

DANILO IZQUIERDO LÓPEZ

**LYOPHILISATION PAR MOUSSAGE DU *BIFIDOBACTEIRUM LONGUM* RO 175 : VIABILITÉ APRÈS
DÉSHYDRATATION ET STABILITÉ PENDANT L'ENTREPOSAGE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Science et technologie des aliments
pour l'obtention du grade de maître en sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

© Danilo Izquierdo López, 2010

Résumé

Le moussage a été utilisé comme un prétraitement avant la lyophilisation du *Bifidobacterium longum* RO175 pour étudier le potentiel d'accélération du taux de séchage ainsi que la viabilité des microorganismes après le procédé. Une étude d'entreposage des produits lyophilisés moussés et non-moussés à différentes températures a complété cette étude.

Lorsque protégé dans des milieux (LEST et lait écrémé) moussés, le *Bifidobacterium longum* RO175 a pu être lyophilisé dans 1/4 à 1/7 du temps employé pour les milieux non-moussés, respectivement, et avec une viabilité plus élevée après la lyophilisation. Toutefois, la masse volumique réduite des mousses par rapport aux liquides entraîne une diminution de la charge du lyophilisateur, qui a pu être compensée seulement pour l'agent protecteur LEST pour maintenir l'efficacité de lyophilisation. Les agents protecteurs moussés ont montré une viabilité plus élevée immédiatement après la lyophilisation (13,66% pour la mousse de LEST et 13,64% pour celle de lait écrémé).

L'entreposage du *Bifidobacterium longum* RO175 lyophilisé entraîne une réduction de la viabilité dans tous les agents protecteurs utilisés (moussés et non-moussés). L'humidité résiduelle des échantillons et la température d'entreposage ont un impact important sur les taux de survie durant l'entreposage.

Mots-clés: lyophilisation, moussage, *Bifidobacterium longum* RO175, probiotiques.

Abstract

Foaming as a pre-treatment was used prior to freeze-drying of *Bifidobacterium longum* RO175 to investigate the potential acceleration of the drying rate as well as the increase in microorganism viability after the process. A study on storage of foamed and non-foamed freeze-dried products completed this study.

Bifidobacterium longum RO175 in foamed media (LEST and skim milk) was freeze-dried in 1/4 to 1/7 of the time employed for non-foamed solutions, respectively, and with higher viability after the process. However, reduced density of foamed materials leads to a decreased dryer load, which was only compensated for LEST medium by a shorter drying time to maintain the dryer throughput. Foamed suspensions presented a higher viability immediately after freeze-drying (13.66% for foamed LEST and 13.64% for foamed skim milk).

Storage leads to a reduction in *Bifidobacterium longum* RO175 viability for all tested protective agents (foamed and non-foamed). Storage temperature and residual moisture content have an important impact on *Bifidobacterium longum* viability during storage.

Keywords: freeze-drying, foam-mat, *Bifidobacterium longum* RO175, probiotics.

Avant-propos

Je voudrais exprimer mes remerciements à tous ceux qui, avec leur aide et collaboration, ont rendu possible la réalisation de ce projet.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de recherche, Cristina Ratti, pour ses conseils scientifiques judicieux, sa disponibilité tout au long de ce projet et surtout la confiance qu'elle m'a fait dès le début de mes études et ses grandes qualités humaines.

Je tiens également à remercier mon codirecteur, Jacques Goulet, pour l'intérêt porté à mon projet et ses conseils fondés sur une profonde connaissance.

Un grand merci à Monica Araya non seulement pour son extraordinaire collaboration technique mais pour partager ses appréciables qualités.

Merci beaucoup à Céline Paquin pour l'aide technique qui m'a permis d'éclaircir mes incertitudes dans la microbiologie.

Mes remerciements vont également à Jocelyne Giasson et au personnel du laboratoire pilote pour leur appui technique.

J'aimerais remercier infiniment ma famille et toutes mes personnes bien aimées en Colombie et à Québec pour leur appui et encouragement pendant cette période.

En fin, je remercie le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les technologies pour le soutien financier et l'Institut Rosell-Lallemand pour avoir fourni la souche objet de l'étude et les milieux.

Dedicado a todos los que amo

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	2
Abstract	3
Avant-propos	4
Table des matières	6
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Introduction	10
CHAPITRE 1	12
Revue de littérature	12
1.1. Les bactéries lactiques	12
1.1.1. Les bifidobactéries	13
1.2. Conservation de bactéries lactiques pour usage industriel ou domestique	14
1.2.1. Lyophilisation	15
1.2.1.1. Définition et étapes	15
1.2.1.2. Effets des variables d'opération liées à la lyophilisation	17
1.2.1.2.1. Température	17
1.2.1.2.2. Pression	18
1.2.1.2.3. Autres variables	18
1.2.1.3. Température de transition vitreuse, T_g	19
1.2.2. Lyophilisation des microorganismes	20
1.2.2.1. Taux de survie des bactéries lactiques à la lyophilisation	21
1.2.2.2. Dommages des microorganismes au cours de la congélation	21
1.2.2.3. Dommages des microorganismes au cours de la dessiccation	22
1.2.2.4. Causes de la faible viabilité des microorganismes après lyophilisation	22
1.2.3. Facteurs liés à la survie des microorganismes lyophilisés	23
1.2.3.1. Milieu de croissance	23
1.2.3.2. Agents protecteurs	24
1.2.3.3. Entreposage	25
1.2.3.4. D'autres facteurs	27
1.2.4. Autres procédés de séchage de bactéries lactiques	29
1.2.5. Coûts des différents procédés de préservation	31
1.3. Les mousses	32
1.3.1. Définition et caractéristiques	32
1.3.2. Les agents moussants	33
1.3.3. Méthodes de formation de mousses	34
1.3.4. Les bactéries et les mousses	35
1.3.4.1. Hydrophobicité de la membrane cellulaire	35
1.3.4.2. Affinité des bactéries pour les mousses	36
1.3.5. Le moussage comme prétraitement	37
1.3.6. Séchage des microorganismes par moussage	38

CHAPITRE 2	41
Hypothèse et objectifs de la recherche	41
2.1. Hypothèse de la recherche	41
2.2. Objectif général	42
2.3. Objectifs spécifiques	42
CHAPITRE 3	43
Foam-mat freeze-drying of <i>Bifidobacterium longum</i> RO 175: viability and storage stability	43
3.1. Résumé	43
3.2. Abstract	44
3.3. Introduction	45
3.4. Materials and methods	47
3.4.1. Strain and culture conditions	47
3.4.2. Protective agents	48
3.4.3. Foaming	49
3.4.4. Freeze-drying and storage	49
3.4.5. Enumeration of survivors	50
3.4.6. Determination of residual moisture	50
3.4.7. Glass transition temperature	50
3.4.8. Statistical analysis	51
3.5. Results and Discussion	52
3.5.1. Overrun	52
3.5.2. Freeze-drying kinetics	52
3.5.3. Cell viability	53
3.5.4. Storage	54
3.6. Conclusion	57
3.7. Tables and Figures	59
3.8. References	68
Conclusion générale et perspectives futures	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau de la revue de littérature

Tableau 1. Comparaison des coûts fixes et d'opération des différentes méthodes de déshydratation des bactéries lactiques (Santivarangkna *et al.*, 2007) 32

Tableaux de l'article

Table 1. Changes in the cell number (cfu/g) of *Bifidobacterium longum* RO 175 during freeze-drying with foamed and non-foamed protective agents.59

Table 2. Residual moisture content (RM) and glass transition temperature (T_g) for *Bifidobacterium longum* RO 175 freeze-dried with four protective agents.....60

LISTE DES FIGURES

Figures de la revue de littérature

- Figure 1.** Diagramme de phases de l'eau.....16
- Figure 2.** Schéma montrant trois bulles formant une mousse. Adapté de Pilpel (1985)..... 35
- Figure 3.** Représentation schématique d'une membrane 35

Figures de l'article

- Figure 1.** Methodology followed to determine the viability of *Bifidobacterium longum* RO175 during freeze-drying and storage.61
- Figure 2.** Experimental set-up used for foaming in an anaerobic chamber.....62
- Figure 3.** Freeze-drying kinetics of *B. longum* RO175.....63
- Figure 4.** Growth curve of *Bifidobacterium longum* RO175.....64
- Figure 5.** Viability of *Bifidobacterium longum* RO175 after freeze-drying.....65
- Figure 6.** Viability of freeze-dried *Bifidobacterium longum* RO175 during storage.....66
- Figure 7.** Survival rate and residual moisture (RM) content for *Bifidobacterium longum* RO 175 freeze-dried at 56 days of storage.67

INTRODUCTION

La lyophilisation est une méthode de déshydratation bien connue utilisée largement pour conserver des micro-organismes. Grâce à sa capacité de combiner la congélation et le séchage dans une seule opération, ce procédé peut créer des produits secs de très haute qualité. Toutefois, les coûts fixes d'un système de lyophilisation (y compris l'achat d'équipement, l'installation et les frais d'ingénierie) est 18 fois celui d'un séchoir à l'air et le double d'un séchoir sous vide (Roser, 1991). En plus, les coûts d'opération pour la lyophilisation sont 5 fois ou le double de ceux de séchage à l'air ou de séchage sous vide, respectivement. Ces coûts fixes et d'opération élevés sont le principal inconvénient de la lyophilisation, et il a conduit des chercheurs du monde entier à trouver d'autres procédés de déshydratation plus viables économiquement. Quelques exemples de ces processus sont l'atomisation, le lit fluidisé ou le séchage sous vide (Santivarangkna *et al.*, 2007).

Bien que la lyophilisation soit une des meilleures méthodes pour préserver la viabilité des micro-organismes, les différentes cultures probiotiques peuvent se comporter différemment face à ce procédé (Atkin *et al.*, 1949). Les lactobacilles généralement montrent une bonne viabilité après la lyophilisation (des valeurs supérieures à 80% ont été obtenues, Palmfeldt *et al.*, 2003; Champagne *et al.*, 1996). D'autre part, les bifidobactéries avec sa forme complexe et sa faible tolérance à l'oxygène sont plus sensibles à la lyophilisation, avec des taux de survie aussi bas que 10% (Maitrot *et al.*, 1997). Une augmentation de la stabilité des micro-organismes durant la congélation, le séchage et l'entreposage peut être obtenue par l'ajout de nombreux composés protecteurs tels que des disaccharides, du lait écrémé et autres (Womersley 1981; Berny *et Hennebert*, 1991; Abadias *et al.*, 2001ab).

Le moussage est un prétraitement utilisé avant la déshydratation de boues et de liquides afin de réduire le temps de séchage ou d'améliorer la qualité du produit. Ce prétraitement a été appliqué avec succès avant le séchage à l'air de jus de fruits (Hertzendorf *et Moshy*, 1970), des œufs (Satyanarayana Rao *et Murali*, 1989), de la pâte de tomate (Lovriæ *et al.*, 1970), du purée de banane (Sankat *et Castaigne*, 2004) et de la pulpe de mangue (Rajkumar *et al.*, 2007). La structure très poreuse créée par la formation de la mousse est probablement responsable de l'accélération du transfert de masse au cours du procédé de séchage à l'air (Brygidyr *et al.*, 1977).

D'autres chercheurs soulignent que le mécanisme de capillarité augmente le taux de séchage (Sankat et Castaigne, 2004). Le moussage avant le séchage à l'air chaud de liquides ou de produits semi-liquides a déjà été utilisé, mais cette technique n'a pas été appliquée encore à la lyophilisation de bactéries. Dans le cas de séchage sous vide, le moussage avant le procédé a montré la stabilisation pendant l'entreposage des cultures de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis* var. *cremoris* à des températures dépassant 37°C, ne comportant que 40% de perte de viabilité (Brohnstein, 2004). La forte affinité entre les microorganismes et les mousses peuvent être liées au fait que, lorsque les mousses sont faites à partir d'une suspension de particules hydrophobes de petite taille (tels que les membranes cellulaires des bactéries), elles montrent une tendance à s'attacher aux bulles et de se concentrer dans la mousse (Pilpel, 1985; Stratton *et al.*, 2002).

Le moussage a également été testé comme un prétraitement à la lyophilisation du blanc d'œuf (Muthukumaran *et al.*, 2008) et du jus de pomme (Raharitsifa et Ratti, 2009a). À partir de ces études, il a été révélé que la formation de mousse réduit le temps de lyophilisation si la comparaison est faite à la même épaisseur d'échantillon. Cependant, la basse densité des matériaux moussés diminue la charge de la masse dans le lyophilisateur. Dans le cas de jus de pomme, les produits moussés lyophilisés se sont montrés thermiquement plus stables au cours de l'entreposage que ceux non-moussés (Raharitsifa et Ratti, 2009b). À date, aucune information n'a été signalée dans la littérature sur le moussage comme un prétraitement pour la lyophilisation des microorganismes.

L'objectif du présent travail est d'étudier le moussage comme prétraitement avant la lyophilisation du *Bifidobacterium longum* RO175 (une bactérie à très forte activité probiotique) afin d'augmenter le taux de séchage et la viabilité du microorganisme après le procédé. Une étude sur le stockage des produits moussés et non-moussés lyophilisés à différentes températures complète cette étude.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1.1 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. À quelques exceptions près, elles sont des bactéries à Gram-positif, généralement immobiles, non sporulées, anaérobies mais aéro tolérantes. Elles ne possèdent ni catalase (certaines souches possèdent un pseudo catalase), ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994).

Le groupe des bactéries lactiques est formé de bactéries en forme de coques (*Streptococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* et *Atobopium*) et de bactéries en forme de bacilles : *Lactobacillus* et *Carnobacterium*.

L'appellation bactéries lactiques est souvent étendue à d'autres bactéries qui leur sont apparentées comme les *Bifidobacterium*, les *Micrococcus*, les *Brevibacterium* et les *Propionibacterium* (Dellaglio et al., 1994).

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la transformation des produits animaux (fromages, laits fermentés, crèmes et beurres acides, Kéfir, produits carnés et produits de la pêche) et des produits végétaux (conservation de fruits et légumes, fermentation de boissons végétales, panification, fabrication de vins et de bières spéciales, malts et moûts de type acide) (De Roissart et Luquet, 1994).

Une des principales fonctions des bactéries lactiques dans l'industrie laitière est la production d'acide lactique parce que cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Schmidt et al., 1994).

L'acide lactique n'est pas le seul produit de la fermentation lactique. Il y a aussi la formation des produits secondaires comme l'acide formique, l'éthanol, l'acide acétique, le diacétyl, l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le gaz carbonique et certains de ces composés qui participent au développement de la saveur et de l'arôme des produits laitiers. Aussi, les bactéries lactiques peuvent produire des agents exopolysaccharides et des enzymes protéolytiques participant à la maturation des fromages entre autres.

1.1.1. Les bifidobactéries

Au début du 20^{ème} siècle, Henri Tissier a découvert les bifidobactéries. Il les a isolées à partir de selles d'enfants nourris au lait maternel (Tissier, 1900). Les bifidobactéries ont généralement une forme bacillaire, montrent une coloration à Gram positif et sont non motiles et non sporulantes. Ces bâtonnets, avec une paroi cellulaire irrégulière, sont normalement concaves et leurs extrémités sont généralement gonflées pour former des proéminences qui peuvent avoir certaines ramifications (Ballongue, 2004).

Les bifidobactéries ont une grande variété de formes : conoïdes, allongées avec des protubérances et des bifurcations (forme bifide en Y) ou à extrémités spatulées ; elles sont souvent disposées en chaînes étoilées en V ou en palissades. Leur morphologie a été souvent utilisée comme caractère distinctif des espèces (Dellaglio *et al.*, 1994).

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies. Cependant, le niveau de tolérance à l'oxygène dépend de l'espèce et du milieu de culture (De Vries et Stouthamer, 1969).

Leur température de croissance minimale est 25-28°C, l'optimale entre 37°C et 41°C et la maximale entre 43°C et 45°C. Leur pH optimum de croissance est compris entre 6,5 et 7,0 mais elles ne croissent pas à pH entre 4,5 et 5,0 ni à pH entre 8,0 et 8,5. Les bifidobactéries produisent de l'acide acétique et de l'acide lactique dans un ratio molaire théorique de 3 : 2 en métabolisant une grande variété d'hexoses par le cycle du fructose-6-phosphate (Scardovi, 1986).

La plupart des bifidobactéries sont considérées comme des probiotiques c'est-à-dire des microorganismes vivants qui, lorsque administrés en quantités adéquates confèrent un ou des bénéfice(s) santé à l'hôte (FAO/WHO, 2002). Les lactobacilles et les bifidobactéries ont été bien étudiés et caractérisés grâce aux effets bénéfiques qu'ils exercent sur leur hôte. L'ingestion de 10^6 à 10^9 de cellules viables par jour est nécessaire chez l'humain pour avoir des effets santé (Lee et Salminen, 1995).

1.2. Conservation de bactéries lactiques pour usage industriel ou domestique

Le but de la conservation des microorganismes est de les maintenir purs, stables et viables dans le temps. Pour atteindre cet objectif, il y a plusieurs méthodes telles que la conservation à basse température et la déshydratation.

Au début de la production industrielle, les ferments laitiers commerciaux ont été fournis sous forme liquide (Bullimore, 1983). Le nombre de bactéries viables de ces cultures était 10^9 cellules/ml ce qui est similaire à celui des cultures en vrac. Ils ne pouvaient pas être utilisés pour inoculer directement de grands volumes de produits laitiers et il fallait des opérations intermédiaires de revivification. Les avancées dans la technologie de production de biomasse a permis d'avoir des ferments sous des formes plus pratiques comme les concentrés congelés et les lyophilisats (Champagne *et al.* 1991).

Les ferments congelés ont le désavantage de requérir de très basses températures d'entreposage et de transport (de -20°C à -40°C) (Gilliland, 1985). En dehors du risque de la décongélation, les coûts élevés de transport peuvent limiter leur commercialisation à des distances courtes. La lyophilisation est, pour cette raison, la façon la plus convenable de les produire car elle n'a pas besoin de conditions de congélation pendant la distribution. Malgré les avantages de la lyophilisation, le fait d'être un procédé coûteux nous amène à regarder d'autres méthodes alternatives de séchage moins chères telles que le séchage par atomisation, le séchage à lit fluidisé et le séchage sous vide (Santivarangkna *et al.*, 2007), entre autres.

1.2.1. Lyophilisation

1.2.1.1. Définition et étapes

La lyophilisation est une opération de déshydratation, généralement sous vide et à basse température, qui consiste à éliminer progressivement l'eau d'un produit congelé principalement par *sublimation* (Genin et René, 1995). La Figure 1 montre le diagramme de phases de l'eau où la sublimation (passage de l'eau de l'état solide à l'état vapeur) est marquée. Pour que la sublimation ait lieu, il est donc nécessaire de soumettre le produit congelé à une pression inférieure à celle correspondant au point triple de l'eau.

La lyophilisation est une opération en trois étapes. Dans la première, le produit (dans la Figure 1 représenté par le point de départ A) doit être *congelé* afin que l'eau qui y est présente soit transformée en glace. Deuxièmement, il y a une diminution marquée de la pression ambiante (vide) et ensuite la glace se retire du produit par *sublimation*. Pour que la sublimation se produise, il faut que l'atmosphère environnante de l'échantillon conserve une pression de vapeur d'eau inférieure à la pression de vapeur saturante du produit congelé. La sublimation a lieu à des valeurs de pression et de température inférieures au point triple de l'eau (0.612 kPa et 0.01°C). Finalement, l'eau fortement liée à la matrice solide est enlevée par une procédé appelé *désorption* (Flink et Knudsen, 1983).

Durant la lyophilisation, la sublimation a lieu dans la limite entre la région sèche et la congelée, appelée *front de sublimation*, qui recède au fur et à mesure que la sublimation procède. La sublimation des cristaux entraîne donc la formation d'une couche superficielle poreuse (Simatos *et al.*, 1994) par où l'eau de désorption migre. Dans les systèmes biologiques, la nature des liaisons unissant l'eau liée au substrat peut être très diverse, et selon le cas, son extraction correspondra à un phénomène d'évaporation (eau retenue dans des espaces capillaires) ou de désorption (eau fixée par liaisons H aux groupements hydrophiles), voire à une sorte de sublimation (eau de clathrates). L'ensemble des phénomènes d'extraction de l'eau non congelable est désigné par le terme désorption (Simatos *et al.*, 1974).

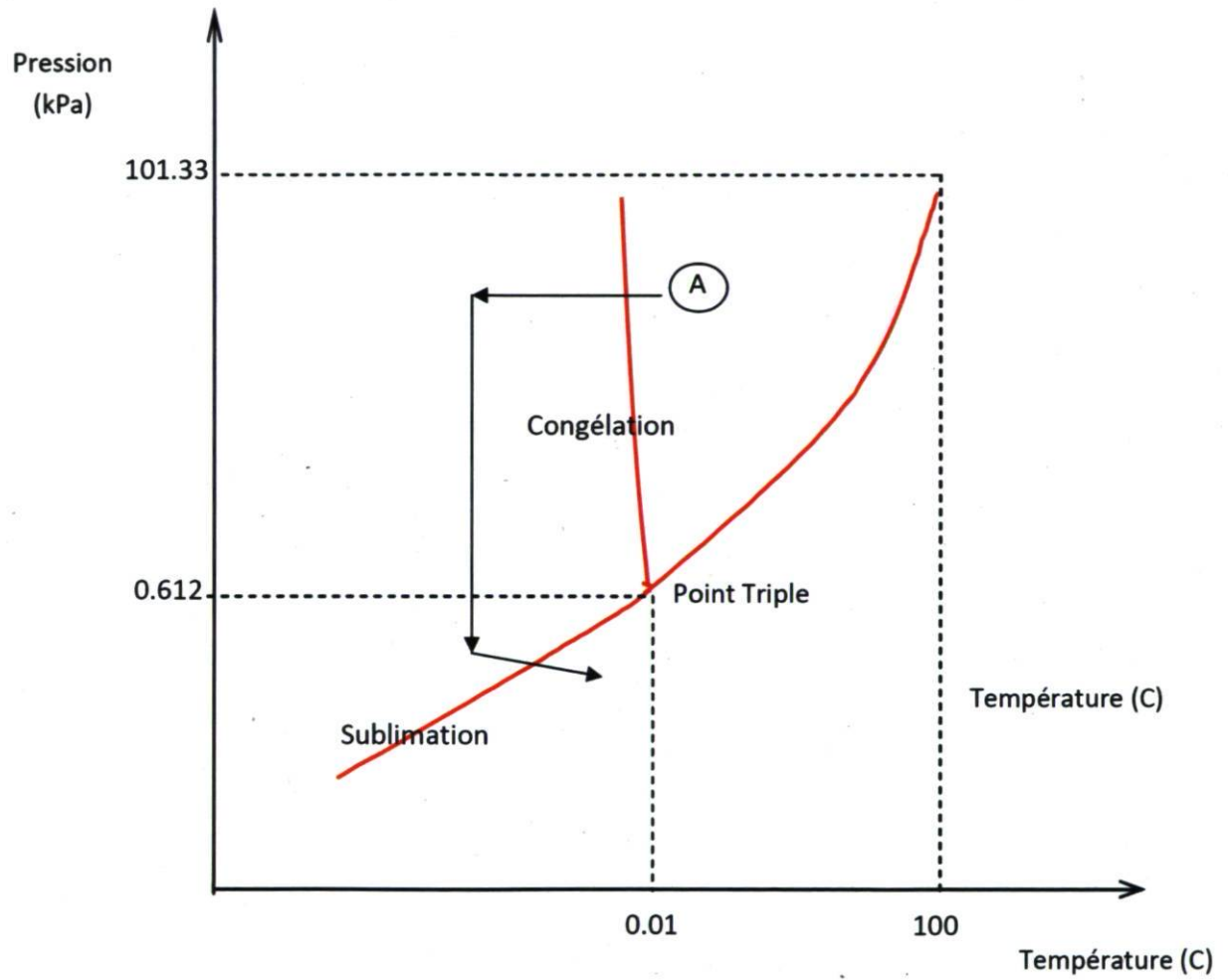


Figure 1. Diagramme de phases de l'eau

Simatos *et al.* (1994) affirment que pour que la dessiccation par lyophilisation soit réalisée à une vitesse aussi élevée que possible, il faut faire attention aux :

-*Transferts de chaleur*, un apport de chaleur correspondant à la chaleur de sublimation doit être effectué au front de sublimation, sans que la température tolérable par le produit soit dépassée (limite thermique); et

-*Transferts de vapeur d'eau*, la perméabilité de la couche poreuse dépend de la vitesse de congélation, de la teneur en matière sèche et de la composition du produit qui influencent la forme des cristaux de glace et la continuité du réseau poreux.

King (1968) a étudié l'incidence de la vitesse de congélation sur la grandeur des pores formés dans l'échantillon. Ils ont observé que la congélation rapide génère des petits et nombreux pores qui vont faciliter le transfert de chaleur et de masse au cours de la dessiccation.

Les dommages cellulaires qui surviennent durant la lyophilisation peuvent avoir lieu de trois façons : (1) par la formation extracellulaire de cristaux de glace entraînant une perturbation mécanique des cellules à cause des gros cristaux résultants de la congélation lente; (2) par la formation intracellulaire de cristaux de glace, que malgré qu'ils soient fins comme résultat de la congélation rapide, causent des désordres dans la structure de l'eau; et (3) par la dénaturation des protéines, qui est probablement provoquée à cause de l'augmentation de la concentration de sels dans les cellules lorsque l'eau est enlevée (Mellor, 1978).

1.2.1.2. Effets des variables d'opération liées à la lyophilisation

1.2.1.2.1. Température

La température de sublimation doit être plus basse que la température de fusion du produit. En général, plus la température de sublimation est basse, meilleure est la qualité du produit. Simatos *et al.* (1974) affirment qu'il y a une diminution d'activité biologique du produit au fur et à mesure que la température augmente.

Pour les microorganismes subissant une lyophilisation, cet effet de la température se traduit dans le pourcentage de survie. Par exemple, Greaves (1966) rapporte que des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, ont montré une survie croissante pour une température de sublimation qui passait de -12.5°C à -35°C. Le même phénomène peut s'observer dans des suspensions de mitochondries qui montrent une meilleure activité de phosphorylation oxydative après avoir été lyophilisées à une température de -76°C en comparaison avec les résultats obtenus à 20°C (Greiff et Myers, 1964).

1.2.1.2.2. Pression

La diminution de la pression dans la chambre augmentera le taux de sublimation en réduisant la concentration de la vapeur sur l'échantillon pour donner une résistance minimale des molécules d'eau qui quittent l'échantillon. Le taux sublimation continue d'augmenter en atteignant un maximum à certain valeur de pression. Si la pression diminue encore, le taux de sublimation n'augmentera pas et, par contre, à des très faibles pressions, le taux de sublimation diminue.

Les lyophilisateurs industriels fonctionnent à une pression constante laquelle facilite le transfert de chaleur dans l'échantillon et la pression du système peut être contrôlée soit par (1) des dégazages d'air dans la chambre, le condenseur ou le système de vacuum ou (2) isolement de la pompe de la chambre pour augmenter la pression en augmentant le nombre de molécules d'eau qui migrent de l'échantillon à la chambre (Adams, 1996).

1.2.1.2.3. Autres variables

D'après Génin et René (1985), le temps de sublimation a une relation proportionnelle et quadratique avec l'épaisseur de l'échantillon selon l'équation suivante :

$$t = \frac{\rho (W_0 - W)}{2 \Psi \Delta P} a^2 \quad (1)$$

où

W_0	: Humidité initiale (kg eau/kg totale)
W	: Humidité finale (kg eau/kg de solide sec)
ρ	: Masse volumique (g/cc)
Ψ	: Perméabilité (H/m)
P	: Pression (Pa)
a	: Épaisseur de l'échantillon (cm)
t	: Temps de la sublimation (s)

L'équation (1) montre une relation quadratique entre le temps de lyophilisation et l'épaisseur du produit, ceci explique pourquoi la lyophilisation est plus rapide si l'on utilise une petite épaisseur d'échantillon.

1.2.1.3. Température de transition vitreuse, T_g

L'état vitreux est comme un liquide dont la viscosité est très élevée et qui est capable de ralentir les réactions chimiques. Bruni et Léopold (1991) suggèrent que l'état vitreux pourrait assurer la stabilité des systèmes vivants pour de longues durées. Ainsi, la matrice protectrice vitreuse emprisonnant et immobilisant les microorganismes permettrait une mobilité restreinte des molécules membranaires (protéines, phospholipides) ; et par conséquent, l'activité biologique et la perte de viabilité seraient réduites dans le temps (Ekdawi-Sever et al., 2001).

Par l'augmentation de la température, l'état vitreux se transforme en un état caoutchouteux, dont la viscosité chute dramatiquement (Genin et René, 1995) due à la grande mobilité des molécules d'eau. Par conséquent, les biomolécules se détériorent, entraînant la mort des microorganismes.

Cette transformation a lieu dans un écart de température de 10 à 20°C (Slade et Levine, 1991) caractérisé par une température nommée température de transition vitreuse (T_g), laquelle peut être détectée par un changement de la capacité calorifique, ou par une mesure directe de la relaxation mécanique de la viscosité (Crowe *et al.*, 1998). Toutefois, il est difficile de la détecter car

plusieurs facteurs interfèrent, comme les conditions de vitrification, le contenu en eau et l'antécédent thermique des échantillons (Franks, 1994).

Plus élevée est la T_g d'une substance, plus thermiquement stable est la matrice lyophilisée (Morgan *et al.*, 1961).

1.2.2. La lyophilisation de microorganismes

La lyophilisation est la méthode la plus convenable pour conserver la viabilité des bactéries ainsi que des moisissures et des champignons (Berny et Hennebert, 1991). Quelques avantages de la lyophilisation sont la protection contre la contamination ou l'infestation pendant l'entreposage (Abadias *et al.*, 2001), la longue viabilité des microorganismes lyophilisés, les conditions de distribution (Miyamoto *et al.*, 2000) et d'entreposage faciles ne requérant pas de très basses températures (Costa *et al.*, 2000), l'obtention de formules très sèches avec une humidité résiduelle inférieure à 1% (Bozoglu *et al.*, 1987) plus stables en regard des cultures congelées ou liquides (Champagne *et al.*, 1991).

Simatos *et al.* (1974) affirment que l'état déshydraté est responsable de la stabilité, et qu'il peut être atteint par évaporation ou sublimation. Ils disent aussi que la déshydratation d'un produit biologique préalablement congelé a les avantages suivants par rapport à la déshydratation à partir de l'état liquide:

Phénomènes de dénaturation réduits, parce que l'extraction de l'eau n'entraîne pas une concentration progressive des solutés à cause d'une structure qui reste intacte durant le procédé. La faible humidité résiduelle est une condition nécessaire pour la stabilité aux températures ambiantes. Cette humidité peut être atteinte aussi grâce à la structure poreuse créée durant la lyophilisation.

Reconstitution aisée, le produit lyophilisé peut être reconstitué d'une façon très rapide et complète (Meda et Ratti, 2005). Ceci est la conséquence de l'état non dénaturé du produit et de la texture poreuse du lyophilisat.

Fixation, parce que la déshydratation à partir de l'état liquide ne peut pas être réalisée de façon instantanée.

Malgré tous les avantages de ce procédé, la lyophilisation est une opération longue et très coûteuse (Ratti, 2001), quatre à huit fois plus que le séchage conventionnel à l'air chaud à cause du vide appliqué durant très longtemps.

1.2.2.1. Taux de survie des bactéries lactiques à la lyophilisation

Rybka et Kailasapathy (1995) ont trouvé que certaines souches de probiotiques ont une meilleure capacité à survivre au procédé de lyophilisation, ce qui peut s'expliquer à partir des différentes géométries des microorganismes et aux variations dans la composition de la membrane cellulaire.

Les taux de survie des microorganismes à la lyophilisation sont très diversifiés. On peut trouver, par exemple dans le cas des lactobacilles, que les pourcentages de survie pendant la lyophilisation peuvent aller jusqu'à 80% (Palmfeldt et Hahn-Hägerdal, 2000) tandis que pour les bifidobactéries, ils sont plutôt faibles environ 10% (Maitrot *et al.*, 1997).

1.2.2.2. Dommages des microorganismes au cours de la congélation

L'une des plus importantes conditions extérieures affectant le taux de survie des microorganismes pendant la congélation est probablement le taux de refroidissement. Ainsi, le taux de survie varie avec les différents taux de refroidissement. En général, plus la vitesse de refroidissement est élevée, plus la possibilité de formation de glace intracellulaire est élevée aussi. Par contre, un faible taux de refroidissement produit la congélation extracellulaire. Les cellules congelées rapidement ont généralement un taux de survie plus faible que celles congelées lentement. On peut donc supposer que la formation de cristaux de glace intracellulaire est l'une des principales causes des blessures pendant la congélation des micro-organismes (Nei, 1964).

Dumont *et al.* (2003) ont vérifié ce phénomène en utilisant différentes vitesses de congélation pour le *Saccharomyces cerevisiae* et ils ont validé que la vitesse de congélation a une incidence

sur le stress thermique que subissent les cellules. L'étude a été faite à quatre vitesses d'abaissement des températures. Des vitesses très basses (inférieures à 5°C/min) ont entraîné une mortalité cellulaire élevée. À des vitesses basses (entre 5 et 10°C/min), l'échappement d'eau cellulaire se fait lentement et n'entraîne pas de dommage. Les vitesses rapides (entre 100 et 2000°C/min) sont caractérisées par des refroidissements induisant une compétition entre la sortie de chaleur et celle de l'eau de la cellule. Dans ce cas-ci, la sortie massive d'eau combinée à l'augmentation de la pression osmotique extracellulaire et à la transition de phase des lipides de la membrane, peut occasionner la mortalité des cellules. Les vitesses ultrarapides (supérieures à 5000°C/min) occasionnent des hauts taux de perte de chaleur. Il est supposé dans ce dernier cas que la vitrification ou la cristallisation précède et empêche la perte d'eau permettant ainsi de préserver une viabilité élevée.

La vitesse de congélation optimale varie grandement en fonction du type de cellules (Mazur, 1970). Pour les bactéries lactiques, cette vitesse ne semble pas avoir été établie de façon précise mais certaines études suggèrent des valeurs autour de 150°C/min en congelant dans l'azote liquide (Baumann et Reinbold, 1966; Gibson *et al.*, 1966; Petterson, 1975).

1.2.2.3. Dommages des microorganismes au cours de la dessiccation

Les mécanismes des dommages causés aux cellules par la déshydratation sont encore de nature très incertaine. Les transitions de phase affectant les phospholipides des structures membranaires à cause de la transformation et de la dénaturation des protéines, semblent être les causes les plus probables. La désorganisation de ces structures entraînerait des altérations de perméabilité (mises en évidence, en particulier pour les lactobacilles) ainsi que des perturbations du fonctionnement des enzymes associées aux membranes (Simatos *et al.*, 1994).

1.2.2.4. Causes de la faible viabilité des microorganismes après lyophilisation

Les principaux facteurs responsables de la faible viabilité des certains microorganismes suite à une lyophilisation sont probablement liés à la formation de cristaux de glace entraînant une

osmolarité élevée : celle-ci serait responsable des dommages aux membranes cellulaires, en provoquant une dénaturation par déshydratation des molécules hydrophiles dans les cellules (Zayed et Ross 2004; Thammavongs *et al.*, 1996). L'important changement de pH du liquide qui reste non congelé (parmi les cristaux de glace) pendant la lyophilisation est une autre cause du dommage aux microorganismes. Ce changement est associé à l'« hydrolyse de cristallisation » laquelle se produit lorsque les cristaux de glace capturent des ions positifs et négatifs de manière différente. Ceci génère un champ électrique à l'intérieure des cristaux de glace et produit de cette façon le changement de pH de la fraction liquide non congelée parmi les cristaux de glace (Bronshtein, 2004).

1.2.3. Facteurs liés à la survie des microorganismes lyophilisés

1.2.3.1. Milieu de croissance

Les stress des cellules vécus pendant la phase de croissance sont additionnés aux dommages postérieurs produits par des opérations telles que la concentration, la congélation et le séchage (Champagne *et al.*, 1991). Champagne *et al.* (1991) ont montré que la préparation des cellules pour la lyophilisation doit être faite aux conditions optimales de croissance des microorganismes, en supposant que ces conditions-là seront aussi les meilleures pour la survie à la lyophilisation. Cependant, des facteurs comme la *température*, le *potentiel redox*, le *pH* et le *type d'alcali* des milieux de croissance peuvent aussi avoir un effet sur les cultures lyophilisées.

Carvalho *et al.* (2003) ont évalué l'impact de trois milieux de croissance (MRS, M17 et Lee) sur la survie à la lyophilisation de six souches d'*Enterococcus faecalis* et deux d'*E. durans* au cours de leur entreposage subsequent. Ils ont trouvé que le taux de survie le plus élevé pendant l'entreposage d'*E. durans* a été obtenu avec ces microorganismes cultivés dans du MRS. Cependant, pour l'*E. faecalis* les meilleures survies ont été obtenues avec le milieu M17. Pour sa part, Bozoglu *et al.* (1987) ont montré que les taux de survie à la lyophilisation de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* cultivés dans deux milieux différents (avec deux pH différents), étaient meilleur pour les milieux à pH 6.0 que ceux ayant un pH 6.5. Par rapport à la

température, Champagne *et al.* (1991) affirment que la croissance de bactéries lactiques à une température 10°C plus basse que celle du taux de croissance optimal serait préférable pour la production de cellules à lyophiliser.

La composition des milieux de croissance a un effet important dans la survie des microorganismes aux opérations de séchage. Carvalho *et al.* (2004a) ont montré que l'addition de mannose au milieu de croissance de *L. bulgaricus* entraîne une mortalité moindre à la lyophilisation que les milieux additionnés de glucose, de fructose ou de lactose. Par contre, la concentration des milieux ne semble pas avoir un effet significatif sur l'activité des microorganismes après le séchage. Dans le travail fait par Linders *et al.* (1997), il a été montré que la viabilité résiduelle après le séchage de *Lactobacillus plantarum* était la même dans du MRS enrichi que dans du MRS dilué. C'était plutôt la présence de sel, de bétaïne et de carnitine dans les milieux qui a surtout influencé la survie.

Le mannitol et d'autres métabolites pourraient résulter de la fermentation de sucres spécifiques et ainsi, être responsables des meilleures survies pendant l'entreposage des bactéries lactiques lyophilisées (Carvalho *et al.*, 2004b). Kets *et al.* (1996a), par exemple, ont démontré qu'avec *Pseudomonas putida* soumise à un stress osmotique, le mannitol s'accumulait quand on utilisait du sucrose au lieu du sel pour diminuer l'activité d'eau du milieu. Aussi, ils ont observé que les quantités de mannitol changeaient lorsque le sucrose était remplacé par d'autres substances comme le fructose, le succinate ou le lactate.

1.2.3.2. Agents protecteurs

L'utilisation d'agents protecteurs permet de stabiliser les microorganismes pendant la lyophilisation et l'entreposage (Zayed et Ross, 2004). Un bon agent protecteur a comme fonctions les suivantes: a) assurer une protection aux cellules pendant la congélation, b) sécher facilement, c) fournir une matrice stable et d) faciliter la réhydratation. Plusieurs substances ont été utilisées comme agents protecteurs. Champagne *et al.* (1991) rapportent que les polyalcools, les polysaccharides, les disaccharides, les acides aminés et les hydrolysats des protéines, les protéines, les minéraux, les sels d'acides organiques et les milieux complexes de vitamines ont

été déjà testés comme agents protecteurs. Le rôle des agents protecteurs s'explique de plusieurs manières (Simatos *et al.*, 1974) : ils diminuent les vitesses de nucléation des cristaux de glace, ils diluent les électrolytes, ils protègent mécaniquement les parois cellulaires et ils réduisent la formation de liaisons intermoléculaires.

Le lait écrémé est une des substances les plus utilisées comme cryoprotecteur dans la lyophilisation, en particulier par sa facilité de déshydratation. Vu que le séchage endommage les protéines de la paroi cellulaire des microorganismes, il a été suggéré que les protéines du lait fourniraient une couche protectrice aux cellules pour éviter ces dommages (Champagne *et al.*, 1991).

Lorsqu'on parle d'agents protecteurs dans le séchage de microorganismes, le tréhalose a une place importante grâce à sa capacité d'augmenter la viabilité des microorganismes. Il a été trouvé que le tréhalose est un bon protecteur pour la conservation de bactéries lactiques pendant la lyophilisation et le séchage sous vide (Conrad *et al.*, 2000). Une explication à cette caractéristique du tréhalose est sa température de transition vitreuse élevée qui permettrait d'augmenter la stabilité thermique des produits. Le tréhalose stimule ainsi la formation de solides amorphes et réduit la formation de glace, laquelle peut endommager les protéines et les cellules (Conrad *et al.*, 2000).

Leslie *et al.* (1995) ont observé que *Escherichia coli* et *Bacillus thuringiensis* ont une tolérance accrue à la lyophilisation quand ils sont séchés en présence de tréhalose : 70% pour *E. coli* et 57% pour *B. thuringiensis* en comparaison à 56 et 44%, respectivement, en présence de sucrose.

1.2.3.3. Entreposage

Il existe plusieurs facteurs qui affectent la stabilité des microorganismes lyophilisés pendant l'entreposage, tels que la température d'entreposage, la température de transition vitreuse de l'agent protecteur, l'humidité résiduelle, le pH des agents protecteurs dans la solution à lyophiliser et la présence d'excipients stabilisateurs ou de contaminants (Wang, 2000).

Bozoglu *et al.* (1987), dans leur travail sur la cinétique de survie de bactéries lactiques pendant et après lyophilisation, ont montré que sous des conditions favorables, le pourcentage d'organismes qui meurent pendant la lyophilisation est généralement supérieur au pourcentage de ceux qui meurent au cours du stockage. Le pourcentage de cellules survivantes à la lyophilisation est, en général, un indice de la survie qui peut être attendue pendant le stockage ultérieur, mais, malheureusement, les deux propriétés ne sont pas toujours reliées.

La dénaturation des protéines à l'intérieur des cellules est la principale cause de la mortalité pendant l'entreposage. L'addition de polymères aux agents protecteurs augmente la stabilité (Champagne *et al.*, 1996) car il y a une interaction entre les groupes carboxyles des protéines du microorganisme et les groupes amines de l'agent (Morange, 1970).

Une augmentation dans la température d'entreposage des microorganismes lyophilisés, entraîne une augmentation aussi de leur mortalité. Costa *et al.* (2002) observent que quand l'entreposage de cellules de *P. agglomerans* est fait sous vide dans des sacs de plastique de haute barrière, les pertes de viabilité étaient 0.5 log après 90 jours d'entreposage à 4°C, tandis qu'une perte de 3 log a été montrée au terme de 28 jours d'entreposage à 25°C.

Champagne *et al.* (1996) confirment l'effet de la température d'entreposage sur la viabilité en montrant que les pertes de comptes viables pour *B. longum* à 20°C étaient d'approximativement 100 fois plus grandes qu'à 4°C. La température à laquelle une souche commence à montrer mortalité est spécifique à chaque souche.

Saxelin *et al.* (1999) dans leur travail sur les probiotiques, ont démontré que toutes les souches lyophilisées ont bien toléré l'entreposage à 25°C pendant deux semaines et quelques unes même des périodes de six mois. Par ailleurs, toutes les souches lyophilisées ont pu être entreposées à -18°C pendant une période d'un an et, quelques unes à 5°C, sans avoir une perte de viabilité significative. Ceci confirme que la lyophilisation est une bonne méthode pour l'entreposage de probiotiques pour des longues périodes.

Il y a une relation entre l'humidité résiduelle et la survie des microorganismes pendant la période d'entreposage. Ainsi, Nagawa *et al.* (1988) ont stocké une poudre lyophilisée de *Bifidobacterium*

avec un pourcentage d'humidité entre 2.5 et 5.2% pendant 30 jours à 35°C. Ils ont observé que la stabilité des poudres entre 2.5 et 3.3 % d'humidité était la même, alors que des valeurs supérieures à 3.8% montraient une diminution de la viabilité en comparaison les poudres d'humidité plus basse.

La température de transition vitreuse des poudres de microorganismes lyophilisés est un autre élément qui affecte la viabilité et la teneur en eau devient une variable clé (Santivarangkna, 2007). Certaines substances sont capables d'augmenter la température de transition vitreuse, donc, la viabilité lors d'entreposage. Conrad *et al.* (2000) ont étudié l'effet des protecteurs à base de tréhalose sur la survie de *Lactobacillus acidophilus* entreposé à 37°C et ils l'ont trouvé un agent stabilisateur très effectif.

Les gaz d'entreposage ont aussi un effet sur la viabilité des microorganismes. Les préparations sèches de virus ont été plus stables lorsque scellées sous hélium ou hydrogène en comparaison de celles scellées sous vide (témoins). Le scellage sous vide est meilleur que le scellage sous argon, azote, oxygène ou dioxyde de carbone. L'hélium et l'hydrogène sont des molécules de petites tailles, elles peuvent pénétrer dans la poudre lyophilisée (très poreuse) plus rapidement et ainsi augmenter la probabilité d'enlever les molécules d'oxygène non désirés des produits lyophilisés (Champagne *et al.*, 1991).

La lumière en combinaison avec l'air a un effet négatif sur la stabilité mais augmente la mort de microorganismes comme *E. coli*. (Israeli *et al.*, 1993). Ces chercheurs affirment que la cause de la mortalité est associée avec un site membranaire impliqué dans la synthèse de l'ADN. Ce site devient exposé et sensible à la lumière et à l'oxygène à cause de la transition de phase membranaire.

1.2.3.4. D'autres facteurs

D'autres facteurs comme la morphologie et la taille des microorganismes ont un effet important dans leur viabilité face aux procédés de séchage. Bozoglu *et al.* (1987) ont trouvé que le

Streptococcus thermophilus avec une forme sphérique, était plus résistant à la lyophilisation que le *Lactobacillus bulgaricus* qui a une forme de bâtonnet. Ils affirment que la probabilité de mort d'un microorganisme est proportionnel à l'aire exposée au milieu externe, d'après l'équation :

$$P = \rho_s S \quad (2)$$

où P est la probabilité de mort de l'organisme, S est l'aire du microorganisme exposée au milieu externe et ρ_s correspond à la probabilité de dommages qui se produisent sur la paroi cellulaire.

Les cellules larges comme les protozoaires ont généralement plus de difficulté à supporter la congélation, probablement parce qu'elles ont plus d'eau intracellulaire et ceci les rend plus susceptibles à des dommages cellulaires. Cependant, ces cellules complexes ont aussi des mécanismes de réparation plus performants. Lorsque le dommage survient, elles sont mieux équipées pour se recouvrir. Par ailleurs, les cellules plus petites et moins complexes comme les bactéries, peuvent être plus résistantes à la congélation et à la lyophilisation, mais lorsque le dommage survient, elles sont moins capables de se réparer (ATCC, 1991).

Le type de Gram des microorganismes a un effet aussi sur la survie : les bactéries à Gram positif résistent mieux la lyophilisation que les bactéries à Gram négatif (Miyamoto *et al.*, 2000) parce que leurs parois cellulaires sont moins fragiles.

L'âge d'une culture peut affecter la capacité de survie des microorganismes à la lyophilisation. Les cultures qui sont trop jeunes ou très vieilles sont moins résistantes aux stress générés par les basses températures et généralement, les microorganismes qui sont lyophilisés à la fin de la phase log ou au début de la phase stationnaire sont ceux qui ont les plus grandes chances de survie (ATCC, 1991).

Même si diverses souches de microorganismes appartiennent à une même espèce, leur comportement peut être différent pendant une opération de séchage sous des conditions identiques. Lian *et al.* (2002) ont étudié les taux de survie au séchage par atomisation de cinq souches de bifidobactéries (*Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, *B. infantis* CCRC14661, *B. longum* ATCC 15708, *B. longum* CCRC 14634 and *B. longum* B6) en utilisant les mêmes milieux

et ils ont démontré que la viabilité après le séchage par atomisation varie avec la souche. Pour un milieu avec 10% de gomme arabique, ils ont trouvé un taux de survie de 26.19% pour *B. longum* ATCC 15708, 30.95% pour *B. longum* CCRC 14634 et de 63.74% pour *B. longum* B6.

1.2.4. Autres procédés de séchage de bactéries lactiques

Même si la lyophilisation est le procédé le plus utilisé pour la conservation des bactéries, il y a d'autres méthodes de déshydratation disponibles qui méritent d'être considérées. D'après la température de séchage, ces traitements peuvent être classifiés en procédés qui utilisent de hautes températures (tel que le séchage par atomisation) et les procédés qui utilisent des températures modérées (tel que le séchage en lit fluidisé et le séchage sous vide).

Le séchage par **atomisation** produit une poudre sèche par la conversion d'un liquide en fines gouttelettes suivi de leur contact direct à haute vitesse avec un courant d'air chaud (150-200°C). Les gouttes atomisées ont une grande surface par rapport au volume car elles sont très nombreuses avec une taille microscopique (10-200µm), ce qui raccourcit le temps de séchage dans la chambre de déshydratation (Santivarangkna *et al.*, 2007). Corcoran *et al.* (2004) affirment que le séchage par atomisation est un processus économique pour la préparation de microorganismes viables à une échelle industrielle. Cette opération offre des taux de production élevés et normalement, les coûts sont bas. En plus, cette méthode est utilisée pour préparer produits alimentaires secs stables, et occupant peu d'espace.

Le séchage par atomisation a été utilisé pour la production des bactériocines à travers du séchage de bactéries lactiques (Silva *et al.*, 2002). Dans ce travail, le séchage par atomisation s'est avéré utile pour produire des poudres avec des microorganismes viables ayant une activité antagoniste contre les pathogènes. Cependant, ceci ne peut pas être généralisé pour tous les microorganismes. Les bactéries lactiques et les bifidobactéries, par ailleurs, montrent un taux de survie plus élevé après un traitement de lyophilisation qu'après le séchage par atomisation. Wang *et al.* (2004) dans son travail sur la viabilité de ces bactéries dans un lait de soja fermenté, obtient des valeurs de survie de 46.2-75.1% et 43.2-51.9% pour la lyophilisation de bactéries lactiques et bifidobactéries, respectivement, tandis que pour le séchage par atomisation, ces valeurs sont

notamment plus basses : 16,2% (bactéries lactiques) et 23.1% (bifidobactéries). Aussi, lorsqu'on examine le taux de survie après l'entreposage pendant quatre mois des poudres résultant des deux traitements, les valeurs pour les microorganismes lyophilisés sont supérieures à ceux des microorganismes séchés par atomisation: 51.1% et 68.8% pour *S. thermophilus* et *B. longum*, respectivement dans le cas de la lyophilisation, versus 29.5% et 57.7% pour le séchage par atomisation. Les taux de survie des microorganismes au séchage par atomisation varient selon la souche (Gardiner *et al.*, 2000) et d'autres facteurs comme la thermo résistance. Les *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus salivarius* survivent au procédé, mais seulement sous certaines conditions de température et d'humidité à la sortie du traitement.

Avec certains microorganismes comme le *Penicillium oxalicum*, il est possible d'obtenir des viabilités de 100%, en utilisant la lyophilisation et le séchage en lit fluidisé avec composés cryoprotecteurs (lait écrémé, Tween, peptone et sucrose), mais par contre lorsqu'on utilise le traitement de séchage par atomisation, les viabilités sont de 20% (Larena *et al.*, 2003).

Un **lit fluidisé** est une suspension de particules solides dans un courant d'air ou de gaz qui passe à un taux suffisamment élevé pour les fluidiser. Les particules sont suspendues librement dans le gaz et déshydratées à la fois, grâce aux transferts améliorés de chaleur et de masse dans le courant d'air (Santivarangkna *et al.*, 2007). Dans le domaine du séchage des microorganismes, le lit fluidisé a été adopté pour la déshydratation de *Saccharomyces cerevisiae* par Bayrock et Ingledew (1997a) qui ont démontré que le type de chaleur utilisée dans le traitement (chaleur humide ou chaleur sèche) n'a pas d'influence sur la viabilité de la levure face au séchage. Bien que la chaleur ait une influence sur le taux de déshydratation, c'est la déshydratation (et pas la chaleur humide, la chaleur sèche ou l'oxydation) qui entraîne des pertes de viabilité des cellules de levure au cours du traitement. D'autre part, les viabilités des levures ne semblent pas être affectées de façon importante au cours du réchauffement initial ni durant les périodes de séchage à taux constant (> 15% d'humidité) à n'importe quelle température de séchage; ainsi, on peut dire que les viabilités sont stables à une température donnée peu importe la durée du séchage. Dans les expériences classiques de mort thermique, on ne devrait pas trouver ce phénomène de stabilisation à moins que le microorganisme soit capable de produire des spores résistantes à la chaleur. Comme *Saccharomyces cerevisiae* ne produit pas de spores sous les conditions

expérimentales utilisées, d'autres raisons (la formation de croûte, par exemple) doivent protéger la levure des pertes de viabilité (Bayrock et Ingledew, 1997b). Les résultats de Bayrock et Ingledew (1997a) suggèrent que des facteurs autres que la destruction thermique influencent la viabilité au cours de séchage en lit fluidisé.

Le **séchage sous vide** est souhaitable pour le traitement de matériaux qui sont sensibles à la chaleur. Dans ce procédé, l'humidité peut être retirée à des températures basses grâce au vide. Par ailleurs, il y a une diminution des réactions d'oxydation pour les bactéries sensibles à l'oxygène (Santivarangkna *et al.*, 2007). Il n'y a pas beaucoup d'études sur le séchage sous vide de bactéries lactiques. King et Su (1993) ont comparé la lyophilisation à ce procédé et ont confirmé que la lyophilisation donne des meilleurs taux de survie pour le *Lactobacillus acidophilus* peu importe l'agent protecteur utilisé. Ils signalent, cependant, que la déshydratation sous vide réduit le temps de séchage par rapport à la lyophilisation.

Lorsque les microorganismes sont sensibles aux méthodes comme la lyophilisation ou encore la congélation, il existe une méthode de **séchage liquide** (liquid-drying ou L-drying) où les échantillons sont séchés directement sous forme liquide sans congélation (Annear, 1956; Banno et Sakane, 1979). La méthode utilise le charbon activé comme support pour la conservation à long terme de microorganismes. Dans cette méthode, les gouttes de suspensions cellulaires sont séchées sous un faible vide sur des disques minces de charbon activé contenant du lait écrémé et des agents de protection efficaces (Malik, 1990). Dans son travail, toutes les cultures testées ont montré une bonne viabilité pendant une période de un à deux ans d'entreposage sans mutation et sans pertes de qualité.

1.2.5 Coûts des différents procédés de préservation

La lyophilisation est, par ses caractéristiques particulières, le procédé industriel de choix pour la conservation des bactéries sous forme de poudre. Cependant, c'est un procédé lent et beaucoup plus cher que d'autres méthodes de déshydratation. Le Tableau 1 montre, par exemple, une comparaison des coûts fixes et d'opération de la lyophilisation par rapport à d'autres méthodes de déshydratation des cultures de bactéries lactiques (Santivarangkna *et al.*, 2007). Tel qu'on peut

l'observer à partir de cette information, la lyophilisation coûte le double du séchage sous vide et 6 à 8 fois plus que le séchage par atomisation.

Tableau 1. Comparaison des coûts fixes et d'opération des différentes méthodes de déshydratation des bactéries lactiques (Santivarangkna *et al.*, 2007)

Procédé de séchage	Coût Fixe (%)	Coût d'opération (%)
Lyophilisation	100.0	100.0
Sous vide	52.2	51.6
Par atomisation	12.0	20.0
Tambour	9.3	24.1
Lit fluidisé	8.8	17.9
Air chaud	5.3	17.9

Ainsi, plusieurs essais scientifiques ont été réalisés au monde et de nouvelles recherches sont en cours afin de développer des méthodes alternatives à la lyophilisation, donnant des cultures bactériennes déshydratées de bonne qualité mais utilisant des procédés plus performants (moins chers et plus rapides).

1.3. Les mousses

1.3.1. Définition et caractéristiques

Une mousse peut être définie comme un système à deux phases dans lequel des bulles de gaz sont entourées par une phase liquide lamellaire. Une conséquence de cette dispersion est la grande interface gaz-liquide. Comme l'interface entre les phases non-miscibles est sous tension, l'expansion de ces interfaces a besoin d'énergie, c'est-à-dire du travail est requis pour leur formation, et de l'énergie est libérée dans leur relaxation, et pour cette raison, les mousses sont très instables (German *et al.*, 1985).

La « qualité » d'une mousse est caractérisée par la fraction de volume de gaz et par sa stabilité. La fraction volumétrique de gaz est normalement très élevée et elle peut excéder la « concentration d'emballage » (« packing concentration » en anglais) d'une suspension concentrée de sphères. Pour ce type de mousses (appelées mousses « sèches » par opposition aux mousses « humides » où la fraction du volume de la phase liquide en suspension est élevée), les bulles ne sont pas si sphériques mais elles deviennent des bulles polyédriques séparées par de fines films liquides. La phase liquide fait partie des films minces et des « frontières Plateau » dans les intersections des bulles polyédriques. Les mousses sont considérées comme une phase continue seulement si la taille des bulles est petite par rapport à la taille de l'échantillon (Herzhaft, 1999).

Quant à la stabilité des mousses, elle est influencée par les propriétés physiques et rhéologiques de l'interface et la phase continue. Des facteurs comme le drainage, la rupture du film et les bulles disproportionnées affectent la stabilité des mousses. La capacité moussante et la stabilité de la mousse sont améliorées par l'adsorption des molécules tensioactives à l'interface (Raharitsifa *et al.*, 2006). Ces agents tensio-actifs forment une couche dense autour des bulles en réduisant ainsi, la tension de surface et l'instabilité (Carp *et al.*, 1997; Karim et Wai 1999a; Sagis *et al.*, 2001; Thakur *et al.*, 2003).

1.3.2. Les agents moussants

Un liquide pur ne peut donner des mousses stables et il est nécessaire, mais pas suffisant, d'avoir un deuxième composé pour sa formation (Malysa, 1992). Les propriétés des mousses dépendent de facteurs tels que la composition de la solution, le type d'espèces tensioactives, la quantité de surfactants utilisés, la contamination et les conditions de formation des mousses (Malysa, 1992).

Un agent moussant est un surfactant qui est adsorbé à l'interface gaz-liquide et qui lorsque présent en petites quantités, facilite la formation d'une mousse ou améliore sa stabilité colloïdale en inhibant la coalescence des bulles (Rajeev *et al.*, 2003). Les agents moussants naturels incluent les lécithines, les protéines, les saponines. Ce sont des substances (comme le savon et les surfactants synthétiques), avec lesquelles l'eau produit une mousse quand elles sont remuées ou bouillies (Pilpel, 1985). La caractéristique commune des agents moussants est que leurs

molécules comprennent deux parties : l'une qui contient des groupes avec affinité pour l'eau, appelée hydrophile, et l'autre de nature huileuse appelée hydrophobe (Pilpel, 1985). Dickinson et Stainsby (1982) affirment que les protéines d'œuf et de lait sont des agents moussants connus grâce à leur capacité de former des films épais d'une résistance mécanique considérable qui augmente la durée de vie des mousses. Les protéines jouent un rôle complexe dans les mousses, car elles agissent en même temps comme des agents moussants et des émulsifiants (Rajeev *et al.*, 2003).

Lorsque les agents moussants sont ajoutés aux solutions aqueuses, les molécules s'arrangent elles-mêmes pour minimiser la surface de contact entre elles et l'eau. Ceci est possible en formant des micelles dans la majeure partie du liquide ou en formant une couche d'une ou quelques molécules d'épaisseur à l'interface gaz-liquide avec les têtes hydrophiles orientées vers l'eau et les queues orientées vers l'air (Figure 2) (Pilpel, 1985).

1.3.3. Méthodes de formation de mousses

Les mousses sont des systèmes colloïdaux à deux phases, c'est pourquoi elles peuvent être produites par des méthodes de dispersion ou d'expansion (Malysa, 1992). Dans les méthodes de **dispersion**, la future phase discontinue est initialement présente comme un gros volume de gaz. La génération de la mousse résulte du mélange du gaz et de la solution avec une contribution d'énergie telle que l'agitation ou le fouettement.

Dans les méthodes **d'expansion**, la future phase dispersée est initialement présente comme un soluté, c'est-à-dire, qui se trouve sous la forme de molécules dissoutes dans le liquide. Les propriétés de l'ensemble du système sont modifiées de telle manière que la solution devient sursaturée de gaz. Le gaz peut être produit de façon chimique, microbiologique ou en réduisant la pression.

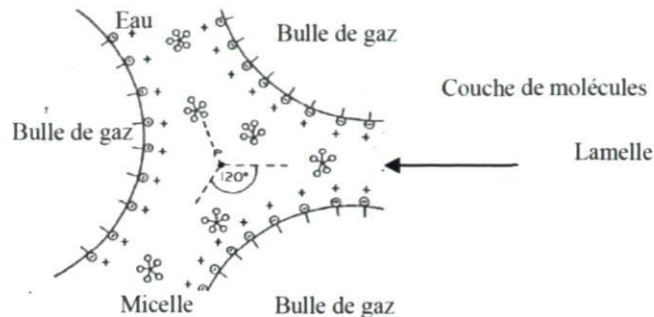


Figure 2. Schéma montrant trois bulles formant une mousse. Adapté de Pilpel (1985).

1.3.4. Les bactéries et les mousses

1.3.4.1. Hydrophobicité de la membrane cellulaire

La membrane cellulaire des bactéries est une membrane semi-perméable contenant une bicouche de phospholipides avec des protéines insérées (Figure 3).

Les phospholipides sont des lipides amphipathiques, c'est-à-dire, des lipides ayant une tête polaire hydrophile (phosphates chargés négativement) orientée vers l'extérieur de la membrane et une queue hydrophobe constituée d'acides gras.

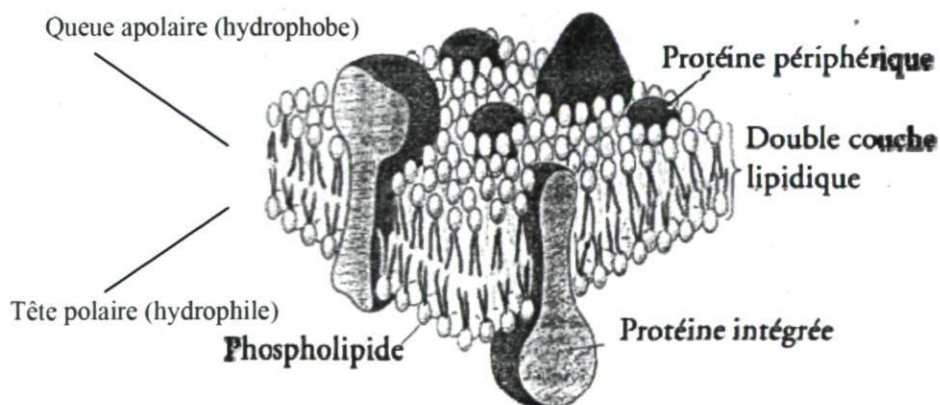


Figure 3. Représentation schématique d'une membrane

1.3.4.2. Affinité des bactéries pour les mousses

L'affinité des bactéries pour les mousses a déjà été étudiée et mise à profit dans des procédés de séparation par flottation (Boyles et Lincoln, 1958; Rubin, 1968; Bretz *et al.*, 1966). La **flottation** est un procédé de séparation de solides très fins les uns des autres (Gaudin, 1957). Dans ce procédé, la séparation des particules en considération se fait quand les particules d'un type s'adhèrent aux bulles de gaz et sont transportées à la surface du liquide comme une mousse, tandis que les particules de l'autre type restent en suspension (Gaudin *et al.*, 1959). Cette séparation est basée sur les propriétés d'hydrophobicité et d'hydrophilicité des phases.

Pour qu'une particule flotte accroche à une bulle, sa surface doit être hydrophobe (Dahlback *et al.*, 1981; Leja, 1982), ce qui peut être obtenu, si nécessaire, par l'ajout d'agents surfactants.

Les cellules hydrophobes ainsi que les bulles de gaz, sont entourées par une microcouche de molécules d'eau qui est rigide et mieux organisée que le reste de l'eau d'une solution. Lorsqu'une cellule adhère à une bulle dans la mousse, il y a une diminution du nombre total des molécules d'eau qui les entourent, donc, une augmentation de l'entropie. Il y a, par conséquent, un avantage thermodynamique pour les cellules hydrophobes en comparaison des particules hydrophiles, à être adsorbées par les bulles. Cet avantage est reflété dans l'accumulation des cellules hydrophobes à l'interface liquide-gaz (Dahlback *et al.*, 1981). La partie extérieure de la surface des microcouches est surtout occupée par des substances hydrophobes comme les lipides, les protéines et les polysaccharides (McIntyre, 1974). Norkrans, (1977) a montré que la couche formée par ces molécules influence grandement l'accumulation de bactéries.

Dognon (1941) a utilisé ce procédé pour séparer des cellules bactériennes des solutions salines. Hopper et McCowen (1952) ont fait une purification de l'eau superficielle en séparant la majorité de solides y compris 99% des bactéries et tous les kystes d'*Entamoeba histolytica*. Dans la culture à grande échelle, la flottation a été utilisée pour concentrer des cultures à l'état mature (Cook, 1950).

Boyles et Lincoln (1958) décrivent une méthode sélective pour séparer et concentrer des spores et des cellules végétatives à partir d'un milieu de culture par flottation au moyen de mousses. Ils

ont collecté avec succès des cellules de *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* et *Serratia marcescens* grâce à leur hydrophobicité qui les a repoussées dans la mousse. Bretz (1966) décrit la séparation d'*E. coli* de l'eau en utilisant la séparation par mousse avec de l'azote et un surfactant de bromure d'éthylhexadécyldiméthylammonium.

Des recherches sur les propriétés de surface des microorganismes dans la flottation, montrent que ces cellules sont très hydrophobes (Mozes et Rouxhet, 1987). L'analyse microscopique des mousses impliquées dans ce procédé présente normalement un grand nombre de microorganismes actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier, 1974), dont les bifidobactéries font partie (Sodell et Seviour., 1990).

Étant donné que les bactéries hydrophobes sont susceptibles de se réunir sur la surface air-liquide et s'attacher aux bulles d'air, elles sont considérées comme des particules stabilisatrices des mousses dans les usines de boues activées (Keisuke *et al.*, 2001).

1.3.5. Moussage comme prétraitement

Le séchage en tapis de mousse est un procédé par lequel un liquide ou semi-liquide est fouetté pour produire une mousse stable qui sera par la suite déshydratée par des apports thermiques (Brygidyr *et al.*, 1977). La technique de moussage comme traitement avant le séchage a été utilisée pour traiter des aliments liquides en visant une accélération dans le temps de séchage et une meilleure qualité des poudres obtenues (Karim et Wai, 1999b).

Cette technique a été utilisée dans le séchage de jus de fruits tels que le carambole (Karim et Wai, 1999b), le tamarin (Vernon-Carter *et al.*, 2001), la pomme (Raharitsifa *et al.*, 2006) et le mangue (Rajkumar *et al.*, 2007) ainsi que pour les bananes (Thuwapanichayanan *et al.*, 2008), la pâte de tomate (Brygidyr *et al.*, 1977; Lovric *et al.*, 1970) et pour les œufs (Satyanarayana Rao et Murali, 1989; Muthukumaran *et al.*, 2008).

Dans une mousse, la surface d'évaporation d'eau est augmentée grâce au grand nombre de bulles qui sont à l'intérieur. Le séchage rapide pourrait être dû au mouvement de l'eau par capillarité

dans les films liquides qui séparent les bulles dans la mousse. Le moussage rend la masse à sécher extrêmement poreuse (Berry *et al.*, 1965; Hart *et al.*, 1963; Morgan *et al.*, 1961; Venkataraman, 1996).

Les principaux avantages des techniques de séchage de mousses en comparaison des autres méthodes comme le séchage par atomisation ou le séchage à tambour sont l'utilisation de températures plus basses et la diminution du temps de séchage (Akintoye et Oguntunde, 1991; Karim et Wai, 1999a).

Quant à la lyophilisation par moussage, elle a été très peu étudiée. Raharitsifa (2008) a observé l'effet du moussage lors de la lyophilisation du jus de pomme. Il a conclu que dans les cas où l'épaisseur est la même, les mousses ont une plus grande vitesse de séchage que le jus sans moussage. Par ailleurs, son étude réalisée sur la courbe de lyophilisation des mousses et du jus sans moussage a permis de révéler que la variation du temps de sublimation en fonction de l'épaisseur n'est pas la même pour ces deux sortes de produits et qu'en augmentant l'épaisseur, la croissance du temps de sublimation est plus atténuée pour les mousses. Dans son travail, il détermine aussi que pendant l'entreposage, les produits lyophilisés en tapis de mousse ont présenté une stabilité thermique plus grande que les produits sans mousse.

L'autre travail concernant la lyophilisation par moussage est celui de Muthukumaran *et al.* (2008) qui ont déterminé le temps de séchage pour la lyophilisation par moussage du blanc d'œuf à travers un modèle simple de prédiction mathématique. Dans leur travail, ils ont trouvé que l'ajout de gomme xanthane (0.125% p/p) au blanc d'œuf durant le moussage conférait une stabilité suffisante à la mousse et donnait un résultat positif en réduisant le temps total de lyophilisation et en permettant d'obtenir une poudre de blanc d'œuf d'excellente qualité.

1.3.6. Séchage des microorganismes par moussage

Le moussage a été très peu étudié comme prétraitement dans le séchage de microorganismes. Annear (1958) a constaté que les solutions très visqueuses contenant des sucres ou des

aminoacides pouvaient être séchées par moussage en les appliquant du vacuum. Il a utilisé ce procédé pour conserver plusieurs espèces de bactéries.

Plus récemment, Bronshtein (2004) a créé la technologie VitriLife® pour la conservation (stabilisation) de bactéries sensibles, des virus, des produits biopharmaceutiques et des produits pharmaceutiques constitués de petites molécules hautement sensibles à la température. Le processus VitriLife® est également connu comme PFF (de l'anglais « preservation by foam formulation »). La PFF est une méthode de préservation de suspensions et de solutions biologiques sensibles en formant des mousses stables à partir de matières fluides qui seront séchées. Pendant la PFF, les solutions biologiques sont d'abord transformées en des mousses sèches, mécaniquement stables, par ébullition sous vide à température ambiante (séchage primaire). Deuxièmement, les échantillons sont soumis à un séchage de stabilité à des températures plus élevées pour augmenter la température de transition vitreuse. Autrement dit, une basse pression est appliquée aux solutions ou suspensions visqueuses de matériaux biologiquement actifs pour produire une solution ou une suspension moussante pendant l'ébullition, et l'enlèvement d'eau postérieur produit une mousse stable. Ces mousses sont facilement divisibles par pulvérisation ou d'autres techniques de séparation. Bronshtein (2004) considère cette technique comme une nouvelle alternative à la lyophilisation qui va stimuler le développement de nouveaux procédés et équipements pour la conservation de produits biologiques labiles à l'état sec.

La technique PFF a été utilisée avec succès pour la conservation des enzymes et des produits pharmaceutiques labiles comme l'amphotéricine, l'urokinase, la luciférase, β -galactosidase, la déshydrogénase lactique (LDH) et d'autres. Aussi, elle a été employée pour stabiliser des virus vivants de plusieurs groupes taxonomiques comme le virus de l'herpès, les paramyxovirus, flavivirus, parvovirus et rétrovirus. De même, la PFF est appliquée pour la conservation de bactéries à Gram positif (*Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) et à Gram négatif (*E. coli* et *Bordetella bronchiseptica*) avec une survie maximale de 40%.

La survie après la réhydratation des échantillons conservés est assurée par la sélection d'un agent protecteur approprié, la bonne sélection du vide et de la température de chauffe pendant le procédé.

Selon Bronshtein (1998), les agents protecteurs peuvent comprendre des glucides (y compris le sucrose entre autres), des polysaccharides, des polymères hydrosolubles, des peptides ou des protéines tant qu'ils renforcent la capacité du matériau biologiquement actif à résister au séchage et à l'entreposage et qu'ils n'interfèrent pas avec l'activité biologique.

D'après Bronshtein (2004), cette technique élimine les problèmes de la lyophilisation associés à la congélation (qui endommage les cellules), aux temps longs et, dans certains cas, à la basse température d'entreposage afin de garder la stabilité. Dans ses expériences, Bronshtein (2004) a montré que la conservation par formulation de mousses appropriées permet une stabilisation effective de matériaux biologiques à des températures élevées avec un minimum de perte d'activité pendant le séchage et l'entreposage ultérieur.

CHAPITRE 2

Hypothèse et objectifs de la recherche

Étant donné que la lyophilisation est un procédé à basse température pendant lequel l'activité de détérioration est diminuée, il a plusieurs avantages sur les autres procédés de séchage de microorganismes (Rovero *et al.*, 1991), dont les principaux sont la qualité du produit lyophilisé obtenu et la durée de vie élevée (Genin et René, 1995). Toutefois, parce que c'est un procédé se faisant sous vide et très lentement, il demeure un procédé coûteux; des techniques simples comme le moussage, utilisé en prétraitement, sont considérées comme une solution possible à ce problème.

Le séchage par moussage a été appliqué à certaines denrées alimentaires comme les œufs (Satyanarayana Rao et Murali, 1989), la pâte de tomate (Lovriæ *et al.*, 1970) et les jus de fruits (Hertzendorf et Moshy, 1970; Karim et Wai, 1999a; Vernon-Carter *et al.*, 2001). L'avantage de ce procédé est le raccourcissement du temps de séchage en raison de l'augmentation de la surface exposée qui favorise le transfert de matière, cela réduisant par conséquent les coûts d'énergie. En outre, l'affinité des microorganismes pour les mousses est un autre point considéré en même temps que le facteur coût dans la lyophilisation des probiotiques : ceci nous amène à proposer cette approche comme une alternative intéressante dans la conservation des organismes qui n'a jamais été étudiée à notre connaissance.

2.1. Hypothèse de la recherche

Le moussage utilisé comme prétraitement permettra de réduire le temps de lyophilisation et d'améliorer le taux de survie du *Bifidobacterium longum* RO 175 après la lyophilisation et pendant l'entreposage.

2.2. Objectif général

Évaluer le potentiel de la lyophilisation par moussage du *Bifidobacterium longum* RO 175 comme moyen d'augmenter sa viabilité et sa stabilité.

2.3. Objectifs spécifiques

1. Évaluer l'effet du moussage sur la cinétique de lyophilisation du *Bifidobacterium longum*, RO 175.
2. Étudier l'effet du moussage sur le taux de survie de *Bifidobacterium longum* RO175 après la lyophilisation et pendant l'entreposage à 4°C et 25°C.

CHAPITRE 3

Foam-mat freeze-drying of *Bifidobacterium longum* RO 175: viability and storage stability

Danilo Izquierdo-López, Jacques Goulet* and Cristina Ratti

*Département des sols et génie agroalimentaire
(*Département des sciences des aliments et de nutrition
Université Laval, Québec, Canada*

3.1. Résumé

Le moussage a été utilisé comme prétraitement avant la lyophilisation de *Bifidobacterium longum* RO175 pour étudier son impact sur l'accélération du taux de séchage ainsi que sur la viabilité des microorganismes après le procédé. Une étude sur la survie de cette bactérie dans des produits lyophilisés moussés et non-moussés entreposés à différentes températures a complété cette étude. Les cultures de *Bifidobacterium longum* RO175 prétraitées avec des agents protecteurs moussés (LEST et lait écrémé) peuvent être lyophilisées respectivement dans 1/4 à 1/7 du temps employé pour les agents protecteurs non-moussés, et avec une viabilité plus élevée après la lyophilisation. Toutefois, la densité réduite des mousses entraîne une diminution de la charge du lyophilisateur, laquelle a seulement été compensée pour l'agent protecteur LEST qui a permis de raccourcir suffisamment le temps de séchage en maintenant l'efficacité de l'opération de lyophilisation. Les agents protecteurs moussés ont donné une viabilité plus élevée immédiatement après la lyophilisation (13.66% pour la mousse de LEST et 13.64% pour la mousse de lait écrémé).

L'entreposage entraîne une réduction de la viabilité du *Bifidobacterium longum* RO175 de tous les agents protecteurs utilisés (moussés et non-moussés). Durant l'entreposage du *Bifidobacterium longum* RO175 on a trouvé que l'humidité résiduelle des échantillons et la température d'entreposage ont un impact important sur les taux de survie.

Mots-clés: lyophilisation, moussage, *Bifidobacterium longum* RO175, probiotiques.

3.2. Abstract

Foaming as a pretreatment was used prior to freeze-drying of *Bifidobacterium longum* RO175 to investigate the potential acceleration of the drying rate as well as the increase in microorganism viability after the process. A study on storage of foamed and non-foamed freeze-dried products at different temperatures completed this study.

Bifidobacterium longum RO175 in foamed medium (LEST and skim milk) could be freeze-dried in 1/4 to 1/7 of the time required for non-foamed solutions, respectively, and with higher viability after the process. However, reduced density of foamed materials leads to a decreased dryer load, which was only compensated for LEST medium by a shorter drying time to maintain the dryer throughput. Foamed suspensions presented a higher viability immediately after freeze-drying (13.66% for foamed LEST and 13.64% for foamed skim milk).

Storage leads to a reduction in *Bifidobacterium longum* RO175 viability for all tested protective agents (foamed and non-foamed). Storage temperature and residual moisture content have an important impact on *Bifidobacterium longum* viability.

Keywords: freeze-drying, foam-mat, *Bifidobacterium longum* RO175, probiotics.

3.3. Introduction

Freeze-drying is a well known dehydration method widely used to preserve microorganisms. By its ability of combining freezing and drying in a unique operation, this process can create final dried products with the highest quality. However, fixed costs of a freeze-drying system (including equipment purchase, installation and engineering costs) are 18 times that of a simple air dryer and double of a vacuum dryer (Roser, 1991). In addition, manufacturing costs for freeze-drying are 5 times or double those for air drying or vacuum drying, respectively. These expensive fixed and operation costs are the main drawback of the freeze-drying process, and had lead researchers over the world to seek for alternative dehydration processes more economically viable. Examples of those processes are spray, fluidized-bed or vacuum drying (Santivarangkna *et al.*, 2007).

Although freeze-drying is one of the best methods to preserve microorganisms, various probiotic cultures may behave differently towards this process (Atkin *et al.*, 1949). *Lactobacillus* usually showed a good viability after freeze-drying (viabilities higher than 80% are reported, Palmfeldt *et al.*, 2003; Champagne *et al.*, 1996). On the other hand, bifidobacteria with their complex shape and low oxygen tolerance are more sensitive to freeze-drying with survival rates as low as 10% (Maitrot *et al.*, 1997). An enhanced stability of microorganisms during freezing, drying and storage can be achieved by adding many protective compounds such as disaccharides, skim milk and other organic molecules (Womersley 1981; Berny and Hennebert 1991; Abadias *et al.*, 2001ab).

Foaming is a pretreatment used prior to dehydration of liquids and slurries in order to reduce drying time or to improve product quality. This pretreatment has been successfully applied before air drying of fruit juices (Hertzendorf and Moshy, 1970), eggs (Satyanarayana Rao and Murali, 1989), tomato paste (Lovriæ *et al.*, 1970), banana puree (Sankat and Castaigne, 2004) and mango pulp (Rajkumar *et al.*, 2007). The highly porous structure created by foaming is probably responsible for the acceleration of mass transfer during the air drying process (Brygidyr *et al.*, 1977). Others point out enhanced capillarity as the mechanism increasing the drying rate (Sankat and Castaigne, 2004). In the case of vacuum drying, foaming prior to the process has been shown

to stabilize cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* var. *cremoris* at temperatures over 37°C during storage with only 40% viability losses (Bronshtein, 2004). The strong affinity between microorganisms and foams can be related to the fact that when foams are made from a suspension of small size hydrophobic particles (such as the cellular membranes of bacteria), these will show a tendency to be attached to the bubbles and to concentrate in the foam (Pilpel, 1985; Stratton *et al.*, 2002).

Foaming has also been tested as a pretreatment of egg white (Muthukumaran *et al.*, 2008) and apple juice (Raharitsifa and Ratti, 2009a) prior to freeze-drying. These studies revealed that foaming reduces freeze-drying time if the comparison is done at equal sample thicknesses. However, the lower density of foamed materials decreases mass load of the dryer. In the case of apple juice, foamed freeze-dried products were shown to be more thermally stable during storage than non-foamed ones (Raharitsifa and Ratti, 2009b). No information has been reported so far in the literature about foaming as a pretreatment of microorganisms before freeze-drying.

The objective of the present work is to investigate foaming as a pretreatment prior to freeze-drying of *Bifidobacterium longum* RO175 (a bacteria commercialized as a probiotic) in order to increase the drying rate and the microorganism viability after the process. A study on storage of foamed and non-foamed freeze-dried products at different temperatures does complete this study.

3.4. Materials and methods

In this study, the **growth curve** of *Bifidobacterium longum* RO 175 was first determined to point out the early stationary phase which is known to give the best survival rates after freeze-drying. Afterwards, a **lyophilisation kinetics** study was performed. Finally, the **viability** of the microorganism after freeze-drying during specific times and during storage was done following the experimental protocol sketched in Figure 1. Details on the materials and methods regarding each particular operation follow.

3.4.1. Strain and culture conditions

The cultivation of *Bifidobacterium longum* RO 175 (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada) was carried out in modified medium 50 (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada) containing (per litre): 1.835 g of sodium phosphate dibasic, 1.835 g of ammonium citrate dibasic, 137,64 g of yeast extract DSM, 137,64 g of casein peptone, 0.092 g of magnesium sulphate heptahydrate, 0.046 g of manganese sulphate monohydrate, 9.176 g of peptone soy A2, 0.688 g of calcium chloride, 30.281g of nutritious food lactose, 27.528 g of dextrose monohydrate and 0.991g of Tween 80.

To trace the **growth curve** of *Bifidobacterium longum* RO 175 (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada), samples were collected from two fermentations at 1-h intervals between 0 and 13h, or 13 and 26-h fermentation. The fermentations were carried out in modified medium 50 (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada) and incubated at 37°C in anaerobic jars (BBL Microbiology System, Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). The samples were analyzed by determining the optical density at wavelength of 625 nm (this wavelength gives the best correlation between the optical density of the culture and the total number of cells it contains).

Before each measurement, a cuvet containing a blank of the culture medium was placed in the machine and adjusted to zero. Spectrophotometer measurements were done in a Genesis 20 (Thermo Electron Corporation, USA) in duplicate in order to establish the growth parameters.

The inoculum used for freeze-drying was prepared by subculturing *Bifidobacterium longum* RO175 twice from frozen stock (-80°C) in modified medium 50 with 1% (v/v) inoculums. The cultures were incubated at 37°C for 16 hours in anaerobic jars (BBL Microbiology System, Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) without agitation. The cells were harvested by centrifugation at 4080 g for 10 min at 4°C in a Sorvall RC-5. The cell pellet was resuspended in a solution containing 0.85% NaCl in order to obtain a 20X concentration factor. Experiments were repeated four times.

3.4.2. Protective agents

Two protective agents, industrial LEST and a skim milk (SM) based medium, were tested for the freeze-drying of *B. longum* RO175. The LEST was chosen because it is used industrially and its cost is low, it is also easy to use. The skim milk (SM) based cryoprotectant was used because it is the classic protective agent used for freeze-drying of Bifidobacteria (Maitrot *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2000; Capela *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2003). Concentrations of protective agents were chosen according to preliminary studies aiming at determining the amount foaming substance (albumin) that provided good stability to the foam.

LEST (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada) was mixed with the cell suspension in industrially-used proportions (0.12 : 1). For the skim milk based cryoprotectant, the concentrated cell suspension was added at a 1:1 ratio to an aqueous medium composed of 24% skim milk, 4% sucrose, 0.3% ascorbic acid and 5% trehalose (Champagne *et al.*, 1996.; Maitrot *et al.*, 1997).

3.4.3. Foaming

Cell suspensions in the two protective agents were mixed with 3% (v/v) egg albumin powder in order to generate the foam. Then, the suspensions (5 ml) were introduced in a 60 ml Buchner funnel (VWR, Montréal, Canada) equipped with a fritted disk filter of fine porosity where foaming was done by gently injecting pure nitrogen gas from a cylinder through the bottom filter of the funnel (Figure 2) during 8 to 10 seconds. The foaming procedure was done in an anaerobic chamber at 20°C. Foam overrun (density of foam/density of solution) was calculated from the measurement of the resulting volume after foaming in the funnel and the initial volume of solution.

3.4.4. Freeze-drying and storage

Five millilitres samples (liquid or foam) were transferred into sterilised vials, frozen in a freezer (SANYO, Medical freezer, MDF 235) for 24 h at -40°C.

In order to determine the drying curve, samples were weighted after 1, 2, 4, 8 and 16 h of freeze-drying at 25°C, in a Mettler AE 200 balance (Grefensee, Zurich). After freeze-drying, samples were transferred to a vacuum oven at 50°C for 48h to obtain the dried weight (AOAC, 1990). The relative moisture content (X/X_o) was determined with the following equation:

$$\frac{X}{X_o} = \frac{(W_t - W_d)}{(W_i - W_d)} \quad (1)$$

With W_t : moisture content at time t
 W_d : dried weight and
 W_i : initial weight

In order to do the viability tests, freeze-drying was then carried out at 25°C in a Freeze-mobile 25 L (Virtis, Gardiner, N.Y.) freeze-dryer, for 4 h in the case of foamed media and 16 h for non-foamed, under 0.3 Torr vacuum. For the storage experiments, *B. longum* dried powders were stored at 4°C and at 25°C in desiccators with Drierite desiccant under vacuum (W.A. Hammond,

USA) for up to 56 days without light presence. The Drierite was replaced every 2 weeks (before observing the change in color indicating that it must be replaced) to ensure its effectiveness. The experiments were repeated

3.4.5. Enumeration of survivors

After freeze-drying and at each week of storage, 0.1 g of each sample was rehydrated in 9.9 ml of peptone water (Difco, Detroit, USA) and incubated at 37°C for 35 min in a temperature-controlled bath. After serial dilutions, 1 ml aliquots of suitable samples were plated in modified medium 50 (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada) containing 15 g/l of agar. The plates were done for 48 h at 37°C under anaerobic conditions. Duplicate counts were conducted at each sample time. Viability was calculated as the percentage number of survivors with respect to initial counts.

3.4.6. Determination of residual moisture

The residual moisture (*RM*) of the freeze-dried products was determined after freeze-drying and at each two weeks of storage (in duplicate) by the difference in weight before and after drying in a vacuum oven at 55°C during 48 h in the presence of phosphorus pentoxide, P₂O₅. Duplicate counts were done at each sample time.

3.4.7. Glass transition temperature (*T_g*)

The glass transition temperature of *B. longum* freeze-dried samples was determined after freeze-drying and at each two weeks of storage (in duplicate).

The glass transition temperature was determined with a Pyris 1 Differential Scanning Calorimeter (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Connecticut, USA). The DSC heat flow was calibrated with

Indium ($T_m=156.6^\circ\text{C}$, $\Delta H_{fus}=28.45$ J/g, Perkin Elmer standard). Samples were sealed in aluminum pans with an empty pan as a reference. The heating rate was $5^\circ\text{C}/\text{min}$ and the samples were scanned from -10 to 100°C .

3.4.8. Statistical analysis

Viability results were analyzed by a General Linear Model (GLM) procedure with SAS software (SAS institute, version 6.12, USA) taking 5% as level of significance. The mean values and the standard deviation were calculated from the data obtained with triplicate trials.

3.5. Results and Discussion

This work is the first investigation of the effect of foaming of *Bifidobacterium longum* on its viability after freeze-drying and during the storage.

3.5.1. Overrun

Under the experimental conditions reported previously when describing the foaming procedure, foam overrun for LEST was 7.14 ± 0.09 , and for the skim milk foams was 7.11 ± 0.08 .

3.5.2. Freeze-drying kinetics

Figure 3 (a) shows the freeze-drying curves of *Bifidobacterium longum* RO175 in foamed LEST medium compared to non foamed solutions. As can be seen for LEST, 12 to 14 hours freeze-drying would be required to obtain a dried product with similar moisture content as a foamed product freeze-dried for only 2 hours. For the skim milk protective agents (Figure 3 (b)), 2 and 8 hours were necessary to freeze-dry the foamed and non-foamed solutions, respectively.

Thus, the foaming pretreatment can reduce the time for freeze-drying *Bifidobacterium longum* RO175 in LEST medium approximately by a factor of 7. In the case of skim milk cryoprotectants, the time reduction factor was lower, approximately 4. Therefore, with a foam overrun of about 700%, the foaming pretreatment with LEST medium seems to be more appropriate to reduce total freeze-drying time in industrial applications (since this cryoprotectant can reduce drying time by a factor of 7).

3.5.3. Cell viability

Figure 4 shows the growth curve of *Bifidobacterium longum* RO175 in modified medium 50 (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada). After a fermentation time of 15h, *Bifidobacterium longum* RO175 reached a late-logarithmic growth phase, and between 15h and 22h, an early stationary phase. Champagne *et al.* (1996), Bozoglu *et al.* (1987), Castro *et al.* (1995), Carvalho *et al.* (2004a) and Zayed *et al.* (2004) were harvesting the cells at this stage when freeze-drying lactic acid bacteria. Young cultures are known to be more sensitive to freeze-drying than late logarithmic or stationary phase cultures (Heckly, 1985).

Table 1 and Figure 5 show the viability of *Bifidobacterium longum* RO175 after freeze-drying in LEST, foamed LEST, skim milk and foamed skim milk media. Foaming had an impact on the survival of *B. longum*. Foamed suspensions presented a higher viability after the process (13.66% and 13.64% for foamed LEST and skim milk, respectively, as compared to 12.63% and 11.47% for non-foamed suspensions, as shown in Figure 5). This better survival of *Bifidobacterium longum* RO175 could be related to the affinity of bacteria to foamed media. Norkrans (1977) found that lipids, proteins and polysaccharides that are found in micro-layers of foam (McIntyre, 1974), favors the accumulation of bacteria. Separation and concentration of bacterial spores and vegetative cells by foam flotation was used by various authors for microbial pathogens (Boyles et Lincoln, 1958; Bretz *et al.* 1966; Rubin, 1968), but this affinity has never been studied on the viability of probiotics in a drying process.

Very little published information is available on the effect of residual water or water activity on the viability of *Bifidobacterium longum*. In general for storage, there is an optimum moisture content for each type of organism in a specific protective agent. The residual moisture of the freeze-dried powders obtained in this work was between 3.55 to 3.83% (Table 2).

The results in Table 2 show slightly higher residual water contents when compared to data of conventional freeze-dried cultures of *Bifidobacterium longum* of less than 3.5% (Nagawa *et al.*, 1988) and a possible reason could be the presence of polysaccharides that increases the residual moisture in the freeze-dried cultures (Champagne *et al.*, 1992). Furthermore, the high death rates

found for *Bifidobacterium longum* may be related to the elimination of free water, intermediate water and structured water, with the consequent damage of cellular proteins (Mellor, 1978). The survival rate of lactic acid bacteria decreases as dehydration increases (de Valdez *et al.*, 1985).

Values of glass transition temperatures of the different protective media are shown in Table 2 together with the residual moisture content of the samples. Several factors such as moisture content, solute composition and length of the polymer chains affect T_g . The presence of water strongly affects T_g in an inversely proportional relationship. Crowe *et al.* (1998) showed a 140°C decrease in the T_g for sucrose because of the addition of water. Joupilla and Roos (1994) found similar results when working with skim milk. From Table 2, it can be observed that values of T_g for the four protective media are higher than 65°C which indicates a good thermal stability for all the cryoprotective agents. Values of T_g for skim milk found in this work are higher than those obtained by Joupilla and Roos (1994), for which a value of 58°C has been reported at 3.7% residual moisture. Differences in residual moisture and T_g are not significant at the 5% level.

3.5.4. Storage

The protective agents help to increase cell survival after freeze-drying and they protect the cultures during storage periods (Desmond *et al.*, 2002). However, it is important to be aware that the best protective agents during dehydration are not necessarily optimal for stability during the storage period (Crowe *et al.*, 1987).

Bifidobacterium longum RO 175 survival during storage was calculated as the ratio of number of viable cells (CFU) over their initial number (storage day 0), and represented as a function of storage time as shown in Figure 6. The initial culture counts ranged from 10^{10} cfu/g and showed a tendency to decrease throughout the storage. A marked decrease in survival was found in the first 30 days of storage for dried cells suspensions tested, with a plateau reached after 40 days. In general, foamed freeze-dried materials showed a lower viability than non-foamed ones during storage, probably due to their increased surface exposed to oxygen. However, the number of

viable microorganism at 56 days storage was, in all cases, over 10^9 which is in the range of viable microorganisms offered in commercial probiotic supplements. It is also well over 10^6 , the minimum value recommended in the literature for which probiotics may have beneficial health effects (Lee and Salminen, 1995; Favaro-Trindade *et al.*, 2007).

Figure 7 shows the survival of *Bifidobacterium longum* RO 175 after 56 days storage at 4 and 25°C, respectively. From these figures, it can be observed that the survival rates of *Bifidobacterium longum* RO175 were between 4.19% and 18.05%. Similar results have already been reported for various *Bifidobacterium* cultures (Chavez and Ledebor, 2007; Corre *et al.*, 1992).

The storage temperature is a factor that largely determines the viability of microorganisms in the dry state (Champagne *et al.*, 1991). At lower storage temperatures, there is a greater survival. There is few data available in literature with regard to storage stability of freeze-dried probiotics at ambient or higher temperatures, and in most reported cases survival rates are low (Maitrot *et al.*, 1997; Nagawa *et al.*, 1988).

In the present work we can see that after 56 days of storage at 25°C, samples showed a higher decrease in viability than those stored at 4°C (except for foamed skim milk) (Figure 7). Costa *et al.*, (2002) showed that survival rates of *P. agglomerans* CPA-2 during storage were higher at 4°C than at 25°C. Also, similar results were observed by Champagne *et al.* (1996) with stored lactic acid bacteria. Low temperatures maintain chemical and biochemical reaction rates at a low level and increase storage stability. This is why 0–5°C is usually the temperature range chosen for storage (Selmer-Olsen *et al.* 1999).

Furthermore, increased survival of lyophilized cultures of lactic acid bacteria at low temperatures may be due to a reduction in the rate of unsaturated fatty acid oxidation (Castro *et al.*, 1995).

During storage at 25°C, foamed skim milk presented the highest viability after 56 days of storage (10.64%). This is the only case in which the viability of *B. longum* R0175 in the form of a freeze-dried foam is higher than its non-foamed form (Figure 7(b)). Also, the viability of *B. longum*

R0175 in foamed skim milk at 25°C was higher than at 4°C, which goes against the common logic effect of temperature on viability during storage. Thus, these observed anomalies could be due to errors inherent to the microbiological analyses and counting of *Bifidobacterium* cultures. Colony forming units are counted in these analyses, which usually represent more than one microorganism. In addition to the particular shape of *Bifidobacterium* microorganisms, they can be together in chains or disaggregate during the shaking carried out during the preparation of the dilutions causing variations in the counting (Haynes et Playne, 2002).

Results also show that foamed materials (LEST or skim milk) were the best protective agents for freeze-drying (Figure 5), while for storage, the behaviour was the opposite, (except for the skim milk at 25°C). This fact could be explained because of the increased surface area of foamed protective agents and consequently, the higher exposure of *Bifidobacterium longum* RO175 to oxygen.

Permeation of oxygen through packaging during storage affects the viability of bifidobacteria in milk or yogurt (Ishibashi and Shimamura., 1993). Hsiao *et al.* (2002) found less survival of bifidobacteria stored in a polyethylene bottle than that in a glass bottle and attributed it to the high-oxygen permeability of polyethylene.

Moisture content and glass transition temperature have also an importance on storage viability (Clementi and Rossi, 1984).

The residual moisture affects the stability of cultures during storage (Ishibashi *et al.*, 1985). In general, there is an optimum moisture content for each type of microorganism in a specific protective agent. Nagawa *et al.* (1988) showed that the *Bifidobacterium longum* was stable at 35°C for 30 days in a skim milk powder with a humidity of less than 3.3%. In contrast, with moisture content greater than 5%, these authors found a significant decrease in viability.

Figure 7 shows the relationship between moisture content and the percentage of survival in storage at 4°C and 25°C. In general, as the humidity is higher, the viability is lower because high humidity accelerates oxidation due to an increase in mobilization of components (Karel 1980). Residual moisture for all protective agents after 8 weeks of storage at 25°C was higher than those

of freeze-dried stored at 4°C. Also, residual moisture content at 56 days of storage was higher in foamed protective agents than in non-foamed ones (Figure 7).

It is known that a large ($T_g - T$) difference is an indicator of stability of dried foodstuffs towards degradation processes (Palzer, 2005). During storage, the T_g of the dried sample is an important factor affecting the viability of cultures, and therefore moisture content becomes a key variable. However, accurate measurement of the moisture content during storage is rarely performed and reported (Santivarangkna *et al.*, 2007). The high viscosity of the sugar glasses below their T_g decreases molecular mobility and reaction rates and therefore stabilize the biological system (Buitink *et al.*, 2000).

In our work, the small differences found in T_g values of the different protective agents (Table 2) was not significant enough to draw conclusions in this regard.

3.6. Conclusion

This work showed that foaming prior to freeze-drying can be used to preserve *Bifidobacterium longum* RO175 cultures greatly reducing the drying times and maintaining the number of viable microorganisms offered in commercial probiotics supplements ($>10^9$ cfu/g) after 56 days storage period at 4°C and at 25°C.

The type and state of the cryoprotective agent affect the survival of *Bifidobacterium longum* RO175 to freeze-drying. The highest viability after freeze-drying was obtained with foamed protective agents.

Foaming of protective agents prior freeze-drying had an important effect on drying kinetics. The results of this study showed that *Bifidobacterium longum* RO175 in foamed medium (LEST and skim milk) could be freeze dried in 1/4 to 1/7 of the time required for non-foamed solutions, respectively, and with higher viability after the process. However, reduced density of foamed

materials leads to a lower dryer load, which was only compensated for LEST medium by a shorter drying time to maintain the dryer throughput.

The effect of foaming on the survival rates after freeze-drying cannot be used to predict the *Bifidobacterium longum* RO175 survival rates during storage. Foamed agents were good protective agents during freeze-drying, while for storage, non-foamed agents showed the better viability. The residual moisture has an effect on the viability of *Bifidobacterium longum* RO 175 during storage.

Viability during storage is influenced by the residual moisture content of samples, their storage temperature and likely by their exposure to oxygen. The influence of this last parameter should be investigated in more details, particularly for the freeze-drying of oxygen sensitive bacteria, as most probiotic cultures are.

3.7. Tables and Figures

Table 1. Changes in the cell number (cfu/g) of *Bifidobacterium longum* RO 175 during freeze-drying with foamed and non-foamed protective agents.

Protective agent	Before freeze-drying (*10 ¹¹)	After freeze-drying (*10 ¹⁰)
LEST	6.44 ± 3.09	8.25 ± 2.70
Foamed LEST	4.81 ± 3.40	6.57 ± 1.38
Skim milk	4.11 ± 2.68	4.71 ± 3.23
Foamed skim milk	3.9 ± 2.56	5.32 ± 3.30

Table 2. Residual moisture content (*RM*) and glass transition temperature (*T_g*) for *Bifidobacterium longum* RO 175 freeze-dried with four protective agents.

Protective agent	<i>RM</i> (%)	<i>T_g</i> (°C)
LEST	3.55 ± 0.24	65.99 ± 4.72
Foamed LEST	3.76 ± 0.21	67.48 ± 1.64
Skim milk	3.83 ± 0.26	67.79 ± 0.88
Foamed skim milk	3.81 ± 0.12	67.72 ± 0.57

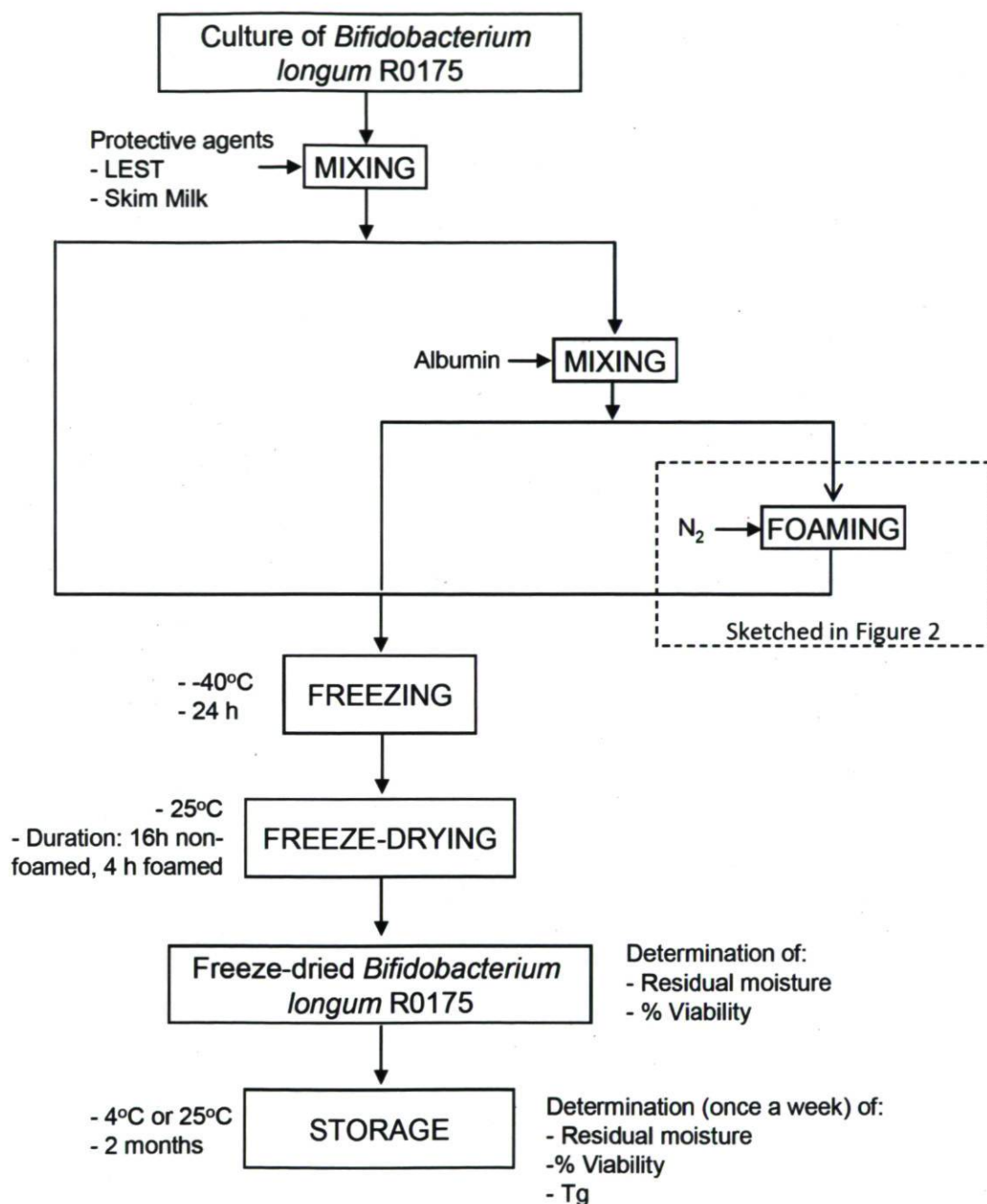


Figure 1. Methodology followed to determine the viability of *Bifidobacterium longum* R0175 during freeze-drying and storage.

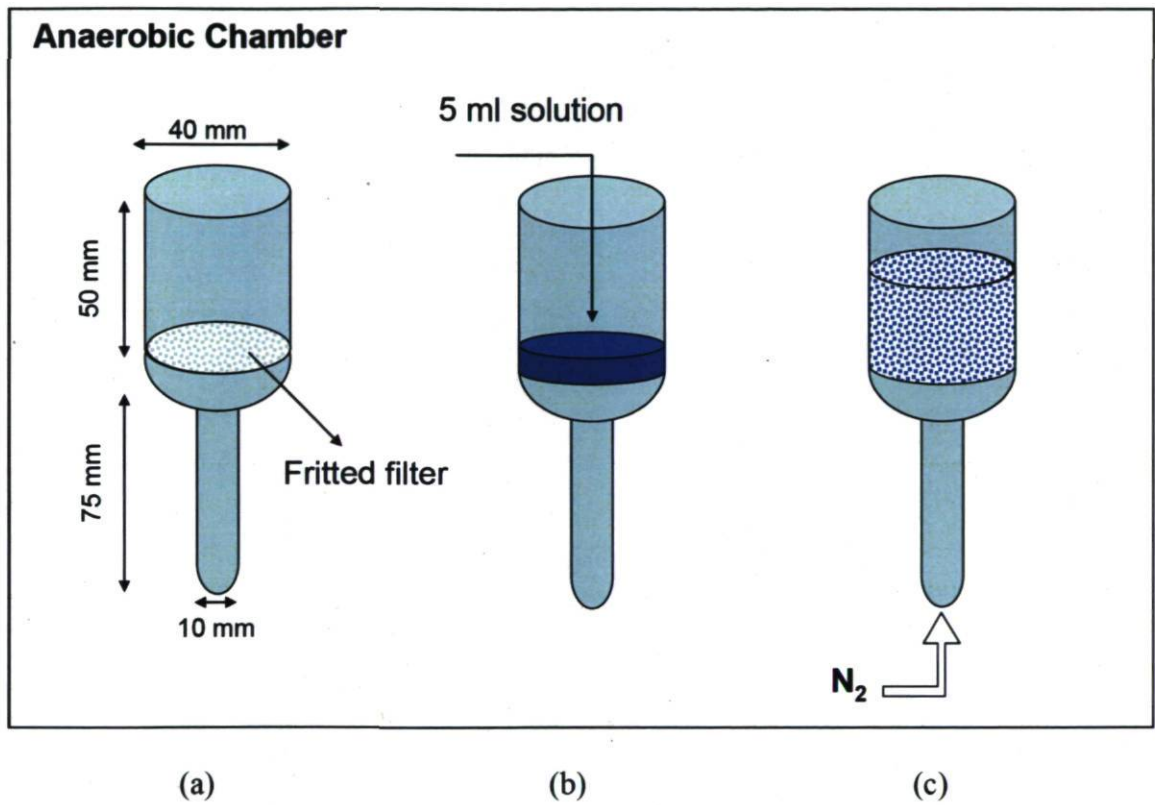
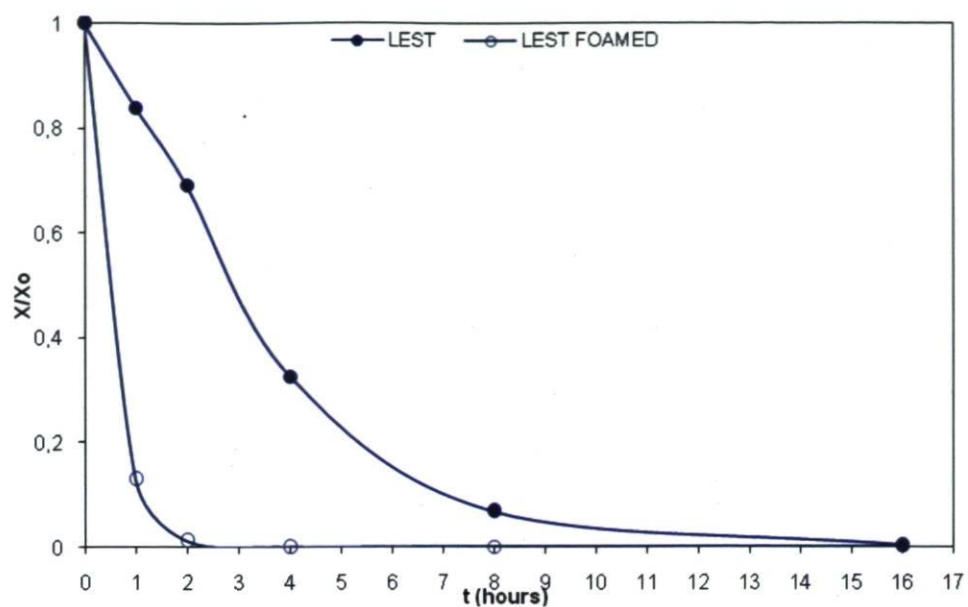
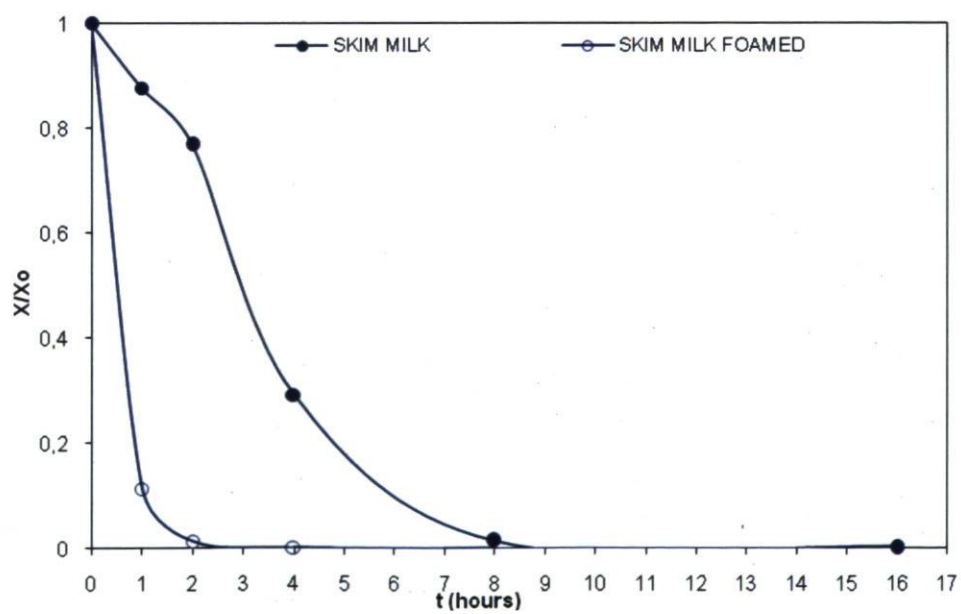


Figure 2. Experimental set-up used for foaming in an anaerobic chamber, (a) Glass funnel filter with sintered glass disc, (b) initial addition of 5 ml solution, (c) flow of N₂ through the solution and foam produced under anaerobic conditions.



(a)



(b)

Figure 3. Freeze-drying kinetics of *B. longum* RO175 in (a) LEST and (b) skim milk media.

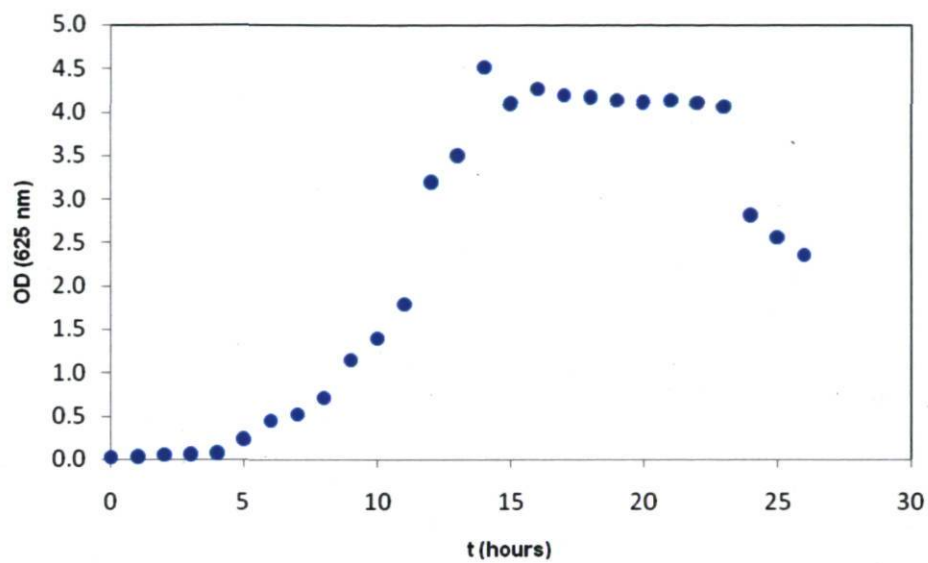


Figure 4. Growth curve of *Bifidobacterium longum* RO175

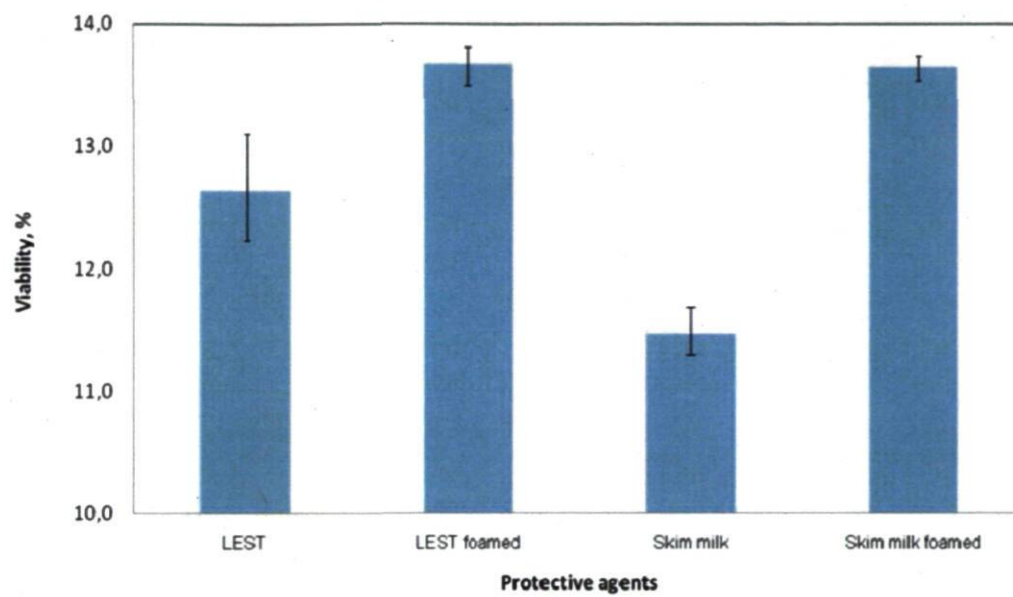
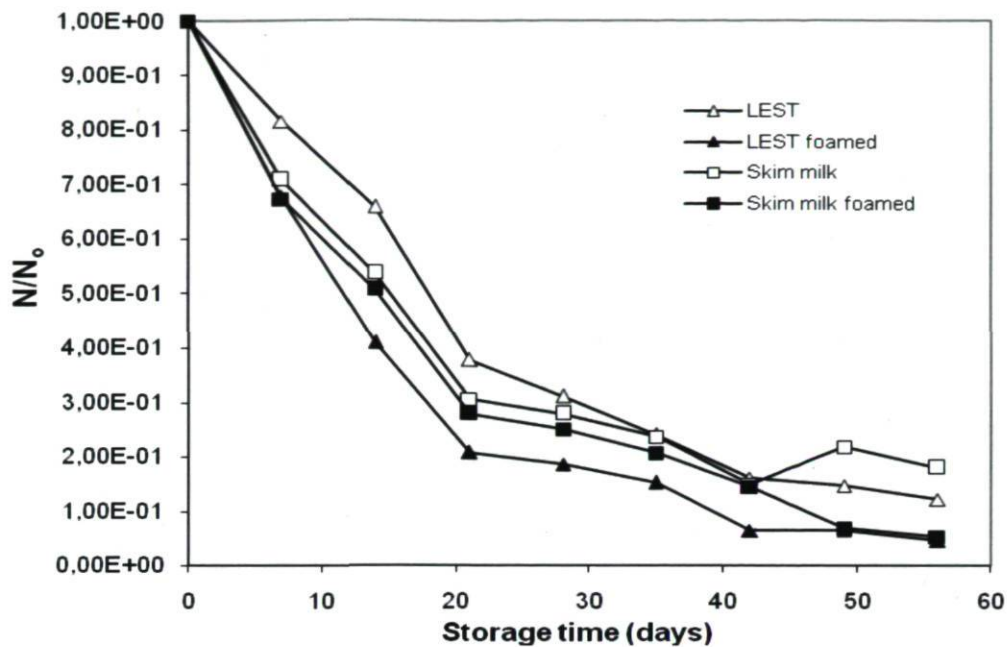
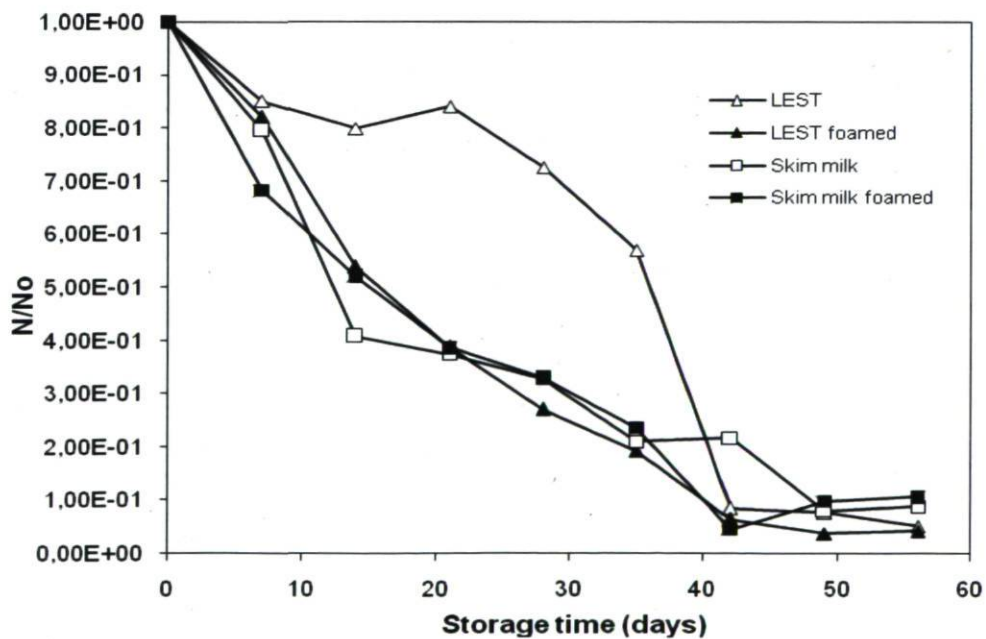


Figure 5. Viability of *Bifidobacterium longum* RO175 after freeze-drying.

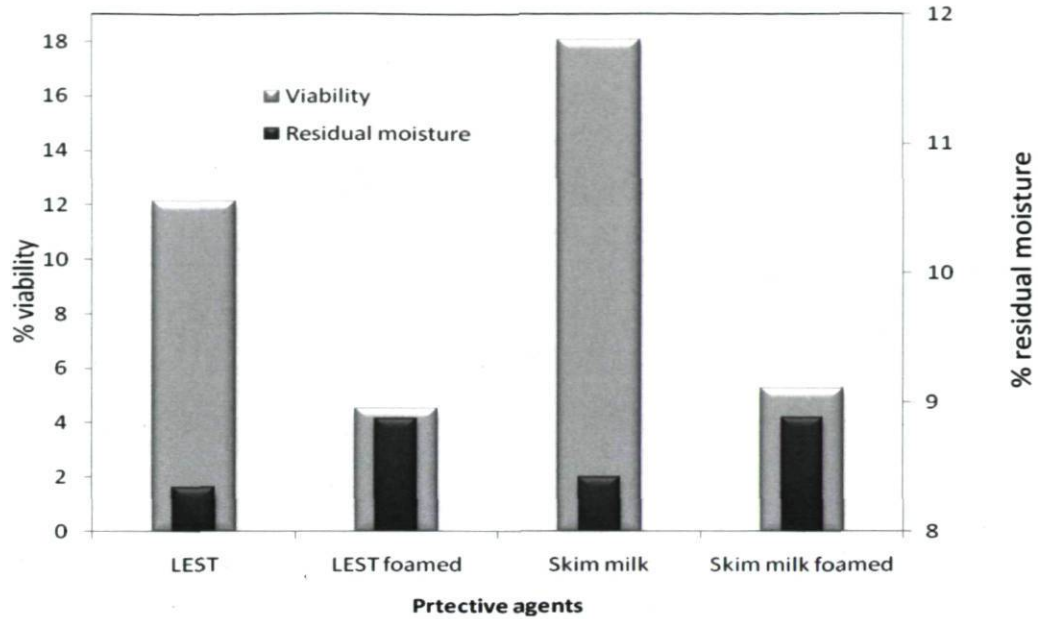


(a)

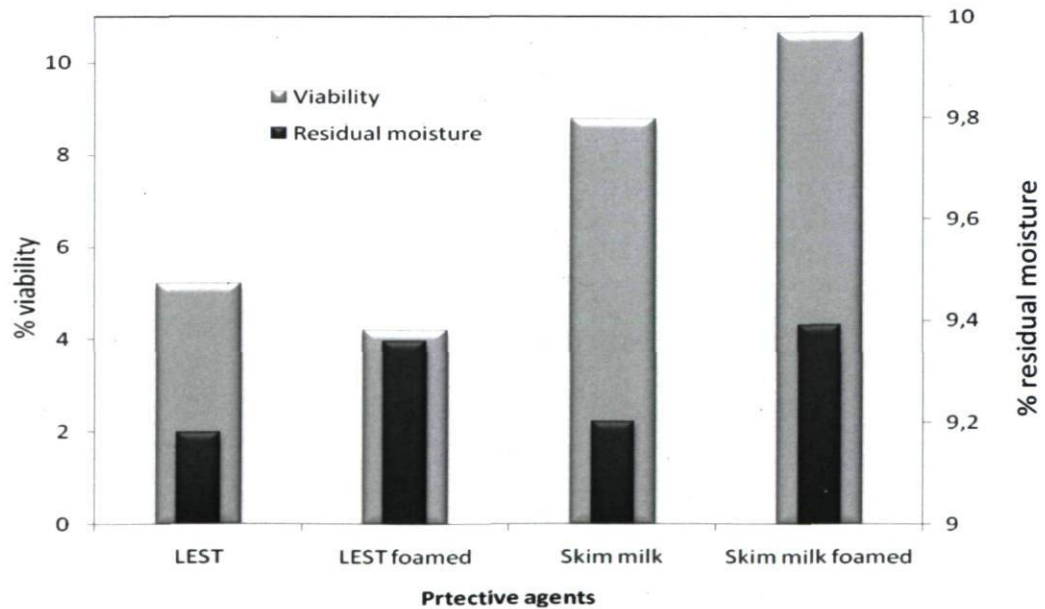


(b)

Figure 6. Viability of freeze-dried *Bifidobacterium longum* RO175 during storage at (a) 4°C and (b) 25°C in LEST and skim milk media (foamed and non-foamed).



(a)



(b)

Figure 7. Survival rate and residual moisture (RM) content for *Bifidobacterium longum* RO 175 freeze-dried at 56 days of storage at (a) 4°C and (b) 25°C.

3.8. References

- Abadias, M., A. Benabarre, N. Teixidó, J. Usall and I. Viñas (2001a). Effect of freeze-drying and protectants on the viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. 65, 173-182.
- Abadias, M., Teixido, N., Usall, J., Benabarre, A., Vinas, I., (2001b). Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*. 64 (6), 856-861.
- Abrams, G.D. (1980). Morphological aspects of gastro-intestinal tract colonization. *Les anaérobies*. Sym; Masson : Paris; 65-75.
- Adams, G. (1996). The principles of freeze-drying. *In* John G. Dayl and Glyn N. Stacey (editors) *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Second edition, (2), 27-28. Humana Press, New York.
- Akintoye, O. and Oguntunde, A. (1991). Preliminary investigation on the effect of foam stabilizers on the physical characteristics and reconstitution properties of foam-mat dried in soymilk. *Drying Technology*. 9 (1), 245-262.
- Ananta, E.;Volkert, M.; Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 15, 399-409.
- Annear, D.I. (1958). Observations on drying bacteria from the frozen and from the liquid state. *Austral. J. Exp. Biol*. 36, 2111-2122.
- AOAC, (1990). *Official Methods of Analysis*, 15th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C.
- Arunachalam KD. (1999). Role of Bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr Res*. 19, 1559-1597.
- ATCC, (1991). ATCC preservation methods: freezing and freeze-drying. *American Type Culture Collection*. 2nd edition, pp. 4.
- Atkin, L., Moses W. and Gray P.P. (1949). The preservation of yeast culture by lyophilization. *J. Bacteriol*. 57, 575-578.
- Ballongue , J., (2004) Bifidobacteria and probiotic action. *In* Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional Aspects*. Marcel Dekker, New York, pp 67-123.

- Banno, T. and Sakane, T (1979). Viability of various bacteria after L-drying. IFO Res. Commun. 9, 35-45.
- Baumann, D.P. and Reinbold, G.W. (1966). Freezing of lactic cultures. J. Dairy Sci. 49(6), 259.
- Baxter-Plant V. S., Hayesm E. and Forster C. F. (1998). The examination of activated sludge from three plants in relation to the problem of stable foam formation. Institute of Chemical Engineers Trans I Chem E, Vol 76, Part B, May
- Bayrock, D. and Ingledew, W. M. (1997a). Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. Food Research International, 30 (6), 407-415.
- Bayrock, D. and Ingledew, W. M. (1997b). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. Food Research International, 30 (6), 417-425.
- Berrada, N.; Laroche, G.; Lemeland, J.F. and Tonetti, H. (1989). Survie des bifidobactéries dans l'estomac de l'homme. In Les laits fermentés. Actualité de la recherche; John Libbey eurotext; 259-260.
- Berny, J.F. and Hennebert, G.L. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. Mycologia 83, 805-815.
- Berry, R. E., Bissett, O. W. and Lastinger, J. C. (1965). Method for evaluating foams from citrus concentrates. Food Technology. 19, 144-147.
- Boyles, W.A. and R.E. Lincoln. (1958). Separation and concentration of bacterial spores and vegetative cells by foam flotation. Appl. Microbiol. 6, 327-334.
- Bozoglu, T.F., Ozilgen, M. And Bakir, U. (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. Enzyme Microbiology Technology. 9, 531-537.
- Bretz H. W., Wang S. L., and Grieves R. B. (1966). Variables Affecting the Foam Separation of Escherichia coli. Applied microbiology. 14 (5).
- Bronshtein, V. (1998). Preservation by foam formation. Patent: US 5766520
- Bronshtein, V. (2004). Preservation by foam formation. Pharmaceutical Technology 28 (4), 86-92.
- Bruni, F. and Leopold, A.C. (1991). Glass Transitions in Soybean Seed : Relevance to Anhydrous Biology. Plant Physiol. 96, 660-663.

- Brygidyr A.M., Rzepecka M.A. and McConnell M.B. (1977). Characterization and drying of tomato paste foam by hot air and microwave energy. *J Inst Canad. Sci Technol Aliment* 10, 313–319.
- Buitink, J.; van den Dries, I.J.; Hoekstra, F.A.; Alberda, M. and Hemminga, M.A. (2000). High critical temperature above T-g may contribute to the stability of biological systems. *Biophys. J.* 79 (2), 1119-1128.
- Bullen, C.L.; Tearle, P.V. and Stewart, M.G. (1977). The effect of “humanised” milks and supplemented breast feeding on the faecal flora of infants. *J. Med. Microbiol.* 10, 403-413.
- Bullimore, B.K. (1983). Dairy Starters reviewed. *Dairy Ind. Internat.* 48, 19.
- Capela P, Hay TKC, Shah NP. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int.* 39, 203–11.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P., (2003). 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., Gibbs, P., (2004a). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress.* 20, 248–254.
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X. and Gibbs P. (2004b). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 14 (10), 835–847.
- Carp D.J., Bartholomai G.B. and Pilosof AMR. (1997). A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range. *Lebensm Wiss Technol.* 30, 253–258.
- Castro H.P., Teixeira P.M. and Kirby R. (1995). Storage of Lyophilized Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 44, 172-176.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y. (1991). The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 24, 118–128.
- Champagne, C.P., Morin, N., Couture, C., Gagnon, C., Jelen, P. et Lacroix, C. (1992). The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Res. Internat.* 25, 419–427.

- Champagne, C.P., Mondou, F., Raymond, Y. and Roy, D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Research International*. 29, 555–562.
- Chavez, B.E. and Ledebor, A.M. (2007). Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Drying Technology*, 25, 1193–1201.
- Clementi, F. and Rossi, J. (1984). Effect of drying and storage conditions on survival of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture* 35, 183–186.
- Conrad P.B. Miller, D.P. Cielenski P.R and de Pablo, J.J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41, 17–24.
- Cook, P. M. (1950) Large scale culture of *Chlorella*. In *The culturing of algae*, a symposium edited by J. Brunel, G. W.Prescott, and L. H. Tiffany, pp. 53-75. The Charles F. Kettering Foundation, Dayton, Ohio.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1024–1039.
- Corre, C., Madec, M.N. and Boyaval, P. (1992). Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53, 189–194.
- Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N. and Vinas, I., (2000). Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected freeze drying. *Journal of Applied Microbiology* 89, 793–800.
- Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N. and Vinas, I. (2002). Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology* 92, 873–878.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F. and Wistrom, C.A. (1987). Stabilization of dry phospholipid-bilayers and proteins by sugars. *Biochemistry Journal*. 242 (1), 1-10.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M. and Carpenter, J.F. (1998). The role of vitrification in anhydriobiosis. *Annual review of physiology*. 60, 73-103.
- Dahlback, B., Hermansson, N., Kjelleber, S. and Norkrans, B. (1981). The hydrophobicity of bacteria-an important factor in their initial adhesion at the air-water interface. *Archives of Microbiology*. 128, 267-270.
- De Roissart H and Luquet F.M. *Bactéries lactiques*. (1994) Vol 2. Lorica: Uriage Editions.

- De Valdez G.F., de Giori G.S., de Ruiz Holgado A.P. and Oliver G. (1985). Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology* 22, 574–577.
- De Vries, W. and Stouthamer, A.H. (1969). Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Mikrobiol.* 65, 275-287
- Dellaglio F, de Roissart H, Torriani S, Curk M.C. et Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques*. Vol 1. De Roissart H et Luquet FM (ed.). Lorica: Uriage. 25-116.
- Desmond, C.; Ross, R.P.; O'Callaghan, E.; Fitzgerald, G. and Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spraydried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.* 93 (6), 1003-1011.
- Dognon, A. (1941). Concentration et separation des molecules et separation des particules par le methode des mousses. *Rev. Sci. (France)*, 79, 613-619.
- Dumont, F., Maéchal, P. and Gervais, P. (2003). Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. *Cryobiology* 46, 33–42.
- Ekdawi-Sever, N.C., Conrad P.B. and de Pablo, J.J. (2001). Molecular simulation of sucrose solutions near the glass transition temperature. *J. Phys. Chem. A.* 105(4), 734-742.
- FAO/WHO (2002)–Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Guideliness for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization Working Group Report. (Online).
- Faure, J.C.; Schellenberg, D; Bexter, A. And Wurzner, H.P. (1982). Barrier effect of *Bifidobacterium longum* on *Escherichia coli* in the germ-free rat. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 52 (2), 225-230.
- Favaro-Trindade, C.S.; de Carvalho Balieiro J.C.; Félix Dias P.; Amaral Sanino,F. and Boschini C. (2007). Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin L*) ice creams. *Food Sci Tech Int.* 13(4), 285–291.
- Fernandes, C.F. and Shahani, K.M. (1990). Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Pro.* 53, 704.
- Flink, J.M. and Knudsen, H. (1983). An Introduction to Freeze Drying; Strandberg Bogtryk/ Offset: Denmark.
- Fox, T.G. and Flory, P.J. (1950). Second order transition temperature and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight. *J. Appl.Phys.* 21, 581.

- Franks, F. (1994). Long-term stabilization of biologicals. *Biotechnology*. 12, 253–256.
- Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P. and Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *L. paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6), 2605–2612.
- Gaudin, A. M. (1957) Flotation, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, N. Y.
- Gaudin A. M., Mular A. L., et O'Connor, R. F. (1959) Separation of Microorganisms by Flotation I. Development and Evaluation of Assay Procedures. Department of Metallurgy, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts
- Genin, N. and René, F. (1995). Analyse du rôle de la transition vitreuse dans les procédés de conservation agro-alimentaires. *Journal of Food Engineering*, 26, 391-408.
- German, J.B., O'Neill T.E. and Kinsella J.E. (1985). Film forming and foaming behaviour of food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 62, 1358–1366.
- German, J. B. and Phillips, L. (1994). Protein Interactions in Foams: Protein-Gas Phase Interactions. *In* Hettiarachchy N. S. and G. R. Ziegler. (Eds.) *Protein Functionality in Food Systems*. Marcel Dekker, Inc.: 181 - 208.
- Gibson, C.A., Landerkin, G.B. and Morse, P.M. (1966). Effects of Additives on the Survival of Lactic Streptococci in Frozen Storage. *Applied Microbiology*, 14(4), 665.
- Gilliland, S.E. 1985. Bacterial starter cultures for food. CRC Press Inc., Boca Raton FL. pp. 146.
- Goldin, B.R.; Swenson, L.; Dwyer, J.; Sexton, M. and Gorbach, S.L. (1980). Effect of diet and Lactobacillus acidophilus supplements on human faecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 64(2), 255-261.
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. (1984). The effect of oral administration of Lactobacillus and antibiotics on intestinal bacteria activity and chemical induction of large bowel tumor. *Dev. Indust. Microbiol.*, 25, 139-144.
- Greaves, R.I.N. (1966). The importance of the prefreezing stage on the viability of freeze-dried organisms. *In* Rey L. and J. May (eds.) *Freeze-drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and Biological Products*, 2nd Edition, pp. 95-101. Marcel Dekker, New York.
- Greiff, D. and Myers, M. (1964). Enzymatic activities of mitochondria following freezing and freeze-drying. *In* Rey L. and J. May (eds.) *Freeze-drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and Biological Products*, 2nd Edition, pp. 351-367. Marcel Dekker, New York.

Hart, M.R., Graham, R. P., Ginnette, L. F., and Morgan, A. I. (1963). Foams for foam-mat drying. *Food Technology*, 17, 1302–1304.

Haynes N. and Playne M.J. (2002). Survival of probiotic cultures in lowfat ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 10–13.

Heckly, R.J. (1985). Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Dev.Ind. Microbiol.* 26, 379-395.

Hertzendorf, M.S. and R.J. Moshy (1970). Foam mat drying in the food industry. *CRC Crit Rev Food Technol.* 1, 25–70.

Herzhaft, B. (1999). Rheology of Aqueous Foams: a Literature Review of some Experimental Works. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, 54 (5), 587-596.

Homma, N., Nishihara, K. and Isoda, K. (1967). Antifidus cocci, their biological properties and clinical significance. *Mschr. Kinderheilk*, 115 (4), 296.

Homma, N. (1988). Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria microflora.* 7(1), 35-43.

Hopper, S. H. and McCowen, M. C. (1952) A flotation process for water purification. *J. Am. Water Works Assoc.* 44, 719-726.

Hosono, A.; Wardojo, R. and Otani, H. (1990). Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mitagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.* 54(7), 1639.

Hsiao, H.C., Lian, W.C. and Chou, C.C. (2002). Viability of various microencapsulated bifidobacteria during storage. Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Microbial World, July 27–Aug 1. Paris, France.

Ishibashi N., Tatematsu T., Shimamura S., Tomita M. and Okonogi S. (1985) Effect of water activity on the viability of bifidobacteria. *Fundamentals and applications of freeze-drying to Biological Materials.* Institut International du Froid, Paris, pp. 227–232.

Ishibashi, N. and Shimamura, S. (1993). Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technology* 47, 126– 134.

Israeli E., Shaffer B.T. and Lighthar B. (1993). Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. *Cryobiology.* 30, 519-523.

Joupilla, K. and Roos, Y.H. (1994). Glass transitions and cryatallization in milk powders. *J.Dairy Sci.* 77, 2907-2915.

- Kageyama, T.; Tanoda, T. and Nakano, Y. (1984). The effect of Bifidobacterium administration in patients with leukemia. *Bifidobacteria microflora*, 3(1), 29-33.
- Karel M (1980) Lipid oxidation, secondary reactions and water activity of foods. In Simic MG, Karel M (eds) *Autoxidation in food and biological systems*. Plenum press, New York
- Karim, A.A. and Wai, C.C. (1999a). Foam-mat drying of starfruit (*Averrhoa carambola L.*) puree. Stability and air drying characteristics. *Food Chemistry*. 64, 337-343.
- Karim, A.A. and Wai, C.C. (1999b). Characteristics of foam prepared from starfruit (*Averrhoa carambola L.*) puree by using methyl cellulose. *Food Hydrocolloids*, 13, 203-210.
- Keisuke I, Naoyuki M, Nami, T; Sachiko M. and Tohru M. (2001) Production of Anti-Gorhnia *amarae* Mycolic Acid Polyclonal Antibody for Detection of Mycolic Acid-Containing Bacteria in Activated Sludge Foam. *Journal of bioscience and bioengineering* 92 (5), 417-422.
- Kets E.P., Galinski E.A., de Wit M. de Bont J.A.M., and Heipieper H.J. (1996a). Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol.* 178, 6665-6670.
- Kets, E. P., Teunissen, P.J.M. and de Bont J.A.M. (1996b). Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and environmental microbiology*, January, pp. 259-261.
- King, J.C. (1968). Rates of moisture sorption and desorption in porous dried foodstuffs. *Food Technol.* 22, 509-515.
- King, V.A. and Su, J.T. (1993). Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. *Process Biochemistry*, 28, 41-52.
- Larena, I., Melgarejo, P. and De Cal, A. (2003). Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against fusarium wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 151, 600-606.
- Lechevalier M.P. and Lechavalier H.A. (1974). *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24, 278-288.
- Lee Y.K. and Salminen S. (1995). The coming of age of probiotics. *Food Science and Technology* 6, 241-244.
- Leja, J. (1982). *Surface Chemistry of Froth flotation*. New York: Plenum Press.

- Lemmer, H and Baumann, R.M. (1988). Scum actinomycetes in sewage treatment plants. Part 2: The effect of hydrophobic substrate. *Water research*. 22, 761-763
- Lemonier, D. (1988). Le yaourt, enjeu scientifique et industriel. *Recherche*, 19, 543-545.
- Leslie S.B., Israeli E., Lighthart, B. Crowe J.H. and Crowe L.M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membrane and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- Lian W.C., Hsiao H.C. and Chou C.C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying, *International Journal of Food Microbiology*. 74, 79- 86.
- Linders, J.M., Wolkers, W.F., Hoekstra, F.A. and van't Riet, K. (1997). Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* 35,31-40
- Lovriæ T., Sablek Z. and Boskovic M. (1970). *Cis-Trans* isomerisation of lycopene and color stability of foam-mat dried tomato powder during storage. *J Sci Food Agric*. 21, 6417.
- Maitrot, H., Paquin, C., Lacroix, C. and Champagne, C.P. (1997) Production of concentrated freeze-dried cultures of *Bifidobacterium longum* in κ -carrageenan-locust bean gum gel. *Biotechnol. Tech.* 11, 527-531.
- Malik, K.A. (1990). A simplified liquid-drying method for the preservation of microorganisms sensitive to freezing and freeze-drying. *Journal of Microbiological Methods*, 12, 125-132.
- Malysa, K. (1992). Wet foams: formation, properties and mechanism of stability. *Advances in Colloidal and Interface Science*, 40, 37-83.
- Marteau, P.; Pochart, P.; Flourie, B.; Pellier.; Santos, L.; Desjeux, J.F. and Rambaud, J.C. (1990). Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing lacto-bacillus acidophilus and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52 (4), 658-688.
- Mayer, J.B. (1969). Interrelationships between diet, intestinal flora and viruses. *Phys. Med. Rehabil.* 10 (1), 16-23.
- Mazur P. (1970). *Cryobiology: The Freezing of Biological Systems*. Science, New Series, 168 (3934), 939-949.
- McIntyre, F. (1974). The top millimetre of the ocean. *Sci. Am.* May, 62-67.
- Meda L. and C. Ratti. (2005). Rehydration of freeze-dried strawberries. *Journal of Food Process Engineering*, 28, 233-246.

- Mellor, J. D. (1962). Accelerated freeze-drying of foodstuffs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Food Pres. Quart. 22, 41
- Mellor, J.D. (1978). Fundamentals of freeze-drying. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). Academic press. Inc. Australia. pp 3-15.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S. and Komatsu, Y. (2000). Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. Cryobiology 41, 251–255.
- Mizutani, T. And Mitsuoka, T. (1979). Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/HE male mice. J. Natl. Cancer Inst. 63, 1365-1370.
- Modler, H.W., McKellar, R.C. and Yaguchi, M. (1990). Bifidobacteria and Bifidogenic Factors. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 23(1), 29-41.
- Morgan, A.I., Graham, R.P., Ginnette, L.F., and Williams, G.S. (1961). Recent developments in foam-mat drying. Food Technology, 15, 37–39.
- Moriche, T. (1970). Nature and action of protective solutes in freeze drying of bacteria. Proceedings of the 1st International Conference on Culture Collections. University Park Press, Tokyo, 121.
- Mozes, N. and Rouxhet, P.G. (1987). Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. J. Microbiol. Methods 6, 99-112.
- Muthukumar, A., Ratti C. and Raghavan G.V.S. (2008). Foam-mat freeze drying of egg white—Mathematical modeling Part II: Freeze drying and modeling. Drying technology. 26(4), 513 – 518.
- Nagawa, M., Nakabayashi, A. and Fujino, S. (1988). Preparation of the bifidus milk powder. Journal of Dairy Science, 71, 1777-1782.
- Nagengast F.M., Hectors M.P.C., Buys W.A.M. and Van Tongeren J.H.M. (1988). Inhibition of secondary bile acid formation in the large intestine by lactulose in healthy subjects of two different age groups. European Journal of Clinical Investigation. 18, 56-61
- Nei, T. (1964). Freezing and freeze-drying of microorganisms. Cryobiology, 1, 87.
- Norkrans, B. and Sörensson, F. (1977). On the marine lipid surface microlayer. Bacterial accumulation in model systems. Bot Mar 20, 473-478.
- O'Callaghan, J. and Condon, S. (2000). Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: correlation with the ability to accumulate glycine bêtaïne. International Journal of Food Microbiology 55, 127–131.

- Palmfeldt, J. and Hahn-Hagerdal, 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.; Rådström, P. and Hahn-Hagerdal, B. (2003). Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* 47 (2003) 21–29.
- Palzer, S. (2005). The effect of glass transition on the desired and undesired agglomeration of amorphous food powders. *Chemical Engineering Science*, 60 (14), 3959-3968.
- Petterson, H.E. (1975). Studies on batch production of bacterial concentrates from mixed species lactic starters. *Applied Microbiol.* 29, 133.
- Pilpel, N. (1985). Foams in pharmacy. *Endeavour, New Series*, 9(2), 87-91.
- Raharitsifa, N., Genovese, D.B. and Ratti, C. (2006). Characterization of apple juice foams for foam-mat drying prepared with egg white protein and methylcellulose. *Journal of Food Science*. 71(3): E142-E151.
- Raharitsifa, N. (2008). Optimisation de la lyophilisation du jus de pomme en tapis de mousse. M. Sc. Université Laval. pp. 63-101.
- Raharitsifa, N. and Ratti C. (2009a). Foam-mat freeze-drying of apple juice: experimental data and ANN simulations. *Journal of Food Process Engineering* (DOI:10.1111/j.1745-4530.2009.00400.x).
- Raharitsifa, N. and Ratti C. (2009b). Foam-mat freeze-drying of apple juice. Part 2: Stability of dry products during storage. *Journal of Food Process Engineering* (DOI: 10.1111/j.1745-4530.2009.00517.x).
- Rajeev K., Thaku, Ch. and Vial, G. Djelveh. (2003) Influence of operating conditions and impeller design on the continuous manufacturing of foods foams. *Journal of Food Engineering*, 60, 9-20.
- Rajkumar P., Kailappan R., Viswanathan R. Ratti and Raghavan G.S.V. (2007) Drying characteristics of foamed alphonso mango pulp in a continuous type foam mat dryer. *Journal of Food Engineering* 79, 1452–1459.
- Rao, A.V.; Shiwnarain, N. and Maharaj, I. (1989). Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 22 (4), 345-351.
- Rasic, J. L. (1983). The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutritional and health. *North Eur. Dairy J.* 49 (4), 80-88

- Ratti C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *Journal of Food Engineering*, 49, 311-319.
- Romond M.B.; Romond, C.; Beerens, H. and Bourlioux, P. (1989). The in vivo effect of dietary buffering capacity on the bifidogenic activity of human milk oligosaccharides, *Microb Ecol Health Dis.* 2, 29–36.
- Roser, B. (1991). Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science & Technology*. July, 166-169.
- Rouimi, S.; Schorsch, C.; Valentini, C. and Vaslin, S. (2005). Foam stability and interfacial properties of milk protein–surfactant systems. *Food hydrocolloids*. 19, 467–478.
- Rovero, G., Baldi, G. and Bruttini, R. (1991) Experimentation and modelling of pharmaceutical lyophilization using a pilot plant. *Chemical Engineering Journal* 45, B67-B77.
- Rubin, A.J. (1968) Microflotation: coagulation and foam separation of *Aerobacter aerogenes*. *Biotechnology and Bioengineering*. 10, 89-98.
- Rybka, S. and Kailasapathy, K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurt. *Australian Journal of DairyTechnology*, 50, 51–57.
- Sagis, L.M.C.; de Groot-Mostert A.E.A.; Prins, A. and Van der Linden, E. (2001). Effect of copper ions on the drainage stability of foams prepared from egg white. *Coll Surf A* 180, 163–72.
- Sankat, C.K. and Castaigne, F., (2004). Foaming and drying behaviour of ripe bananas. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37, 517-525.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U. and Foerst, P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol Prog* 23, 302–315.
- Satyanarayana Rao T.S. and Murali H.S. (1989). Changes in lipids of spray-dried, freeze-dried and foam-mat dried, whole egg powders during storage. *Lebensm Wissen Technol* 22, 217–21.
- Saxelin, M. Grenov, B.; Svensson, U.; Fonden, R.; Reniero, R. and Mattila-Sandholm, T. (1999). The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10(12), 387-392.
- Scardovi, V. (1986). *Bifidobacterium*. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 9th Ed.; Williams and Williams: Baltimore,
- Shah, N. P. (2002). *Bifidobacterium* spp: Applications in fermented milks. In: *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 147–151). London: Academic press.

Schmidt, J.; Tourneur, C. and Lenoir, J. (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. Dans : *Bactéries lactiques*. Vol 2. De Roissart H. et Luquet F.M.S (ed.). Loriga: Uriage. pp. 25-116.

Schneegans, E.; Haarscher, A.; Lutz, A.; Levy-Silag and Schmittbuhl, J. (1966). Effets de *B. bifidum* et du lactulose sur l'éradication d'*E.coli* chez l'enfant. Semaine des Hôpitaux de Paris, Paris. 42, 457-461.

Selmer-Olsen, E.; Sørhaug, T.; Birkeland, S-E. and Pehrson, R. (1999) Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. J Ind Microbiol Biotechnol 23, 79– 85.

Shin, H.S.; Lee, J.H.; Pestka, J.J. and Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. Journal of Food Science, 65(5), 884–887.

Silva, J.; Carvalho, A.S.; Teixeira, P. and Gibbs, P.A. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. Letters in Applied Microbiology 34, 77–81.

Simatos, D., Blond.G., Dauvois, P., et Sauvageot, F. (1974). La lyophilisation : Principes et Applications. Collection de l'Association Nationale de Recherche Technique, Paris. pp. 3-33

Simatos, D.; Blond, G.; Le Meste, M. and Morice, M. (1994). Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation. In : Bactéries lactiques. Vol 1. De Roissart H. et Luquet F.M. (ed.). Loriga: Uriage. pp. 555-573.

Simpson, P.J., Stanton, C.; Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. J. Appl. Microbiol. 99, 493–501.

Simon, G.; Gorbach, S. (1986). The human intestinal microflora. Dig. Dis. Sci. 31(9), 1475-1625.

Slade, L. and Levine, H. (1991). Beyond water activity: Récent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. 30, 115.

Sodell, J.A. and Serviour R.J. (1990). A review. Microbiology of foaming in activated sludge plants. Journal of Applied Bacteriology. 69, 145-176.

Stratton, H.M.; Brooks, P.R.; Griffiths, P.C. and Seviour, R.J. (2002). Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam. J Industrial Microbiology and Biotechnology, 28(5), 264-267.

Tanaka, K. (1959). The glass transition temperatures of various kinds of polyethylenes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 32(11), 1279-1280.

Teixeira, P.; Castro, H. and Kirby, R. (1995) Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of applied bacteriology* 78, 456–462.

Thakur R.K.; Vial, C. and Djelveh, G. (2003). Influence of operating conditions and impeller design on the continuous manufacturing of food foams. *J. Food Eng* 60, 9–20.

Thuwapanichayanan, R.; Prachayawarakorn, S. and Soponronnarit, S. (2008). Drying characteristics and quality of banana foam mat. *Journal of Food Engineering* 86, 573–583.

Thammavongs, B.; Corroler, D.; Panoff, J.M.; Auffray, Y. and Boutibonnes, P. (1996). Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock : growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. *Letters in Appl Microb*, 23, 398-402.

Tissier, H. (1900) Recherches sur la flore intestinale (état normal et pathologique) des nourissons. Paris Thèses: 1-253, Université de médecine, Paris, France.

Venkataraman, P. S. (1996). Success and failures in mango pulp processing industries in chitoor district of A.P. *Indian Food Packer*, 51(1), 57–58.

Vercelloti, J.R. ; Salyers, A.A. ; Bullard, W.D. ; Wilkins, T.D. Breakdown of mucin and plant polysaccharides in the human colon. *Can. J. Biochem.* 55, 1990-1996.

Vernon-Carter E.J.; Espinosa-Paredes, G.; Beristain, C.I. and Romero-Tehuitzil, H. (2001). Effect of foaming agents on the stability, rheological properties, drying kinetics and flavor retention of tamarind foam-mats. *Food Res Int.* 34, 587–98.

Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 203, 1–60.

Wang, Y.C., Yu, R.C. and Chou, C.C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 209–217.

Wilde, P. J. and Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. *In* *Methods of testing protein functionality*. G. M. Hall (eds). Blackie Academic & Professional. pp. 111-152.

Womersley, C. (1981). Biochemical and physiological aspects of anhydrobiosis. *Comparative biochemistry and physiology. Part B*, 70, 669-678.

Yamazaki, S.; Kamimura, H.; Momose, H.; Kawashima, T. and Ueda, K. (1982). Protective effect of *Bifidobacterium*-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*. *Bifidobacteria microflora*, 1(1), 55-59.

Zayed, G. and Ross Y.H. (2004), Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process biochemistry* 39, 1081–1086.

Conclusion générale et perspectives futures

Dans le but de vérifier l'hypothèse de ce projet, une évaluation des effets du moussage sur la survie de *Bifidobacterium longum* RO 175 à la lyophilisation a été faite. Ainsi, une nouvelle technique pour la production des mousses pour protéger des bactéries anaérobies a été conçue et réalisée de façon réussie.

Tous les agents protecteurs sous la forme de mousse ont donné une plus grande vitesse de lyophilisation par rapport aux témoins. Les taux de survie à la lyophilisation ainsi que l'humidité résiduelle et la température de transition vitreuse ont été déterminés pour établir, en plus du moussage, d'autres facteurs affectant la viabilité de ce probiotique. Les microorganismes séchés dans les agents protecteurs moussants ont présenté les meilleurs taux de survie à la lyophilisation. De même on a trouvé que le degré de viabilité était aussi lié à l'humidité après la lyophilisation.

Une étude de la stabilité pendant l'entreposage a été réalisée en déterminant la viabilité pendant 56 jours à 4°C et à 25°C : on a pu observer que la survie dépendait de la température d'entreposage et était affectée négativement par l'humidité résiduelle.

Cette recherche pourra servir de modèle pour des travaux futurs dans le domaine de la lyophilisation de microorganismes, surtout pour ceux qui sont difficiles à conserver. La diminution substantielle du temps du séchage représente une alternative intéressante du point de vue économique étant donné que la lyophilisation, malgré tous ses avantages par rapport à la qualité, est un procédé onéreux.

D'autre part, l'étude d'autres microorganismes, températures d'entreposage et concentrations initiales de cellules pourraient être étudiés pour améliorer cette technique et la rendre une alternative intéressante pour la conservation des microorganismes.