

YANN DOLEYRES

**PRODUCTION EN CONTINU DE FERMENTS  
LACTIQUES PROBIOTIQUES PAR LA  
TECHNOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISÉES**

Thèse  
présentée  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)

Département des sciences des aliments et de nutrition

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

MARS 2003

© Yann Doleyres, 2003

## Résumé court

Pour produire des ferments lactiques contenant des bifidobactéries par des cellules immobilisées, des fermentations ont été réalisées avec une culture pure de bifidobactéries ou en culture mixte avec une souche de lactocoques. Une méthode a été développée pour localiser et quantifier par immunofluorescence les deux souches dans des billes de gel. L'utilisation de cette méthode a permis d'observer une croissance bactérienne préférentielle à la périphérie des billes. La production continue de culture mixte a été étudiée avec un système composé d'un premier réacteur (R1) contenant les deux souches immobilisées séparément dans des billes de gel et d'un second réacteur (R2) opéré avec les cellules libres relarguées de R1. Une culture mixte concentrée de composition stable a été produite à 35°C dans l'effluent de R2. La redistribution des souches dans les billes fut observée en microscopie confocale. La résistance à différents stress des cellules libres produites dans l'effluent des deux réacteurs a augmenté avec le temps de fermentation.

Yann Doleyres

Christophe Lacroix

Professeur

## Résumé long

Pour étudier la production de ferments lactiques contenant des bifidobactéries à l'aide de cellules immobilisées, des fermentations batch et continues ont été réalisées avec une culture pure de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 ou en culture mixte avec *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD. Lors de la production continue de *B. longum* à l'aide de cellules immobilisées à pH (5,5) et température (37°C) constants, les concentrations cellulaires maximales dans l'effluent ont été obtenues pour un taux de dilution de 0.5 h<sup>-1</sup>. Cependant, la productivité volumique maximale a été obtenue pour le taux de dilution le plus élevé (D=2.0 h<sup>-1</sup>) et fut approximativement 9,5 fois plus élevée que par fermentation batch avec cellules libres. Une nouvelle méthode utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques et la microscopie confocale a été développée pour détecter et quantifier spécifiquement les deux souches dans des billes de gel. Avec cette méthode, la croissance bactérienne lors de fermentations batch successives fut observée préférentiellement dans des couches périphériques des billes de 200 et 300 µm pour *L. diacetylactis* and *B. longum*. La production de cette culture mixte fut ensuite étudiée avec un système de fermentation continue composé d'un premier réacteur (R1) contenant des cellules des deux souches immobilisées séparément dans des billes de gel et d'un second réacteur (R2) opéré avec les cellules libres relarguées de R1. Une culture mixte concentrée a été produite avec un rapport de souches stable (22:1 *L. diacetylactis* / *B. longum*) à 35°C dans l'effluent de R2, mais la composition de la culture a été rapidement débalancée en faveur de *B. longum* à 37°C ou de *L. diacetylactis* à 32°C. La redistribution des souches dans les billes immobilisant à l'origine une culture pure fut observée dans une couche périphérique des billes de 100 µm. À la fin de la fermentation, le rapport cellulaire (7:1 *L. diacetylactis* / *B. longum*) dans l'effluent de R1 était identique à celui de billes individuelles. La résistance à différents stress des cellules libres produites dans l'effluent des deux réacteurs a augmenté avec le temps de fermentation et était généralement plus élevée après 6 jours que celle de cellules produites lors de fermentations batch avec cellules libres.

Yann Doleyres

Christophe Lacroix

Professeur

## Remerciements

Cette thèse représente quatre années de travail durant lesquelles l'appui et l'aide de plusieurs personnes ont facilité ma tâche.

J'adresse ma reconnaissance à mon directeur, Christophe Lacroix, pour ses conseils scientifiques judicieux, sa disponibilité exceptionnelle et la liberté d'action qu'il m'a laissé tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier mon codirecteur, Ismail Fliss, pour son intérêt porté à mon projet, son aide en immunologie et la mise à disposition de ses infrastructures.

Mes remerciements vont également au personnel et à mes collègues du Centre STELA ainsi qu'à ceux des laboratoires du département ALN et de microscopie confocale qui, par leur appui technique et leurs conseils, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je désire remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Novalait, les Producteurs laitiers du Canada et l'Institut Rosell-Lallemand pour leur soutien financier à travers le Réseau de recherche sur les Bactéries Lactiques.

Enfin, ce travail est l'aboutissement de longues années d'étude ici et ailleurs, auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille en Suisse ainsi qu'à Québec ont largement contribué.

## Avant-propos

Cette thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques. Pour satisfaire aux normes de la Faculté des études supérieures, les chapitres en anglais sont précédés d'un résumé en français.

Le chapitre 1, intitulé "Introduction générale", précise la problématique de la recherche et résume les connaissances actuelles sur les ferments lactiques et les bactéries qui les composent, ainsi que les défis à relever pour produire et exploiter les bactéries probiotiques. L'immobilisation cellulaire, avec une vue d'ensemble des techniques envisageables, est introduite comme méthode prometteuse de production de ferments lactiques probiotiques. Une synthèse des notions actuelles sur la dynamique microbienne des cellules immobilisées introduit le besoin de développer une méthode de détection des bactéries immobilisées dans des billes de gel de polysaccharide. Les effets de l'immobilisation cellulaire sur la physiologie et la morphologie des cellules sont finalement discutés. Suite à cette revue de littérature, les hypothèse, but et objectifs de recherche sont posés.

Le chapitre 2, intitulé "*Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium", étudie la capacité de la technologie des cellules immobilisées à produire une culture pure de bifidobactéries. Ce chapitre constitue la première étape dans le but de produire une culture mixte de bactéries lactiques et probiotiques avec des cellules immobilisées et a été publié dans le journal "Applied Microbiology and Biotechnology", **60** : 168-173, 2002. Céline Paquin et Murielle Leroy ont contribué activement à l'obtention de ces résultats. En plus d'effectuer certaines expériences, j'ai interprété les résultats et rédigé l'article scientifique en question.

Le chapitre 3, intitulé "Quantitative determination of the spatial distribution of pure and mixed-strain immobilized cells in gel beads by immunofluorescence", traite du développement et de l'application d'une méthode de localisation et de quantification de bactéries immobilisées dans des billes de gel dans le but de suivre la dynamique

microbienne complexe dans les billes de gel lors de la production de ferments lactiques mixtes à l'aide de cellules immobilisées. Cet article a été publié dans le journal "Applied Microbiology and Biotechnology", **59** : 297-302, 2002.

Le chapitre 4, intitulé "Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology" démontre la possibilité de produire en continu un ferment mixte modèle contenant une souche compétitive de bactéries lactiques et une souche non compétitive de bifidobactéries à l'aide d'un système de fermentation à deux étages avec cellules immobilisées. Le phénomène de contamination croisée est également observé grâce aux outils immunologiques développés dans le chapitre 3. Cet article a été soumis dans le journal "Biotechnology Progress".

Le chapitre 5, intitulé "Changes of lactic and probiotic culture characteristics during continuous immobilized-cell fermentation with mixed strains" traite des modifications physiologiques observées lors de la culture continue sur de longues périodes des cellules produites par la technologie d'immobilisation, en les comparant à des cellules produites de façon conventionnelle en fermentation batch avec cellules libres. Kathy Barbeau a effectué certaines manipulations en laboratoire lors d'un stage d'été. Ces résultats, conjointement aux travaux de mon collègue Dirk Bergmaier, ont conduit au dépôt d'un brevet provisoire intitulé "Control and modulation of probiotic culture characteristics with immobilized cell technology".

Finalement, une conclusion générale sous forme de 6<sup>ème</sup> chapitre présente les conclusions les plus importantes de cette étude, leur impact et les perspectives pour des travaux futurs.

## Table des matières

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RÉSUMÉ COURT .....</b>                         | <b>I</b>    |
| <b>RÉSUMÉ LONG.....</b>                           | <b>II</b>   |
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>                        | <b>III</b>  |
| <b>AVANT-PROPOS.....</b>                          | <b>IV</b>   |
| <b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>                   | <b>VI</b>   |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>                    | <b>XIII</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>                    | <b>XIV</b>  |
| <b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>    | <b>1</b>    |
| <i>1.1 PROBLÉMATIQUE .....</i>                    | <i>2</i>    |
| <i>1.2 REVUE DE LITTÉRATURE .....</i>             | <i>5</i>    |
| <i>1.2.1 Les bactéries lactiques .....</i>        | <i>5</i>    |
| 1.2.1.1 Les lactocoques .....                     | 6           |
| 1.2.1.2 Les bifidobactéries .....                 | 7           |
| 1.2.1.3 Les probiotiques .....                    | 8           |
| <i>1.2.2 Les ferments lactiques .....</i>         | <i>9</i>    |
| 1.2.2.1 Cultures mésophiles et thermophiles ..... | 10          |
| 1.2.2.2 Production de ferments lactiques .....    | 10          |
| 1.2.2.3 Les ferments probiotiques.....            | 11          |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.2.2.4 Critères de sélection des souches probiotiques .....  | 12        |
| <i>1.2.3 La technologie des cellules immobilisées .....</i>   | <i>13</i> |
| 1.2.3.1 Techniques d'immobilisation cellulaire .....  | 14        |
| 1.2.3.2 Immobilisation dans des billes de $\kappa$ -carraghénane / gomme de caroube ..  | 16        |
| 1.2.3.3 Distribution de la biomasse dans les billes de gel .....  | 17        |
| 1.2.3.4 Principe du relargage cellulaire des billes .....   | 18        |
| 1.2.3.5 Phénomène de contamination croisée .....  | 19        |
| 1.2.3.6 Immobilisation de cultures lactiques mixtes .....   | 20        |
| <i>1.2.4 L'immunofluorescence comme méthode de détection et de quantification de<br/>bactéries lactiques immobilisées .....</i> | <i>21</i> |
| 1.2.4.1 Rappels d'immunologie .....   | 21        |
| 1.2.4.2 Généralités sur la fluorescence .....   | 22        |
| 1.2.4.3 Définition et applications de l'immunofluorescence .....  | 23        |
| 1.2.4.4 Généralités sur les marqueurs fluorescents ALEXA 488 et ALEXA 56824   |           |
| 1.2.4.5 Détection par microscopie confocale des signaux immunofluorescents..  | 28        |
| 1.2.4.6 Quantification des signaux immunofluorescents .....   | 30        |
| <i>1.2.5 Physiologie des cellules immobilisées .....</i>  | <i>31</i> |
| <i>1.3 HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</i>   | <i>33</i> |
| <i>1.3.1 Hypothèse .....</i>  | <i>33</i> |
| <i>1.3.2 But .....</i>  | <i>33</i> |



|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 1.3.3   | <i>Objectifs spécifiques</i> .....                     | 33        |
| <br>  |  |           |
| <b>CHAPITRE 2 : BIFIDOBACTERIUM LONGUM ATCC 15707 CELL PRODUCTION DURING FREE- AND IMMOBILIZED-CELL CULTURES IN MRS-WHEY PERMEATE MEDIUM.....</b> |  | <b>35</b> |
| 2.1   | <i>RÉSUMÉ</i> .....                                    | 36        |
| 2.2   | <i>ABSTRACT</i> .....                                  | 37        |
| 2.3   | <i>INTRODUCTION</i> .....                              | 38        |
| 2.4   | <i>MATERIALS AND METHODS</i> .....                     | 40        |
| 2.4.1   | <i>Strain and culture conditions</i> .....             | 40        |
| 2.4.2   | <i>Free-cell batch fermentations</i> .....             | 40        |
| 2.4.3   | <i>Cell immobilization</i> .....                       | 40        |
| 2.4.4   | <i>Continuous immobilized-cell fermentation</i> .....  | 41        |
| 2.4.5   | <i>Viable cell enumeration</i> .....                   | 41        |
| 2.4.6   | <i>HPLC</i> .....                                      | 42        |
| 2.4.7   | <i>Statistical analysis</i> .....                      | 42        |
| 2.5   | <i>RESULTS</i> .....                                   | 43        |
| 2.5.1   | <i>Free-cell batch fermentations</i> .....             | 43        |
| 2.5.2   | <i>Immobilized-cell continuous fermentations</i> ..... | 44        |
| 2.6   | <i>DISCUSSION</i> .....                                | 46        |
| 2.6.1   | <i>Free-cell batch fermentations</i> .....             | 46        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.6.2 | <i>Immobilized-cell continuous fermentation</i> ..... | 47 |
|-------|---|----|

**CHAPITRE 3 : QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE SPATIAL DISTRIBUTION OF PURE AND MIXED-STRAIN IMMOBILIZED CELLS IN GEL BEADS BY IMMUNOFLUORESCENCE ..... 53**

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.1   | <i>RÉSUMÉ</i> .....  | 54 |
| 3.2   | <i>ABSTRACT</i> .....  | 55 |
| 3.3   | <i>INTRODUCTION</i> .....  | 56 |
| 3.4   | <i>MATERIALS AND METHODS</i> .....   | 57 |
| 3.4.1 | <i>Strains and medium</i> .....  | 57 |
| 3.4.2 | <i>Cell immobilization</i> .....   | 57 |
| 3.4.3 | <i>Fermentations</i> .....   | 57 |
| 3.4.4 | <i>Viable cell enumeration</i> .....   | 58 |
| 3.4.5 | <i>Total biomass determination by ELISA</i> .....  | 58 |
| 3.4.6 | <i>Confocal microscopy observations and quantitative analysis of spatial biomass distribution in beads</i> ..... | 59 |
| 3.5   | <i>RESULTS</i> .....   | 60 |
| 3.5.1 | <i>Single-strain fermentations</i> .....   | 60 |
| 3.5.2 | <i>Mixed-strain fermentations</i> .....  | 61 |
| 3.6   | <i>DISCUSSION</i> .....  | 63 |

**CHAPITRE 4 : CONTINUOUS PRODUCTION OF MIXED LACTIC STARTERS CONTAINING PROBIOTICS USING IMMOBILIZED CELL TECHNOLOGY.... 72**

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 4.1   | RÉSUMÉ.....   | 73        |
| 4.2   | ABSTRACT.....   | 74        |
| 4.3   | INTRODUCTION.....   | 75        |
| 4.4   | MATERIALS AND METHODS.....  | 77        |
| 4.4.1 | <i>Strains and medium</i> .....   | 77        |
| 4.4.2 | <i>Cell immobilization</i> .....  | 77        |
| 4.4.3 | <i>Fermentations</i> .....  | 77        |
| 4.4.4 | <i>Viable cell enumeration</i> .....  | 78        |
| 4.4.5 | <i>HPLC analysis</i> .....  | 79        |
| 4.4.6 | <i>Confocal microscopy observations and quantitative analysis of spatial biomass distribution in beads</i> .....                                    | 79        |
| 4.5   | RESULTS.....  | 80        |
| 4.5.1 | <i>Immobilized and free-cell counts</i> .....   | 80        |
| 4.5.2 | <i>Sugar and organic acid concentrations</i> .....  | 81        |
| 4.5.3 | <i>Biomass gradients and cross-contamination in gel beads</i> .....   | 82        |
| 4.6   | DISCUSSION.....   | 84        |
| 4.7   | CONCLUSION.....   | 89        |
|       | <b>CHAPITRE 5 : CHANGES OF LACTIC AND PROBIOTIC CULTURE CHARACTERISTICS DURING CONTINUOUS IMMOBILIZED-CELL FERMENTATION WITH MIXED STRAINS.....</b> | <b>97</b> |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 5.1    | <i>RÉSUMÉ</i> .....  | 98  |
| 5.2    | <i>ABSTRACT</i> .....  | 99  |
| 5.3    | <i>INTRODUCTION</i> .....  | 100 |
| 5.4    | <i>MATERIALS AND METHODS</i> .....                                       | 102 |
| 5.4.1  | <i>Strains and medium</i> .....  | 102 |
| 5.4.2  | <i>Cell immobilization</i> .....   | 102 |
| 5.4.3  | <i>Fermentations</i> .....   | 102 |
| 5.4.4  | <i>Viable cell enumeration</i> .....                                     | 103 |
| 5.4.5  | <i>Resistance to freeze-drying</i> .....                                 | 104 |
| 5.4.6  | <i>Tolerance to hydrogen peroxide</i> .....                              | 104 |
| 5.4.7  | <i>Sensitivity to simulated gastro-intestinal tract conditions</i> ..... | 104 |
| 5.4.8  | <i>Tolerance to antibiotics</i> .....                                    | 105 |
| 5.4.9  | <i>Sensitivity to nisin Z</i> .....                                      | 105 |
| 5.4.10 | <i>Reversibility of culture characteristics</i> .....                    | 106 |
| 5.4.11 | <i>Statistical analysis</i> .....  | 107 |
| 5.5    | <i>RESULTS</i> .....   | 108 |
| 5.5.1  | <i>Resistance to freeze-drying</i> .....                                 | 108 |
| 5.5.2  | <i>Tolerance to hydrogen peroxide</i> .....                              | 108 |
| 5.5.3  | <i>Sensitivity to simulated gastro-intestinal tract conditions</i> ..... | 109 |

|       |   |            |
|-------|---|------------|
| 5.5.4 | <i>Tolerance to antibiotics</i> .....                 | 110        |
| 5.5.5 | <i>Sensitivity to nisin Z</i> .....                   | 111        |
| 5.5.6 | <i>Reversibility of culture characteristics</i> ..... | 112        |
| 5.6   | <i>DISCUSSION</i> .....                               | 113        |
|       | <b>CHAPITRE 6 : CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....         | <b>128</b> |
|       | <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....                            | <b>133</b> |

## Liste des tableaux

|  |     |
|--|-----|
| <i>Table 2.1 : Residual sugar concentrations and biomass and acid productions after 12 h culture during B. longum ATCC 15707 pH-controlled batch fermentations in MRS medium with or without whey permeate supplementation.....</i>  | 49  |
| <i>Table 2.2 : Residual sugar concentrations and biomass and acid productions during continuous fermentation of MRS-WP at pH=5.5 with immobilized cells of B. longum ATCC 15707 in gellan gum gel beads as a function of dilution rate.....</i>                                    | 50  |
| <i>Table 4.1 : Change of the strain ratio in individual beads originally immobilizing a pure culture of B. longum or L. diacetylactis during continuous pH-controlled fermentation with immobilized cells at different temperatures.....</i>                                       | 90  |
| <i>Table 5.1 : Inhibition diameters (mm) measured by the disc assay method of different antibiotics on L. diacetylactis MD and B. longum ATCC 15707 produced during FC batch culture (control) or after 15 days continuous IC fermentation in the effluent of reactor R2. ....</i> | 120 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <i>Figure 1.1</i> : Diagramme de Jablonski illustrant la création d'un état excité, les réarrangements conformationnels de la molécule excitée et l'émission subséquente de fluorescence suite à l'excitation d'un fluorochrome par un rayonnement externe .....         | 22 |
| <i>Figure 1.2</i> : Spectres d'excitation et d'émission du marqueur fluorescent ALEXA 488 (ALEXA 488 labelling kit, Molecular Probes).....   | 26 |
| <i>Figure 1.3</i> : Spectres d'excitation et d'émission du marqueur fluorescent ALEXA 568 (ALEXA 568 labelling kit, Molecular Probes).....   | 26 |
| <i>Figure 1.4</i> : Structure chimique du marqueur fluorescent ALEXA 488 (ALEXA 488 labelling kit, Molecular Probes) .....   | 27 |
| <i>Figure 1.5</i> : Structure chimique du marqueur fluorescent ALEXA 568 (ALEXA 568 labelling kit, Molecular Probes) .....   | 27 |
| <i>Figure 1.6</i> : Arrangement optique du microscope confocal.....  | 28 |
| <i>Figure 1.7</i> : Faisceaux incidents et réfléchis de la lumière fluorescente dans un microscope confocal .....  | 29 |
| <i>Figure 2.1</i> : Viable cell counts during free-cell batch fermentations of <i>B. longum</i> ATCC 15707 in MRS-WP at pH=5.0 (▲), 5.5 (×), 6.0 (◆), 6.5 (Δ) and without pH control (◇), or in unsupplemented MRS medium at pH=5.5 (□). .....                           | 51 |
| <i>Figure 2.2</i> : Lactose (▲), glucose (■), galactose (◆), lactic (□) and acetic (◇) acid concentrations determined by HPLC analysis during free-cell pH-controlled (pH=5.5) batch fermentations of <i>B. longum</i> ATCC 15707 in MRS medium (a) or in MRS-WP (b). .. | 52 |
| <i>Figure 3.1</i> : Detection of <i>L. diacetylactis</i> colonies in gel beads using specific polyclonal antibodies, confocal microscopy, and bead image analysis for determination of spatial biomass distribution .....  | 66 |

**Figure 3.2** : Total biomass concentration determined by ELISA ( $\circ$ , log cells/g) and viable-cell counts in beads ( $\square$ , log CFU/g) and broth ( $\diamond$ , log CFU/ml) during repeated pH-controlled batch fermentations (B1 to B3) with immobilized *L. diacetylactis* (a) or *B. longum* (b) ..... 67

**Figure 3.3** : Mean biomass concentration profiles (5 beads) during repeated pH-controlled batch fermentations (B1 to B3) with immobilized *L. diacetylactis* (a) or *B. longum* (b) .... 68

**Figure 3.4** : Effects of bead numbers on biomass concentration in *L. diacetylactis* beads. 69

**Figure 3.5** : Total biomass concentration determined by ELISA ( $\bullet$ ,  $\circ$ , log cells/g) and viable cell counts in beads ( $\blacksquare$ ,  $\square$ , log CFU/g) and broth ( $\blacklozenge$ ,  $\lozenge$ , log CFU/ml) during repeated pH-controlled (pH=6.2) batch fermentations (B1 to B4) with co-immobilized *B. longum* (dark symbols) and *L. diacetylactis* (open symbols) (ratio 9:1 in the inoculum) ..... 70

**Figure 3.6** : *L. diacetylactis* (a) and *B. longum* (b) concentration profiles in beads during repeated pH-controlled batch fermentations (B1 to B4) with co-immobilized strains ..... 71

**Figure 4.1** : Viable-cell counts in beads ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ; CFU/g) and effluents of R1 ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ; CFU/ml) and R2 ( $\lozenge$ ,  $\blacklozenge$ ; CFU/ml) during the continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* (dark symbols) and *B. longum* (open symbols). ..... 91

**Figure 4.2** : Lactic (dark symbols) and acetic (open symbols) acid concentrations in effluents of R1 ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) and R2 ( $\lozenge$ ,  $\blacklozenge$ ) determined by HPLC analysis during the continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* and *B. longum* ..... 92

**Figure 4.3** : Lactose ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ), glucose ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ), and galactose ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) concentrations in effluents of R1 (dark symbols) and R2 (open symbols) determined by HPLC analysis during the continuous pH-controlled fermentation with immobilized cells of *L. diacetylactis* and *B. longum* ..... 93



**Figure 4.4** : Confocal microscopy observation of half-beads originally immobilizing a pure culture of *B. longum* (a) or *L. diacetylactis* (b) after 14-day continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* and *B. longum* ..... 94

**Figure 4.5** : Specific biomass occupation profiles of *L. diacetylactis* and *B. longum* in beads originally immobilizing a pure culture of *B. longum* (a) or *L. diacetylactis* (b) after 14 days continuous pH-controlled immobilized-cell fermentation. .... 95

**Figure 4.6** : Confocal microscopy observation of half-bead after 14-day continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* and *B. longum* ..... 96

**Figure 5.1** : *B. longum* (■) and *L. diacetylactis* (□) cell survival during freeze-drying of control (batch FC culture) and experimental (continuous two-stage IC fermentation) cultures for different culture times ..... 121

**Figure 5.2** : *B. longum* (■; □) and *L. diacetylactis* (▲; △) cell survival to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) of control (batch FC culture, dark symbols), and experimental (continuous two-stage IC fermentation, open symbols) cultures ..... 122

**Figure 5.3** : Cell survival to simulated gastric and duodenal juices for *B. longum* (a) and *L. diacetylactis* (b) from control (batch FC culture, □) and experimental (continuous two-stage IC fermentation) cultures, for reactors R1 (▨ = gastric juice; ■ = duodenal juice) and R2 (□ = gastric juice; ▩ = duodenal juice) and different culture times ..... 123

**Figure 5.4** : Tolerance to chloramphenicol of *B. longum* (a) and *L. diacetylactis* (b) cells produced during batch FC culture (control, □) or during continuous IC fermentation in reactors R1 (■) and R2 (□) at different culture times ..... 124

**Figure 5.5** : Tolerance to different nisin Z concentrations of cells produced during batch FC culture (control, ●) or after 3 (□), 6 (■), 9 (△), 12 (▲), or 15 (○) days continuous IC fermentation: a) *B. longum* in reactor R1 ; b) *L. diacetylactis* in reactor R1 ; c) *B. longum* in reactor R2 ; d) *L. diacetylactis* in reactor R2 ..... 125

**Figure 5.6** : Inhibition diameter (mm) measured by the disc assay method for different antibiotics (□ = ampicillin; ▤ = bacitracin; ■ = penicillin; ▨ = chloramphenicol) on *B. longum* (a) and *L. diacetylactis* (b) cells produced after successive batch FC cultures, inoculated (2%) with a culture sampled from reactor R2 after 15 days continuous IC fermentation ..... 127

# **CHAPITRE 1: Introduction générale**

## 1.1 Problématique

Les bactéries lactiques sont utilisées dans de nombreux produits laitiers dont les laits fermentés, les fromages et les yogourts. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés aromatiques. Les bactéries lactiques inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs telles les bactériocines (Piard et Desmazeaud, 1991, 1992) et en abaissant le pH par la production d'acide lactique (Gilliland, 1985b).

Les ferments lactiques sont traditionnellement produits par fermentation discontinue appelée également fermentation «batch» (Gilliland, 1985b). L'accumulation de produits toxiques, principalement l'acide lactique non dissocié et le lactate, est un facteur important limitant la production de levains lactiques par cette technologie. Les cultures en continu permettent d'éviter ce problème par l'emploi de taux de dilution adéquats mais présentent des risques importants de contamination et de perte d'activité enzymatique. D'autre part, en culture mixte, les interactions entre les souches peuvent conduire à l'élimination d'une ou plusieurs souches dans le bioréacteur (Hugenholtz et Veldkamp, 1985).

La fabrication en continu de ferments lactiques par des cellules immobilisées est prometteuse. En effet, cette technologie permet d'augmenter la productivité grâce aux opérations en continu, à la haute densité cellulaire maintenue dans les réacteurs et à la réutilisation des biocatalyseurs (Groboillot et al., 1994). En outre, l'importante concentration de biomasse dans les billes augmente les vitesses de réaction et limite les risques de contamination (Champagne et al., 1994). De plus, l'immobilisation cellulaire augmente la stabilité plasmidique (D'Angio et al., 1994; Huang et al., 1996) et, dans l'immobilisation de différentes bactéries lactiques, permet d'obtenir un équilibre stable entre les populations relarguées (Sodini-Gallot et al., 1995; Lamboley, 1998).

Les bifidobactéries sont des bactéries probiotiques qui, une fois ingérées en quantité suffisante dans l'organisme, exercent des effets bénéfiques pour la santé allant au-delà des vertues nutritives de base (Schaafsma, 1996). L'incorporation de telles bactéries dans les

produits laitiers fermentés intéresse par conséquent grandement les industriels mais leur faible compétitivité en culture mixte est un frein au développement de nouveaux produits. L'immobilisation cellulaire dans des billes de gel de polysaccharide pourrait être une solution pour l'incorporation de souches de bifidobactéries dans les ferments traditionnels. Cette technique permet, par la forte croissance bactérienne dans les billes et les tensions intrinsèques qu'elle provoque, les forces de cisaillement dans le réacteur agité et les nombreuses collisions entre billes, la fuite des bactéries immobilisées à la surface des billes dans le milieu liquide. Afin d'évaluer le potentiel d'un tel système pour produire des cultures lactiques contenant des bifidobactéries, le suivi spécifique d'une souche de bifidobactérie en culture mixte avec une souche de lactocoque utilisée couramment dans les ferments traditionnels doit être effectué dans le cadre d'une production avec cellules immobilisées d'un ferment probiotique modèle composé de deux souches.

Par ailleurs, si les conditions de fermentation (pH, température, nature de la base, composition du milieu) sur la production de ferments en culture discontinue ont été étudiées (Gilliland, 1985b), l'influence de ces paramètres sur le comportement des cellules immobilisées en culture mixte en fermentation continue a très peu été rapportée (Lamboley, 1998). Ce procédé s'est révélé approprié pour la production de ferments de composition et activité contrôlées et a montré une haute stabilité biologique (Lamboley, 1998). Cependant, un phénomène de contamination croisée dans les billes immobilisant à l'origine des cultures pures et résultant de la dynamique microbienne complexe du système a été mis en évidence lors de cette étude. Ce phénomène avait été observé dans le même temps lors de la pré-acidification en continu du lait (Sodini et al., 1997).

Par conséquent, un des objectifs de ce travail a été de démontrer et d'étudier, lors de la production de ferments en continu avec une culture mixte immobilisée, la contamination croisée des billes dans un système modèle composé d'une souche compétitive (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) et d'une souche non compétitive (*Bifidobacterium longum*) immobilisées séparément dans des billes de gel de  $\kappa$ -carraghénane/gomme de caroube. En effet, la compréhension des phénomènes de relargage cellulaire des bactéries de la périphérie des billes de gel dans le milieu externe et de contamination croisée est

fondamentale dans l'optique d'une application industrielle des cultures mixtes immobilisées afin de produire en continu des ferments de composition voulue. La dynamique de redistribution des souches qui se produit dans les billes doit être comprise et contrôlée car les bactéries immobilisées constituent le réservoir de biomasse qui sert à la production de ferment.

L'immobilisation cellulaire résulte en des modifications physiologiques et morphologiques par rapport aux cellules en suspension. Certaines études très récentes se sont concentrées sur l'impact de l'immobilisation cellulaire sur des caractéristiques aussi diverses que la tolérance aux produits du métabolisme bactérien et aux produits de nettoyage (Krishnan et al., 2001; Trauth et al., 2001). Des modifications morphologiques ont par ailleurs été également observées avec différents micro-organismes (Kiy et Tiedtke, 1993; Krishnan et al., 2001; Bergmaier, 2002). Cependant, aucune étude n'a, à ce jour, été rapportée sur les conséquences de l'immobilisation cellulaire sur des caractéristiques technologiques de souches importantes pour la production de ferments lactiques, ainsi que sur les caractéristiques probiotiques des bifidobactéries.

Ainsi, le dernier objectif de ce travail a visé à étudier certaines caractéristiques physiologiques des cellules immobilisées dans des billes de gel de polysaccharide lorsqu'elles sont cultivées sur de longues périodes pour la production de ferments lactiques modèles. Des cellules de *B. longum* et de *L. diacetylactis* produites lors de fermentations 'batch' conventionnelles avec cellules libres et lors de fermentation continue avec cellules immobilisées ont été comparées pour leur tolérance à différents stress. Dans ce but d'importantes propriétés technologiques des souches telles que la résistance à la lyophilisation, au peroxyde d'hydrogène et à la nisine mais également des caractéristiques probiotiques telles que la survie au tractus gastro-intestinal simulé et la tolérance aux antibiotiques ont été étudiées.

## 1.2 Revue de littérature

### 1.2.1 LES BACTÉRIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram +, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994).

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique.

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière.

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers en Amérique du Nord (Champagne, 1998). Le rôle principal des bactéries lactiques est la production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique du fromage. En effet, la production d'acide facilite la coagulation des protéines par la présure ainsi que la synérèse. L'abaissement du pH limite aussi la croissance des bactéries indésirables (Gilliland, 1985a). Enfin, la production d'acide lactique intervient également sur le goût des produits fermentés, soit directement dans les

produits frais, soit indirectement en agissant sur les activités enzymatiques pendant l'affinage.

Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le  $H_2O_2$  doit être éliminé sinon son accumulation devient toxique. Le système le plus efficace d'élimination du  $H_2O_2$  est une enzyme nommée catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes. Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme micro-aérophiles.

Les bactéries lactiques aromatisantes comme *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produisent des composés aromatisants qui contribuent au goût des produits frais et à la production de  $CO_2$  responsable d'ouvertures dans le fromage. Enfin, certaines bactéries lactiques produisent des exopolysaccharides qui influencent l'aspect et la texture des produits fermentés, ainsi que du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines inhibant la croissance de bactéries indésirables.

### **1.2.1.1 Les lactocoques**

Les lactocoques se retrouvent principalement dans les laits et crèmes fermentés ainsi que dans les fromages où ils sont en quantité dominante et dans lesquels ils jouent un rôle irremplaçable en contribuant à la structure et au goût et en assurant la conservation et la salubrité des produits.

Les lactocoques se présentent sous forme de coques et forment des chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), anaérobies facultatives à micro-aérophiles. Leur température de croissance optimale est proche de 30°C. Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9.6 (Dellaglio et al., 1994). Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces dont les trois types suivants



sont utilisés en fabrication fromagère : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Le type *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* possède un plasmide encodant la dégradation du citrate en diacétyl, molécule aromatique responsable de l'arôme du beurre. Les autres caractères biochimiques sont une croissance à 40°C, en présence de NaCl 4%, et à pH 9.2.

### 1.2.1.2 Les bifidobactéries

La découverte des bifidobactéries remonte au début du siècle lorsque Henri Tissier les a isolées de selles d'enfants nourris au lait maternel (Tissier, 1900). Les bifidobactéries sont des bâtonnets à Gram positif aux formes variées, non motiles, non sporulants et en général anaérobies strictes qui composent la presque totalité (85 à 99%) de la flore intestinale d'un enfant. Ces bactéries jouent un rôle majeur dans l'équilibre et la stabilité de la flore intestinale, d'où l'appellation de culture probiotique (Hekmat et McMahon, 1992). Une diminution des bifidobactéries au profit des clostridies, des lactobacilles, des streptocoques et des entérobactéries est cependant observée tout au long de la vie. De plus, les espèces et les biovariétés typiques de l'adulte remplacent celles de l'enfant. Ces modifications seraient en partie imputables à l'évolution du régime alimentaire (Gournier-Chateau et al., 1994).

Parmi les 32 espèces de bifidobactéries répertoriées, 10 sont considérées comme étant d'origine humaine, alors que les autres sont isolées dans les matières fécales d'animaux divers (Curk et al., 1994). *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis* et *B. breve* ont été les plus étudiées à cause de leur aptitude à fermenter le lait ou à être incorporées dans les aliments (Modler et al., 1990; Hekmat et McMahon, 1992; Blanchette et al., 1996; Shah, 1997; Gobetti et al., 1998; Rosenthal et Bernstein, 1998; Stanton et al., 1998). Les conditions optimales de croissance des bifidobactéries se situent à des températures comprises entre 37°C et 41°C, et à des valeurs de pH comprises entre 6.5 et 7. Aucune croissance n'est observée à des températures inférieures à 25°C et supérieures à 45°C et à des valeurs de pH inférieures à 4.5 ou supérieures à 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).

### **1.2.1.3 Les probiotiques**

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou "probiotiques" (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yoghourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques. La propagation des bifidobactéries est cependant problématique du fait de leur grande sensibilité à l'oxygène, de leur faible tolérance aux acides issus de leur métabolisme et de leurs exigences nutritionnelles (Modler et al., 1990). L'utilisation du terme probiotique remonte à 1965 et fait référence à toute substance ou organisme qui contribue à l'équilibre dans l'intestin (Lilly et Stillwell, 1965), principalement chez les animaux d'élevage. Plus récemment, les probiotiques ont été définis comme des organismes vivants qui, après ingestion en certaines quantités, exercent des effets bénéfiques pour la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de base (Schaafsma, 1996). Cette révision souligne la nécessité d'une population suffisante de micro-organismes vivants et indique précisément que les bienfaits peuvent être une amélioration de l'équilibre microbien aussi bien que d'autres effets sur l'organisme, immunomodulateurs par exemple.

Les bifidobactéries, hôtes naturels des intestins de l'homme et des animaux à sang chaud, ont des propriétés nutritionnelles et thérapeutiques aujourd'hui reconnues. En effet, parmi ces effets, on note le contrôle de la flore intestinale et l'inhibition de la croissance de nombreux pathogènes et bactéries putréfiantes, la régulation du transit intestinal, l'amélioration de l'intolérance au lactose et des allergies alimentaires aux caséines laitières, certaines propriétés anticancérigènes, anticholestérolémiques et antidiarrhéiques ainsi qu'une stimulation du système immunitaire (Modler et al., 1990; Gournier-Chateau et al., 1994; Salminen et Saxelin, 1996; Tannock, 1997).

Cependant, pour exercer une influence positive sur l'organisme, les bactéries lactiques probiotiques doivent survivre en quantité suffisante au passage à travers le tractus digestif supérieur pour pouvoir coloniser l'intestin. Des travaux *in vitro* effectués lors d'une étude portant sur l'incorporation de bifidobactéries dans des yogourts glacés ont montré que les cellules pouvaient résister pendant deux heures à une concentration en sels biliaires de 0.45%, mais pas à de l'acide chlorhydrique 0.1 N (Holcomb et al., 1991). Il semblerait toutefois que la résistance à l'environnement stomacal dépende de la souche de bifidobactéries utilisée, certaines souches pouvant résister jusqu'à 90 minutes à pH 3 (Berrada et al., 1991). Des différences marquées de tolérance aux conditions présentes lors de la digestion ont par ailleurs été observées parmi six souches de *Lactobacillus acidophilus* et neuf souches de bifidobactéries (Lankaputhra et Shah, 1995). Les résistances aux sels biliaires et à l'acidité des sucs gastriques constituent par conséquent deux caractéristiques importantes à prendre en compte lors de la sélection des cultures probiotiques pour une utilisation dans les produits laitiers fermentés.

D'autre part, une propriété importante des bactéries probiotiques réside dans leur capacité à adhérer aux parois intestinales. En effet, ceci leur confère une compétitivité avantageuse dans le but de résider à long terme dans le gros intestin. *Lactobacillus casei* GG a ainsi exprimé *in vitro* des facteurs d'adhérence qui permettent à cette souche de multiples interactions avec les cellules épithéliales humaines (Elo et al., 1991).

## 1.2.2 LES FERMENTS LACTIQUES

Depuis une époque immémoriale, l'Homme a mis à profit les principes de la fermentation afin de conserver ses aliments, qu'ils soient à base de lait, de viande, de fruits ou de légumes. En fait, bien avant que l'on soupçonne leur présence, les micro-organismes étaient employés pour la fabrication de produits fermentés, tels la choucroute, le yogourt et les fromages.

En fromagerie par exemple, l'acidification s'effectuait à partir du lait cru qu'on laissait fermenter spontanément par des bactéries qui avaient contaminé le lait à la ferme ou à la

fromagerie. Vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, certains chercheurs démontrèrent qu'il était possible de fabriquer des produits de qualité constante en utilisant des cultures pures de micro-organismes. Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés. Parmi ces cultures, on distingue les ferments naturels, souvent des mélanges de nombreuses souches de bactéries dont la composition exacte est indéterminée des ferments mixtes, composés de cinq ou six souches soigneusement sélectionnées et cultivées séparément jusqu'au stade de culture mère ou de ferment. Au cours de la fermentation, les bactéries se multiplient et produisent des composés conférant à l'aliment ses propriétés organoleptiques comme l'acidité, la saveur, l'arôme et la texture.

#### **1.2.2.1 Cultures mésophiles et thermophiles**

On a recours aux cultures mésophiles pour la fabrication de fromages aussi variés que le cheddar, gouda, édam, bleu et camembert, ainsi que pour les pâtes fraîches. Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance proche de 30°C et comprennent toujours des souches de *L. cremoris* et de *L. lactis* (ferments de type O; Cogan, 1980). A ces souches peuvent s'ajouter *L. diacetylactis* (ferment de type D) ou *Leuconostoc* (ferment de type L), bactéries dites aromatisantes de par leur synthèse de diacétyle. Ainsi un ferment DL est un ferment composé d'un mélange de *L. cremoris*, *L. lactis*, *L. diacetylactis* et de *Leuconostoc*. Certaines cultures (lactobacilles, bifidobactéries, *Streptococcus thermophilus*) sont appelées thermophiles dans le secteur laitier car leur température optimale de croissance se situe entre 37 et 47°C.

#### **1.2.2.2 Production de ferments lactiques**

Les bactéries lactiques sont traditionnellement propagées en cuve fermée, par fermentation discontinue ou «batch» (Gilliland, 1985b). Dans ce cas, le milieu de culture est initialementensemencé et n'est pas renouvelé jusqu'à la fin de la fermentation. Le principal facteur limitant la production de ferments lactiques par cette technique réside dans l'accumulation de produits toxiques du métabolisme bactérien, principalement l'acide lactique non dissocié

et le lactate. En effet, même avec un milieu de culture encore suffisamment riche et des conditions de température et de pH favorables, la présence de ces composés à une certaine concentration inhibe la croissance des bactéries lactiques. Cette technique peut être utilisée pour propager des cultures pures ou mixtes. Dans ce dernier cas, le contrôle de la population de chacune des souches est plus délicat mais il permet une réduction des besoins d'équipement par rapport au mode de propagation en cultures pures suivi d'un mélange pour obtenir la culture mixte désirée.

Les fermentations continues utilisent des systèmes dans lesquels la cuve est continuellement alimentée en milieu de culture frais alors que le milieu fermenté est retiré avec le même débit. Cette technologie est encore peu utilisée en milieu industriel mais offre de nombreux avantages comparativement aux cultures discontinues. Elle permet en effet d'éviter le problème d'accumulation de produits inhibiteurs par l'emploi de taux de dilution adéquats et d'augmenter la productivité de l'installation. Cependant, les risques de contamination sont plus importants et, en culture mixte, les interactions entre les souches et leur différente compétitivité peuvent conduire rapidement à l'élimination d'une ou plusieurs souches dans le bioréacteur. Par ailleurs, les cultures continues nécessitent des équipements plus complexes ainsi qu'un travail en aval adapté.

### **1.2.2.3 Les ferments probiotiques**

Bien que le premier lait fermenté par des bifidobactéries ait été mis sur le marché il y a près de 50 ans, le domaine des aliments probiotiques ne s'est développé que dans les années 1970 (Tamime et al., 1995). En 1997, plus de 70 produits laitiers industriels tels que des laits fermentés, du fromage blanc, du babeurre et des desserts surgelés contenaient des bactéries probiotiques, dont plus de la moitié au Japon (Shah, 1997). Aujourd'hui, les marques LC1 (Nestlé), Vifit (Campina Melkunie), Actimel (Danone) et Yakult ont émergé comme des chefs de file dans les yogourts et laits fermentés probiotiques (Stanton et al., 2001). Par ailleurs, les laits fermentés 'AB milk' et 'Cultura' contenant *L. acidophilus* et *B. bifidum* sont très populaires au Danemark (Tamime et al., 1995). D'autres produits comme les yogourts acidophilus-bifidus (contenant *L. acidophilus* et *B. bifidum*, ou *B. longum* et

les ferments du yogourt), les laits ‘Bifidus’ (*B. bifidum* ou *B. longum*), ‘Biogarde’ (*L. acidophilus*, *B. bifidum* et *S. thermophilus*), ‘Biomild’ (*L. acidophilus* et *Bifidobacterium* spp.) en Allemagne et les laits ‘Diphilus’ (*L. acidophilus* et *B. bifidum*) et ‘Ophilus’ (*L. acidophilus*, *B. bifidum*, et *S. thermophilus*, ou *L. acidophilus*, *B. bifidum*, et *L. cremoris*) en France ne sont que quelques exemples de l’utilisation variée des bifidobactéries comme bactéries probiotiques dans des ferments mixtes en combinaison avec *L. acidophilus* ou les ferments du yogourt (*L. bulgaricus* et *S. thermophilus*) (Tamime et al., 1995). Les bifidobactéries peuvent être utilisées seules mais sont souvent associées à des bactéries lactiques pour des raisons organoleptiques et technologiques (Saloff-Coste, 1997). De plus, la présence de bactéries protéolytiques, en particulier *L. bulgaricus*, favorise la croissance des bifidobactéries.

Cependant, pour la production du ferment mixte probiotique, les bifidobactéries ne peuvent pas être propagées conjointement aux bactéries lactiques en raison de leur faible compétitivité en culture mixte. Ainsi, pour assurer une quantité de bactéries probiotiques suffisante dans les produits fermentés, les ferments probiotiques commerciaux consistent en des cultures pures de bifidobactéries mélangées aux cultures lactiques au moment de la fabrication du produit ou encore directement ajoutées au produit fermenté à la concentration finale recherchée. Cette limite économique et matérielle justifie le développement d’une nouvelle technologie de production de culture mixte contenant des souches plus ou moins compétitives.

#### **1.2.2.4 Critères de sélection des souches probiotiques**

Alors que les bactéries lactiques sont principalement sélectionnées pour leurs activités acidifiantes et protéolytiques dans les ferments classiques, d’autres propriétés doivent être étudiées dans le cas des probiotiques. Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent, comme pour les ferments classiques, survivre en grand nombre au procédé de fabrication, à la lyophilisation éventuelle et à l’entreposage qui s’en suit. Il est en effet généralement admis qu’un nombre minimal de  $10^7$  cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique (Ishibashi et Shimamura, 1993).

Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées. De plus, ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité (Mattila-Sandholm et al., 2002). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des cellules en phase stationnaire de croissance, plus tolérantes aux stress environnementaux que des cellules en phase exponentielle, devraient être privilégiées pour la confection de produits contenant des probiotiques en grand nombre (Kolter, 1993; Hartke et al., 1994; Rallu et al., 1996; Heller, 2001). Les interactions possibles entre bactéries lactiques et probiotiques devraient également être prises en compte pour sélectionner la meilleure combinaison de souches afin d'optimiser le procédé et la survie cellulaire dans le produit entreposé (Vinderola et al., 2002).

Enfin, ces bactéries probiotiques devraient être capable de survivre en grand nombre aux conditions acides de l'estomac et aux sels biliaires de l'intestin lors de la consommation du produit, puis d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin afin de produire les effets bénéfiques désirés le plus longtemps possible (Tamime et al, 1995).

Certaines études ont cependant montré que le consommation de probiotiques non-viables peut aussi engendrer des effets bénéfiques sur le système immunitaire (Ouweland et Salminen, 1998; Salminen et al., 1999). Dans de tels cas, il suffit alors d'obtenir de grandes concentrations de probiotiques dans le produit durant la période initiale de production sans nécessairement conserver une bonne viabilité durant l'entreposage.

### 1.2.3 LA TECHNOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISÉES

L'immobilisation cellulaire consiste à retenir et localiser des cellules microbiennes dans un espace précis du système de fermentation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active (Karel et al., 1985). Bien que cette technologie semble nouvelle dans l'industrie laitière, la production traditionnelle de kéfir repose sur ce principe (Champagne et al., 1994). En effet les grains de kéfir sont composés d'un mélange insoluble de levures et de

bactéries lactiques servant à inoculer le lait et initier sa fermentation. Par la suite, les grains sont récupérés afin d'initier d'autres réactions. De nouveaux procédés utilisant la technologie des cellules immobilisées ont été étudiés pour les fermentations laitières comme par exemple l'inoculation-préfermentation continue du lait pour la production de fromage frais (Sodini et al., 1997) ou de yogourt (Prévost et al., 1985), et pour la production de ferments lactiques mésophiles (Lamboley, 1998).

Cette technologie, comparativement aux systèmes à cellules libres, permet d'augmenter la productivité grâce aux opérations en continu, à la haute densité cellulaire maintenue dans les réacteurs et à la réutilisation des biocatalyseurs (Groboillot et al., 1994). De plus, l'immobilisation cellulaire limite les risques de contamination (Champagne et al., 1994), augmente la stabilité plasmidique (D'Angio et al., 1994; Huang et al., 1996) et, dans l'immobilisation de différentes bactéries lactiques, permet d'obtenir un équilibre stable entre les populations relarguées (Sodini-Gallot et al., 1995).

### **1.2.3.1 Techniques d'immobilisation cellulaire**

Les différents moyens d'immobiliser des cellules bactériennes comprennent l'attachement à des surfaces, l'inclusion dans des matrices poreuses, la rétention derrière des barrières (membranes), la floculation et l'encapsulation. L'inclusion dans une matrice de polymère et l'utilisation de membranes sont actuellement les techniques les plus étudiées pour la production de ferments lactiques.

#### *1.2.3.1.1 Immobilisation dans des réacteurs à membrane*

La technologie des réacteurs à membrane consiste à coupler un fermenteur à une unité d'ultrafiltration ou de microfiltration. Les cellules ne sont alors pas immobilisées dans une matrice mais retenues dans le système de fermentation permettant la diffusion de composés solubles de petite taille, selon la porosité de la membrane choisie. Le renouvellement continu du milieu de culture fermenté par addition de milieu frais dans le système permet de diminuer l'inhibition par les produits du métabolisme bactérien. Des densités cellulaires 10 fois plus élevées qu'en fermentation batch classique peuvent alors être obtenues



(Taniguchi et al., 1987a; 1987b; Prigent et al., 1988; Corre et al., 1992). Ceci permet par conséquent d'éliminer les étapes de concentration de biomasse habituellement effectuées après la production. Cependant, au delà d'une certaine concentration cellulaire, l'activité métabolique est inhibée (Blanc et Goma, 1989). De plus, l'activité des ferments lactiques produits dans un tel réacteur est faible (Prigent et al., 1988, Bibal et al., 1991). Ceci serait dû au stress relié au pompage du milieu fermenté à travers la membrane de filtration. Enfin, la stabilité à long terme du procédé est limitée par l'encrassement des membranes (Blanc et Goma, 1989; Gonçalves et al., 1992; Musale et Kulkarni, 1998).

#### 1.2.3.1.2 *Adsorption à un support préformé*

L'immobilisation cellulaire par adsorption à une matrice préformée ou support solide est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces. Cette technique imite l'environnement naturel des bactéries presque toujours associées à des surfaces et se développant en biofilms (Dunne, 2002). L'adsorption est obtenue par la mise en contact du support et des cellules actives pendant une période définie dans le bioréacteur. Un choix judicieux de support inerte ne nécessitant pas d'agent chimique pour l'adsorption permet une immobilisation dans des conditions douces résultant en une viabilité élevée des cellules immobilisées. En général les difficultés de diffusion de substrats et de produits d'inhibition sont moindres dans des systèmes à cellules adsorbées par rapport aux techniques plus répandues d'immobilisation dans des billes de gel. Les supports sont également plus résistants aux forces de cisaillement produites par l'agitation des réacteurs. L'inconvénient principal réside dans la vulnérabilité du biofilm faiblement attaché au support et au détachement qui peut s'en suivre (Groboillot et al., 1994). Néanmoins, de fortes concentrations de cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ( $8.5 \times 10^{11}$  CFU/ml support solide) ont été obtenues par ce moyen lors de la production d'exopolysaccharides (Bergmaier, 2002).

#### 1.2.3.1.3 *Immobilisation dans des matrices poreuses*

Le procédé d'immobilisation cellulaire le plus répandu consiste à inclure une culture bactérienne dans une matrice poreuse par la gélification d'une solution de polymère

( $\kappa$ -carraghénane, gomme de gellan, agarose, gélatine, alginate, chitosane). Ces polymères sont facilement disponibles et largement acceptés comme additifs alimentaires dans l'industrie. Comme les matrices d'immobilisation résultent en des limitations de transfert de masse, les billes de gel sont en général préférées aux films grâce à leur géométrie sphérique augmentant la surface (Groboillot et al., 1994). Les billes de gel sont produites en utilisant des méthodes d'extrusion ou d'émulsification suivies d'une étape de durcissement par abaissement de température ou l'ajout d'un agent gélifiant. Dans le cas de la méthode par extrusion, la solution liquide de polymère/culture bactérienne est extrudée par une seringue engendrant des gouttes sphériques qui tombent dans une solution de durcissement. La technique par émulsion fait par contre intervenir la dispersion de cette phase aqueuse de cellules/polymère dans une phase organique, résultant en un émulsion eau dans huile. Les gouttes aqueuses dispersées sont par la suite durcies par abaissement de température ou par l'ajout d'un agent gélifiant. La technique d'émulsion permet d'obtenir des billes de diamètre plus petits que par extrusion et est plus adaptée à la production industrielle à grande échelle (Groboillot et al., 1994).

### **1.2.3.2 Immobilisation cellulaire dans des billes de $\kappa$ -carraghénane / gomme de caroube**

Une technique d'immobilisation utilisant un biopolymère non toxique pour les bactéries lactiques et assurant un degré de viabilité et une productivité cellulaire élevés est essentielle pour la production de ferments en continu en utilisant des bactéries immobilisées. Les applications avec les bactéries lactiques font appel, en général, aux gels d'alginate ou de  $\kappa$ -carraghénane (Champagne et al., 1994). Le gel d'alginate est stabilisé par les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant ces ions peuvent être chélatés par les ions phosphates, lactates et citrates au cours de fermentations lactiques (Groboillot et al., 1994). Les gels de  $\kappa$ -carraghénane sont alors recommandés dans ces situations (Audet et al., 1988).

La technique d'immobilisation des cellules bactériennes par macroémulsion dans des billes de  $\kappa$ -carraghénane/gomme de caroube se fait dans des conditions douces et évite ainsi la destruction de l'activité des enzymes bactériennes (Audet et al., 1988; Audet et Lacroix,

1989; Lacroix et al., 1990; Artignan et al., 1997). Utilisé seul, le  $\kappa$ -carraghénane produit un gel fragile incapable de résister aux stress causés par la croissance bactérienne interne et le cisaillement dans le réacteur en agitation. Un effet synergique est observé avec la gomme de caroube (Lacroix et al., 1990). Une supplémentation en ions  $K^+$  donne des gels plus élastiques et rhéologiquement plus stables du fait d'une interaction spécifique entre le  $\kappa$ -carraghénane et les chaînes de galactomananes de la gomme de caroube (Arnaud et al., 1989). En assurant un relargage et donc une inoculation cellulaire en continu dans le milieu externe du fait de la nature poreuse du gel, l'immobilisation cellulaire dans des billes de  $\kappa$ -carraghénane / gomme de caroube permet l'obtention de hautes concentrations cellulaires dans le bioréacteur ainsi qu'un meilleur contrôle des fermentations en continu (Lamboley, 1998).

### **1.2.3.3 Distribution de la biomasse dans les billes de gel**

La performance de la biomasse immobilisée dans une matrice de gel dépend des cinétiques de réaction cellulaires, des transferts de masse interne et externe des substrats et des produits, ainsi que du relargage cellulaire de la surface des billes dans le milieu externe. Dans le cas des bactéries lactiques qui sont sensibles aux produits d'inhibition, les substrats, la concentration des produits et le profil de pH jouent un rôle prépondérant sur la productivité et sur la croissance des cellules immobilisées dans des billes de gel (Sayles et Ollis, 1990).

Le phénomène compétitif de diffusion-réaction explique la croissance cellulaire non uniforme dans les billes de gel colonisées (Montbouquette et al., 1990; Wijffels et al., 1991; Yabannavar et Wang, 1991). Une région de haute densité bactérienne est ainsi formée à la périphérie des billes où les conditions de croissance sont plus favorables (Arnaud et Lacroix, 1991). L'épaisseur et la concentration bactérienne de cette couche dépendent de la bactérie, de l'effet d'obstruction et des vitesses de diffusion dans la couche cellulaire ainsi que d'autres paramètres de fermentation tels que le pH, la concentration en substrats et en produits et la température. Par exemple, l'accumulation d'acide lactique fut responsable de la distribution hétérogène de la biomasse dans des billes d'alginate immobilisant

*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* lors de l'étude du co-métabolisme du lactose et du citrate (Cachon et Diviès, 1993). Par dissolution progressive de couches périphériques des billes de gel dans un tampon citrate, les auteurs déterminèrent qu'à l'état stationnaire, 95% de la biomasse se situait dans une couche de 125  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à la périphérie des billes dont la concentration (350 g/l) était 20 à 30 fois plus élevée qu'au centre des billes.

D'autres recherches ont démontré la formation progressive d'une couche cellulaire dense à la périphérie des billes durant des fermentations continues ou non avec des bactéries lactiques immobilisées dans des billes de gel. L'épaisseur de cette couche lors de l'immobilisation de *Lactobacillus casei*, estimée en microscopie optique, fut proche de 0.4 mm, ce qui représentait approximativement 84% du volume total des billes de 1.75 mm de diamètre (Arnaud et Lacroix, 1991). Lors de l'immobilisation de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* dans des billes d'alginate, la dissolution progressive de couches périphériques des billes permit d'observer que 43 et 90% des cellules immobilisées se situaient dans une couche périphérique de 0.13 et 0.41 mm, correspondant à 28 et 70% respectivement du volume total des billes (Prévost et Diviès, 1988).

#### **1.2.3.4 Principe du relargage cellulaire des billes**

Lors de fermentations en continu avec des cellules de *Lactobacillus casei* ssp. *casei* immobilisées dans des billes de gel, des observations au microscope ont montré qu'il y a abrasion et rupture de la surface du gel. Ces tensions dans le gel, résultant de la croissance bactérienne ainsi que des effets du cisaillement et des collisions dans les réacteurs agités mécaniquement, provoquent la fuite des bactéries des cavités ouvertes vers le milieu de culture (Arnaud et al., 1992). Le relargage cellulaire est à la base du procédé à cellules immobilisées de fabrication de biomasse libre (Lamboley et al., 1997), de préfermentation du lait dans la fabrication de yogourt (Prévost et al., 1985; Prévost et Diviès, 1988) ou de fromage frais (Prévost et Diviès, 1987; Sodini-Gallot et al., 1995).

Le relargage cellulaire dépend de la taille des billes ainsi que de l'agitation du milieu (Sodini-Gallot et al., 1995). En effet, l'agitation favorise les phénomènes de diffusion vers la bille mais, par son effet mécanique, favorise également l'ouverture des cavités vers l'extérieur par l'augmentation des forces de cisaillement (Arnaud et al., 1993). Par contre, le relargage cellulaire est peu influencé par la densité cellulaire initiale dans les billes (Champagne et al., 1992). Le pH a un effet sur la croissance des bactéries lactiques dans les billes (Morin et al., 1992; Champagne et al., 1993; Norton et al., 1994) ainsi que sur le relargage cellulaire (Champagne et al., 1993). La composition du milieu de culture influence également la croissance des bactéries dans les billes et le relargage (Champagne et al., 1993). Influençant la composition du milieu externe en acide lactique et en nutriments, le taux de dilution appliqué lors de fermentations en continu avec cellules immobilisées affecte également la croissance des bactéries immobilisées (Gobbetti et Rossi, 1993; Audet et al., 1991; Champagne et al., 1994).

#### **1.2.3.5 Phénomène de contamination croisée**

Un phénomène de contamination croisée a été mis en évidence lorsque des cultures de bactéries lactiques mésophiles, immobilisées séparément, étaient cultivées ensemble pendant de longues périodes pour la préfermentation du lait (Sodini et al., 1997) ou pour la production de ferments lactiques mésophiles (Lamboley et al., 1997; 1999; 2001). La présence de souches autres que celle immobilisée à l'origine dans chacune des billes fut révélée par l'analyse des populations de billes individuelles. La contamination croisée serait une conséquence du mécanisme de relargage cellulaire. En effet, le gel viscoélastique pourrait, après relargage partiel des cellules d'une colonie située près de la surface de la bille, se refermer partiellement et immobiliser dans la zone périphérique active de la bille un échantillon du milieu de culture contenant un mélange de souches dans le cas d'une culture mixte (Lacroix et al., 1996). Les bactéries initialement immobilisées dans une bille pourraient ainsi être emprisonnées dans une autre bille colonisée, à l'origine, par une autre souche. Selon les caractéristiques propres des bactéries et les conditions locales, ces bactéries contaminantes pourraient par la suite se multiplier dans la bille pour former une

culture mixte à sa surface. Ce modèle de contamination croisée n'a cependant jamais été formellement démontré.

#### **1.2.3.6 Immobilisation de cultures lactiques mixtes**

L'immobilisation peut modifier les interactions entre les différentes souches d'une culture mixte. En effet, deux souches de lactocoques compétitives en cellules libres se sont révélées coopérantes lorsqu'elles étaient immobilisées (Audet et al., 1995). Cependant, lorsque les cultures du yogourt ont été immobilisées et cultivées en mélange pour la préfermentation du lait, le ratio streptocoques/lactobacilles est resté stable (Prévost et al., 1985; Prévost et Diviès, 1988). Par contre, la modification du pH et du milieu de culture pouvait affecter ce même ratio (Champagne et al., 1993). De même, lors de l'utilisation d'une culture mixte de trois souches de lactocoques immobilisées pour la production de ferments en continu, les proportions des différentes populations sont restées stables sur une longue période malgré l'apparition du phénomène de contamination croisée (Lambole et al., 1997). De plus, comme les différentes souches de lactocoques étaient affectées différemment par les conditions de fermentation (pH, température et taux de dilution), il était possible d'obtenir un ferment de composition déterminée en sélectionnant judicieusement ces conditions (Lambole et al., 1997).

L'incorporation de bifidobactéries dans les produits laitiers fermentés se développe de plus en plus. En effet, des fromages probiotiques contenant des bifidobactéries ont par exemple déjà été rapportés (Daigle et al., 1999). Ainsi, de nouveaux ferments pour la fabrication de fromages, incluant des bactéries lactiques et des souches probiotiques, doivent être développés industriellement. Cependant, dans le but de produire des ferments de composition complexe contenant des souches de différentes compétitivités, l'influence des paramètres opérationnels sur les proportions des souches dans un procédé de fermentation en continu avec des cellules immobilisées n'a pas été rapportée. La résistance d'une souche non dominante immobilisée dans des billes à l'origine en culture pure dans une culture mixte compétitive et le phénomène de contamination croisée n'ont ainsi pas été étudiés.

Dans la présente étude, l'hypothèse est émise que la technologie des cellules immobilisées peut être utilisée avantageusement pour la production efficace de ferments lactiques mixtes contenant des bifidobactéries qui sont peu compétitives lorsqu'elles sont produites avec des bactéries lactiques par fermentation avec cellules libres (Baron et al., 2000; Smart et al., 1993). Le choix des souches dans cette étude (*B. longum* et *L. diacetylactis*) a ainsi été effectué dans le but d'étudier un système modèle comportant une souche compétitive utilisée communément dans les produits laitiers fermentés (*L. diacetylactis*) et une souche probiotique non compétitive (*B. longum*), de démontrer le phénomène de contamination croisée et d'en identifier les paramètres principaux. Le contrôle de la composition de la culture produite dans l'effluent et la stabilité du procédé sont également recherchés. Ainsi la composition de souches choisie n'a pas nécessairement une application directe en fermentation laitière.

#### 1.2.4 L'IMMUNOFLUORESCENCE COMME MÉTHODE DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DE BACTÉRIES LACTIQUES IMMOBILISÉES

##### 1.2.4.1 Rappels d'immunologie

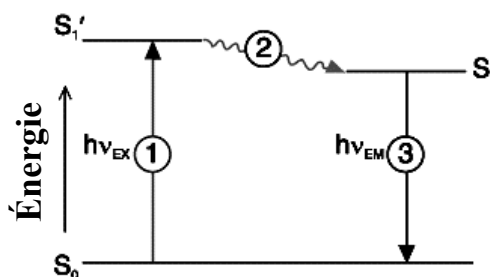
Les membranes de bactéries lactiques, constituées de protéines et de lipides, représentent des substances immunogènes qui peuvent induire une réponse immunitaire lorsqu'elles sont injectées chez les animaux (Janeway et Travers, 1996). En effet, les molécules immunogènes sont essentiellement des protéines et des polysaccharides de poids moléculaire supérieur à 5000 Da. La réponse immunitaire se traduit, entre autre, par la production d'immunoglobulines, ou anticorps, qui reconnaissent des sites sur les molécules immunogènes (épitopes) et aident à leur élimination. Les anticorps polyclonaux sont un ensemble d'anticorps dirigés contre plusieurs épitopes de la substance immunogène alors que les anticorps monoclonaux sont des anticorps spécifiques à un épitope donné.

Les bifidobactéries et les lactocoques étant phylogénétiquement différents (Dellaglio et al., 1994), ces bactéries sont constituées de parois cellulaires de composition assez différente

pour permettre le développement d'anticorps polyclonaux spécifiques. Cette production d'anticorps polyclonaux a ainsi été effectuée avec les souches de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD et *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, par une série d'immunisations de lapines avec des extraits de parois cellulaires (Prioult et al., 2000).

#### 1.2.4.2 Généralités sur la fluorescence

La fluorescence est le résultat de trois étapes qui se déroulent dans certaines molécules appelées fluorochromes (généralement des hydrocarbures polyaromatiques ou des hétérocycles) suite à l'absorption d'énergie fournie par un rayonnement externe (Johnson, 1996). Durant l'étape d'excitation, le fluorochrome passe à un état électronique excité  $S_1'$  par absorption de photons d'énergie  $h\nu_{EX}$  provenant d'une lampe à incandescence ou d'un laser (Figure 1.1). La molécule reste par la suite dans l'état excité durant un très court laps de temps (1-10 nanosecondes) durant lequel des changements conformationnels ont lieu dissipant une faible quantité d'énergie ( $S_1' - S_1$ ) (Figure 1.1). Lors de la troisième étape, le fluorochrome retourne à son état initial  $S_0$  en émettant un photon d'énergie  $h\nu_{EM}$  d'énergie inférieure (de longueur d'onde supérieure) à  $h\nu_{EX}$  (Figure 1.1).



**Figure 1.1** : Diagramme de Jablonski illustrant la création d'un état excité (1), les réarrangements conformationnels de la molécule excitée (2) et l'émission subséquente de fluorescence (3) suite à l'excitation d'un fluorochrome par un rayonnement externe (Johnson, 1996).



### 1.2.4.3 Définition et applications de l'immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de détection de plus en plus utilisée, combinant l'immunologie et la fluorescence (Hansen et al., 1997; Ishiko et al., 1998; Veena et van Vuurde, 2002). Ainsi, des anticorps monoclonaux (Mutharia et Hancock, 1983; Para et Plouffe, 1983) ou polyclonaux (Hugenholtz et al., 1987) sont rendus fluorescents par ajout de molécules fluorescentes à leur structure sans altérer leur affinité et leur spécificité pour l'antigène. La fluorescence peut être directe, par marquage de l'anticorps spécifique développé, ou indirecte par l'utilisation d'un deuxième anticorps fluorescent reconnaissant un premier anticorps non fluorescent (Laan et al., 1988; Hunik et al., 1993). La méthode indirecte génère un signal fluorescent plus intense que la méthode directe puisque plusieurs anticorps peuvent se fixer sur le même anticorps primaire non fluorescent (Brock et Madigan, 1991).

L'utilisation de l'immunofluorescence pour détecter spécifiquement différentes souches d'une culture lactique mixte a déjà été rapportée (Hugenholtz et al., 1987). Dans cette étude, des anticorps ont été développés contre quatre souches de *L. cremoris* et marqués à la fluorescéine. La détection simultanée de deux souches en culture mixte faisait appel à l'immunofluorescence directe et indirecte. En effet, une des deux souches était détectée directement avec un anticorps marqué à la fluorescéine alors que la deuxième était détectée par l'ajout successif d'un premier anticorps spécifique non fluorescent et d'un deuxième anticorps fluorescent. Les deux souches étaient détectées simultanément après excitation à la même longueur d'onde (488 nm) puisque le même fluorochrome (la fluorescéine) était utilisée pour les deux souches. La différence d'intensité de fluorescence émise par les deux souches servait alors de moyen de discernement.

L'immunofluorescence indirecte a également été utilisée pour détecter spécifiquement *Nitrobacter agilis* et *Nitrosomonas europaea* co-immobilisés dans des billes de  $\kappa$ -carraghénane en utilisant un microscope à fluorescence classique (Hunik et al., 1993). Des anticorps spécifiques aux deux souches ont été utilisés en présence d'un deuxième anticorps marqué à la fluorescéine pour la visualisation en microscopie. Le deuxième anticorps utilisé

étant identique pour les deux souches, la différenciation des deux souches dans une même bille était impossible. La détection spécifique a donc été réalisée sur des coupes minces de billes différentes. Cette méthode permet la détection spécifique de plusieurs souches en culture mixte mais ne permet pas de les visualiser sur le même échantillon, ce qui limite son application et augmente le nombre d'échantillons à analyser.

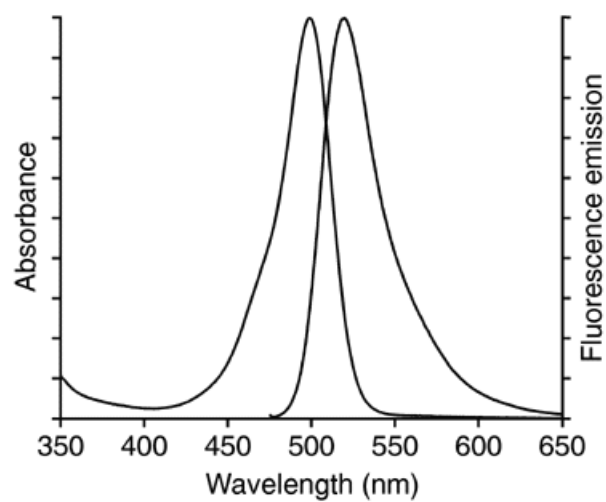
Afin d'éviter ces inconvénients, une méthode de détection spécifique par immunofluorescence de *B. longum* ATCC 15707 et de *L. diacetylactis* MD dans des billes de gel de  $\kappa$ -carraghénane/gomme de caroube a récemment été développée (Prioult et al., 2000). Lors de cette étude, des anticorps polyclonaux spécifiques aux deux souches, marqués chacun de fluorochromes différents, ont été obtenus. Cette technique, utilisant les fluorochromes ALEXA 488 et ALEXA 568, a par la suite permis de distinguer et localiser les deux souches à l'intérieur d'une même bille en microscopie confocale (Prioult et al., 2000). En effet, par l'excitation des deux fluorochromes à des longueurs d'onde différentes (488 nm pour *B. longum* (ALEXA 488) et 543 nm pour *L. diacetylactis* (ALEXA 568)), les souches ne sont visibles au microscope confocal que lorsque l'excitation des billes de gel se fait à la longueur d'onde correspondant au maximum d'intensité de chacun des deux fluorochromes.

#### **1.2.4.4 Généralités sur les marqueurs fluorescents ALEXA 488 et ALEXA 568**

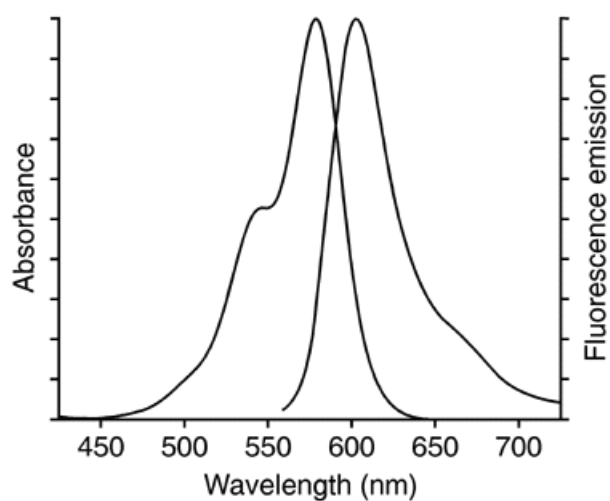
Le marqueur fluorescent ALEXA 488 possède un spectre presque identique à celui de la fluorescéine mais les conjugués formés ALEXA 488-anticorps sont plus lumineux et plus stables que ceux formés avec la fluorescéine (ALEXA 488 labelling kit, Molecular Probes). Ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales sont respectivement à 491 et 515 nm (Figure 1.2). De plus, sa stabilité à la lumière et aux pH compris entre 4 et 10 permet une observation et une capture d'image facilitée. Sa structure chimique comprend trois noyaux aromatiques, un hétérocycle responsable de la fluorescence et un groupement ester succinimidyl responsable du couplage du fluorochrome avec l'anticorps (Figure 1.4).

Le marqueur fluorescent ALEXA 568 bénéficie des mêmes avantages que le fluorochrome ALEXA 488 mais possède des longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales à 573 et 596 nm (Figure 1.3). Sa structure chimique contient trois noyaux aromatiques, trois hétérocycles et un groupement ester succinimidyl (Figure 1.5).

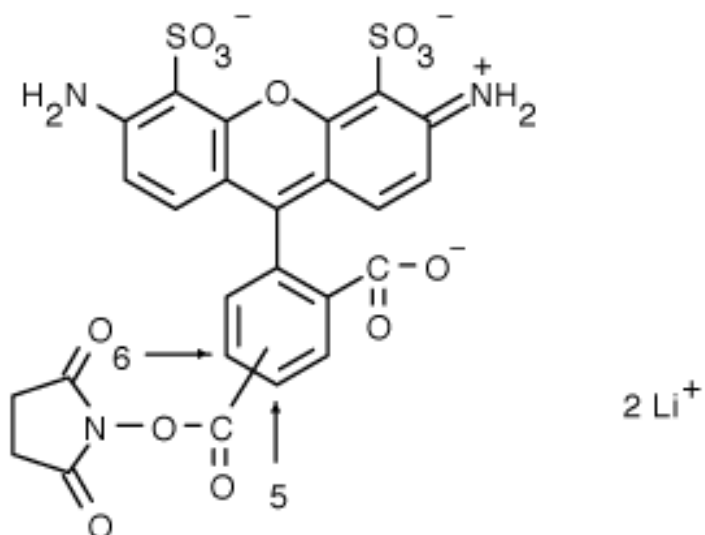
Ainsi, le très faible chevauchement de spectres de ces deux fluorochromes a déjà permis de distinguer et localiser spécifiquement par un double marquage deux différentes souches à l'intérieur d'une même bille en microscopie confocale (Prioult et al., 2000).



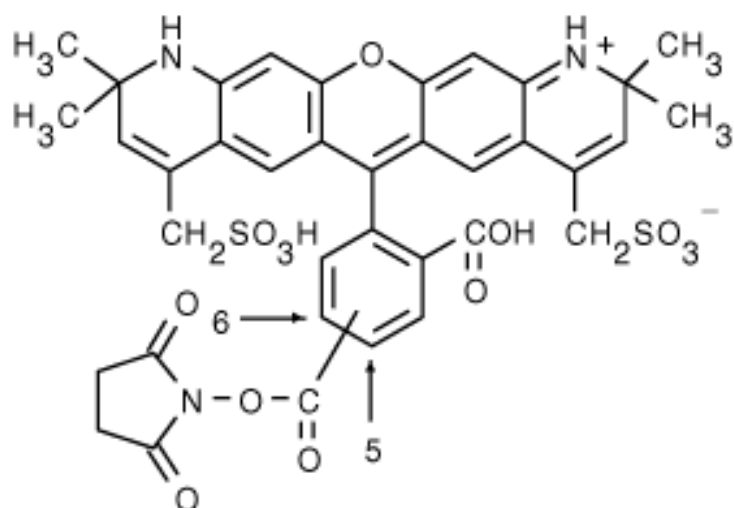
**Figure 1.2** : Spectres d'excitation et d'émission du marqueur fluorescent ALEXA 488 (ALEXA 488 labelling kit, Molecular Probes)



**Figure 1.3** : Spectres d'excitation et d'émission du marqueur fluorescent ALEXA 568 (ALEXA 568 labelling kit, Molecular Probes)



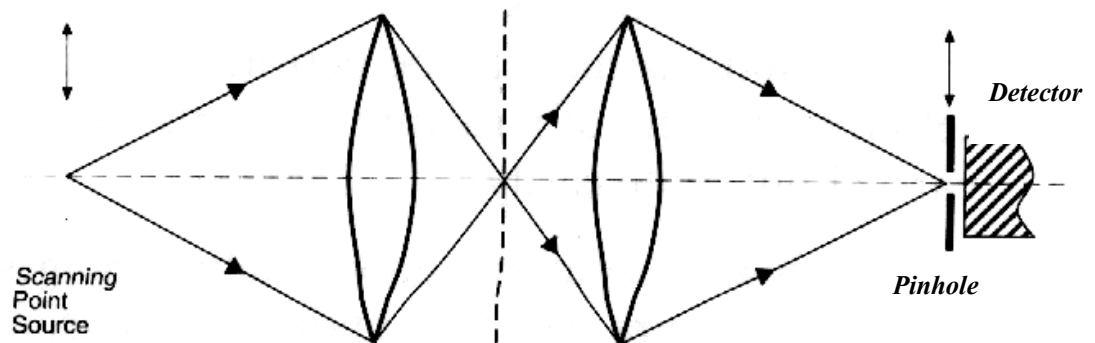
**Figure 1.4** : Structure chimique du marqueur fluorescent ALEXA 488 (ALEXA 488 labelling kit, Molecular Probes)



**Figure 1.5** : Structure chimique du marqueur fluorescent ALEXA 568 (ALEXA 568 labelling kit, Molecular Probes)

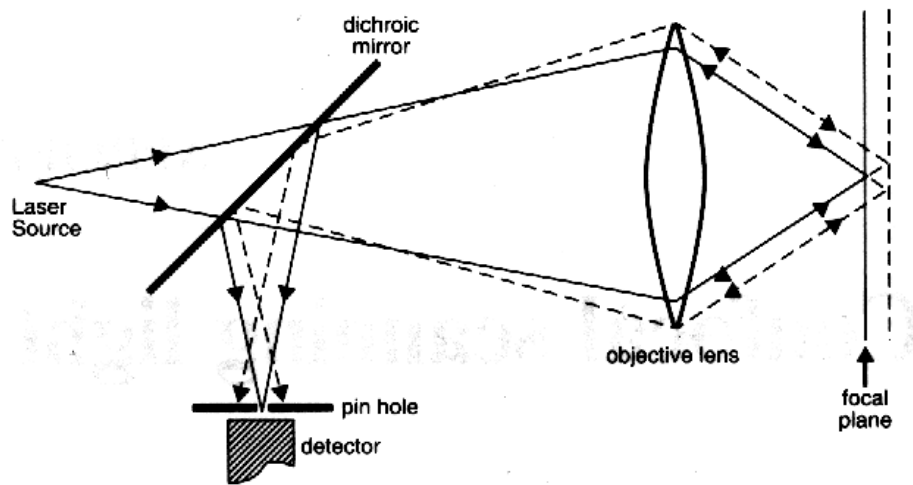
#### 1.2.4.5 Détection par microscopie confocale des signaux immunofluorescents

La microscopie confocale (laser scanning confocal microscopy ou LSCM en anglais) est une forme particulière de microscopie dans laquelle un laser à une longueur d'onde précise excite seulement un certain plan focal d'un échantillon fluorescent. La source lumineuse est focalisée à une profondeur définie dans l'échantillon analysé et l'information de chaque point focal projetée contre le "trou d'épingle" (littéralement «pinhole») d'un détecteur. La source lumineuse et le "trou d'épingle" du détecteur sont les deux situés dans le plan focal de la lentille, d'où le terme de confocalité (Figure 1.6).



**Figure 1.6** : Arrangement optique du microscope confocal. La lentille objective fait le focus sur l'échantillon alors que la lentille de collecte transmet l'image d'un seul point focal à la fois au détecteur (detector) à travers le "trou d'épingle" (pinhole) (Blonk et van Aalst, 1993).

Par ce principe le bruit de fond dû à l'environnement tridimensionnel du point focal est minimisé (Figure 1.7). Comparé à un microscope conventionnel, le microscope confocal augmente la résolution latérale d'un facteur 1,4 (Blonk et van Aalst, 1993).



**Figure 1.7** : Faisceaux incidents et réfléchis de la lumière fluorescente dans un microscope confocal. Les lignes pleines indiquent le faisceau dans le plan focal alors que les traits représentent une onde hors focus non collectée (Blonk et van Aalst, 1993).

En scannant point par point tout le plan focal par synchronisation de la source lumineuse et du "trou d'épingle" du détecteur, une image est construite grâce à un logiciel informatique. Le "sectionnement optique" ou "épaisseur de l'image" dépend de la taille du "trou d'épingle" du détecteur ainsi que des caractéristiques de la lentille. En général pour les microscopes commerciaux, l'épaisseur du plan focal est d'environ  $1 \mu\text{m}$ . Un agrandissement du "trou d'épingle" du détecteur augmente l'épaisseur de l'image avec comme extrême l'obtention d'un microscope conventionnel à "trou d'épingle" complètement ouvert.

Le principal avantage de la microscopie confocale réside donc dans la résolution en profondeur. En effet, avec les microscopes conventionnels, la lumière réfléchie des plans hors focus rend l'image obtenue plus floue. Le sectionnement optique répété d'un échantillon volumineux conjointement au focus fin effectué par le microscope confocal permettent d'obtenir une série de sections optiques à des distances choisies bien définies

(limite d'environ 1  $\mu\text{m}$ ) les unes des autres dans un échantillon, et ceci sans découpes physiques qui pourraient endommager l'échantillon. Couplée à plusieurs lasers, la microscopie confocale permet ainsi la détection simultanée de plusieurs composés fluorescents dans des échantillons tridimensionnels. Enfin, les différentes vitesses de balayage offrent la possibilité d'obtenir des images de haute définition (Vodovotz et al., 1996).

L'immunofluorescence, combinée à la microscopie confocale, représente donc un outil performant pour suivre la dynamique microbienne et le phénomène de contamination croisée dans les billes de gel lors de la production de ferments mixtes à l'aide de cellules immobilisées.

#### **1.2.4.6 Quantification des signaux immunofluorescents**

La mise en évidence du phénomène de contamination croisée nécessite également le développement d'une méthode de quantification spécifique des différentes souches de la culture mixte à l'étude dans des billes de gel de polysaccharide.

La distribution spatiale de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter agilis* coimmobilisées dans des billes de  $\kappa$ -carraghénane à l'aide d'anticorps spécifiques fluorescents a déjà été observée (Hunik et al., 1993). À l'aide de cercles concentriques passant par la périphérie des billes, la fraction d'espace occupée par les bactéries a été déterminée en fonction de la profondeur dans les billes (exprimée en pourcentage d'occupation d'espace). Les inconvénients de cette méthode résident d'une part dans l'utilisation d'un même anticorps fluorescent greffé sur les anticorps spécifiques aux deux souches non fluorescents (et donc l'utilisation de deux coupes physiques pour détecter spécifiquement les deux souches) et, d'autre part, dans l'absence d'une corrélation entre la concentration bactérienne et la proportion de l'espace des billes de gel occupée par de la biomasse.

Récemment, une méthode de détection de *Bifidobacterium longum* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* coimmobilisées dans des billes de gel a été développée (Prioult et al., 2000). Utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques aux deux souches



marqués chacun d'un fluorochrome différent, cette méthode permet de distinguer les deux souches dans le même échantillon. À cette étude s'est également ajoutée la quantification d'échantillons de plusieurs billes par ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay). À la différence des dénombrements sur milieux gélosés qui ne déterminent que la biomasse active, le test immunologique ELISA permet de quantifier la biomasse totale dans des billes et donc de servir de corrélation avec les images obtenues par immunofluorescence en microscopie confocale.

La relation entre les profils d'occupation de biomasse en fonction de la profondeur (pourcentage d'occupation) dans les billes déterminés par la méthode de Hunik et al. (1993) et la biomasse totale dans les billes de gel déterminée par ELISA (Prioult et al., 2000) permettra ainsi de déterminer, lors de fermentations avec des cellules immobilisées de *Bifidobacterium longum* et de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, les concentrations bactériennes des deux souches en fonction de la profondeur dans les billes de gel. Le phénomène de contamination croisée dans les billes de gel sera ainsi localisé et quantifié.

### 1.2.5 PHYSIOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISÉES

L'immobilisation dans une matrice poreuse et les concentrations bactériennes potentiellement très élevées limitent la diffusion des nutriments ainsi que l'élimination des produits du métabolisme bactérien, tels les acides lactique et acétique dans le cas des lactocoques et des bifidobactéries. Les conditions environnantes des cellules libres et immobilisées sont donc très différentes et peuvent résulter en des comportements physiologiques et des morphologies cellulaires distinctes.

Plusieurs études récentes ont ainsi montré que la production de biomasse à l'aide de la technologie des cellules immobilisées peut induire des changements morphologiques et physiologiques. Une modification de la voie métabolique d'homofermentaire à hétérofermentaire a été observé lors d'une culture continue avec cellules immobilisées de *Lactobacillus plantarum* (Krishnan et al., 2001). Des changements physiologiques et

morphologiques furent également observés lors de la production en continu d'exopolysaccharides (EPS) à l'aide de cellules immobilisées de *L. rhamnosus* RW-9595M (Bergmaier, 2002). Une diminution de la production d'EPS soluble fut observée dans le temps parallèlement à la formation d'aggrégats macroscopiques (1-2 mm), composés principalement de cellules viables et d'EPS non solubles. Cependant la faible production d'EPS dans l'effluent de la culture continue fut réversible et l'importante production d'EPS préalablement démontrée en cellules libres (1742 mg/l) fut recouvrée après quatre fermentations batch successives dont la première avait été inoculée par un échantillon de l'effluent de la fermentation continue avec cellules immobilisées (Bergmaier, 2002). Enfin, plusieurs auteurs ont observé une augmentation de la tolérance des cellules immobilisées aux produits d'inhibition (Fortin et Vuilleumard, 1989; Texeira de Mattos et al., 1994; Krisch et Szajani, 1997), alcools (Holcberg and Margalith, 1981; Curtain, 1986), phénols (Keweloh et al., 1989; Heipieper et al., 1991, Diefenbach et al., 1992), antibiotiques (Jouenne et al., 1994) et aux produits de nettoyage (Trauth et al., 2001). Dans ces deux dernières études, l'immobilisation mais également la culture prolongée sur plusieurs jours permit d'améliorer la survie cellulaire au stress imposé (Jouenne et al., 1994; Trauth et al., 2001).

## 1.3 Hypothèse, but et objectifs du travail

### 1.3.1 HYPOTHÈSE

La production par fermentation continue de cultures lactiques mixtes en cellules libres est délicate car le maintien de l'équilibre entre les souches est difficile, particulièrement dans le cas de souches de compétitivités différentes. L'hypothèse de ce travail est que l'immobilisation cellulaire combinée à un procédé de fermentation en continu permet un meilleur contrôle des populations mixtes et la production d'une culture mixte modèle contenant une souche de bifidobactérie peu compétitive, qui soit équilibrée, stable et aux caractéristiques technologiques et probiotiques avantageuses.

### 1.3.2 BUT

Le but de cette étude était de caractériser d'un point de vue biologique les performances et la stabilité d'un procédé de fermentation continue utilisant des cellules immobilisées dans des billes de gel pour produire une culture mixte composée d'une souche compétitive de bactéries lactiques (*L. diacetylactis*) et d'une souche probiotique peu compétitive (*B. longum*).

### 1.3.3 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

- Étudier la production de *B. longum* ATCC 15707 en culture pure par des fermentations batch en cellules libres et lors de fermentations continues avec cellules immobilisées (chapitre 2).
- Développer une méthode d'immunofluorescence pour la détection et la quantification spécifique et simultanée de deux souches d'intérêt dans le domaine laitier (*L. diacetylactis* et *B. longum*) immobilisées dans des billes de gel (chapitre 3).

- Étudier la production de cette culture mixte lors d'une fermentation continue sur une longue période avec cellules immobilisées dans des billes de gel de polysaccharides à l'origine en cultures pures.
  - Déterminer l'effet de la température et du temps de fermentation sur la dynamique microbienne dans les billes et la composition du ferment produit dans le milieu de culture (chapitre 4).
  - Observer, grâce à la méthode développée précédemment, la redistribution des souches dans les billes lors de cette fermentation (chapitre 4).
  - Déterminer l'effet de l'immobilisation cellulaire et de la culture continue sur certaines propriétés technologiques et probiotiques importantes de la culture mixte produite dans l'effluent de la fermentation continue (chapitre 5).

**CHAPITRE 2: *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell**  
**production during free- and immobilized-cell cultures**  
**in MRS-whey permeate medium**

Y. Doleyres, C. Paquin, M. Leroy et C. Lacroix

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

Publié dans "Applied Microbiology and Biotechnology", **60** : 168-173, 2002.

## 2.1 Résumé

La production de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 dans le milieu de culture MRS supplémenté en perméat de lactosérum (MRS-WP) a été étudiée pendant des fermentations batch avec cellules libres et en continu avec cellules immobilisées. Une concentration cellulaire très élevée fut dénombrée après 12 h de fermentation en batch à pH= 5.5 dans le milieu MRS-WP ( $1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$  CFU/ml), ce qui est environ deux fois supérieur aux comptes cellulaires dans le MRS non supplémenté. Notre étude a montré que le perméat de lactosérum est une source bon marché de lactose et d'autres composés qui pourrait être utilisé pour augmenter la production de bifidobactéries dans le milieu MRS. La fermentation continue dans le MRS-WP avec des cellules de *B. longum* immobilisées dans des billes de gel a produit les plus fortes concentrations cellulaires ( $4.9 \pm 0.9 \times 10^9$  CFU/ml) dans l'effluent pour un taux de dilution de  $0.5 \text{ h}^{-1}$ . Cependant la productivité volumétrique maximale pendant la fermentation ( $6.9 \pm 0.4 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) a été obtenue pour un taux de dilution de  $D=2.0 \text{ h}^{-1}$ , et était approximativement 9.5 fois plus élevée que celle obtenue lors des fermentations batch avec cellules libres ( $7.2 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) au pH optimal de croissance des bifidobactéries de 5.5.

## 2.2 Abstract

*Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production was studied in MRS medium supplemented with whey permeate (MRS-WP) during free-cell batch fermentations and continuous immobilized-cell cultures. Very high populations were measured after 12 h batch cultures in MRS-WP medium controlled at pH=5.5 ( $1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$  CFU/ml), which was approximately 2-fold higher than in non-supplemented MRS. Our study showed that whey permeate is a low-cost source of lactose and other components that can be used to increase bifidobacteria cell production in MRS medium. Continuous fermentation of MRS-WP with *B. longum* immobilized in gellan gum gel beads produced the highest cell concentrations ( $4.9 \pm 0.9 \times 10^9$  CFU/ml) in the effluent at a dilution rate of  $0.5 \text{ h}^{-1}$ . However maximal volumetric productivity ( $6.9 \pm 0.4 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) during continuous cultures was obtained for a dilution rate of  $D=2.0 \text{ h}^{-1}$ , and was approximately 9.5-fold higher than during free-cell batch cultures at optimal pH of 5.5 ( $7.2 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

## 2.3 Introduction

Bifidobacteria are natural hosts of the human and animal large intestines which have beneficial effects on the hosts (Chandan, 1999). They are now used in the preparation of a large variety of pharmaceuticals and fermented milk foods, such as fresh cheeses, fermented milks and health supplements (Tamime et al., 1995). However, bifidobacteria are fastidious bacteria that require complex and expensive media for propagation, such as the MRS medium (de Man et al., 1960) with the addition of growth-promoting factors, due to their stringent growth requirements (Ibrahim and Bezkorovainy, 1994). Low-cost whey-based media were developed to continuously produce cultures of bifidobacteria (Corre et al., 1992). Concentrated suspensions of *Bifidobacterium bifidum* were obtained during continuous cultures with these media when an ultrafiltration unit was coupled to the bioreactor. However long-term stability of cultures with membrane reactors is limited by membrane fouling, particularly with whey-based media (Musale and Kulkarni, 1998). Whey permeate is the by-product of whey ultrafiltration used to concentrate whey proteins. Whey permeate, which is produced in large amounts and contains high concentrations of lactose (4.8%) and minerals (0.5%), is a good base medium for lactic acid bacteria culture (Lamboley et al., 1997).

Cell immobilization in natural polymers was previously developed for the production of biomass during continuous fermentations with major advantages such as high volumetric productivity, stable strain ratios in mixed immobilized cultures, prevention from washing-out during continuous cultures, reduction of susceptibility to contamination and bacteriophage attack, enhancement of plasmid stability, and protection of the cells from shear forces in the stirred reactor (Champagne et al., 1994; Lamboley et al., 1997; 1999; 2001 ; Macedo et al., 1999). However, very little data have been reported on bifidobacteria immobilization and utilization of immobilized cell technology for bifidobacteria biomass production. Bifidobacteria immobilized in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum mixed gel beads have been tested for continuous fermentation of a supplemented milk (Ouellette et al., 1994). Immobilized cell growth and cell release from the gel beads into circulating milk



allowed for a steady inoculation of the feed. However, *B. longum* is highly sensitive to K<sup>+</sup> ions, which are required for the maintenance of κ-carrageenan/locust bean gum bead integrity during continuous fermentations (Paquin et al., 1990). Gellan gum gel was studied and used as an entrapment matrix for *B. longum*, for high mechanical bead stability, as well as high entrapped cell activity during continuous fermentation (Camelin et al., 1993).

In the present study, a continuous fermentation of MRS medium supplemented with whey permeate with cells of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 immobilized in gellan gum gel beads was studied for biomass production at different dilution rates. Preliminary experiments were conducted in free-cell batch fermentations to determine the effect of pH and whey permeate supplementation of the MRS medium on cell growth and maximal cell production.

## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 STRAIN AND CULTURE CONDITIONS

*B. longum* ATCC 15707 (American Type Collection Culture, Rockville, MD, USA) was propagated routinely at 37°C for 16 h in MRS (de Man et al., 1960) medium (Rosell Institute Inc., Montréal, QC, Canada) supplemented (w/w) with 0.02% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.05% cysteine (Sigma, St-Louis, MO, USA) and 2.5% whey permeate (Wisconsin Dairy, Foremost Ingredient Group, Baraboo, WI, USA). The inoculum used for free-cell batch fermentations and for cell immobilization was prepared by subculturing twice *B. longum* from frozen stock (-80°C) in supplemented MRS broth (MRS-WP) with a 2% (v/v) inoculum.

### 2.4.2 FREE-CELL BATCH FERMENTATIONS

Batch fermentations were carried out in MRS-WP, using a 500-ml stirred tank bioreactor (Bioflo model C30, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) purged with CO<sub>2</sub>, at 37°C for 12 h with or without pH control held in the range of 5.0 to 6.5 with NaOH 4 N, using a 2% (v/v) inoculum. The pH of the inoculated medium was 6.5 and pH control started when pH reached the defined set point for the experiment. Another batch fermentation was carried out at pH=5.5 under the same conditions, but in MRS medium without whey permeate addition to test the effect of whey permeate supplementation on biomass growth and final cell concentration. Broth samples were taken at 2-h intervals for viable cell enumeration and HPLC analysis. All fermentations were conducted in triplicate, and means and standard deviations of dependent variables are reported.

### 2.4.3 CELL IMMOBILIZATION

A fresh culture of *B. longum* was immobilized in 1-2 mm diameter gel beads made of 2.5% (w/v) gellan gum (Gelrite, Biotech Scientific, Lachine, QC, Canada) and 0.2% sodium citrate, as previously described by Camelin et al. (1993), but with some modifications.

Temperature of the polymer solution at the inoculation step was 47°C and CaCl<sub>2</sub> 0.01M was used as the hardening and stabilizing agent. A 2% inoculation was used for bead production.

#### 2.4.4 CONTINUOUS IMMOBILIZED-CELL FERMENTATION

Continuous immobilized cell fermentations were carried out in a Bioflo III model (New Brunswick Scientific Co.) with a fermentation volume of 1.0 l, as described previously (Norton et al., 1994). The bioreactor was inoculated with 280 ml beads, measured by liquid displacement, and CO<sub>2</sub> was injected to the headspace to maintain anaerobic conditions. Four repeated-batch fermentations with replacement of spent medium with fresh medium after 16, 12, 8 and 4 h incubation, respectively, were first carried out at 37°C in MRS-WP containing CaCl<sub>2</sub> 0.01 M to colonize beads. Mixing was set at 120 rpm and pH controlled at 5.5 by addition of 4 N NaOH. After this colonization step, continuous fermentation was started under the same conditions, with dilution rate (D) set at 0.5 h<sup>-1</sup>. After an initial stabilization period of 24 h, the D set point selected in the range from 0.5 to 2.0 h<sup>-1</sup> was randomly changed each day. The 22 h stabilization period after changing the set point was considered sufficient to reach a pseudo-steady state for continuous culture at the new set point (Lamboley et al., 1997). Three samples were taken from the reactor at hour intervals after 22, 23 and 24 h of stabilization and used for viable cell enumeration and HPLC analysis. Beads were also sampled for viable cell enumeration at the end of the experiment.

#### 2.4.5 VIABLE CELL ENUMERATION

*B. longum* viable cell counts were determined by plating diluted samples in peptonized water on MRS-WP containing 1.5% agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), using the pour plate method, and incubating for 48 h at 37°C in anaerobic jars (BBL Microbiology System, Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). For bead population analysis, 1 ml of beads was dissolved in 9 ml of saline water at 45°C by vortexing for 15 min with glass beads. Reported data are means for duplicate analyses.

#### 2.4.6 HPLC

Concentrations of sugars (lactose, glucose, galactose) and organic acids (lactic and acetic acids) were determined in broth samples by HPLC analysis (Waters, Millipore Co, Montreal, QC, Canada) with a Phenomenex ion column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0064 N as eluent at a flow of 0.4 ml/min, as previously described (Lamboley et al., 1997).

#### 2.4.7 STATISTICAL ANALYSIS

The T test (LSD) was used to test for differences among treatment means using the SAS software (SAS System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), with a level of significance at 0.05.

## 2.5 Results

### 2.5.1 FREE-CELL BATCH FERMENTATIONS

Figure 2.1 shows the effect of pH on *B. longum* growth during free-cell batch fermentations at 37°C, with or without whey permeate supplementation of MRS medium. All fermentations with or without pH control between 5.0 and 6.5 exhibited the same growth during the first 6 h of culture, which corresponded to non-limiting growth conditions. After this period, growth rates and biomass concentrations varied greatly depending on pH set points. Very high maximum populations were measured after 12 h during cultures in the MRS-whey permeate medium at pH=5.5 ( $1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$  CFU/ml) and pH=6.0 ( $1.5 \pm 0.3 \times 10^{10}$  CFU/ml), which were not significantly different ( $p > 0.05$ ). A significantly lower *B. longum* concentration ( $9.0 \pm 2.3 \times 10^9$  CFU/ml) was obtained during fermentation at pH=5.0 after 12 h culture. Biomass growth during 12 h cultures at pH=6.5 and without pH control was very similar, with maximum biomass concentrations of  $3.5 \pm 0.5 \times 10^9$  and  $3.3 \pm 0.3 \times 10^9$  CFU/ml, respectively.

Whey permeate supplementation of MRS medium did not change cell growth during the first 8 h of fermentations at pH=5.5, but a lower final biomass was reached with MRS ( $8.7 \pm 2.6 \times 10^9$  CFU/ml) compared with MRS-WP ( $1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$  CFU/ml), which contained a higher total sugar concentration.

The highest acid concentrations in MRS-WP were obtained at pH=6.0 when sugars were completely metabolized, with lactic and acetic acid productions of  $14.0 \pm 0.9$  and  $14.6 \pm 1.5$  g/l after 12 h culture, respectively (Table 2.1). Significantly lower lactic and acetic acid productions ( $11.8 \pm 0.5$  and  $11.3 \pm 0.6$  g/l, respectively) were found after 12 h culture at pH=5.5. Despite the complete hydrolysis of lactose, only  $11.6 \pm 1.2$  g/l of initial glucose was metabolized in this condition and residual glucose concentration was high ( $7.5 \pm 1.2$  g/l). The ratios (w/w) of acetic to lactic acid at the end of cultures in MRS-WP for different pH were not significantly different and equal to  $0.93 \pm 0.08$  (Table 2.1). Galactose

concentrations at the end of cultures for different pH (except for pH=6.5) were low (<2 g/l) and not significantly different from unfermented media (Table 2.1). However, residual galactose concentration at pH=6.5 was very high (8.2 g/l).

Glucose was completely consumed after 10 h culture carried out at pH=5.5 in MRS medium without whey permeate supplementation (Figure 2.2). The lactic and acetic acid productions were significantly lower than in MRS-WP at the same pH ( $7.2\pm 0.8$  and  $9.6\pm 0.9$  g/l compared with  $11.8\pm 0.5$  and  $11.3\pm 0.6$  g/l for lactic and acetic acids, respectively). However, the acetic / lactic acid ratio (w/w) produced after 12 h culture in non-supplemented MRS ( $1.35\pm 0.17$ ) was significantly higher than for cultures in MRS-WP (Table 2.1).

The biomass yield after 12 h free-cell batch cultures at different pH varied between  $2.3\pm 0.3\times 10^8$  and  $5.7\pm 1.7\times 10^8$  CFU/g sugar consumed. The organic acid (sum of lactic and acetic acids) yields from sugar for different pH and media were not significantly different and averaged  $0.76\pm 0.08$  g/g sugar consumed.

## 2.5.2 IMMOBILIZED-CELL CONTINUOUS FERMENTATIONS

Table 2.2 shows residual sugars and biomass and organic acid productions determined in the outflow of continuous fermentations with cells immobilized in gellan gum gel beads, as a function of dilution rate. Cell count was highest ( $4.9\pm 0.9\times 10^9$  CFU/ml) at  $D=0.5\text{ h}^{-1}$  and it did not change significantly with dilution rate in the range from 1.0 to  $2.0\text{ h}^{-1}$  ( $3.7\pm 0.2\times 10^9$  CFU/ml). However, the highest biomass volumetric productivity increased from  $2.5\pm 0.4\times 10^9$  CFU $\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  to  $6.9\pm 0.4\times 10^9$  CFU $\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  with dilution rate increasing in the range from 0.5 to  $2.0\text{ h}^{-1}$ . *B. longum* counts in beads determined at the end of experiment were high, equal to  $6.8\pm 1.9\times 10^{10}$  CFU/g.

Glucose and lactose concentrations (approximately 20 g/l of each sugar) in the MRS-WP were not limiting factors for the continuous culture. Sugar utilization decreased from  $4.4\pm 1.1$  g/l and  $8.5\pm 0.5$  g/l to  $2.0\pm 0.5$  g/l and  $1.9\pm 0.6$  g/l, for glucose and lactose, respectively, for  $D$  increasing from 0.5 to  $2.0\text{ h}^{-1}$  (Table 2.2). However, the lactose intake

rate was not significantly different for all dilution rates tested, averaging  $4.1 \pm 0.3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . The glucose intake rate was significantly higher at high D of  $2.0 \text{ h}^{-1}$  ( $4.0 \pm 0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) than for low D of  $0.5$  and  $1.0 \text{ h}^{-1}$  (Table 2.2). Galactose concentrations remained low between  $0.6 \pm 0.2$  and  $1.7 \pm 0.4 \text{ g/l}$ , for D decreasing from  $2.0$  to  $0.5 \text{ h}^{-1}$ . Lactic and acetic acid productions were highest at low dilution rate ( $0.5 \text{ h}^{-1}$ ), equal to  $9.3 \pm 0.7$  and  $8.0 \pm 1.5 \text{ g/l}$ , respectively. However the organic acid productivities increased with the dilution rate to maximum values of  $11.9 \pm 1.0$  and  $10.5 \pm 1.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at  $D=1.5 \text{ h}^{-1}$  for lactic and acetic acids, respectively, and remained constant for a higher D of  $2.0 \text{ h}^{-1}$ . The ratio (w/w) of acetic and lactic did not show a defined trend with D, varying between  $0.85 \pm 0.10$  and  $0.99 \pm 0.03$  in the tested range (Table 2.2).

## 2.6 Discussion

### 2.6.1 FREE-CELL BATCH FERMENTATIONS

This study is the first to report supplementation of MRS medium with whey permeate for production of bifidobacteria. The MRS medium is a complex broth medium (de Man et al., 1960) that is commonly used to grow fastidious strains, such as lactobacilli and bifidobacteria. However its relatively low sugar content (2%, w/w) combined with its high cost may limit industrial applications. Whey-based media have already been used to grow bifidobacteria (Corre et al., 1992). In this study whey supplemented with casamino acids or yeast extract and a reducing agent, such as ascorbic acid or cysteine, appeared to be a suitable medium for *B. bifidum* growth during batch cultures without pH regulation. However, the maximum cell production ( $9 \times 10^8$  CFU/ml) was lower than in MRS medium ( $1.4 \times 10^9$  CFU/ml). Supplementation of MRS medium with whey permeate was investigated in our study to increase MRS characteristics for bifidobacteria growth. Indeed, whey permeate represents a low-cost source of lactose and other components such as minerals and nitrogen compounds that can be limiting factors for growth of bifidobacteria.

Free-cell batch fermentations were carried out in MRS-WP with pH control in the range from 5.0 to 6.5 to determine *B. longum* optimal growth conditions. Very high biomass concentrations of  $1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$  and  $1.5 \pm 0.3 \times 10^{10}$  CFU/ml were obtained at pH=5.5 and 6.0, respectively. This is in agreement with the fact that optimal growth of bifidobacteria occurs within pH interval of 5.5-6.0 (Scardovi, 1986). Organic acid productions were higher in cultures at pH=6.0 than at pH=5.5. Available sugars were completely consumed at pH=6.0, contrary to fermentations at pH=5.5 where approximately 8.5 g/l glucose remained in the medium after the 12 h culture. This data can be explained by the higher concentration of un-dissociated lactic and acetic acids at low pH, which are the most inhibitory forms (Gätje and Gottschalk, 1991). HPLC analyses clearly demonstrated that *B. longum* preferentially metabolized lactose to glucose during free-cell batch fermentations of a medium containing the two sugars (Figure 2.2). Galactose produced from lactose hydrolysis was also readily



consumed, as shown by the very low galactose concentrations measured after 12 h cultures (< 2 g/l), except for pH=6.5 (8.2 g/l) (Table 2.1).

*B. longum* production was significantly lower during free-cell batch fermentations carried out in non-supplemented MRS medium with optimal pH conditions (pH=5.5) ( $8.7 \pm 2.6 \times 10^9$  CFU/ml) compared with MRS-WP at the same pH ( $1.7 \pm 0.5 \times 10^{10}$  CFU/ml). The same trend was observed for organic acid productions. The complete glucose intake after 10 h culture clearly shows that sugar was the limiting factor in MRS fermentation (Figure 2.2). However other components than lactose in whey permeate, such as minerals and some nitrogen compounds, could also promote the growth of *B. longum* in MRS-WP.

## 2.6.2 IMMOBILIZED-CELL CONTINUOUS FERMENTATION

Continuous fermentation with *B. longum* immobilized in gellan gum gel beads was carried out to study the effect of dilution rate, in the range from 0.5 to 2.0 h<sup>-1</sup>, on biomass production. Very high cell concentrations were continuously produced in the effluent, with maximum at D=0.5 h<sup>-1</sup> ( $4.9 \pm 0.9 \times 10^9$  CFU/ml). The fermentation medium composition was not apparently a limiting factor, as high sugar concentrations remained in the effluent of the continuous culture. In the only other work on continuous production of bifidobacteria with immobilized cells, a pure culture of *B. infantis* immobilized in κ-carrageenan/locust bean gum gel beads was used to continuously ferment skim milk (10% solids) supplemented with 1% yeast extract (Ouellette et al., 1994). Cell counts in the cultured milk increased from 1.0 to  $2.2 \times 10^9$  CFU/ml for dilution rates decreasing in the range from 1.0 to 0.5 h<sup>-1</sup>. Compared with our study, the lower cell production could be due to different growth rates for the two strains and to the fact that the MRS-WP might be better suited for growth of bifidobacteria than milk-based media (Desjardins et al., 1991). *B. bifidum* maximal productivity in a whey-based medium using a continuous stirred tank reactor attached to an ultrafiltration device was approximately 35-fold lower ( $2 \times 10^8$  CFU•ml<sup>-1</sup>•h<sup>-1</sup>) than in our study ( $6.9 \pm 0.4 \times 10^9$  CFU•ml<sup>-1</sup>•h<sup>-1</sup> at D=2.0 h<sup>-1</sup>), for similar cell concentrations in the ultrafiltration retentate ( $5 \times 10^9$  CFU/ml) and in the effluent of the immobilized cell reactor ( $3.5 \pm 0.2 \times 10^9$  CFU/ml) (Corre et al., 1992). Maximal volumetric productivity at pH=5.5

during 12-h free-cell batch cultures, considering one 12 h experiment per working day, reached  $7.2 \times 10^8$  CFU $\cdot$ ml $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ , which is approximately 9.5-fold lower than for continuous fermentations.

Lactic and acetic acid concentrations in the effluent of the continuous fermentations were much lower for all dilution rates tested than after 12 h of free-cell batch fermentations carried out with the same pH and medium. However organic acid productivities were approximately 4.5- (D=0.5 h $^{-1}$ ) to 11.5-fold (D=2.0 h $^{-1}$ ) higher during continuous fermentation with immobilized cells compared with free-cell batch fermentations (12 h culture).

Very high *B. longum* counts were determined in beads at the end of the experiment ( $6.8 \pm 1.9 \times 10^{10}$  CFU/g). Similar bead colonizations were reported for the same culture immobilized in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads during fermentations in MRS (Doleyres et al., 2002) or in MRS-WP (Camelin et al., 1993), with  $9.6 \times 10^{10}$  and  $7.0 \times 10^{10}$  CFU/g, respectively. However, cell concentration in beads was much lower ( $2 \times 10^{10}$  CFU/g) during continuous fermentation of skim milk supplemented with yeast extract with immobilized *B. infantis* (Ouellette et al., 1994).

Our study showed that MRS medium supplementation with whey permeate is a very suitable fermentation medium for *B. longum* production and increased cell production by 2-fold compared with MRS. In addition, the immobilized cell technology can be used to continuously produce fastidious micro-organisms, such as bifidobacteria, with a high volumetric productivity and high biomass concentrations in the outflow of the continuous fermentation, even at high dilution rates exceeding the specific growth rate.

**Table 2.1** : Residual sugar concentrations and biomass and acid productions after 12 h culture during *B. longum* ATCC 15707 pH-controlled batch fermentations in MRS medium with or without whey permeate supplementation.

| pH / Medium                        | Cell counts<br>[CFU*10 <sup>-9</sup> /ml] | Glucose <sup>1</sup><br>[g/l] | Galactose <sup>1</sup><br>[g/l] | Lactose <sup>1</sup><br>[g/l] | Lactic acid<br>production<br>[g/l] | Acetic acid<br>production<br>[g/l] | Ratio<br>acetic acid / lactic acid | Biomass Yield<br>[10 <sup>8</sup> CFU/g sugar<br>consumed] |
|------------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 5.0 / MRS-WP                       | 9.0 (±2.3) <sup>a</sup>                   | 14.0 (±2.9) <sup>a</sup>      | 1.5 (±0.5) <sup>a</sup>         | 6.9 (±4.0) <sup>a</sup>       | 6.6 (±0.8) <sup>a</sup>            | 5.8 (±0.9) <sup>a</sup>            | 0.88 (±0.10) <sup>a</sup>          | 5.1 (±1.3) <sup>a</sup>                                    |
| 5.5 / MRS-WP                       | 17.3 (±5.0) <sup>b</sup>                  | 7.5 (±1.2) <sup>b</sup>       | 2.0 (±0.8) <sup>a</sup>         | 0.4 (±0.6) <sup>b</sup>       | 11.8 (±0.5) <sup>b</sup>           | 11.3 (±0.6) <sup>b</sup>           | 0.96 (±0.04) <sup>a</sup>          | 5.7 (±1.7) <sup>a</sup>                                    |
| 6.0 / MRS-WP                       | 15.0 (±3.0) <sup>b</sup>                  | 0.7 (±1.7) <sup>c</sup>       | 1.1 (±0.5) <sup>a</sup>         | 0.4 (±1.1) <sup>b</sup>       | 14.0 (±0.9) <sup>c</sup>           | 14.6 (±1.5) <sup>c</sup>           | 1.04 (±0.12) <sup>a</sup>          | 4.0 (±0.8) <sup>a</sup>                                    |
| 6.5 / MRS-WP                       | 3.5 (±0.5) <sup>c</sup>                   | 15.9 (n.a.) <sup>a</sup>      | 8.2 (n.a.) <sup>b</sup>         | 0.7 (±0.3) <sup>b</sup>       | 5.2 (±0.1) <sup>d</sup>            | 4.3 (±0.5) <sup>a</sup>            | 0.93 (±0.07) <sup>a</sup>          | 2.3 (±0.3) <sup>b</sup>                                    |
| Uncontrolled <sup>2</sup> / MRS-WP | 3.3 (±0.3) <sup>c</sup>                   | 11.7 (±1.8) <sup>a</sup>      | 1.1 (±0.6) <sup>a</sup>         | 14.5 (±0.1) <sup>c</sup>      | 5.6 (±1.4) <sup>ad</sup>           | 4.9 (±0.9) <sup>a</sup>            | 0.82 (±0.01) <sup>a</sup>          | 2.6 (±0.2) <sup>b</sup>                                    |
| 5.5 / MRS                          | 8.7 (±2.6) <sup>a</sup>                   | 0.0 (±0.0) <sup>d</sup>       | 0.2 (±0.2) <sup>c</sup>         | ---                           | 7.2 (±0.8) <sup>a</sup>            | 9.6 (±0.9) <sup>b</sup>            | 1.35 (±0.17) <sup>b</sup>          | 4.4 (±1.3) <sup>a</sup>                                    |

Means and standard deviations are calculated from triplicate experiments. Means with the same letter (by columns) are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

<sup>1</sup> Initial glucose, galactose and lactose concentrations were 19.5±1.1, 0.8±0.5, 0 g/l in MRS and 19.5±0.9, 1.4±0.4, 20.9±0.8 g/l in MRS-WP.

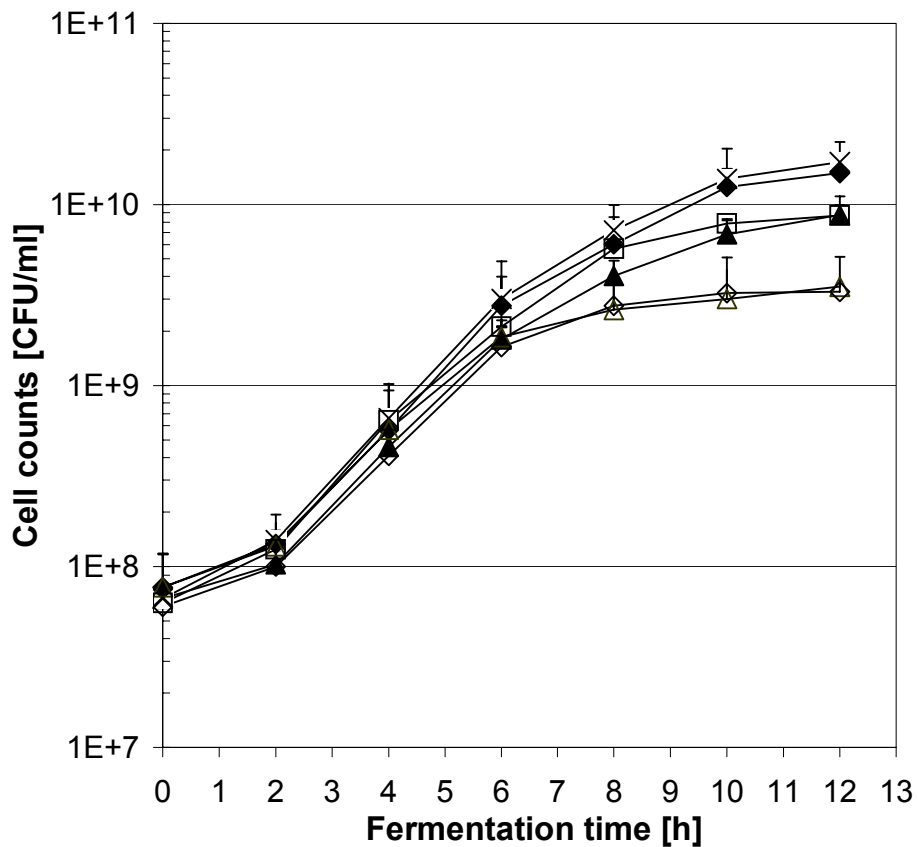
<sup>2</sup> Final pH was 4.5

n.a. = Only one repetition was available for these data.

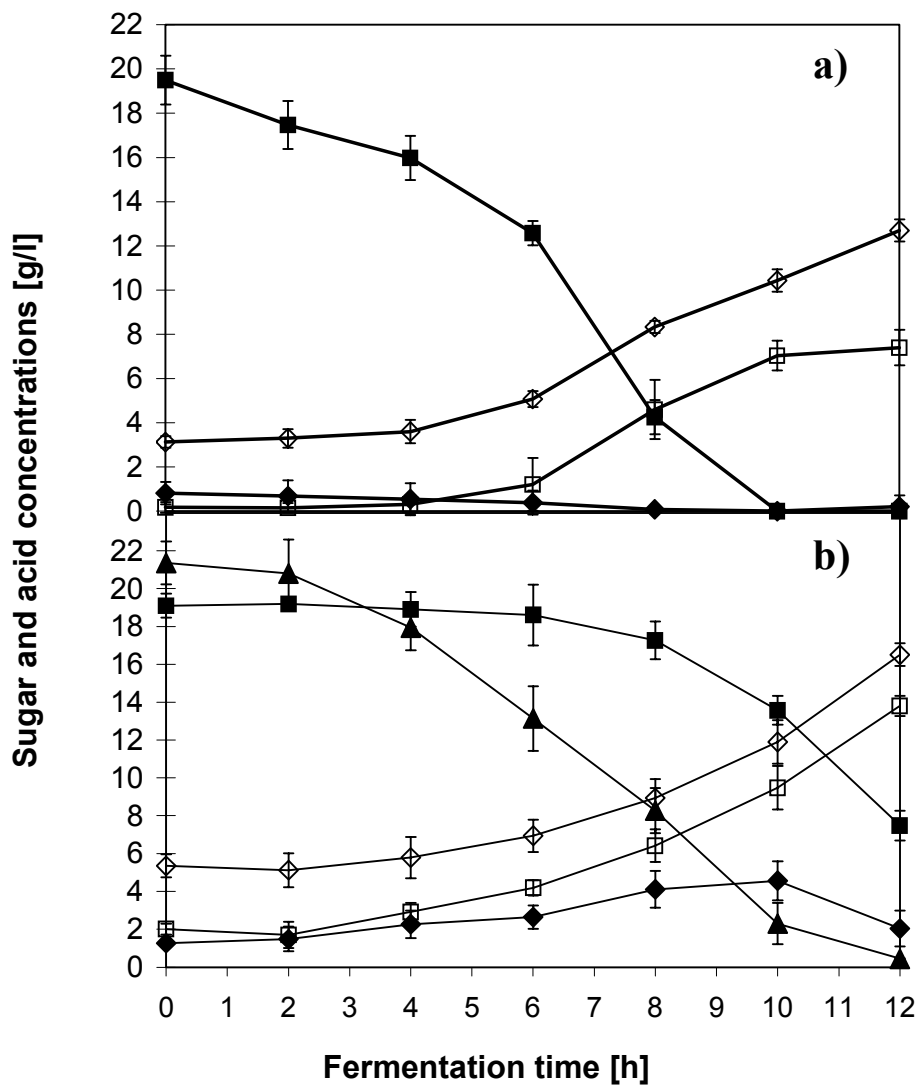
**Table 2.2** : Residual sugar concentrations and biomass and acid productions during continuous fermentation of MRS-WP at pH=5.5 with immobilized cells of *B. longum* ATCC 15707 in gellan gum gel beads as a function of dilution rate.

| Dilution rate<br>[h <sup>-1</sup> ] | Cell counts<br>[CFU*10 <sup>-9</sup> /ml] | Biomass maximal<br>volumetric productivity<br>[CFU*10 <sup>-9</sup> ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | Glucose <sup>1</sup><br>[g/l] | Galactose <sup>1</sup><br>[g/l] | Lactose <sup>1</sup><br>[g/l] | Glucose<br>intake rate <sup>1</sup><br>[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | Lactose<br>intake rate <sup>1</sup><br>[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | Lactic acid<br>production<br>[g/l] | Acetic acid<br>production<br>[g/l] | Lactic acid<br>productivity<br>[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | Acetic acid<br>productivity<br>[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | Ratio<br>acetic acid<br>/<br>lactic acid |
|-------------------------------------|---|--|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|---|------------------------------------|------------------------------------|---|---|--|
| 0.5                                 | 4.9 (±0.9) <sup>a</sup>                   | 2.5 (±0.4) <sup>a</sup>  | 15.6 (±1.1) <sup>a</sup>      | 1.7 (±0.4) <sup>ab</sup>        | 11.5 (±0.5) <sup>a</sup>      | 2.2 (±1.1) <sup>a</sup>   | 4.2 (±0.2) <sup>a</sup>   | 9.3 (±0.7) <sup>a</sup>            | 8.0 (±1.5) <sup>a</sup>            | 4.6 (±0.3) <sup>a</sup>   | 4.0 (±0.7) <sup>a</sup>   | 0.85 (±0.10) <sup>a</sup>                |
| 1.0                                 | 3.7 (±0.1) <sup>b</sup>                   | 3.7 (±0.1) <sup>b</sup>  | 18.2 (±0.6) <sup>b</sup>      | 1.1 (±0.2) <sup>bc</sup>        | 15.5 (±0.3) <sup>b</sup>      | 1.8 (±0.6) <sup>a</sup>   | 4.5 (±0.3) <sup>a</sup>   | 7.6 (±0.2) <sup>b</sup>            | 7.5 (±0.1) <sup>a</sup>            | 7.6 (±0.2) <sup>b</sup>   | 7.5 (±0.1) <sup>b</sup>   | 0.99 (±0.03) <sup>b</sup>                |
| 1.5                                 | 3.8 (±0.1) <sup>b</sup>                   | 5.7 (±0.15) <sup>c</sup>   | 17.7 (±0.8) <sup>b</sup>      | 1.0 (±0.1) <sup>c</sup>         | 17.2 (±0.7) <sup>c</sup>      | 3.5 (±1.2) <sup>ab</sup>  | 4.0 (±1.0) <sup>a</sup>   | 8.0 (±0.7) <sup>b</sup>            | 7.0 (±1.0) <sup>a</sup>            | 11.9 (±1.0) <sup>c</sup>  | 10.5 (±1.5) <sup>c</sup>  | 0.88 (±0.07) <sup>ab</sup>               |
| 2.0                                 | 3.5 (±0.2) <sup>b</sup>                   | 6.9 (±0.4) <sup>d</sup>  | 18.0 (±0.5) <sup>b</sup>      | 0.6 (±0.2) <sup>d</sup>         | 18.0 (±0.6) <sup>c</sup>      | 4.0 (±0.5) <sup>b</sup>   | 3.8 (±1.1) <sup>a</sup>   | 5.6 (±0.1) <sup>c</sup>            | 5.2 (±0.4) <sup>b</sup>            | 11.2 (±0.2) <sup>c</sup>  | 10.5 (±0.8) <sup>c</sup>  | 0.94 (±0.06) <sup>ab</sup>               |

Means and standard deviations are calculated from duplicate experiments. Means with the same letter (by columns) are not significantly different ( $P > 0.05$ ).<sup>1</sup> Initial glucose, galactose and lactose concentrations were 18.9±0.2, 0.5±0.3, 20.3±0.6 g/l.



**Figure 2.1** : Viable cell counts during free-cell batch fermentations of *B. longum* ATCC 15707 in MRS-WP at pH=5.0 (▲), 5.5 (×), 6.0 (◆), 6.5 (△) and without pH control (◇), or in unsupplemented MRS medium at pH=5.5 (□).



**Figure 2.2** : Lactose (▲), glucose (■), galactose (◆), lactic (□) and acetic (◇) acid concentrations determined by HPLC analysis during free-cell pH-controlled (pH=5.5) batch fermentations of *B. longum* ATCC 15707 in MRS medium (a) or in MRS-WP (b).

**CHAPITRE 3: Quantitative determination of the spatial  
distribution of pure and mixed-strain immobilized  
cells in gel beads by immunofluorescence**

Y. Doleyres, I. Fliss et C. Lacroix

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

Publié dans "Applied Microbiology and Biotechnology", **59** : 297-302, 2002.

### 3.1 Résumé

Une nouvelle méthode basée sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux et la microscopie confocale a été développée pour détecter et quantifier deux souches, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD et *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, immobilisées séparément ou co-immobilisées dans des billes de gel. Ainsi, l'établissement d'un profil de concentration de biomasse pour chaque souche a été mesuré durant la colonisation des billes lors de fermentations successives en batch avec pH contrôlé. La croissance cellulaire s'est déroulée principalement dans une couche périphérique de billes d'une épaisseur de respectivement 200 et 300  $\mu\text{m}$  pour *L. diacetylactis* and *B. longum*. Ces fermentations en batches répétés avec cellules immobilisées ont également permis de produire une culture mixte contenant une souche peu compétitive de bifidobactérie, grâce à la croissance des cellules immobilisées et à la forte libération cellulaire de la périphérie des billes dans le milieu de fermentation. Par ailleurs, aucun phénomène particulier de coopération ou d'inhibition entre les deux souches fut observé lors des fermentations en culture mixte.



### 3.2 Abstract

A new method was developed to detect and quantify two strains, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, immobilized separately and co-immobilized in gel beads, using specific polyclonal antibodies and confocal laser-scanning microscopy. The establishment of biomass concentration profiles for each strain was measured during colonization of beads using successive pH-controlled batch fermentations. Growth occurred preferentially in 200 and 300  $\mu\text{m}$  peripheral layers of the beads for *L. diacetylactis* and *B. longum*, respectively. Repeated-batch cultures with immobilized cells permitted the production of a mixed culture containing a non-competitive strain of bifidobacteria, as a result of immobilized cell growth and high cell-release activity from the beads. During co-immobilized fermentations, there were no apparent interactions of strains.

### 3.3 Introduction

Fermented dairy products containing probiotics are increasingly gaining popularity with consumers because of their perceived importance in human health (Chandan, 1999). Due to their low competitiveness for fermenting milk or other media when they are grown in mixed cultures with lactic acid bacteria, bifidobacteria are usually propagated in pure cultures, and then added in combination with the lactic starter used for milk fermentation (Tamime et al. 1995).

The immobilized cell technology with lactic acid bacteria in polysaccharide gel beads has been studied for the continuous production of mixed cultures of mesophilic lactic acid bacteria with controlled composition (Lamboley et al. 1997, 1999, 2001). The high immobilized cell concentration and cell release from the beads to the bulk medium lead to high process productivity and biological stability. However, a complex redistribution of strains among gel beads initially immobilizing a pure culture was observed. An immunofluorescent method involving double color labelling and confocal microscopy has been recently developed to specifically detect lactic acid bacteria and probiotic cells co-immobilized in gel beads (Prioult et al. 2000). This method could be used for studying the complex microbial dynamics for mixed cultures in gel beads. However, this would require the localization and quantification of microcolonies in beads.

The aim of the present research was therefore to develop a quantitative analysis for the detection of immobilized cells, using the immunological method described by Prioult et al. (2000). Bead colonization during successive batch fermentations with a model mixed culture containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* as a competitive strain, and *Bifidobacterium longum* as a non-competitive probiotic strain, immobilized separately or co-immobilized, was analyzed with this new method for cell detection.

## 3.4 Materials and Methods

### 3.4.1 STRAINS AND MEDIUM

For immobilization, pure cultures of *B. longum* ATCC 15707 (American Type Collection Culture, Rockville, MD, USA) or *L. diacetylactis* MD (Rhône Poulenc, Brampton, ON, Canada) from frozen stock (-80°C) were grown twice in MRS broth (Rosell Institute Inc., Montreal, QC, Canada) supplemented with 0.5 g/l cysteine, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>, for 18 h at 30°C for *L. diacetylactis* or 37°C for *B. longum* with a 2% (v/v) inoculum.

### 3.4.2 CELL IMMOBILIZATION

*B. longum* and *L. diacetylactis* cultures were immobilized separately or co-immobilized in κ-carrageenan/locust bean gum gel beads, as described previously (Lamboley et al. 1997). For gel bead production, a total inoculum of 2 % (v/v) was used for pure and mixed cultures. Co-immobilization was carried out with two strain ratios (1:1 and 9:1) for *B. longum* and *L. diacetylactis*. Beads with diameters in the range 1-2 mm were selected by wet sieving and used for subsequent fermentation experiments.

### 3.4.3 FERMENTATIONS

Fermentations were carried out in a stirred tank bioreactor (Bioflo model C30, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) purged with CO<sub>2</sub> and inoculated with 100 ml of beads, giving a total culture volume of 500 ml. The pH-controlled batch fermentations were performed at 37°C in supplemented MRS broth containing KCl 0.1 M to keep the bead structure, with mixing set at 200 rpm and pH controlled at 5.8 or 6.2 by addition of 5 N NaOH. The fermented broth was replaced with fresh medium when the base

consumption stopped. Three successive batch fermentations (pH=5.8) of 14.5 h, 11.5 h and 2 h or 14.5 h, 11.5 h and 6.5 h were carried out for pure cultures of *B. longum* or *L. diacetylactis*, respectively. Two experiments were conducted with co-immobilized cells with different strain ratios. For the first experiment, three successive batch fermentations (pH=5.8) of 14 h, 8 h and 4 h were carried out with a 1:1 initial strain ratio. For the second one, four successive batch fermentations (pH=6.2) of 12 h, 9 h, 2.5 h and 1.5 h were carried out with a 9:1 initial *B. longum* / *L. diacetylactis* ratio. Bead and broth samples were taken from the reactor at different time intervals for cell enumeration using plate counts and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and for immunofluorescence microscopy.

#### 3.4.4 VIABLE CELL ENUMERATION

*L. diacetylactis* was enumerated by plating diluted samples on solid M17 agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 0.5% lactose and incubating aerobically at 30°C for 48 h. Columbia agar base (Difco Laboratories) supplemented with 0.5 g/l cysteine, 10 g/l lactose, 2 g/l LiCl, 3 g/l sodium propionate and 20 mg/l kanamycin was used to selectively determine *B. longum* population, after incubation at 37°C for 48 h in anaerobic jars. For bead population analysis, approximately 0.5 g of accurately weighed beads in 4.5 ml peptonized water was treated with an Ultra-Turax (Janke and Kunkel, Staufen, Germany) on ice for 45 s at 13500 rpm to break up the beads and resuspend the cells. Reported data are means for duplicate analyses.

#### 3.4.5 TOTAL BIOMASS DETERMINATION BY ELISA

A sandwich-type ELISA using anti-*B. longum* and anti-*L. diacetylactis* polyclonal antibodies labelled with horseradish peroxidase was used to specifically determine the total biomass concentration of each strain in beads, as described by Prioult et al. (2000). Reported data are means for triplicate analyses.

### 3.4.6 CONFOCAL MICROSCOPY OBSERVATIONS AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SPATIAL BIOMASS DISTRIBUTION IN BEADS

Bead preparation and confocal microscopy observation, using specific fluorescent polyclonal antibodies for the two strains, were performed as previously described (Prioult et al. 2000). The biomass volumetric fraction for each strain as a function of the gel bead radius was derived from the position and surface area of the colonies in the labelled sections (Hunik et al. 1993). For this determination, bead sections were divided into 2.5  $\mu\text{m}$  thickness annular regions and the number and fraction of fluorescent pixels containing biomass were determined in each region as a function of radius (Figure 3.1). Total biomass concentration in the beads determined by ELISA was used to calculate cell concentration (cells/g) from the fraction of biomass in the annular regions. For this calculation, a numerical integration of occupation profiles as a function of depth in the bead, which was assumed to be perfectly spherical, was carried out for each strain. The mean profiles from one, two or five beads during *L. diacetylactis* fermentation were used to determine the effect of the number of beads analyzed for a given fermentation time on biomass profile accuracy. Five beads were used to determine biomass profiles during subsequent fermentations.

## 3.5 Results

### 3.5.1 SINGLE-STRAIN FERMENTATIONS

Bead colonization was first studied during single-strain repeated-batch fermentations. In *L. diacetylactis* cultures, immobilized cell concentration increased exponentially during the first 8-12 hours of the first batch fermentation to reach  $5.4 \pm 1.3 \times 10^9$  CFU/g beads and only doubled to  $1.1 \pm 0.2 \times 10^{10}$  CFU/g at the end of the third culture (32 h; Figure 3.2a). Viable-cell counts in the broth at the end of batch cultures were very similar, and remained low between  $5.7 \pm 0.2 \times 10^7$  CFU/ml and  $1.7 \pm 0.1 \times 10^8$  CFU/ml. The total cell concentration in beads measured by ELISA was two- to threefold higher than viable-cell counts, at the beginning of the stationary phase of the first batch culture (12 h). Confocal microscopy images and analysis of spatial biomass distribution showed that *L. diacetylactis* growth was almost nil at the bead centre but mainly occurred in a 200  $\mu\text{m}$  peripheral layer of the beads (Figure 3.3a). Cell concentration estimated by reference to the ELISA test reached  $5.0 \times 10^9$  cells/g at the bead centre at the end of the first batch culture (14.5 h) and did not increase thereafter. However cell concentration in the peripheral layer increased during the three successive batch cultures and reached  $2.7 \times 10^{10}$  cells/g near the bead surface at the end of the third batch (31.5 h). Increasing the number of beads analyzed from 1 to 5 produced smoother profiles but did not change cell concentrations as a function of bead depth (Figure 3.4).

In *B. longum* cultures, viable-cell counts in beads increased during the first two batch cultures to a very high value of  $9.6 \pm 1.0 \times 10^{10}$  CFU/g after 26 h culture (Figure 3.2b). Viable-cell counts in the broth continuously increased with the number of batch cultures, from  $8.2 \pm 0.6 \times 10^8$  CFU/ml at the end of the first batch to  $2.5 \pm 0.2 \times 10^9$  CFU/ml for the third batch. As observed with *L. diacetylactis*, *B. longum* cell concentration determined by ELISA was similar to viable cell counts in beads during the exponential growth of the first

batch culture but was higher during the stationary phase, with a maximal ratio of 3.2 after 14.5 h culture. Growth occurred mainly in a 300  $\mu\text{m}$  peripheral layer but did not stop at the bead centre during the experiment. Cell concentration at the bead centre and periphery reached  $8.0 \times 10^{10}$  and  $1.9 \times 10^{11}$  cells/g at the end of the third culture (Figure 3.3b).

### 3.5.2 MIXED-STRAIN FERMENTATIONS

Microbial dynamics in beads and broth was then studied during fermentations with co-immobilized cells to observe possible interactions between the two strains. Figure 3.5 shows the strain concentrations in beads and broth during repeated-batch fermentations carried out at  $\text{pH}=6.2$  with an inoculum composition of 9:1 *B. longum* / *L. diacetylactis*. Viable-cell counts of *L. diacetylactis* in beads increased until 9-12 h of culture during the first batch and remained constant during the subsequent batches at  $2.1 \pm 0.1 \times 10^{10}$  CFU/g. For *B. longum*, viable-cell counts in beads increased during repeated-batch fermentations up to  $9.9 \pm 0.1 \times 10^{10}$  CFU/g at the end of the fourth batch (26 h). Lactococci free-cell counts in the broth at the end of the batch cultures did not change from the first to the fourth batch, averaging  $2.2 \pm 0.7 \times 10^8$  CFU/ml. On the other hand, *B. longum* viable-cell counts at the end of batch cultures progressively increased from  $1.1 \pm 0.1 \times 10^8$  to  $1.3 \pm 0.1 \times 10^9$  CFU/ml from the first to the fourth batch culture. *L. diacetylactis* and *B. longum* concentrations in beads determined by ELISA were four- to fivefold higher than the viable-cell counts after an initial culture period (Figure 3.5). *L. diacetylactis* concentration at the bead centre reached  $1.2 \times 10^{10}$  cells/g at the end of the second batch culture (21 h) and did not change thereafter (Figure 3.6a). Growth was concentrated in a 200-250  $\mu\text{m}$  peripheral layer and peaked at  $5.3 \times 10^{10}$  cells/g near the bead surface (80  $\mu\text{m}$ ) at the end of the experiment. *B. longum* cell concentration near the bead centre and the bead surface (60-120  $\mu\text{m}$ ) increased gradually during the repeated cultures, to maxima of approximately  $7.3 \times 10^{10}$  and  $1.5 \times 10^{11}$  cells/g (Figure 3.6b).

A second experiment with co-immobilized cells was conducted under the same conditions except for pH control (5.8) and strain ratio (1:1) in the inoculum used for bead preparation, to tentatively favor the growth of *L. diacetylactis* and decrease the dominant behaviour of *B. longum* observed in the first experiment. Very similar data were obtained for both co-immobilized culture experiments, for both immobilized and free-cell concentrations and biomass profiles in gel beads (data not shown).



### 3.6 Discussion

This study is the first to report the specific and quantitative analysis of the spatial biomass distribution of *L. diacetylactis* and *B. longum*, immobilized separately or co-immobilized in gel beads, using ELISA and an immunofluorescent method involving double colour labelling and confocal microscopy. Viable-cell counts determined on Petri dishes can only be correlated to the ELISA test and confocal images when no loss of viability is postulated since polyclonal antibodies detect both live and dead biomass and when the antigen-antibody reaction is not altered for immobilized cells compared with free cells used to calibrate the ELISA test. Clearly, this was not the case during fermentations, during which the ELISA test measured a much higher cell concentration than plate counts (ratio from 2 to 5) after an initial growth period (Figures 3.2 and 3.5). Increasing the number of beads analyzed (from 1 to 5) to determine biomass profiles smoothed the curves but did not change the concentration profiles, indicating a high uniformity of colonization and biomass profiles among beads (Figure 3.4).

Quantitative determination of the spatial distribution of the two strains in beads showed that, after an initial colonization, cell growth occurred preferentially in a 200 or 300  $\mu\text{m}$  layer near the bead surface for *L. diacetylactis* and *B. longum*, respectively, for both separately and co-immobilized cells (Figures 3.3 and 3.6). Conditions are more favourable for cell growth close to the gel bead surface due to diffusional limitations for both substrates and inhibitory products, in this case lactic and acetic acids (Arnaud et al. 1992; Lamboleley et al. 1997), which result in a sharp pH gradient in beads (Masson et al. 1994). In addition, a cell concentration decrease can be observed close to the bead surface, which is explained by the high cell-release activity from the bead to the broth medium (Figures 3.3 and 3.6). The thicker growth layer and the higher total and viable-cell concentrations for immobilized *B. longum* than for *L. diacetylactis* indicate that this culture is more resistant to lactic and acetic acid local concentrations in beads, for the culture conditions used in this

study. Using electron microscopy, Arnaud and Lacroix (1991) reported that immobilized cells of *Lactobacillus casei* were concentrated in a 400 µm peripheral layer. Using sequential dilution of alginate beads, Prévost and Diviès (1988) observed that 43 and 90% of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* immobilized cells were localized in a peripheral layer of 130 and 410 µm.

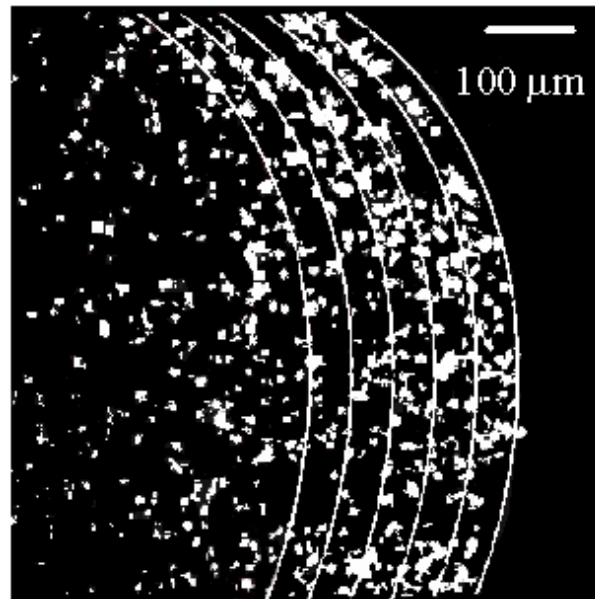
This study also showed that immobilized cell technology allowed the production of a model mixed-lactic starter containing a competitive strain (*L. diacetylactis*) and a non-competitive strain of bifidobacteria. Immobilized cell technology had already been used for the efficient and stable continuous production of mixed-strain mesophilic lactic starters of controlled composition and activity in fermented medium, as a result of high immobilized cell counts and cell-release activity from gel beads (Lambole et al. 1997, 1999, 2001). Fermentation conditions, such as temperature (37°C) and medium composition, were thus chosen to promote growth of *B. longum*. With these conditions, bead colonization during repeated pH-controlled batch fermentation was complete at the end of the first batch culture for both strains, but a much higher viable-cell concentration in beads was obtained for *B. longum* ( $1.0 \times 10^{11}$  CFU/g) than for *L. diacetylactis* ( $1.1 \times 10^{10}$  CFU/g) (Figure 3.2). Similar concentrations in gel beads were reported during continuous fermentations with *B. longum* (Camelin et al. 1993), but much higher concentrations ( $1.2 \times 10^{11}$  CFU/g) were obtained with lactococci (Lambole et al. 1997). As a result of immobilized cell growth and cell release, a much higher concentration of *B. longum* ( $1.7 \pm 1.1 \times 10^9$  CFU/ml) was produced in the broth at the end of batch cultures compared with *L. diacetylactis* ( $1.1 \pm 0.5 \times 10^8$  CFU/ml) (Figure 3.2).

During the production of mixed cultures of non-isogenic lactococci, two strains exhibiting a competitive relationship in free-cell cultures were found to be cooperative during fermentations carried out with immobilized cells (Audet et al. 1995). However this phenomenon was not observed in the present study. *L. diacetylactis* strain was apparently not influenced by the presence of the other strain during mixed co-immobilized

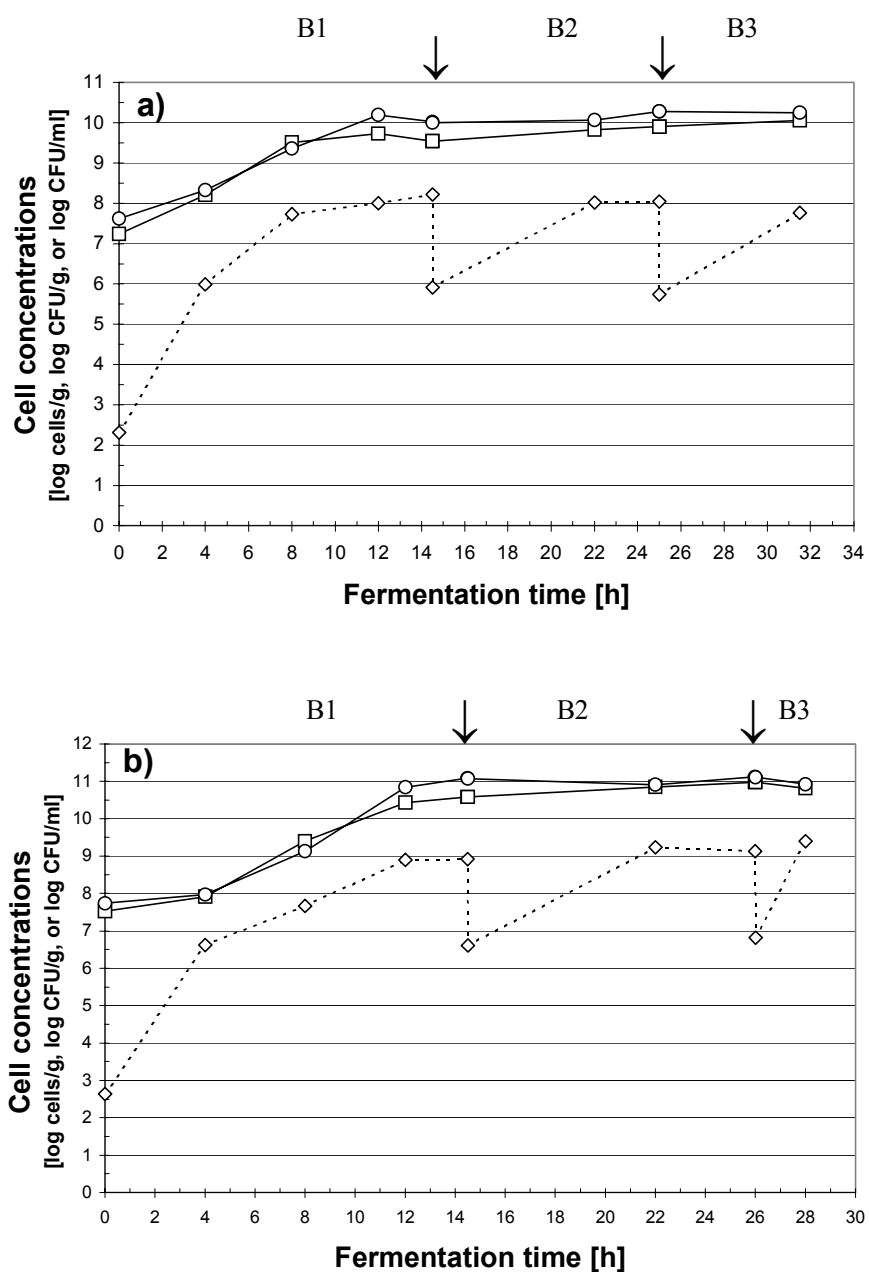
fermentations (Figures 3.2a and 3.5). However *B. longum* maximal concentration in beads and broth was reached later in mixed cultures compared with pure cultures (end of fourth and first batch, respectively), with no effect on maximal ELISA and viable cell counts (Figures 3.2b and 3.5). At the end of the fourth batch fermentation, a mixed free-cell culture containing  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml *L. diacetylactis* and  $1.3 \times 10^9$  CFU/ml *B. longum* was produced in the broth (Figure 3.5). *B. longum* counts could be further increased with the number of batch cultures, and by starting a continuous culture. In the previous chapter, a cell production of  $4.9 \times 10^9$  CFU/ml was measured in the broth for the same strain in immobilized cell continuous cultures. On the other hand, *L. diacetylactis* cell counts in the broth did not change from the end of the first to the fourth batch cultures, indicating the unfavourable conditions for this strain in mixed cultures.

To promote *L. diacetylactis* growth in mixed cultures, a new set of experiments was performed with pH decreased from 6.2 to 5.8 and *L. diacetylactis* concentration increased approximately tenfold in the inoculum used for bead preparation. These changes gave very little effect on the growth and fermentation of both strains, suggesting that culture conditions, such as lower fermentation temperatures, should be changed to promote the growth of *L. diacetylactis* and balance the mixed cultures.

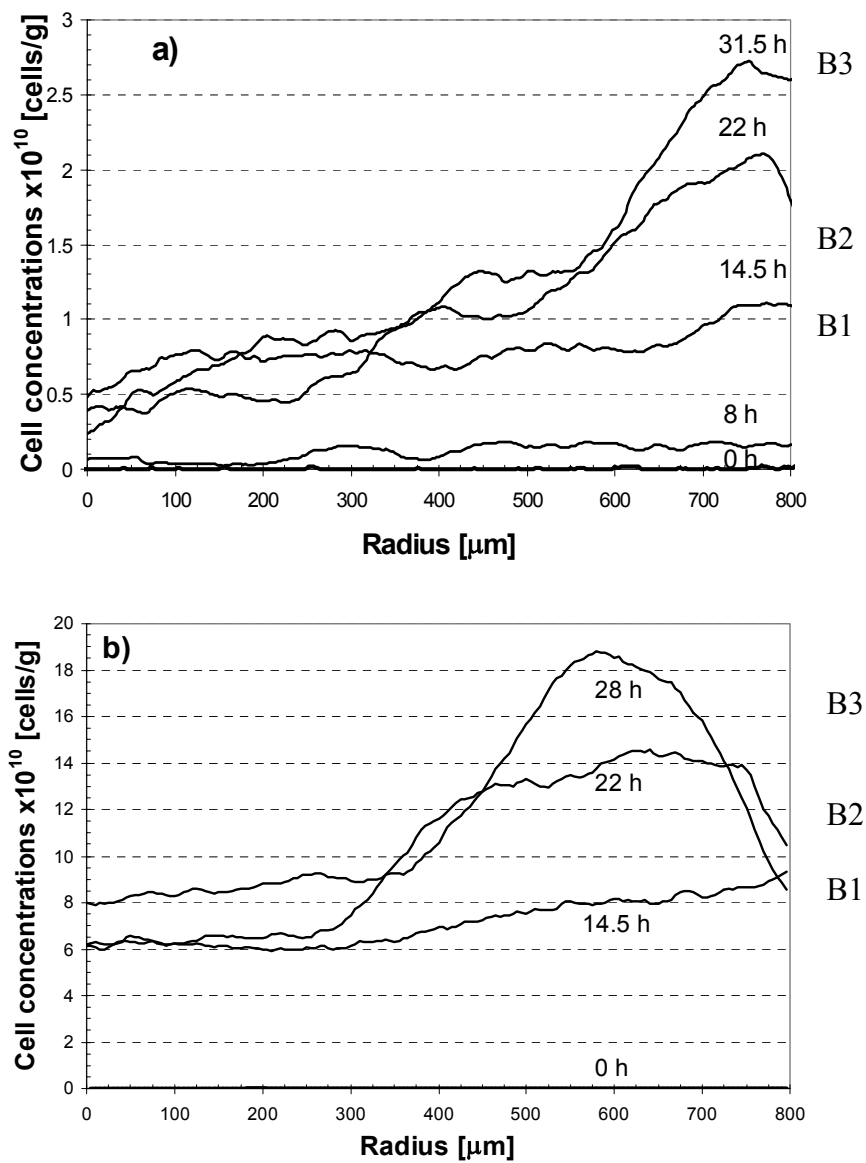
The present study shows that cell immobilization in polysaccharide gel beads can be used to produce a mixed-lactic starter containing a non-competitive strain of bifidobacteria. Viable-cell counts in the broth during repeated pH-controlled batch fermentations were related to biomass concentrations of each strain in the beads. Moreover, a new method was tested to specifically localize and quantify biomass profiles in gel beads, using specific polyclonal antibodies and confocal laser-scanning microscopy observations. This method will be used to study the complex microbial phenomena that occur in beads during continuous production of mixed-strain lactic starters using immobilized cell technology (chapter 4).



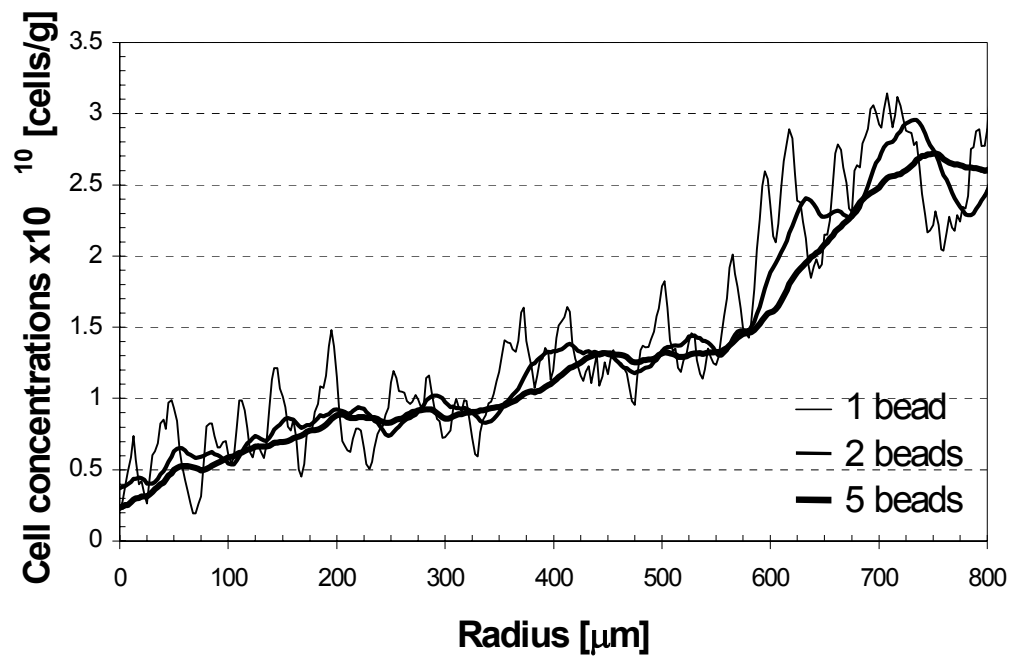
**Figure 3.1** : Detection of *L. diacetylactis* colonies in gel beads using specific polyclonal antibodies, confocal microscopy, and bead image analysis for determination of spatial biomass distribution. Lines indicate the principle of separation of annular regions used for the determination of the volumetric colony distribution as a function of the distance from the bead centre.



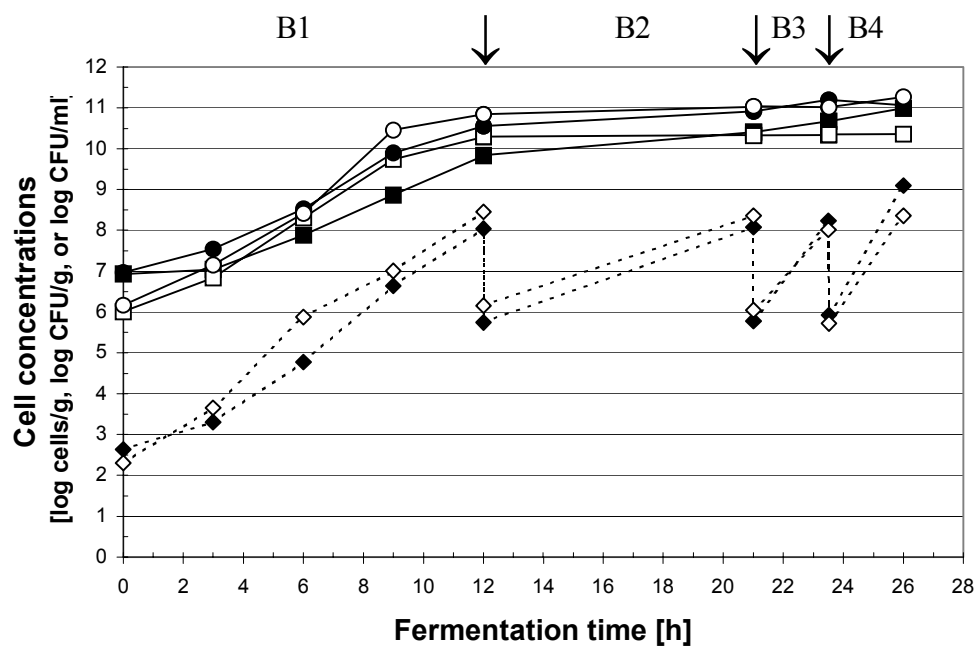
**Figure 3.2** : Total biomass concentration determined by ELISA (○, log cells/g) and viable-cell counts in beads (□, log CFU/g) and broth (◇, log CFU/ml) during repeated pH-controlled batch fermentations (B1 to B3) with immobilized *L. diacetylactis* (a) or *B. longum* (b). The arrows indicate medium changes after 14.5 and 25 h (a) or after 14.5 and 26 h (b).



**Figure 3.3** : Mean biomass concentration profiles (5 beads) during repeated pH-controlled batch fermentations (B1 to B3) with immobilized *L. diacetylactis* (a) or *B. longum* (b). The medium was changed after 14.5 and 25 h (a) or after 14.5 and 26 h (b).

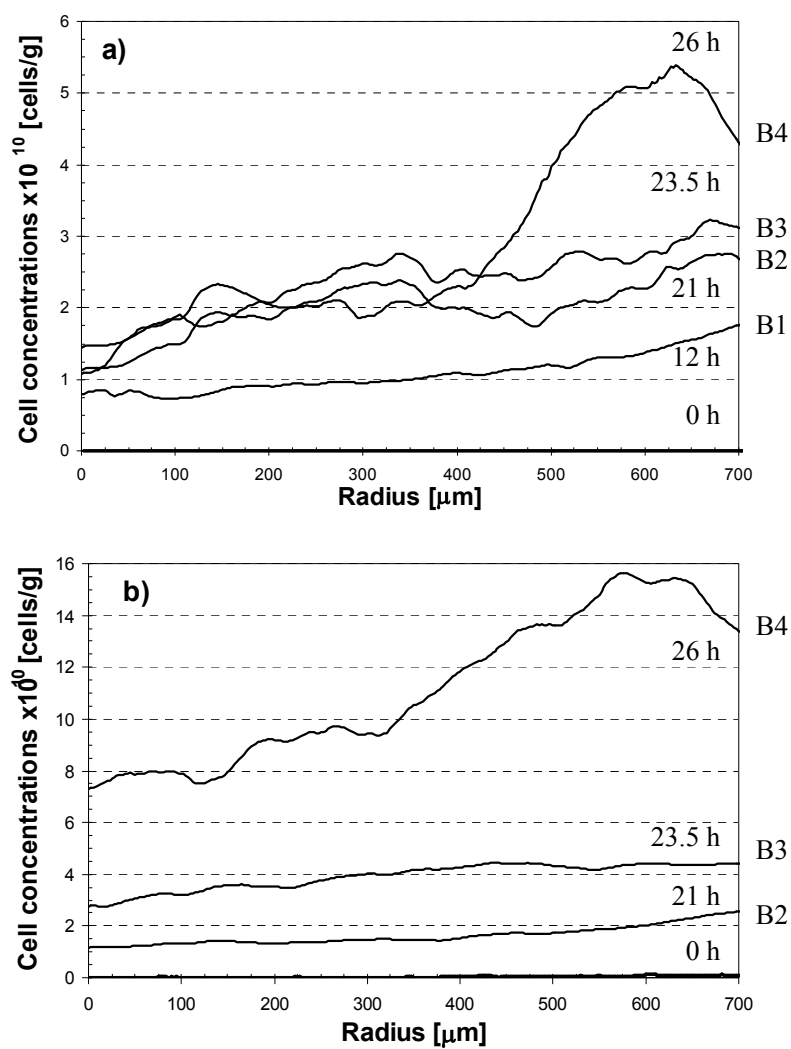


**Figure 3.4** : Effects of bead numbers on biomass concentration in *L. diacetylactis* beads.



**Figure 3.5** : Total biomass concentration determined by ELISA (●,○, log cells/g) and viable cell counts in beads (■,□, log CFU/g) and broth (◆,◇, log CFU/ml) during repeated pH-controlled (pH=6.2) batch fermentations (B1 to B4) with co-immobilized *B. longum* (dark symbols) and *L. diacetylactis* (open symbols) (ratio 9:1 in the inoculum). The arrows indicate medium changes after 12, 21 and 23.5 h.





**Figure 3.6 :** *L. diacetylactis* (a) and *B. longum* (b) concentration profiles in beads during repeated pH-controlled batch fermentations (B1 to B4) with co-immobilized strains. The medium was changed after 12, 21 and 23.5 h.

**CHAPITRE 4: Continuous production of mixed lactic  
starters containing probiotics using immobilized cell  
technology**

Y. Doleyres, I. Fliss et C. Lacroix

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

Soumis dans "Biotechnology Progress"

## 4.1 Résumé

La production d'une culture mixte composée de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD et de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 a été étudiée lors d'une fermentation continue de 17 jours avec cellules immobilisées conduite à différentes températures entre 32 et 37°C. Le système de fermentation à deux étages était composé d'un premier réacteur (R1) contenant des cellules des deux souches immobilisées séparément dans des billes de gel de  $\kappa$ -carraghénane et de gomme de caroube et d'un second réacteur (R2) opéré avec les cellules libres relarguées du premier réacteur. Le système a permis de produire une culture mixte concentrée avec un rapport de souches dont la composition dépendait de la température et du temps de fermentation. Une culture mixte stable (avec un ratio cellulaire de 22:1 *L. diacetylactis* / *B. longum*) a été produite à 35°C dans l'effluent de R2, alors que la culture mixte était rapidement débalancée en faveur de *B. longum* à plus haute température (37°C) ou de *L. diacetylactis* à plus basse température (32°C). Une redistribution des souches dans les billes immobilisant à l'origine une culture pure de *L. diacetylactis* ou de *B. longum* a également été observée. À la fin de la fermentation, le ratio cellulaire (7:1 *L. diacetylactis* / *B. longum*) dans des échantillons de plusieurs billes (environ 0.5 g) était similaire à celui de billes individuelles. La détermination de la distribution spatiale des deux souches dans les billes de gel par immunofluorescence couplée à la microscopie confocale a montré que la contamination croisée était limitée à une couche périphérique des billes de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les données de cette étude valident un précédent modèle de dynamique des populations et de relarguage cellulaire dans des billes de gel lors de fermentations avec cellules immobilisées.

## 4.2 Abstract

The production of a mixed lactic culture containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 was studied during a 17-day continuous immobilized-cell culture at different temperatures between 32 and 37°C. The two-stage fermentation system was composed of a first reactor (R1) containing cells of the two strains separately immobilized in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads and a second reactor (R2) operated with free cells released from the first reactor. The system allowed continuous production of a concentrated mixed culture with a strain ratio whose composition depended on temperature and fermentation time. A stable mixed culture (with a 22:1 ratio of *L. diacetylactis* and *B. longum*) was produced at 35°C in the effluent of R2, whereas the mixed culture was rapidly unbalanced in favour of *B. longum* at a higher temperature (37°C) or *L. diacetylactis* at a lower temperature (32°C). Strain redistribution in beads originally immobilizing pure cultures of *L. diacetylactis* or *B. longum* was observed. At the end of culture, the strain ratio (7:1 *L. diacetylactis*/*B. longum*) in bulk bead samples was similar to that of individual beads. The determination of the spatial distribution of the two strains in gel beads by immunofluorescence and confocal laser-scanning microscopy showed that bead cross-contamination was limited to a 100  $\mu\text{m}$  peripheral layer. Data from this study validate a previous model for population dynamics and cell release in gel beads during mixed immobilized-cell cultures.

### 4.3 Introduction

Continuous fermentations with lactic acid bacteria immobilized in polysaccharide gel beads have major advantages over free-cell cultures for the production of biomass, including high productivity and stability, stable strain ratios in mixed cultures, prevention from washing-out, reduction of susceptibility to contamination and bacteriophage attack, enhancement of plasmid stability, and protection of the cells from shear forces in the stirred reactor (Champagne et al., 1994; Lamboley et al., 1997; 1999; 2001; Macedo et al., 1999).

Applications of the immobilized cell technology for the continuous inoculation prefermentation of milk in the production of fresh cheese (Sodini-Gallot et al., 1995; Sodini et al., 1997) or yogurt (Prévost et al., 1985), and for the production of mesophilic lactic starters (Lamboley et al., 1997; 1999; 2001) or probiotic bacteria (Doleyres et al., 2002a,b ; chapters 2, 3) lead to high process productivity and stability, due to the high immobilized cell concentration and cell release activity from beads to bulk medium. However, a complex redistribution of strains among gel beads initially immobilizing a pure culture was observed (Lamboley et al., 1997; 1999; 2001; Sodini et al., 1997). A theoretical model for cell release from cavities at the bead periphery has been recently proposed to explain this cross-contamination phenomenon (Lacroix et al., 1996).

To validate this hypothesis and identify factors of cross-contamination, an immunofluorescent method involving double-color labelling and confocal microscopy has been developed to specifically detect cells of one strain of lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) and one probiotic (*Bifidobacterium longum*) co-immobilized in gel beads (Prioult et al., 2000). Recently, a quantitative analysis for the localization and quantification of microcolonies in beads was developed with the same method (Doleyres et al., 2002a; chapter 3). Repeated-batch cultures with immobilized cells also allowed the production of a mixed culture containing lactic acid bacteria and a non-competitive strain of bifidobacteria.

The objective of the present work was to demonstrate and quantify the cross-contamination in polysaccharide gel beads during continuous production of a model probiotic lactic starter composed of two strains, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD, immobilized separately in gel beads, using a recently developed quantitative immunofluorescence method (Doleyres et al., 2002a; chapter 3). Moreover, the effect of temperature on the production of a balanced mixed culture of lactic acid bacteria and non-competitive cells of bifidobacteria in the fermentation broth was also studied during a 17-day continuous immobilized-cell fermentation.

## 4.4 Materials and methods

### 4.4.1 STRAINS AND MEDIUM

*B. longum* ATCC 15707 was provided by the American Type Collection Culture (Rockville, MD, USA) and *L. diacetylactis* MD was obtained from Rhône Poulenc (Brampton, ON, Canada). For immobilization, pure cultures of the two strains from frozen stock (-80°C) were grown twice in MRS (de Man et al., 1960) broth (Rosell Institute Inc., Montreal, QC, Canada) supplemented with 0.5 g/l cysteine, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>, for 18 h at 30°C for *L. diacetylactis* or 37°C for *B. longum*, with a 2% (v/v) inoculum. The fermentation medium used during batch and continuous cultures was MRS broth without glucose, supplemented with 50 g/l lactose, 0.5 g/l cysteine, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>, and KCl 0.15 M to ensure bead mechanical stability.

### 4.4.2 CELL IMMOBILIZATION

*B. longum* and *L. diacetylactis* cultures were immobilized separately in κ-carrageenan/locust bean gum gel beads with a 2 % (v/v) inoculum, as previously described (Lamboley et al., 1997). Beads with diameters in the range of 1-2 mm were selected by wet sieving and used for subsequent fermentation experiments.

### 4.4.3 FERMENTATIONS

Batch fermentations were first carried out for bead colonization for 16 h in a stirred tank bioreactor (Bioflo model C30, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) containing 400 ml supplemented MRS medium and 100 ml of *B. longum* or *L. diacetylactis* beads. The bioreactor was controlled at 37°C and purged with CO<sub>2</sub> to ensure anaerobic conditions, with mixing set at 120 rpm. The pH was controlled at 6.0 by addition of 6 N NH<sub>4</sub>OH.

Colonized beads were then stored overnight in citrate buffer (0.1 M, pH=5.4) containing KCl 0.3 M before starting the continuous immobilized-cell culture.

A two-stage fermentation system was used for the continuous fermentation. The first reactor (R1) was a flat-bottomed custom-built glass bioreactor (R1) containing 20 ml of each of the two types of colonized gel beads, for a total culture volume of 120 ml. The second reactor of 600 ml (R2, Bioflo model C30, New Brunswick Scientific Co.) was operated in series and inoculated with free cells released from beads in R1. The reactors were adapted for continuous culture with immobilized cells, as described previously (Norton et al., 1994), and CO<sub>2</sub> was injected in the headspace of the two reactors to maintain anaerobic conditions during cultures. Flow rate of supplemented MRS medium was set at 240 ml/h during the 17-day culture and pH was controlled at 6.0 by addition of 6 N NH<sub>4</sub>OH. Temperature in both reactors was first set at 37°C, then decreased to 32°C at day 6, and finally increased to 35°C at day 13 until the end of the experiment. Broth samples were taken daily from the two reactors for cell enumeration and HPLC analysis, whereas bead samples were taken every 3 days for cell enumeration and confocal laser-scanning microscopy analysis.

#### 4.4.4 VIABLE CELL ENUMERATION

Viable cell counts of *L. diacetylactis* and *B. longum* were determined using the pour plate method, as previously described (Doleyres et al., 2002a; chapter 3). For bead population analysis, approximately 0.5 g of accurately weighed beads in 4.5 ml peptonized water were treated with an Ultra-Turax (Janke and Kunkel, Staufen, Germany) on ice for 45 s at 13500 rpm to break up the beads and resuspend the cells. Individual beads were also dissolved in 5 ml peptonized water with the Ultra-Turax for cross-contamination analysis. Reported data are means for duplicate analyses of bead and broth samples, and for six individual beads.



#### 4.4.5 HPLC ANALYSIS

Concentrations of sugars (lactose, glucose and galactose) and organic acids (lactic and acetic acids) were determined in broth samples by HPLC analysis (Waters, Millipore Co, Montreal, QC, Canada) with a Phenomenex ion column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and 0.0064 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as eluent at a flow of 0.4 ml/min, as previously described (Lamboley et al., 1997).

#### 4.4.6 CONFOCAL MICROSCOPY OBSERVATIONS AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SPATIAL BIOMASS DISTRIBUTION IN BEADS

Bead preparation and confocal microscopy observation using specific fluorescent polyclonal antibodies for the two strains, and quantitative determination of the spatial distribution of cells from the two strains in beads were performed as previously described (Prioult et al., 2002; Doleyres et al., 2002a; chapter 3). Briefly, the biomass volumetric fraction (percentage of space occupation) for each strain as a function of the gel bead radius was derived from the position and surface area of the colonies in the labelled sections. For this determination, bead sections were divided into 2.5 µm thickness annular regions and the number and fraction (%) of fluorescent pixels containing biomass were determined in each region as a function of radius. Each pixel could contain cells from none, one, or the two strains. The sum of biomass occupation for the two strains could therefore be 100% or more in certain parts of the beads. Five beads were used to determine biomass profiles in beads originally immobilizing *B. longum* or *L. diacetylactis* after 15 days continuous culture.

Half beads were also stained with fluorescent dyes SYTO9 and propidium iodide for observation of total and dead biomass, respectively (LIVE/DEAD BacLight Bacterial

Viability Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Confocal micrographs were made at an excitation wavelength of 488 nm with a FITC emission filter for SYTO9 and at an excitation wavelength of 543 nm for propidium iodide.

## 4.5 Results

### 4.5.1 IMMOBILIZED AND FREE-CELL COUNTS

*B. longum* and *L. diacetylactis* counts in beads and effluents of R1 and R2 varied with fermentation time and temperature (Figure 4.1). *B. longum* counts in beads increased during the first 5 days at 37°C to reach  $1.5 \pm 0.1 \times 10^{10}$  CFU/g at day 5, but decreased to  $5.5 \pm 1.3 \times 10^9$  CFU/g at day 11, after the temperature was changed to 32°C at day 6. A stable *B. longum* concentration was further observed in beads when temperature was set at 35°C, averaging  $9.6 \pm 1.6 \times 10^9$  CFU/g from day 14 to day 17. The same tendency was observed for *B. longum* cell counts in the effluents of R1 and R2. Due to high bead colonization and favourable temperature (37°C) for *B. longum* growth, cell counts in the effluents of R1 and R2 increased from day 2 to day 6 from  $4.3 \pm 0.1 \times 10^8$  to  $1.1 \pm 0.2 \times 10^9$  CFU/ml and from  $3.4 \pm 0.1 \times 10^8$  to  $6.9 \pm 0.1 \times 10^8$  CFU/ml, respectively. Then bifidobacteria cell counts decreased when the temperature was changed to 32°C, to  $1.9 \pm 0.1$  and  $1.8 \pm 0.1 \times 10^8$  CFU/ml in R1 and R2 at day 13, respectively, and remained stable from day 14 to day 17 at 35°C, averaging  $3.7 \pm 1.1$  and  $3.4 \pm 0.9 \times 10^8$  CFU/ml in R1 and R2, respectively.

*L. diacetylactis* counts in beads varied in an opposite direction compared to *B. longum* counts with temperature. A significant decrease was observed with fermentation time at 37°C to a low concentration in beads of  $2.8 \pm 0.4 \times 10^9$  CFU/g at day 5, followed by a large increase when temperature was set at 32°C, to reach a very high concentration of  $6.4 \pm 0.6 \times 10^{10}$  CFU/g at day 11. Then, *L. diacetylactis* counts in beads decreased slightly at 35°C to  $3.7 \pm 0.4 \times 10^{10}$  CFU/g at day 17. Even though *L. diacetylactis* cell counts in the effluents of R1 and to a lesser extent in R2 increased during the first 5 days at 37°C,

concentrations remained low at  $5.4 \pm 1.2 \times 10^7$  and  $1.7 \pm 0.1 \times 10^8$  CFU/ml in R1 and R2 at day 6, respectively. However, as observed in beads, cell counts in the fermented broth from R1 and R2 greatly increased when temperature was decreased to 32°C to reach very high values of  $2.3 \pm 0.3$  and  $6.0 \pm 0.3 \times 10^9$  CFU/ml at day 13, respectively. The temperature change to 35°C at day 13 induced an approximately twofold decrease of *L. diacetylactis* counts in R1 that reached  $1.2 \pm 0.2 \times 10^9$  CFU/ml at day 17, whereas counts in R2 remained stable from day 14 until the end of the study, averaging  $7.0 \pm 1.1 \times 10^9$  CFU/ml.

#### 4.5.2 SUGAR AND ORGANIC ACID CONCENTRATIONS

Lactic and acetic acid concentrations in the effluents of R1 and R2 during the 17-day continuous culture are reported in Figure 4.2. Organic acid concentrations were constant in R1 and R2 from day 2 to day 6 at 37°C averaging  $7.0 \pm 0.5$  and  $9.0 \pm 0.4$  g/l for acetic acid, and  $5.2 \pm 0.9$  and  $8.5 \pm 0.7$  g/l for lactic acid, respectively. After a temperature decrease to 32°C, the acetic acid concentration decreased to  $4.1 \pm 0.5$  and  $4.6 \pm 0.7$  g/l in R1 and R2 at day 13, respectively, whereas lactic acid concentrations increased after a 2-day delay to  $9.2 \pm 1.7$  and  $24.5 \pm 2.4$  g/l in R1 and R2 at day 13, respectively. No change in lactic and acetic acid concentrations in the effluents of the two bioreactors was further observed during the following days (day 14 to day 17) carried out at 35°C compared with that at 32°C.

Figure 4.3 shows sugar concentrations in the effluents of R1 and R2 during the continuous culture. Lactose concentration decreased during the first 5 days at 37°C in both R1 and R2 to 16.0 and 1.0 g/l at day 6, respectively. Lactose concentration increased during the first 2 days at 32°C to 29.7 and 23.2 g/l at day 8 in R1 and R2, but then decreased with time at the same temperature in R1 to 23.1 g/l at day 13, and to a greater extent in R2 to a low value of 8.0 g/l. Lactose concentration remained constant during the following 4 days at 35°C in R1 ( $23.5 \pm 0.6$  g/l) and R2 ( $4.1 \pm 0.4$  g/l). Glucose and galactose concentrations increased during the first 4 days at 37°C to 7.6 and 7.1 g/l and 12.6 and 12.9 g/l for R1 and R2 at day 6,

respectively. After decreasing the temperature to 32°C, glucose and galactose concentrations in R1 and R2 dropped rapidly to low values of 2.3 and 3.8 g/l for glucose and 3.2 and 5.5 g/l for galactose at day 7, respectively, and then remained constant until the end of the 17-day culture at 32°C or 35°C.

#### 4.5.3 BIOMASS GRADIENTS AND CROSS-CONTAMINATION IN GEL BEADS

*B. longum* and *L. diacetylactis* viable cell counts were determined in individual beads to observe cross-contamination occurring in beads originally immobilizing a pure culture of one of the two strains, as a function of fermentation time (Table 4.1). At day 2, beads immobilizing the two different strains were distinct with no (*L. diacetylactis* beads) or a low (*B. longum* beads) cross-contamination by the other strain. *B. longum* concentration in *L. diacetylactis* beads increased rapidly to approximately 1/7 of total cell concentration in these beads at day 8, but did not change thereafter. In contrast, *L. diacetylactis* contamination was slower in beads originally immobilizing *B. longum* but was more intense after 11 days, with a high *L. diacetylactis* / *B. longum* ratio of  $7\pm 3$ , which did not change for longer fermentation times. Consequently, beads originally immobilizing a pure culture of *B. longum* or *L. diacetylactis* could not be distinguished from day 11 to the end of the experiment, as the strain ratios determined by viable cell enumeration became identical for the two types of gel beads.

Using specific fluorescent polyclonal antibodies for the two strains and confocal laser-scanning microscopy, contamination by the other strain was detected after 14 days at the periphery of both types of beads (Figure 4.4). The peripheral layer of approximately 100  $\mu\text{m}$  contained a mixed culture of *B. longum* and *L. diacetylactis* cells occupying a very high fraction of *B. longum* bead volume (60-65% and 90-95% for each strain, respectively) (Figure 4.5a). After 14 days, colonization of *B. longum* beads was constant in the core of

the beads, with an occupation of approximately 30% (Figure 4.5a). There was also approximately a 150- $\mu\text{m}$  thick intermediate layer, between the external mixed-strain layer and the core of the beads, where the fraction of bead volume occupied by biomass was very low, equal to approximately 10%. Biomass profiles in *L. diacetylactis* beads exhibited the same tendencies after 14 days continuous culture (Figure 4.5b), with a 100- $\mu\text{m}$  peripheral layer containing a mixed culture of the two strains, with a volume occupation of 60% *L. diacetylactis* and 45% *B. longum*. As observed for *B. longum* beads, there was approximately a 150- $\mu\text{m}$  thick layer between the external layer and the core of the beads where the fraction of bead volume occupied by biomass was very low at 10%. Moving deeper in the beads toward the centre, the occupation ratio increased to 30% but then progressively decreased to approximately 10% at the bead centre (Figure 4.5b). Using a two-color fluorescence assay of bacterial viability (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit), the intermediate layer containing low biomass concentration in beads, detected with polyclonal antibodies, appeared to contain a large concentration of dead biomass, unlike the periphery and the core of the beads which contained live biomass (Figure 4.6).

## 4.6 Discussion

This study is the first to report the continuous production of a mixed culture containing lactic acid bacteria and bifidobacteria immobilized in gel beads. The fermentation process, with two reactors in series continuously fed with MRS medium, allowed continuous production of a concentrated mixed culture of the two strains. Temperature appeared to be a crucial parameter for the strain ratio in the mixed culture (Figure 4.1). A high temperature close to 37°C favoured the growth of *B. longum* (maximal concentration of  $8.3 \pm 0.1 \times 10^8$  CFU/ml in the effluent of R2 at day 5), whereas a low temperature of 32°C promoted *L. diacetylactis* growth (maximal concentration of  $7.5 \pm 0.1 \times 10^9$  CFU/ml in R2 at day 12). However, a stable ratio of strain concentrations was obtained in the effluent of R2 at 35°C for 4 days and until the end of the experiment, with a high concentration of both strains in the effluent ( $3.4 \pm 0.9 \times 10^8$  and  $7.0 \pm 1.1 \times 10^9$  CFU/ml for *B. longum* and *L. diacetylactis*, respectively). During a previous study on repeated pH-controlled batch fermentations carried out at 37°C with co-immobilized cells of *B. longum* and *L. diacetylactis*, a mixed free-cell culture containing  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml *L. diacetylactis* and  $1.3 \times 10^9$  CFU/ml *B. longum* was produced in the broth at the end of the fourth batch culture (Doleyres et al., 2002a; chapter 3). These results are close to cell counts determined in the effluent of R1 when temperature was initially set at 37°C (day 2 to day 6). High biological stability and cell volumetric productivities were also obtained during long-term continuous fermentations (exceeding 50 days) of a supplemented whey permeate medium using immobilized cells to produce mixed-strain mesophilic lactic starters, and no strain became dominant nor was eliminated from the reactor (Lamboley et al., 1997; 1999; 2001). Data in our study show that immobilized cell technology and a culture parameter such as temperature can be used to control the strain ratio of a mixed culture of lactic acid bacteria and less competitive strains like bifidobacteria, and that biological stability can be obtained for at least 4 days at 35°C. Lamboley et al. (1997) also showed that fermentation parameters (temperature, dilution rate and pH) can be used to efficiently control ratios of

three lactococci in the effluent of a continuous immobilized-cell bioreactor. However, changing the bead ratios in the inoculum of the immobilized-cell bioreactor had only a limited effect on the composition of the culture produced in the effluent (Lamboley et al., 2001).

During the entire 17-day continuous fermentation, *L. diacetylactis* viable cell counts were higher (up to fivefold) in the effluent of R2 than in that of R1 (except for day 4), whereas *B. longum* viable free-cell counts were always lower in R2 than in R1. The low competitiveness of *B. longum* free cells in R2 can be mainly explained by the high lactic acid concentration in R2 (maximum of 25.5 g/l at day 14 compared with 9.8 g/l in R1), which inhibited *B. longum* growth in R2. Acetic acid concentration measured in R1 and R2 were very similar, particularly at 32 and 35°C (Figure 4.2). However, the synergic inhibitory effect of lactic and acetic acids on this strain (Desjardins et al., 1990) could also explain the absence of growth of *B. longum* in R2. Consequently, lactic acid production in R2 was almost totally due to *L. diacetylactis* activity.

Lactose hydrolysis was high in R1 when fermentation was carried out at 37°C (residual lactose concentration of 16.0 g/l in R1 at day 6), indicating a high enzymatic activity of bifidobacteria which resulted in significant glucose and galactose accumulations in the fermentation medium. However, lactose concentration remained higher at 32-35°C at 22-30 g/l than at 37°C, and glucose and galactose concentrations did not exceed 5 g/l, indicating a high utilization of monosaccharides by *L. diacetylactis*. This preference for *B. longum* to metabolize lactose before glucose was previously demonstrated during free-cell batch fermentations of a medium containing the two sugars (Doleyres et al., 2002b; chapter 2).

The use of a second reactor R2 in series with the first immobilized cell reactor R1, with a higher volume to increase biomass concentration in the effluent, may not be a good strategy for promoting the growth of bifidobacteria in mixed cultures containing other competitive strains of lactic acid bacteria, like *L. diacetylactis*. However, the inhibitory conditions in R2

could also increase cell tolerance to various stresses, such as freeze-drying or oxygen, that cells generally encounter following their production (Reilly and Gilliland, 1999).

The development of a mixed culture of the two strains in beads originally immobilizing a pure culture as a function of fermentation time was observed and quantified with selective enumeration methods and the use of immunofluorescence and confocal laser-scanning microscopy. Strain redistribution led to identical strain ratios ( $7 \pm 3/1$  *L. diacetylactis*/*B. longum*) after 11 days in beads originally immobilizing *L. diacetylactis* or *B. longum* (Table 4.1). This phenomenon of strain redistribution among gel beads initially immobilizing a pure culture has been previously observed during long-term continuous cultures of mesophilic lactic acid bacteria by plating individual beads on Petri dishes (Lamboley et al., 1997; 1999; 2001, Sodini et al., 1997). To explain this massive cross-contamination of gel beads, a theoretical model for contamination was proposed (Lacroix et al., 1996). In this model, cell release from the gel cavities results from high pressure due to cell expansion, collisions and shearing forces in the bioreactor. Afterwards, the walls of the emptied cavities made of viscoelastic polysaccharide gel material could close again, entrapping a sample of the surrounding bulk medium. Recolonization of the cavities occurs as a result of the activity of both the original bead culture and the contaminating flora.

With the use of confocal microscopy and the determination of the spatial distribution of the two strains in gel beads by immunofluorescence, our study validated this model. Indeed, contamination by free cells from the surrounding medium was limited to a peripheral layer of approximately 100  $\mu\text{m}$  thickness due to diffusion limitations of cells in the gel. *B. longum* bead contamination by *L. diacetylactis* cells after 11 days was higher than *L. diacetylactis* bead contamination by *B. longum* cells, as a result of the medium containing more lactococci than bifidobacteria cells. However, contamination by the other strain was detected earlier in *L. diacetylactis* beads than in *B. longum* beads due to the fact that the optimal temperature for *B. longum* growth (37°C) was applied during the first days of fermentation (day 1 to day 6). In addition, the production of acetic acid by immobilized *B.*



*longum* might have created local inhibitory conditions for *L. diacetylactis* growth in *B. longum* beads, which delayed its implantation and detection. The subsequent modification of temperature set point to lower values of 32 and 35°C increased competitiveness of *L. diacetylactis* and produced a strain ratio greatly in favour of *L. diacetylactis* in both types of gel beads. The fact that this ratio was identical in both types of beads demonstrates that most if not all viable cells in beads were located in the peripheral layer and that the core of the beads contained mainly dead cells after 11 days continuous culture. However, confocal laser scanning microscopy and specific cell marking with fluorescent polyclonal antibodies did not permit to distinguish live and dead cells (Figure 4.4).

A biomass gradient was observed after 14 days continuous culture in the core (0-700 µm) of *L. diacetylactis* beads contrary to beads originally immobilizing *B. longum* that showed a flat profile (Figure 4.5). This was previously observed and explained by the fact that immobilized cells of *B. longum* are more resistant to lactic and acetic acid local concentrations in beads (Doleyres et al., 2002a; chapter 3). In this study, a cell concentration decrease was observed at the extreme periphery of the beads, which can be explained by the high cell-release activity from the beads to the medium. Our study showed that contamination of beads occurred in the high-cell density peripheral layer. A low biomass concentration layer was also observed for both types of beads, between the highly colonized peripheral layer and the core of the beads with intermediate colonization (Figure 4.5). A high concentration of dead cells was observed in this part of the beads using the LIVE/DEAD bacterial viability kit (Figure 4.6). Consequently, the polyclonal antibodies apparently marked only live biomass, due to modifications in cell wall structure following cell death. This cell mortality could be tentatively explained by initial cell growth during bead colonization with favourable conditions, followed by strong inhibition due to the high cell activity in the bead periphery and to the production of steep organic acid concentrations and pH gradients within the beads (Arnaud et al., 1991; 1992; Masson et al., 1994). In comparison, cells in the core of the beads grew with more inhibiting conditions and adapted

progressively to these stress conditions in the course of bead colonization, and remained active during the 17 days of culture.

## **4.7 Conclusion**

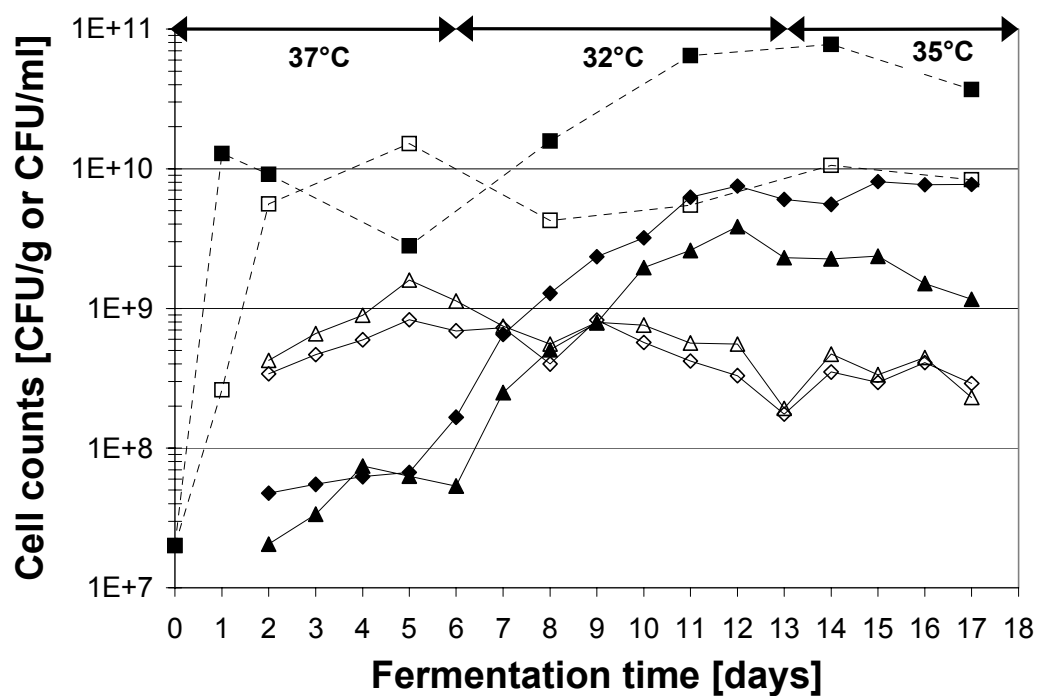
This work has demonstrated that cell immobilization in polysaccharide gel beads can be used to continuously and stably produce a mixed lactic culture containing a non-competitive strain of bifidobacteria. The use of confocal laser-scanning microscopy and fluorescent polyclonal antibodies also allowed the demonstration of the microbial dynamics of immobilized cells during mixed-strain fermentations and the cross-contamination by the other strains of mixed cultures that occurs in gel beads initially immobilizing a pure culture. Chapter 5 will assess the changes in physiological characteristics and compare tolerance to different stresses of cells produced during continuous immobilized-cell fermentations with that of cells produced during conventional free-cell batch fermentations.

**Table 4.1** : Change of the strain ratio in individual beads originally immobilizing a pure culture of *B. longum* or *L. diacetylactis* during continuous pH-controlled fermentation with immobilized cells at different temperatures <sup>1</sup>.

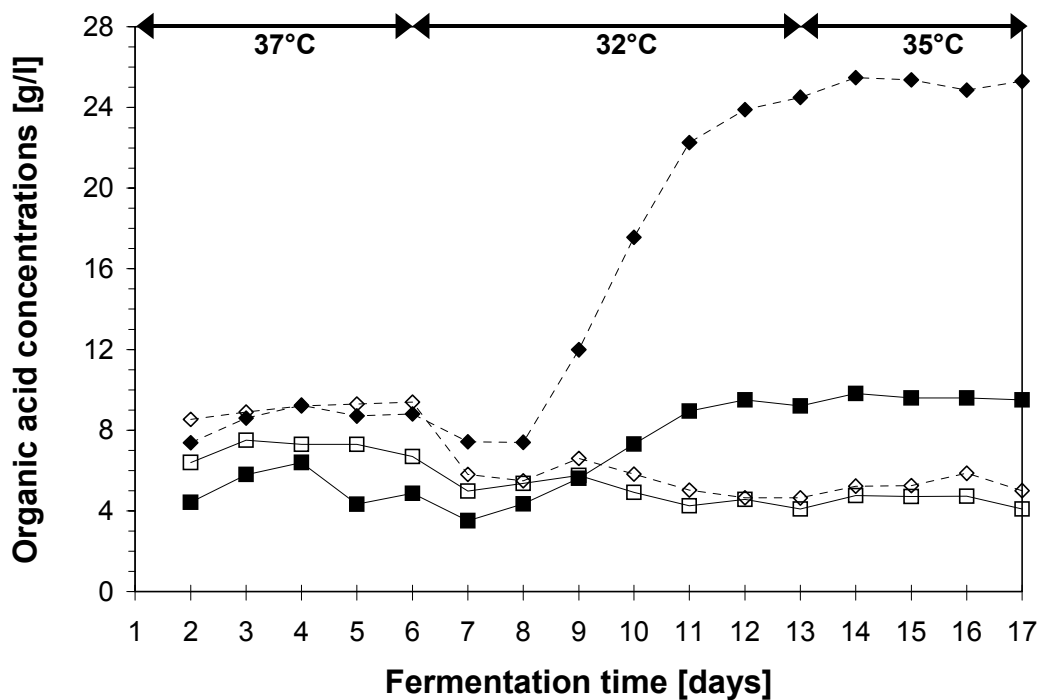
|  | <b>Ratio <i>L. diacetylactis</i> / <i>B. longum</i></b> |                   |                 |                     |                     |                     |
|--|---|-------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|  | Day 2   | Day 5             | Day 8           | Day 11 <sup>2</sup> | Day 14 <sup>2</sup> | Day 17 <sup>2</sup> |
| <b><i>B. longum</i><br/>beads</b>        | 0.0020<br>±0.0012                                       | 0.0045<br>±0.0014 | 0.156<br>±0.128 |                     |                     |                     |
|  |   |                   |                 | 7±3                 | 15±5                | 8±4                 |
| <b><i>L. diacetylactis</i><br/>beads</b> | infinite  | 10±2              | 7±3             |                     |                     |                     |

<sup>1</sup> Continuous culture was carried out at 37°C until day 6, 32°C between day 6 and 13, and 37°C afterward.

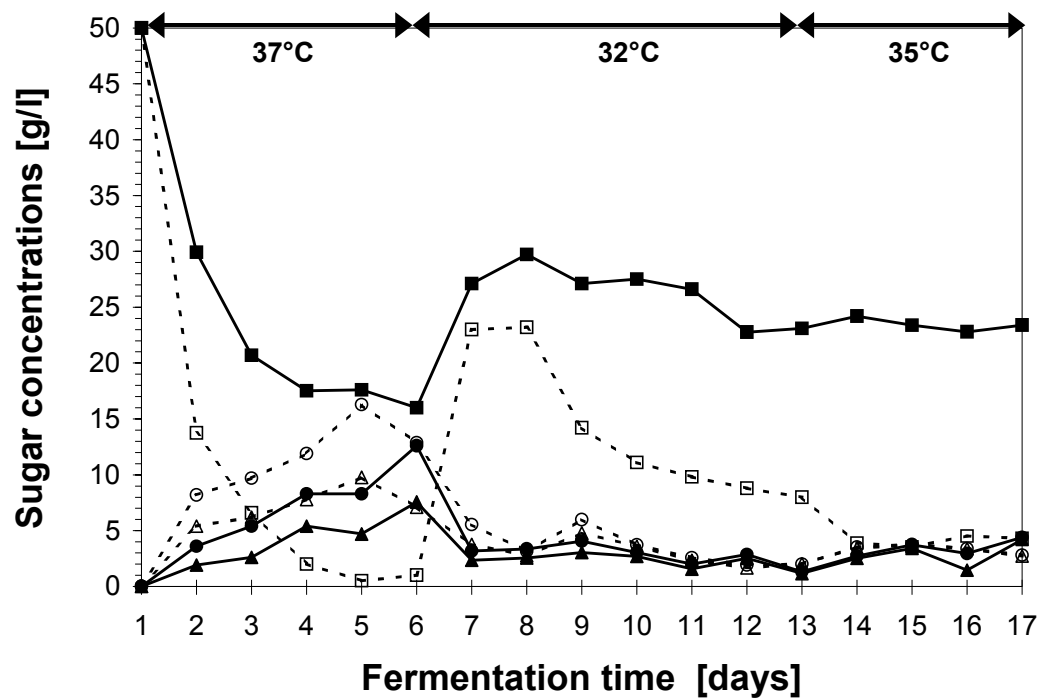
<sup>2</sup> After 11 days culture, beads for the two strains could not be distinguished.



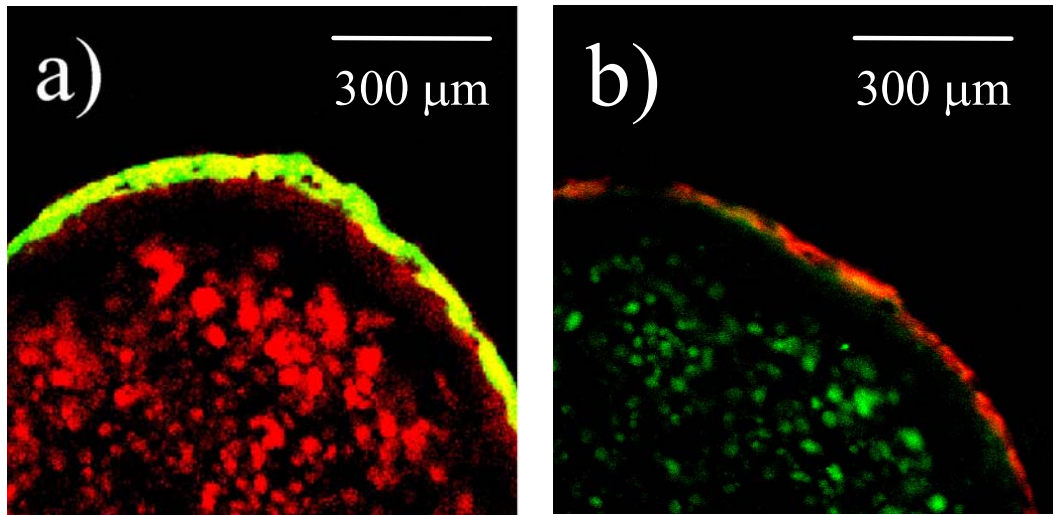
**Figure 4.1** : Viable-cell counts in beads ( $\square, \blacksquare$ ; CFU/g) and effluents of R1 ( $\Delta, \blacktriangle$ ; CFU/ml) and R2 ( $\diamond, \blacklozenge$ ; CFU/ml) during the continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* (dark symbols) and *B. longum* (open symbols).



**Figure 4.2** : Lactic (dark symbols) and acetic (open symbols) acid concentrations in effluents of R1 ( $\square, \blacksquare$ ) and R2 ( $\diamond, \blacklozenge$ ) determined by HPLC analysis during the continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* and *B. longum*.

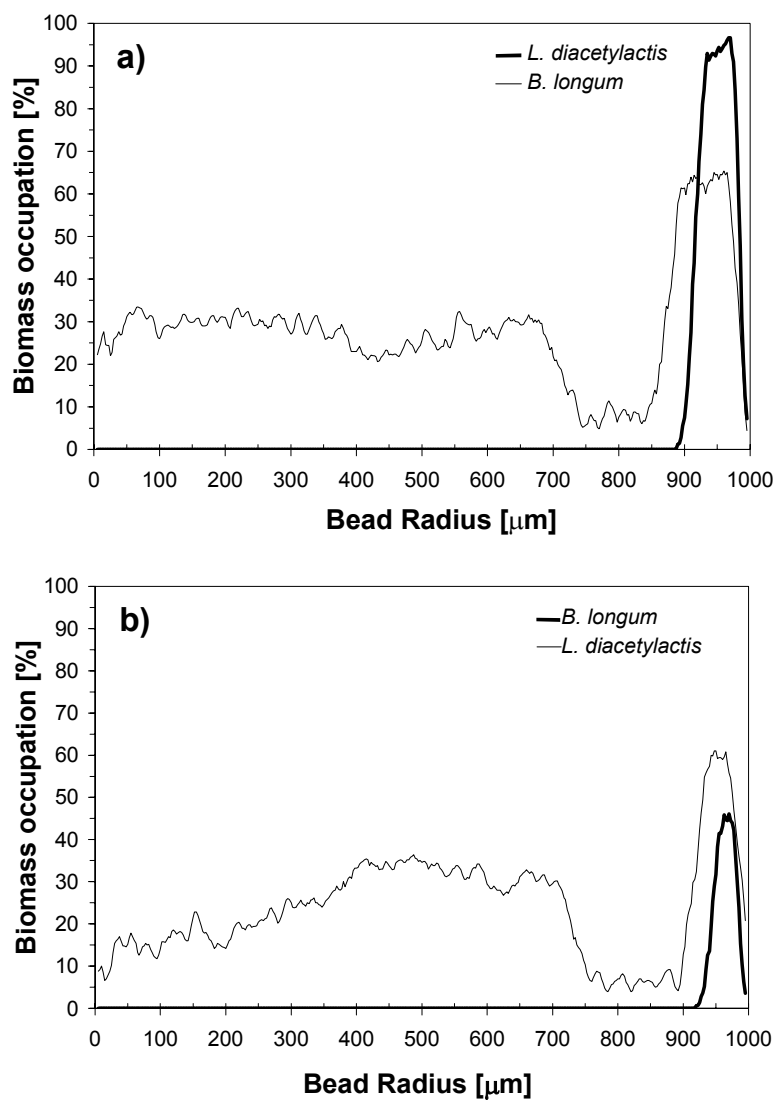


**Figure 4.3** : Lactose ( $\square, \blacksquare$ ), glucose ( $\Delta, \blacktriangle$ ), and galactose ( $\circ, \bullet$ ) concentrations in effluents of R1 (dark symbols) and R2 (open symbols) determined by HPLC analysis during the continuous pH-controlled fermentation with immobilized cells of *L. diacetylactis* and *B. longum*.

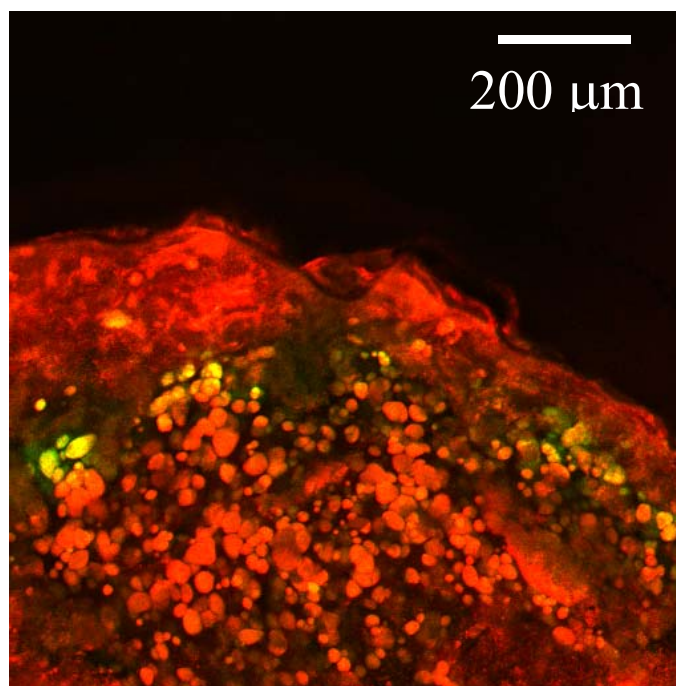


**Figure 4.4** : Confocal microscopy observation of half-beads originally immobilizing a pure culture of *B. longum* (a) or *L. diacetylactis* (b) after 14-day continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* and *B. longum*. *L. diacetylactis* (green) and *B. longum* (red) cells were detected by specific fluorescent polyclonal antibodies (Doleyres et al., 2002a; chapter 3).





**Figure 4.5** : Specific biomass occupation profiles of *L. diacetylactis* and *B. longum* in beads originally immobilizing a pure culture of *B. longum* (a) or *L. diacetylactis* (b) after 14 days continuous pH-controlled immobilized-cell fermentation.



**Figure 4.6** : Confocal microscopy observation of half-bead after 14-day continuous pH-controlled fermentation with immobilized *L. diacetylactis* and *B. longum*. Viable (488 nm, red) and dead (543 nm, green) cells of *B. longum* and *L. diacetylactis* were detected by a two-color fluorescence assay of bacterial viability (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit).

**CHAPITRE 5: Changes of lactic and probiotic culture characteristics during continuous immobilized-cell fermentation with mixed strains**

Y. Doleyres, I. Fliss et C. Lacroix

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

## 5.1 Résumé

Les effets de l'immobilisation cellulaire et de la fermentation continue sur une période de 17 jours sur les caractéristiques probiotiques et technologiques de bactéries lactiques produites dans l'effluent ont été étudiés. Le procédé de fermentation comprenait deux réacteurs en série, le premier réacteur (R1) contenant des cellules de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 et de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD immobilisées séparément dans des billes de gel de polysaccharides, et le second réacteur (R2) opéré avec les cellules libres relarguées du premier réacteur. La fermentation fut conduite pendant 17 jours à différentes températures entre 32 et 37°C. La tolérance des cellules libres produites dans l'effluent des deux réacteurs à des stress variés, tels la lyophilisation, l'addition de peroxyde d'hydrogène, les conditions gastro-intestinales simulées, la présence de nisine et d'antibiotiques a augmenté avec le temps de fermentation et fut en général plus élevée après 6 jours de fermentation que celle de cellules produites de manière conventionnelle par fermentation en 'batch' avec des cellules libres. Des changements dans la paroi et la membrane cellulaire pourraient être responsable de cette adaptation non spécifique des cellules, puisque ce phénomène d'augmentation de tolérance cellulaire fut observé pour tous les stress et toutes les souches testées. La réversibilité de la tolérance de *B. longum* acquise aux antibiotiques, mais pas de *L. diacetylactis*, a été montrée lors de fermentations en 'batch' successives, dont la première avait été inoculée avec des cellules prélevées dans l'effluent de la fermentation continue avec cellules immobilisées. Notre étude a montré que la fermentation en continu avec cellules immobilisées pourrait être utilisée pour élaborer des produits industriels contenant des probiotiques et des bactéries lactiques avec des caractéristiques améliorées, potentiellement utiles pour la santé humaine.

## 5.2 Abstract

The effect of immobilization and long-term continuous-flow culture was studied on probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria produced in the effluent medium. The fermentation process consisted of two reactors in series, with a first reactor (R1) containing cells of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD separately immobilized in polysaccharide gel beads, and a second reactor (R2) operated with free cells released from the first reactor. The culture was carried out for 17 days at different temperatures ranging from 32 to 37°C. The tolerance of free cells produced in the effluent medium of both reactors to various stresses, including freeze-drying, hydrogen peroxide, simulated gastro-intestinal conditions, nisin, and antibiotics, markedly increased with culture time and was generally higher after 6 days than that of cells produced during conventional free-cell batch (FC) fermentations. Changes in cell wall and cell membrane could be partly responsible for this non-specific environmental adaptation of cells, as this phenomenon of increased cell tolerance was observed for all stresses and both strains tested. The reversibility of the acquired tolerance of *B. longum*, but not *L. diacetylactis*, to antibiotics was shown during successive FC batch cultures initially inoculated with cells taken from the effluent of the continuous immobilized-cell fermentation. Our study showed that continuous culture with immobilized cells could be used to manufacture industrial products containing probiotic and lactic acid bacteria with enhanced characteristics and potentially improved benefits on human health.

**Key words** : immobilization, continuous fermentation, cell physiology, lactic bacteria, probiotics.

### 5.3 Introduction

Probiotics are defined as microbial cells which transit the gastrointestinal tract and which, in doing so, benefit the health of the consumer (Tannock et al., 2000). Among these micro-organisms, bifidobacteria are already used in many probiotic dairy products including milk, yogurt, ice cream, and cheese. However, a thorough knowledge of the abilities of cells to survive manufacture and storage of the product is required to successfully develop foods containing high viable concentrations of these micro-organisms (Heller, 2001). Furthermore, probiotic cultures must reach the gastrointestinal tract in a viable state and in significant numbers to be beneficial to the host, which requires that they survive the acidic condition in the stomach and bile in the small intestine (Stanton et al., 2001). Presently, the only technique used to increase cell resistance to stresses occurring during production, storage or digestion relies on incubation of free cells under starving or other stressful conditions, such as heat, high concentrations of salt, bile salts, or hydrogen peroxide, or low pH (Gilliland and Rich, 1990; Reilly and Gilliland, 1999; Desmond et al. 2002). Cells can also be physically encapsulated after their production to create protection to different stresses such as oxygen, moisture, and acidity (Rao et al., 1989; Lee and Heo, 2000).

Immobilized cell technology has been shown to result in very high cell volumetric productivity of batch or continuous cultures compared with free-cell (FC) cultures, due to the high cell density maintained in the reactor (Doleyres et al., 2002a, b; chapters 2, 3, 4; Lamboley et al., 1997; 1999; 2001). The growth of immobilized cells results in high cell release into the bulk medium and efficient production of pure or mixed strain lactic acid bacteria (LAB) culture (Lamboley et al., 1997). Moreover, high stability of continuous immobilized cultures with mixed strains was obtained over long periods which allowed for constant biomass production, with a stable and controlled strain ratio (Lamboley et al., 1997; 1999; 2001). Other advantages of cell immobilization have been reported in previous studies, such as high resistance to bacterial and phage contaminations and high biological

stability, including genetic stability (Champagne et al., 1994; Huang et al., 1996; Macedo et al., 1999). However, it has been reported that immobilization of living microbial whole cells may change the cell growth rate and morphology and sometimes alter the metabolic activity (Teixeira de Mattos et al., 1994; Krishnan et al., 2001). Several authors have observed an increased tolerance to product inhibition of immobilized cells (Teixeira de Mattos et al., 1994; Krisch and Szajani, 1997). Furthermore, increased resistance of cells to environmental stress factors, such as sanitizers or antibiotics, have been observed after prolonged cultures for specific systems (Jouenne et al., 1994; Trauth et al., 2001).

Recently, the production of a mixed model lactic culture containing a dominant LAB strain, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MD, and a probiotic culture, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, was reported during a 17-day continuous immobilized-cell (IC) culture at different temperatures between 32 and 37°C (chapter 4). The two-stage fermentation system, composed of a first reactor containing cells of the two strains separately immobilized in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads and a second reactor operated with free cells released from the first reactor, allowed continuous and stable production of a concentrated mixed culture at 35°C. In addition, composition and strain ratio of the culture produced in the effluent medium was influenced by temperature in the range studied.

In the present work, we report on the changes in physiological characteristics of cells produced during the 17-day continuous IC fermentation carried out at different temperatures (chapter 4) and compared cell characteristics to that of cells from conventional batch FC fermentations. *B. longum* and *L. diacetylactis* produced during FC batch and IC continuous fermentations were assessed for their tolerance to various stresses, by measuring important technological characteristics, such as survival to freeze-drying and hydrogen peroxide, sensitivity to nisin Z, and probiotic characteristics, such as cell survival to simulated gastro-intestinal conditions and tolerance to antibiotics.

## 5.4 Materials and methods

### 5.4.1 STRAINS AND MEDIUM

*B. longum* ATCC 15707 was provided by the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and *L. diacetylactis* MD was obtained from Rhône Poulenc (Brampton, ON, Canada). The fermentation medium used during continuous IC culture was MRS medium (de Man et al., 1960) without glucose (Rosell Institute Inc Montreal, QC, Canada.), supplemented with 50 g/l lactose, 0.5 g/l cysteine, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>, and KCl 0.15 M to ensure bead integrity.

### 5.4.2 CELL IMMOBILIZATION

For immobilization, pure cultures of the two strains from frozen stock (-80°C) were grown twice in MRS broth (Rosell Institute Inc.) supplemented with 0.5 g/l cysteine, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>, for 18 h without pH control, aerobically at 30°C for *L. diacetylactis* or in anaerobic jars (Oxoid Inc., Nepean, ON, Canada) at 37°C for *B. longum*, with a 2% (v/v) inoculum. *B. longum* and *L. diacetylactis* cultures were immobilized separately in κ-carrageenan/locust bean gum gel beads, as previously described (Doleyres et al., 2002a; chapter 3). Beads with diameters in the range of 1-2 mm were selected by wet sieving and used for fermentation experiments.

### 5.4.3 FERMENTATIONS

The continuous IC culture was carried out as previously described (chapter 4). Briefly, a two-stage fermentation system was used for the continuous production of a mixed culture composed of *L. diacetylactis* and *B. longum*. The first flat-bottomed custom-built bioreactor (R1) contained 20 ml of the two types of pre-colonized gel beads immobilizing a pure



culture, for a total culture volume of 120 ml. The second 600 ml useful-volume stirred tank reactor (R2, Bioflo model C30, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) was operated in series with free cells released from the first reactor R1. Carbon dioxide was injected in the headspace of the two reactors to maintain anaerobic conditions during the culture. The flow rate of supplemented MRS medium was set at 240 ml/h (dilution rate of 2 h<sup>-1</sup> calculated for R1) during the 17-day culture and pH was controlled at 6.0 by addition of 6 N NH<sub>4</sub>OH. Temperature in both reactors was first set at 37°C, then decreased to 32°C at day 6, and finally increased to 35°C at day 13 until the end of the experiment. Broth samples were taken from the two reactors at 3-day intervals to test cell tolerance to different stress conditions.

Control samples used in the tests for strain sensitivity to antibiotics, freeze-drying, simulated gastro-intestinal conditions, hydrogen peroxide and nisin, were produced using the same procedure as for the inoculum used for immobilization. Control and effluent samples were centrifugated (10000 g at 4°C for 10 min) and suspended to their initial volume in a solution of 100 g/l skim milk and 100 g/l glycerol, prior to freezing at -80°C until testing.

#### 5.4.4 VIABLE CELL ENUMERATION

*L. diacetylactis* and *B. longum* viable cells were enumerated by plating diluted samples (peptonized water) on solid MRS agar (Rosell Institute Inc.) supplemented with 0.5 g/l cysteine, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>. The plates were incubated for 48 h aerobically at 30°C or in anaerobic jars at 42°C to determine *L. diacetylactis* or *B. longum* population, respectively. Reported data are means for duplicate analyses.

#### 5.4.5 RESISTANCE TO FREEZE-DRYING

Cell survival during freeze-drying of control and experimental cultures was determined as follows. Frozen control and effluent samples were thawed, centrifuged (10000 g at 4°C for 10 min), and then suspended to the initial volume in a cryoprotective solution containing 100 g/l non-fat milk solids, 100 g/l saccharose, and 4 g/l ascorbic acid. The mixture was frozen at -80°C for 24 h and freeze-drying was then carried out at -50°C for 48 h under 0.01 mbar vacuum (Model Lyph Lock 4.5, Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). Freeze-dried cultures were immediately rehydrated to their initial volume in a solution of tryptone 1%, peptone 1.5%, and beef extract 0.5% for 10 min at 37°C, and homogenized by high speed vortexing (Font de Valdez et al., 1985a, b). Cell survival was then determined by the pour plate method. Reported data are means for duplicate analyses.

#### 5.4.6 TOLERANCE TO HYDROGEN PEROXIDE

Cell survival of control and experimental cultures to hydrogen peroxide was determined as previously described by Shimamura et al. (1992), with some modifications. Briefly, 1 ml thawed cell sample was added to 9 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions at different final concentrations (0, 2000, 10000, 20000, or 30000 ppm), and incubated for 1 min at 37°C. After incubation, 0.1 ml of test sample was added to 9.9 ml catalase solution (0.2 g/l) to stop the reaction, and cell survival was determined by the pour plate method. Reported data are means for triplicate analyses.

#### 5.4.7 SENSITIVITY TO SIMULATED GASTRO-INTESTINAL TRACT CONDITIONS

For cell survival test to simulated gastric conditions, 1 ml thawed cell sample was added to 9 ml of pepsin (0.22%) and NaCl (0.5%) solution at pH=3.2 (1 M HCl) and incubated for

1 h at 37°C. Cell survival was then determined by the pour plate method. For cell survival test to simulated intestinal conditions, 1 ml thawed cell sample was added to 9 ml of a solution containing 12% (v/w) reconstituted skim milk, 0.4% (v/w) bile salts, and 0.2% (v/w) pancreatin, and the mixture was incubated 1 h at 37°C. Viable cell enumeration was then carried out by the pour plate method to determined cell survival. Reported data for gastric and intestinal tests are means for duplicate analyses.

#### 5.4.8 TOLERANCE TO ANTIBIOTICS

Antibiograms were determined using an antimicrobial disk susceptibility assay according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (1991), but with some modifications. Tests were performed by plating cell samples on MRS-cysteine agar, after dilution with peptonized water to a cell concentration of approximately  $10^8$  CFU/ml. The plates were incubated for 24 h in anaerobic jars at 42°C or aerobically at 30°C for *B. longum* or *L. diacetylactis*, respectively. Antibiotic tolerance of cell samples were compared using the following antibiotic disks (BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA): ampicillin (AM 10), bacitracin (B 10), chloramphenicol (C 30), erythromycin (E 15), gentamycin (GM 10), kanamycin (K 30), neomycin (N 5), novobiocin (NB 30), penicillin (P 2), polyxymin B (PB 30), rifampin (RA 5), streptomycin (S 10), tetracycline (T 30), and vancomycin (VA 30). Reported data are means for duplicate samples and analyses.

#### 5.4.9 SENSITIVITY TO NISIN Z

Nisin Z production from an overnight culture of a nisin Z-producing strain and purification by immunoaffinity was carried out as previously described (Benech et al., 2002). Cell sensitivity to nisin Z was then determined using an agar well diffusion test as previously described by Wolf and Gibbons (1996), with some modifications. The test was performed

by plating cell samples on MRS-cysteine agar, after dilution with peptonized water to a cell concentration of approximately  $10^7$  CFU/ml. The plates were then incubated for 24 h anaerobically at 42°C or aerobically at 30°C for *B. longum* or *L. diacetylactis*, respectively. Nisin Z sensitivity of cell samples were compared for different nisin Z concentrations added in the wells, varying from 0 to 800 IU/ml. Zones of inhibition were measured to the nearest 1 mm, and a regression equation was calculated from these data for the inhibition diameter as a function of the log nisin concentration for each sample tested. Sensitivity of the cells to nisin Z was correlated with the ordinate intercept of the regression for one sample (Wolf and Gibbons, 1996). Moreover, a steeper slope of the regression equation indicates that, for a given increase in nisin Z concentration, a larger change in the inhibition diameter will result (Wolf and Gibbons, 1996). Reported data are means for duplicate analyses.

#### 5.4.10 REVERSIBILITY OF CULTURE CHARACTERISTICS

Samples from the effluent of R2 after 15 days continuous culture were subcultured 7 times in supplemented MRS medium without pH control to study the reversibility of strain characteristic changes induced by long-term continuous IC culture, with a 2% inoculum. Repeated batch cultures were carried out for 18 h in test tubes at 30°C to preferentially propagate *L. diacetylactis* cells, or at 40°C in anaerobic jars (Oxoid Inc.) for *B. longum*. Tolerance tests to ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, penicillin and vancomycin for *B. longum*, and to ampicillin, bacitracin, kanamycin, penicillin and vancomycin for *L. diacetylactis*, were carried out after each batch culture. Reported data are means for duplicate cultures and analyses.

#### 5.4.11 STATISTICAL ANALYSIS

ANOVA and Student's t test were carried out to detect differences among means, using the software JMP IN (SAS Institute Inc., version 4, Cary, NC, USA) with a level of significance at 0.05.

## 5.5 Results

The resistance of cells produced during continuous IC culture in the effluents from R1 and R2 to different environmental stresses was tested as a function of fermentation time and temperature, and compared with a control treatment. Control cells were produced during conventional batch FC fermentation in MRS medium inoculated at 2% and incubated for 18 h, anaerobically at 37°C (for *B. longum*) or aerobically at 30°C (for *L. diacetylactis*), with no pH control.

### 5.5.1 RESISTANCE TO FREEZE-DRYING

Survival to freeze-drying of *L. diacetylactis* cells produced during continuous IC fermentation (averaging 39±16%) was higher but not significantly different ( $p>0.05$ ) from that for control cells (21±11%) (Figure 5.1). No effect of fermentation time and temperature was observed on this parameter. For *B. longum*, cell survival to freeze-drying increased dramatically during continuous culture from day 3 at 37°C (0.22±0.16%) to day 9 at 32°C (9.5±3.7%) and remained stable until day 12 at 32°C. Then, this parameter decreased slightly after temperature was decreased to 35°C to an intermediate value of 5.5±2.4% at day 15. Cell survival for the control *B. longum* culture was 4±3% (Figure 5.1). Survival to freeze-drying of cells of the two strains harvested from the second FC reactor (R2) was not significantly different from that for cells from the first IC reactor (R1) (data not shown).

### 5.5.2 TOLERANCE TO HYDROGEN PEROXIDE

No effect of culture time, temperature and reactor ( $p>0.05$ ) was observed on cell survival of both strains to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during continuous IC culture, with means of 0.91±0.45% and 0.11±0.04%, for *B. longum*, and 47±30% and 22±14%, for *L. diacetylactis*, at 20000 and

30000 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively (Figure 5.2). However, hydrogen peroxide survival of *B. longum* produced during continuous IC fermentation was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that for control cells produced during FC batch cultures ( $0.08 \pm 0.06\%$  and  $0.003 \pm 0.001\%$  for concentrations of 20000 and 30000 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively). Resistance to hydrogen peroxide of *L. diacetylactis* cells produced during continuous IC fermentation was not significantly different ( $p > 0.05$ ) from that for control cells ( $28 \pm 18\%$  and  $7.8 \pm 0.1\%$  for 20000 and 30000 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively).

### 5.5.3 SENSITIVITY TO SIMULATED GASTRO-INTESTINAL TRACT CONDITIONS

*B. longum* survival to simulated gastric and duodenal juices, studied separately, increased progressively with fermentation time, with no apparent effect of temperature, during continuous IC culture (Figure 5.3a). Samples at day 3 exhibited lower survival rates than control cells ( $0.02 \pm 0.01\%$  and  $0.08 \pm 0.03\%$  in R1 compared with  $2 \pm 1\%$  and  $21 \pm 9\%$  for control culture, for gastric and duodenal juices, respectively). However, cell survivals reached very high values after 15 days continuous IC culture ( $69 \pm 4\%$  in gastric juice and  $70 \pm 7\%$  in duodenal juice for R1). Survivals of cells from R2 were higher than that for cells from R1 for all fermentation times, with maxima of  $86 \pm 3\%$  and  $90 \pm 13\%$  after 15 days for gastric and duodenal juices, respectively (Figure 5.3a).

A different behaviour was observed for *L. diacetylactis* (Figure 5.3b). Cell survival also increased with culture time but was apparently much more dependent on fermentation temperature. During the first fermentation period of 6 days at 37°C, survival of cells from R1 to gastric and duodenal juices increased from  $30 \pm 4\%$  and  $42 \pm 6\%$  at day 3 to  $60 \pm 9\%$  and  $78 \pm 12\%$  at day 6, respectively. During this period, cell survival for samples from R2 to gastric and duodenal juices were higher than for R1, and also increased from day 3 to day 6 to reach very high values of  $79 \pm 12\%$  and  $82 \pm 12\%$ , respectively. Decreasing fermentation temperature to 32°C resulted in a progressive decrease of *L. diacetylactis* cell survival, to

37±5% and 40±6% for gastric and duodenal juices in R1, respectively, and to 66±10% and 72±11% for gastric and duodenal juices in R2 respectively, at day 12. Then, increasing temperature to an intermediate value of 35°C increased cell survival to gastric and duodenal juices, to 67±10% and 73±11% in R1, and 74±11% and 77±12% in R2 at day 15, respectively. *L. diacetylactis* control cell survival to gastric and duodenal juices was 54±8% and 66±10%, respectively.

#### 5.5.4 TOLERANCE TO ANTIBIOTICS

*B. longum* (Figure 5.4a) and *L. diacetylactis* (Figure 5.4b) cells produced during continuous IC fermentation in reactors R1 and R2 for different culture times showed increased tolerance to chloramphenicol compared with control cells from FC batch culture. The tolerance to chloramphenicol increased with time for the two strains, with samples from day 3 exhibiting lower tolerance (29.7±2.5 and 31.3±1.6 mm inhibition for *B. longum* and *L. diacetylactis* in R1, respectively) than control cells (25.8±2.0 and 26.0±1.1 mm inhibition for *B. longum* and *L. diacetylactis*, respectively). However, cells produced after day 6 showed higher tolerance (19.2±1.7 and 22.2±1.3 mm inhibition for *B. longum* and *L. diacetylactis* in R1 after 15 days culture, respectively) than the control (Figure 5.4). Cell tolerance to chloramphenicol of samples from R2 was not significantly ( $p>0.05$ ) different from that of R1 for each fermentation time.

Increased cell tolerance as a function of fermentation time was observed for various antibiotics. Indeed, *L. diacetylactis* cells produced in the effluent of R2 after 15 days continuous IC culture were significantly ( $p<0.05$ ) more tolerant to ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, neomycin, penicillin, polymyxin B, streptomycin, tetracyclin, and vancomycin than control cells, whereas *B. longum* showed increased tolerance to ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, erythromycin, neomycin, penicillin, and vancomycin (Table 5.1). However, no increase in tolerance to erythromycin,



novobiocin and rifampin was observed for *L. diacetylactis* and to gentamycin, novobiocin, rifampin, and tetracycline for *B. longum* as a result of cell immobilization.

Control cells of *B. longum* were resistant to kanamycin, polymyxin B, and streptomycin (6 mm of inhibition diameter corresponds to the diameter of the antibiotic disk) (Table 5.1), and the same result was obtained for cells produced during continuous IC fermentation for all fermentation times (data not shown).

### 5.5.5 SENSITIVITY TO NISIN Z

The sensitivity of *B. longum* and *L. diacetylactis* to nisin Z as a function of continuous IC fermentation time and reactors (R1 or R2) is reported in Figure 5.5. The ordinate intercept of the regression equations of the inhibition diameter as a function of log nisin Z concentration was used to measure nisin sensitivity of a cell sample. The intercept progressively decreased with fermentation time for *B. longum* (4.2, -2.3, -6.3, -10.4, and -15.3 mm of inhibition after 3, 6, 9, 12, and 15 days in R1), and for *L. diacetylactis* (0.4, -5.8, -5.0, -9.8, and -12.8 mm of inhibition after 3, 6, 9, 12, and 15 days in R1), indicating that cells became progressively less sensitive to nisin with time during continuous IC culture (Figure 5.5).

For a given strain and fermentation time, the ordinate intercept of samples from the effluent of R2 (1.3, -6.4, -9.2, -12.6, -16.5, and -2.6, -4.2, -7.6, -13.7, -14.7 mm of inhibition after 3, 6, 9, 12, and 15 days in R2 for *B. longum* and *L. diacetylactis*, respectively) was lower than that from cells in the effluent of R1 (Figures 5.5c and 5.5d). Control cells (ordinate intercept of -1.6 and -1.5 mm for *B. longum* and *L. diacetylactis*) exhibited lower sensitivity to nisin than samples from IC culture after day 3, but higher sensitivity than samples from day 6 and the following days.

For a given strain, the slope of the regression progressively increased with fermentation time from 5.0 to 10.2 and from 5.4 to 9.9 after 3 and 15 days for *B. longum* in R1 and R2,

respectively, and from 5.7 to 10.2 and from 6.6 to 10.0 after 3 and 15 days for *L. diacetylactis* in R1 and R2, respectively). The slope of the regression for control cells were 5.4 and 5.5 for *B. longum* and *L. diacetylactis*, respectively.

#### 5.5.6 REVERSIBILITY OF CULTURE CHARACTERISTICS

Tolerance to ampicillin, bacitracin, penicillin and chloramphenicol of *B. longum* cells sampled from the effluent of R2 after 15 days continuous IC fermentation that were subcultured decreased with the number of batch cultures (Figure 5.6). The inhibition diameter of  $19.0 \pm 1.5$  mm for ampicillin and cells from R2 after 15 days progressively increased to  $24.5 \pm 0.8$  mm after three batch cultures, and remained stable during subsequent batch cultures ( $25.0 \pm 0.6$  mm) (Figure 5.6a). After the third batch culture, the inhibition diameter with ampicillin was not significantly different from control cells ( $25.2 \pm 1.1$  mm). A similar decrease in tolerance to penicillin, bacitracin and chloramphenicol was observed for *B. longum* during repeated batch cultures, and tolerance to these antibiotics was similar to that for control cells, after 3, 5, and 7 batch cultures, respectively (Figure 5.6a).

During seven repeated FC batch cultures initially inoculated with *L. diacetylactis* cells taken from the effluent of R2 after 15 days continuous IC fermentation, cell tolerance to ampicillin, bacitracin, penicillin and kanamycin remained stable, with inhibition diameters averaging  $18.7 \pm 1.2$ ,  $18.9 \pm 1.0$ ,  $15.0 \pm 1.1$ , and  $7.1 \pm 0.2$  mm, respectively (Figure 5.6b). These values were significantly lower than that for control cells ( $33.5 \pm 0.9$ ,  $27.7 \pm 1.3$ ,  $25.7 \pm 0.3$ , and  $15.7 \pm 1.1$  mm inhibition, for ampicillin, bacitracin, penicillin and kanamycin, respectively). The high tolerance to vancomycin of *B. longum* and *L. diacetylactis* cells acquired after 15 days continuous culture in R2 was stable during the seven successive batch FC cultures ( $6.0 \pm 0.0$  mm corresponding to the diameter of the antibiotic disk) and significantly different from control cells ( $20.2 \pm 1.1$  and  $21.3 \pm 0.9$  mm inhibition for *B. longum* and *L. diacetylactis*, respectively).

## 5.6 Discussion

This work was carried out to study the effects of the cell production technology on tolerance to different stresses of two strains, *B. longum* and *L. diacetylactis*. Cells produced during conventional batch FC fermentation and long-term continuous IC fermentations were compared for their survival to different technological and environmental stresses, including freeze-drying, hydrogen peroxide, simulated gastric and intestinal conditions, antibiotics, and nisin Z. As a general trend for the different stresses applied, survivals of cells produced with immobilized cell technology significantly increased with fermentation time, and were higher after 3-6 day culture than that for cells produced during batch FC culture.

Commercial dairy starters are increasingly supplied in the freeze-dried form because such starters can eliminate the subculturing steps without the risks of thawing during transportation or storage of the frozen culture. Even though many compounds have been successfully used to improve the survival of LAB during freeze-drying, other means of increasing cell survival such as fermentation process are of interest to culture suppliers. For *B. longum* cells produced during continuous IC culture, cell survival after freeze-drying increased for fermentation times up to day 9, and then remained constant until the end of the experiment. Fermentation time and temperature apparently had an effect on *B. longum* survival, with a stable high value ( $9.3 \pm 3.1\%$ ) measured between day 9 and 12 for a low temperature of  $32^\circ\text{C}$ . Even though the effects of fermentation time and temperature on cell survival were superposed, our data suggest that a temperature lower than the optimal value for *B. longum* growth could increase cell resistance to freeze-drying. For *L. diacetylactis*, a slight non-significant increase in cell survival to freeze-drying was also observed as a function of fermentation time, but this characteristic was not different than for control cells. Moreover, no significant difference was observed for both strains between samples from R1 and R2 for a given fermentation time. The limited accuracy of the pour plate method

used to determine cell survival could partly explain the absence of effects for *L. diacetylactis*.

Cell tolerance to hydrogen peroxide was tested because bifidobacteria are classified as anaerobic organisms, although some species can tolerate low concentrations of oxygen. Precautions are thus required to prevent toxic effects of oxygen when bifidobacteria are grown for industrial applications or used in products (Shah, 1997). Indeed, oxygen toxicity is generally considered to result from the effects of different compounds including superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals (Shoesmith and Worsley, 1984). Hydrogen peroxide produced by yogurt organisms, especially *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, may also affect the viability of bifidobacteria, and the presence of hydrogen peroxide in acidic conditions, such as in yogurt, may cause synergistic inhibition of bifidobacteria (Lankaputhra et al., 1996). Our study showed that both *B. longum* and *L. diacetylactis* cells with enhanced tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations of 20000 ppm or higher were produced during continuous IC fermentation, compared with conventional batch FC culture. This increase in tolerance was very high (40- and 3-fold higher survival rate at 30000 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for *B. longum* and *L. diacetylactis* from IC culture compared with the control, respectively) and developed rapidly in the course of the culture (less than 3 days) compared with the slower adaptation of cells to the other stresses tested. Cell tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not change after 3 days, with no effect of reactors.

Cell tolerance to simulated gastric and intestinal juices was tested because probiotic cultures must reach the gastrointestinal tract in a viable state and in significant numbers to be beneficial to the host, which requires that they survive the acidic conditions in the stomach and bile in the small intestine (Stanton et al., 2001). A very large increase in cell survival to both simulated gastric and duodenal juices was observed for *B. longum* as a function of continuous IC fermentation time, with a higher survival rate than for control cells after 9 days continuous culture. For *L. diacetylactis*, cell survival seemed to be more dependent on fermentation temperature. *L. diacetylactis* cells were less tolerant to

simulated gastro-intestinal conditions when they were grown close to their optimal growth temperature (32°C) compared with higher temperatures (up to 37°C), indicating that a temperature stress in addition to the effect of immobilization generated cells that could better survive during digestion. In a previous study, we showed that a change in growth temperature between 32 and 37°C had more effect on growth kinetics and concentration in the effluent of continuous IC fermentation of *L. diacetylactis* than for *B. longum* (chapter 4).

Tolerance of probiotic cells to antibiotics is of great interest due to their possible use to reconstitute the intestinal microflora of patients suffering from antibiotic-associated colitis. Cell tolerance to different antibiotics greatly increased with culture time during continuous IC fermentation (Table 5.1). Cells generally exhibited lower tolerance after 3 days continuous culture than control cells but higher tolerance after day 6 and the following days. *Escherichia coli* cells immobilized in agar gel layers also exhibited increased resistance to an antibiotic (latamoxef) compared with free (planktonic) cells, with tolerance increasing with ageing of the immobilized culture (Jouenne et al., 1994). The authors explained this difference in sensitivity by a limitation of diffusion of latamoxef in the biofilm-like agar structure. However, in our study, an increased tolerance was observed for both released cells in R1 and cells that subsequently grew in a suspended state in R2. Moreover, tolerance to antibiotics of cells from R2 was generally higher than for cells from R1 for a given fermentation time, as shown for chloramphenicol. In a previous study, we reported growth inhibiting conditions in R2 due to high lactic and acetic acid production by the two strains, which can therefore have added a stress that contributed to further increase cell tolerance to antibiotics (chapter 4).

Bacteriocins from lactic acid bacteria are protein compounds showing antimicrobial activity against several gram-positive bacteria (Klaenhammer, 1993). Nisin is the best-known bacteriocin and the only one recognized as GRAS (generally recognized as safe) for several specific applications in more than 50 countries as a food preservative (Turtell and Delves-

Broughton, 1998). However, one important limit for the use of nisin in dairy products or of nisin-producing lactic acid bacteria in mixed starters is its inhibitory effect on other suitable lactic strains (Bouksaim et al., 2000; Benech et al., 2002). Our study showed that cells produced during long-term continuous IC fermentation exhibited increased tolerance to nisin Z with fermentation time. Cells were more tolerant to nisin Z concentrations of  $\leq 200$  UI/ml than control cells after 6-9 days continuous culture. Moreover, the slopes of the regression equations increased with fermentation time, indicating that the increased tolerance to nisin Z was more pronounced for low nisin concentrations.

The low tolerance at day 3 observed in all tests might be explained by the fact that cells produced during the continuous IC fermentation at high dilution rate ( $2 \text{ h}^{-1}$  calculated for the total volume of the first IC reactor R1, and  $0.4 \text{ h}^{-1}$  for the second FC reactor R2) are in exponential growth phase. Indeed, it is well known that cells in exponential phase are much more sensitive to the environment than cells in stationary growth phase such as control cells produced after 18 h batch FC cultures (Kolter, 1993; Hartke et al., 1994; Rallu et al., 1996). Moreover, control cells that are propagated without pH control are subjected to acid stress at the end of culture which is already commonly used to increase cell resistance to stresses occurring during production and storage (Hartke et al., 1996). However, compared with cells of both strains in exponential growth phase in R1, cells in R2 were in late exponential growth phase for *L. diacetylactis* and in stationary or decline/death growth phase for *B. longum* due to the the higher residence time in R2 compared with R1, resulting in an increase tolerance to environmental stresses (chapter 4).

Cell growth in gel beads is limited by diffusional limitations of both substrates and inhibitory products, in this case lactic and acetic acids (Arnaud et al., 1991; 1992; Lamboley et al., 1997). This leads to the development of steep gradients of inhibitory products, pH and biomass in colonized beads (Masson et al., 1994; Doleyres et al., 2002a; chapter 3). Recently, enhanced cell-to-cell signalling and cell-matrix interactions leading to coordinated behaviour of immobilized microorganisms were reported (Shapiro and

Dworkin, 1997). Such studies must be carried out to better understand the effects of the local microenvironment of immobilized cells combined to long-term culture leading to a progressive increase of resistance characteristics for the two strains.

For industrial benefits of these cell modifications, particular attention should be paid to the possible reversibility of the cell characteristics when they are further grown or incorporated in dairy products. Consequently, cells from the effluent of R2 after 15-day continuous IC fermentation were propagated for seven successive FC batch cultures to study the reversibility of the strain-characteristic modifications observed during long-term continuous IC culture, with tolerance to antibiotics as a model. Tolerance of *B. longum* cells to four antibiotics (ampicillin, bacitracin, penicillin, and chloramphenicol), which were selected for the test, progressively decreased with numbers of batch cultures and reached that of control cells after seven batch cultures or less. However, the high tolerance to vancomycin of *B. longum* cells measured after the 15-day continuous culture in R2 was stable during the seven successive FC batch cultures. On the other hand, the behaviour of *L. diacetylactis* cells was very different. For this culture, the tolerance to antibiotics was stable during seven successive FC batch cultures, and remained significantly higher than for control cells.

Several studies have shown that cells produced with immobilized cell technology exhibited a change in growth, morphology and physiology characteristics compared with cells produced during conventional FC cultures. Cachon et al. (1998) reported differences in cell physiology during batch cultures with and without pH control and continuous cultures with free and immobilized *Lactococcus lactis*, depending on the culture mode. The redox states, enzymatic pool and intracellular pH differed for immobilized and free-cell cultures. A shift in the metabolic pathway from homofermentative to heterofermentative has also been observed during continuous cultures with immobilized cells of *Lactobacillus* (Krishnan et al., 2001). Moreover, many authors observed an increased tolerance of immobilized cells to product inhibition (Krisch and Szajani, 1997), alcohols (Holcberg and Margalith, 1981; Curtain, 1986), phenols (Keweloh et al., 1989; Heipieper et al., 1991; Diefenbach et al.,

1992), or quaternary ammonium sanitizers (Trauth et al., 2001). Immobilization as well as prolonged culture of immobilized cells led to increased cell tolerance to sanitizers (Trauth et al., 2001). In the last study, the authors tentatively explained this phenomenon of increased tolerance by a possible modification of the cell membrane and physiology, and protection of the cell membrane by the proximity of cells in a saturated matrix. Our study showed that the increased tolerance to various environmental stresses when cells were immobilized was not associated with cell- or strain-specific mechanisms or physical protection by cell contact and high density in the gel matrix, since tolerance was measured with released cells and for different stresses and strains. Our results suggest that the non-specific increase in cell resistance during long-term continuous IC fermentations could be partly due to a reversible increase in the thickness of the cell wall or due to modifications of the cell membrane, as proposed by Trauth et al (2001) for the increased tolerance to quaternary ammonium sanitizers of immobilized cells.

For industrial applications of immobilized cells for culture production with increased characteristics, the colonized beads should be stored under adequate conditions between two productions to ensure good viability and to avoid the approximately 6-day adaptation phase of newly immobilized cells. Moreover, particular attention should be paid to the possible reversibility of the characteristics of cells produced during continuous IC culture when they are further grown or incorporated in dairy products, which depends both on strains and characteristics. However, our study showed that immobilized cell technology combined with long-term continuous culture can be used to efficiently produce, in a one step process, cells with enhanced tolerance to environmental stresses, without the need for preconditioning treatments which are sometimes used for better survival of probiotics during production and use in functional foods, but eventually result in reduced cell activity and yield (Desmond et al., 2002). In addition, cells produced with continuous IC cultures are in exponential or early stationary growth phase, and they exhibited both a high viability and metabolic activity compared with starving cells produced with conventional batch



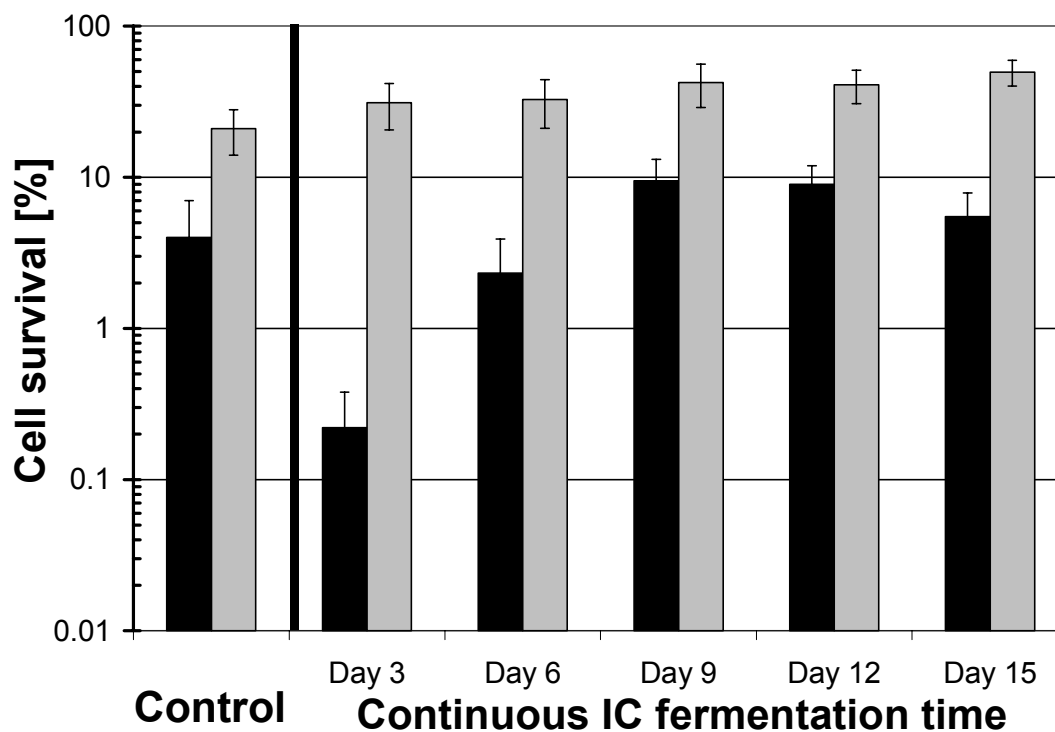
cultures. These results together with the high productivities of immobilized cell technology for cell and metabolic product production (chapter 4), show that there is a crucial advantage of this process for producing biomass with controlled properties and improved stress resistance compared with conventional batch FC cultures, particularly in the area of probiotic culture applications.

Probiotic cultures produced with continuous IC fermentations could survive to a greater extent as they pass through the gastro-intestinal tract and could be used to manufacture products with new or enhanced health claims, as well as new food or pharmaceutical bio-ingredients. Probiotics with enhanced tolerance to antibiotics could also be used to reconstitute the intestinal microflora of patients suffering from antibiotic-associated colitis or to be given to farm animals which are eating growth-promoting concentrations of antibiotics in their food. One important limitation for using nisin in dairy products or nisin-producing lactic acid bacteria in mixed starters is the inhibitory effect of the peptide on suitable acidifying or aroma-producing lactic strains (Bouksaim et al., 2000; Benech et al., 2002). Indeed, immobilized cell technology could also be used to enhance lactic starter or probiotic tolerance to nisin prior to incorporation into nisin-containing products. Finally, a better cell survival to freeze-drying conditions and resulting increase in process cell yield would be of great economical interest to culture suppliers.

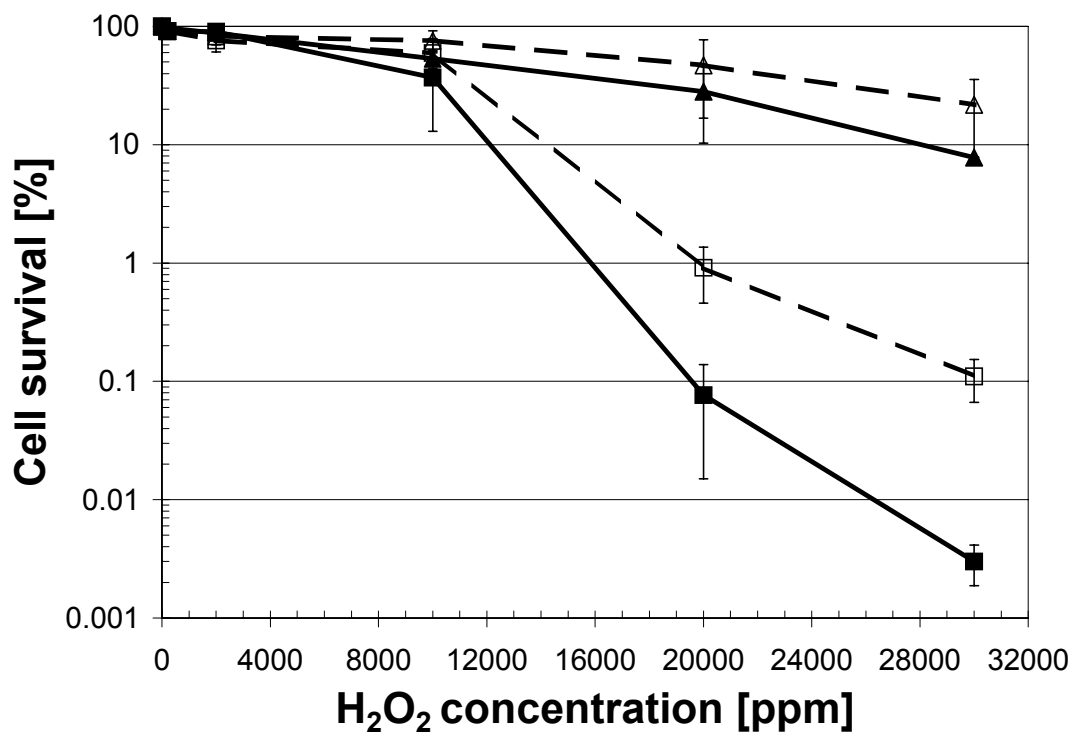
**Table 5.1** : Inhibition diameters (mm) measured by the disc assay method <sup>1</sup> of different antibiotics on *L. diacetylactis* MD and *B. longum* ATCC 15707 produced during FC batch culture (control) or after 15 days continuous IC fermentation in the effluent of reactor R2.

| Antibiotics     | Disk content | <i>L. diacetylactis</i> |                  | <i>B. longum</i> |                  |
|-----------------|--------------|-------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                 |              | Control                 | R2 15-d          | Control          | R2 15-d          |
| Ampicillin      | 10 µg        | 33.5 ± 0.9              | 21.2 ± 1.1       | 25.2 ± 1.1       | 19.0 ± 1.5       |
| Bacitracin      | 10 units     | 27.7 ± 1.3              | 17.7 ± 0.8       | 20.1 ± 1.3       | 14.5 ± 1.4       |
| Chloramphenicol | 30 µg        | 26.0 ± 1.1              | 22.2 ± 1.3       | 25.8 ± 2.0       | 18.7 ± 1.1       |
| Erythromycin    | 15 µg        | 28.5 ± 1.3              | 29.3 ± 0.6       | 27.8 ± 1.6       | 23.7 ± 1.2       |
| Gentamicin      | 10 µg        | 13.8 ± 1.5              | 10.3 ± 0.6       | 9.0 ± 0.5        | 10.0 ± 0.5       |
| Kanamycin       | 30 µg        | 15.7 ± 1.1              | 7.0 ± 0.0        | 6.0 <sup>1</sup> | 6.3 ± 0.3        |
| Neomycin        | 5 µg         | 8.2 ± 0.3               | 6.0 <sup>1</sup> | 6.8 ± 0.3        | 6.0 <sup>1</sup> |
| Novobiocin      | 30 µg        | 17.7 ± 0.8              | 17.5 ± 1.0       | 18.5 ± 0.9       | 20.7 ± 1.8       |
| Penicillin      | 2 units      | 25.7 ± 0.3              | 15.3 ± 0.3       | 20.8 ± 0.8       | 14.8 ± 1.1       |
| Polymyxin B     | 300 units    | 7.2 ± 0.3               | 6.0 <sup>1</sup> | 7.2 ± 1.9        | 6.0 <sup>1</sup> |
| Rifampin        | 5 µg         | 8.3 ± 0.6               | 8.3 ± 1.2        | 19.9 ± 1.8       | 22.0 ± 2.0       |
| Streptomycin    | 10 µg        | 13.0 ± 1.1              | 8.0 ± 0.5        | 8.0 ± 2.6        | 7.7 ± 0.8        |
| Tetracycline    | 30 µg        | 31.3 ± 0.8              | 28.3 ± 1.1       | 25.5 ± 1.0       | 22.8 ± 1.8       |
| Vancomycin      | 30 µg        | 21.3 ± 0.9              | 6.0 <sup>1</sup> | 20.2 ± 1.1       | 6.0 <sup>1</sup> |

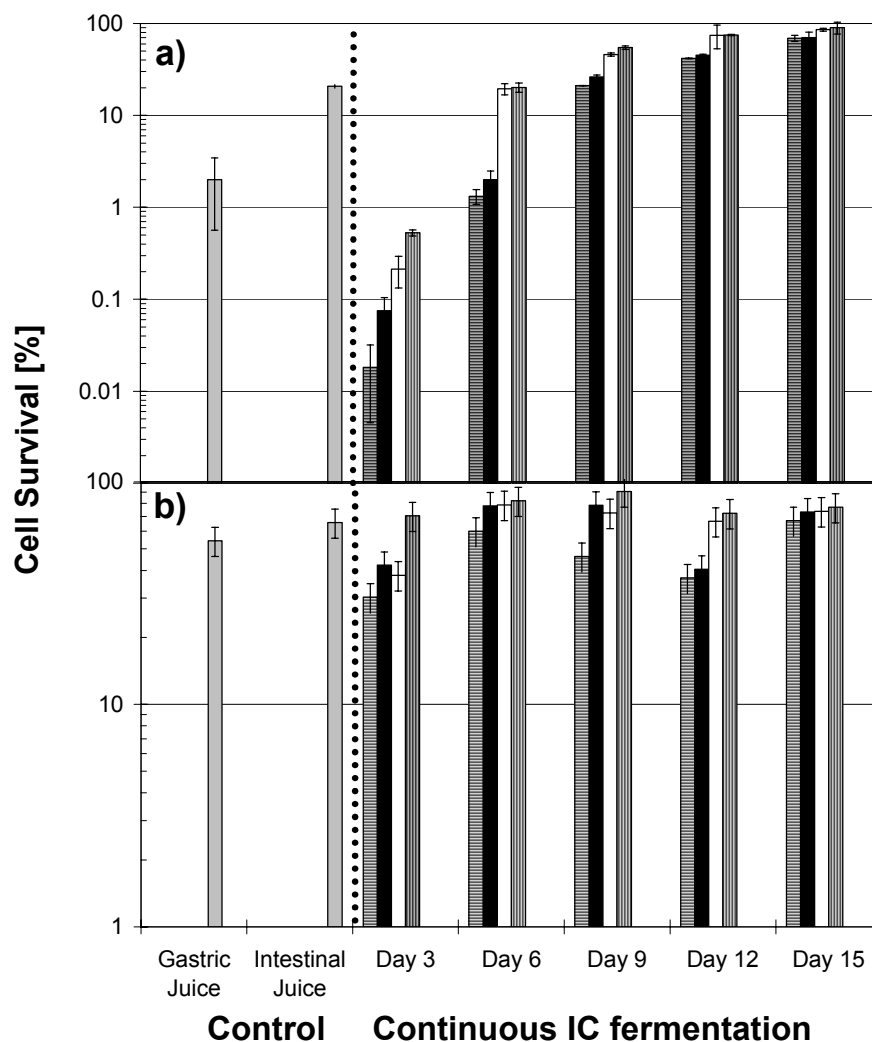
<sup>1</sup> A diameter of 6 mm corresponds to the diameter of the disk and indicates the absence of inhibition of the culture by the antibiotic.



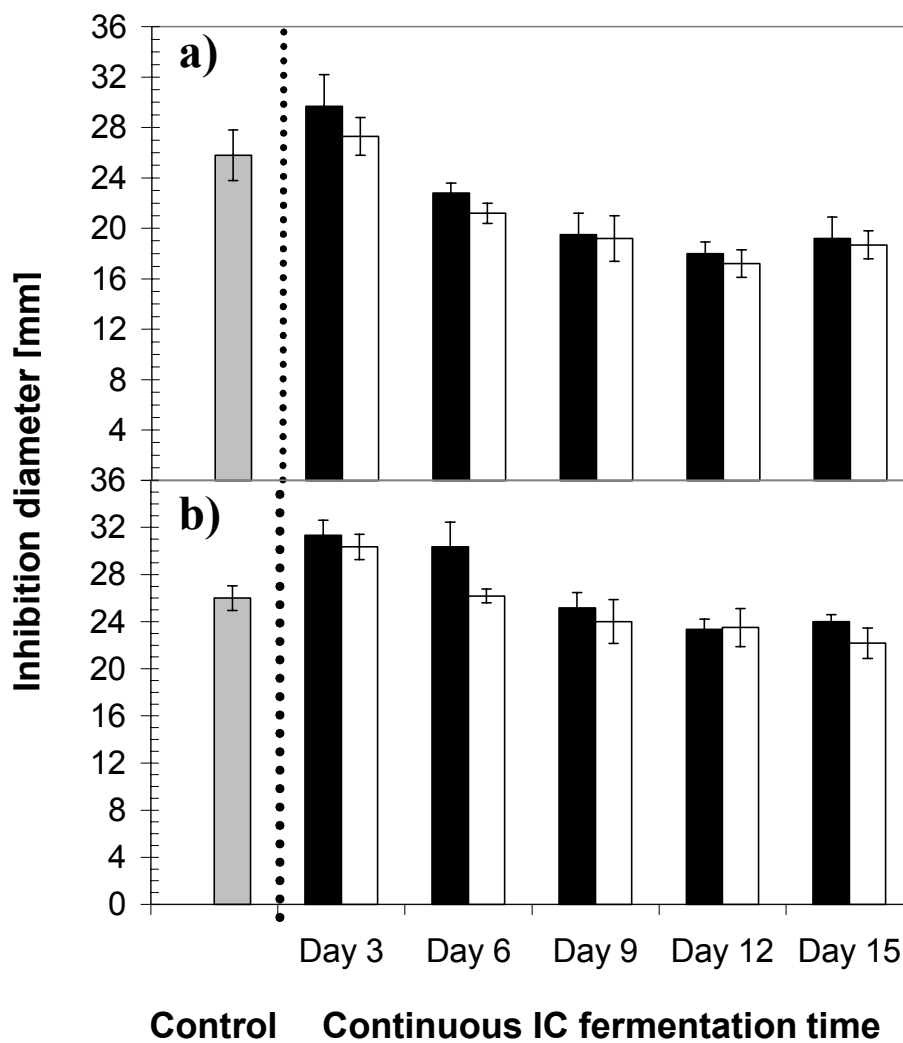
**Figure 5.1** : *B. longum* (■) and *L. diacetylactis* (□) cell survival during freeze-drying of control (batch FC culture) and experimental (continuous two-stage IC fermentation) cultures for different culture times. For the IC culture, mean survival rates for the first (R1) and second (R2) reactors are reported because there was no significant effect of reactors ( $p > 0.05$ ). Temperature during continuous IC culture was set at 37°C from day 1 to day 6, 32°C until day 13, and 35°C thereafter.



**Figure 5.2** : *B. longum* (■; □) and *L. diacetylactis* (▲; △) cell survival to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of control (batch FC culture, dark symbols), and experimental (continuous two-stage IC fermentation, open symbols) cultures. For the IC culture, mean survival rates of samples from the first (R1) and second (R2) reactors for different culture times are reported because there was no significant effect of reactors and culture time ( $p > 0.05$ ). Temperature during continuous IC culture was set at 37°C from day 1 to day 6, 32°C until day 13, and 35°C thereafter.

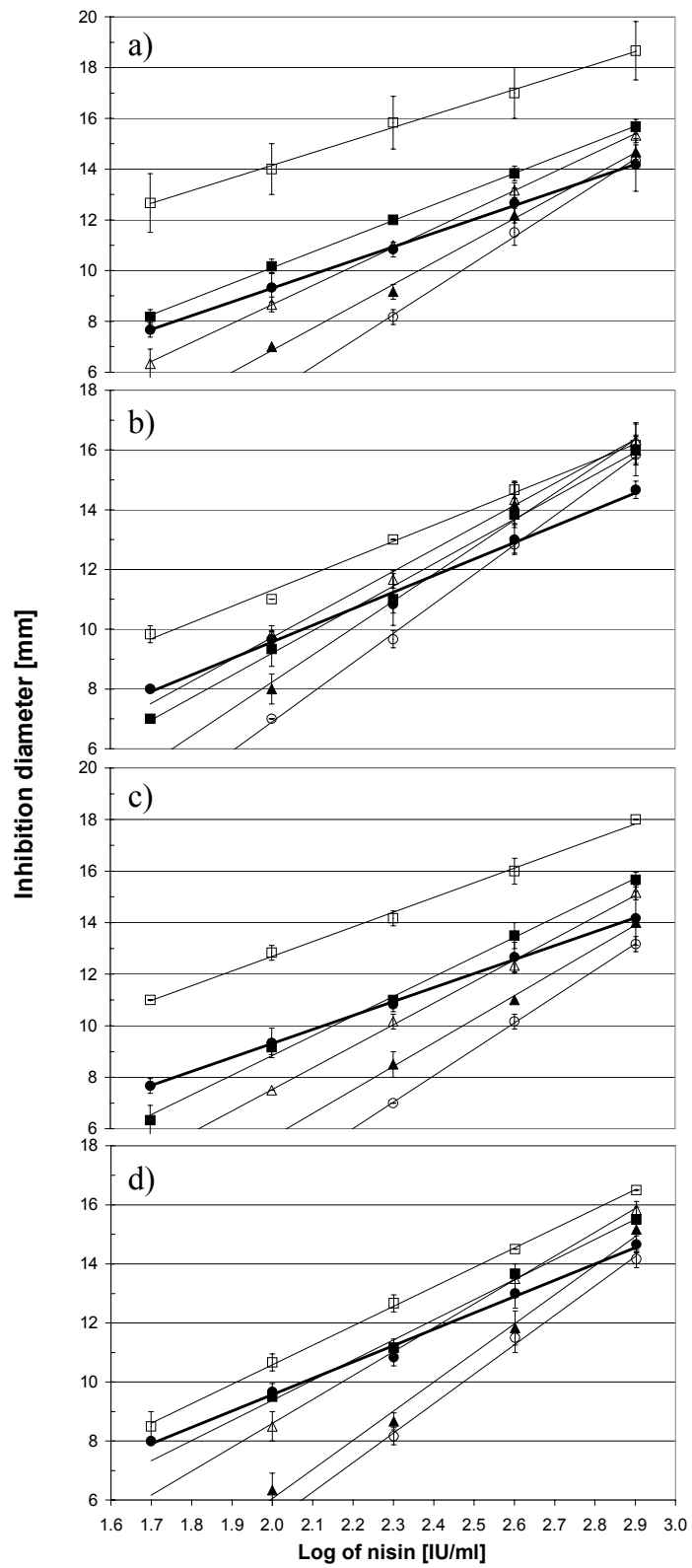


**Figure 5.3** : Cell survival to simulated gastric and duodenal juices for *B. longum* (a) and *L. diacetylactis* (b) from control (batch FC culture,  $\square$ ) and experimental (continuous two-stage IC fermentation) cultures, for reactors R1 ( $\boxminus$  = gastric juice;  $\blacksquare$  = duodenal juice) and R2 ( $\square$  = gastric juice;  $\boxplus$  = duodenal juice) and different culture times. Temperature during continuous IC culture was set at 37°C from day 1 to day 6, 32°C until day 13, and 35°C thereafter.

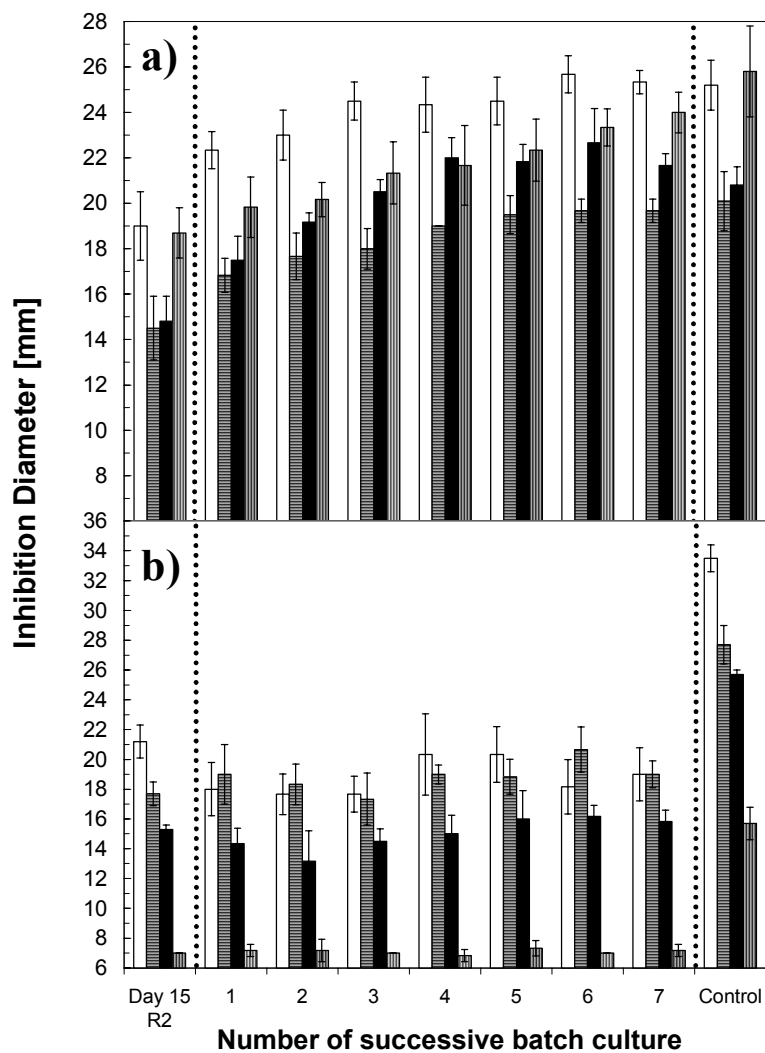


**Figure 5.4** : Tolerance to chloramphenicol of *B. longum* (a) and *L. diacetylactis* (b) cells produced during batch FC culture (control,  $\square$ ) or during continuous IC fermentation in reactors R1 ( $\blacksquare$ ) and R2 ( $\square$ ) at different culture times. The antibiotic sensitivity was tested by the disc assay method. Temperature during continuous IC culture was set at 37°C from day 1 to day 6, 32°C until day 13, and 35°C thereafter.

**Figure 5.5** : Tolerance to different nisin Z concentrations of cells produced during batch FC culture (control, ●) or after 3 (□), 6 (■), 9 (△), 12 (▲), or 15 (○) days continuous IC fermentation: a) *B. longum* in reactor R1 ; b) *L. diacetylactis* in reactor R1 ; c) *B. longum* in reactor R2 ; d) *L. diacetylactis* in reactor R2. Temperature during continuous IC culture was set at 37°C from day 1 to day 6, 32°C until day 13, and 35°C thereafter.







**Figure 5.6** : Inhibition diameter (mm) measured by the disc assay method for different antibiotics ( $\square$  = ampicillin;  $\equiv$  = bacitracin;  $\blacksquare$  = penicillin;  $\text{||||}$  = chloramphenicol) on *B. longum* (a) and *L. diacetylactis* (b) cells produced after successive batch FC cultures, inoculated (2%) with a culture sampled from reactor R2 after 15 days continuous IC fermentation. Control samples were produced during batch FC culture.

## **CHAPITRE 6: Conclusion générale**

L'hypothèse de ce travail était que l'utilisation de la technologie des cellules immobilisées permet de produire une culture lactique mixte modèle contenant une souche de bifidobactérie peu compétitive, qui soit équilibrée, stable et aux caractéristiques technologiques et probiotiques avantageuses.

Le but de cette étude était de caractériser d'un point de vue biologique les performances et la stabilité d'un procédé de fermentation continue utilisant des cellules immobilisées dans des billes de gel pour produire une culture mixte composée d'une souche compétitive de bactéries lactiques (*L. diacetylactis*) et d'une souche probiotique non compétitive (*B. longum*).

Pour cela, des fermentations batch et continues ont tout d'abord été réalisées avec une culture pure de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 libre ou immobilisée dans des billes de gel. Lors de la production continue de *B. longum* à l'aide de cellules immobilisées à pH (5,5) et température (37°C) constants, les concentrations cellulaires maximales dans l'effluent ont été obtenues pour un taux de dilution de 0.5 h<sup>-1</sup>. Cependant, la productivité volumique maximale a été obtenue pour le taux de dilution le plus élevé (D=2.0 h<sup>-1</sup>) et fut approximativement 9,5 fois plus élevée que par fermentation batch avec cellules libres. Ainsi, cette première étape a démontré que la technologie des cellules immobilisées peut être utilisée pour produire en continu une culture pure de bifidobactéries avec une productivité volumique élevée ainsi que de hautes concentrations cellulaires dans l'effluent de la fermentation continue même à des taux de dilution supérieurs au taux de croissance spécifique des bactéries.

Afin d'étudier les phénomènes microbiens complexes qui se déroulent dans les billes de gel lors de la production de cultures mixtes à l'aide de cellules immobilisées, une méthode utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques et la microscopie confocale a été développée par la suite pour détecter et quantifier spécifiquement les deux souches de la culture mixte modèle étudiée (*L. diacetylactis* MD et *B. longum* ATCC 15707) dans des billes de gel. La

croissance bactérienne lors de fermentations batch successives avec des cultures pures et mixtes des deux souches a ainsi été observée préférentiellement dans des couches périphériques des billes de 200 et 300  $\mu\text{m}$  pour *L. diacetylactis* and *B. longum*, là où les conditions de croissance sont les plus favorables. De plus, ces fermentations batch successives ont permis, par le choix de conditions de fermentations (température, milieu de culture) favorables pour la croissance des bifidobactéries, la production d'une culture lactique mixte contenant une souche peu compétitive (*B. longum*).

La production de cette culture mixte sur une période de 17 jours a été ensuite étudiée avec un système de fermentation continue composé d'un premier réacteur (R1) contenant des cellules des deux souches immobilisées séparément dans des billes de gel et d'un second réacteur (R2) opéré avec les cellules libres relarguées de R1. Une culture mixte concentrée a été produite avec un rapport de souches stable (22:1 *L. diacetylactis* / *B. longum*) à 35°C dans l'effluent de R2, mais cette culture est rapidement débalancée en faveur de *B. longum* à 37°C ou de *L. diacetylactis* à 32°C.

Lors de cette même expérience, une redistribution des souches dans les billes immobilisant à l'origine une culture pure, appelée phénomène de contamination croisée et observée dans des travaux précédents par dénombrement sur géloses sélectives, a été observée en microscopie confocale. Cette contamination des billes par les cellules libres du milieu de culture environnant a été limitée à une couche périphérique des billes d'approximativement 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. À la fin de la fermentation, le rapport cellulaire (7:1 *L. diacetylactis* / *B. longum*) dans l'effluent de R1 était identique à celui de billes individuelles, indépendamment de la souche immobilisée à l'origine dans les billes testées. Le fait que ce rapport cellulaire ait été identique dans les deux types de billes indique que presque toutes les cellules viables se situaient dans la couche périphérique des billes et que le centre des billes contenait principalement des cellules mortes à la fin de la fermentation.

Enfin, nous avons voulu étudier l'effet de la technologie de production de biomasse sur la tolérance des deux souches à différents stress technologiques et probiotiques que celles-ci peuvent subir durant la production, l'entreposage et leur consommation. Ainsi des cellules produites lors de fermentation en batch conventionnelles en cellules libres et lors d'une fermentation continue avec cellules immobilisées ont été comparées sur la base de leur tolérance à la lyophilisation, au peroxyde d'hydrogène, aux conditions gastro-intestinales simulées, aux antibiotiques et à la nisine. En général, la survie des cellules produites dans l'effluent de la fermentation continue avec cellules immobilisées aux différents tests a augmenté avec le temps de fermentation et était plus élevée après 3-6 jours de culture que celle de cellules libres conventionnelles. Cependant, lors de fermentations 'batch' successives inoculées avec des cellules prélevées dans l'effluent de la fermentation continue avec cellules immobilisées, la tolérance de *B. longum* acquise à plusieurs antibiotiques fut réversible, à l'inverse de *L. diacetylactis*.

Ces résultats, couplés aux productivités élevées, démontrent le potentiel de la technologie des cellules immobilisées pour élaborer des produits industriels contenant des probiotiques et des bactéries lactiques avec des caractéristiques améliorées et potentiellement bénéfiques pour la santé humaine. Néanmoins, une attention particulière devrait être portée sur la possible réversibilité de ces caractéristiques lors de l'incorporation ou de la croissance de ces cellules dans les produits laitiers. Ainsi, même si ce travail a mis en évidence des changements physiologiques majeurs des bactéries lactiques lors de fermentations en continu avec cellules immobilisées, l'utilisation de ces phénomènes pour des applications précises passera par une meilleure compréhension des causes ayant mené à ces observations et par une caractérisation plus poussée des cellules ainsi produites. Les conditions opérationnelles de fermentation (température, pH, temps de fermentation), la composition du milieu de culture, les souches cultivées, leur concentration et leurs interactions en culture mixte constituent autant de paramètres dont l'influence sur les modifications physiologiques des cellules immobilisées devra être comprise. Dans l'optique d'une

utilisation industrielle, Il faudra alors effectuer les modifications adéquates en aval de la fermentation et principalement lors de la fabrication de produits laitiers fermentés contenant ces cellules aux caractéristiques physiologiques différentes de cellules libres produites de manière traditionnelle.

Ainsi il serait important d'étudier la production à l'aide de cellules immobilisées d'une culture mixte plus complexe que la culture modèle utilisée lors de ce travail, avec un intérêt industriel. Un milieu de culture plus économique et potentiellement moins favorable pour la croissance autant de bactéries lactiques que de bifidobactéries, comme par exemple les milieux à base de perméat de lactosérum, devrait remplacer le milieu à base de MRS. Enfin, une application industrielle de la technologie des cellules immobilisées pour la production de biomasse passe par une méthode de fabrication de billes de gel à grande échelle ou par l'utilisation de supports solides acceptés dans le domaine alimentaire.

## Bibliographie

Arnaud JP, Lacroix C (1991) Diffusion of lactose in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel with or without entrapped growing lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **38**:1041-1049.

Arnaud JP, Lacroix C, Castaigne F (1992) Counterdiffusion of lactose and lactic acid in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped lactic acid bacteria. *Enz. Microbiol. Technol.* **14**:715-724.

Arnaud JP, Lacroix C, Choplin L (1989) Rheological behavior of  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum mixed gels. *J. Texture Stud.* **19**:419-430.

Arnaud JP, Lacroix C, Choplin L (1992) Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Biotechnol. Tech.* **6**:265-270.

Arnaud JP, Lacroix C, Fousereau C, Choplin L (1993) Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Biotechnol.* **29**:157-175.

Artignan JM, Corrieu G, Lacroix C (1997) Rheology of pure and mixed kappa-carrageenan gels in lactic-acid fermentation conditions. *J. Texture Stud.* **28**:47-70.

Audet P, Lacroix C (1989) Two-phase dispersion process for the production of biopolymer gel beads: effect of various parameters on bead size and their distribution. *Process Biochem.* **24**:217-226.

Audet P, Lacroix C, Paquin C (1991) Continuous fermentation of a supplemented whey permeate medium with immobilized *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Int. Dairy J.* **2**:1-15.

Audet P, Paquin C, Lacroix C (1988) Immobilized growing lactic acid bacteria with  $\kappa$ -carrageenan-locust bean gum gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:11-18.

- Audet P, St-Gelais D, Roy D (1995) Production of mixed cultures of non-isogenic *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* using immobilized cells. *Milchwissen.* **50**:18-22.
- Baron M, Roy D, Vuillemard JC (2000) Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait.* **80**:465-478.
- Benech RO, Kheadr EE, Laridi R, Lacroix C, Fliss I (2002) Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or *in situ* production by mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3683-3690.
- Bergmaier D (2002) Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. *Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.*
- Berrada N, Lemeland JF, Laroche G, Thouvenot P, Piaia M (1991) *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* **74**:409-413.
- Bibal B, Vayssier Y, Goma G, Pareilleux A (1991) High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:746-754.
- Blanc P, Goma G (1989) Propionic acid and biomass production using continuous ultrafiltration fermentation of whey. *Biotechnol. Lett.* **11**:189-194.
- Blanchette L, Roy D, Bélanger G, Gauthier S (1996) Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* **79**:8-15.
- Blonk JCG, van Aalst H (1993) Confocal scanning light microscopy in food research. *Food Res. Int.* **26**:297-311.
- Bouksaim M, Lacroix C, Audet P, Simard RE (2000) Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **59**:141-156.



Brock TD, Madigan MT (1991) Immunology and immunity. Dans: *Biology of microorganisms*. 6ème édition. Brock TD, Madigan MT (ed). Prentice Hall, Englewood Cliffs, 426-468.

Cachon R, Antérieux P, Diviès C (1998) The comparative behaviour of *Lactococcus lactis* in free and immobilized culture processes. *J. Biotechnol.* **63**:211-218.

Cachon R, Diviès C (1993) Localization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* in alginate gel beads affects biomass density and synthesis of several enzymes involved in lactose and citrate metabolism. *Biotechnol. Tech.* **7**:453-456.

Camelin I, Lacroix C, Paquin C, Prévost H, Cachon R, Diviès C (1993) Effect of chelating agents on gellan gel rheological properties and setting temperature for immobilization of living bifidobacteria. *Biotechnol. Prog.* **9**:291-297.

Champagne CP (1998) *Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière*. La Fondation des Gouverneurs et Edisem (ed), Sainte-Hyacinthe, Canada.

Champagne CP, Gaudy C, Poncelet D, Neufeld RJ (1992) *Lactococcus lactis* release from alginate beads. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1429-1434.

Champagne CP, Girard F, Rodrigue N (1993) Production of concentrated suspensions of thermophilic lactic acid bacteria in calcium alginate beads. *Int. Dairy J.* **3**:257-275.

Champagne CP, Lacroix C, Sodini-Gallot I (1994) Immobilized cell technology for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**:109-134.

Chandan RC (1999) Enhancing market value of milk by adding cultures. *J. Dairy Sci.* **82**: 2245-2256.

Cogan TM (1980) Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait.* **60**:397-425.

Corre C, Madec MN, Boyaval P (1992) Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **53**:189-194.

Curk MC, Boeufgras JM, Decaris B, Gavini F, Kersters K, Larpent P, Le Bourgeois P, Renault P, de Roissart H, Rouvier C (1994) Méthodes d'identification des bactéries lactiques. Dans: *Bactéries lactiques*. Vol 1. De Roissart H et Luguët FM (ed). Loriga:Uriage, 141-168.

Curtain, C (1986) Understanding and avoiding ethanol inhibition. *Trends Biotechnol.* **4**:110.

Daigle A, Roy D, Bélanger G, Vuilleumard JC (1999) Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *J. Dairy Sci.* **82**:1081-1091.

D'Angio C, Béal C, Boquien CY, Corrieu G (1994) Influence of dilution rate and cell immobilization on plasmid stability during continuous cultures of recombinant strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Biotechnol.* **34**:87-91.

Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC, Janssens D (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. Vol 1. De Roissard H et Luquet FM (ed.). Loriga: Uriage. 25-116.

Desjardins ML, Roy D, Goulet J (1991)  $\beta$ -galactosidase and proteolytic activities of bifidobacteria in milk : A preliminary study. *Milchwissen.* **46**:11-13.

Desjardins ML, Roy D, Toupin C, Goulet J (1990) Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* ssp. *J. Dairy Sci.* **73**:1478-1484.

Desmond C, Stanton C, Fitzgerald GF, Collins K, Ross RP (2002) Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *Int. Dairy J.* **12**:183-190.

Diefenbach R, Keweloh H, Rehm HJ (1992) Fatty acids impurities in alginate influence the phenol tolerance of immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:530-534.

Doleyres Y, Fliss I, Lacroix C (2002a) Quantitative determination of the spatial distribution of pure- and mixed-strain immobilized cells in gel beads by immunofluorescence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:297-302.

Doleyres Y, Paquin C, Leroy M, Lacroix C (2002b) *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**:168-173.

Dunne WM (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:155-66.

Elo S, Saxelin M, Salminen S (1991) Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: Comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**:154-156.

Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Pesce de Ruiz Holgado AA, Oliver G (1985a) Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1339-1341.

Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Pesce de Ruiz Holgado AA, Oliver G (1985b) Effect of rehydration temperature on the survival of freeze-dried lactic acid bacteria. *Milchwissen.* **40**:147-148.

Fortin C, Vuilleumard J (1989) Effect of immobilization in calcium alginate beads on regulation of protease production by *Myxococcus xanthus* cells. Dans: *Physiology of immobilized cells*. De Bont JAM, Visser J, Mattiasson B, Tramper J (ed). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Pays-Bas.

Gätje G, Gottschalk G (1991) Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**:446-449.

Gilliland SE (1985a) Concentrated starter culture. Dans *Bacterial starter cultures for food*. Gilliland SE (ed). CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 145-157.

- Gilliland SE (1985b) Role of starter culture bacteria in food preservation. Dans *Bacterial starter cultures for food*. Gilliland SE (ed). CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 175-185.
- Gilliland SE, Rich CN (1990) Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH. *J. Dairy Sci.* **73**:1187-1192.
- Gobbetti M, Corsetti A, Smacchi E, Zocchetti A, de Angelis M (1998) Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* **81**:37-47.
- Gobbetti M, Rossi J (1993) Continuous fermentation with free-growing and immobilized multistarters to get a kefir production pattern. *Microbiol. Alim. Nutr.* **11**:119-127.
- Gonçalves LMD, Barreto MTO, Xavier AMBR, Carrondo MJT, Klein J (1992) Inert supports for lactic acid fermentation - a technological assessment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:305-311.
- Gournier-Chateau N, Larpent JP, Castellanos MI, Larpent JL (1994) Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier, Technique et Documentation (ed). Paris, France, 1-192.
- Groboillot A, Boadi DK, Poncelet D, Neufeld RJ (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**:75-107.
- Hansen M, Kragelund L, Nybroe O, Sorensen J (1997) Early colonization of barely roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:353-360.
- Hartke A, Bouché S, Gansel X, Boutibonnes P, Auffray Y (1994) Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3474-3478.
- Hartke A, Bouché S, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P (1996) The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **33**:194-199.

- Heipieper HJ, Keweloh H, Rehm HJ (1991) Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1213-1217.
- Hekmat S, McMahon DJ (1992) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *J. Dairy Sci.* **75**:1415-1422.
- Heller KJ (2001) Probiotic bacteria in fermented foods : Product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:374-379.
- Holberg I, Margalith P (1981) Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentration. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **13**:133-140.
- Holcomb JE, Frank JF, McGregor JU (1991) Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in soft-serve frozen yogurt. *Cult. Dairy Prod. J.* **26**:4-5.
- Huang J, Lacroix C, Daba H, Simard R (1996) Pediocin 5 production and plasmid stability during continuous free and immobilized cell cultures of *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* **80**:635-644.
- Hughenoltz J, Veldkamp H (1985) Competition between different strains of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:57-62.
- Hughenoltz J, Veldkamp H, Konings WN (1987) Detection of specific strains and variants of *Streptococcus cremoris* in mixed cultures by immunofluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:149-155.
- Hunik JH, van den Hoogen MP, de Boer W, Smit M, Tramper J (1993) Quantitative determination of the spatial distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells immobilized in  $\kappa$ -carrageenan gel beads by a specific fluorescent-antibody labelling technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1951-1954.
- Ibrahim SA, Bezkorovainy A (1994) Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *J. Food Sci.* **59**:189-191.

- Ishibashi N, Shimamura S (1993) Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technol.* **47**:126-135.
- Ishiko A, Shimizu H, Masunaga T, Kurihara Y, Nishikawa T (1998) Detection of antigens by immunofluorescence on ultrathin cryosections of skin. *J. Histochem. Cytochem.* **46**:1455-1460.
- Janeway CA, Travers P (1996) Immunobiology: The immune system in health and disease. 2ème édition. Current Biology Ltd, Londres, et Garland Publishing Inc., New York.
- Johnson ID (1996) Introduction to fluorescence techniques. Dans: *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6ème édition. Haugland RP, Spence MTZ (ed). Molecular Probes, Eugene, 1-6.
- Jouenne T, Tresse O, Junter G (1994) Agar entrapped bacteria as an *in vitro* model of biofilms and their susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**:237-242.
- Karel SF, Libicki B, Robertson CR (1985) The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem. Eng. Sci.* **40**:1321-1354.
- Keweloh H, Heipieper HJ, Rehm HJ (1989) Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:383-389.
- Kiy T, Tiedtke A (1993) Effects of immobilization on growth, morphology, and DNA content of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**:117-122.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-86.
- Kolter R (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:855-874.

- Krisch J, Szajani B (1997) Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. *Biotechnol. Lett.* **19**:525-528.
- Krishnan S, Gowda LR, Misra MC, Karanth NG (2001) Physiological and morphological changes in immobilized *L. plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnol.* **15**:193-202.
- Laan H, Smid EJ, de Leij L, Schwander E, Konings WN (1988) Monoclonal antibodies to the cell-wall-associated proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2250-2256.
- Lacroix C, Paquin C, Arnaud JP (1990) Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. Optimization of the rheological properties of the entrapment gel matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:403-408.
- Lacroix C, Sodini I, Corrieu G (1996) Microbiological stability of an immobilized cell bioreactor with mixed lactic acid bacteria during continuous fermentation of milk. Dans *Immobilized cells : basic and applications*. Wijffels R (ed). Elsevier Science, Londres, 600-607.
- Lamboley L (1998) Étude de la production continue de levains lactiques mésophiles mixtes dans le perméat de lactosérum par la technologie des cellules immobilisées. *Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada*.
- Lamboley L, Lacroix C, Artignan JM, Champagne CP, Vuilleumard JC (1999) Long-term mechanical and biological stability of an immobilized cell reactor for continuous mixed-strain mesophilic lactic starter production in whey permeate. *Biotechnol. Prog.* **15**:646-654.
- Lamboley L, Lacroix C, Champagne CP, Vuilleumard JC (1997) Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. *Biotechnol. Bioeng.* **56**:502-516.

Lamboley L, Lacroix C, Sodini I, Lemay MJ, Champagne CP (2001) Effect of inoculum composition and low KCl supplementation on the biological and rheological stability of an immobilized-cell system for mixed mesophilic lactic starter production. *Biotechnol. Prog.* **17**:1071-1078.

Lankaputhra WEV, Shah NP (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* **30**:2-7.

Lankaputhra WEV, Shah NP, Britz ML (1996) Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissen.* **51**:65-70.

Lee KY, Heo TR (2000) Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:869-873.

Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* **147**:747-748.

Macedo MG, Champagne CP, Vuilleumard JC, Lacroix C (1999) Establishment of bacteriophages in an immobilized cells system used for continuous inoculation of lactococci. *Int. Dairy J.* **9**:437-445.

de Man JC, Rogosa M, Sharpe E (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**:130-135.

Masson F, Lacroix C, Paquin C (1994) Direct measurement of pH profiles in gel beads immobilizing *Lactobacillus helveticus* using a pH sensitive microelectrode. *Biotechnol. Tech.* **8**:551-556.

Mattila-Sandholm T, Myllarinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fonden R, Saarela M (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* **12**:173-182.

Modler HW, McKellar RC, Yaguchi M (1990) Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23**:29-41.



- Monbouquette HG, Sayles GD, Ollis DF (1990) Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behavior: Model and experiment. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:609-629.
- Morin N, Bernier-Cardou M, Champagne CP (1992) Production of concentrated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suspensions in calcium alginate beads. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:545-550.
- Musale DA, Kulkarni SS (1998) Effect of whey composition on ultrafiltration performance. *J. Agric Food Chem.* **46**:4717-4722.
- Mutharia LM, Hancock REW (1983) Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **42**:1027-1033.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1991) Antimicrobial susceptibility testing, 3ème édition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Norton S, Lacroix C, Vuilleumard JC (1994) Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enz. Microbiol. Technol.* **16**:457-465.
- Ouellette V, Chevalier P, Lacroix C (1994) Continuous fermentation of a supplemented milk with immobilized *Bifidobacterium infantis*. *Biotechnol. Tech.* **8**:45-50.
- Ouwehand AC, Salminen SJ (1998) The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* **8**:749-758.
- Paquin C, LeRoy M, Lacroix C (1990) *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 production using free and immobilized cell fermentations in a whey permeate based medium. *Proceedings of the 23<sup>rd</sup> International Dairy Federation*, International Dairy Federation: Brussels, Belgium; p 321.

- Para MF, Plouffe JF (1983) Production of monoclonal antibodies to *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 6. *J. Clin. Microbiol.* **18**:895-900.
- Piard JC, Desmazeaud MJ (1991) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolism end products. *Lait.* **71**:525-541.
- Piard JC, Desmazeaud MJ (1992) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**:113-142.
- Prévost H, Diviès C (1987) Fresh fermented cheese production with continuous pre-fermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic *Streptococci* entrapped in Ca-alginate. *Biotechnol. Lett.* **9**:789-794.
- Prévost H, Diviès C (1988) Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria I. Development of the process. *Milchwissen.* **43**:621-625.
- Prévost H, Diviès C, Rousseau E (1985) Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca-alginate. *Biotechnol. Lett.* **7**:247-252.
- Prigent C, Corre C, Boyaval P (1988) Production of concentrated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. *J. Dairy Res.* **55**:569-577.
- Prioult G, Lacroix C, Turcotte C, Fliss I (2000) Simultaneous immunofluorescent detection of co-entrapped cells in gel beads. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2216-2219.
- Rallu F, Gruss A, Maguin E (1996) *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**:243-251.
- Rao AV, Shiwnarain N, Maharaj I (1989) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **22**:345-349.

- Reilly SS, Gilliland SE (1999) *Bifidobacterium longum* survival during frozen and refrigerated storage as related to pH during growth. *J. Food Sci.* **64**:714-718.
- Rosenthal I, Bernstein S (1998) The survival of a commercial culture of bifidobacteria in milk products. *Milchwissen.* **53**:441-443.
- Salminen S, Ouwehand AC, Benno Y, Lee YK (1999) Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* **10**:107-110.
- Salminen S, Saxelin M (1996) Comparison of successful probiotic strains. *Nutr. Tod. Sup.* **31**:32- 34.
- Saloff-Coste CJ (1997) Bifidobactéries. *Danone World Newsl.* Danone, Le Plessis-Robinson, France, 16.
- Sayles GD, Ollis DF (1990) Product inhibition influence on immobilized cell biocatalyst performance. *Biotechnol. Prog.* **6**:153-158.
- Scardovi V (1986) Genus *Bifidobacterium*. Dans *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9ème édition. Vol 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (ed). Williams and Wilkins. Publ. Baltimore:1418-1434.
- Schaafsma G (1996) State of the art concerning probiotic strains in milk products. *Int. Dairy Fed. Nutr. Newsl.* **5**:23-24.
- Shah NP (1997) Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissen.* **52**:16-21.
- Shapiro JA, Dworkin M (1997) Bacteria as multicellular organisms. Oxford University Press, New York.
- Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M (1992) Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* **75**:3296-3306.

Shoesmith JG, Worsley BW (1984) Anaerobes and exposure to oxygen. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **12**:127.

Smart JB, Pillidge CJ, Garman JH (1993) Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of  $\beta$ -galactosidase and phospho- $\beta$ -galactosidase. *J. Dairy Res.* **60**:557-568.

Sodini I, Boquien CY, Corrieu G, Lacroix C (1997) Use of an immobilized cell bioreactor for the continuous inoculation of milk in fresh cheese manufacturing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**:56-61.

Sodini-Gallot I, Corrieu G, Boquien CY, Latrille E, Lacroix C (1995) Process performance of continuous inoculation and acidification of milk with immobilized lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **75**:1407-1420.

Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins K, Fitzgerald G, Ross RP (1998) Probiotic cheese. *Int. Dairy J.* **8**:491-496.

Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, Ross RP (2001) Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:476-483.

Tamime AY, Marshall VME, Robinson RK (1995) Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* **62**:151-187.

Taniguchi M, Kotani N, Kobayashi T (1987a) High-concentration cultivation of *Bifidobacterium longum* in fermenter with cross-flow filtration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**:438-441.

Taniguchi M, Kotani N, Kobayashi T (1987b) High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermenter with cross-flow filtration. *J. Ferment. Technol.* **65**:179-184.

Tannock GW (1997) Probiotic properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental R&D. *Trends Biotechnol.* **15**:270-274.

- Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2578-88.
- Teixeira de Mattos MJ, de Boer JP, Zoutberg GR, Neijssel OM (1994) Metabolic shift analysis at high cell densities. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:21-28.
- Tissier H (1900) Recherches sur la flore intestinale (état normal et pathologique) des nourissons. *Thèse de doctorat, Université de médecine, Paris, France.*
- Trauth E, Lemaitre JP, Rojas C, Diviès C, Cachon R (2001) Resistance of immobilized lactic acid bacteria to the inhibitory effect of quaternary ammonium sanitizers. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **34**:239-243.
- Turtell A, Delves-Broughton J (1998) International acceptance of nisin as a food preservative. *Int. Dairy Fed. Bull.* **329**:20-23.
- Veena MS, van Vuurde JW (2002) Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *J. Microbiol. Meth.* **49**:11-17.
- Vinderola CG, Mocchiutti P, Reinheimer JA (2002) Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* **85**:721-729.
- Vodovotz Y, Vittadini E, Coupland J, McClements DJ, Chinachoti P (1996) Bridging the gap : Use of confocal microscopy in food research. *Food Technol.* **50**:74-82.
- Wijffels RH, De Gooijer CD, Kortekass S, Tamper JH (1991) Growth and substrate consumption of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: Part 2. Model evaluation. *Biotechnol. Bioeng.* **38**:232-240.
- Wolf CE, Gibbons WR (1996) Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J. Appl. Bacteriol.* **80**:453-457.

Yabannavar VM, Wang DIC (1991) Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:544-550.

