lactic acid bacteria was achieved by applying a cooling step after the culture or by performing the cultures at low temperature or acidic pH. Nevertheless, these operations greatly increased process time. Moreover, they often led to reduced biomass production because cultures were not done under optimal conditions. Even if these considerations are not critical for preservation within culture collections, they are detrimental when considering these operations at an industrial scale.

This work aimed to improve the cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1 during freezing and frozen storage, without considerably increasing the culture time and with limited deterioration of the biomass production level. It analysed the effect of acidification of the fermented broth at the end of the culture. Conditions of acidification such as pH, duration, type of acid used and pH neutralisation after acidification will be examined.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and media

The microorganism used in this study was *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 (INRA,

Thierval-Grignon, France). Frozen aliquots were stored at -75°C . They were precultured two times in 5 ml MRS broth (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) at 42°C , for 24 and 8 h, respectively, before inoculation of the bioreactor.

The culture medium was composed of 60 g l^{-1} of sweet whey powder (Eurosérum, Port-sur-Saône, France), that was heat-treated at 110°C for 20 min after adjustment at pH 5 with 50% H_2SO_4 . After centrifugation ($17,000 \times g$, 20 min, 4°C) and filtration ($0.45\text{ }\mu\text{m}$), the supernatant was supplemented with 20 g l^{-1} lactose (Prolabo, Briare-le-Canal, France) and 5 g l^{-1} yeast extract (Organotechnie, La Courneuve, France). It was sterilised in the fermentor at 110°C for 20 min.

MRS agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) (70.3 g l^{-1}) was used for cell counts. It was heat-treated at 121°C for 15 min.

The medium used for acidification activity measurements was composed of 100 g l^{-1} reconstituted dried skim milk (EPI Ingrédient, Ancenis, France). It was sterilised for 20 min at 110°C in 150 ml Erlenmeyer flasks and stored at 4°C before use.

2.2. Fermentation and stabilisation

Cultures were performed in a 2.2-l fermentor (LSL-Biolafitte, St Germain-en-Laye, France) with 1.8 l working volume. Inoculation was done at a very low initial level ($5 \pm 2.4\text{ CFU ml}^{-1}$), in order to achieve a long lag phase, and then an overnight culture. During fermentation, temperature and pH were controlled at set-points of 42°C and pH 6, with an agitation speed of 100 rpm. The pH regulation was done by introducing 6% NaOH (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) by using a peristaltic pump. The continuous weighing of neutralising solution made it possible to follow the evolution of the process and to identify the time at which the culture entered the stationary phase, corresponding to the time at which the rates of variation of conductivity and NaOH consumption were maximal in absolute value (Wang et al., 2005b).

The cultures were stopped 3 h after the beginning of the stationary phase. The cell suspension was acidified according to the experimental design conditions and then rapidly cooled to 15°C . As a reference, an additional culture was conducted at pH 6 without acidification.

Cells were harvested and concentrated by centrifugation ($17,000 \times g$, 30 min, 4°C). Concentrated cells were resuspended in three times their weight of supernatant. Aliquots of $500\text{ }\mu\text{l}$ were frozen and stored at -20°C for 24 weeks for acidification activity measurements. They were thawed at 30°C for 5 min before analyses.

2.3. Specific acidification activity measurements

The acidification activity of $100\text{ }\mu\text{l}$ samples was measured in milk at 42°C , in triplicate, by the CINAC system (Corrieu et al., 1988). The time necessary to reach pH 5.8 (tpH5.8, in min) was chosen to characterise the acidification activity of the bacterial suspensions. The higher the tpH5.8, the longer the latency phase and the lower the acidification activity.

Cell concentrations (CFU ml^{-1}) were determined by plate counting on MRS agar. The plates were incubated under anaerobic conditions (GENbox anaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 42°C for 72 h. Results corresponded to geometrical means of at least three counts.

The specific acidification activity (t_{spe} , in min $(\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1}$) was defined as the ratio of tpH5.8 to the corresponding log of cell concentration. It was measured before freezing (t_{spe} , in min $(\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1}$), after freezing (t_{spe}^f , in min $(\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1}$) and after different storage times at -20°C . The loss of specific acidification activity during freezing (dt_{spe} , in min $(\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1}$) was calculated as the difference between t_{spe} and t_{spe}^f :

$$dt_{\text{spe}} = t_{\text{spe}}^f - t_{\text{spe}} \quad (1)$$

The loss in specific acidification activity as a function of storage time (t_s , in d) was linear, as previously shown by Fonseca et al. (2000) with non-specific parameters (Fig. 1):

$$t_{\text{spe}} = t_{\text{spe}} + dt_{\text{spe}} + k_{\text{spe}} \times t_s \quad (2)$$

where k_{spe} is the slope of the regression line (in min $(\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1} \text{ d}^{-1}$). It represented the rate of loss in specific acidification activity during frozen storage. A high value of k_{spe} was related to a rapid decrease in specific acidification activity, and indicated that the cell suspension was sensitive to storage conditions.

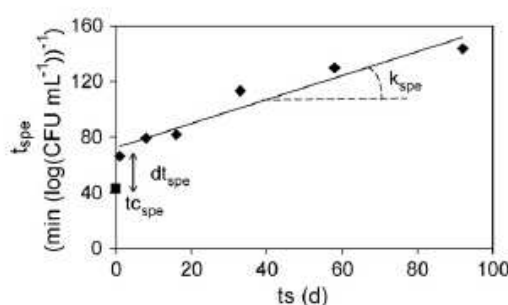


Fig. 1. Loss in specific acidification activity of *L. bulgaricus* CFL1 during freezing and frozen storage at -20°C . t_{spe} : specific acidification activity ($\text{min}(\log(\text{CFU mL}^{-1}))^{-1}$); t_s : storage time (days); t_{cspe} : specific acidification activity before freezing ($\text{min}(\log(\text{CFU mL}^{-1}))^{-1}$); $d t_{\text{spe}}$: loss of specific acidification activity during freezing ($\text{min}(\log(\text{CFU mL}^{-1}))^{-1}$); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage at -20°C ($\text{min}(\log(\text{CFU mL}^{-1}))^{-1} \text{d}^{-1}$).

2.4. Experimental designs and statistical analyses

A second-order central composite rotatable design was used to characterise the main effects and interactions of pH and duration of acidification on the cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1. It permitted the representation of each variable by a linear quadratic model, including pH, duration and their interaction, with a reduced number of experiments. Table 1 details the experimental design conditions used in this study.

For each variable (Y), the multivariable second-order linear regression allowed finding a polynomial

as a function of pH (pH) and duration (D), as follows:

$$Y = a_0 + a_1 \times \text{pH} + a_2 \times D + a_{11} \times \text{pH}^2 + a_{22} \times D^2 + a_{12} \times \text{pH} \times D \quad (3)$$

where a_0 was a constant term, a_1 and a_2 corresponded to the linear effects, a_{11} and a_{22} to the quadratic effects, and a_{12} to the interaction effect.

The effects of these two factors on the specific acidification activity before freezing (t_{cspe}), on the loss measured during freezing ($d t_{\text{spe}}$) and on the rate of loss during storage at -20°C (k_{spe}) were analysed.

In a second part, tests were carried out to check the influence of the type of acid used for the acidification of the fermented medium on the specific acidification activity of the concentrated cells. At the end of the culture, fermented medium was acidified at pH 5.25, either with 36% HCl or with 90% H_2SO_4 . Two samples were taken (0 and 30 min after acidification) to evaluate the specific acidification activity parameters: t_{cspe} , $d t_{\text{spe}}$ and k_{spe} .

Finally, the influence of an increase of the pH after acidification on the specific acidification activity of *L. bulgaricus* CFL1 was determined. At the end of the culture, the fermented medium was acidified at pH 5.25 with 90% H_2SO_4 . It was maintained in this condition during 0, 30 or 60 min. Recovered cells were divided into two parts: in the first one, the pH remained unchanged, whereas in the second one, the pH was raised to pH 6 before concentration and freezing. Specific acidification activity parameters were then investigated.

Statistical analyses were made with the software Statgraphics plus 3.0.

Table 1

Experimental design used to study the effect of acidification conditions on the cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1

Experiments	Design matrix		Work matrix	
	pH _c	D _c	pH	D
1	-1	-1	4.7	10
2	-1	1	4.7	50
3	1	-1	5.8	10
4	1	1	5.8	50
5–6	0	0	5.25	30
7	-1.41	0	4.5	30
8	+1.41	0	6.0	30
9	0	-1.41	5.25	0
10	0	+1.41	5.25	60

pH_c: coded value of pH; D_c: coded value of duration; D: duration of acidification (in min).

3. Results

3.1. Fermentation kinetics

In order to further evaluate the effect of different acidification conditions on cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1, it was necessary to produce cells in a similar physiological state. In this first part of the work, we assessed and compared the kinetics and yields of the six cultures that were conducted within the experimental designs.

On-line measurements of NaOH consumption and electrical conductivity of culture medium made it possible to evaluate and compare the kinetics of *L. bulgaricus* CFL1 growth. By considering the six cultures done in this study, the lag-phase ranged between 500 and 550 min. It was followed by an exponential-phase of 164–214 min. Consequently, the time necessary to reach the end of the exponential phase was 714 ± 21.5 min. The maximal rates of NaOH consumption and conductivity change were equal to $-0.39 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $0.06 \pm 0.006 \text{ mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively. At the end of the exponential phase, cells consumed $33.3 \pm 1.2 \text{ g l}^{-1}$ of 6% NaOH in order to maintain the pH at 6, and the electrical conductivity was enhanced to $5.2 \pm 0.32 \text{ mS cm}^{-1}$. Biomass concentration increased from $5 \pm 2.4 \text{ CFU ml}^{-1}$ to $2 \times 10^7 \pm 5 \times 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$. During the cultures, cells consumed $39.3 \pm 1.5 \text{ g l}^{-1}$ of lactose and produced $13.4 \pm 0.6 \text{ g l}^{-1}$ of galactose and $11.2 \pm 0.4 \text{ g l}^{-1}$ of lactic acid. Regardless of the considered parameter, confidence intervals at 95% were low, as compared to the mean results. Consequently, it was considered that the cultures were similar and that the cells were recovered in a similar physiological state.

3.2. Influence of acidification of fermented broth on cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1

Lowering the pH of the fermented broth at the end of the culture allowed changes in specific acidification activity of *L. bulgaricus* CFL1. The effects of five pHs and five durations of acidification were determined with the aid of analyses of variance. Table 2 shows that pH and duration of acidification (D) displayed linear and quadratic effects ($P < 0.05$) on three parameters that characterised the specific acidification activity (t_{spe} , d_{spe} and k_{spe}). Moreover, the interaction between pH and D was significant ($P < 0.05$) on the loss of specific acidification activity during freezing.

These effects were represented by estimated response surfaces, applied to t_{spe} , d_{spe} and k_{spe} (Fig. 2). The specific acidification activity measured before freezing was comprised between 30 and 43 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1}$). For the fermentation conducted without acidification, this parameter was equal to 45 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1}$), with a $\text{tpH}5.8$ value of 328 min and a cell concentration

Table 2

Effect of pH and duration of acidification on the parameters characterising the specific acidification activity of *L. bulgaricus* CFL1

Variables	Simple effects		Quadratic effects		Interactions
	pH	D	pH^2	D^2	$\text{pH} \times D$
t_{spe}	0.00	0.00	0.00	2.14	26.11
d_{spe}	11.47	82.96	0.06	2.52	4.63
k_{spe}	0.00	3.38	2.67	0.03	20.58

D : Duration of acidification (min); t_{spe} : specific acidification activity before freezing ($\text{min} (\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1}$); d_{spe} : loss of specific acidification activity during freezing ($\text{min} (\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1}$); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage ($\text{min} (\log(\text{CFU ml}^{-1}))^{-1} \text{ d}^{-1}$). In bold: significant effect. P value in (%).

of $1.8 \times 10^7 \text{ CFU ml}^{-1}$. The loss of specific acidification activity during freezing, measured for the different acidification conditions, ranged between 17 and 35 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1}$) (Fig. 2), whereas it was 34 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1}$) for the reference fermentation. The interaction between pH and duration showed that lowering the pH improved the cryotolerance mainly for the longer durations ($D > 30$ min), whereas it was less effective for shorter acidification. The rate of loss during frozen storage varied from 0.31 to 0.57 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Fig. 2). It was generally lower than the one obtained for the fermentation conducted without acidification (0.57 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1} \text{ d}^{-1}$)). Finally, after 90 days of frozen storage at -20°C , values of $\text{tpH}5.8$ for the different acidification conditions ranged between 532 and 626 min, and corresponding cell concentrations were comprised between $1.1 \times 10^4 \text{ CFU ml}^{-1}$ and $2.4 \times 10^5 \text{ CFU ml}^{-1}$. The subsequent specific acidification activities were comprised between 99 and 162 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1}$), and were equivalent or better than the one measured for the reference fermentation (163 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})^{-1}$)). As a consequence, the results obtained within the experimental design were better, or at least equivalent, than those achieved without acidification (reference fermentation). This emphasised the positive effect of acidification of the fermented broth in relation to cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1.

The optimal values corresponding to each variable of specific acidification activity (t_{spe} , d_{spe} and k_{spe}) represented the lowest values that could be achieved within the experimental conditions. They

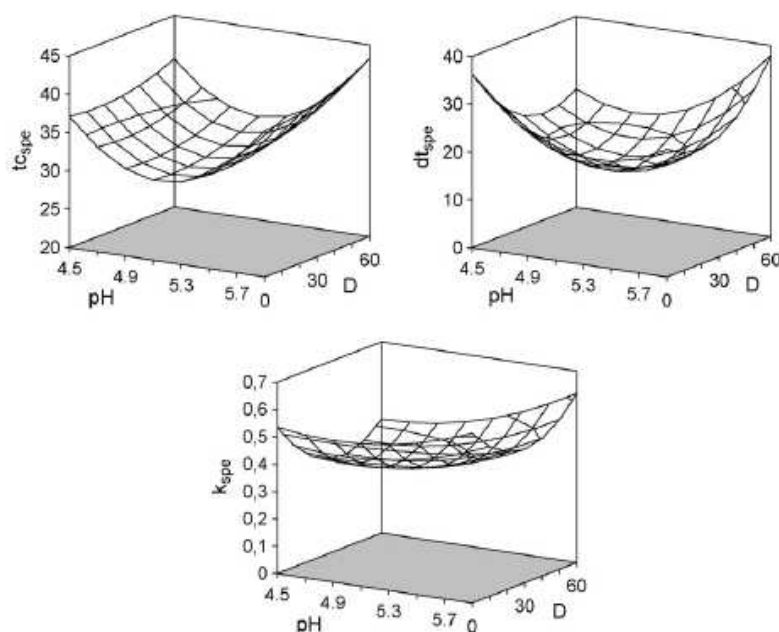


Fig. 2. Estimated response surfaces representing the effects of pH and duration (D , in min) of acidification, on the initial specific acidification activity (tc_{spe} , in min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1}$), and on the loss of specific acidification activity during freezing (dt_{spe} , in min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1}$) and frozen storage (k_{spe} , in min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1} \text{ d}^{-1}$) of *L. bulgaricus* CFL1.

were calculated by annullating the partial derivative of the polynomials that characterised the variables. A pH of 5.15 and a duration of 31 min were found to be the optimal conditions that minimised the loss of specific acidification activity during freezing (dt_{spe}), which was then equal to 15.7 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1}$. The optimal value of tc_{spe} (30.2 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1}$) was obtained after 10 min of acidification at pH 5.15. Nevertheless, a very small variation of tc_{spe} (0.6 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1}$) was observed at pH 5.15, between 10 and 30 min. Consequently, it could be considered that optimal conditions for tc_{spe} were mainly defined by the pH of acidification, whereas a range of duration comprised between 10 and 30 min was effective. The optimal acidification conditions that minimised the rate of loss of specific acidification activity during storage at -20°C were pH 4.7 and 36 min. They allowed the k_{spe} value to be lowered to 0.34 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1} \text{ d}^{-1}$. In contrast to tc_{spe} , the main variation of k_{spe} was caused by the duration of acidification instead of the pH. An increase of only 0.02 min ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$) $^{-1} \text{ d}^{-1}$ was observed by changing the pH from 4.7 to 5.15.

Finally, these results permitted to define the optimal conditions as pH 5.15 and duration of 30 min, to minimise all the specific acidification activity parameters. Moreover, this work pointed out the importance of considering pH and duration of acidification simultaneously, in order to achieve a cellular adaptation to cold stress.

3.3. Effect of the acid used for acidification of the fermented broth on cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1

Once a positive effect of acidification of fermented broth on cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1 was found, we wanted to know if this phenomenon was type of acid-dependent. With this aim in view, this part of the study analysed the effect of acidification at pH 5.25, for 0 and 30 min, carried out with 90% H_2SO_4 or with 36% HCl . These experimental conditions were chosen because they were included in the previous experimental design. Table 3 presents the mean values of each variable for each factor condition, and the

Table 3

Means and multiple comparison tests showing the effects of the type of acid and the duration of acidification at pH 5.25 on specific acidification activity parameters of *L. bulgaricus* CFL1

Parameters	Acid type		Duration of acidification (min)	
	HCl	H ₂ SO ₄	0	30
t_{spe}	27.7 ^a	30.0 ^b	29.1 ^a	28.6 ^b
$d_{t_{spe}}$	56.8 ^a	15.0 ^b	38.5 ^a	33.3 ^b
k_{spe}	1.43 ^a	0.43 ^b	1.08 ^a	0.78 ^b

Superscript letters (a and b) show significant difference at 0.1%. t_{spe} : specific acidification activity before freezing (min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹); $d_{t_{spe}}$: loss of specific acidification activity during freezing (min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage at -20°C (min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹ d⁻¹).

corresponding results of the multiple comparison tests of Newman-Keuls.

The type of acid, the duration of acidification at pH 5.25 and the interaction between these two factors showed significant effects on the three specific acidification activity parameters. According to Table 3, the effects observed on t_{spe} were significant, but very slight. It could be considered that the type of acid used did not change the initial acidification activity of the concentrated cells. Moreover, the slight influence of duration of acidification on t_{spe} confirmed our previous results. In contrast, use of HCl instead of H₂SO₄ strongly deteriorated the resistance of the strain during freezing ($d_{t_{spe}}$) and frozen storage (k_{spe}). Using H₂SO₄ led to a reduction of $d_{t_{spe}}$ of 42 min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹ after freezing, and of k_{spe} of 1 min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹ d⁻¹ during storage at -20°C. The greater loss of specific acidification activity observed with HCl could be related to an osmotic change of the medium, due to NaCl accumulation. This salt resulted from the reaction between HCl and NaOH used to maintain the fermentation pH constant. The duration of acidification also showed a significant effect on $d_{t_{spe}}$ and k_{spe} . Moreover, Table 3 confirms that a 30 min acidification allowed obtaining cells that were more resistant to freezing and to frozen storage.

Finally, these results led to conclude that the use of H₂SO₄ was more effective than HCl for increasing the cryotolerance of the cells. Moreover, they confirmed that acidification at pH 5.25 for 30 min before freezing was effective for improving the cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1.

3.4. Effect of a pH increase after acidification of the fermented broth on cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1

The last part of the study attempted to determine if the positive effect of acidification was linked to the low pH of the medium during freezing and frozen storage or, more likely, to metabolic modifications of the cells during the 30-min acidification step. To answer this question, cells were acidified at pH 5.25 with H₂SO₄, for 0, 30 or 60 min, and the pH was further increased, or not, to pH 6, before freezing. Table 4 shows the mean values of each variable for each factor condition, and the corresponding results of the multiple comparison tests of Newman-Keuls.

Duration of acidification and pH increase showed significant effects on specific acidification activity parameters. The effect of both factors on the initial acidification activity (t_{spe}) was significant, but very slight. This result indicated that the acidification step was not responsible for an important change in t_{spe} values. Results concerning the influence of duration of acidification on cryotolerance confirmed that 30-min acidification led to the lower values of $d_{t_{spe}}$ and k_{spe} . Finally, increasing the pH from 5.25 to pH 6 after acidification slightly reduced the values of the specific acidification activity parameters measured after freezing ($d_{t_{spe}}$) and during frozen storage (k_{spe}). This indicates that cryotolerance during freezing and storage was improved by this pH increase. Nevertheless, differences remained small.

Table 4

Means and multiple comparison tests showing the effects of duration of acidification and further pH increase on specific acidification activity parameters of *L. bulgaricus* CFL1

Parameters	Duration of acidification (min)			pH increase	
	0	30	60	Without	With
t_{spe}	30.8 ^a	30.7 ^a	33.8 ^b	31.0 ^a	32.6 ^b
$d_{t_{spe}}$	18.3 ^a	9.8 ^b	15.7 ^c	15.9 ^a	13.3 ^b
k_{spe}	0.72 ^a	0.56 ^b	0.69 ^a	0.72 ^a	0.60 ^b

Superscript letters (a–c) show difference at 0.1%. t_{spe} : specific acidification activity before freezing (min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹); $d_{t_{spe}}$: loss of specific acidification activity during freezing (min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage at -20°C (min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹ d⁻¹).

4. Discussion

Within the culture conditions used in this work, the time to reach the end of the exponential phase was twice as long as the ones observed by Béalet et al. (1989, 1994), both using *Lactobacillus bulgaricus* 398. These authors obtained an increase of 3 log in cell concentration, whereas we achieved a 7 log increase. This difference could be explained by the small inoculation rate used in our study and by the different strains of *L. bulgaricus*.

By comparing the kinetic and yield parameters, good repeatability was achieved. This result was important because it revealed that cells of *L. bulgaricus* CFL1 used in this study were in a similar physiological state.

Experimental design results made it possible to determine optimal acidification conditions in order to improve cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1. Firstly, it was demonstrated that improving cryotolerance required a combination of pH and duration. Among all acidification conditions tested, optimal pH of 5.15 and duration of 30 min were found. They minimised both the loss of specific acidification activity during freezing and the rate of loss during frozen storage. Moreover, an excessively acidic pH (pH 4.7) was not effective for adapting the cells. This beneficial effect of acidification indicated that cells were able to develop physiological adaptation responses to moderate acid stress. These biological mechanisms acted to improve the resistance of the concentrated cells to the subsequent cold shock. This result was in agreement with the literature. Båati et al. (2000) displayed a better cell survival rate after freezing at -80°C for *L. acidophilus* ATCC 4356 cultivated under non-regulated pH conditions, as compared to controlled pH. Moreover, Palmfeldt and Hahn-Hägerdal (2000) and Wang et al. (2005a) improved the freeze-drying and the freezing resistance of the cells, respectively, after cultivating lactic acid bacteria under acidic conditions. Wang et al. (2005a) explained the beneficial effect of acidic pH by modifications of membrane fluidity that allowed the cells to more effectively resist cold stress suffered during freezing. Nevertheless, these three studies led to low biomass productivity, either as a result of low biomass concentrations (non-controlled pH cultures) or long process times (cultures conducted at low pH).

By investigating the effect of the type of acid (HCl or H_2SO_4) on the specific acidification activity param-

eters, it was observed that H_2SO_4 allowed obtaining cells with better cryotolerance. Our hypothesis that the negative effect of HCl could be linked to NaCl accumulation was in agreement with the results obtained by Font de Valdez et al. (1983), who showed that *L. bulgaricus* is highly susceptible to the presence of sodium chloride. It is also in agreement with the work of Linders et al. (1997) who showed that the residual activity of *L. plantarum* after drying decreased in the presence of NaCl. Moreover, both HCl and H_2SO_4 are strong acids, but we did not find evidence of extensive studies about the effect of strong acids on bacterial cryotolerance in the literature. Weak acids have been more extensively studied. According to O'Driscoll et al. (1997) and Jan et al. (2000), the protonated form of weak acids can pass across the cell membrane, resulting in an intensification of the deleterious effect of low pHs. In the same way, Foster (1999) showed that organic acids (e.g., acetate and lactate) led to a decrease of intracellular pH and permitted the accumulation of intracellular anions in cells. They concluded that these acids had a more negative effect on the cells than inorganic acids.

Increasing the pH before freezing showed a slightly positive effect on the cryotolerance of *L. bulgaricus* CFL1, thus making it possible to obtain cells that were more resistant to freezing and frozen storage. This result was consistent with the work of Saarela et al. (2005), who demonstrated that the neutralisation of the medium before freezing minimised the acid shock due to hydrogen ion concentration. As a consequence, our results showed that the positive effect of acidification was linked to physiological changes of the cells during acidification, rather than to the acidity of the medium during the freezing step.

As a final conclusion, we proved that controlled acidification of *L. bulgaricus* cells at the end of the culture, under optimal conditions, made it possible to increase their cryotolerance. This improvement was related to a physiological adaptation of the cells. Moreover, it was linked to a sufficiently high level of biomass productivity that was neither altered by optimal culture conditions nor by long culture times. To better understand the mechanisms involved in this acid adaptation, some key features that characterised the physiological state of *L. bulgaricus* CFL1, such as fatty acid composition and proteome, will be studied in the near future. Moreover, it would be interesting to broaden this

approach, by considering other strains of *L. bulgaricus* and, more generally, other lactic acid bacteria.

Acknowledgement

This work was partly supported by the CAPES Foundation (Brazil).

References

- Bâti, L., Fabre-Gea, C., Auriol, D., Blanc, P.J., 2000. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 241–247.
- Béal, C., Louvet, P., Corrieu, G., 1989. Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 148–154.
- Béal, C., Spinnler, H.E., Corrieu, G., 1994. Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 95–98.
- Corrieu, G., Spinnler, H.E., Jomier, Y., Picque, D., 1988. Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters. Patent, INRA, FR 2,629,612.
- De Urraza, P., De Antoni, G., 1997. Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar. *Cryobiology* 35, 159–164.
- Fonseca, F., Béal, C., Corrieu, G., 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.* 67, 83–90.
- Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G., 1983. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* 20, 560–566.
- Foster, J.W., 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 170–174.
- Guillouard, I., Lim, E.M., Van de Guchte, M., Grimaldi, C., Penaud, S., Maguin, E., 2004. Tolerance and adaptive acid stress of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lait* 84, 1–6.
- Jan, G., Rouault, A., Maubois, J.L., 2000. Acid stress susceptibility and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Lait* 80, 325–336.
- Kim, W.S., Ren, J., Dunn, N.W., 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 57–65.
- Linders, L.J.M., Meerdink, G., van't Riet, K., 1997. Effect of growth parameters on the residual activity of *Lactobacillus plantarum* after drying. *J. Appl. Microbiol.* 82, 683–688.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., 1997. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2679–2685.
- Ouvry, A., Wache, Y., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., Cachon, R., 2002. Effects of oxidation-reduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 257–261.
- Palmfeldt, J., Hahn-Hagerdal, B., 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 235–238.
- Panoff, J., Thamavongs, B., Laplace, J., Hartke, A., Boutibonnes, P., Auffray, Y., 1995. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403. *Cryobiology* 32, 516–520.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T., Mäntö, J., 2005. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1330–1339.
- Sanders, J.W., Venema, G., Kok, J., 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 483–501.
- Van de Guchte, M., Serron, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 187–216.
- Wang, Y., Corrieu, G., Béal, C., 2005a. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *J. Dairy Sci.* 88, 21–29.
- Wang, Y., Delettre, J., Guillot, A., Corrieu, G., Béal, C., 2005b. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* 50, 294–307.

III.1.3 Conclusion

Ces résultats permettent de conclure qu'une acidification contrôlée des cellules de *Lb. bulgaricus* CFL1 à la fin de la fermentation, conduite dans des conditions optimales de température et pH, induit une amélioration de leur cryotolérance, à la fois pendant l'étape de congélation et pendant le stockage des cellules sous forme congelée. Parmi les neuf conditions d'acidification étudiées, les cellules acidifiées à pH 5,25 pendant 30 min sont plus résistantes à la congélation (54 %) et 1,5 fois plus stables pendant le stockage que les cellules non adaptées. Cette condition est proche de la condition optimale, établie à travers l'analyse des polynômes obtenus grâce au plan d'expériences, qui est égale à pH 5,15 et 31 min.

Selon l'approche proposée dans cette étude, l'adaptation est réalisée en fin de fermentation et, de ce fait, la productivité du procédé est maintenue à une valeur élevée. En effet, la durée de la phase d'adaptation est courte (30 min) alors que les conditions de culture restent optimales, générant ainsi des temps de fermentation corrects.

La cryotolérance des cellules est également liée au type d'acide utilisé pour l'acidification. L'utilisation de HCl induit un changement osmotique dans le milieu, du à la formation de NaCl, ce qui engendre un effet négatif sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1. De ce fait, l'usage de H₂SO₄ conduit à un meilleur résultat. Le pH des concentrés bactériens au moment de leur congélation impacte aussi sur la cryotolérance des cellules. La remontée du pH des cellules après acidification et avant congélation a permis une légère amélioration de la cryotolérance. Selon notre analyse, cela signifie que l'adaptation acide observée n'est pas liée au caractère acide du milieu, mais bien à une adaptation physiologique des cellules. Il importe maintenant de comprendre les phénomènes biologiques observés.

III.2 Influence d'une acidification en fin de fermentation sur les réponses physiologiques au niveau de la membrane et du protéome, liées à une meilleure cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1

III.2.1 Contexte et objectifs

Les résultats présentés dans la partie III.1 montrent qu'une acidification modérée des cellules, pratiquée en fin de fermentation, est responsable d'une meilleure résistance de celles-ci aux étapes de congélation et de stockage. Ils indiquent également que cette amélioration n'est pas liée à l'acidification du milieu, mais bien à une adaptation physiologique des cellules pendant les 30 min d'acidification à pH 5,25.

Dans le chapitre I.4 de la synthèse bibliographique, nous avons recensé les différentes réponses des cellules face à des conditions adverses, notamment aux niveaux membranaire et cytoplasmique. Les principaux facteurs à l'origine de telles réponses ont également été analysés. Nous proposons, donc, dans cette deuxième partie, d'étudier les mécanismes physiologiques mis en place par les cellules au cours de l'acidification. Dans ce but, nous avons caractérisé la composition en acides gras membranaires et le protéome des cellules soumises à l'acidification (pH 5,25 pendant 30 min) et l'avons comparé avec ceux des cellules non acidifiées. Ces analyses permettront d'identifier les réponses des cellules face à un stress acide modéré, tant au niveau de la membrane qu'au niveau métabolique.

Les résultats obtenus font l'objet d'un deuxième article, accepté pour publication par le « Journal of Applied Microbiology ». Il constitue le paragraphe III.2.2.

III.2.2 Publication 2. L'adaptation acide de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induit des réponses physiologiques, au niveau de la membrane et du cytoplasme, responsables d'une meilleure cryotolérance

Résumé

Cette partie du travail vise à identifier les réponses physiologiques des cellules de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 après leur acidification en fin de fermentation, en relation avec leur cryotolérance. Par rapport à la condition de référence (cellules non acidifiées, pH 6,0), les cellules acidifiées en fin de fermentation (pH 5,25 pendant 30 min) présentent une meilleure cryotolérance. En analysant le protéome cytosolique, des changements dans la synthèse de 21 protéines ont été détectés. Ces protéines sont liées aux métabolismes énergétique, nucléotidique et azoté ainsi qu'à la synthèse des protéines de stress. L'acidification a induit aussi une légère réduction des rapports entre acides gras insaturés et saturés, ainsi que cycliques et saturés dans la membrane. En conclusion, *Lb. bulgaricus* CFL1 est capable de développer des réponses physiologiques tant au niveau membranaire que cytosolique. L'adaptation acide a été identifiée comme un phénomène d'adaptation croisée, car elle permet aux cellules de devenir plus tolérantes au stress froid. Finalement, cette étude a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques expliquant la protection croisée par une adaptation acide. Elle est utile pour améliorer la cryotolérance des bactéries lactiques, tant au niveau des banques de souches que dans l'industrie.

Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
induces physiological responses at membrane and cytosolic
levels that improves cryotolerance

F. Streit, J. Delettre, G. Corrieu and C. Béal

UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, AgroParisTech, INRA

CBAI, F-78850 Thiverval-Grignon

Abbreviated running headline: Acid adaptation of *Lact. bulgaricus*

Correspondence

Catherine Béal, AgroParisTech, INRA, CBAI, 78850, Thiverval-Grignon, France

E-mail: beal@grignon.inra.fr; phone: + 33 (0)1 30 81 54 85; fax: + 33 (0)1 30 81 55 97

ABSTRACT

Aims: This work aimed at clarifying the physiological responses of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 cells after exposure to acidification at the end of fermentation, in relation to their cryotolerance.

Methods and Results: Cells acidified at the end of the fermentation (pH 5.25 for 30 min) had their cryotolerance improved as compared to the reference condition (pH 6.0). By analyzing the cytosolic proteome, it was established that changes occurred in the synthesis of 21 proteins, involved in energy metabolism, nucleotide and protein synthesis and stress response. Acidification also induced a slight decrease in unsaturated to saturated and cyclic to saturated membrane fatty acid ratios.

Conclusions: *Lact. bulgaricus* CFL1 was able to develop a combined physiological response at both membrane and cytosolic levels. This acid adaptation was referred as a cross-protection phenomenon as it allowed the cells to become more tolerant to cold stress.

Significance and Impact of Study: This study increased knowledge concerning the physiological mechanisms that explained the cross-protection by acid adaptation. It may be useful for improving cryotolerance of lactic acid bacteria, either in cells banks or in an industrial context.

Keywords

Acidification, cross-protection, cryotolerance, fatty acid composition, *Lactobacillus bulgaricus*, proteome

INTRODUCTION

Microorganisms and, more specifically, lactic acid bacteria are commonly exposed to low temperatures during starter production, cell preservation in culture banks or applications in different products. It is well documented that low temperatures are responsible for loss of cell viability and activity, membrane damage and morphological changes (Fonseca *et al.*, 2000 ; Ouvry *et al.*, 2002 ; Saarela *et al.*, 2005). These changes are undesirable since they affect the technological properties of the bacteria, such as viability and acidification activity and, consequently, the final quality of the products.

Many studies have been done to improve the cryotolerance of lactic acid bacteria. Among them, the preadaptation of the bacteria by applying a moderate stress before cold stress was investigated. A first approach consists in applying a cold adaptation to the cells before their exposure to low temperatures. Panoff *et al.* (1995) showed that preincubation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 cells at 8°C for 48 h improved their cryotolerance at -20°C. The effect of incubation of *Lact. bulgaricus* at suboptimal temperatures (0, 7 and 30°C, for 30, 60 and 180 min) before freezing at -20°C in lactose broth was examined by De Urraza and De Antoni (1997). After incubation at 30°C for 60 min, the cells were more resistant after 10 and 45 days of storage at -20°C. Broadbent and Lin (1999) improved the resistance of *L. lactis* to freezing at -60°C after a cold adaptation at 10°C for 2 h. Finally, Wang *et al.* (2005b) reported improved cryotolerance of *Lact. acidophilus* RD758 at -20°C, after a cold adaptation at a moderate temperature (28°C) for 8 h.

As a second means to increase cryotolerance of lactic acid bacteria, some works describe the use of cross protection. It consists in improving the resistance to a given stress (for example, cold stress), by applying a moderate but different stress beforehand (for example, acid stress). Palmfeldt and Hahn-Hägerdal (2000) found that cells of *Lact. reuteri* ATCC55730, cultivated at pH 5, were more resistant to freeze-drying than cells grown at pH 6. Wang *et al.* (2005a) demonstrated that cryotolerance of *Lact. acidophilus* RD758 during freezing and frozen storage at -20°C was enhanced when cultures were conducted at pH 5. More recently, we showed that acidification of *Lact. bulgaricus* CFL1 suspensions at pH 5.25 for 30 min improved their resistance to freezing and frozen storage at -20°C (Streit *et al.*, 2007).

The mechanisms that explain these phenomena of homologous adaptation or cross protection have been elucidated in some cases. They are first ascribed to the ability of the cells to develop stress-sensing systems, which permit them to better resist harsh conditions and sudden environmental changes (Van de Guchte *et al.*, 2002). Bacteria can adapt to adverse conditions by modifying the fatty acid composition of their cellular membrane, thus modifying membrane fluidity. Broadbent and Lin (1999), with *L. lactis* and *cremoris*, and Wang *et al.* (2005a), with *Lact. acidophilus* RD758, reported that changes in membrane

fluidity allow the bacteria to adapt themselves to low temperatures. Once membrane fluidity is linked to membrane fatty acid content, conditions allowing changes in this composition induce cellular adaptation (Béal *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2005b). Transient induction of general or specific proteins has been reported as a second mechanism. This was demonstrated by Lim *et al.* (2000), who observed an induction of the synthesis of three heat shock proteins after exposure of *Lact. bulgaricus* to acidic conditions. Arena *et al.* (2006) used proteomic analysis to identify different biological responses developed by *Strep. thermophilus* cells exposed to heat, cold, acid and oxidative stresses. The same approach was conducted by Budin-Verneuil *et al.* (2005) with *L. lactis* cells exposed to acid stress, and Hörmann *et al.* (2006) with *Lact. sanfranciscensis* cells submitted to high-pressure treatments.

However, the mechanisms behind the metabolic responses of *Lact. bulgaricus* species to stress conditions are still not clear at this time. The recent publication of the complete genome of this species (Van de Guchte *et al.*, 2006) represents a major step in developing a better understanding of the metabolic changes of cells submitted to adverse conditions. In this context, the objective of this work was to clarify the physiological responses of *Lact. bulgaricus* CFL1 cells exposed to acidification at the end of fermentation, in relation to their cryotolerance after freezing and frozen storage. Membrane fatty acid composition will be assessed to explain changes in membrane fluidity, and proteomic analyses will make it possible to clarify some changes in cytosolic proteins.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and media

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CFL1 (INRA, Thiverval-Grignon, France) was used in this study. Frozen aliquots (-80°C) were precultured two times in 5 ml MRS broth (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) at 42°C before inoculation of the bioreactor.

Culture medium was composed of 60 g l⁻¹ of sweet whey powder (Eurosérum, Port-sur-Saône, France), heat-treated at 110°C for 20 min after adjustment at pH 5 with 50% H₂SO₄. After centrifugation (17 000 g, 20 min, 4°C) and filtration (0.45 µl), 20 g l⁻¹ lactose (Prolabo, Briare-le-Canal, France) and 5 g l⁻¹ yeast extract (Organotechnie, La Courneuve, France) were added to the supernatant. Medium was then sterilized in the fermentor at 110°C for 20 min.

Fermentation and stabilization

Cultures were conducted in a 2.2-l fermentor (LSL-Biolafitte, St-Germain-en-Laye, France) with 1.8 l working volume, under controlled conditions (pH 6, temperature 42°C and agitation speed 100 rpm). A 6% NaOH solution (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) was

used for pH control. Growth was stopped three hours after entering the stationary phase. The cell suspension was cooled at 15°C (reference condition) or acidified at pH 5.25 for 30 min before cooling at 15°C (Streit *et al.*, 2007). 15 min were needed to cool the cells from 42°C until 15°C. Fermentations were done in duplicate.

Once 15°C was achieved, cells were harvested and concentrated 15 times by centrifugation (17 000 g, 30 min, 4°C), whatever they were submitted or not to acidification. Two different procedures of freezing were used. One part of the concentrated cells was divided in 500 µL aliquots that were frozen and stored at -20°C for subsequent specific acidification activity analyses. The other part of the concentrated cells was frozen and stored at -80°C to avoid any deterioration. These samples were used to analyze the membrane fatty acids and the proteome of the cells just after their production. This protocol allowed us to identify the impact of these physiological characteristics on the subsequent acidification activity of cells that were frozen and stored at -20°C.

Proteome analyses

Proteome of cells recovered before and after acidification was investigated by two-dimensional electrophoresis (Bio-Rad System, Marnes-la-Coquette, France), as previously described by Wang *et al.* (2005b). The samples were analyzed in triplicate.

Each spot was matched among the different gels and the spot intensities were compared. The modifying factor (MF) was calculated as the ratio between the normalized intensity of the protein spot in the acid condition and the normalized intensity of the same spot in the reference condition. Proteins with an MF higher than 2 (enhanced synthesis) or lower than 0.5 (reduced synthesis) were considered as significantly different between the two conditions.

Cytosolic proteins, which had their synthesis changed under different conditions, were analyzed by MALDI-TOF as described by Guillot *et al.* (2003). Protein spots were excised from the gel and hydrolyzed before MALDI-TOF analysis according to the description of Wang *et al.* (2005b). The monoisotopic mass lists characterizing each protein were searched against a *Lactobacillus* database (*Lact. plantarum* WCFS1, *Lact. johnsonii* NCC533), two public databases of *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCCBAA365 and ATCC11842 (both at NCBI INR), by using a local version of the MSFit program (<http://prospector.ucsf.edu>).

Fatty acid analyses

Membrane fatty acids were extracted and methylated as described by Béal *et al.* (2001) and Wang *et al.* (2005a). Methylated fatty acid esters were analyzed by gas chromatography. Their identification was made possible by comparing their retention times with those of two known standards: Bacterial Acid Methyl Esters (BAME) (Supelco,

Bellefonte, USA) and Fatty Acid Methyl Esters (FAME) (Sigma). The use of a mass selective detector allowed confirming the fatty acid methyl esters identification. Each mass spectrum was compared with a data bank (NIST/02 Mass Spectral Library) to determine the exact carbon number and the existence of a cyclopropane.

Results were expressed as relative percentages of each fatty acid, which were calculated as the ratio of the surface area of the considered peak to the total area of all peaks. The ratios of unsaturated to saturated fatty acids (U/S) and cyclic to saturated fatty acids (C/S) were calculated. Analyses were made in quadruplicate.

Viability and specific acidification activity measurements

Viable cells were quantified by plate counts on MRS agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) after incubation in anaerobiosis, at 42°C for 72 h. Viability was determined before freezing (Nc, in CFU ml⁻¹), after freezing (Nf, in CFU ml⁻¹) and during frozen storage. This allowed calculating the survival rate during freezing as the ratio (in %) of viable cells measured after freezing to that estimated before freezing.

The specific acidification activity of a sample (t_{spe} , in min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹) is a parameter that characterizes the metabolic activity of lactic acid bacteria (Streit *et al.*, 2007). It was calculated as the ratio of the time necessary to reach pH 5.8 in milk (in min), measured by the CINAC system (Corrieu *et al.*, 1988), to its corresponding log of cell concentration (in CFU ml⁻¹). It was measured before and after freezing and during storage at -20°C. It made possible to calculate three specific acidification activity parameters: tc_{spe} (initial specific acidification activity, in min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹), dtf_{spe} (loss of specific acidification activity during freezing, in min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹) and k_{spe} (rate of loss of specific acidification activity during frozen storage, in min (log(CFU ml⁻¹ d))⁻¹). High values of these variables corresponded to low specific acidification activity.

RESULTS

Specific acidification activity of *Lact. bulgaricus* CFL1 cells submitted to acidification

Table 1 reports the results of viability, acidification activity and specific acidification activity of *Lact. bulgaricus* CFL1 cells, recovered at pH 6.0 and after acidification at pH 5.25 for 30 min. Both fermentations reached their maximum rate of NaOH consumption at 712 ± 4 min and they were cooled or acidified at 892 ± 4 min. The good reproducibility of the fermentation kinetics permitted to conclude that the cells used in this study were in the same initial physiological state. The difference in CFU concentration after acidification was related to a dechaining of *Lact. bulgaricus*, as a consequence of acidic conditions, as already described (Norton *et al.*, 1993 ; Rhee and Pack, 1980).

Table 1 Viability, acidification activity and specific acidification activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 cells recovered at pH 6.0 without acidification or after acidification at pH 5.25 for 30 min (values are means $\pm$ SD)

Parameters	pH 6.0	pH 5.25 for 30 min
Nc (CFU ml ⁻¹) *	$1.7 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^7$	$1.7 \cdot 10^8 \pm 3.5 \cdot 10^6$
Nf (CFU ml ⁻¹) †	$8.0 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^6$	$7.4 \cdot 10^7 \pm 3 \cdot 10^6$
Survival (%) ‡	4.7	42.9
tc (min) §	328 ± 1	246 ± 1
dtf (min) ¶	133 ± 4	66 ± 1
k (min d ⁻¹) *	1.07 ± 0.05	1.16 ± 0.06
t365 (min) ^	905 ± 16	827 ± 20
tc _{spe} (min (log(CFU ml ⁻¹)) ⁻¹) **	45 ± 0.2	31 ± 1.2
dtf _{spe} (min (log(CFU ml ⁻¹)) ⁻¹) ††	34 ± 0.7	16 ± 6.8
k _{spe} (min (log(CFU ml ⁻¹ d) ⁻¹) ††	0.57 ± 0.01	0.37 ± 0.01
t365 _{spe} (min (log(CFU ml ⁻¹)) ⁻¹) §§	311 ± 4.5	193 ± 3.7

* initial cell concentration.

† cell concentration after freezing.

‡ Survival to the freezing step = (Nf / Nc)*100.

§ initial acidification activity.

¶ loss of acidification activity during freezing.

* rate of loss of acidification activity during frozen storage.

^ acidification activity after 365 days of storage at -20°C.

** initial specific acidification activity.

†† loss of specific acidification activity during freezing.

†† rate of loss of specific acidification activity during frozen storage.

§§ specific acidification activity after 365 days of storage at -20°C.

Parameters characterizing acidification activity and specific acidification activity before and after freezing were always lower after acidification for 30 min at pH 5.25 than without acidification. This indicates that acidification of *Lact. bulgaricus* cells improved their initial acidification activity (tc and tc_{spe}). An improvement was also observed for the loss of acidification activity and specific acidification activity during freezing (dtf and dtf_{spe}). The losses observed with acidified cells were 50% lower than those obtained without acidification. On the basis of cell survival measurements, it was observed that acidified cells more effectively resisted freezing than cells recovered at pH 6.0. Their survival rates were nine times higher than those of unacidified cells. Because the loss of acidification activity was not proportional to the survival rate, it could be hypothesized that the physiological state of the cells changed upon acidification.

By considering the rate of loss of specific acidification activity during frozen storage, the positive effect of acidification on cryotolerance was confirmed. The k_{spe} value of acidified cells was 1.5 times lower than that observed with cells produced at pH 6.0. After 365 days at

-20°C, cells submitted to acidification presented a specific acidification activity of 193 min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹, compared to 311 min (log(CFU ml⁻¹))⁻¹ for unacidified cells. The rates of loss of acidification activity (k) were similar, but after 365 days at -20°C, acidified cells presented a better acidification activity (827 min instead of 905 min). This was explained by the improved acidification activity of acidified cells after freezing.

The possible effect of a cold adaptation was also considered, as the cells were submitted to a cold treatment before freezing (cooling until 15°C and concentration at 4°C for 30 min) (Panoff *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2005b). Nevertheless, as both acidified and not acidified cells were submitted to the same cold treatment, but to a different acid treatment, it could be considered that differences within these two kinds of cells were only induced by the acidification treatment. Consequently, regardless of the considered parameter, acidification improved the cryotolerance of *Lact. bulgaricus*. Related physiological responses will be determined.

Comparative proteomes of *Lact. bulgaricus* CFL1 according to different acidification conditions

The proteome of *Lact. bulgaricus* CFL1 was analyzed for cells recovered from two acidification conditions: at pH 6.0 without acidification, and after acidification at pH 5.25 for 30 min. Fig. 1A shows the two-dimensional electrophoresis profile of cytosolic proteins of *Lact. bulgaricus* CFL1 cells obtained without acidification.

A total of 167 proteins were displayed. Their molecular weight ranged between 25 and 100 kDa, and their isoelectric point varied from pH 4.25 to pH 6.25. The proteome of cells recovered after acidification at pH 5.25 for 30 min encompassed 159 proteins, thus showing a modification in response to acidification (Fig. 1B). By comparing the intensities of the spots within the two acidification conditions, we found that the intensities of 21 proteins varied. Eleven spots were amplified or only present on the acidified gels, whereas ten proteins were reduced or only present on the reference gels. As can be seen on Table 2, two proteins appeared after acidification at pH 5.25 for 30 min (A1 and A2), and the synthesis of nine proteins (A3 to A11) significantly increased (modifying factor ≥ 2). In contrast, the synthesis of nine proteins (R1 to R9) was lowered (modifying factor ≤ 0.5) and one protein (R10) disappeared after acidification.

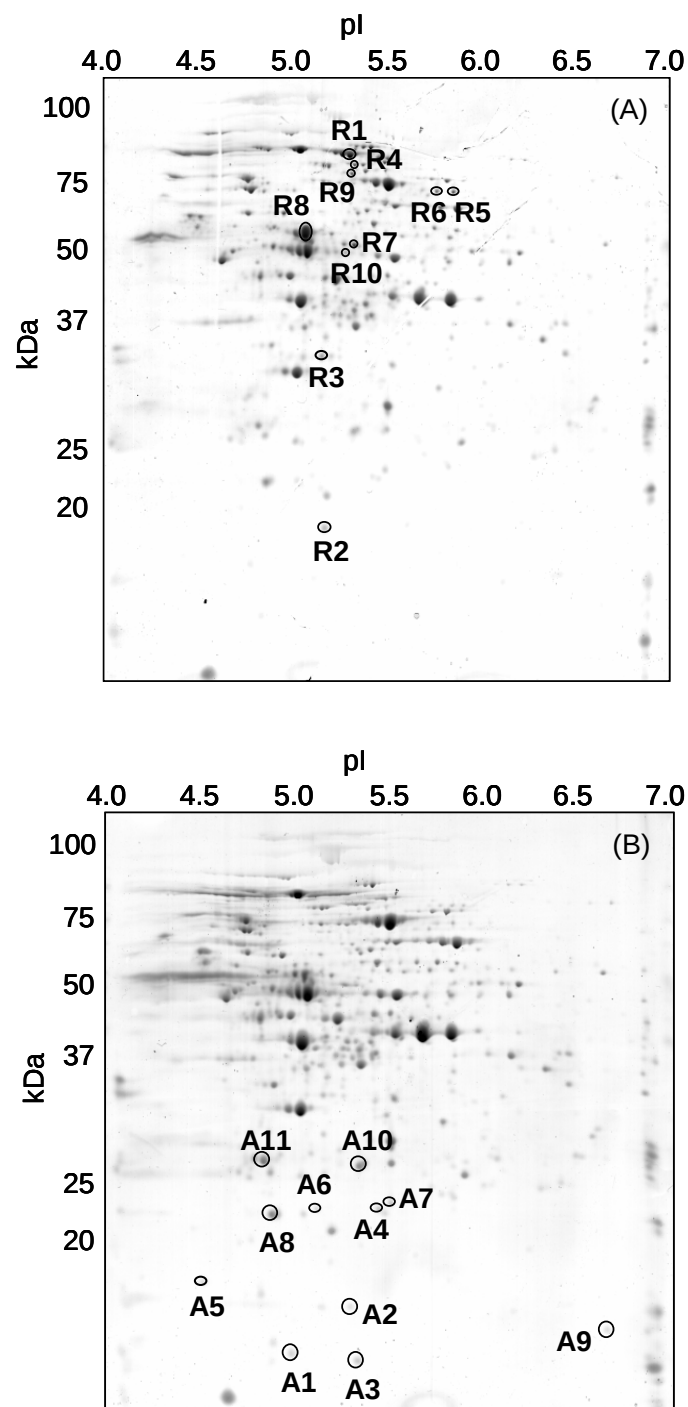


Figure 1 2-D electrophoresis gels of cytosolic proteins of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 cells recovered at pH 6.0 (A) or after acidification at pH 5.25 for 30 min (B).
 Ri = proteins whose intensities were greater in the reference gel; Ai = proteins whose intensities were greater in the acidified gel.

Table 2 Characteristics of the 21 proteins showing significant differences in intensity for cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 recovered at pH 6.0 or after acidification at pH 5.25 for 30 min

Spot No.	pI *		MW (kDa) [†]		MF ^{‡c}	Homologous protein
	Exp. [§]	Theor. [¶]	Exp.	Theor.		
A1 *	4.85	ni	13.7	ni	100	ni **
A2	5.23	5.06	16.0	17.85	100	S-ribosylhomocysteinase
A3	5.28	5.07	13.4	13.05	19.14	Pyridoxine 5'-phosphate oxidase
A4	5.40	5.14	21.7	19.79	6.62	Adenine phosphoribosyltransferase
A5	4.40	ni	17.3	ni	5.27	ni
A6	5.10	4.88	20.7	21.67	4.30	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A7	5.47	ni	22.3	ni	2.87	ni
A8	4.77	4.88	21.2	20.58	2.73	Single-stranded DNA-binding protein
A9	6.75	6.28	14.7	16.35	2.43	Phosphoribosylcarboxyaminoimidazole (NCAIR) mutase
A10	5.28	5.42	25.4	20.59	2.15	GrpE chaperone protein
A11	4.72	4.72	26.0	27.30	2.10	Triosephosphate isomerase
R1 *	5.11	5.07	80.5	81.91	0.45	Ribonucleoside-triphosphate reductase
R2	5.12	4.95	18.2	18.20	0.43	50S ribosomal protein L10
R3	5.10	4.95	32.7	28.38	0.39	30S ribosomal protein S2
R4	5.26	5.29	81.9	81.73	0.30	ATP-dependent Clp protease
R5 - R6	5.84	5.51	72.5	60.77	0.20	CTP synthase
R7	5.27	5.13	47.8	49.57	0.17	Aminopeptidase G
R8	5.00	4.83	50.0	43.28	0.15	Elongation factor Tu
R9	5.24	5.07	76.8	62.70	0.05	Prolyl-tRNA synthetase
R10	5.21	5.06	46.3	50.16	0	Glutamine synthetase

* isoelectric point

[†] molecular weight

[‡] modifying factor (Ai/Ri)

[§] experimental

[¶] theoretical

* proteins whose intensity increased after acidification

▲ proteins whose intensity decreased after acidification

** not identified.

Analysis of these proteins by MALDI-TOF permitted the identification of 18 of them. They are listed in Table 2. These proteins belonged to four metabolic pathways corresponding to general (A11, R7), nucleotide (A4, A8, A9, R1, R5, R6) and nitrogen (A2, A3, R2, R3, R8, R9, R10) metabolisms and stress protein synthesis (A6, A10, R4). The three proteins that were not identified were all of small molecular weight (13.7 to 22.3 kDa), thus leading to peptides that were too small to be identified by this method.

Fatty acid composition of *Lact. bulgaricus* CFL1

The fatty acid composition of *Lact. bulgaricus* CFL1 was characterized in order to better understand the physiological changes of the cells submitted to acidification. Eighteen fatty acids were detected in the membrane of *Lact. bulgaricus* CFL1, but 11 of them accounted for more than 99.2% of all the fatty acids. Table 3 summarizes these main fatty acids for cells recovered at pH 6.0 and after acidification at pH 5.25 for 30 min. They were divided into three groups. Saturated fatty acids included decanoic acid (C10:0), dodecanoic acid (C12:0), tetradecanoic acid (C14:0), pentadecanoic acid (C15:0), hexadecanoic acid (C16:0) and octadecanoic acid (C18:0). Unsaturated fatty acids were represented by hexadecenoic acid (C16:1), heptadecenoic acid (C17:1), octadecenoic acid (C18:1) and octadecadienoic acid (C18:2). Finally, methylenoctadecenoic acid (cycC19:0) was detected as a cyclic fatty acid. Seven minor fatty acids, displaying a relative concentration lower than 0.07% were also identified: tridecanoic acid (C13:0), tetradecenoic acid (C14:1), heptadecanoic acid (C17:0), octadecatrienoic acid (C18:3), eicosanoic acid (C20:1), eicosatrienoic acid (C20:3) and eicosatetranoic acid (C20:4).

Table 3 Relative fatty acid concentrations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 cells recovered at pH 6.0 without acidification or after acidification at pH 5.25 for 30 min (values are means $\pm$ SD)

Fatty acids	pH 6.0	pH 5.25 for 30 min
C10:0 (%)	0.30 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.12
C12:0 (%)	0.50 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.21
C14:0 (%)	4.66 $\pm$ 0.37	5.17 $\pm$ 0.92
C15:0 (%)	0.28 $\pm$ 0.00	0.38 $\pm$ 0.02
C16:0 (%)	25.77 $\pm$ 0.30	26.88 $\pm$ 0.99
C16:1 (%)	42.64 $\pm$ 2.20	40.40 $\pm$ 5.83
C17:1 (%)	4.10 $\pm$ 0.17	1.35 $\pm$ 0.03
C18:0 (%)	1.16 $\pm$ 0.20	1.67 $\pm$ 0.83
C18:1 (%)	8.60 $\pm$ 0.24	13.03 $\pm$ 1.95
C18:2 (%)	0.31 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.04
cycC19:0 (%)	10.93 $\pm$ 1.77	8.64 $\pm$ 3.11
Total (%)	99.24	99.26
U/S *	1.70	1.56
C/S [†]	0.33	0.24

* U/S: unsaturated to saturated fatty acid ratio.

[†] C/S: cyclic to saturated fatty acid ratio.

By analyzing the relative concentration values, *Lact. bulgaricus* CFL1 displayed high C16:0, C16:1, C18:1 and cycC19:0 contents, since they accounted for 88% of the total fatty acids. On the contrary, saturated fatty acids represented only 33% of the total fatty acids of *Lact. bulgaricus* CFL1.

Comparing the fatty acid composition of the cells obtained under the two conditions, it was observed that the total saturated fatty acid concentration was slightly higher after acidification at pH 5.25 for 30 min (35.4%) than without acidification (32.7%). In contrast, the cyclic fatty acid concentration decreased from 10.9% to 8.6%. The total unsaturated fatty acid concentration remained stable (55.4%), even if the C18:1 content displayed a 5% enhancement. Consequently, the ratio between unsaturated and saturated fatty acids (U/S) slightly decreased (-8.2%), whereas the ratio between cyclic and saturated fatty acids (C/S) more significantly diminished (-27.3%). Nevertheless, since the maximal differences between relative contents were lower than 3%, the dissimilarity between membrane fatty acid compositions obtained under these two conditions remained small.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that the recovery of specific acidification activity after freezing of *Lact. bulgaricus* CFL1 and the stability of concentrated cells during frozen storage were improved after acidification of the cells at the end of fermentation. We also described physiological changes in proteome and fatty acid composition of *Lact. bulgaricus* CFL1, as a result of this acidification. Consequently, it was suggested that these physiological changes induced adaptation responses, making the bacteria more cryotolerant.

Relationship between cryotolerance and alteration of the proteome of *Lact. bulgaricus* CFL1 as a result of acidification

With 167 proteins, the proteome of *Lact. bulgaricus* CFL1 is in agreement with those obtained by Gouesbet *et al.* (2002) and Lim *et al.* (2000) for *Lact. bulgaricus* species. The 21 proteins whose synthesis changed after acidification represented about 13% of the total proteins of *Lact. bulgaricus* CFL1. This value was slightly lower than the one obtained by Budin-Verneuil *et al.* (2005), who reported that 22% of the proteins of *L. lactis* MG1363 changed after an acid adaptation at pH 5.0 for 30 min, as compared to non-adapted cells. Moreover, an alteration of 28% of the proteins synthesized by *Strep. mutans* H7 was observed by Svensäter *et al.* (2000) after an adaptation at pH 5.5 for 30 min. These differences can be ascribed to intrinsic differences between bacterial strains and to different acidification conditions.

Some differences were observed between experimental and theoretical values of isoelectric point and molecular weight of the 21 proteins presented on Table 2. According to Len *et al.* (2004), these differences can be related to the existence of isoform proteins, characterized by a slightly different peptides structure but with the same biological function.

Identification of these proteins by MALDI-TOF made it possible to classify them into four functional classes: two proteins from the general metabolism, five proteins from the nucleotide metabolism, three stress proteins and seven proteins from the nitrogen metabolism.

After acidification, the synthesis of triosephosphate isomerase, a glycolytic enzyme involved in energy metabolism (Rechinger *et al.*, 2000), was found to increase, helping cells to maintain their intracellular pH during acidification. The same mechanism of adaptation was observed with *Lact. acidophilus* RD758 grown at high temperatures (Wang, 2005) and with *L. lactis* grown with glucose instead of maltose (Palmfeldt *et al.*, 2004). Conversely, the aminopeptidase G synthesis was reduced after acidification. This enzyme is responsible for the hydrolysis of peptides containing glycine on the N-terminal position. It had never been previously recognized as a result of environmental changes.

Three proteins were identified as heat shock proteins (HSP): GrpE chaperone protein, ATP-dependent Clp protease and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. By remaining intact after a stress, they contribute to the folding, misfolding or degradation of other proteins that are affected by the stress (Lazar *et al.*, 1998). The highest amount of GrpE protein in acid-adapted cells was in agreement with the results of De Angelis *et al.* (2001), obtained with *Lact. sanfranciscensis* CB1. The increased synthesis of the peptidyl-prolyl isomerase corroborated the results of Foster (1999), who reported that this protein is essential for the survival of *E. coli* cells at extreme pH (alkali or acid). In contrast, the level of ATP-dependent Clp protease decreased after acidification at pH 5.25 for 30 min. This result differed from the one obtained by Wang *et al.* (2005b), who observed a higher synthesis of this enzyme after an intermediate cooling of *Lact. acidophilus* RD758 cells at 28°C for 8 h. The different strain and stress conditions may explain this discrepancy.

Synthesis of five proteins involved in nucleotide metabolism changed according to the two different acidification conditions: CTP synthase and ribonucleoside-triphosphate reductase showed reduced synthesis whereas adenine phosphoribosyltransferase, phosphoribosylcarboxyaminoimidazole (NCAIR) mutase and single-stranded DNA binding protein showed enhanced synthesis. CTP synthase is responsible for the *de novo* synthesis of cytosine triphosphate (CTP) from pyrimidine and is essential for growth. The smaller amount obtained after acidification differed from the results published by Budin-Verneuil *et al.* (2005) with *L. lactis* MG1363. Moreover, Sanchez *et al.* (2005) reported a higher production of CTP synthase in *Bifidobacterium longum* NCIMB8809 cells exposed to different bile salt

concentrations. Ribonucleoside-triphosphate reductase plays a central role in DNA replication, catalyzing reduction of all common ribonucleoside 5'-triphosphates (Stubbe, 1990). After acidification, reduction of ribonucleotides, as well as CTP synthesis was diminished, thus decreasing nucleotide synthesis. The adenine phosphoribosyltransferase catalyzes a salvage reaction resulting in the formation of AMP from adenine, which is energetically less costly than *de novo* synthesis. This enzyme was previously found in *Strep. thermophilus* by Arena *et al.* (2006), but its synthesis was not altered after heat, cold, acid or oxidative stress. On the basis of our results, it could be hypothesized that the higher level of this enzyme after acidification may allow the cells to recover a sufficiently high energy level after the acid stress. Phosphoribosylcarboxyaminoimidazole (NCAIR) mutase is involved in the biosynthesis of purine. Its enhanced synthesis is in agreement with the observation of Gitton *et al.* (2005), who considered *L. lactis* NCDO763 growth in milk instead of synthetic medium. The single-stranded DNA binding protein is essential for replication of the chromosome and is involved in DNA recombination and repair (Wold, 1997). Consequently, the higher synthesis of this protein after acidification is considered as a mechanism of acid adaptation of the cells (Foster, 1999). This is consistent with the results obtained by Leverrier *et al.* (2004) with *Propionibacterium freudenreichii*, who observed an induction of single-stranded DNA binding protein after heat stress.

A major modification of the proteome concerned seven proteins involved in translation and protein synthesis. Elongation factor Tu, prolyl-tRNA synthetase, 50S ribosomal protein L10 and 30S ribosomal protein S2 had their synthesis reduced after acidification, glutamine synthetase was completely absent in acidified cells, pyridoxine 5'-phosphate oxidase had his synthesis improved and S-ribosylhomocysteinase was only found in acidified cells. Since these results are in accordance with previous ones, it can be assumed that the lower synthesis of translation proteins was linked to the stress conditions (Thieringer *et al.*, 1998). Elongation factor Tu was found to be less synthesized in *Lact. sanfranciscensis* DSM20451 cells, submitted to an acid stress (pH 3.7 for 1 h), as compared to non-stressed cells (Hörmann *et al.*, 2006). The authors observed the same behavior for cells submitted to a high pressure stress (1 h at 80 MPa), indicating that this protein was not specific to acid stress response. On the other hand, Sanchez *et al.* (2005) observed a higher synthesis of elongation factor Tu, prolyl-tRNA synthetase and 30S ribosomal protein S2 in *Bifidobacterium longum* NCIMB8809, in response to different bile salt concentrations. Finally, Arena *et al.* (2006) obtained different quantities of elongation factor Tu, depending on the type of stress applied: higher synthesis during cold and acid stress, but lower synthesis during heat stress and starvation. The same authors displayed a reduced synthesis of 50S ribosomal protein L10 and 30S ribosomal protein S2, after heat shock and starvation. Pyridoxine 5'-phosphate oxidase is responsible for the oxidation of pyridoxine 5'- phosphate

or pyridoxamine 5'-phosphate to form pyridoxal 5'-phosphate (PLP), which is a constitutive compound of vitamin B₆. This enzyme was previously described in *E. coli* (Di Salvo *et al.*, 2003) and *Lact. bulgaricus* ATCCBAA-365 (NCBI), but was never identified as a result of environmental changes. The S-ribosylhomocysteinase (LuxS) was only synthesized in the cells submitted to acidification. This result agrees with that of Frees *et al.* (2003), who found an increase of the S-ribosylhomocysteinase (LuxS) concentration in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 cells acidified at pH 5.5 or 4.5. The same conclusions were reported by Kirkpatrick *et al.* (2001) for *E. coli* cells submitted to low pH conditions. Finally, glutamine synthetase is involved in nitrogen metabolism by acting in L-glutamine biosynthesis and nitrogen assimilation (Rexer *et al.*, 2006). Since this enzyme was completely absent after acidification, it was strongly affected by low pH. Nevertheless, no previous data was found to corroborate this result.

From these observations, it can be concluded that acidification of the cells induced a reduction in protein metabolism, whereas an improvement in energy and nucleotide metabolism and a higher synthesis of stress proteins were achieved. By comparing our results with the literature, it was observed that physiological responses of lactic acid bacteria differed with respect to stress and strains.

These changes in the proteome of *Lact. bulgaricus* CFL1 cells submitted to acidification can be responsible for their improved cryotolerance. They corresponded to a cellular adaptation at the cytosolic level, which is in agreement with some previous results. Wang *et al.* (2005b) observed that a cold adaptation of *Lact. acidophilus* RD758 at 28°C for 8 h was linked to the higher synthesis of four proteins and the reduced synthesis of another one, and enhanced the resistance of the cells during freezing and frozen storage at -20°C. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* during liquid nitrogen freezing was improved after a pre-treatment at 43°C for 30 min by Komatsu *et al.* (1990). This improved cryoresistance was associated with a higher synthesis of heat shock proteins. Broadbent and Lin (1999) demonstrated that a heat (42°C or 39°C for 25 min) or a cold shock (10°C for 1 h) improved the viability and cryotolerance of *L. lactis*, and that this improvement was linked to the synthesis of different heat shock proteins.

Relationship between cryotolerance and fatty acid composition as a result of acidification

Cryotolerance of *Lact. bulgaricus* CFL1 was analyzed with regard to the membrane fatty acid composition of the cells, either after acidification or not. A similar fatty acid composition was previously identified in *Lact. bulgaricus* (Gomez Zavaglia *et al.*, 2000 ; Partanen *et al.*, 2001 ; Smittle *et al.*, 1974 ; Teixeira *et al.*, 1996). The main fatty acids (C16:0 and C16:1) were previously identified by Smittle *et al.* (1974) for four different *Lact.*

bulgaricus strains. In contrast, Gomez-Zavaglia *et al.* (2000) and Teixeira *et al.* (1996) displayed some diversity by considering the fatty acid composition of different *Lact. delbrueckii* subspecies. It is noticeably that our strain had high concentrations of unsaturated and cyclic fatty acids, as compared to other data available for the same species (Smittle *et al.*, 1974).

By comparing the fatty acid composition of cells obtained without acidification (pH 6.0) and after 30 min of acidification at pH 5.25, saturated and cyclic fatty acid concentrations slightly changed. In this study, the improved cryotolerance of *Lact. bulgaricus* CFL1 after acidification was surprisingly related to lower membrane fluidity. According to Teixeira *et al.* (2002), reducing unsaturated and cyclic fatty acid concentrations allowed membrane fluidity to slightly decrease as a result of an enhanced solid-to-fluid transition temperature. Béal *et al.* (2001) observed an increase of unsaturated fatty acid content of *Streptococcus thermophilus* CFS2, thus leading to a higher membrane fluidity, when the pH of the culture was reduced. This was further confirmed by Wang *et al.* (2005a) with *Lact. acidophilus* RD758. The discrepancy found between our results and the literature can be explained by three different factors: the microorganisms employed, the different approaches used to study the acid adaptation (acidification at the end of the culture instead of fermentation at acidic pH) and the different methods of evaluation. The high unsaturated and cyclic fatty acid contents of the cells may also explain these observations. Moreover, since variations in membrane fatty acid composition were small, it could be hypothesized that the short time of adaptation was not long enough to induce the higher changes that were observed by Wang *et al.* (2005b).

Finally, our results demonstrated that controlling the intracellular concentrations of fatty acids and proteins by acting on environmental conditions was an interesting way to improve the cryotolerance of *Lact. bulgaricus* CFL1. This was achieved in this work by an acidification of the cells. In the future, we would like to investigate the effects of other environmental factors such as medium composition or temperature, and to use other lactic acid bacteria. The interaction between acidification and low positive temperatures (during cooling and concentration) on cells physiological state may also be determined. In order to relate the results obtained by fatty acid and proteome analyses, it could be valuable to extend this study by characterizing the differential protein synthesis at membrane level under acidic conditions.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was partly supported by the CAPES Foundation (Brazil).

REFERENCES

- Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L. and Scaloni, A. (2006). A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics* **6**, 181-192.
- Béal, C., Fonseca, F. and Corrieu, G. (2001). Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science* **84**, 2347-2356.
- Broadbent, J. R. and Lin, C. (1999). Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* **39**, 88-102.
- Budin-Verneuil, A., Pichereau, V., Auffray, Y., Ehrlich, Dusko S. and Maguin, E. (2005). Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **5**, 4794-4807.
- Corrieu, G., Spinnler, H. E., Jomier, Y. and Picque, D. (1988). Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters. French patent. FR 2 629 612.
- De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P. S. and Gobbetti, M. (2001). The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* **147**, 1863-1873.
- De Urraza, P. and De Antoni, G. (1997). Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar. *Cryobiology* **35**, 159-164.
- Di Salvo, M. L., Safo, M. K., Musayev, F. N., Bossa, F. and Schirch, V. (2003). Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1647**, 76-82.
- Fonseca, F., Béal, C. and Corrieu, G. (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research* **67**, 83-90.
- Foster, J. W. (1999). When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 170-174.
- Frees, D., Vogensen, F. K. and Ingmer, H. (2003). Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 293-300.
- Gitton, C., Meyrand, M., Wang, J., Caron, C., Trubuil, A., Guillot, A. and Mistou, M.-Y. (2005). Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7152-7163.
- Gomez Zavaglia, A., Disalvo, E. A. and De Antoni, G. L. (2000). Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *Journal of Dairy Research* **67**, 241-247.

- Gouesbet, G., Jan, G. and Boyaval, P. (2002).** Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* thermotolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1055-1063.
- Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P. and Mistou, M. Y. (2003).** Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* **3**, 337-354.
- Hörmann, S., Scheyhing, C., Behr, J., Pavlovic, M., Ehrmann, M. and Vogel, R. F. (2006).** Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T. *Proteomics* **6**, 1878-1885.
- Kirkpatrick, C., Maurer, L. M., Oyelakin, N. E., Yoncheva, Y. N., Maurer, R. and Slonczewski, J. L. (2001).** Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**, 6466-6477.
- Komatsu, Y., Kaul, S. C., Iwahashi, H. and Obuchi, K. (1990).** Do heat shock proteins provide protection against freezing? *FEMS Microbiology Letters* **72**, 159-162.
- Lazar, S. W., Almiron, M., Tormo, A. and Kolter, R. (1998).** Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival. *Journal of Bacteriology* **180**, 5704-5711.
- Len, A. C. L., Harty, D. W. S. and Jacques, N. A. (2004).** Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology* **150**, 1339-1351.
- Leverrier, P., Vissers, J. P. C., Rouault, A., Boyaval, P. and Jan, G. (2004).** Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in *Propionibacterium freudenreichii*. *Archives of Microbiology* **181**, 215-230.
- Lim, E. M., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. (2000).** Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*. *Electrophoresis* **21**, 2557-2561.
- Norton, S., Lacroix, C. and Vuillemand, J. C. (1993).** Effect of pH on the morphology of *Lactobacillus helveticus* in free-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation. *Food Biotechnology* **7**, 235-251.
- Ouvry, A., Wache, Y., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C. and Cachon, R. (2002).** Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* **214**, 257-261.
- Palmfeldt, J. and Hahn-Hägerdal, B. (2000).** Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 235-238.
- Palmfeldt, J., Levander, F., Hahn-Hägerdal, B. and James, P. (2004).** Acidic proteome of growing and resting *Lactococcus lactis* metabolizing maltose. *Proteomics* **4**, 3881-3898.

- Panoff, J., Thammavongs, B., Laplace, J., Hartke, A., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. (1995).** Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403. *Cryobiology* **32**, 516-520.
- Partanen, L., Marttinen, N. and Alatossava, T. (2001).** Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 500-506.
- Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H., Svendsen, I. and Jakobsen, M. (2000).** Early protein synthesis of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in milk revealed by [S-35]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 2660-2669.
- Rexer, H. U., Schäberle, T., Wohlleben, W. and Engels, A. (2006).** Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Archives of Microbiology* **186**, 447-458.
- Rhee, S. K. and Pack, M. Y. (1980).** Effect of environmental pH on chain length of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* **144**, 865-868.
- Saarela, M., Virkajärki, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T. and Mättö, J. (2005).** Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1330-1339.
- Sanchez, B., Champomier-Vergès, M.-C., Anglade, P., Baraige, F., de los Reyes-Gavilan, C. G., Margolles, A. and Zagorec, M. (2005).** Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *Journal of Bacteriology* **187**, 5799-5808.
- Smittle, R. B., Gilliland, S. E., Speck, M. L. and Walter Jr, W. M. (1974).** Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology* **27**, 738-743.
- Streit, F., Corrieu, G. and Béal, C. (2007).** Acidification of fermented broth improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology* **128**, 659-667.
- Stubbe, J. (1990).** Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 5329-5332.
- Svensäter, G., Sjögren, B. and Hamilton, I. R. (2000).** Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology* **146**, 107-117.
- Teixeira, H., Gonçalves, M. G., Rozes, N., Ramos, A. and San Romao, M. V. (2002).** Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress? *Microbial Ecology* **43**, 146-153.

- Teixeira, P., Castro, H. and Kirby, R. (1996).** Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 34-38.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G. and Inouye, M. (1998).** Cold shock and adaptation. *BioEssays* **20**, 49-57.
- Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J. M., Walunas, T., Gibrat, J. F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. (2006).** The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *PNAS* **103**, 9274-9279.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 187-216.
- Wang, Y. (2005).** Préadaptation et cryotolérance chez *Lactobacillus acidophilus* : effet des conditions opératoires. *Thèse de doctorat*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, France. 214 p.
- Wang, Y., Corrieu, G. and Béal, C. (2005a).** Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science* **88**, 21-29.
- Wang, Y., Delettre, J., Guillot, A., Corrieu, G. and Béal, C. (2005b).** Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* **50**, 294-307.
- Wold, M. S. (1997).** Replication protein A: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry* **66**, 61-92.

III.2.3 Conclusion

Les résultats obtenus dans cette partie ont mis en évidence l'effet d'un changement dans les conditions environnementales (acidification en fin de fermentation) sur les réponses physiologiques des bactéries, au niveau de leur composition en acides gras membranaires et de leur protéome. Ils confirment que l'amélioration de la cryotolérance observée après acidification est liée à une adaptation physiologique de celles-ci.

La comparaison des compositions en acides gras membranaires des cellules acidifiées et non acidifiées montre que les cellules acidifiées présentent une concentration plus élevée en acide gras C18:1 (augmentation de 52 %). Ces changements dans la composition membranaire correspondent à une réponse physiologique des cellules au stress acide. Ils représentent un des mécanismes responsables de la meilleure résistance des cellules à la congélation et au stockage sous forme congelée.

Grâce à l'analyse du protéome, il a été observé que l'acidification des cellules a modifié le niveau de synthèse de 21 protéines, d'un facteur au moins égal à 2. Parmi celles-ci, des protéines des métabolismes nucléotidique et énergétique ainsi que des protéines de stress ont vu leur synthèse accrue, alors qu'une réduction des protéines du métabolisme protéique a été observée.

Ces résultats confirment que les cellules s'adaptent à un double niveau, membranaire (modification de leur composition en acides gras) et cytosolique (changements dans la synthèse des protéines), en réponse à une modification dans leur environnement (acidification).

III.3 Influence des conditions de concentration par centrifugation sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1

III.3.1 Contexte et objectifs

Les différentes étapes constituant le procédé de production des ferments lactiques peuvent avoir un effet important sur leurs caractéristiques technologiques et, notamment, leur résistance à la congélation. Plusieurs études ont porté sur l'effet des conditions de culture et les conditions de congélation et de stockage sur la cryotolérance des bactéries lactiques. En revanche, l'impact de l'étape de concentration (procédé de séparation et conditions de concentration) sur la résistance des cellules a été très peu étudié.

Dans ce contexte, l'objectif de cette troisième partie est d'analyser l'effet de différentes conditions de centrifugation sur la résistance de *Lb. bulgaricus* CFL1 à la congélation et au stockage à -20 °C. Le travail a été conduit en quatre étapes visant à :

- caractériser l'effet de trois vitesses de rotation et de trois durées de centrifugation sur la résistance à l'étape de concentration et sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1 ;
- identifier les conditions de centrifugation optimales, permettant de maximiser la résistance des cellules aux étapes de stabilisation ;
- analyser l'effet de la température de centrifugation sur les paramètres caractérisant la résistance des cellules aux différentes étapes du procédé ;
- analyser l'effet combiné des conditions de centrifugation et d'une adaptation acide sur la résistance des cellules.

La résistance des cellules a été caractérisée par leur activité acidifiante spécifique initiale (tc_{spe}), leur perte d'activité acidifiante spécifique pendant la concentration ($d_{tc_{spe}}$) et la congélation ($d_{tf_{spe}}$) et leur vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique pendant le stockage sous forme congelée (k_{spe}).

Les résultats obtenus font objet d'une troisième publication, acceptée dans le journal « Food and Bioprocess Technology », et constituant la partie III.3.2.

III.3.2 Publication 3. Effet des conditions de centrifugation sur la cryotolérance de *Lactobacillus bulgaricus* CFL1

Résumé

L'étape de concentration est généralement considérée comme responsable d'une dégradation des cellules. L'objectif de ce travail est de quantifier l'effet des conditions de centrifugation (vitesse, durée, température et pH) sur la qualité des ferments concentrés de *Lb. bulgaricus* CFL1. Ces effets ont été analysés sur l'activité acidifiante spécifique des cellules selon un plan d'expériences. Etonnamment, les conditions de centrifugation n'ont pas affecté significativement la perte d'activité acidifiante spécifique pendant l'étape de concentration elle-même. Par contre, la vitesse et la durée de centrifugation ont légèrement altéré la résistance des cellules à la congélation et au stockage sous forme congelée. La température de centrifugation (4 °C ou 15 °C) ne génère pas de différence de comportement des bactéries. Finalement, la combinaison de bonnes conditions de centrifugation (10 000 *g* pendant 15 min) avec une acidification des cellules dans leur milieu de culture (pH 5,25 pendant 30 min) en fin de fermentation, a permis d'augmenter leur cryotolérance. Il est donc possible d'observer le caractère additionnel des effets positifs liés aux conditions de centrifugation et à l'adaptation acide. Ces résultats ont un impact positif potentiel pour les industries de production de ferments, leur permettant ainsi de modifier les conditions de centrifugation afin de s'adapter à la spécificité et à la viscosité des milieux de fermentation.

Effect of centrifugation conditions on the cryotolerance of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1

Fernanda Streit, Georges Corrieu and Catherine Béal

UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, AgroParisTech, INRA
CBAI, F-78850 Thiverval-Grignon

Short running head: Centrifugation influences cryotolerance

Corresponding author: Catherine Béal
UMR782 GMPA, AgroParisTech, INRA
CBAI, F-78850 Thiverval-Grignon, France
Phone: + 33 (0)1 30 81 54 85
Fax: +33 (0)1 30 81 55 97.
E-mail address: beal@grignon.inra.fr

ABSTRACT

As concentration step is usually considered to be responsible for cell damage, the objective of this work was to quantify the effect of centrifugation conditions (speed, duration, temperature and pH) on the quality of *Lb. bulgaricus* CFL1 starters. These effects were analyzed on the specific acidification activity of the cells, according to experimental designs. Surprisingly, centrifugation conditions did not significantly affect the loss of specific acidification activity during concentration step. In contrast, centrifugation speed and duration slightly altered cell resistance to freezing and frozen storage. No difference was observed when centrifugation was conducted at 4 °C or 15 °C. Finally, combining good centrifugation conditions to an acidification of the cells in their fermented broth strongly improved their cryotolerance. These results may have an impact for industrial starter production as they allowed modifying centrifugation conditions to better match the specificity and the viscosity of the medium.

Keywords: acidification activity; centrifugation; cryotolerance; lactic acid bacteria

INTRODUCTION

On industrial scale, lactic acid bacteria starters are produced according to a sequence of different unit operations: fermentation, cooling, concentration, cryoprotection, freezing or freeze-drying, storage and distribution (Fonseca *et al.*, 2001). The production of lactic acid bacteria starters focuses on obtaining stable cultures with a high quality, i.e. keeping good viability and functional activity, even after long-term storage (Carvalho *et al.*, 2004).

Nevertheless, some of these unit operations alter the quality of the starters. Fonseca *et al.* (2001) demonstrated that process parameters, such as neutralizing agent, freezing rate and addition of glycerol affect the resistance of *St. thermophilus* and *Lb. bulgaricus* to freezing and frozen storage. According to Wang *et al.* (2005a), the pH and the temperature during fermentation influence the quality of frozen starters. The composition of the medium also affects the cryotolerance of *Lb. lactis*, *Lb. bulgaricus* and *St. thermophilus* (Carvalho *et al.*, 2003 ; Fonseca *et al.*, 2001). Bâati *et al.* (2000) showed that slow cooling rate increased the cryotolerance of *Lb. acidophilus*. Wang *et al.* (2005b) and Streit *et al.* (2007) determined the optimal post-fermentation conditions to allow *Lb. acidophilus* RD758 and *Lb. bulgaricus* CFL1, respectively, to better resist to freezing. They obtained an improved cryotolerance by cooling the cells at 28 °C for 8 h, or by acidifying them at pH 5.25 for 30 min. Saarela *et al.* (2005) pointed out that harvesting time, pH and cryoprotectant influence the stability of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* during freeze-drying. Finally, only one work dealing with the concentration step is available (Champagne and Gardner, 2002). The authors demonstrated that there is no effect of the centrifugation mode (batch or continuous) on the viability of *Leuconostoc mesenteroides*.

Among this information, the effect of the concentration conditions remained under question. The objective of the concentration step is to reduce the volume of the cells suspension, as well as to obtain a high cell concentration. This permits a reduction of transportation and storage costs and allows direct vast inoculation (DVI) (Béal *et al.*, 2008). Concentration is normally achieved by centrifugation (Mäyrä-Mäkinen and Bigret, 1998), permitting to obtain concentration rates that are comprised between 10 and 40 times (Béal *et al.*, 2008). According to Boyaval (1992), separation of the cells during centrifugation is based on a difference of density between the cells and the culture medium. In this way, high viscosity media need stronger centrifugation conditions to obtain a good recovery of the cells. Membrane techniques are considered as an alternative for centrifugation but for instance, their costs are higher, thus limiting their use for cells recovery in the industry (Béal *et al.*, 2008).

Available information concerning the effect of centrifugation conditions on cellular viability and metabolic activity is still limited. In this context, we aimed to clarify the influence of the centrifugation conditions on quality and cryotolerance of *Lb. bulgaricus* CFL1. The

effects of centrifugation speed, duration and temperature will be determined on the specific acidification activity of the cells. Finally, acidification of the cells will be combined to centrifugation, in order to check if their positive effects may be additive.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and media

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CFL1 (INRA, Thiverval-Grignon, France) was used in this study. Two precultures (24 and 8 h) were performed in 5 ml MRS broth at 42 °C before inoculation of the bioreactor.

The culture medium was composed of 60 g/l of sweet whey powder that was acidified at pH 5 with 50 % H₂SO₄ and heat-treated at 110 °C for 20 min. After centrifugation (17,000g, 20 min, 4 °C) and filtration (0.45 µm), the supernatant was supplemented with 20 g/l lactose and 5 g/l yeast extract. It was sterilized in the fermentor at 110 °C for 20 min. MRS agar (70.3 g/l) was employed for plate counts. It was heat-treated at 121 °C for 15 min. Reconstituted dried skim milk (100 g/l) was used for acidification activity measurements. After heat treatment (110 °C for 20 min), it was stored at 4 °C before use.

Fermentation and stabilization

Cultures were performed in a 2.2 l fermentor (LSL-Biolafitte, France) at controlled conditions (42 °C, pH 6 and 100 rpm). The pH regulation was achieved by introducing a solution of 60 g/l NaOH. The continuous weighing of the neutralizing solution permitted to identify the time at which the rate of variation of NaOH consumption was maximal in absolute value, which corresponded to the time at which the culture entered the stationary phase (Wang *et al.*, 2005b). Fermentations were stopped three hours after the beginning of stationary phase by a rapid cooling (2 °C/min) to 15 °C.

Cells were harvested and concentrated by centrifugation within various conditions (Table 1). Centrifugation was conducted at 4 °C, except in some cases that are specified. After centrifugation, the same stabilization procedure was applied. Concentrated cells were resuspended in their supernatant to achieve a mass concentration factor of 5. Aliquots of 500 µl were frozen and stored at -20 °C for 24 weeks for plate counts and acidification activity measurements. They were thawed at 30 °C for 5 min before analysis.

Specific acidification activity measurements

The acidification activity measurements were done by the CINAC System (Corrieu *et al.*, 1988). A fixed volume of sample (100 µl) was used to inoculate 150 ml of milk and the analysis was performed at 42 °C, in triplicate. The acidification activity of the bacterial

suspensions was characterized by the time necessary to reach pH 5.8 (tpH5.8, in min). A high value of tpH5.8 indicates a low acidification activity.

Cell concentrations (CFU/ml) were determined by plate counts on MRS agar, after incubation under anaerobic conditions at 42 °C for 72 h. Results corresponded to geometrical means of at least three counts.

The specific acidification activity (t_{spe} , in min/log(CFU/ml)) was defined as the ratio of tpH5.8 to the corresponding log of cell concentration. It was measured before concentration (tac_{spe} , in min/log(CFU/ml)), after concentration and before freezing (tc_{spe} , in min/log(CFU/ml)), after freezing (tf_{spe} , in min/log(CFU/ml)) and after different storage times at -20 °C. The loss of specific acidification activity during concentration (dtc_{spe} , in min/log(CFU/ml)) and during freezing (dtf_{spe} , in min/log(CFU/ml)) were calculated as follows:

$$dtc_{spe} = tc_{spe} - tac_{spe} \quad (1)$$

$$dtf_{spe} = tf_{spe} - tc_{spe} \quad (2)$$

The loss of specific acidification activity as a function of storage time (t_s , in d) is linear, as previously shown by Streit *et al.* (2007):

$$t_{spe} = tac_{spe} + dtc_{spe} + dtf_{spe} + k_{spe} \cdot t_s \quad (3)$$

where k_{spe} is the slope of the regression line (in min/log(CFU/ml).d). It represents the rate of loss in specific acidification activity during frozen storage. Cell suspensions that are sensitive to the storage conditions are characterized by a high value of k_{spe} . The specific acidification activity after 365 days of frozen storage ($t_{365_{spe}}$, in min/log(CFU/ml)) was calculated by using equation (3).

Experimental designs and statistical analyses

Three levels of centrifugation speed (3,000g; 10,000g and 17,000g) and duration (15; 30 and 45 min) were combined according to Table 1 (left part) in order to evaluate their main effects and interactions on the cryotolerance of *Lb. bulgaricus* CFL1. The effects of these two factors were analyzed on the five specific acidification activity parameters (tac_{spe} , dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} , $t_{365_{spe}}$). Results represent the average of three replicates. Moreover, two true experimental replicates were done at the following centrifugation conditions: 3,000g for 15 min and 17,000g for 45 min.

The influence of the centrifugation temperature on the specific acidification activity of the concentrated cells was also checked. At the end of four cultures, fermented medium was divided into two parts, each one being concentrated (17,000g for 30 min) at two different temperatures (4 °C or 15 °C). The temperature of 15 °C was chosen as it corresponds to the conditions normally used in the industry, whereas the temperature of 4 °C was close to that applied at laboratory scale. The effect of the concentration temperature was characterized on

the specific acidification activity parameters (tac_{spe} , dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} , $t365_{spe}$). Results correspond to the average of 12 measurements: four different replicate experiments, each one with three replicates.

Finally, the combined effect of centrifugation conditions and acidification at pH 5.25 for 30 min, on the specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1, was evaluated. At the end of the culture, cells were acidified at pH 5.25 with 90% H_2SO_4 for 30 min, and concentrated at 10,000g for 15 min. The effects of centrifugation conditions and acidification were quantified on the parameters characterizing the specific acidification activity (tac_{spe} , dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} , $t365_{spe}$). Results represent the average of three replicates.

Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests were done with the software Statgraphics plus 3.0 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA). The Anova linearity assumption was verified by the Quantile-Quantile plot test and by the standardized Skewness and standardized Kurtosis coefficients. The results obtained for the two centrifugation temperatures were analyzed according to the test of two samples comparison with the software Statgraphics plus 3.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of centrifugation speed and duration on specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1

Specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1 was determined after various centrifugation conditions, as well as after freezing and frozen storage. Results are summarized in Table 1 (right part).

Results showed that cells were characterized by an average specific acidification activity of 36 min/log(CFU/ml) before concentration. As dtc_{spe} values were not significantly different from zero, no loss of specific acidification activity was observed during the concentration step. After the freezing step, *Lb. bulgaricus* cells displayed a specific acidification activity of 80 min/log(CFU/ml), corresponding to an average loss during freezing of 44 min/log(CFU/ml). During frozen storage, the average rate of loss of specific acidification activity was equal to 0.37 min/log(CFU/ml).d, thus leading to a specific acidification activity of 216 min/log(CFU/ml) after 365 days of storage at -20 °C.

Table 1 Experimental design and parameters characterizing the specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1 cells after concentration, freezing and frozen storage at -20 °C.

Centrifugation conditions		Acidification activity parameters				
Speed (g)	Duration (min)	tac _{spe}	dtc _{spe}	dtf _{spe}	k _{spe}	t365 _{spe}
3,000	15	35	0	40	0.33	197
10,000	15	34	0	42	0.35	204
17,000	15	37	0	51	0.41	236
3,000	30	37	1	47	0.38	224
10,000	30	36	1	40	0.42	232
17,000	30	36	0	38	0.35	201
3,000	45	37	0	49	0.36	217
10,000	45	37	0	54	0.35	217
17,000	45	35	0	41	0.39	218
Average *		36 ± 1	0.22 ± 0.29	45 ± 4	0.37 ± 0.02	216 ± 9

* values ± confidence intervals at 95%.

tac_{spe} : specific acidification activity before concentration (min/log(CFU/ml)); dtc_{spe}: loss of specific acidification activity during centrifugation (min/log(CFU/ml)); dtf_{spe} : loss of specific acidification activity during freezing (min/log(CFU/ml)); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage (min/(log(CFU/ml).d)); t365_{spe} : specific acidification activity after 365 days of storage at -20°C (min/log(CFU/ml)).

By considering the confidence intervals corresponding to the mean values of these parameters and the precision of the method used to quantify the specific acidification activity (± 2 min/log(CFU/ml)) (Streit *et al.*, 2007), differences between centrifugation conditions were slight. In order to better quantify them, analyses of variance were conducted for each specific acidification activity parameter. From ANOVA, no influence of centrifugation speed and duration was observed on the initial specific acidification activity (tac_{spe}) ($P > 5\%$) and on the loss of specific acidification activity during centrifugation (dtc_{spe}) ($P > 5\%$). A statistical effect of both parameters was observed on the loss of specific acidification activity during freezing (dtf_{spe}) ($P < 0.01\%$) and on the rate of loss of specific acidification activity during frozen storage (k_{spe}) ($P < 5\%$). Finally, no significant effect on residual specific acidification activity after 365 days of frozen storage was noticed. Results corresponding to the multiple comparison tests are presented on Table 2.

From Table 2, a high centrifugation speed and an intermediate duration led to low values of dtf_{spe}, i.e. to a high cryotolerance of *Lb. bulgaricus* during freezing. An interaction ($P < 0.01\%$) between centrifugation speed and duration appeared (Fig. 1). It indicates that increasing centrifugation duration had a negative effect on cryotolerance of *Lb. bulgaricus* CFL1 for low centrifugation speeds (3,000g and 10,000g). In contrast, cryotolerance increased by combining high centrifugation speed and duration. From these results, the

condition that minimized the loss of specific acidification activity during freezing was centrifugation at 17,000g for 30 min.

Table 2 Multiple comparison tests for the parameters being significantly affected by the centrifugation speed and duration (D)

Parameter	Speed (g)			D (min)		
	3,000	10,000	17,000	15	30	45
dtf_{spe}	45.6 ^b	45.3 ^b	42.3 ^a	44.2 ^b	41.1 ^a	47.9 ^c
k_{spe}	0.36 ^d	0.37 ^{de}	0.38 ^e	-	-	-

dtf_{spe} : loss of specific acidification activity during freezing (min/log(CFU/ml)); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage (min/log(CFU/ml).d). (a, b, c) : significance effect at 0.01 %; (d, e): significance effect at 5 %.

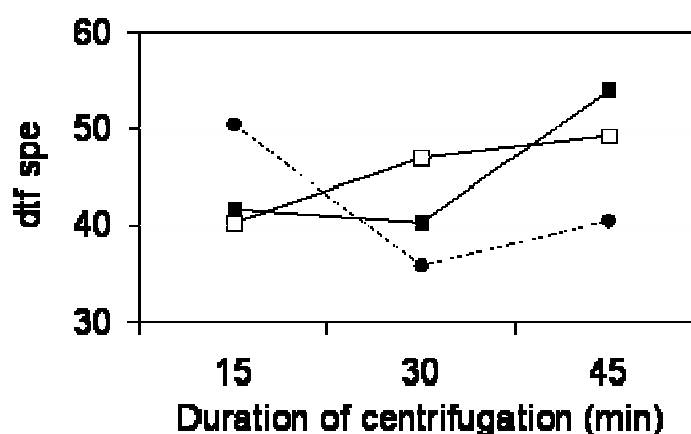


Figure 1 Interaction between centrifugation speed and duration on the loss of specific acidification activity during freezing (dtf_{spe} , in min/log(CFU/ml)) of *Lb. bulgaricus* CFL1 cells. (□): 3,000g; (■):10,000g; (●): 17,000g.

By considering the rate of loss of specific acidification activity during frozen storage at -20 °C (k_{spe}), a slight effect ($P < 5\%$) of the centrifugation speed was observed. The cryotolerance during frozen storage was the lowest (i.e. k_{spe} was the highest) when the cells were centrifuged at a high centrifugation speed (17,000g). The negative effect of high centrifugation speed on cells resistance to frozen storage can be related to the higher mechanical stress at which they were submitted. In summary, the best centrifugation speed for the freezing step (17,000g) induced the highest rate of loss of specific acidification activity during frozen storage. This opposite effect of the centrifugation conditions during these two steps explained why no effect of centrifugation speed and duration was observed on the specific acidification activity measured after 365 days of frozen storage (t_{365spe}).

From these results, centrifugation conditions influenced cryotolerance of *Lb. bulgaricus* CFL1. Nevertheless, even if the effects were significant, differences remained slight. Moreover, if *Lb. bulgaricus* CFL1 is known to be cryosensitive (Fonseca *et al.*, 2001), our results demonstrated that it was resistant to the mechanical stress induced by

concentration. This could be explained by considering that the cells were in a quite stable physiological state, as they were cooled (from 42°C to 15°C) before centrifugation. They were thus less reactive to mechanical stress. This result is in agreement with that of Champagne and Gardner (2002), who studied the survival rate of *Leuconostoc mesenteroides* BLAC after centrifugation. By comparing batch (10,000g) and continuous (33,000g) centrifugations, they did not find any significant influence of the type of centrifuge used, thus confirming the slight effect of this unit operation. Similar results were obtained by Bozoğlu *et al.* (1987) with *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*, as they observed no viability loss during concentration by centrifugation (7,000 rpm for 30 min at 0 °C). Our results completed this information, as they characterized the effects of centrifugation on the cell resistance to each step of their production process.

Effect of centrifugation temperature on specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1

In order to assess if centrifugation temperature influenced, or not, the specific acidification activity, cells were concentrated at 17,000g for 30 min, at two temperatures: 4 °C and 15 °C. Table 3 summarizes the results obtained with *Lb. bulgaricus* CFL1.

Table 3 Influence of centrifugation temperature on the parameters characterizing the specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1 cells concentrated at 17,000g for 30 min (means $\pm$ confidence intervals at 95%).

Parameter	4 °C	15 °C	P value
tac _{spe}	37 $\pm$ 2	37 $\pm$ 2	0.99
dtc _{spe}	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1.00
dtf _{spe}	32 $\pm$ 9	30 $\pm$ 7	0.72
k _{spe}	0.37 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.12	0.66
t365 _{spe}	205 $\pm$ 42	221 $\pm$ 46	0.88

tac_{spe} : specific acidification activity before concentration (min/log(CFU/ml)); dtc_{spe} : loss of specific acidification activity during centrifugation (min/log(CFU/ml)); dtf_{spe} : loss of specific acidification activity during freezing (min/log(CFU/ml)); k_{spe} : rate of loss of specific acidification activity during frozen storage (min/log(CFU/ml).d); t365_{spe} : specific acidification activity after 365 days of storage at -20 °C (min/log(CFU/ml)). P value: probability, according to the F-test, that the values obtained for the parameters studied at these two temperatures are not significantly different at a 95% confidence level.

By comparing the specific acidification activity obtained at the two centrifugation temperatures, and by considering that the P values were always higher than 0.05, no significant difference was observed when the cells were concentrated at 4 °C or at 15 °C. As previously indicated, this may be explained by the stable physiological state of the cells, at low temperatures ($\leq$ 15°C). Consequently, it could be concluded that centrifugation temperature had no effect on the resistance to concentration, freezing and frozen storage of

Lb. bulgaricus CFL1. As no previous information is still available, these results are original and should be further confirmed with other lactic acid bacteria. Nevertheless, they made it possible to compare other published results, in which centrifugation was conducted at different temperatures. Moreover, it indicates that centrifugation temperature may be increased (from 4°C to 15°C), in order to reduce medium viscosity and increase cells recovery (Boyaval, 1992), without disturbing the quality of the starters. This may have an important impact for the industry of starter production.

Combined effect of centrifugation and acidification at pH 5.25 for 30 min on the specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1

This part of the work intends to state if the effects of centrifugation conditions and of a mild acidification can be combined. This was done by simultaneously evaluating the effects of centrifugation conditions and acidification on the specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1. In this way, we retained the centrifugation condition that corresponded to 10,000g for 15 min, as it led to low specific parameters (dtf_{spe} , k_{spe} and $t365_{spe}$) as shown in Table 1. Corresponding cells were submitted to a mild acidification at pH 5.25 for 30 min (Streit *et al.*, 2007), before being concentrated at 10,000g for 15 min. Results were compared to those obtained after centrifugation at 17,000g for 15 min, as a reference of low specific acidification activity (i.e. high specific parameters).

Specific acidification activity measured before concentration was not changed by acidification (36 ± 0.4 min/log(CFU/ml)). No loss of specific acidification activity during the concentration step was revealed. In contrast, an important increase in *Lb. bulgaricus* cryotolerance was achieved after acidification. Fig. 2 displays the parameters representing the loss of specific acidification activity during freezing (dtf_{spe}) and the rate of loss of specific acidification activity during frozen storage (k_{spe}) for cells submitted or not to acidification.

After being exposed to a mild acidification for 30 min, cryotolerance of cells being centrifuged at 10,000g for 15 min was improved. With a reduction of 21 min/log(CFU/ml) on the dtf_{spe} value, resistance during freezing was 50% higher than that of not acidified cells (Fig. 2A). During frozen storage (Fig. 2B) cryotolerance was increased as k_{spe} value was reduced (14.3%). The better resistance obtained during these two steps engendered cells with a higher specific acidification activity after 365 days of storage for acidified cells (164 min/log(CFU/ml)), as compared to not acidified cells (204 min/log(CFU/ml)). These results agreed with those obtained by Streit *et al.* (2007). However, with *Lb. bulgaricus* CFL1 cells submitted to the same acidification condition (pH 5.25 for 30 min), these authors obtained a lower loss of specific acidification activity during freezing (15.8 min/log(CFU/ml) instead of 21 min/log(CFU/ml)). This could be explained by the higher mass concentration factor (14 instead of 5 in our case), as proposed by Bozoğlu *et al.* (1987).

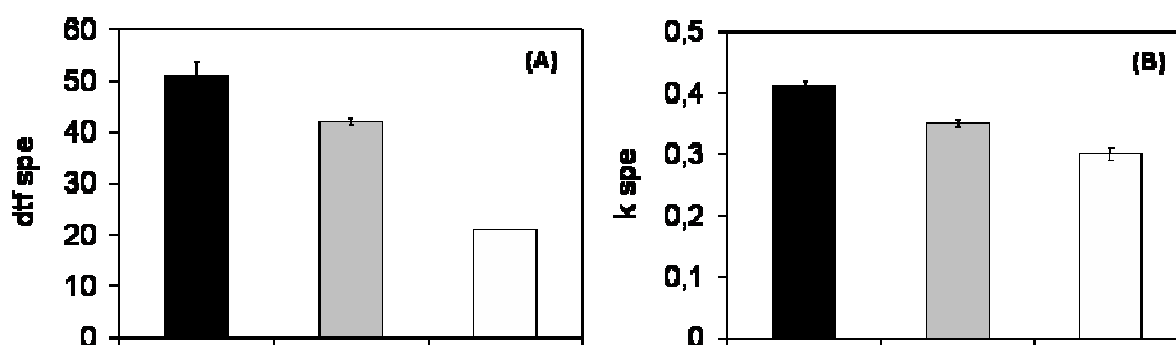


Figure 2 Loss of specific acidification activity during freezing (dtf_{spe} , in min/log(CFU/ml)) (A) and rate of loss of specific acidification activity during frozen storage at -20°C (k_{spe} , in min/log(CFU/ml).d) (B) for *Lb. bulgaricus* CFL1 cells. (■) not acidified cells concentrated at 17,000g for 15 min; (▒) not acidified cells concentrated at 10,000g for 15 min; (□) cells acidified at pH 5.25 for 30 min before centrifugation at 10,000g for 15 min.

By comparing the results obtained with acidified cells concentrated at 10,000g for 15 min with those corresponding to not acidified cells concentrated at 17,000g for 15 min, we observed an additional effect of centrifugation conditions and acid adaptation. The resistance to freezing and frozen storage was improved by combining good centrifugation conditions and acidification. This led to a dramatic increase of specific acidification activity after 365 days of storage at -20°C , as $t_{365_{spe}}$ decreased from 236 to 164 min/log(CFU/ml). This difference of 72 min/log(CFU/ml) represented an important improvement that may be valuable for the starter production industry.

CONCLUSION

This work demonstrated that centrifugation conditions, such as speed, duration and temperature, had a small or inexistent effect on the cryotolerance of *Lb. bulgaricus* CFL1. Surprisingly, the concentration step did not lead to any loss of specific acidification activity. This can be linked to a good resistance of this strain to the mechanical stress induced by centrifugation. The slight effects of centrifugation conditions on the resistance to freezing and frozen storage were opposite. For example, cells concentrated at 17,000g displayed a good cryotolerance during freezing but a high rate of loss of specific acidification activity during frozen storage. This opposite behavior cancelled the effects of centrifugation conditions after long term frozen storage.

Finally, we reported that the positive effects of two process steps can be added. From our results, combining good centrifugation conditions and a mild acidification of cells strongly improved their cryotolerance.

As these results were new, they should be confirmed with other lactic acid bacteria. However, they made it possible to compare different studies, performed in different

centrifugation conditions. They also highlighted that some simple and small changes during centrifugation allowed improving cells quality and process performance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by the CAPES Foundation (Brazil). The authors would like to thanks Dr. Anne Saint-Eve for her help on the statistical analysis of our results.

REFERENCES

- Bâati, L., Fabre-Gea, C., Auriol, D. and Blanc, P. J. (2000).** Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 241-247.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. and Obert, J. P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 661-785.
- Boyaval, P. (1992).** Couplage fermentation-ultrafiltration et production de biomasse. *Industries Alimentaires et Agricoles* **109**, 713-716.
- Bozoğlu, T. F., Ozilgen, M. and Bakir, U. (1987).** Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology* **9**, 531-537.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. (2003).** Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal* **13**, 463-468.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. (2004).** Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **14**, 835-847.
- Champagne, C. P. and Gardner, N. J. (2002).** Effect of process parameters on the production and drying of *Leuconostoc mesenteroides* cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**, 291-296.
- Corrieu, G., Spinnler, H. E., Jomier, Y. and Picque, D. (1988).** Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters. French patent. FR 2 629 612.
- Fonseca, F., Béal, C. and Corrieu, G. (2001).** Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology* **43**, 189-198.
- Mäyrä-Mäkinen, A. and Bigret, M. (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 73-102.

- Saarela, M., Virkajärki, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T. and Mättö, J. (2005).** Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1330-1339.
- Streit, F., Corrieu, G. and Béal, C. (2007).** Acidification of fermented broth improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology* **128**, 659-667.
- Wang, Y., Corrieu, G. and Béal, C. (2005a).** Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science* **88**, 21-29.
- Wang, Y., Delettre, J., Guillot, A., Corrieu, G. and Béal, C. (2005b).** Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* **50**, 294-307.

III.3.3 Conclusion

Cette partie de l'étude a permis de quantifier l'influence des conditions de centrifugation, telles que la vitesse de rotation, la durée et la température, sur la cryotolérance de *Lb. bulgaricus* CFL1.

Aucune perte d'activité acidifiante spécifique n'a été observée pendant l'étape de concentration, quelles que soient les conditions de centrifugation appliquées. Ces résultats sont liés à une bonne résistance de la souche au stress mécanique associé à la centrifugation, mais aussi à la gamme des conditions étudiées (3 000 *g* à 17 000 *g* et 15 à 45 min) qui n'a pas permis de modifier significativement cette résistance. L'élargissement de cette gamme n'est cependant pas envisagé car il paraît peu réaliste au vu des contraintes techniques et des conditions de travail existant dans l'industrie.

La vitesse de rotation et la durée de centrifugation présentent un effet faible, mais significatif, sur la cryotolérance des cellules. Par contre, les résultats indiquent que les effets de ces paramètres sur la résistance à la congélation et au stockage sous forme congelée sont opposés. Par exemple, les cellules concentrées à 17 000 *g* présentent une bonne cryotolérance au cours de la congélation, mais une vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique élevée pendant le stockage sous forme congelée. Ce comportement antagoniste annule l'effet des conditions de concentration sur l'activité acidifiante spécifique des cellules à l'issue d'un stockage à long terme (1 an).

Les résultats obtenus montrent, par ailleurs, que la température de concentration n'a pas d'effet sur la résistance des cellules au cours des différentes étapes du procédé. Il est donc indifférent de centrifuger les cellules à 4 °C ou à 15 °C, ce qui procure des marges de fonctionnement importantes, notamment lorsqu'il s'agit de centrifuger des milieux visqueux ou très spécifiques.

Enfin, les résultats indiquent que la combinaison d'une acidification (pH 5,25 pendant 30 min) du milieu de fermentation avec des conditions de centrifugation favorables (10 000 *g* pendant 15 min) est responsable d'une meilleure maintenance de l'activité cellulaire : les cellules sont 1,3 fois plus acidifiantes après 1 an de stockage à -20 °C que les cellules non acidifiées. Les effets positifs, liés aux conditions de centrifugation et à l'acidification, sont donc additionnels.

III.4 Effet des conditions de microfiltration tangentielle sur l'état physiologique et les propriétés technologiques de *Lb. bulgaricus* CFL1

III.4.1 Contexte et objectifs

Le principe ainsi que les avantages et les inconvénients des différentes méthodes de concentration (centrifugation et filtration membranaire) ont été présentés au paragraphe III.2.4.5. La centrifugation, considérée comme la méthode de référence lors de la production de ferments, a été étudiée au chapitre précédent, en portant une attention particulière aux effets des conditions opératoires sur la qualité des bactéries lactiques.

Les techniques de filtration sur membrane sont largement citées comme une alternative à la concentration par centrifugation. Actuellement, l'application de ces techniques permet, essentiellement, la récupération des bioproduits (enzymes, vitamines, antibiotiques) et la clarification des boissons (bière, vin, cidre et jus de fruits). Les résultats disponibles, relatifs à la séparation de microorganismes, portent, soit sur des applications avec une charge bactérienne faible (traitement de l'eau), soit sur des applications où le produit d'intérêt se trouve dans le milieu (acide lactique, par exemple). Dans ces deux cas, la récupération de la biomasse microbienne ne présente pas d'intérêt pour l'opérateur.

Afin d'envisager l'application de la filtration tangentielle pour la concentration des ferments lactiques, il est important de connaître l'effet des conditions opératoires sur la qualité et la résistance des cellules. Ceci correspond à l'objectif de cette quatrième partie de la thèse dont les objectifs spécifiques visent à :

- analyser l'effet des conditions opératoires de microfiltration (vitesse tangentielle et pression transmembranaire) sur les performances du procédé de concentration ;
- étudier la résistance de *Lb. bulgaricus* CFL1 aux étapes de concentration, congélation et stockage à -20 °C, en considérant différentes conditions de microfiltration (cinq valeurs de vitesse tangentielle et cinq valeurs de pression transmembranaire) ;
- identifier la condition de microfiltration permettant l'obtention d'un concentré bactérien le plus actif et le plus résistant possible aux étapes de congélation et de stockage sous forme congelée ;
- analyser l'effet des conditions opératoires de microfiltration sur les réponses physiologiques (composition en acides gras membranaires et protéome) des bactéries.

La résistance des cellules est quantifiée par leur perte d'activité acidifiante spécifique pendant la concentration (dtc_{spe}) et la congélation (dtf_{spe}), leur vitesse de perte d'activité acidifiante spécifique pendant le stockage sous forme congelé (k_{spe}) et leur activité acidifiante spécifique après 365 jours de stockage à -20 °C ($t_{365_{spe}}$).

Une partie des résultats obtenus fait objet d'une quatrième publication, actuellement soumise à « Process Biochemistry » et présentée ci-dessous. Les résultats relatifs à la protéomique sont présentés à la suite.

III.4.2 Publication 4. Les conditions de microfiltration induisent des changements de la cryotolérance de *Lb. bulgaricus*, correspondant à des réponses physiologiques différentes des cellules

Résumé

L'objectif de ce travail est d'analyser l'effet des conditions de microfiltration (vitesse tangentielle et pression transmembranaire) sur la qualité de *Lb. bulgaricus* CFL1 sous forme concentrée et congelée. Lors de l'étape de concentration, les bactéries concentrées par microfiltration sont moins résistantes que celles concentrées par centrifugation. Par contre, leur cryotolérance pendant la congélation est augmentée, entre 28 % et 88 %, selon les conditions de microfiltration utilisées. Pendant le stockage sous forme congelée, et par comparaison avec les cellules centrifugées, la résistance des cellules est affectée, positivement ou négativement, par les conditions de microfiltration appliquées. La meilleure cryotolérance a été obtenue avec les bactéries concentrées à une vitesse tangentielle de 2 m.s^{-1} et à une pression transmembranaire de 0,15 MPa. Ces conditions de microfiltration induisent une augmentation des ratios entre acides gras membranaires insaturés et saturés, ainsi que cycliques et saturés. Ces changements sont responsables d'une augmentation de la fluidité membranaire, ce qui aide les cellules à mieux résister pendant la congélation et le stockage sous forme congelée.

Microfiltration conditions induce changes to *Lb. bulgaricus* cryotolerance in response to physiological changes

Abbreviated running title: Microfiltration influences bacterial cryotolerance

Fernanda Streit, Amine Bchir, Violaine Athès, Georges Corrieu, Catherine Béal *

UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, AgroParisTech, INRA
CBAI, F-78850 Thiverval-Grignon

* Corresponding author. Fax: +33 (0)1 30 81 55 97.

E-mail address: beal@grignon.inra.fr (C. Béal)

ABSTRACT

This work aimed at quantifying the effect of microfiltration conditions (cross-flow velocity and transmembrane pressure) on the quality of frozen *Lb. bulgaricus* CFL1 starters. Microfiltered cells were less resistant during the concentration process than centrifuged cells. In contrast, bacterial cryotolerance during freezing was improved, in a range of 28% to 88%, depending on the microfiltration conditions. During frozen storage, cell resistance was also affected by microfiltration conditions, either positively or negatively compared to centrifugation. The best cryotolerance was obtained for cells microfiltered with a cross-flow velocity of 2 m/s and a transmembrane pressure of 0.15 MPa. Concerning membrane fatty acids, these conditions increased cellular unsaturated to saturated and cyclic to saturated ratios which enhanced membrane fluidity, thus helping cells better resist freezing and frozen storage.

Keywords: acidification activity, concentration, cryotolerance, *Lb. bulgaricus*, membrane fatty acid composition, microfiltration

INTRODUCTION

The quality of an active fermented bioproduct is highly dependant on the downstream process conditions (Zhou *et al.*, 2006). To promote the production of lactic acid starters, centrifugation is the method usually employed to concentrate the cells before their stabilization (Béal *et al.*, 2008). Nevertheless, it leads to high production and maintenance costs (Carrère and Blaszkow, 2001) and sometimes results in low quality products due to elevated temperatures. In addition, as it is based on differential density, incomplete separation (less than 90%) is commonly observed (Grandison and Finnigan, 1996).

As an alternative, membrane processes such as cross-flow microfiltration are well designed to separate bacterial cells. According to Fig. 1, the fermented broth flows tangentially to a membrane, which is characterized by a pore size comprised between 0.05 and 1 μm (Van Reis and Zydney, 2007). The membrane selectively separates the cells (retentate) from the fermented medium (permeate) due to a pressure difference. This pressure gradient, called transmembrane pressure (TMP), together with the cross-flow velocity (v) applied to the fermented broth, represent the two most important parameters that characterize this unit operation. The advantage of using cross-flow microfiltration instead of centrifugation is the possibility of obtaining a complete recovery of the cells and to reduce costs (Boyaval *et al.*, 1998 ; Grandison and Finnigan, 1996).

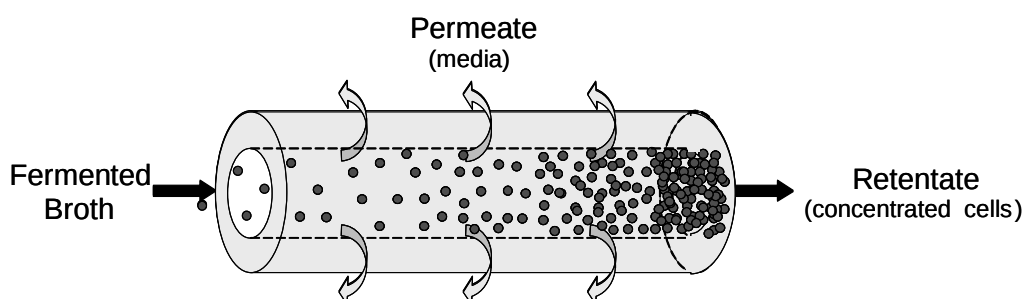


Figure 1 Schematic representation of cell concentration by cross-flow microfiltration

By separating cells, cross-flow microfiltration is commonly applied as the first step for harvesting bioproducts such as enzymes, antibiotics and organic acids produced by microorganisms. The bioproduct is recovered in the permeate and further extracted using other selective separation processes (Grandison and Finnigan, 1996 ; Persson *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2006). Another common application of microfiltration concerns the clarification of beer, wine, cider and fruit juices (Athès *et al.*, 2006 ; Fillaudeau and Carrère, 2002 ; Grandison and Finnigan, 1996). Some works are also available concerning water and wastewater treatment by cross-flow microfiltration (Haneda *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007 ; Sadr Ghayeni *et al.*, 1999) and bacterial removal from milk (Caric *et al.*, 2000 ; Daufin *et al.*,

1998), both cases being characterized by low microorganism concentrations. Finally, some applications of cross-flow microfiltration focus on lactic acid bacteria separation, mainly for recycling the cells during batch or continuous fermentation processes (Amen and Cabau, 1982 ; Boyaval *et al.*, 1998).

At present, no work is available about the use of cross-flow microfiltration for the concentration of lactic acid bacteria during starter production processes. Information about the effect of microfiltration on the cell's physiological state is thereof not available in the literature. In order to clarify the potential interest of this process and to better understand the biological consequences of microfiltration, the four following questions need to be answered: Does microfiltration represent a more efficient downstream process than centrifugation? What are the effects of microfiltration parameters (cross-flow velocity and transmembrane pressure) on process performance for lactic acid bacteria concentration? Does microfiltration influence the acidification activity of the cells and their cryotolerance? Does microfiltration affect the physiological state of the cells?

In order to answer these questions, this work aimed at evaluating the impact of different conditions of cross-flow velocity and transmembrane pressure on the parameters characterizing the microfiltration process such as duration, initial permeate flux and rate of reduction of the permeate flux, and the specific acidification activity parameters of the cells after concentration, freezing and frozen storage. We also aimed at identifying the physiological changes induced by microfiltration in relation to the cryotolerance of the cells by analysing their membrane fatty acid composition.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and media

The lactic acid bacterium *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 (INRA, Thiverval-Grignon, France) was used in this work. Frozen aliquots were stored at -80°C. Two precultures (24 h and 8 h) were performed in 5 mL MRS broth (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) at 42°C before inoculation of the bioreactor.

The culture medium was composed of 60 g/L sweet whey powder (Eurosérum, Port-sur-Saône, France) that was heat-treated at 110°C for 20 min after adjustment at pH 5 with 50% H₂SO₄ (v/v). The supernatant, obtained after centrifugation (17,000 x g, 20 min, 4°C) and filtration on a qualitative filter (0.45 µm), was supplemented with 20 g/L lactose (Prolabo, Briare-le-Canal, France) and 5 g/L yeast extract (Organotechnie, La Courneuve, France). It was sterilized in the fermentor at 110°C for 20 min.

MRS agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) (70.3 g/L) was heat-treated at 121°C for 15 min and was used for plate counts.

Reconstituted dried skim milk (EPI Ingrédient, Ancenis, France) (100 g/L) was sterilized at 110°C for 20 min and employed for acidification activity measurements.

Fermentation and stabilization

Cultures were prepared in a 2.2 L fermentor (LSL-Biolafitte, St Germain-en-Laye, France) with 1.9 L working volume at controlled conditions (42°C, pH 6 and 100 rpm). The pH was controlled by introducing a solution of 6% NaOH (v/v) (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). Cultures were stopped three hours after the beginning of the stationary phase by rapid cooling to 15°C (Streit *et al.*, 2007).

Cells were harvested and concentrated by microfiltration according to the conditions described on Table 1. For each culture, one additional sample was concentrated by centrifugation (17,000 $\times g$, 30 min, 4°C) as a reference condition. A mass concentration factor of 2.5 was targeted. Concentrated cells were frozen and stored at -20°C for 24 weeks for plate counts and acidification activity measurements. Another part of the concentrated cells was frozen and stored at -80°C to avoid any deterioration. They were then used for membrane fatty acid analyses.

Microfiltration

Lab-scale microfiltration was performed in a mineral mono-tubular membrane composed of alumina α (Membralox, Pall Exekia, Bazet, France) with an effective area of 50 cm² and a pore-size of 0.1 μ m. It was characterized by a permeability factor of 0.00207 L/(h.m².Pa) and a hydraulic resistance assessed on water of 1.74 10¹² m⁻¹.

The microfiltration system consisted of a cross-flow module (TIA, Bollène, France) with a 2 L storage vessel. Its use made it possible to vary the cross-flow velocity from 0.14 to 11 m/s and the transmembrane pressure from 0.02 to 0.46 MPa. The transmembrane pressure was considered as constant throughout the 25 cm length of the mono-tubular membrane. The media was introduced into the vessel and circulated with a pump at a defined flow-rate. During microfiltration, permeate was collected and continually weighed, thus making it possible to calculate the mass concentration factor (MCF) of the retentate. The microfiltration was stopped when a MCF of 2.5 was achieved.

After each run, the system was cleaned by a three-step process: two alkali treatments with Ultrasil 25F (Henkel, Boulogne-Billancourt, France) diluted at 1%, maintained first at 45°C for 10 min and then at 80°C for 30 min, and an acid treatment with nitric acid 0.2% at 30°C for 15 min. The system was rinsed with water after each step to reach neutrality. Before utilization, it was decontaminated with a solution of NaOH 1% containing 200 mg/L of sodium hypochlorite at a maximum temperature of 20°C for 30 min.

For all the microfiltration conditions studied (Table 1), four parameters characterizing process performance were determined: the time necessary to achieve a mass concentration factor of 2.5 (D , in min), the initial permeate flux (J_0 , in $L/(h \cdot m^2)$), the rate of reduction of permeate flux during the process (dJ/dt , in $L/(h^2 \cdot m^2)$) and the final hydraulic resistance (R_{Hfinal} , in m^{-1}) which represented the hydraulic resistance of the clean membrane plus the resistance due to cake formation and fouling. This resistance was calculated as a function of the viscosity of the permeate (μ , in Pa.s), the final permeate flux (J_{final} , in $L/(h \cdot m^2)$) and the transmembrane pressure (TMP, in Pa) at the end of the microfiltration, according to the following equation, derived from Darcy's Law:

$$R_{Hfinal} = 3.6 \cdot 10^6 \cdot \frac{TMP}{\mu \cdot J_{final}} \quad (1)$$

Different cross-flow velocities and TMP conditions were studied. Cross-flow velocity values were comprised between 1.5 and 5 m/s and TMP values between 0.1 and 0.42 MPa. These values were chosen according to the literature and the operational limits of the microfiltration module. Table 1 (left part) presents the different combinations of v and TMP studied. Experiments CF2 and CF5 were duplicated.

Viability and specific acidification activity measurements

Cell viability (CFU/mL) was determined by plate counts on MRS agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) after anaerobic incubation (GENbox anaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 42°C for 72 h. Results corresponded to geometrical means of at least three counts.

The CINAC System (Corrieu *et al.*, 1988) was used for acidification activity measurements carried out in milk at 42°C in triplicate. The time necessary to reach pH 5.8 (tpH5.8, in min) was retained to quantify the acidification activity of the bacterial suspensions. The higher the tpH5.8, the longer the latency phase and the lower the acidification activity.

The specific acidification activity (t_{spe} , in $min/(\log(CFU/mL))$) was defined as the ratio of tpH5.8 to the corresponding log of cell concentration (Streit *et al.*, 2007). It was measured before concentration (tac_{spe} , in $min/(\log(CFU/mL))$), after concentration and before freezing (tc_{spe} , in $min/(\log(CFU/mL))$), after freezing (tf_{spe} , in $min/(\log(CFU/mL))$) and after different storage times at -20°C.

Four specific acidification activity variables were determined. The loss in specific acidification activity during concentration (dac_{spe} , in $min/(\log(CFU/mL))$) and freezing (dfe_{spe} , in $min/(\log(CFU/mL))$) were calculated as follows:

$$dac_{spe} = tc_{spe} - tac_{spe} \quad (2)$$

$$dfe_{spe} = tf_{spe} - tc_{spe} \quad (3)$$

High values of dtc_{spe} and dtf_{spe} were related to high losses of specific acidification activity during concentration and freezing, respectively.

The loss in specific acidification activity (t_{spe}) as a function of storage time (ts , in d) was linear, as previously shown by Streit *et al.* (2007):

$$t_{spe} = tac_{spe} + dtc_{spe} + dtf_{spe} + k_{spe} \cdot ts \quad (4)$$

where k_{spe} is the slope of the regression line (in $\text{min}/(\log(\text{CFU/mL}) \cdot \text{d})$). A high value of k_{spe} was related to a rapid decrease in specific acidification activity, and indicated that the cell suspension was sensitive to storage conditions.

Statistical Analysis

Principal component analysis (*Statbox*TM v6.7, Grimmersoft, Neuilly-sur-Seine, France) was performed in order to relate the microfiltration conditions (v and TMP) to the specific acidification activity parameters of *Lb. bulgaricus* CFL1. It made it possible to identify the conditions of microfiltration that led to cell suspensions with the highest and lowest resistance to concentration, freezing and storage at -20°C . These two cell suspensions were used for subsequent analyses of membrane fatty acid composition and proteome.

Membrane fatty acid analyses

Membrane fatty acids of the two retained cell suspensions (highest and lowest resistance) were extracted and methylated as described by Wang *et al.* (2005a). Methylated fatty acid esters were analysed by gas chromatography. Their identification was made possible by comparing their retention times with those of two known standards: Bacterial Acid Methyl Esters (BAME) (Supelco, Bellefonte, PA) and Fatty Acid Methyl Esters (FAME) (Sigma). By using a mass selective detector, the fatty acid methyl esters identification was confirmed. Each mass spectrum was compared with a data bank (NIST/02 Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) to determine the exact carbon number and the existence of a cyclopropane.

Results were expressed as relative percentages of each fatty acid which were calculated as the ratio of the surface area of the considered peak to the total area of all peaks. The ratios of unsaturated to saturated fatty acids (U/S) and cyclic to saturated fatty acids (C/S) were calculated. Analyses were made in quadruplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of microfiltration conditions on process performances

The effect of cross-flow velocity (v) and transmembrane pressure (TMP) was established on the parameters characterizing the process performance: the time necessary

to achieve a mass concentration factor of 2.5 (D , in min), the initial permeate flux (J_0 , in $L/(h.m^2)$), the rate of reduction of permeate flux during the process (dJ/dt , in $L/(h^2.m^2)$) and the final hydraulic resistance (R_{Hfinal} , in m^{-1}). Results are displayed on Table 1, right part.

Table 1 Experimental conditions used to study the effect of microfiltration conditions on the parameters characterizing process performance.

Experiments	Microfiltration conditions		Process parameters			
	v	TMP	J_0	dJ/dt	R_{Hfinal}	D
CF1	5.00	0.26	63	-5	1.9 10 ¹³	261
CF2	3.25	0.26	71	-10	2.3 10 ¹³	276
CF3	3.25	0.42	69	-8	4.0 10 ¹³	292
CF4	1.50	0.26	27	-2	7.7 10 ¹³	663
CF5	3.25	0.10	53	-4	1.0 10 ¹³	354
CF6	4.49	0.37	76	-12	2.5 10 ¹³	237
CF7	4.49	0.15	83	-12	8.8 10 ¹²	238
CF8	2.01	0.15	37	-2	3.0 10 ¹³	465
CF9	2.01	0.37	39	-2	5.6 10 ¹³	437

v : cross-flow velocity (in m/s); TMP : transmembrane pressure (in MPa); J_0 : initial permeate flux (in $L/(h.m^2)$); dJ/dt : rate of decrease of permeate flux during the microfiltration process (in $L/(h^2.m^2)$); R_{Hfinal} : final hydraulic resistance (in m^{-1}); D : time necessary to achieve a mass concentration factor of 2.5 (in min)

For all the microfiltration conditions tested, the permeate flux decreased quite linearly during the concentration process, thus making it possible to establish linear regressions to identify J_0 and dJ/dt values (Fig. 2). This decrease was explained by an increased concentration in cells and cell residues, which, when deposited on the membrane surface, leads to a decrease in TMP (Caridis and Papathanasiou, 1997) due to additional resistance to the permeate flux through the membrane (Van Reis and Zydney, 2007). This behaviour differed from that observed by Carrère *et al.* (2002), who observed a faster reduction of the permeate flux at the beginning of the process followed by a constant and stable value. This difference can be explained by the TMP control that was carried out in the work of these authors but not in ours.

By analysing our results, we identified three groups of microfiltration conditions according to process performance. As shown on Table 1, three conditions (CF4, CF8 and CF9) led to a low initial permeate flux (J_0) and a small reduction of flux during microfiltration (dJ/dt), but a high duration of microfiltration (D). This behaviour can be explained by substantial blocking of the pores of the membrane at the beginning of the process which, due to the low cross-flow velocities, limited the decrease of the permeate flux during

microfiltration. On the other hand, five conditions displayed high values of J_0 and dJ/dt and a small value for D (CF1, CF2, CF3, CF6 and CF7). In these cases, the fouling phenomenon was minimized when a high cross-flow velocity was applied. The same behaviour was previously described by Caridis and Papathanasiou (1997), Persson *et al.* (2001) and Graves *et al.* (2006) during microfiltration of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC19435, *Mycobacterium* M156 and *Bacillus subtilis*, respectively. Finally, condition CF5 (3.25 m/s and 0.1 MPa) was characterized by an intermediate behaviour. Even if this condition showed a similar reduction of permeate flux (dJ/dt) compared to CF1, its lower initial permeate flux (J_0) explained the increase in the duration (D) of the microfiltration. This was related to the smaller values of v and TMP compared to CF1 which increased the initial fouling of the membrane.

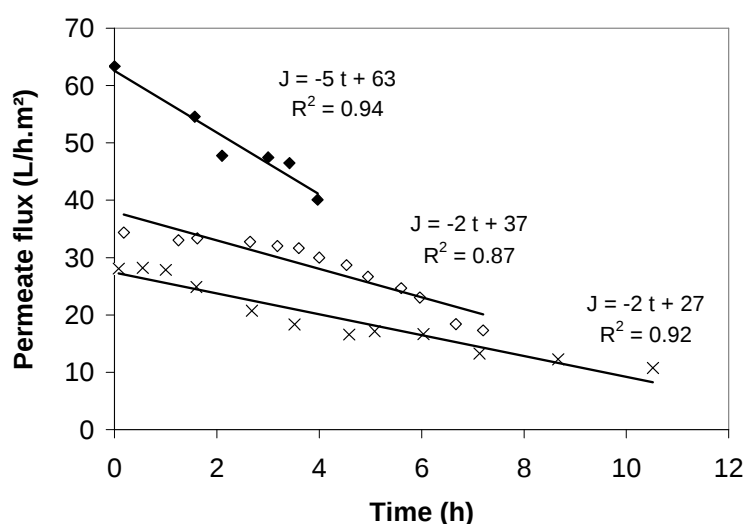


Figure 2 Time-decrease of permeate flux during microfiltration. ♦: CF1 (5 m/s, 0.26 MPa); x: CF4 (1.5 m/s, 0.26 MPa); ◇: CF8 (2.01 m/s, 0.15 MPa).

The evidence of fouling during the process was obtained by comparing the average final hydraulic resistance (R_{Hfinal}) for all the microfiltration conditions ($3.3 \cdot 10^{13} \pm 1.5 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1}$) with the hydraulic resistance of the clean membrane ($1.74 \cdot 10^{12} \text{ m}^{-1}$). No significant effect of v and/or TMP was observed on this final resistance. Nevertheless, this result was higher than that obtained by Fillaudeau and Carrère (2002), who displayed a maximum value equal to $1.0 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1}$. As they worked with another medium and with yeasts, and as they used the same process conditions and the same membrane pore size ($0.1 \mu\text{m}$), the difference indicates that the type of microorganism influences process performance. *Lb. bulgaricus* cells are smaller than yeast cells, thus permitting them to more easily block the pores, subsequently increasing resistance to the permeate flux. Conversely, a higher final resistance ($3.0 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-1}$) was obtained by Graves *et al.* (2006) during the microfiltration of *Bacillus subtilis* cells. This higher resistance, for bigger cells than *Lb. bulgaricus*, is explained

by the use of a membrane with a bigger pore size (0.2 μm), thus more sensitive to the fouling phenomena.

The duration (D) of the microfiltration, to obtain a mass concentration factor of 2.5, differed in a range of 237 to 663 min according to the microfiltration conditions. A high value of D was related to a small value of initial permeate flux and a slow reduction of this flux during time. In contrast, a high initial permeate flux was necessary to obtain a low value of duration. The same effect of cross-flow velocity and transmembrane pressure on the duration of microfiltration was previously described by Carrère and Blaszkow (2001) for eliminating cells during the production of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis*. For the same TMP, increasing the cross-flow velocity (v) generates a large scale reduction in process time, thus representing a gain of productivity. High cross-flow velocities are responsible for an increase in shear stress at the membrane surface which reduces the deposition of particles and enhances the permeate flux (Graves *et al.*, 2006 ; Persson *et al.*, 2001). In addition, for the same cross-flow velocity, increasing TMP slightly reduces the process duration. Theoretically, the increase of TMP improves permeate flux (Li *et al.*, 2006). Nevertheless, according to Boyaval *et al.* (1998), this behaviour was never observed for cell suspensions due to enhanced fouling phenomena. Practically speaking, for each type of equipment, a specific combination of TMP and v that optimises the separation process can be defined (Boyaval *et al.*, 1998 ; Fillaudeau and Carrère, 2002).

Effect of microfiltration conditions on the specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1

The loss of specific acidification activity of *Lb. bulgaricus* CFL1 (in $\text{min}/(\log(\text{CFU/ml}))$) during concentration ($\text{d}_{\text{c}_{\text{spe}}}$), freezing ($\text{d}_{\text{f}_{\text{spe}}}$) and frozen storage (k_{spe}) varied according to the microfiltration conditions (Table 2). Results obtained for cells concentrated by centrifugation (17,000 $\times g$, 30 min, 4°C), considering the same mass concentration factor (2.5), are presented as reference values.

The initial specific acidification activity measured before concentration was similar for both concentration processes and whatever the microfiltration condition used ($32 \pm 2 \text{ min}/(\log(\text{CFU/ml}))$). This observation indicates that the cells were harvested in a similar physiological state (Streit *et al.*, 2007).

The loss of specific acidification activity during concentration ($\text{d}_{\text{c}_{\text{spe}}}$) was comprised between 8 and 34 $\text{min}/(\log(\text{CFU/ml}))$ for cells submitted to microfiltration. These values were higher than that observed after centrifugation (0 $\text{min}/(\log(\text{CFU/ml}))$), thus indicating that the cells were sensitive to the concentration process itself. This negative effect of microfiltration can be linked firstly, to the duration of the concentration process, as centrifugation lasted 30 min, whereas microfiltration lasted at least 4 hours (Table 1). Moreover, the mechanical

stress produced by pumping and turbulent flow can affect cell viability (Shimizu *et al.*, 1994), thus reducing the specific acidification activity of microfiltered cells. This point is in agreement with the work of Arnaud *et al.* (1993), who demonstrated that high shear stress reduced the growth rate of *Lb. bulgaricus*. In contrast, Jeantet *et al.* (1996) did not find any loss of *Lactobacillus helveticus* CNRZ303 viability after nanofiltration at 16.5 bars for 2 h at 45°C, probably because of the lower shear stress corresponding to this type of membrane filtration process. All these results indicate that cell resistance is highly dependant on operating conditions and the strains used.

Table 2 Specific acidification activity parameters of *Lb. bulgaricus* CFL1 concentrated according to different microfiltration conditions and by centrifugation.

Experiments	Microfiltration conditions		Specific acidification activity parameters			
	v	TMP	dtc _{spe}	dtf _{spe}	k _{spe}	t365 _{spe}
CF1	5.00	0.26	34	20	0.87	401
CF2	3.25	0.26	9	7	0.28	153
CF3	3.25	0.42	12	18	0.38	199
CF4	1.50	0.26	24	5	0.52	246
CF5	3.25	0.10	22	15	0.48	248
CF6	4.49	0.37	29	23	0.64	313
CF7	4.49	0.15	9	9	0.23	138
CF8	2.01	0.15	8	4	0.22	121
CF9	2.01	0.37	22	7	0.28	166
Centrifugation (17,000g, 30 min, 4°C)			0	32	0.37	205

v: cross-flow velocity (in m/s); TMP : transmembrane pressure (in MPa); dtc_{spe}: loss of specific acidification activity during concentration (in min/(log(CFU/mL))); dtf_{spe}: loss of specific acidification activity during freezing (in min/(log(CFU/mL))); k_{spe}: rate of loss of specific acidification activity during frozen storage at -20°C (in min/(log(CFU/mL).d)); t365_{spe}: specific acidification activity after 365 days of frozen storage (in min/(log(CFU/mL))).

Concerning the loss of specific acidification activity during freezing, microfiltered cells were more cryotolerant than cells submitted to centrifugation. The dtf_{spe} values were lower than those observed for centrifuged cells and the improvement ranged from about 28% to 88%, depending on the microfiltration conditions. This result agrees with that obtained by Arnaud *et al.* (1993), who observed that *Lb. bulgaricus* cells submitted to a shear stress of 36 Pa during cultivation in an annular bioreactor tolerated freezing at -80°C better than cells that had not been stressed. According to these authors, morphological changes were responsible for this higher resistance during freezing.

Finally, the rate of loss of specific acidification activity during storage at -20°C (k_{spe}) and the specific acidification activity after 365 days of storage (t365_{spe}) displayed a large

variability depending on the microfiltration conditions. Some conditions led to highly resistant cells (CF2, CF7, CF8 and CF9) during frozen storage. CF3 condition produced cells with an equivalent resistance to that of centrifuged ones. In contrast, for four microfiltration conditions (CF1, CF4, CF5 and CF6), cells were less resistant to frozen storage than centrifuged cells. These results indicate that microfiltration conditions play a central role in determining cell cryotolerance during freezing and frozen storage.

Identification of the microfiltration conditions producing opposite behaviour of *Lb. bulgaricus* CFL1 cryotolerance

To identify the microfiltration conditions that led to cells with a high specific acidification activity and cryotolerance, the data were analysed according to principal component analysis (PCA) (Fig. 3). Using PCA made it possible to represent microfiltration conditions together with the parameters characterizing the specific acidification activity of cells (dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} and $t365_{spe}$).

According to Fig. 3, the two principal components (PC) explained 97% of the variance. The microfiltration conditions were mainly distinguished according to their position on PC1, which represented 87% of the total variability. Conditions CF1 and CF6 were related to high values of specific acidification activity parameters, thus displaying a low resistance during concentration, freezing and storage. They were characterized by high cross-flow velocities and transmembrane pressures. A second group of microfiltration conditions displayed an intermediate resistance to freezing and frozen storage (CF3, CF4, CF5 and CF9). The last group included cells with a high resistance to concentration, freezing and frozen storage. It was composed of the CF2, CF7 and CF8 conditions.

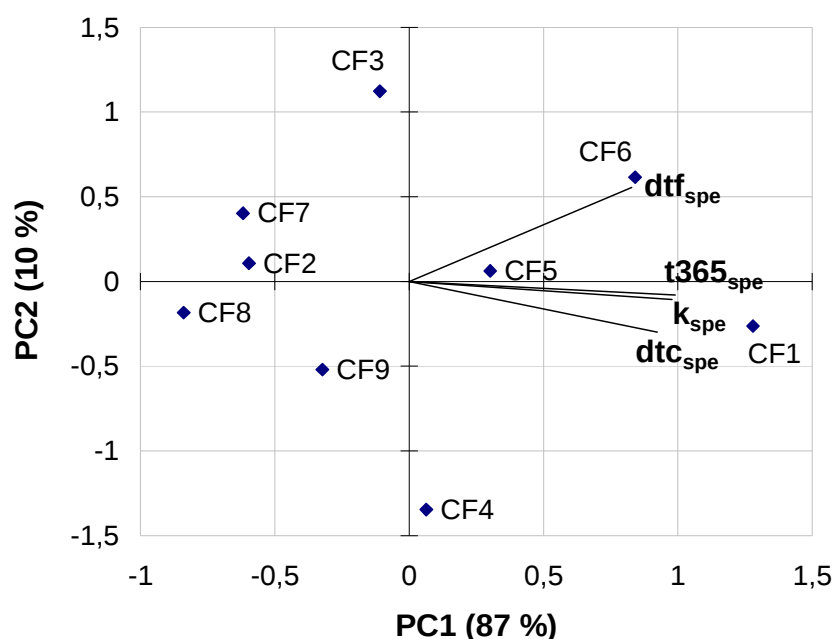


Figure 3 Principal component analysis showing the distribution of the nine microfiltration conditions (CF1 to CF9) in relation to the four specific acidification activity parameters (dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} and $t365_{spe}$).

Having analysed the results concerning specific acidification activities after 365 days at -20°C (Table 2), we decided to retain microfiltration conditions CF1 and CF8 for further experiments as they represent, respectively, the cells with the worst (401 min) and the best (121 min) cryotolerance. Cells concentrated according to CF8 conditions (low v and TMP) were identified as those showing the best specific acidification activity, as they displayed a high resistance to the concentration step, the freezing step and during frozen storage simultaneously. On the opposite, cells obtained from CF1 conditions (high v , intermediate TMP) were the least resistant of all the microfiltration conditions evaluated for all the process steps studied. The better cryotolerance of cells obtained from low v and TMP (2.01 m/s and 0.15 MPa) is in agreement with the considerations of Zokaee *et al.* (1999), who indicate that low pressures are recommended for microfiltration processes as they lead to low mechanical stress. The mechanical stress produced by higher TMP, such as in the CF1 condition, is related to the compressibility of biological cakes on the membrane surface (Graves *et al.*, 2006) which increase resistance to flux and induce a slight increase in permeate flux. At high TMP conditions, cells will be compressed against the membrane surface and subjected to high shear stress (Suchecka *et al.*, 2003). The negative effect of increasing v between CF8 and CF1 conditions is then responsible for cell disruption, with a consequent increase in flux resistance (Graves *et al.*, 2006 ; Persson *et al.*, 2001).

Changes of membrane fatty acid composition of *Lb. bulgaricus* CFL1 cells produced under two different microfiltration conditions

In order to evaluate the physiological changes that are induced by different microfiltration conditions, the membrane fatty acid composition of cells obtained from the CF1 and CF8 conditions was analysed. These analyses may contribute to our understanding of some mechanisms linked to membrane structure and explain the different behaviours.

Table 3 summarizes the main membrane fatty acids of *Lb. bulgaricus* CFL1 cells submitted to CF1 and CF8 microfiltration conditions. These 13 fatty acids represented more than 99% of the total composition. Among them, C16:0 and C16:1 accounted for more than 68% of the cell composition. Our results agree with those of Smittle *et al.* (1974), Teixeira *et al.* (1996), Gomes Zavaglia *et al.* (2000) and Partanen *et al.* (2001) who identified the same membrane fatty acids for other *Lb. bulgaricus* strains.

The comparison of the membrane fatty acid composition showed that cells obtained from the CF8 condition contained a lower saturated fatty acid content than those obtained from CF1 (42% instead of 48%). In contrast, CF8 cells were characterized by higher unsaturated (50%) and cyclic (8%) fatty acid contents than CF1 cells (48% and 3%, respectively). The relative concentration of three main fatty acids (C16:0, C18:1 and cycC19:0) was enhanced in CF8 cells, whereas the C14:0 content was strongly decreased. As to our knowledge no other information has as yet been published concerning the effect of microfiltration conditions on fatty acid composition, our results cannot be matched with the literature.

Considering our previous results, these differences may be related to the different cryotolerance of CF1 and CF8 cells. The better resistance to concentration, freezing and frozen storage of CF8 cells was connected to their higher unsaturated to saturated (U/S) and cyclic to saturated ratios (C/S), i.e. to their higher C18:1 and cycC19:0 concentrations and lower C14:0 content. This result is in agreement with those obtained by Béal *et al.* (2001) who demonstrated that cryotolerance of *Streptococcus thermophilus* CFS2 was related to high concentrations of C18:1, C20:1 but low C14:0, C16:0 and C18:0 contents. It also agrees with the results of Wang *et al.* (2005b) who obtained highly cryotolerant *Lb. acidophilus* RD758 cells related to a high cycC19:0 concentration. According to Russel *et al.* (1995), the increase of the unsaturated to saturated (U/S) and cyclic to saturated (C/S) fatty acid ratios in the membrane is responsible for the higher permeability and fluidity of the membrane. With a similar mechanism, it may be proposed that a cross-flow velocity of 2.01 m/s and a transmembrane pressure equal to 0.15 MPa (CF8 conditions) enhance the cell's membrane fluidity, thus making them more resistant to the further stress linked to freezing and frozen storage.

Table 3 Relative fatty acid concentrations of *Lb. bulgaricus* CFL1 cells concentrated according to CF1 and CF8 microfiltration conditions (values are means $\pm$ SD)

Fatty acid	CF1	CF8
C10:0 (%)	0.70 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.06
C12:0 (%)	1.17 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.15
C14:0 (%)	16.73 $\pm$ 0.51	7.52 $\pm$ 0.75
C14 :1 (%)	0.90 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.04
C15:0 (%)	0.27 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.02
C16:0 (%)	27.71 $\pm$ 0.13	31.88 $\pm$ 0.67
C16:1 (%)	40.64 $\pm$ 0.09	39.51 $\pm$ 2.41
C17 :0 (%)	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.02
C17:1 (%)	1.98 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.03
C18:0 (%)	1.26 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.29
C18:1 (%)	5.06 $\pm$ 0.23	9.78 $\pm$ 0.89
C18:2 (%)	0.11 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03
cycC19:0 (%)	3.29 $\pm$ 0.24	7.60 $\pm$ 1.77
Total (%)	99.81	99.96
U/S	1.02	1.20
C/S	0.07	0.18

U/S: unsaturated to saturated fatty acid ratio; C/S: cyclic to saturated fatty acid ratio

As microfiltration was always longer than centrifugation, it was necessary to clarify whether these changes on membrane fatty acid composition were related to the microfiltration conditions (v and TMP) or if they were a secondary effect of the process duration, temperature or pH decrease of the samples. Some of our previous results (data not shown) demonstrated that *Lb. bulgaricus* CFL1 cells exposed to 15°C for 400 min did not change their membrane fatty acid composition. Consequently, no effect of temperature and duration was involved in these changes. In contrast, concerning the final pH of the microfiltration samples, a slight acidification of the cell suspension (average final pH of 5.75 instead of 6) was observed. It has previously been shown that acidification has a positive effect on *Lb. bulgaricus* CFL1 cryotolerance (Streit *et al.*, 2007) and membrane fatty acid composition (Streit *et al.*, in press). Consequently, the modification of membrane fatty acid composition can be considered as an adaptative response of the cells induced by the microfiltration conditions and by the slight acidification observed during the process. These two mechanisms may explain the improvement of the cryotolerance of the cells submitted to CF8 microfiltration conditions.

It was not possible to dissociate these two effects during this study as we used laboratory scale equipment with a small membrane surface for microfiltration. This choice led to long filtration times in order to achieve the desired concentration factor. These filtration times were always associated to a slight acidification. Nevertheless, Streit *et al.* (2007) have shown that an acidification at pH 5.8 for 50 min does not produce an increase in *Lb. bulgaricus* CFL1 cryotolerance compared to cells not submitted to acidification. On the basis of this result, it is possible to propose that the small acidification produced during microfiltration was not responsible for the increase in cell resistance. Still, these results remain to be confirmed by conducting microfiltration in a shorter timeframe.

CONCLUSIONS

This work demonstrates, for the first time, the possibility to use cross-flow microfiltration for the concentration of lactic acid bacteria during starter production. The results show that process performance is affected mainly by cross-flow velocity and to a lesser extent by transmembrane pressure. The wide range of process durations, in addition to the mechanical stress induced by the different operational conditions, led to the production of cells with different levels of tolerance during the concentration and stabilization steps. It was observed that microfiltered cells were less resistant during the concentration process than centrifuged cells. In contrast, microfiltered cells were better adapted to survive the stress produced during freezing and frozen storage than centrifuged cells. Among all conditions tested, a cross-flow velocity of 2 m/s and transmembrane pressure of 0.15 MPa were the best microfiltration conditions to obtain high quality *Lb. bulgaricus* CFL1 frozen starters. Concerning membrane fatty acid composition, this improved cryotolerance is related to high unsaturated/saturated and cyclic/saturated ratios, thus corresponding to cells with higher membrane fluidity.

As the duration of the concentration by microfiltration was longer than by centrifugation, it would be interesting, in the future, to reduce the process time in order to achieve a process duration similar to the one obtained by centrifugation. Such an effect would be achievable by increasing the membrane surface, which was impossible with our equipment. This increase might make it possible to understand the positive effect of the slight pH decrease observed during microfiltration. Finally, in order to enlarge these results, they should be confirmed with other lactic acid bacteria.

ACKNOWLEDGMENT

This work was partly supported by the CAPES Foundation (Brazil).

NOMENCLATURE

μ	viscosity of the permeate, Pa.s
C/S	cyclic to saturated ratio
CF	microfiltration condition
CFU	colony forming units
D	time necessary to achieve a mass concentration factor of 2.5, min
dJ/dt	rate of reduction of permeate flux, $L/(h^2.m^2)$
dtc_{spe}	loss of specific acidification activity during concentration, $min/(log(CFU/mL))$
dtf_{spe}	loss of specific acidification activity during freezing, $min/(log(CFU/mL))$
J_o	initial permeate flux, $L/(h.m^2)$
J_{final}	final permeate flux, $L/(h.m^2)$
k_{spe}	rate of loss of specific acidification activity during frozen storage, $min/(log(CFU/mL).d)$
MCF	mass concentration factor
R_{Hfinal}	final hydraulic resistance, m^{-1}
$t_{365_{spe}}$	specific acidification activity after 365 days at frozen storage, $min/(log(CFU/mL))$
$tpH5.8$	time necessary to reach pH 5.8, min
taC_{spe}	specific acidification activity before concentration, $min/(log(CFU/mL))$
tc_{spe}	specific acidification activity after concentration and before freezing, $min/(log(CFU/mL))$
tf_{spe}	specific acidification activity after freezing, $min/(log(CFU/mL))$
t_s	storage time, d
t_{spe}	specific acidification activity, $min/(log(CFU/mL))$
U/S	unsaturated to saturated ratio
v	cross-flow velocity, m/s
TMP	transmembrane pressure, Pa

REFERENCES

- Amen, J. and Cabau, M. (1982).** Procédé de fabrication de microorganismes. French patent. FR 2 505 359.
- Arnaud, J. P., Lacroix, C., Fousereau, C. and Choplin, L. (1993).** Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Biotechnology* **29**, 157.
- Athès, V., Bes, M., Carrère, H., Marin, M. and Souchon, I. (2006).** Séparations dans les liquides alimentaires et biologiques. *In Mise en oeuvre des matières agroalimentaires 1*. Colonna, P. et Della Valle, G. (ed.). Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 23-97.

- Béal, C., Fonseca, F. and Corrieu, G. (2001).** Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science* **84**, 2347-2356.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. and Obert, J. P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 661-785.
- Boyaval, P., Bouhallab, S., Lafforgue-Delorme, C. and Goma, G. (1998).** Bioréacteurs à membranes. In *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. Daufin, G., René, F. et Aimar, P. (ed.). Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 534-572.
- Caric, M. D., Milanovic, S. D., Krstic, D. M. and Tekic, M. N. (2000).** Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. *Journal of Membrane Science* **165**, 83-88. Jan.
- Caridis, K. A. and Papathanasiou, T. D. (1997).** Pressure effects in cross-flow microfiltration of suspensions of whole bacterial cells. *Bioprocess Engineering* **16**, 199-208.
- Carrère, H. and Blaszkow, F. (2001).** Comparison of operating modes for clarifying lactic acid fermentation broths by batch cross-flow microfiltration. *Process Biochemistry* **36**, 751-756.
- Carrère, H., Blaszkow, F. and Roux de Balman, H. (2002).** Modelling the microfiltration of lactic acid fermentation broths and comparison of operating modes. *Desalination* **145**, 201-206.
- Corrieu, G., Spinnler, H. E., Jomier, Y. and Picque, D. (1988).** Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters. French patent. FR 2 629 612.
- Daufin, G., Pierre, A., Garem, A., Gaoudédranche, H., Gésan-Guizieu, G., Muller, A., Merin, U., Jeantet, R., Bramaud, C., Bouhallab, S., Léonil, J., Nau, F., Chauffer, B., Manem, J. and Dresch, M. (1998).** Industrie Laitière. In *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. Daufin, G., René, F. et Aimar, P. (ed.). Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 282-371.
- Fillaudeau, L. and Carrère, H. (2002).** Yeast cells, beer composition and mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes. *Journal of Membrane Science* **196**, 39-57.
- Gomez Zavaglia, A., Disalvo, E. A. and De Antoni, G. L. (2000).** Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *Journal of Dairy Research* **67**, 241-247.

- Grandison, A. S. and Finnigan, T. J. A. (1996).** Microfiltration. In *Separation processes in the food and biotechnology industries - principles and applications*. Grandison, A. S. et Lewis, M. J. (ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 141-153.
- Graves, K., Rozeboom, G., Heng, M. and Glatz, C. (2006).** Broth conditions determining specific cake resistance during microfiltration of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* **94**, 346-352.
- Haneda, R. N., Ikegami, R., Fortulan, C. A., Purqueiro, B. M., Longo, E. and Fontes, S. R. (2006).** Microfiltration with chemistry treating of commercial membranes and microporous tubes for retention of bacteria *E. coli* on processing of wastewater of dairy products. *Desalination* **200**, 313-315.
- Jeantet, R., Maubois, J. L. and Boyaval, P. (1996).** Semicontinuous production of lactic acid in a bioreactor coupled with nanofiltration membranes. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 614-619.
- Kim, J. O., Jung, J. T., Yeom, I. T. and Aoh, G. H. (2007).** Electric fields treatment for the reduction of membrane fouling, the inactivation of bacteria and the enhancement of particle coagulation. *Desalination* **202**, 31-37.
- Li, Y., Shahbazi, A. and Kadzere, C. T. (2006).** Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *Journal of Food Engineering* **75**, 574-580.
- Partanen, L., Marttinen, N. and Alatossava, T. (2001).** Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 500-506.
- Persson, A., Jönsson, A.-S. and Zacchi, G. (2001).** Separation of lactic acid-producing bacteria from fermentation broth using a ceramic microfiltration membrane with constant permeate flow. *Biotechnology and Bioengineering* **72**, 269-277.
- Russell, N. J., Evans, R. I., Ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, T. (1995).** Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 255-261.
- Sadr Ghayeni, S. B., Beatson, P. J., Fane, A. J. and Schneider, R. P. (1999).** Bacterial passage through microfiltration membranes in wastewater applications. *Journal of Membrane Science* **153**, 71-82.
- Shimizu, Y., Matsushita, K. and Watanabe, A. (1994).** Influence of shear breakage of microbial cells on cross-flow microfiltration flux. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **78**, 170-174.
- Smittle, R. B., Gilliland, S. E., Speck, M. L. and Walter Jr, W. M. (1974).** Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology* **27**, 738-743.

- Streit, F., Corrieu, G. and Béal, C. (2007).** Acidification of fermented broth improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology* **128**, 659-667.
- Streit, F., Delettre, J., Corrieu, G. and Béal, C. (in press).** Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. *Journal of Applied Microbiology*.
- Suchecka, T., Biernacka, E. and Piatkiewicz, W. (2003).** Microorganism retention on microfiltration membranes. *Filtration and Separation* **40**, 50-55.
- Teixeira, P., Castro, H. and Kirby, R. (1996).** Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 34-38.
- Van Reis, R. and Zydney, A. (2007).** Bioprocess membrane technology. *Journal of Membrane Science* **297**, 16-50.
- Wang, Y., Delettre, J., Guillot, A., Corrieu, G. and Béal, C. (2005a).** Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* **50**, 294-307.
- Wang, Y., Corrieu, G. and Béal, C. (2005b).** Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science* **88**, 21-29.
- Zhou, H. D., Ni, J. R., Huang, W. and Zhang, J. D. (2006).** Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* **52**, 29-38.
- Zokaee, F., Kaghazchi, T. and Zare, A. (1999).** Cell harvesting by microfiltration in a deadend system. *Process Biochemistry* **34**, 803-810.

III.4.3 Analyse des changements du protéome de *Lb. bulgaricus* CFL1 en fonction des conditions de microfiltration

Les résultats présentés dans l'article précédent montrent que les cellules de *Lb. bulgaricus* CFL1 réagissent différemment pendant les étapes de concentration, congélation et stockage selon les conditions de microfiltration appliquées. Il a été possible d'identifier deux conditions de microfiltration générant des niveaux de cryotolérance très différents : les cellules issues de la microfiltration CF1 (5 m.s⁻¹ et 0,26 MPa) présentent une faible résistance à la concentration, à la congélation et au stockage alors que celles issues de la microfiltration CF8 (2 m.s⁻¹ et 0,15 MPa) présentent une bonne résistance à ces différentes étapes du procédé. Cette différence de comportement a été reliée à la composition en acides gras membranaires des bactéries. Les résultats ont notamment montré que les cellules issues de la microfiltration CF8 présentent des rapport U/S et C/S plus élevés que les cellules provenant de la microfiltration CF1, ce qui correspond à des cellules avec une fluidité membranaire plus importante.

Afin de compléter ces résultats sur les mécanismes physiologiques responsables des changements de résistance des cellules microfiltrées, le protéome des cellules concentrées dans les deux conditions de microfiltration CF1 et CF8 a été analysé et comparé. Les images obtenues sont présentées à la figure III.1. Comme cela a été décrit au chapitre III.2, les protéines de *Lb. bulgaricus* CFL1 se concentrent principalement dans la région des pH compris entre 4,25 et 6,25 et des poids moléculaires situés entre 25 à 80 kDa. Les cellules concentrées selon la condition CF1 présentent un total de 110 protéines, supérieur à celui des cellules concentrées selon la condition CF8 (99 protéines). Cette variation du nombre de protéines selon les conditions de microfiltration est une conséquence de l'effet de cette opération unitaire sur l'état physiologique des cellules. De plus, le nombre de protéines est fortement réduit par rapport à celui des cellules concentrées par centrifugation (167 protéines, chapitre III.2). Cette différence démontre que les cellules sont capables d'adapter leur protéome selon le procédé de concentration utilisé, comme dans ce cas, la centrifugation au lieu de la microfiltration.

L'analyse comparative des protéomes des bactéries issues des cellules CF1 et CF8 a permis d'identifier 26 spots dont l'intensité est différente selon la condition de microfiltration (tableau III.1). Les cellules identifiées comme étant les plus résistantes au procédé (cellules CF8) voient la synthèse de six protéines (L1-L6) augmenter (MF>2) par rapport aux cellules CF1 (les moins résistantes). En revanche, la synthèse de 11 protéines (S1-S11) est plus importante dans les cellules CF1 (MF<0,5) tandis que neuf protéines (S12-S20) sont complètement absentes dans les cellules CF8 (MF=0).

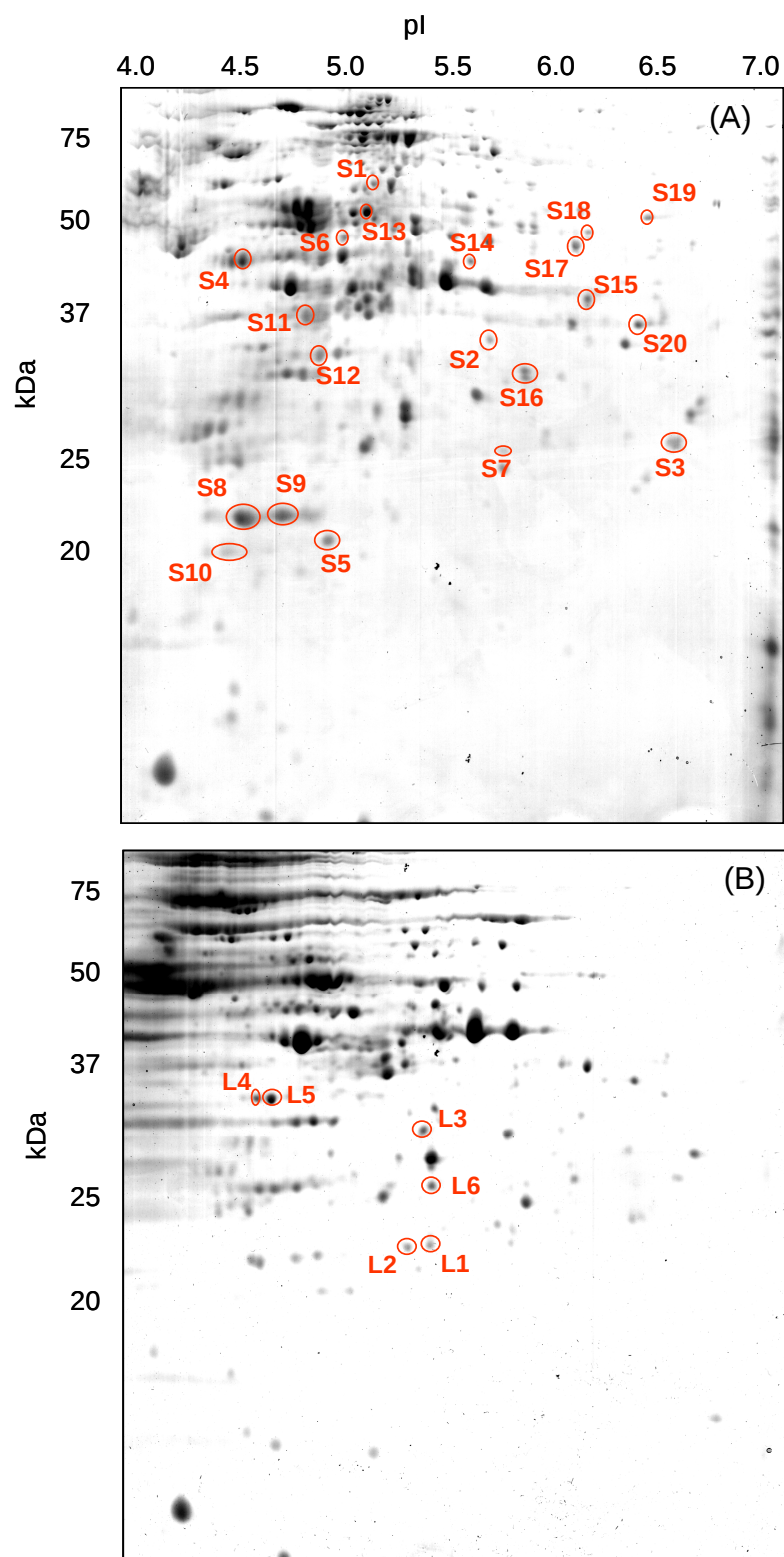


Figure III.1 : profils des protéines cytosoliques de *Lb. bulgaricus* CFL1 après concentration par microfiltration dans les conditions CF1 (bactéries peu résistantes à la concentration, à la congélation et au stockage, A) et CF8 (bactéries résistantes, B)

Tableau III.1 : caractéristiques des 26 protéines synthétisées différemment dans les cellules de *Lb. bulgaricus* CFL1 concentrées selon les deux conditions de microfiltration CF1 et CF8

Spot No.	pI		MW (kDa)		MF	Protéine homologue
	Exp.	Theor.	Exp.	Theor.		
L1–L2	5,43	5,30	22,61	19,1	10,0	Adenine/guanine phosphoribosyltransferase related PRPP-binding protein
L3	5,39	-	30,53	-	6,2	ni
L4–L5	4,80	4,80	34,61	34,2	4,8	Manganèse dependant inorganic pyrophosphatase
L6	5,43	5,30	26,13	24,2	2,6	Adenylate kinase
S1	5,29	-	58,51	-	0,4	ni
S2	5,87	-	35,05	-	0,4	ni
S3	6,60	-	26,36	-	0,4	ni
S4	4,79	4,80	41,51	43,2	0,3	Elongation factor Tu
S5	5,07	-	20,92	-	0,3	ni
S6	5,15	-	44,77	-	0,3	ni
S7	5,92	5,40	25,89	21,7	0,3	Xanthosine triphosphate pyrophosphatase
S8	4,79	4,90	22,04	20,6	0,2	Single stranded DNA binding protein
S9	4,88	4,88	22,16	21,67	0,2	Peptidyl prolyl-cis trans isomerase
S10	4,75	-	20,42	-	0,1	ni
S11	4,97	-	36,31	-	0,1	ni
S12	5,03	5,00	34,14	28,4	0	30S Ribosomal S2
S13	5,25	5,10	50,2	49,6	0	Aminopeptidase G
S14	5,79	5,50	41,48	43,2	0	UDP galactopyranose mutase
S15	6,25	-	37,32	-	0	ni
S16	6,00	-	31,3	-	0	ni
S17	6,20	5,60	43,65	44,2	0	Ribosomal protein S1
S18	6,26	-	45,57	-	0	ni
S19	6,46	6,10	48,97	48,0	0	Putative pyridine nucleotide-disulphide oxydoreductase
S20	6,43	-	35,88	-	0	ni

pI : point isoélectrique ; MW : poids moléculaire ; MF : facteur de modification de l'intensité des protéines (Li/Si) ; Exp. : expérimental ; Theor. : théorique ; Li : protéines dont l'intensité est plus importante après concentration selon CF8 ; Si : protéines dont l'intensité est plus importante après concentration selon CF1 ; ni : non identifié.

Parmi ces 26 protéines, 14 ont pu être identifiées par spectroscopie de masse MALDITOF. Le tableau III.1 présente les résultats d'identification de ces protéines et la comparaison de leurs caractéristiques expérimentales (point isoélectrique et poids moléculaire) par rapport aux caractéristiques théoriques des protéines homologues. Comme cela a déjà été observé au chapitre III.2, il existe des différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques, liées à l'existence de protéines isoformes. Ces protéines sont caractérisées par une structure de peptides légèrement différente, mais avec

la même fonction biologique (Len *et al.*, 2004). Certaines de ces protéines peuvent donc être associées (L1 et L2, L4 et L5) et sont alors considérées comme uniques.

A partir des résultats de l'identification des protéines, leur classification selon le type de métabolisme auquel elles appartiennent est possible. On observe ainsi des changements au niveau du métabolisme général (S13), énergétique (L4–L5), des nucléotides (L1–L2, L6, S7, S8 et S19) et de l'azote (S4, S12 et S17) ainsi que dans la synthèse de protéines de stress (S9).

La synthèse de la protéine aminopeptidase G (S13), responsable de l'hydrolyse de peptides contenant la glycine en position N-terminale, est complètement absente dans les cellules CF8, c'est-à-dire dans les cellules les plus cryotolérantes. Ce résultat est cohérent avec la réduction de la synthèse de l'aminopeptidase G, précédemment décrite au chapitre III.2, et associée à une meilleure cryotolérance des cellules après une adaptation acide (pH 5,25 pendant 30 min). Ces résultats confirment donc la synthèse de cette protéine est modifiée en réponse à un changement environnemental ou opératoire.

Une protéine liée au métabolisme énergétique, la manganèse dépendante inorganic pyrophosphatase (L4-L5), est sur-synthétisée dans les cellules les plus résistantes à la congélation, c'est-à-dire, les cellules soumises à la condition de microfiltration CF8. Ces résultats suggèrent que les cellules CF8 sont plus résistantes car elles ont été capables de maintenir un métabolisme énergétique plus actif. Même si cette protéine n'a pas été identifiée précédemment (chapitre III.2), ce résultat est proche de l'analyse effectuée sur les cellules soumises à une acidification en fin de culture (adaptation acide). En effet, ces cellules présentent également une synthèse accrue de protéines du métabolisme énergétique, reliée à leur meilleure résistance à la congélation et au stockage. Ce résultat est en accord avec ceux de Len *et al.* (2004), qui décrivent que le métabolisme énergétique de *Streptococcus mutans* LT11 cultivé à pH 5 au lieu de 7 est augmenté, et de Wang *et al.* (2005b), qui observent une augmentation du métabolisme énergétique de *Lb. acidophilus* RD758 après une adaptation au froid (26 °C pendant 8 h), reliée à une meilleure résistance à la congélation.

La synthèse de cinq protéines, liées au métabolisme des nucléotides, est modifiée selon les conditions de microfiltration : l'adénine/guanine phosphoribosyltransférase (L1-L2) et l'adénylate kinase (L6) voient leur synthèse augmentée dans les cellules CF8, alors que la xanthosine triphosphate pyrophosphatase (S7) et la single stranded DNA binding protéine (S8) ont leur synthèse réduite dans les cellules CF8. La putative pyridine nucléotide-disulphide oxydoréductase (S19) est complètement absente dans les cellules CF8. L'adénine phosphoribosyltransférase, ainsi que la single stranded DNA binding protéine, ont été également altérées après acidification des cellules de *Lb. bulgaricus* CFL1, avec des facteurs de modification égaux à 6,62 et 2,73, respectivement, comme cela a été démontré

au chapitre III.2. Cependant, la synthèse de la single stranded DNA binding protéine présente, dans les cellules CF8, un comportement opposé à celui observé précédemment, où les cellules les plus résistantes à la congélation, après acidification modérée, montrent une synthèse accrue de cette protéine. La synthèse augmentée de l'adénylate kinase va aussi à l'opposé des résultats décrits par Sanchez *et al.* (2005) qui observent une réduction de la synthèse de cette protéine chez *Bifidobacterium longum* NCIMB8809 après exposition à un stress osmotique en présence de bile. Enfin, c'est la première fois que les protéines xanthosine triphosphate pyrophosphatase et putative pyridine nucléotide-disulphide oxydoréductase sont identifiées lors d'une réponse physiologique de bactéries lactiques à leur environnement.

Trois protéines liées au métabolisme azotée (facteur d'élongation Tu (S4) et des protéines ribosomales 30S S2 (S12) et S1 (S17)), voient leur synthèse fortement accrue dans les cellules issues de la microfiltration CF1. Ces protéines agissent sur les étapes d'initiation et d'élongation lors de la traduction des protéines à partir des ARN messagers. Si l'on analyse ces résultats en considérant l'activité acidifiante spécifique des cellules, la condition de microfiltration produisant les cellules les plus actives (CF8) induit une concentration réduite de ces protéines, ce qui est en accord avec les résultats présentés au chapitre III.2. En effet, les cellules soumises à une adaptation acide en fin de fermentation montrent une résistance plus importante aux étapes de congélation et stockage, en même temps qu'une synthèse réduite de la protéine ribosomale 30S S2 et du facteur d'élongation Tu. En accord avec ce résultat, Hörmann *et al.* (2006) ont obtenu une synthèse réduite du facteur d'élongation Tu pour les cellules de *Lb. sanfranciscensis* DSM20451 soumises à un stress acide (pH 3,7 pendant 1 h). Par contre, Wang (2005) a observé une augmentation de la synthèse de cette protéine pour les cellules de *Lb. acidophilus* RD758 cultivées à 42 °C au lieu de 37 °C. Arena *et al.* (2006) ont montré que la synthèse de cette protéine n'est pas une réponse spécifique. Ils ont obtenu une augmentation de sa synthèse dans les cellules de *S. thermophilus* ATCC19258 soumises à un stress thermique froid ou acide, et une réduction après leur exposition à un stress thermique chaud ou nutritionnel. De plus, ils ont observé une réduction de la synthèse de la protéine ribosomale 30S S2 suite à des stress thermique chaud ou nutritionnel.

Parmi les protéines de stress, une seule a été identifiée dans cette étude, la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (S9). Cette protéine catalyse l'isomérisation de la proline en oligopeptides et accélère la reconformation des protéines. Les cellules CF1, moins résistantes à la congélation et au stockage, présentent une synthèse plus importante de cette protéine. Ces résultats vont à l'opposé de ceux décrits au chapitre III.2, où les cellules soumises à une adaptation acide, plus résistantes à la congélation, présentaient aussi une synthèse plus élevée de cette protéine. Aucune autre référence n'a cependant été trouvée

pour conclure sur son comportement chez les bactéries lactiques. Seul Foster (1999) la décrit comme une protéine essentielle pour la survie de *E. coli* à des conditions de pH extrêmes (acide ou basique).

Finalement, le tableau III.1 montre que la synthèse de la protéine UDP galactopyranose mutase (S14) est complètement absente dans les cellules concentrées selon la condition de microfiltration CF8. Cette protéine réalise la conversion de l'UDP-D-galactopyranose vers l'UDP-D-galacto-1,4-furanose, qui est un composé important de la paroi de certains microorganismes, tels que *Mycobacterium tuberculosis* (Sanders and Klaenhammer, 2001) et *Trypanosoma cruzi* (Fullerton *et al.*, 2003). Cette protéine a été identifiée récemment dans le génome de *Lb. bulgaricus* (Van de Guchte *et al.*, 2006). Cependant, il n'existe actuellement aucune information sur son rôle dans le métabolisme des bactéries lactiques, ni sur l'effet des conditions environnementales sur sa synthèse.

La comparaison de ces informations avec d'autres résultats de la littérature reste très difficile, car les effets du procédé de microfiltration sur le protéome n'ont jamais été étudiés auparavant. Toutefois, si l'on fait le lien avec l'activité acidifiante spécifique des bactéries, nos résultats sont en cohérence avec ceux obtenus au chapitre III.2 et avec ceux décrits par d'autres auteurs (Len *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005b).

III.4.4 Conclusion

En se basant sur les performances du procédé de séparation et sur la qualité technologique des ferments produits, les résultats obtenus, dans cette dernière partie de la thèse, démontrent l'intérêt de l'utilisation de la microfiltration tangentielle pour la concentration des ferments lactiques.

La vitesse tangentielle est le paramètre opératoire le plus influent sur la durée de la microfiltration et le colmatage des membranes. En revanche, la pression transmembranaire a un effet mineur sur les performances de la concentration, ce qui est probablement lié à l'utilisation d'un module de microfiltration de petite taille (50 cm²).

L'analyse de la résistance des cellules aux différentes étapes du procédé a permis de mettre en évidence des résultats originaux. Pendant la concentration par microfiltration, les cellules sont faiblement résistantes, avec une perte d'activité acidifiante spécifique élevée en comparaison de celle des bactéries concentrées par centrifugation (chapitre III.3). Par contre, ce comportement s'inverse lors des étapes de congélation et de stockage sous forme congelée : les bactéries concentrées par microfiltration deviennent plus résistantes que celles concentrées par centrifugation.

Les paramètres caractérisant l'activité acidifiante spécifique des cellules (dtc_{spe} , dtf_{spe} , k_{spe} and $t_{365_{spe}}$) ont été quantifiés en fonction des conditions de microfiltration mises en

œuvre (vitesse tangentielle et pression transmembranaire). Une analyse en composantes principales a permis d'identifier la condition (CF8 : 2 m.s^{-1} , 0,15 MPa) à l'origine des bactéries plus résistantes. A l'opposé, à 5 m.s^{-1} et sous 0,26 MPa (condition CF1) sont obtenues les cellules les plus sensibles à la stabilisation.

La caractérisation de l'état physiologique de ces deux types de cellules montre que les cellules les plus résistantes (CF8) présentent une fluidité membranaire plus importante, avec des rapports U/S et C/S plus élevés. L'évolution de ces rapports est surtout lié à une augmentation de la teneur en acides gras C16:0, C18:1 et cycC19:0, et à une importante réduction de la concentration en C14 :0. Enfin, l'analyse protéomique indique que les cellules les plus actives et les plus résistantes voient la synthèse de protéines du métabolisme énergétique augmenter, alors que la synthèse des protéines des métabolismes général et azoté est réduite.

Finalement, il est possible que conclure que la microfiltration est un procédé intéressant pour la concentration des bactéries lactiques. Les résultats obtenus, associés à ceux du chapitre III.3, mettent en évidence la capacité de *Lb. bulgaricus* CFL1 à s'adapter à des conditions de concentration différentes ; tant par rapport au type de procédé de concentration (centrifugation ou microfiltration) que par rapport aux conditions de microfiltration appliquées. De plus, il a été possible de mieux comprendre certains mécanismes physiologiques expliquant les différences de résistance des cellules en fonction des conditions de concentration appliquées. Enfin, outre ces connaissances nouvelles, ce travail présente un certain intérêt industriel, puisqu'il propose des voies d'amélioration de la qualité technologique de *Lb. bulgaricus* CFL1.

Conclusion générale et perspectives

Tout au long du procédé de production de ferments lactiques, les cellules sont soumises à différents types de stress (thermique, acide, nutritionnel, oxydatif, mécanique, osmotique). La stabilisation et la conservation des cellules par congélation représente, en particulier, une situation de stress thermique froid important pour les cellules, est constituée une étape critique pour le maintien de la qualité des ferments. Un mauvais contrôle des conditions de congélation est, en effet, responsable d'une dégradation des propriétés technologiques des cellules. Afin d'améliorer la cryotolérance des bactéries lactiques, une approche intéressante consiste à adapter les cellules, en les soumettant à un stress modéré, avant leur exposition à un stress plus fort tel que la congélation. Le stress modéré permet aux cellules de développer des mécanismes physiologiques de défense et d'adaptation qui vont, par la suite, leur permettre de mieux résister aux conditions de stress réel.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact de l'application de certains stress modérés, notamment au cours des étapes de récolte et de concentration des ferments, sur la cryotolérance et l'état physiologique de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. L'amélioration de la résistance des cellules à l'issue des étapes de concentration, congélation et stockage était recherchée, en considérant à la fois leur survie et le maintien de leur activité acidifiante. L'utilisation de méthodes permettant de caractériser l'état physiologique des cellules (composition en acides gras membranaires et protéome) devait permettre d'identifier certains mécanismes d'adaptation des cellules, face aux conditions de stress.

La première partie de ce travail a démontré qu'une adaptation acide des cellules en fin de fermentation et avant refroidissement, après culture en conditions optimales de croissance, a permis d'obtenir des cellules plus résistantes à la congélation et au stockage à -20 °C. Les meilleurs résultats ont été obtenus après acidification à pH 5,25 pendant 30 min : les cellules adaptées sont plus résistantes à la congélation (54 %) et 1,5 fois plus stables pendant le stockage que les cellules non adaptées. L'utilisation de H₂SO₄ au lieu de HCl, ainsi que la remontée du pH avant congélation, ont également démontré un effet positif sur la résistance des cellules.

Les mécanismes physiologiques expliquant cette adaptation ont été recherchés, aux niveaux membranaire et cytoplasmique. La meilleure résistance des cellules de *Lb. bulgaricus* CFL1 a pu être liée à une concentration accrue de l'acide gras C18:1. De plus, après adaptation acide, la synthèse de 21 protéines a été modifiée. Ces modifications

correspondent à une réduction du métabolisme azoté, une augmentation des métabolismes énergétique et nucléotidique, ainsi qu'à une synthèse plus importante de protéines de stress dans les cellules adaptées. Un avantage important de cette approche par rapport à d'autres études précédemment publiées est qu'elle permet, en plus d'une bonne aptitude à la conservation, de maintenir une productivité élevée du procédé.

Lors de la troisième partie de la thèse, les cellules ont été concentrées selon différentes conditions de centrifugation (vitesse de rotation, durée et température), afin d'étudier l'effet de cette opération unitaire sur la résistance des cellules à la concentration, à la congélation et au stockage. La température de concentration n'a pas démontré d'effet sur la résistance des cellules. Les résultats révèlent aussi que les différentes conditions de centrifugation étudiées n'ont pas eu d'effet sur la résistance de *Lb. bulgaricus* CFL1 à l'étape de concentration elle-même, mais ont présenté un effet faible mais significatif sur leur cryotolérance. Les comportements de la résistance des cellules à la congélation et au stockage étant opposés, l'effet des conditions de centrifugation sur les cellules stockées à long terme est cependant négligeable. Ces résultats sont intéressants en vue d'applications industrielles. En effet, puisque les conditions de centrifugation n'ont pas d'influence très marquée sur la résistance des cellules, les conditions opératoires de centrifugation pourront être adaptées, en fonction des spécificités et de la viscosité des milieux. Le caractère « souche dépendant » de ces résultats ne doit cependant pas être oublié, ce qui nécessite un élargissement futur à d'autres bactéries lactiques.

La quatrième partie des résultats a permis de quantifier, pour la première fois, l'impact de la concentration des cellules par microfiltration, sur leur résistance aux différentes étapes du procédé et sur l'état physiologique de *Lb. bulgaricus* CFL1. Les résultats montrent que les cellules sont moins résistantes à l'étape de microfiltration qu'à la centrifugation. Par contre, la résistance à la congélation augmente significativement, entre 28 % et 88 %, selon les conditions de vitesse tangentielle et de pression transmembranaire appliquées, par rapport à la centrifugation. La résistance au stockage varie aussi selon les conditions opératoires utilisées. La meilleure cryotolérance a été obtenue pour une vitesse tangentielle égale à $2,01 \text{ m.s}^{-1}$ et une pression transmembranaire de 0,15 MPa. A partir de l'analyse des réponses physiologiques des cellules, nous avons montré que cette meilleure cryotolérance est liée à des rapports entre acides gras insaturés et saturés et acides gras cycliques et saturés plus élevés, correspondant à des cellules avec une fluidité membranaire plus importante. L'adaptation de la fluidité membranaire est liée à une augmentation des teneurs en acides gras C16:0, C18:1 et cycC19:0, ainsi qu'à une réduction de la concentration en C14:0 dans les cellules résistantes. Enfin, l'analyse protéomique indique que 26 protéines ont eu leur synthèse modifiée selon les conditions de microfiltration, parmi lesquelles 14 ont pu être identifiées. Les résultats montrent que les cellules les plus actives et les plus

résistantes voient leur métabolisme énergétique augmenter, alors que leur métabolisme général et azoté est, au contraire, réduit.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats permet de conclure que les trois procédés étudiés (acidification, centrifugation et microfiltration) agissent sur la résistance des cellules, lors de l'étape de concentration et lors de leur stabilisation et de leur stockage sous forme congelée. Ces changements de résistance ont été quantifiés sur la base des réponses technologiques (survie et activité acidifiante) de *Lb. bulgaricus* CFL1 aux procédés et aux conditions opératoires. Ainsi, selon les procédés et les conditions appliquées, les réponses observées diffèrent, dans le sens soit de l'amélioration, soit de la dégradation de la cryotolérance des cellules. Ces résultats sont intéressants pour une application industrielle, car ils permettent d'identifier les conditions opératoires qui doivent être appliquées pour obtenir un ferment lactique à la fois actif et résistant. Ainsi, si l'on souhaite produire un ferment lactique avec une activité acidifiante spécifique élevée, il conviendra d'appliquer une acidification modérée (pH 5,25) pendant 30 min, avant l'étape de concentration, ou de concentrer les cellules par microfiltration (2 m.s^{-1} , 0,15 MPa). De plus, la combinaison entre cette acidification modérée et des conditions de centrifugation favorables (10 000 *g* pendant 15 min) permet également la production de cellules avec une bonne activité. Jusqu'à présent, comme cela a été discuté aux chapitres III.1, III.3 et III.4, ces étapes post-fermentaires, étaient peu renseignées. Ce travail constitue donc une contribution qui pourra être valorisée, à la fois à l'échelle du laboratoire, mais surtout au stade industriel, pour préserver plus efficacement des ferments lactiques.

Le deuxième enseignement important qui ressort de ces travaux de thèse concerne l'identification de certaines réponses physiologiques, en relation avec les réponses technologiques décrites précédemment. En effet, les réponses technologiques des ferments ont été analysées par rapport à leur activité acidifiante spécifique. Etant donné que ce paramètre prend en compte la concentration bactérienne, une différence d'activité acidifiante spécifique entre des cellules soumises à différents niveaux d'adaptation, caractérise des ferments avec des états physiologiques différents. Les réponses physiologiques ont donc été analysées, aux niveaux membranaire (composition en acides gras membranaires) et cytoplasmique (protéome cellulaire). Elles varient en conséquence des changements environnementaux ou opératoires effectués lors de la récolte ou de la concentration des cellules. A travers l'analyse des acides gras membranaires et du protéome de *Lb. bulgaricus* CFL1, certaines réponses générales de ce microorganisme ont pu être identifiées.

Parmi les acides gras membranaires constituant la membrane de cette souche, ce sont les acides tétradécanoïque (C14:0), hexadécanoïque (C16:0), hexadécénoïque (C16:1), oléique (C18:1) et méthylène-octadécanoïque (cycC19:0) qui ont le plus contribué à

l'adaptation des cellules. Les concentrations relatives des acides gras C16:0 et C16:1, qui représentent presque 70 % de la composition membranaire, ainsi que des acides gras C14:0, C18:1 et cycC19:0 sont significativement modifiées en fonction des conditions de production des cellules. Ces acides gras sont responsables de modifications de la fluidité membranaire des cellules, ce qui leur permet de mieux résister au stress lié à la congélation. De plus, il a été observé que les cellules adaptent leur membrane différemment si elles sont soumises à une acidification ou si elles sont concentrées par microfiltration plutôt que par centrifugation. Cependant, les résultats obtenus permettent de faire ressortir l'importance de l'augmentation de la concentration en C18:1, pour obtenir des cellules avec une bonne cryotolérance, indépendamment de l'adaptation réalisée. En outre, deux acides gras (cycC19:0 et C14:0) sont modifiés plus spécifiquement après microfiltration, ce qui détermine aussi la cryotolérance des cellules.

A partir de l'analyse des changements du protéome cellulaire de *Lb. bulgaricus* CFL1, consécutifs aux modifications des conditions environnementales (chapitre III.2) ou opératoires (chapitre III.4), une synthèse différentielle des protéines a été observée. Les différences portent sur le nombre de protéines affectées ainsi que sur leur fonction. La synthèse des protéines varie en relation avec l'activité acidifiante et la cryotolérance des cellules et aussi, selon le type d'adaptation réalisée. Ainsi, trois protéines (aminopeptidase G, protéine ribosomale 30S S2 et facteur d'élongation Tu) sont sous-synthétisées dans les cellules les plus cryotolérantes, alors qu'une protéine (adénine phosphoribosyltransférase) est sur-synthétisée, indépendamment du type d'adaptation réalisée au préalable. La seule protéine de stress identifiée à la suite des deux adaptations étudiées (peptidyl-prolyl cis-trans isomérase) présente une synthèse différenciée selon les adaptations effectuées. Une synthèse élevée de cette protéine est liée à une bonne cryotolérance des cellules soumises à l'adaptation acide. Par contre, les cellules plus résistantes à la congélation à la suite de la microfiltration sont caractérisées par une synthèse réduite de cette protéine. De manière plus globale, outre les quatre protéines communes aux deux adaptations, une augmentation du métabolisme énergétique et une réduction du métabolisme azoté sont corrélées à l'obtention de ferments lactiques actifs, à l'issue des étapes de congélation et de stockage sous forme congelée.

Finalement, ce travail a permis d'identifier certaines réponses générales des bactéries lactiques, en relation avec leur cryotolérance. Il s'agit d'une élévation de la concentration de l'acide gras C18:1, d'une synthèse accrue de la protéine adénine phosphoribosyltransférase et d'une synthèse réduite des protéines aminopeptidase G, protéine ribosomale 30S S2 et facteur d'élongation Tu. Ces résultats confirment, en les élargissant, les mécanismes d'adaptation précédemment décrits par Smittle *et al.* (1974), Béal *et al.* (2001), Arena *et al.* (2006), Hörmann *et al.* (2006) et Schoug *et al.* (2007). Ils

démontrent l'intérêt des approches utilisées dans cette étude, consistant à travailler sur les étapes précédant la stabilisation des cellules, afin de leur permettre de mieux résister aux stress liés à leur stabilisation et à leur conservation.

Ces résultats permettent d'ouvrir de nombreuses perspectives, qui peuvent être présentées selon deux niveaux : poursuite directe et approfondissement de certains points de l'étude, et élargissement du travail.

Parmi les perspectives donnant suite directe à nos travaux, il pourrait être judicieux de réduire la durée de microfiltration. En effet, lors de l'étape de concentration par microfiltration, les durées de concentration étaient longues du fait de la taille de l'équipement utilisé (module de laboratoire). Pour réduire le temps de concentration, il conviendrait donc d'augmenter la surface membranaire du module. Outre une meilleure adéquation avec une utilisation industrielle, cela permettrait d'analyser les résultats sans le biais de l'effet lié à la durée de l'étape de concentration. L'étude de la combinaison entre une acidification modérée et la microfiltration constitue une deuxième perspective directe de ce travail. En effet, ces deux approches permettant d'augmenter la cryotolérance de la bactérie, il serait intéressant de les coupler, comme cela a été fait avec l'acidification et la centrifugation, pour accroître encore la résistance à la congélation et au stockage de *Lb. bulgaricus* CFL1.

De façon complémentaire à ces perspectives directes, quelques voies d'élargissement de cette étude peuvent être proposées. Les résultats ont montré l'effet positif d'une adaptation croisée (adaptation acide) pour améliorer la cryotolérance des bactéries lactiques, c'est-à-dire leur résistance à un stress hypothermique. Par la suite, coupler les adaptations obtenues dans ce travail, à la suite de l'acidification des cellules ou de leur concentration par microfiltration, avec d'autres types de stress (séchage, lyophilisation, stress acide pour les souches probiotiques) pourrait être une voie prometteuse. L'étude d'autres types d'adaptations, comme par exemple, l'application de stress modérés de type oxydatif ou nutritionnel, pourrait être également envisagée afin d'améliorer la cryotolérance des cellules.

Afin d'approfondir la connaissance et la compréhension des réponses physiologiques des cellules soumises à un stress acide modéré ou à une concentration par microfiltration, l'utilisation d'autres méthodes, permettant d'obtenir des réponses à d'autres niveaux cellulaires, constitue une autre perspective intéressante. Par exemple, l'utilisation des méthodes de cytométrie en flux, de spectroscopie en infrarouge à transformée de Fourier et d'analyse des protéines membranaires pourrait donner des informations intéressantes, respectivement, sur le potentiel de membrane des cellules, leur fluidité ainsi que sur les protéines potentiellement liées à la synthèse des acides gras membranaires.

Finalement, tous les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus avec la souche *Lb. bulgaricus* CFL1. Avant de généraliser les effets observés et les réponses physiologiques développées par les cellules, il conviendrait de les confirmer avec d'autres souches, d'autres espèces, voir d'autres genres de bactéries lactiques ou probiotiques.

Références bibliographiques

- Amen, J. et Cabau, M. (1982).** Procédé de fabrication de microorganismes. Brevet français. FR 2 505 359.
- Ananta, E., Heinz, V. et Knorr, D. (2004).** Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology* **21**, 567-577.
- Ananta, E., Voigt, D., Zenker, M., Heinz, V. et Knorr, D. (2005).** Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 271-278.
- Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L. et Scaloni, A. (2006).** A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics* **6**, 181-192.
- Arguello, M. A., Salazar, G., Riera, F., Alvarez, R., Gésan-Guiziu, G. et Daufin, G. (1998).** Nettoyage et désinfection. In Daufin, G., René, F. et Aimar, P. (ed.). *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, France, 248-277.
- Athès, V., Bes, M., Carrère, H., Marin, M. et Souchon, I. (2006).** Séparations dans les liquides alimentaires et biologiques. In Colonna, P. et Della Valle, G. (ed.). *Mise en oeuvre des matières agroalimentaires 1*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 23-97.
- Aubert, C., Capelle, N., Jeanson, S., Eckert, H., Divies, C. et Cachon, R. (2002).** Le potentiel d'oxydo-réduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sciences des Aliments* **22**, 177-187.
- Axelsson, L. (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.
- Bâati, L., Fabre-Gea, C., Auriol, D. et Blanc, P. J. (2000).** Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 241-247.
- Bartlett, D. H. (2002).** Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1595**, 367-381.
- Baumann, D. P. et Reinbold, G. W. (1966).** Freezing of lactic cultures. *Journal of Dairy Science* **49**, 259-263.
- Béal, C. et 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. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **27**, 86-92.
- Béal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N. et Corrieu, G. (1999).** Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science* **82**, 673-681.
- Béal, C., Fonseca, F. et Corrieu, G. (2001a).** Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science* **84**, 2347-2356.
- Béal, C., Marin, M., Fonseca, F. et Corrieu, G. (2001b).** Procédé de préparation d'une composition lyophilisée contenant des bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors d'un stockage à température ambiante et composition obtenue. Brevet français. FR 2 829 147 A1.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. et Obert, J. P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 661-785.
- Berner, D. et Viernstein, H. (2006).** Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Scientia Pharmaceutica* **74**, 137-149.
- Beveridge, T. J. et Davies, J. A. (1983).** Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain. *Journal of Bacteriology* **156**, 846-858.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmgren, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. et Sorokin, A. (2001).** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* **11**, 731-753.
- Boyaval, P., Corre, C. et Terre, S. (1987).** Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electrodialysis. *Biotechnology Letters* **9**, 207-212.
- Boyaval, P. (1992).** Couplage fermentation-ultrafiltration et production de biomasse. *Industries Alimentaires et Agricoles* **109**, 713-716.
- Boyaval, P., Bouhallab, S., Lafforgue-Delorme, C. et Goma, G. (1998).** Bioréacteurs à membranes. In Daufin, G., René, F. et Aimar, P. (ed.). *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 534-572.
- Bozoğlu, T. F., Ozilgen, M. et Bakir, U. (1987).** Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology* **9**, 531-537.
- Brashears, M. M. et Gilliland, S. E. (1995).** Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. *Journal of Dairy Science* **78**, 2326-2335.

- Breeuwer, P. et Abee, T. (2000).** Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 193-200.
- Broadbent, J. R. et Lin, C. (1999).** Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* **39**, 88-102.
- Budin-Verneuil, A., Pichereau, V., Auffray, Y., Ehrlich, Dusko S. et Maguin, E. (2005).** Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **5**, 4794-4807.
- Bunthof, C. J., van den Braak, S., Breeuwer, P., Rombouts, F. M. et Abee, T. (2000).** Fluorescence assessment of *Lactococcus lactis* viability. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 291-294.
- Bunthof, C. J. (2002).** Flow cytometry, fluorescent probes and flashing bacteria. *Thèse de Doctorat*. Wageningen University, Wageningen. 160 p.
- Bunthof, C. J. et Abee, T. (2002).** Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2934-2942.
- Cachon, R., Anterieux, P. et Divies, C. (1998).** The comparative behavior of *Lactococcus lactis* in free and immobilized culture processes. *Journal of Biotechnology* **63**, 211-218.
- Cachon, R., Jeanson, S., Aldarf, M. et Divies, C. (2002).** Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait* **82**, 281-288.
- Cano, V. P. S., Valentini, S. R., Sivieri, K. et Rossi, E. A. (2007).** Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. *Lait* **87**, 59-69.
- Carrère, H. et Blaszkow, F. (2001).** Comparison of operating modes for clarifying lactic acid fermentation broths by batch cross-flow microfiltration. *Process Biochemistry* **36**, 751-756.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. et Gibbs, P. (2003a).** Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 947-952.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. et Gibbs, P. (2003b).** Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal* **13**, 463-468.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. et Gibbs, P. (2004).** Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **14**, 835-847.
- Casadei, M. A., Manas, P., Niven, G., Needs, E. et Mackey, B. M. (2002).** Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied & Environmental Microbiology* **68**, 5965-5972.

- Cash, P. (1998).** Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* **372**, 121-145.
- Chammas, G. I., Saliba, R., Corrieu, G. et Beal, C. (2006).** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *International Journal of Food Microbiology* **110**, 52-61.
- Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E. et Beaulieu, Y. (1991).** The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Canadian Institut of Food Science and Technology* **24**, 118-128.
- Champagne, C. P. et Gardner, N. J. (2002).** Effect of process parameters on the production and drying of *Leuconostoc mesenteroides* cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**, 291-296.
- Champomier-Verges, M. C., Maguin, E., Mistou, M. Y., Anglade, P. et Chich, J. F. (2002).** Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B* **771**, 329-342.
- Chich, J. F. (2001).** A mini review: proteomic analysis, a post-genomic approach. *Lait* **81**, 13-18.
- Chilson, O. P., Costello, L. A. et Kaplan, N. O. (1965).** Effects of freezing on enzymes. *Federation Proceedings* **24**, S55-S65.
- Cholet, O. (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. *Thèse de Doctorat*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 192 p.
- Chu-Ky, S. (2005).** Fluidité membranaire en relation avec l'adaptation de la bactérie lactique *Oenococcus oeni* au milieu vin. *Thèse de Doctorat*. Université de Bourgogne, Dijon. 157 p.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.-A. et Guzzo, J. (2005).** Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica Biophysica Acta* **1717**, 118-124.
- Corrieu, G., Spinnler, H. E., Jomier, Y. et Picque, D. (1988).** Procédé de mise en évidence et de contrôle de l'activité acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en œuvre. Brevet français. FR 2 629 612.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M., Anchordoguy, T. J. et Drobnis, E. (1989).** Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* **26**, 76-84.
- Da Cruz, A. G., Faria, J. A. F. et Van Dender, A. G. F. (2007).** Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International* **40**, 951-956.
- Daly, C., Fitzgerald, G. F., O'Connor, L. et Davis, R. (1998).** Technological and health benefits of dairy starter cultures. *International Dairy Journal* **8**, 195-205.

- De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P. S. et Gobbetti, M. (2001).** The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* **147**, 1863-1873.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Huet, C., Crecchio, C., Fox, P. F. et Gobbetti, M. (2004).** Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 1336-1346.
- De Giori, G. S., De Valdez, G. F., De Ruiz Holgado, A. P. et Oliver, G. (1985).** Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **68**, 2160-2164.
- De Loecker, W., Koptelov, V. A., Grischenko, V. I. et De Loecker, P. (1998).** Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation. *Cryobiology* **37**, 103-109.
- De Urraza, P. et De Antoni, G. (1997).** Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar. *Cryobiology* **35**, 159-164.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. et De Vos, W. M. (2006).** *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* **16**, 1018-1028.
- Degorce-Dumas, R., Goursaud, J. et Leveau, J. Y. (1986).** Analyse de composés volatils du yaourt par chromatographie en phase gazeuse-espace de tête (headspace). *Industries Alimentaires et Agricoles* **9**, 805-808.
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H. et Trevors, J. T. (2003).** Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 149-182.
- Even, S., Lindley, N. D. et Cocaigh-Bousquet, M. (2003).** Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology* **149**, 1935-1944.
- Fernandez Murga, M. L., De Ruiz Holgado, A. P. et De Valdez, G. F. (1998).** Survival rate and enzyme activities of *Lactobacillus acidophilus* following frozen storage. *Cryobiology* **36**, 315-319.
- Fernandez Murga, M. L., Cabrera, G. M., Font de Valdez, G., Disalvo, A. et Seldes, A. M. (2000).** Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 342-348.
- Fonseca, F., Béal, C. et Corrieu, G. (2000).** Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research* **67**, 83-90.
- Fonseca, F. (2001).** Influence de la cryoprotection et de la congélation sur l'activité acidifiante de bactéries lactiques thermophiles. Relations entre propriétés biologiques et

thermodynamiques. *Thèse de doctorat*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 212 p.

- Fonseca, F., Béal, C. et Corrieu, G. (2001).** Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology* **43**, 189-198.
- Fonseca, F., Béal, C., Mihoub, F., Marin, M. et Corrieu, G. (2003).** Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. *International Dairy Journal* **13**, 917-926.
- Fonseca, F., Marin, M. et Morris, G. J. (2006).** Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 6474-6482.
- Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Pesce de Ruiz Holgado, A. et Oliver, G. (1983).** Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* **20**, 560-566.
- Foschino, R., Fiori, E. et Galli, A. (1996).** Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. *Journal of Dairy Research* **63**, 295-303.
- Foster, J. W. (1999).** When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 170-174.
- Frank, J. F. et Hassan, A. N. (1998).** Starters cultures and their use. In Marth, E. H. et Steele, J. L. (ed.). *Applied Dairy Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 131-172.
- Frees, D., Vogensen, F. K. et Ingmer, H. (2003).** Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 293-300.
- Gatto, E., Peddie, F. et Andrews, S. (1993).** Acidification power: performance evaluation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Australia* **45**, 124-128.
- Gaudreau, H., Fliss, I. et Champagne, C. P. (2006).** Stability of autolytic lactococci during starter production and storage in commercial whey-based media. *International Dairy Journal* **16**, 200-206.
- Gilliland, S. E. (1976).** Preparation and storage of concentrated culture of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science* **60**, 805-809.
- Gilliland, S. E. et Lara, R. C. (1988).** Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 898-902.
- Gitton, C., Meyrand, M., Wang, J., Caron, C., Trubuil, A., Guillot, A. et Mistou, M.-Y. (2005).** Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7152-7163.
- Gomez Zavaglia, A., Disalvo, E. A. et De Antoni, G. L. (2000).** Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *Journal of Dairy Research* **67**, 241-247.

- Gouesbet, G., Jan, G. et Boyaval, P. (2001).** *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* thermotolerance. *Lait* **81**, 301-309.
- Gouesbet, G., Jan, G. et Boyaval, P. (2002).** Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* thermotolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1055-1063.
- Grandison, A. S. et Finnigan, T. J. A. (1996).** Microfiltration. In Grandison, A. S. et Lewis, M. J. (ed.). *Separation processes in the food and biotechnology industries - principles and applications*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 141-153.
- Griffin, T. J., Goodlett, D. R. et Aebersold, R. (2001).** Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 607-612.
- Guarner, F. et Schaafsma, G. J. (1998).** Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 237-238.
- Guerzoni, M. E., Vernocchi, P., Nadgijimana, M., Gianotti, A. et Lanciotti, R. (2007).** Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli-yeast interactions. *Food Microbiology* **24**, 139-148.
- Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P. et Mistou, M. Y. (2003).** Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* **3**, 337-354.
- Guillot, A., Obis, D. et Mistou, M.-Y. (2000).** Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 47-51.
- Guillouard, I., Lim, E. M., Van de Guchte, M., Grimaldi, C., Penaud, S. et Maguin, E. (2004).** Tolerance and adaptative acid stress of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lait* **84**, 1-6.
- Hartke, A., Bouché, S., Giard, J. C., Benachour, A. et Boutibonnes, P. (1996).** The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology* **33**, 194-199.
- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. et Yvon, M. (2004).** Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino-acids. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3855-3861.
- Heller, K. J. (2001).** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 374S-379.
- Hörmann, S., Scheyhing, C., Behr, J., Pavlovic, M., Ehrmann, M. et Vogel, R. F. (2006).** Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T. *Proteomics* **6**, 1878-1885.
- Hugenholtz, J., Sybesma, W., Groot, M. N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., van Sinderen, D., Piard, J.-C., Eggink, G., J. Smid, E., Savoy, G., Sesma, F., Jansen, T.,**

- Hols, P. et Kleerebezem, M. (2002).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 217-235.
- Hutkins, R. W. et Nannen, N. L. (1993).** pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **76**, 2354-2365.
- Jakubczak, E. et Leclerc, H. (1980).** Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence : étude critique des méthodes d'extraction. *Annales de Biologie Clinique* **38**, 297-304.
- Johnson, M., Ray, B. et Speck, M. L. (1984).** Freeze-injury in cell wall and its repair in *Lactobacillus acidophilus*. *Cryo-Letters* **5**, 171-176.
- Kilara, A., Shahani, K. M. et Das, N. K. (1976).** Effect of cryoprotective agents on freeze-drying and storage of lactic cultures. *Cultured Dairy Products Journal* **11**, 8-11.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K. et Vogensen, F. K. (1997).** Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1826-1837.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. et Siezen, R. (2002).** Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 29-58.
- Klaenhammer, T. R. et Kleeman, E. G. (1981).** Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 1461-1467.
- Langella, P., Nouaille, S., Commissaire, J., Bolotine, A., Gruss, A. et Le Loir, Y. (2001).** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* **81**, 19-28.
- Latrille, E., Picque, D., Perret, B. et Corrieu, G. (1992).** Characterizing acidification kinetics by measuring pH and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **74**, 32-38.
- Lay Jr., J. O. (2000).** MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *Trends in Analytical Chemistry* **19**, 507-516.
- Lee, K. H. (2001).** Proteomics: a technology-driven and technology-milited discovery science. *Trends in Biotechnology* **19**, 217-222.
- Lehninger, A. L. (1981).** *Biochemistry*. Worth Publishers, New York. pp. 1104.
- Lejard, F., Boyaval, P., De Roissart, H. et Maruejols, R. (1994).** Production de ferments concentrés pour ensemencement direct. In De Roissard, H. et Luquet, F. M. (ed.). *Bactéries lactiques*. Lorica, Uriage, 539-553.

- Len, A. C. L., Harty, D. W. S. et Jacques, N. A. (2004).** Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology* **150**, 1339-1351.
- Lievense, L. C., Van't Riet, K. et Noomen, A. (1990).** Measuring and modelling the glucose-fermenting activity of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 669-673.
- Lim, E. M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2000).** Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* **21**, 2557-2561.
- Lim, E. M., Lafon, A., Dridi, L., Boudebouze, S., Ehrlich, D. et Maguin, E. (2001).** Identification of stress proteins in *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* by two-dimensional electrophoresis. *Lait* **81**, 317-325.
- Linders, L. J. M., Meerdink, G. et Van't Riet, K. (1997a).** Effect of growth parameters on the residual activity of *Lactobacillus plantarum* after drying. *Journal of Applied Microbiology* **82**, 683-688.
- Linders, L. J. M., Wolkers, W. F., Hoekstra, F. A. et Van't Riet, K. (1997b).** Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* **35**, 31-40.
- Lorca, G. L. et Font de Valdez, G. (1999).** The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology* **39**, 144-149.
- Lorca, G. L. et Font de Valdez, G. (2001).** A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology* **42**, 21-25.
- Lorca, G. L., Font de Valdez, G. et Ljungh, A. (2002).** Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4**, 525-32.
- Malone, A. S., Shellhammer, T. H. et Courtney, P. D. (2002).** Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4357-4363.
- Martos, G. I., Minahk, C. J., Font de Valdez, G. et Morero, R. (2007).** Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 282-288.
- Maruejous, A. et Caigniet, A. (1983).** Les cultures concentrées congelées. *La Technique Laitière* **976**, 38-43.
- Mättö, J., Alakomi, H.-L., Vaari, A., Virkajärvi, I. et Saarela, M. (2006).** Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a

- special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal* **16**, 1029-1037.
- Mäyrä-Mäkinen, A. et Bigret, M. (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-102.
- Mazur, P. (1970).** Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* **168**, 939-949.
- McDougald, D., Rice, S. A., Weichert, D. et Kjelleberg, S. (1998).** Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 1-9.
- McGann, L. E. (1978).** Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* **15**, 382-390.
- Monnet, C., Béal, C. et Corrieu, G. (2003).** Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* to freezing by natural selection. *Journal of Dairy Science* **86**, 3048-3053.
- Morein, S., Andersson, A.-S., Rilfors, L. et Lindblom, G. (1996).** Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 6801-6809.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A. et Vesey, G. (2006).** Preservation of micro-organisms by drying: a review. *Journal of Microbiological Methods* **66**, 183-193.
- Morice, M., Bracquart, P. et Linden, G. (1992).** Colonial variation and freeze-thaw resistance of *S. thermophilus*. *Journal of Dairy Science* **75**, 1197-1203.
- O'Farrell, P. H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007-4021.
- Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Fonseca, F., Passot, S. et 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. *Biotechnology Progress* **21**, 885-892.
- Olivares, M., Diaz-Ropero, M. P., Gomez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A., Martin, R., Lopez-Huertas, E., Rodriguez, J. M. et Xaus, J. (2006a).** Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 104-111.
- Olivares, M., Diaz-Ropero, M. P., Martin, R., Rodriguez, M. et Xaus, J. (2006b).** Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 72-79.
- Ostlie, H. M., Treimo, J. et Narvhus, J. A. (2005).** Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *International Dairy Journal* **15**, 989-997.

- Ott, A., Fay, L. B. et Chaintreau, A. (1997).** Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 850-858.
- Ott, K.-H., Aranibar, N., Singh, B. et Stockton, G. W. (2003).** Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry* **62**, 971-985.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. et Isolauri, E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 279-289.
- Palmfeldt, J. et Hahn-Hägerdal, B. (2000).** Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 235-238.
- Palmfeldt, J., Levander, F., Hahn-Hägerdal, B. et James, P. (2004).** Acidic proteome of growing and resting *Lactococcus lactis* metabolizing maltose. *Proteomics* **4**, 3881-3898.
- Panchaud, A., Affolter, M., Moreillon, P. et Kussmann, M. (2007).** Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *Journal of Proteomics*. Doi:10.1016/j.prot.2007.12.001.
- Panoff, J., Thammavongs, B., Laplace, J., Hartke, A., Boutibonnes, P. et Auffray, Y. (1995).** Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403. *Cryobiology* **32**, 516-520.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., Gueguen, M. et Boutibonnes, P. (1998).** Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**, 75-83.
- Parente, E. et Cogan, T. M. (2004).** Starters cultures: general aspects. In Fox, P. F. et McSweeney, P. L. H. (ed.). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Elsevier, London, UK, 123-147.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. et Hunziker, P. (2001).** Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica Biophysica Acta* **1526**, 131-140.
- Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D. F. et Dunn, M. J. (1997).** Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends in Cell Biology* **7**, 168-173.
- Perrin, C., Gonzalez-Marquez, H., Gaillard, J. L., Bracquart, P. et Guimont, C. (2000).** Reference map of soluble proteins from *Streptococcus thermophilus* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 949-955.
- Péter, G. et Reichart, O. (2001).** The effect of growth phase, cryoprotectants and freezing rates on the survival of selected micro-organisms during freezing and thawing. *Acta Alimentaria* **30**, 89-97.
- Petry, S., Furlan, S., Waghorne, E., Saulnier, L., Cerning, J. et Maguin, E. (2003).** Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp

- bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiology Letters* **221**, 285-291.
- Picque, D., Perret, B., Latrille, E. et Corrieu, G. (1992).** Caractérisation et classification de bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **25**, 181-186.
- Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1-152.
- Prasad, J., McJarrow, P. et Gopal, P. (2003).** Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 917-925.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.-C. et Bouix, M. (2007).** Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* **55**, 35-43.
- Raynaud, S., Perrin, R., Coccagn-Bousquet, M. et Loubiere, P. (2005).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8016-8023.
- Rechinger, K. B., Siegmundfeldt, H., Svendsen, I. et Jakobsen, M. (2000).** Early protein synthesis of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* in milk revealed by [S-35]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 2660-2669.
- Renault, P. (2008).** Génétique des bactéries lactiques. In Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 153-269.
- Rodriguez, J. M., Martínez, M. I., Horn, N. et Dodd, H. M. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 101-116.
- Rozès, N., Garbay, S., Denayrolles, M. et Lonvaud-Funel, A. (1993).** A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition. *Letters in Applied Microbiology* **17**, 126-131.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. et Zoon, P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **12**, 163-171.
- Russell, N. J., Evans, R. I., Ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A. et Abee, T. (1995).** Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 255-261.
- Russell, N. J. (2002).** Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 27-34.

- Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajärvi, I. et Mättö, J. (2004).** Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 1205-1214.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T. et Mättö, J. (2005).** Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1330-1339.
- Saide, J. A. O. et Gilliland, S. E. (2005).** Antioxidative activity of Lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity. *Journal of Dairy Science* **88**, 1352-1357.
- Sanchez, B., Champomier-Vergès, M.-C., Anglade, P., Baraige, F., de los Reyes-Gavilan, C. G., Margolles, A. et Zagorec, M. (2005).** Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *Journal of Bacteriology* **187**, 5799-5808.
- Sanders, M. E. et Klaenhammer, T. R. (2001).** The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science* **84**, 319-331.
- Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E. et Davis, R. W. (1998).** Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology* **16**, 301-306.
- Schiraldi, C., Valli, V., Molinaro, A., Carteni, M. et Rosa, M. d. (2006).** Exopolysaccharides production in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* exploiting microfiltration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **33**, 384-390.
- Schoug, A., Fischer, J., Heipieper, H. J., Schnürer, J. et Hakansson, S. (2007).** Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Doi:10.1007/s10295-007-0281-x.
- Siegel, D. P. (1986).** Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic and inverted hexagonal lipid phases. II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. *Biophysical Journal* **49**, 1171-1183.
- Simatos, D., Blond, G., Meste, M. L. et Morice, M. (1994).** Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation. In De Roissant, H. et Luquet, F. M. (ed.). *Bactéries Lactiques*. Lorica, Grenoble, 555-573.
- Singer, S. J. et Nicholson, G. L. (1972).** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Smit, G., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Smit, B. A., Ayad, E. H. E. et Engels, W. J. M. (2002).** Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *The Australian Journal of Dairy Technology* **57**, 61-68.

- Smith, D. (2001).** Provision and maintenance of micro-organisms for industry and international research networks. *Cryo Letters* **22**, 91-96.
- Smittle, R. B., Gilliland, S. E., Speck, M. L. et Walter Jr, W. M. (1974).** Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology* **27**, 738-743.
- Sondergaard, A. K. (2005).** Application of probiotics in food. In Luquet, F.-M. et Corrieu, G. (ed.). *Bactéries lactiques et probiotiques*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 195-209.
- Spinnler, H. E., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. et Corrieu, G. (1987).** Measurement of the partial pressure of dissolved CO₂ for estimating the concentration of *Streptococcus thermophilus* in coculture with *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**, 464-470.
- Spinnler, H. E. et Corrieu, G. (1989).** Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research* **56**, 755-764.
- Spinnler, H. E., Rozzi, A., Béal, C. et Corrieu, G. (1989).** On-line measurement of urease activity to estimate a population of *Streptococcus thermophilus* in pure and mixed cultures. *Process Biochemistry* **24**, 187-192.
- Stadhouders, J. (1986).** The control of cheese starter activity. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **40**, 115-173.
- Steuer, R., Kurths, J., Fiehn, O. et Weckwerth, W. (2003).** Observing and interpreting correlations in metabolomic networks. *Bioinformatics* **19**, 1019-1026.
- Streit, F., Corrieu, G. et Béal, C. (2007).** Acidification of fermented broth improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology* **128**, 659-667.
- Svensäter, G., Sjögren, B. et Hamilton, I. R. (2000).** Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology* **146**, 107-117.
- Talwalkar, A. et Kailasapathy, K. (2003).** Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science* **86**, 2537-2546.
- Tamime, A. Y. et Robinson, R. K. (1999).** Preservation and production of starter cultures. In Tamime, A. Y. et Robinson, R. K. (ed.). *Yoghurt: Science and Technology*. Woodhead publishing limited, Cambridge, England, 486-514.
- Taniguchi, M., Hoshino, K., Urasaki, H. et Fujii, M. (1994).** Continuous production of an antibiotic polypeptide (nisin) by *Lactococcus lactis* using a bioreactor coupled to a microfiltration module. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77**, 704-708.
- Taylor, M. J. (2007).** Biology of cell survival in the cold: the basis for biopreservation of tissues and organs. In Baust, J. G. et Baust, J. M. (ed.). *Advances in Biopreservation*. CRC Press, Boca Raton, FL, 15-62.

- Teixeira, H., Gonçalves, M. G., Rozes, N., Ramos, A. et San Romao, M. V. (2002).** Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress? *Microbial Ecology* **43**, 146-153.
- Thiboutot, H., Dako, E., El Soda, M., Vuillemand, J. C., Power, N. et Simard, R. E. (1995).** Influence of heat and freeze shocking on the autolysis and peptidase activities of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft* **50**, 448-452.
- To, B. C. S. et Etzel, M. R. (1997).** Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science* **62**, 576-578.
- Todaro, C. L. (1997).** Centrifugation. In Vogel, H. C. et Todaro, C. L. (ed.). *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design and equipment*. Noyes Publications, Westwood, NJ, 558-589.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L. et Divies, C. (2000).** Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 269-273.
- Trevors, J. T. (2003).** Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **57**, 87-103.
- Tymczyszyn, E. E., Gomez-Zavaglia, A. et Disalvo, E. A. (2005).** Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **443**, 66-73.
- Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J. M., Walunas, T., Gibrat, J. F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2006).** The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *PNAS* **103**, 9274-9279.
- Vasiljevic, T., Shah, N. P. et Jelen, P. (2005).** Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 as affected by different neutralisers. *The Australian Journal of Dairy Technology* **60**, 3-9.
- Wang, Y. (2005).** Préadaptation et cryotolérance chez *Lactobacillus acidophilus* : effet des conditions opératoires. *Thèse de doctorat*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 214 p.
- Wang, Y., Corrieu, G. et Béal, C. (2005a).** Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science* **88**, 21-29.
- Wang, Y., Delettre, J., Guillot, A., Corrieu, G. et Béal, C. (2005b).** Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* **50**, 294-307.
- Weckwerth, W. et Fiehn, O. (2002).** Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 156-160.

- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J. et Grobber, G. J. (2002).** Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal* **12**, 151-161.
- Wolfe, J. et Bryant, G. (2001).** Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* **24**, 438-450.
- Yarmush, M. L. et Jayaraman, A. (2002).** Advances in proteomic technologies. *Annual Reviews in Biomedical Engineering* **4**, 349-373.
- Zannini, E., Santarelli, S., Osimani, A., Dell'Aquila, L. et Clementi, F. (2005).** Effect of process parameters on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation. *Annals of Microbiology* **55**, 372-378.

Annexes

Annexe 1 : Estimation de la perte de charge dans la membrane de microfiltration tangentielle

Afin d'estimer l'importance de la perte de charge entre l'entrée et la sortie de la membrane, nous avons posé l'hypothèse que le milieu fermenté est un fluide Newtonien et que la membrane est une conduite lisse. Selon ces considérations, l'équation de Blasius peut être utilisée afin d'obtenir le facteur de frottement ($f/2$) pour chaque valeur de vitesse tangentielle.

$$\frac{f}{2} = 0.0395 \cdot \text{Re}^{-0.25} \quad (\text{eq. 1 - Relation de Blasius})$$

Dans cette étude, la vitesse tangentielle appliquée a varié entre 1,5 et 5 m/s, soit un nombre de Reynolds Re compris entre 11.340 et 37.800 (régime turbulent), ce qui conduit à l'obtention de valeurs de $f/2$ comprises entre $3,82 \cdot 10^{-3}$ et $2,83 \cdot 10^{-3}$.

La perte de charge (ΔP) est, par la suite, calculée grâce à la relation :

$$\Delta P = \frac{f}{2} \cdot \frac{4 \cdot \rho \cdot v^2 \cdot L}{D} \quad (\text{eq. 2})$$

Dans cette étude, la longueur de la membrane (L) est égale à 25 cm et le diamètre intérieur (D) est de 1,4 cm. La masse volumique du milieu fermenté est considérée égale à 1100 kg/m³.

Dans les conditions de vitesse tangentielle appliquées (entre 1,5 et 5 m/s), la perte de charge dans la membrane varie alors entre 66,4 et 5460 Pa. Ces valeurs sont faibles en comparaison avec les pressions transmembranaires étudiées (de 0,1 à 0,42 Mpa). En conséquence, nous considérons que la pression transmembranaire peut être considérée comme constante tout au long de la membrane.

L'éq. 2 a été aussi utilisée pour estimer les pertes de charge dans les différentes parties constituant le module de microfiltration. Les résultats montrent que, selon l'endroit considéré et les conditions de vitesse tangentielle appliquées, les pertes de charge varient entre 10^{-2} et 10^{-5} MPa. Ces résultats permettent de constater que la position d'un des manomètres (situé bien après la sortie de la membrane) n'as pas beaucoup d'influence sur la valeur de pression transmembranaire mesurée.

Annexe 2 : Protocole de nettoyage du module de microfiltration tangentielle

Matériels

- 3 béciers de 1 L pour alimenter le module, récupérer le perméat et le rétentat
- 1 tuyau en silicone pour alimenter le bac avec de l'eau osmosée

Réactifs

- 4 L d'une solution ULTRASIL 25F à 1 %
- 3 L d'une solution d'acide nitrique (2 mL.L^{-1}) (préparée sous la sorbonne en utilisant un masque et des gants).
- Eau osmosée (environ 30 L)

Attention : Vérifiez régulièrement le niveau de la cuve d'alimentation afin d'éviter que la pompe tourne à vide.

Procédure de nettoyage

- Lavage basique à 45 °C
 - Introduire 2 L de la solution basique ULTRASIL 25F dans la cuve d'alimentation
 - Régler la température du bain marie à 45 °C
 - Faire tourner le module à 18 Hz avec $PM_2 = 0 \text{ MPa}$ jusqu'à stabilisation de la température
 - Conditions de lavage :
 - Fréquence = 30 Hz
 - $PM_2 = 0,2 \text{ MPa}$
 - Durée = 10 min
 - Vider la cuve d'alimentation et la membrane
- Rinçage de la membrane à l'eau : il est réalisé à deux reprises
 - Introduire de l'eau osmosée dans la cuve d'alimentation
 - Faire tourner le module à 30 Hz avec $PM_2 = 0,2 \text{ MPa}$ pendant 10 min
 - Vider la cuve d'alimentation
 - Réglez la température du bain marie à 85 °C
 - Effectuez un deuxième lavage avec l'eau osmosée dans les mêmes conditions
 - Vider la cuve d'alimentation et la membrane
- Lavage basique à 80 °C
 - Introduire 2 L de la solution basique ULTRASIL 25F dans la cuve d'alimentation
 - Faire tourner le module à 18 Hz avec $PM_2 = 0 \text{ MPa}$ jusqu'à stabilisation de la température
 - Conditions de lavage :
 - Fréquence = 30 Hz
 - $PM_2 = 0,1 \text{ MPa}$
 - Durée = 30 min
 - Vider la cuve d'alimentation et la membrane
- Rinçage à l'eau en continu
 - La vidange de l'eau doit se faire progressivement afin de ne pas provoquer de choc thermique pouvant endommager la membrane

- Introduire progressivement de l'eau osmosée dans la cuve d'alimentation tout en récupérant la solution basique (vanne V₂ ouverte).
 - Conditions de rinçage :
 - Fréquence = 30 Hz
 - PM₂ = 0,1 MPa
 - le rinçage se fait jusqu'à ce que le pH du perméat atteigne la neutralité.
 - Vider la cuve d'alimentation et la membrane
- Lavage acide à 30 °C
 - Introduire 3 L de la solution d'acide nitrique dans la cuve d'alimentation
 - Régler la température du bain marie à 30 °C
 - Faire tourner le module à 18 Hz avec PM₂ = 0 MPa jusqu'à stabilisation de la température
 - Conditions de lavage :
 - Fréquence = 30 Hz
 - PM₂ = 0,2 MPa
 - Durée = 15 min
 - Vider la cuve d'alimentation et la membrane
 - Rinçage à l'eau en continu
 - Introduire de l'eau osmosée en continu dans le bac d'alimentation
 - Ouvrir la vanne V₂ a fin de maintenir le niveau d'eau constant dans le bac
 - Conditions de rinçage :
 - Fréquence = 30 Hz
 - PM₂ = 0,1 MPa
 - Le rinçage se fait jusqu'à ce que le pH du perméat atteigne la neutralité

Pour vérifier l'efficacité des cycles de nettoyage, il est nécessaire d'effectuer des mesures de la densité de flux de l'eau à travers la membrane (débit de perméat) à 20 °C (DE₁₂₀, en L.h⁻¹.m⁻²) avec la pression à la sortie du système (PM₂) réglée à 1 bar. La valeur du débit à l'eau est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$DE_{120} = \frac{(D \cdot KT)}{(S \cdot P_m)}$$

où D est le débit du perméat (en L.h⁻¹), KT est un coefficient permettant de standardiser la valeur de la température à 20 °C, S est la surface membranaire (en m²) et P_m est la pression moyenne (en bar).

La valeur de DE₁₂₀ mesurée juste avant la première utilisation du module de microfiltration sert comme référence pour évaluer le cycle de nettoyage. Pour ce module, elle est de 344 L.h⁻¹.m⁻². Après chaque nettoyage, DE₁₂₀ doit être rétablie à +/- 20 % de la valeur de référence. Si après nettoyage la valeur du DE₁₂₀ est très inférieure à la valeur de référence, il est nécessaire de refaire une séquence de nettoyage.

Annexe 3 : Protocole de décontamination du module de microfiltration tangentielle

Matériels

- 3 béciers de 1 L pour alimenter le module, récupérer le perméat et le rétentat

Réactifs

- 3 L d'eau de javel à 200 ppm. Cette solution est préparée en mélangeant 6,9 mL d'eau de javel à 9,6 % dans 3 L d'une solution de NaOH 1 % (utiliser des gants et un masque et travailler dans la sorbonne).
- 25 L d'eau osmosée stérile répartis dans des bouteilles de 5 L et autoclavés à 120 °C pendant 20 min

Procédure de décontamination

La température de décontamination ne doit pas dépasser 20 °C.

- Décontamination
 - Réglez le bain marie à 10 °C
 - Introduire la solution de décontamination dans le module
 - Conditions de décontamination :
 - Fréquence = 30 Hz
 - $PM_2 = 0,1$ MPa
 - Durée = 30 min
 - Vider la cuve d'alimentation et la membrane
- Rinçage à l'eau stérile
 - Introduire en continu de l'eau osmosée stérile dans le réservoir
 - Faire tourner le module à 30 Hz avec $PM_2 = 0,1$ MPa
 - Mesurer régulièrement au cours du rinçage le pH du perméat
 - L'étape de rinçage est arrêtée lorsque le pH du perméat atteint la neutralité.

Annexe 4 : Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Principe

La méthode de Bradford consiste à doser la quantité de protéines contenues dans un échantillon en la comparant à une gamme de concentrations en sérum albumine bovine (SAB), traitée dans les mêmes conditions, après coloration au bleu de Coomassie. La densité optique de chaque échantillon est mesurée à 595 nm.

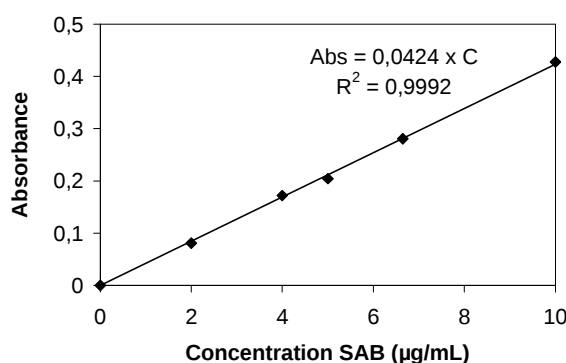
Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme est élaborée à partir d'une solution mère en SAB à 0,02 mg.mL⁻¹, diluée selon le tableau suivant :

Concentration de SAB (µg.mL ⁻¹)	Eau milliQ (µL)	SAB 0,02 mg.mL ⁻¹ (µL)	Colorant (µL)
10	400	400	200
6,65	533	266	200
5	600	200	200
4	640	160	200
2	720	80	200
0	800	0	200

Mesure et quantification de la concentration en protéines des échantillons

Tous les échantillons sont dilués au 1/1000^{ème} dans de l'eau milliQ. 800 µL de chaque échantillon sont placés dans une cuve de spectrophotomètre et additionnés de 200 µL de colorant. Après 5 min de réaction à l'obscurité, l'absorbance est mesurée. La droite obtenue à partir de la gamme d'étalonnage est lissée par une relation linéaire, en fonction de la concentration en protéines.



Relation linéaire entre la concentration en protéines et l'absorbance

Tous les essais sont doublés et la droite est linéaire jusqu'à une valeur d'absorbance de 0,5.

La concentration en protéines de l'échantillon (C, en µg.mL⁻¹) est calculée par la formule suivante :

$$C = \frac{\left(\frac{\text{Abs}}{\text{pente de la droite}} \right)}{\text{dilution}}$$

Annexe 5 : Composition et fonctions du tampon de focalisation

Tampon de base de focalisation

Composés	Concentration	Fonction
Urée (Sigma)	7 M	Solubiliser et dénaturer les protéines en perturbant les liaisons hydrogènes et les structures secondaires des protéines, qui peuvent affecter leur mobilité
Thiourée (Sigma)	2 M	Même fonction que l'urée, mais pour les protéines membranaires de plus faible solubilité
Triton 100 (Sigma)	5 g.L ⁻¹	Perturber les interactions hydrophobes et augmenter la mobilité des protéines vers leur pI
Biolyte 4-6 (Biorad)	3 g.L ⁻¹	Contrer la précipitation des protéines due à une quantité de sel insuffisante
Biolyte 5-7 (Biorad)	3 g.L ⁻¹	Même fonction que le Biolyte 4-6

Tampon de focalisation (pour 1 strip)

1,1 mg de dithiothreitol (DTT, Biorad) sont pesés et puis dissous dans 0,35 mL de tampon de base de focalisation (concentration finale en DTT : 20 mM). La fonction du DTT est de perturber les liaisons disulfides et permettre la séparation des sous-unités protéiques. Ce tampon est préparé juste avant son utilisation.

Annexe 6 : Programmes de focalisation et de migration

Programme de focalisation (1ère dimension)

Etape	Voltage (volts)	Durée	
0	50	11 h	→ Réhydratation active
1	50 à 500	30 min	
2	500	1 h	Focalisation isoélectrique
3	500 à 1000	1 h	
4	1000	30 min	
5	1000 à 3000	1 h	
6	3000	30 min	
7	3000 à 8000	1 h 30 min	
8	8000	7 h 30 min	

Programme de migration (2ème dimension)

Etape	Durée	Intensité* pour 1 gel
Pré-migration	15 min	5 mA
Migration	16 h 30 min	10 mA

*L'intensité est multipliée par le nombre de gels migrant simultanément

Annexe 7 : Composition des tampons d'équilibration

Tampon de base d'équilibration

Composés	Concentration finale
Urée (Sigma)	6 M
SDS 20 % (Biorad)	20 g.L ⁻¹
Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (Sigma)	0,375 M
Glycérol (Prolabo)	200 g.L ⁻¹
Biolyte 5-7 (Biorad)	6 g.L ⁻¹
Eau milliQ	qsp
Bleu de Coomassie (Biorad)	traces

Tampon d'équilibration E1 (pour un strip)

50 mg de dithiothreitol (DTT, Biorad) sont dissous dans 0,5 mL d'eau milliQ. 2 mL de tampon de base d'équilibration sont ajoutés pour atteindre une concentration finale en DTT de 130 mM. Ce tampon est préparé juste avant utilisation.

Tampon d'équilibration E2 (pour un strip)

100 mg d'iodoacétamide (Biorad) sont dissous dans 0,5 mL d'eau miliQ. 2 mL de tampon de base d'équilibration sont ajoutés pour atteindre une concentration finale en iodoacétamide de 210 mM. Ce tampon est préparé juste avant utilisation.

Annexe 8 : Composition du gel SDS-Page pour la deuxième dimension

Gel d'acrylamide 12,5 % (composition pour un gel)

Composés	Volumes
Acrylamide / Bis Acrylamide (37,5 :1) (Biorad)	21 mL
Tampon Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (Sigma)	12,5 mL
SDS 20 % (Biorad)	0,25 mL
Eau milliQ	qsp 50 mL

Une fois le mélange préparé, il doit être dégazé pendant environ 15 min. Puis, 250 µL de persulfate d'ammonium (APS) à 10 % (concentration finale de 0,5 %) et 16 µL de Temed (Biorad) sont ajoutés au mélange juste avant le couler entre les plaques. Attendre entre 1 à 2 heures pour garantir la complète polymérisation du gel avant utilisation.