

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Maria-Guadalupe MACEDO-ESPINOSA

**ÉTUDE DE LA PRODUCTION D'EXOPOLYSACCHARIDES PAR
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS RW-9595M DANS UN MILIEU À BASE DE
PERMÉAT DE LACTOSÉRUM**

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

Département de sciences des aliments et de nutrition
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

Octobre 2001

© Maria-Guadalupe Macedo-Espinosa, 2001



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-66324-8

Canada

*No estudio por saber más,
sino para ignorar menos*

Sor Juana Inés de la Cruz,
Ciudad de México, 1648-1695

RÉSUMÉ COURT

L'effet de la composition du milieu de culture et de la température a été étudié afin d'optimiser la production d'exopolysaccharides (EPS) par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M dans un milieu à base de perméat de lactosérum (PLS). Dans un premier temps, la température, la supplémentation en azote (Yeast Nitrogen Base, YNB) et en carbone ont été étudiés en interactions à l'aide d'un plan central composite. Les résultats ont montré que la production d'EPS varie entre 125 et 477 mg l⁻¹, et qu'elle peut être ou non associée à la croissance cellulaire, ce qui dépend des conditions de culture. Les meilleures productions ont été obtenues pour de fortes concentrations en PLS (8.4 % p/p) et à une température de 42°C, proche de la température optimale de croissance. Cependant les fortes concentrations en lactose résiduel et les faibles productions d'acide lactique laisse supposer que le milieu à base de PLS ne contient pas tous les nutriments nécessaires à la croissance cellulaire et à la production d'EPS. Pour cette raison, dans une première partie, la performance de 8 sources d'azote a été testée sur la croissance de *L. rhamnosus* RW-9595M. Dans une deuxième partie, les trois plus performantes sources azotées ont été choisies afin de vérifier leur effet sur la production d'EPS dans des fermentations en batch dans le PLS. Aucune de ces sources n'a montré un effet positif sur cette production. Enfin, pour identifier le ou les nutriments qui favorisent la production d'EPS, des fermentations avec contrôle de pH (6.0) ont été réalisées dans différents milieux de PLS supplémenté avec les composants, par groupe, du milieu défini BMM (acides aminés, AA; sels, S; et vitamines, V), selon un plan factoriel. De plus un extrait de levure ultrafiltré (EL-UF) a été ajouté afin d'assurer les besoins en azote de *L. rhamnosus* RW-9595M et en évitant l'interférence possible d'autres polysaccharides dans le dosage de l'EPS produit par la culture. Les résultats suggèrent que le facteur S favorise la production d'EPS, mais l'interaction S*AA en présence de l'EL-UF augmente de façon très importante cette production et la croissance cellulaire (2780 mg EPS l⁻¹ et 1.1 x 10¹⁰ cfu ml⁻¹). Par contre, les vitamines seules ou en combinaison ainsi que les acides aminés ou l'EL-UF individuellement n'exercent aucun effet positif ni sur la production d'EPS ni sur celle de biomasse. Une méthode de quantification rapide par le proche infrarouge (NIR) a été développée pour le dosage simultané d'EPS, de l'acide lactique et du lactose au cours des fermentations. D'excellentes corrélations ont été trouvées entre la méthode NIR et les méthodes conventionnelles. Ce travail a mis en évidence le forte potentiel de la souche pour produire d'EPS puisque la production d'EPS obtenue avec cette souche dans la présente étude est de loin la plus élevée rapportée dans la littérature pour un lactobacilles.

RÉSUMÉ LONG

Les objectifs de ce travail ont été de trouver les conditions optimales de la fermentation en batch à pH contrôlé (pH 6.0) pour la production d'exopolysaccharides (EPS) par *L. rhamnosus* RW-9595M dans un milieu à base de perméat de lactosérum (PLS), en variant certains paramètres de fermentation (température et composition du milieu de culture). Dans un premier temps, un plan central composite (CCD) a été élaboré pour étudier les effets principaux et les interactions de la température (22°C à 42°C), de la concentration de la source d'azote (Yeast Nitrogen Base, YNB, 0 à 2% p/v) et de la concentration de perméat de lactosérum (PLS, 1.6% à 8.4% p/p). Avec un tel plan d'expérience, un modèle polynomial du 2^{ème} ordre a été établi pour élucider les effets des facteurs précédents sur la production d'EPS et la croissance cellulaire. Les résultats ont révélé que la production maximale d'EPS au cours des fermentations varie entre 125 et 477 mg l⁻¹ et est fonction des conditions de fermentation. La production d'EPS n'est pas associée à la croissance cellulaire à des températures de fermentation proches de la température optimale de croissance (37°C) et en présence de fortes concentrations en PLS (7-8.4% p/p). Par contre, à une température sub-optimale de croissance, cette production a eu lieu essentiellement pendant la phase exponentielle de croissance. Enfin la supplémentation avec le YNB n'a pas augmenté la croissance cellulaire mais elle a favorisé la production d'EPS en présence de fortes concentrations en PLS. De plus, une forte concentration en lactose résiduel et une faible production d'acide lactique au cours des fermentations ont suggéré une inhibition de la croissance cellulaire à cause d'une déficience en nutriments dans le milieu de culture, tels que les nutriments azotés, les minéraux ou les vitamines.

Afin de corroborer cette hypothèse, l'effet de 8 sources azotées dont des acides aminés, de l'extrait de levure (EL), du bactocasitone, des concentrés et des isolats de protéines du lactosérum (WPC et WPI, respectivement) a été testé sur la croissance de *L. rhamnosus* RW-9595M. Des tests d'acidification et une micro-méthode spectrophotométrique ont servi à comparer la performance des sources d'azote. L'EL, le WPI à l'alcalase ainsi qu'un des WPC ont eu le effet le plus important sur la croissance de *L. rhamnosus* RW-9595M. Des fermentations en batch à pH 6.0 ont été réalisées en duplicata dans un milieu à base de PLS supplémenté à une concentration de 1.0% (p/v) avec les trois sources d'azote sélectionnées, afin de mesurer l'effet de ces composés sur la production d'EPS. De plus, une fermentation contrôlée sans source d'azote ajoutée a été aussi réalisée. L'effet des trois sources d'azote testées sur la biomasse est faible, avec des populations maximales de 5×10^8 cfu ml⁻¹, en moyenne, comparées à 3.2×10^8 cfu ml⁻¹ dans le PLS sans source d'azote. Enfin, la production d'EPS a varié entre 92 et 166 mg l⁻¹, soit une production plus faible que celle obtenue dans le PLS supplémenté avec YNB. Ces résultats démontrent que les sources d'azote testées n'ont pas eu d'impact positif sur la production d'EPS, ce qui pourrait indiquer l'effet limitant d'un ou plusieurs micro-éléments dans le milieu.

La troisième étape a donc visé à identifier les composés stimulant de production d'EPS dans le milieu à base de PLS. Pour ce faire, des fermentations avec contrôle de pH (pH 6.0) ont été réalisées dans différents milieux à base de PLS, selon un plan factoriel. Le

PLS a été supplémenté avec les composants, par groupe, du milieu BMM (acides aminés, AA; sels, S; et vitamines, V), afin de trouver le ou les nutriments qui favorisent la production d'EPS. De plus le PLS a été supplémenté avec un extrait de levure ultrafiltré (EL-UF), afin d'assurer d'une part que les besoins en azote de *L. rhamnosus* RW-9595M seraient comblés et d'autre part que l'EL ne contienne pas de polysaccharides qui peuvent interférer avec le dosage des EPS produits par la culture. Nous avons aussi réalisé des fermentations « contrôle » dans le milieu BMM et dans le PLS supplémenté avec l'ensemble des différents composants du BMM (AA, S et V), en absence d'EL-UF. Nos résultats suggèrent que le facteur sels favorise la production d'EPS, mais l'interaction entre les sels et les acides aminés (S*AA) en présence d'EL-UF augmente de façon très importante cette production et la biomasse maximale (2780 mg EPS l⁻¹ et 1.1x10¹⁰ cfu ml⁻¹). Par contre, les vitamines seules ou en combinaison ainsi que les acides aminés ou l'EL-UF individuellement n'exercent aucun effet positif ni sur la production d'EPS ni sur celle de biomasse. Une méthode de quantification rapide par le proche infrarouge (NIR) a été développée pour le dosage simultané d'EPS, de l'acide lactique (AL) et du lactose (L) au cours des fermentations. D'excellentes corrélations ont été trouvées entre la méthode NIR et les méthodes conventionnelles avec les coefficients de corrélation (R²) et les erreurs de prédiction (SEP) suivants: 99 % et 1.64 g l⁻¹ pour L, 99 % et 4.5 g l⁻¹ pour AL et 91 % et 0.32 g l⁻¹ pour EPS. Ces résultats indiquent le grand potentiel de la méthode NIR pour doser de façon rapide et simultanée des métabolites issus des procédés de fermentation. Nos résultats confirment que *L. rhamnosus* RW-9595M est une souche avec un très haut potentiel pour la production d'EPS puisque la production d'EPS obtenue avec cette souche dans la présente étude est de loin la plus élevée rapportée dans la littérature pour un lactobacilles.

A mis queridos hermanos : Jose Humberto e Isabel,
fuentes inagotables de imaginación, motivación y amor.

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Christophe Lacroix, pour sa patience, son esprit critique, sa disponibilité et le support financier.

Je souhaite également remercier mon co-directeur de recherche, le Dr. Claude P. Champagne, pour sa disponibilité, son engagement dans le projet et ses suggestions toujours pertinentes.

Ma reconnaissance et gratitude à Nancy Gardner pour sa précieuse participation dans la dernière partie de ce projet de recherche.

Je remercie le Ministère de la coopération internationale du gouvernement du Québec, en les personnes de M. Robert Rousseau et Mme Ginette Angers pour le soutien économique, mais surtout pour m'avoir accordé le statut de personne et non de numéro de compte.

Je remercie les membres du Centre STELA pour leur disponibilité, leur bonne volonté envers moi et ce projet. Je tiens à remercier particulièrement Marie-France Laporte, d'avoir partagé avec moi une passion : l'infrarouge; Dirk Bergmaier pour son soutien technique et sa disponibilité; Gabriel Remondetto et Aurelio Dominguez (membre du département d'ALN) de m'avoir appris plus que la statistique et pour les bons moments.

Enfin, la réalisation d'un doctorat est beaucoup plus qu'un projet de recherche, c'est élargir ses horizons. Alors je tiens à remercier du fond du cœur toutes ces personnes que j'ai rencontrées au cours de mon séjour au Québec. Elles m'ont apprises à appréhender les choses d'une autre façon et ont fait de moi une meilleure personne.

Merci à tous

TABLE DES MATIÈRES

Résumé court.....	III
Résumé long.....	IV
Avant-Propos.....	VII
Table des matières.....	VIII
Liste des tableaux.....	XV
Liste des figures.....	XVI
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Chapitre I REVUE DE LITTÉRATURE	3
1 LES EXOPOLYSACCHARIDES.....	4
1.1 La fonction des EPS dans la cellule.....	4
1.2. L'utilisation industrielle des EPS	6
1.2.1 (1 → 3)- β -D-glucanes.....	6
1.2.2. Pullulane (α -D-glucane).....	7
1.2.3 Gellane.....	7
1.2.4 Xanthane.....	7
1.3 Les exopolysaccharides des bactéries lactiques	9
1.3.1 Les hétéropolysaccharides des BL.....	10
1.3.1.1 Composition et structure des EPS	12
1.3.1.2 Caractérisation rhéologique des EPS	15
1.3.1.3 Biosynthèse des EPS.....	17
1.3.1.3.1 Activation des sucres	18

1.3.1.3.2 Polymérisation des sucres	18
1.3.1.3.3 Polymérisation et exportation du polysaccharide	19
1.3.1.4 Génétique de la production des EPS chez les BL.....	21
1.3.1.4.1 L'instabilité du caractère épaississant.....	21
1.3.1.4.2 Organisation des gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse des EPS.....	22
1.3.1.5 Détection de la production d'EPS.....	25
1.3.1.6 Extraction et purification des EPS	26
1.3.1.7 Quantification des EPS	27
1.3.1.8 Éluclidation de la structure des EPS.....	31
1.3.1.9 Production d'EPS par les B L.....	32
1.3.1.9.1 Milieu de culture utilis. pour la production d'EPS.....	32
1.3.1.9.2 Effet de la composition de milieu sur la production d'EPS.....	34
1.3.1.10 Effet des conditions de culture sur la production d'EPS.....	36
1.3.1.11 Cinétique de production des EPS	38
1.3.1.12 Applications des EPS dans les aliments	40
1.3.1.12.1 Les yoghourts et les laits fermentés brassés.....	40
1.3.1.12.2 Les produits allégés en matière grasse	42
1.3.1.13 Le rôle bénéfique des EPS sur la santé	44
1.3.2 Conclusions	45

1.4 Spectroscopie proche infrarouge (NIRS).....	46
1.4.1 Bases théoriques.....	46
1.4.2 Le modèle chemométrique.....	48
1.4.3 L'utilisation du proche infrarouge.....	50
1.4.3.1 Analyses des aliments.....	50
1.4.3.2 Produits laitiers.....	51
1.4.3.3 Contrôle des procédés.....	52
1.4.3.4 Culture des cellules.....	53
1.4.3.5 Détermination de la biomasse.....	54
1.5 Hypothèses et objectifs de travail.....	55
1.5.1 Objectif général.....	55
1.5.2 Objectifs particuliers.....	55
Chapitre II Combined Effects of Temperature and Medium Composition on Exopolysaccharide Production by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M in a Whey Permeate Based Medium	56
2.1 Résumé.....	57
2.2 Summary	58
2.3 Introduction.....	59
2.4 Materials and Methods	60
2.4.1 Strain and culture preparation.....	60
2.4.2 Culture medium preparation.....	60

2.4.3 Culture conditions	61
2.4.4 Viable cell determination	61
2.4.5 Lactose and lactic acid concentration	61
2.4.6 EPS purification and quantification	62
2.4.7 Apparent viscosity	63
2.4.8 Experimental design	63
2.4.9 Statistical analyses	63
2.5 Results	64
2.5.1 Cell growth	64
2.5.2 EPS production	65
2.5.3 Lactose and lactic acid concentration	67
2.5.4 Apparent viscosity	67
2.6 Discussion	67
2.7 Conclusions	70
Chapitre III Screening of Nitrogen Sources for the Growth of an Exopolysaccharide-producing <i>Lactobacillus rhamnosus</i> in Whey Permeate	77
3.1 Résumé	78
3.2 Summary	79
3.3 Introduction	80
3.4 Materials and Methods	81

3.4.1 Bacterial strain and culture preparation.....	81
3.4.2 Acidifying activity test.....	81
3.4.3 Automated spectrophotometry test.....	82
3.4.4 pH-controlled batch cultures.....	83
3.4.5 Analyses.....	83
3.4.6 Experimental design and statistical analyses.....	83
3.5 Results and discussion.....	83
3.5.1 Nitrogen source concentration for acidifying activity and AS tests.....	83
3.5.2 Effect of nitrogen sources on acidifying activity.....	84
3.5.3 Effect of nitrogen sources on growth.....	85
3.5.4 Cultures in WP media.....	85
3.6 Conclusions.....	87
Chapitre IV Effect of Medium Supplementation on Exopolysaccharide Production by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M in Whey-Permeate.....	91
4.1 Résumé.....	92
4.2 Summary.....	93
4.3 Introduction.....	94
4.4 Materials and Methods.....	95
4.4.1 Bacterial strain and culture preparation.....	95
4.4.2 Media.....	95

4.4.3 Fermentations	97
4.4.4 Analysis.....	97
4.4.5 Experimental design and statistical analyses.....	98
4.5 Results.....	98
4.5.1 Effect of medium composition on populations.....	98
4.5.2 Production of EPS.....	98
4.5.3 Lactose and lactic acid.....	99
4.5.4 Relative viscosity.....	100
4.6 Discussion	100
4.7 Conclusions	104
Chapitre V Quantification of Exopolysaccharide, Lactic Acid and Lactose Concentrations in Culture Broth by NIR Spectroscopy.....	108
5.1 Résumé.....	109
5.2 Summary	110
5.3 Introduction.....	111
5.4 Materials and Methods	112
5.4.1 Samples.....	112
5.4.2 Reference analysis.....	113
5.4.3 NIR spectroscopy.....	113
5.4.4 Statistical analysis.....	113

5.5 Results	115
5.5.1 NIR spectra of EPS, lactic acid and lactose	115
5.5.2 NIR spectra of cultures samples	115
5.5.3 NIR determination of EPS, lactic acid and lactose	116
5.6 Discussion	117
5.7 Conclusions	120
CONCLUSION GÉNÉRALE	128
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

<i>Tableau 1.1</i>	Applications industrielles des exopolysaccharides microbiens.....	8
<i>Tableau 1.2</i>	Bactéries lactiques productrices d'EPS.....	11
<i>Tableau 1.3</i>	Composition et poids moléculaire des EPS produits par des LAB.....	13
<i>Tableau 1.4</i>	Production d'exopolysaccharides par les LAB dans différentes conditions..... de fermentation et différents milieux de culture.	29

Chapitre II

<i>Table 2.1</i>	Measured response for the dependent variables of the central composite design.....	71
<i>Table 2.2</i>	Analysis of variance for dependent variables of the central composite design.....	72

Chapitre III

<i>Table 3.1</i>	Effect of different nitrogen sources on growth and acidifying characteristics determined from the acidification and AS tests for <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M.....	88
<i>Table 3.2.</i>	Effect of growth medium on maximal population, EPS production and EPS specific yield during pH-controlled batch cultures with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M....	89

Chapitre IV

<i>Table 4.1</i>	Means of dependent variables measured during pH-controlled batch cultures of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M in different media.....	105
<i>Table 4.2</i>	Analysis of variance for dependent variables of the factorial design.....	106

Chapitre V

<i>Table 5.1</i>	Chemical composition of supernatant samples from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M cultures for NIR calibration.....	121
<i>Table 5.2</i>	Statistical descriptors for NIR calibration and validation for analyses of EPS, lactose and lactic acid concentrations in supernatant culture samples.....	122

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

- Figure 1.1* Observations en microscopie électronique de la souche *L. rhamnosus* RW-9595M avec un marquage à la ferritine du matériel extracellulaire.....12
- Figure 1.2* Classification des EPS en fonction de leur caractéristiques rhéologiques et organoleptiques.....16
- Figure 1.3* Les voies métaboliques impliquées dans le catabolisme du lactose et l'anabolisme des EPS chez *Lactococcus lactis* Gal⁺ (via les systèmes phosphoenolpyruvate PEP et phospho-transférase PTS) et chez *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* Gal⁻ (via lactose/galactose antiport).....20
- Figure 1.4* Organisation moléculaire des gènes impliqués dans la synthèse des EPS chez *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (chromosomique) et chez *Lactococcus lactis* NIZO B40 (plasmidique).....24
- Figure 1.5* Mise en évidence de la formation d'un réseau entre les exopolysaccharides, les cellules de *Lactobacillus* et les caséines par la technique de microscopie électronique à balayage, lors de la fabrication du yogourt commercial.....41
- Figure 1.6* Les différents facteurs agissant avec les EPS pour donner la texture aux yoghourts.....43

Chapitre II

- Figure 2.1* Cell growth (□), EPS production measured by the conventional (▲) and UF methods (■) and apparent viscosity (●) during pH-controlled batch fermentation for 6 repetitions of the central points (32 °C, 5 % WP and 1% YNB). Bars : standard errors of 6 repetitions.....73
- Figure 2.2* Response surface for the effects of whey permeate (WP) and yeast nitrogen base (YNB) concentrations on maximal viable cell counts during pH-controlled batch fermentations at 32°C.....74
- Figure 2.3* Maximal EPS productions during exponential (□) and stationary growth phase (■) during pH-controlled batch fermentations. Fermentations experiments identified by

Temperature ($^{\circ}\text{C}$), and whey permeate (WP %, w/w) and yeast nitrogen base (YNB %, w/v) concentrations.....75

Figure 2.4 Response surface for the effects of whey permeate (WP) and yeast nitrogen base (YNB) on maximal EPS production during pH-controlled batch fermentations at 42°C76

Chapitre III

Figure 3.1 Comparison of growth of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M during pH-controlled batch cultures in unsupplemented WP (\square) and WP supplemented with different nitrogen sources: yeast extract (\bullet), WPI-Bipro-alcalase (\circ) and WPC-DMV (\blacksquare).90

Chapitre IV

Figure 4.1 Viable cell population (\square), EPS production (\blacksquare), lactose (\bullet) and lactic acid concentrations (\circ), and capillary relative viscosity of culture broth (\blacktriangle) and supernatant (\triangle) during pH-controlled batch cultures in WPYE supplemented with S, AA and V (means of two repetitions).....107

Chapitre V

Figure 5.1 NIR second derivative spectra of standard solutions of a) EPS, b) lactic acid and c) lactose at different concentrations of 3 % (----), 5 % (—) and 6 % (...).123

Figure 5.2 NIR second derivative spectra of supernatants obtained from a pH-controlled batch culture in whey permeate based medium as a function of time: 0 h (—), 8 h (----), 15 h (----), 32 h (...), and 56 h (—).....124

Figure 5.3 NIR second derivative spectra of EPS standard solutions at 6 % (—) and EPS factor (...).125

Figure 5.4 NIR calibration curves for a) EPS ($y = 0.913x + 0.0808$, $R^2 = 90.7$), b) lactose ($y = 0.977x + 0.7172$, $R^2 = 98.1$) and c) lactic acid ($y = 0.982x + 0.3314$, $R^2 = 99.1$). Prediction (...) and confidence (----) 95% of intervals.....126

Figure 5.5 NIR validation curves for a) EPS ($y = 0.907x + 0.2070$, $R^2 = 90.30$), b) lactose ($y = 1.051x + 2.645$, $R^2 = 98.7$) and c) lactic acid ($y = 0.990x + 0.0295$, $R^2 = 99.4$). Prediction (...) and confidence (----) 95% of intervals.127

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les bactéries lactiques (BL) sont utilisées depuis des siècles comme moyen de conservation des aliments, grâce à leur capacité à produire des acides organiques, principalement l'acide lactique, qui ont une activité antimicrobienne importante. Dans les dernières années, les recherches ont été orientées vers le développement de produits naturels. Dans ce contexte, l'utilisation des LAB a pris une grande importance, car elles sont largement impliquées dans la production d'arômes, de saveurs et de composés tels que les exopolysaccharides (EPS) qui jouent un rôle très important sur les caractéristiques organoleptiques et rhéologiques des produits fermentés comme le yogourt, le fromage ou les laits et crèmes fermentés. En effet, les EPS sont formés de longues chaînes de monosaccharides qui favorisent la stabilité, augmentent la viscosité et améliorent la texture des produits que les contiennent. De plus, des recherches récentes ont montré que certains EPS produits par des BL probiotiques ont un impact positif sur la santé. Avec toutes ces caractéristiques, les EPS pourraient être utilisés comme des bioingrédients alimentaires et devenir une alternative aux polymères d'origine animale ou végétale dans les produits alimentaires ou bien remplacer, en partie, les solides de lait dans les produits allégés.

Cependant, l'utilisation des EPS des BL dans l'industrie agro-alimentaire est encore limitée à cause de leur faible production (40-1400 mg l⁻¹) en comparaison à celle des EPS des bactéries à Gram négatif (15 g l⁻¹). La production d'EPS par les BL est fortement dépendante de la souche, des conditions et de la composition du milieu de culture. D'autre part, les milieux de culture utilisés pour la production de ces composés sont généralement coûteux et fastidieux à préparer, ce qui augmente en définitive le coût total de production. Pour ces raisons, l'objectif général de ce travail a été de trouver les conditions de fermentation et les nutriments clés qui stimulent la production d'EPS par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M, dans un milieu à base de perméat de lactosérum (PLS), un sous produit de l'industrie laitière disponible en grandes quantités et de coût très bas. Du fait de sa forte concentration en lactose et minéraux, ce milieu peut être utilisé comme milieu de culture pour les BL. Ainsi, une nouvelle voie de valorisation du PLS pour la production d'EPS pourrait être développée avec un fort

impact économique ainsi qu'écologique. La souche à l'étude a déjà montré un fort potentiel pour la production d'EPS dans le lait et dans le milieu défini BMM (basal minimal medium).

Le premier chapitre de cette thèse expose les connaissances théoriques et le bilan des approches scientifiques utilisées afin d'optimiser la production des EPS par voie fermentaire.. Les chapitres ultérieurs sont présentés sous forme d'articles scientifiques qui ont été soumis pour publication dans des revues scientifiques. Le chapitre II qui traite de l'effet de la température et la composition du milieu de culture sur la production d'EPS a été accepté dans *Biotechnology Progress*. Les chapitres III et IV traitent de l'effet des différentes sources d'azote sur la production de biomasse par *L. rhamnosus* RW-9595M et de l'effet de différents nutriments (minéraux, acides aminés, vitamines) sur la production d'EPS, respectivement, ils font l'objet d'un article scientifique accepté dans *International Dairy Journal*. Le chapitre V rapporte la mise au point du dosage simultané du lactose, de l'acide lactique et des EPS par une méthode spectrophotométrique en proche infrarouge (NIR). L'article de ce chapitre a été soumis au *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enfin une conclusion générale qui reprend les principaux résultats et les perspectives de ce projet est présentée.

Chapitre I

Revue de littérature

1 LES EXOPOLYSACCHARIDES

Plusieurs bactéries produisent et sécrètent différents types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent dans le cytosol et servent de source d'énergie, d'autres sont les constituants de la paroi cellulaire tels que les peptidoglycanes et les acides téichoïdes. Enfin des polysaccharides nommés exopolysaccharides (EPS) sont excrétés à l'extérieur de la cellule (Cerning, 1994a). Le nom d'exopolysaccharides est une appellation générale qui englobe tous les polysaccharides qui se trouvent à l'extérieur de la cellule, incluant ceux qui ont un lien avec la paroi cellulaire (Sutherland, 1982). Ces EPS ont des fonctions diverses dans la cellule qui favorisent l'interaction des cellules avec l'environnement. Les EPS agissent comme facteurs de virulence, agents de protection contre la dessiccation ou l'attaque phagique, etc. Parmi ces polysaccharides bactériens quelques-uns ont des propriétés fonctionnelles d'intérêt dans le domaine agro-alimentaire, puisqu'ils peuvent être utilisés comment agents gélifiants, viscosifiants, stabilisants ou émulsifiants. Tel est le cas de la gomme xanthane, du gellan, des dextrans, etc. (Sutherland, 1998). Dans l'industrie laitière, les bactéries lactiques (BL) productrices d'exopolysaccharides, qui incluent les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus*, sont utilisées *in situ* afin de donner des caractéristiques propres au produits comme le « Viili », « Kéfir » ou « Yakult » (Bottazzi, 1988), ou bien pour améliorer la texture des produits laitiers fermentés comme le yoghourt, le fromage ou la crème glacée (De Vuyst *et al.*, 1999). Ce groupe de bactéries cataloguées comme GRAS (generally recognized as safe) produit une grande variété d'hétéropolysaccharides qui peuvent être reliés ou non à la paroi cellulaire (Cerning, 1994a).

1.1 La fonction des EPS dans la cellule

Les exopolysaccharides sont produits par une grande gamme de micro-organismes. Leur diversité structurale reflète leur évolution donc leur adaptation à l'environnement. Le rôle des EPS dépend donc des niches écologiques où se situent les bactéries qui les sécrètent. Il a été suggéré que la capacité de produire des EPS constitue une réponse directe aux pressions sélectives de l'environnement (Whitfield, 1988). En fait, une des plus importantes fonction des

EPS, sans être l'unique, est la protection vis à vis de l'environnement. La capacité des micro-organismes de s'enrober dans une couche de polymères qui retient très bien l'eau confère à la cellule une protection à la dessiccation et à la déprédation des protozoaires. Cette couche a aussi un effet significatif sur les propriétés de diffusion des constituants vers ou en dehors de la cellule; ainsi les agents anti-microbiens, comme les antibiotiques peuvent plus difficilement atteindre l'intérieur de la cellule (Whitfield, 1988).

Dans une grande variété de micro-environnements, la survie des micro-organismes dépend de leur capacité à s'adhérer aux surfaces inertes ou biologiques. La participation des EPS dans la formation de biofilms qui sert à l'adhésion aux surfaces est très importante. Cette fonction, n'est cependant pas toujours bénéfique puisqu'elle peut occasionner, par exemple la formation de la plaque dentaire et des caries ou l'incrustation des micro-organismes et des polysaccharides dans les installations d'eau des industries (Bryers, 1993; Kumar *et al.*, 1998). Dans le cas des cyanobactéries, les EPS jouent un rôle très important dans le recyclage des minéraux comme le Mn^{2+} (Moreno *et al.*, 1998). En ce qui concerne les micro-organismes qui produisent des polysaccharides capsulaires, notamment certains pathogènes, il semblerait que la quantité et la vitesse de synthèse de leur capsule sont des paramètres importants dans leur caractère pathogène. En effet, les capsules semblent être un facteur très important dans la survie des bactéries qui doivent éviter la phagocytose dans l'organisme hôte. Il semblerait également que la capsule et sa composition sont des facteurs fort importants dans la réponse immunitaire vis à vis de certaines bactéries (Whitfield, 1988).

Le rôle des EPS contre les bactériophages est très controversé. Il y a autant de travaux qui démontrent une action bénéfique des EPS contre les phages (Vedamuthu *et al.*, 1986; Forde *et al.*, 1999) que de travaux qui démontrent l'effet contraire (Sutherland, 1999). D'une part, certains travaux indiquent que l'adhérence phagique peut être augmentée par la production d'EPS, car ceux-ci fournissent des sucres agissant comme des récepteurs spécifiques de surface. En effet, Valyasevi *et al.* (1994) ont trouvé que le rhamnose du polysaccharide de la paroi extracellulaire des souches de *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (*L. cremoris*) KH et *L. lactis* C2 agit comme le récepteur de bactériophages Kh et sK1, respectivement. D'autre part, certains travaux démontrent l'effet inverse, soit une inhibition de l'adhérence phagique

attribuée à la capacité des EPS à masquer les sites récepteurs sur la paroi des cellules bactériennes. Le travail de Vedamathu *et al.* (1986) a montré que le transfert par conjugaison du plasmide pSRQ 2202 de 18.5 Kb, d'une souche mucoïde de *L. cremoris* à des souches *L. lactis* leur confère non seulement la capacité de produire des EPS mais aussi la résistance aux phages lytiques. Forde et Fitzgerald (1999) ont identifié le plasmide pCI658 comme le responsable de la production d'un EPS hydrophobe chez *L. cremoris* HO2 qui masque les récepteurs de la paroi cellulaire et ainsi empêche l'adhésion des phages.

Il ne faut pas oublier que pour certaines industries, la présence d'EPS est non désirée car elle est un indice d'altération du produit. Par exemple, certaines souches de *Pediococcus* produisent des β -glucanes dans les vins ou bières, et des souches de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* produisent des polysaccharides sur la surface des produits carnés emballés sous vide (Cerning, 1994a).

1.2 L'utilisation industrielle des EPS

La plupart des polysaccharides utilisés dans l'industrie sont produits par voie biotechnologique, puisque les propriétés physiques des polymères des micro-organismes sont supérieures à celles des polymères d'origine végétale et les coûts de production sont inférieures. De plus, la modification chimique de la structure de ces polymères utilisés commercialement augmente leurs champs d'application et leur valeur ajoutée, comme dans le cas du Sephadex®, un dérivé du dextrane (Sutherland, 1998). Le *Tableau 1.1* montre les applications industrielles des plusieurs exopolysaccharides d'origine microbienne.

1.2.1 (1→3)- β -D-glucanes

Les bactéries du genre *Agrobacterium* et *Rhizobium* produisent le curdlane qui est un polymère insoluble dans l'eau froide, mais qui peut former des gels à 55°C après refroidissement. Après chauffage à des températures entre 88-100°C, le curdlane produit un gel plus fort. Dans des conditions de stérilisation (121°C), la conformation des molécules change pour former une triple hélice qui présente des caractéristiques similaires à celles de l'alginate, mais avec l'avantage de ne pas être dépendant des cations. Le curdlane est très

utilisé seulement au Japon comme stabilisant alimentaire, grâce à ses propriétés de rétention d'eau; il est ainsi utilisé dans la fabrication de tofu, pâtes de poisson et gels de fèves. De plus le curdlane acétylé présente une activité anti-thrombique (Sutherland, 1998).

1.2.2 Pullulane (α -D-glucane)

Aureobasidium pullulans synthétise un α -D-glucane linéaire de maltose et de maltotriose unis par des liaisons (α -1,4) et (α -1,6). Ce polymère est très soluble et forme des solutions visqueuses très stables. La stérification est utilisée pour augmenter ses propriétés physiques et pour empêcher l'action des hydrolases. Il est utilisé comme film d'emballages des produits alimentaires, car il aide à la rétention des saveurs et à garder l'apparence fraîche des aliments (Sutherland, 1998).

1.2.3 Gellane

Le gellane est produit par *Sphingomonas paucimobilis*. Ce polymère est composé des unités répétitives de tétrasaccharides avec des substitués *O*-acétyle et glycéryle. Le gellane forme des gels thermo-réversibles qui ont de bonnes caractéristiques rhéologiques. Les produits commercialisés aux États Unis, Kelgogen® et Gelrite® , sont utilisés comme gélifiants et stabilisants dans les aliments. Gelrite® est aussi utilisé comme substitut d'agar dans les milieux de culture (Sutherland, 1998).

1.2.4 Xanthane

Le xanthane produit par *Xanthomonas campestris* est le plus important biopolymère commercialisé. Sa production excède 20000 tonnes par an. Le xanthane est un polymère avec un pentasaccharide comme unité répétitive, composée de D-glucose, de D-mannose, D-acide gluconique, acétate et pyruvate. Ses propriétés rhéologiques dérivent de sa conformation en double hélice en solution. En effet, le xanthane en solution présente des caractéristiques pseudo-plastiques. Ce biopolymère est très utilisé dans la préparation d'aliments, car il favorise le relargage de la saveur en bouche, augmente la viscosité et donne une texture désirée. De plus il est compatible avec les autres ingrédients alimentaires, tel que les protéines, les lipides et

d'autres hydrates de carbone. Le xanthane peut aussi être utilisé en combinaison avec d'autres polysaccharides comme la gomme de guar, ou la gomme de caroube afin d'améliorer la viscosité des produits alimentaires (Sutherland, 1998).

Tableau 1.1 Applications industrielles des exopolysaccharides microbiens

	Utilisation	Exopolysaccharide
Propriétés biologiques	agents anti- tumeur membrane pour les yeux	β -D-glucanes acide hyaluronique (<i>Streptococcus</i> EPS)
Propriétés chimiques	substrat enzymatique préparation des oligosaccharides	<i>E. coli</i> K4 et K5 EPS curdlane, pullulane, scleroglucane
Propriétés physiques		
- émulsion, stabilisation	aliments, peinture thixotropique	xanthane
- formation de films	films alimentaires	pullulane
- stabilisation de mousse	bière, fluides anti-incendie	xanthane
- agents gélifiants	technologie des cellules et enzymes en aliments	gellane
- agent hydratant	produits cosmétiques et pharmaceutiques	acide hyaluronique
- inhibiteur de formation de cristaux	aliments congelés, sirops aliments	xanthane
- viscosifiant	aliments	xanthane
- agent de suspension	pesticides agro-chimiques et aérosol	xanthane

Adapté de Sutherland, 1998.

Le *Tableau 1.1.* montre la grande gamme d'application des exopolysaccharides d'origine microbienne. Cependant, avec l'internationalisation des marchés, le choix d'un polymère comme stabilisant en agro-alimentaire ne sera pas plus seulement fonction des ses propriétés physico-chimiques mais de sa provenance et de son effet sur la santé. Ainsi, les hétéropolysaccharides excrétés dans le milieu de culture par les bactéries lactiques ont un grand potentiel pour être utilisés comme bio-ingrédients dans différentes applications nouvelles dans l'industrie alimentaire, car ils sont produits par des micro-organismes GRAS dont certains sont potentiellement probiotiques. Dans certains cas, ces polysaccharides ont des propriétés

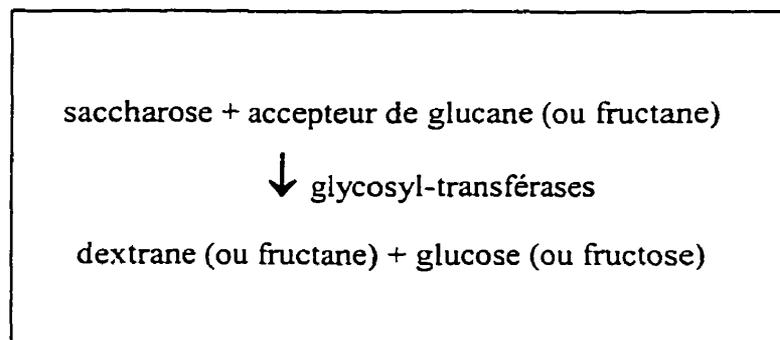
rhéologiques intéressantes. De plus des études récentes ont suggéré que certains EPS produits par des BL ont des caractéristiques prébiotiques (Nagaoka *et al.*, 1994; Ouwehand *et al.*, 1999). En effet, des études ont montré que certains EPS peuvent agir comme immuno-stimulants, diminuer le taux du cholestérol dans le sang ou avoir un effet antitumoral. Pour ces raisons, les recherches dans ce champ se sont développées au cours des 10 dernières années. Cependant, à l'heure actuelle, les connaissances sur ces biopolymères sont encore limitées et il reste beaucoup de travail à faire au niveau de leur caractérisation biochimique, physico-chimique et rhéologique. De plus une des caractéristiques des EPS produits par les BL est leur faible production en comparaison à celle des autres EPS microbiens et l'instabilité relative du caractère épaississant (Cerning, 1994a). Les travaux actuels visent donc à trouver des technologies alternatives et à approfondir les connaissances sur la synthèse des EPS afin d'augmenter leur production pour qu'ils deviennent une option envisageable pour leur utilisation comme bioingrédients alimentaires. Dans les sections suivantes, l'état actuel des recherches dans ce domaine a été revu et la pertinence ce projet exposée.

1.3 Les exopolysaccharides des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) produisent deux types d'EPS: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Dans le groupe des homopolysaccharides on retrouve : les dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* et les glucanes produits par *Streptococcus mutans* (*S. mutants*) et *S. sobrinus*. Ces homopolysaccharides sont composés de résidus de glucose unis par des liaisons (α -1,4) et (α -1,6). Les levanes sont aussi des homopolysaccharides composés de résidus de fructose unis par des liaisons (β -2,6) et excrétés par *S. salivarius*. Le groupe des hétéropolysaccharides, qui fait l'objet de ce travail, regroupe les EPS composés de plusieurs types d'oses constitutifs et produits par des bactéries lactiques mésophiles et thermophiles (Cerning, 1994a).

La production des homopolysaccharides exige un substrat spécifique, en l'occurrence le saccharose, ce qui reflète l'existence d'enzymes très spécifiques qui agissent sur les substrats carbonés. Leur synthèse se fait à l'extérieur de la cellule en présence d'un donneur et d'un

récepteur par l'action des enzymes : la dextrane-sucrase dans le cas des dextrans et des glucosyl-transférases dans le cas des α -glucanes, selon le schéma suivant (Cerning, 1994a) :



Les secteurs industriels les plus variés sont utilisateurs de dextrans, tels que l'industrie pétrolière, papetière, textile, pharmaceutique et cosmétique. Les dextrans de faible poids moléculaire sont largement utilisés dans le monde médical comme substitut de plasma sanguin. Ils ont également une activité anticoagulante, antilipémique et anti-ulcère. Les dextrans modifiés tels que le dextrane réticulé « Sephadex » ont une valeur ajoutée très importante. L'utilisation des dextrans dans l'industrie alimentaire se limite à la stabilisation et augmentation de la viscosité dans les sirops (Cerning, 1994a).

1.3.1 Les hétéropolysaccharides des bactéries lactique

Le *Tableau 1.2* présente les BL productrices d'hétéropolysaccharides. Puisque ce chapitre porte sur les hétéropolysaccharides des BL, le terme exopolysaccharide (EPS) sera toujours utilisé dans la suite pour se référer à ces polymères.

Un grand nombre de souches bactériennes ont la capacité de produire des EPS. Dans le cas des bactéries lactiques utilisées dans la fermentation des produits laitiers, les espèces *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* (Garcia-Garibay *et al.*, 1991; Cerning *et al.*, 1992; Grobбен *et al.*, 1995; Grobбен *et al.*, 1996; Rawson *et al.*, 1997; Kimmel *et al.*, 1998b), *S. thermophilus* (Cerning *et al.*, 1988; Doco *et al.*, 1990; Gancel *et al.*, 1994a; 1994b; Stingle *et al.*, 1996; Lemoine *et al.*, 1997; De Vuyst *et al.*, 1998; Low *et al.*, 1998; Degeest *et al.*,

1999) et *L. lactis* (Nakajima *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1995; Kitazawa *et al.*, 1996; Forde et Fitzgerald, 1999; Looijesteijn *et al.*, 1999a; Yang *et al.*, 1999) ont été les plus étudiées.

Tableau 1.2 Bactéries lactiques productrices d'hétéropolysaccharides (EPS)

Bactéries lactiques productrices des EPS	
Mésophiles	Thermophiles
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	

Durant les dernières années, les exigences des consommateurs se sont orientées vers des produits plus naturels, ce qui a déclenché le développement d'un nouveau marché et des études approfondies sur les souches considérées comme probiotiques : *Bifidobacterium* (Andaloussi *et al.*, 1995); *L. casei* (Vescovo *et al.*, 1989; Nagaoka *et al.*, 1990; Cerning *et al.*, 1994 b; Mozzi *et al.*, 1995a; Mozzi *et al.*, 1995b) et *L. rhamnosus* (Gamar *et al.*, 1997; Korpela *et al.*, 1997; Gamar-Nourani *et al.*, 1998; Berry *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2000). Gamar-Nourani *et al.* (1998) ont travaillé avec la souche *L. rhamnosus* C83 qui produit un polymère composé de glucose et de galactose dans un ratio 1 :1, indépendamment de la source de carbone. Cependant la production d'EPS n'a pas été très élevée (Tableau 1.4). Dupont *et al.* (2000) ont travaillé avec trois souches de *Lactobacillus*, deux *L. rhamnosus* et un *L. casei*. Dans un premier temps, ils ont fait le profil plasmidique des souches et ont trouvé que le caractère épaississant de toutes les souches étudiées, était génomique. Par la suite, ils ont évalué la production d'EPS de ces trois souches en culture batch avec contrôle de pH dans

un milieu défini (BMM). Les deux souches de *L. rhamnosus* se sont avérées d'excellentes productrices d'EPS, dont *L. rhamnosus* RW-9595M qui a montré le plus fort potentiel pour la production d'EPS. En effet, la souche *L. rhamnosus* RW-9595M, un mutant stable de *L. rhamnosus* ATCC 9595, et *L. rhamnosus* Rosell produisent respectivement jusqu'à 1275 et 601 mg EPS par litre. Tandis que la production de la souche *L. casei* se situe entre 65-93 mg l⁻¹. La *figure 1.1* montre la souche de *L. rhamnosus* RW-9595M avec un marquage à la ferritine du matériel extracellulaire qui a permis de visualiser par microscopie électronique, les EPS produits et excrétés par la bactérie.



Figure 1.1 Photo par microscopie électronique de la souche *L. rhamnosus* RW-9595M avec un marquage à la ferritine du matériel extracellulaire.

1.3.1.1 Composition et structure des EPS

Les exopolysaccharides comme il a été déjà mentionné, sont des polymères qui se trouvent à l'extérieur de la cellule, soit sous forme d'une capsule enrobant la cellule, soit sécrétés dans le milieu. Dans certains cas, les deux formes sont produites par le même micro-organisme et dans la pratique la distinction entre les deux n'est pas toujours évidente (Cerning, 1994a) Les EPS sont composés de plusieurs types de monosaccharides reliés par des liaisons α et β . Dans certains cas, ils peuvent contenir d'autres composés et des ramifications. Cependant, il est possible d'identifier une unité de base appelée « unité répétitive » formée de

1 à 8 monosaccharides où normalement se retrouvent du D-glucose, du D-galactose et du L-rhamnose à différents ratios (De Vuyst et Degeest, 1999). Le *Tableau 1.3* montre quelques exemples d'EPS dont la composition et le poids moléculaire ont été élucidés. Des résidus autres que des sucres ont été identifiés : sn-glycérol-3-phosphate, N-acétyl-amino, phosphates et groupes acétyle (Doco *et al.*, 1990; Nakajima *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1995; Stinglee *et al.*, 1996). Il semblerait que le groupe phosphate serait responsable de l'activité prébiotique de certains EPS (Kitazawa *et al.*, 1998). L'EPS produit par *S. thermophilus* MR-1C a une structure et une composition différentes de celles des autres EPS. Il contient du galactose, du rhamnose et du fucose (6-déoxygalactose) dans un ratio de 5 : 2 : 1, lesquels forment une unité répétitive de 8 sucres (Low *et al.*, 1998).

Tableau 1.3 Composition et poids moléculaire des EPS produits par des LAB

Souche	Composition				PM (Da)	Référence
	Glu	Gal	Rha	Autres		
<i>S. thermophilus</i> CNCM1733	+	+	-	GalNAc	1x10 ⁶	Doco <i>et al.</i> , 1990
<i>S. thermophilus</i> SY	+	+	+	Ara	2x10 ⁶	Riccardi et Clementi, 2000
<i>S. thermophilus</i> Ly03	+	+	-	-	1.8, 0.41 x10 ⁶	Deggest et de Vuyst, 1999
<i>S. thermophilus</i> Sfi39	+	+	-	-	2x10 ⁶	Lemoine <i>et al.</i> , 1997
<i>S. thermophilus</i> Sfi12	+	+	+	-	2x10 ⁶	Lemoine <i>et al.</i> , 1997
<i>S. thermophilus</i> Sfi6	+	+	-	GalNAc	ND	Stinglee <i>et al.</i> , 1996
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	+	+	+	-	5x10 ⁵	Cerning <i>et al.</i> , 1988
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 1187	+	+	-	Man	ND	Bouzar <i>et al.</i> , 1996
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1	+	+	-	-	1.2x10 ⁶	Uemura <i>et al.</i> , 1998
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1	+	+	-	P	1.1x10 ⁶	Uemura <i>et al.</i> , 1998
<i>L. casei</i> spp. <i>casei</i> NCIB4114	+	+	-	-	ND	Cerning <i>et al.</i> , 1992
<i>L. rhamnosus</i> RW-9595M	+	+	+	-	ND	Pham <i>et al.</i> , 2000**
<i>L. Sake</i> 0-1	+	-	+	-	6x10 ⁶	Van den Berg <i>et al.</i> , 1995
<i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> LC330	+	+	-	GluNAc	1x10 ⁶	Marshall <i>et al.</i> , 1995
<i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> LC330	+	+	+	GluNAc,P	1x10 ⁴	Marshall <i>et al.</i> , 1995
<i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> 352	+	+	-	Man	ND	Knoshaug <i>et al.</i> , 2000
<i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> SBT 0495	+	+	+	Gly-P	ND	Kitasawa <i>et al.</i> , 1991
<i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	+	+	+	P	6.8x10 ⁵	van Casteren <i>et al.</i> , 1998
<i>Bifidobacterium longum</i>	+	+	-	AU, HA	1.2, 0.36x10 ⁶	Andaloussi <i>et al.</i> , 1995

Glu : glucose; Gal : galactose; Rha : rhamnose; NAc : N-acétyle; P : phosphate; AU : Acide uronique; HA : hexoamines; Man : mannose; Gly-P : glycérol-phosphate; NacGal : n-acétylgalactosamine.

La composition et la structure des EPS semblent être fortement influencées par les conditions de fermentation, la composition du milieu de culture ainsi que par les techniques de purification et de quantification des EPS. En effet, Cerning (1994a) ont observé que *L. casei* CG11 cultivé dans le milieu BMM produisait des EPS avec une composition différente en fonction de la source de carbone. En présence de glucose le polymère est composé de glucose, rhamnose, galactose et mannose dans un ratio de 75.7, 20.5 2.1 et 1.7 %, respectivement, tandis qu'en présence de lactose, l'EPS était formé par du glucose, rhamnose, galactose, mannose et xylose dans une proportion de 63.0, 16.1, 13.2, 6.8 et 1.0 %, respectivement. Grobber *et al.* (1995; 1996; 1997) ont déterminé la structure et la composition d'un EPS produit par *L. bulgaricus* NCFB 2772 qui présentait une composition différente en fonction de la source de carbone et de la technique de purification utilisée. En présence de glucose et de lactose, l'EPS contenait du glucose, du galactose et du rhamnose dans un ratio de 1 :6.8 :0.7, respectivement (Grobber *et al.*, 1995). Par contre dans un milieu à base de fructose, l'EPS produit ne contient que du glucose et du galactose dans un ratio de 1 :2.4 (Grobber *et al.*, 1996). Quand la souche est cultivée dans un milieu défini (Grobber *et al.*, 1996) elle produit deux type d'EPS avec un poids moléculaire et une composition différents. Le premier EPS a un poids moléculaire de 1.4×10^6 Da et est composé de galactose, glucose et rhamnose dans un ratio de 11 :1 :0.4. Le deuxième EPS a un poids moléculaire de 7.4×10^7 Da et il est formé du galactose, de glucose et rhamnose dans un ratio de 5 :1 :1.

De la même façon, un même micro-organisme peut produire deux types d'EPS en fonction des conditions de fermentation ou de la composition du milieu de culture. Bouzar *et al.* (1996) ont rapporté une variation dans la composition des EPS produits par *L. bulgaricus* CNRZ 1187 durant les 10 premières heures de fermentation. Marshall *et al.* (1995) ont isolé deux EPS de poids moléculaire et composition différents chez *L. cremoris* LC330 cultivé dans un milieu défini (CDM). L'EPS neutre avec un PM de 1×10^6 Da est produit pendant la phase stationnaire et le second EPS possédant un groupement phosphate et un PM de 1×10^4 Da est plutôt lié à la membrane cellulaire et produit seulement pendant la phase exponentielle de croissance. Degeest et De Vuyst (1999) ont observé la production simultanée de deux EPS par *S. thermophilus* LY03 dans le lait ou le milieu MRS avec la même composition, mais avec un

poids moléculaire différent (1.8×10^6 et 4.1×10^5 Da, respectivement). Ils ont également constaté que la proportion de chaque EPS dépendait du ratio C:N dans le milieu.

La composition chimique des EPS est cependant controversée en ce qui concerne la présence de protéines dans la structure. Certains auteurs ont trouvé des concentrations importantes en protéines dans la solution d'EPS ce qui les a fait conclure que l'EPS et la protéine étaient liés et formaient une entité glycoprotéique (Macura *et al.*, 1984; Garcia-Garibay et Marshall, 1991; Toba *et al.*, 1991). Cependant, les EPS ont été produits dans un milieu riche en protéines laitières, et les protéines associées à l'EPS pourraient être des contaminants retenus pendant la purification du biopolymère (De Vuyst et Degeest, 1999).

1.3.1.2 *Caractérisation rhéologique des EPS*

Très peu d'EPS ont été caractérisés rhéologiquement. Alors il est difficile de les qualifier comme de bons agents épaississants. Tel que mentionné précédemment, certaines bactéries peuvent produire des EPS capsulaires et/ou des EPS libres. Il est important de caractériser d'un point de vue rhéologique et organoleptique ces deux formes d'EPS car les caractéristiques rhéologiques et organoleptiques du produit final seront fonction du type d'EPS. Tous les EPS n'améliorent pas les propriétés rhéologiques et organoleptiques de l'aliment. En effet, Lavezzari *et al.* (1997) ont classé en fonction de caractéristiques visuelles, rhéologiques et organoleptiques les EPS produits par des souches servant à la fabrication des yogourts. D'un point de vue visuel et organoleptique, il propose la classification qui est illustrée dans la *Figure 1.2*.

D'après cette classification, les EPS dits mucoïdes présentent des forces de cisaillement plus élevées à faibles vitesses de cisaillement que les EPS dits épaississants. Donc, le gel formé par les EPS mucoïdes est plus susceptible à la rupture de sa structure lors de l'application d'une force mécanique. Les auteurs concluent que les souches productrices d'EPS mucoïdes ont tendance à former un réseau entre les caséines moins résistants que ceux qui forment les EPS épaississants.

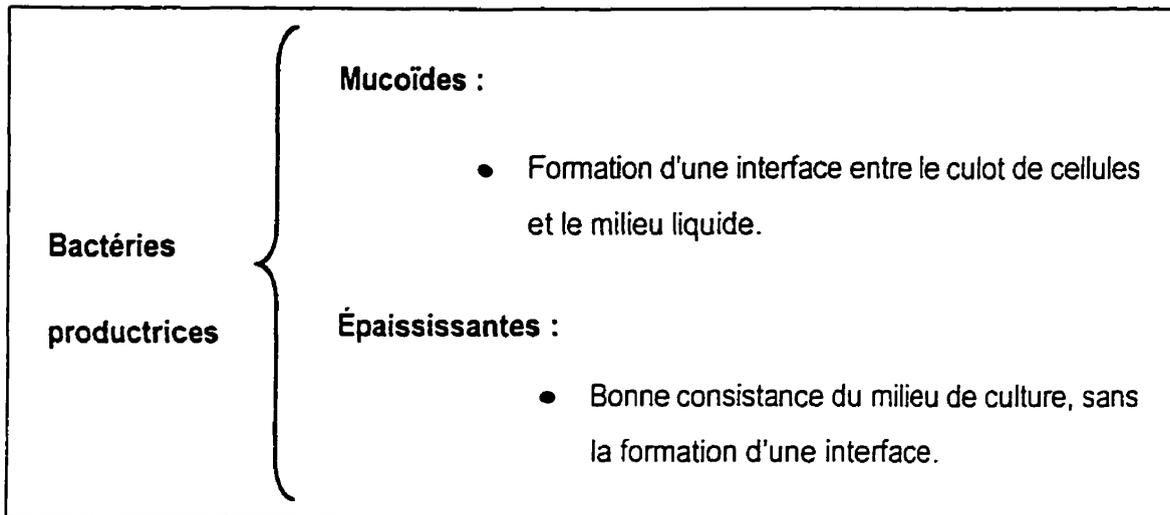


Figure 1.2 Classification des EPS en fonction de leur caractéristiques rhéologiques et organoleptiques (Lavezzari *et al.*, 1997)

Ricciardi et Clementi. (2000) ont caractérisé l'EPS produit par *S. thermophilus* SY qui a un comportement pseudoplastique et une viscosité similaire à celle du xanthane. Yang *et al.* (1999) ont isolé et caractérisé des EPS produits par 5 souches de *L. cremoris* utilisées pour la fabrication de « Viili ». Les 5 EPS ont montré une composition et structure similaires à celles de l'EPS produit par *L. cremoris* SBT 0495 identifié par Van Kranenburg *et al.* (1997). Dans des solutions aqueuses à 0.1 g l^{-1} , les biopolymères exhibent un comportement de polyélectrolytes. Par contre, en solutions plus concentrées (1 % p/v), les EPS montrent un comportement pseudoplastique. De plus leur viscosité dépend de la température, du pH et de la force ionique de la solution. Enfin, les EPS sont capables de former un gel après chauffage à 40°C . L'EPS produit par *L. sake* 0-1 a été comparé au xanthane, les résultats rhéologiques montrent que l'EPS produit par *L. sake* 0-1 a de meilleures propriétés viscosifiantes que celles du xanthane, à une concentration de 1 %, et quand la force de cisaillement varie entre 0 à 300 s^{-1} . En ce qui concerne les propriétés pseudoplastiques, elles sont similaires pour les deux polymères (Van den Berg *et al.*, 1995).

1.3.1.3 Biosynthèse des EPS

Les EPS peuvent être synthétisés dans les différentes phases de la croissance cellulaire. La biosynthèse des hétéropolysaccharides des BL, à la différence des homopolysaccharides, est plus complexe car elle a lieu en partie dans le cytoplasme et un grand nombre d'enzymes et de complexes enzyme/protéine sont impliqués telles que l'UDP glucose-déshydrogénase, plusieurs glycosyl-transférases (glucosyl-, galactosyl-, rhamnosyl-, acide glucuronique-transférases, etc.) et des polymérases, qui ne sont pas toutes spécifiques à la synthèse des EPS. Avant que les glycosyl-transférases ne puissent commencer l'enchaînement des sucres, il faut que ceux-ci soient « activés » par des enzymes cytoplasmiques. Le polysaccharide est ensuite attaché à la membrane par un transporteur lipidique et transporté dans le périplasme ou dans le milieu extracellulaire (Stingele *et al.*, 1996; Van Kranenburg *et al.*, 1997). L'EPS est alors exporté hors de la cellule et peut rester soit attaché à la membrane (capsules), soit être séparé du transporteur lipidique par hydrolyse et relargué dans le milieu.

Le mécanisme de la synthèse des EPS de quelques bactéries lactiques a été déjà élucidé (De Vos, 1996; Stingele *et al.*, 1996; Van Kranenburg *et al.*, 1997; Looijesteijn *et al.*, 1999a). La *Figure 1.3* montre les voies métaboliques du lactose proposé par De Vos (1996). D'après Looijesteijn *et al.* (1999a), la source de carbone joue un rôle important dans la composition osidique du polymère, puisque les voies cataboliques que la bactérie va utiliser vont dépendre de la source de carbone présente dans le milieu. Par exemple, si la source de carbone est le lactose, il sera d'abord acheminé à l'intérieur de la cellule par des protéines du système PTS puis hydrolysé en galactose et glucose. Le galactose peut suivre la voie métabolique de la glycolyse ou être converti en sucre nucléotide. Par la suite, il est incorporé dans la chaîne de l'EPS, tandis qu'une partie du glucose est phosphorylé et lié à un nucléotide diphosphate pour former l'UDP-glucose. À partir de ce nucléotide « clé », des épimérasés, des pyrophosphorylases et des réductases auront la tâche de former les autres sucres nucléotides : l'UDP-galactose, l'UDP-mannose ou l'UDP-rhamnose. Ces sucres sont alors incorporés à l'unité répétitive de la chaîne polysaccharidique formée.

1.3.1.3.1 Activation des sucres

Avant d'être polymérisés, les monosaccharides doivent être activés par des nucléotides diphosphates pour former des sucres nucléotidiques. Lors de leur addition à la chaîne polysaccharidique, ils seront scindés du nucléotide diphosphate et associés au transporteur lipidique. Parmi les enzymes impliquées dans la formation des précurseurs se trouvent les kinases, responsables de la phosphorylation du monosaccharide, une nucléotidyl-transférase ou phosphorylase qui a pour rôle de substituer un groupe phosphate par un nucléotide diphosphate du sucre activé, et enfin des épimérasés, deshydrogénases, mutase, etc, qui peuvent intervenir pour modifier le sucre récemment formé.

1.3.1.3.2 Polymérisation des sucres

Les sucres ainsi activés peuvent alors être intégrés à la chaîne polysaccharidique créée par l'action des glycosyl-transférases. Celles-ci sont des catalyseurs spécifiques du transfert d'un sucre de sa fraction nucléotidique au transporteur lipidique ou au dernier sucre de la chaîne qui vient d'être formée. Les transporteurs lipidiques servant d'ancrage aux monosaccharides sont des esters phosphate et des alcools isoprénoïdes (C55) à longues chaînes, identiques à ceux décrits dans la biosynthèse des lipopolysaccharides, de l'antigène O et du peptidoglycane (Sutherland, 1982). Leur fonction serait d'être l'accepteur pour le premier sucre nucléotide, de faciliter la catalyse des glycosyl-transférases, et de favoriser la solubilisation des oligosaccharides hydrophiles dans la zone hydrophobe de la membrane ainsi que le transport à travers la membrane (Cerning, 1994a; De Vuyst et Degeest, 1999). La régulation des étapes de la synthèse des polymères est basée sur la disponibilité des lipides car ses composés sont également impliqués dans la synthèse des lipopolysaccharides du peptidoglycane et des acides téichoïques. En effet, des observations indirectes laissent supposer que la disponibilité des intermédiaires lipidiques est un des éléments les plus importants dans la synthèse des exopolysaccharides (Sutherland, 1982; Looijesteijn *et al.*, 1999a). Dans des conditions qui stimulent la synthèse des lipopolysaccharides ou des acides téichoïques, la production des EPS est réduite à cause de la compétition de l'une au l'autre voie de synthèse pour les intermédiaires lipidiques.

Chez les bactéries à Gram négatif, la production des EPS est plus importante aux températures inférieures à celle de la croissance optimale. Sutherland (1982) a suggéré que dans ces conditions, la synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire est ralentie, ce qui laisserait plus de molécules de phosphate d'isoprénoïde disponibles pour la production des EPS (Peiris *et al.*, 1998). Ce même phénomène a été observé chez certaines BL (Gancel et Novel, 1994a; Van den Berg *et al.*, 1995; Gamar *et al.*, 1997). En ce qui concerne les glycosyl-transférases impliquées dans la biosynthèse des EPS, elles sont spécifiques à un seul type de monosaccharide et ne sont capables de les associer que par un seul type de lien osidique, α - ou β -glycosidique. Lorsque le premier sucre est fixé à la membrane, les glycosyl-transférases ajoutent les sucres activés dans un ordre défini qui sera toujours le même. La répétition de ce motif glucidique de base formera la structure du polysaccharide.

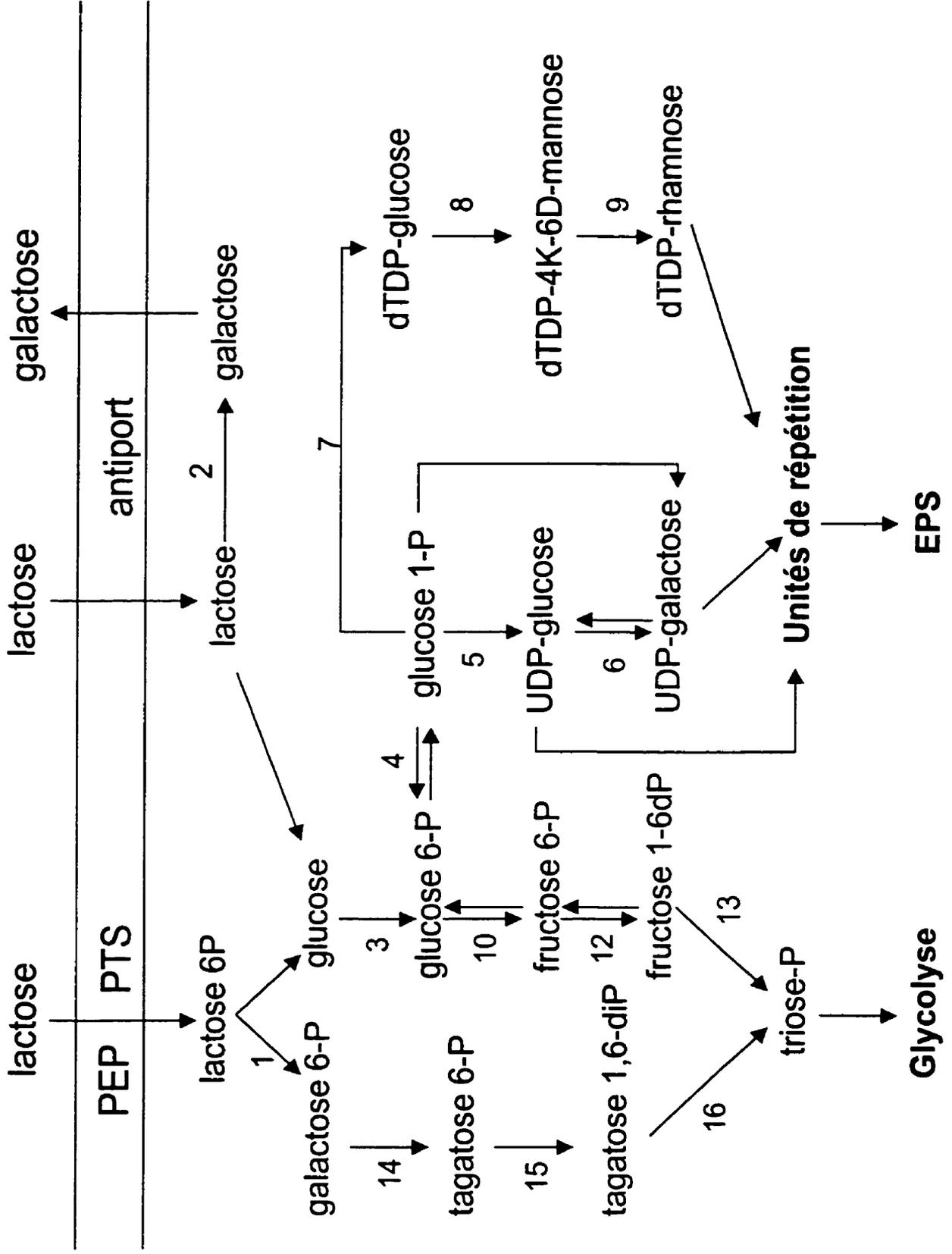
Lors de l'assemblage, des groupements succinate, acétyle, méthyle et phosphate peuvent être ajoutés à l'unité répétitive et entraîner une modification importante des propriétés physico-chimiques du polysaccharide synthétisé (Kitazawa *et al.*, 1998).

1.3.1.3.3 Polymérisation et exportation du polysaccharide

Le mécanisme d'exportation du polysaccharide s'effectue à la surface de la membrane cytoplasmique. Une fois l'unité répétitive formée, elle est transportée vers le milieu extracellulaire. Van Kranenburg *et al.* (1997) proposent l'action d'un complexe enzymatique (flippase) composé d'une polymérase qui lie les unités répétitives et d'une protéine qui détermine la longueur de la chaîne polysaccharidique, probablement en régulant l'activité de la polymérase (*Figure 1.4*).

Puisque le point « clé » pour la production d'EPS, c'est-à-dire la formation des sucres nucléotides et sachant que dans la formation et la polymérisation des EPS interviennent plusieurs glyco-transférases, le génie génétique pourrait donc être une des alternatives pour produire des souches hyperproductrices d'EPS avec des structures et des conformations définies.

Figure 1.3 Les voies métaboliques impliquées dans le catabolisme du lactose et l'anabolisme des EPS chez *Lactococcus lactis* Gal⁺ (via les systèmes phosphoenolpyruvate PEP et phospho-transférèse PTS) et chez *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* Gal⁻ (via lactose/galactose antiport). 1: phospho-β-galactosidase; 2: β-galactosidase; 3: glucokinase; 4: phosphoglucomutase; 5: UDP-glucose; 6: UDP-galactose-4-epimerase; 7: dTDP-glucose pyrophosphorylase; 8: déshydratase; 9: épimérase réductase; 10: phosphoglucoisomérase; 11: 6-phosphofructokinase; 12: fructose-1,6-biphosphatase, 13: fructose 1,6-diphosphate aldolase; 14: galactose 6-phosphate isomérase; 15: tagatose 6-phosphate kinase, 16: tagatose -1,6-diphosphate aldolase (De Vuyst et Degeest, 1999b).



Glycolyse

EPS

1.3.1.4 Génétique de la production des EPS chez les BL

1.3.1.4.1 L'instabilité du caractère épaississant

De nombreuses BL possèdent un caractère épaississant d'intérêt technologique. Cependant, la production d'EPS n'est pas homogène d'une fermentation à l'autre et peut parfois disparaître au cours de repiquage ou après de longues incubations à température élevée (De Vuyst et Degeest, 1999). Elle semble, en effet, être d'une extrême instabilité, ce qui limite considérablement l'utilisation de cette caractéristique des souches dans l'industrie laitière à grande échelle. Chez les bactéries lactiques mésophiles telles que *L. cremoris* et *L. lactis*, leur capacité à produire des EPS est généralement associée à un plasmide et l'instabilité génétique peut s'expliquer par la perte de celui-ci (Macura et Townsley, 1984; Vedamuthu et Neville, 1986; Neve *et al.*, 1988; Vescovo *et al.*, 1989). Les travaux de Vedamuthu et Neville. (1986) et Neve *et al.* (1988) ont démontré la présence d'un plasmide qui codait pour la production d'EPS chez *L. cremoris*. En effet, ce caractère phénotypique a disparu lorsque les souches EPS⁺ ont été curées. Vedamuthu et Neville (1986) ont isolé le plasmide pRSQ2202 et l'ont transféré à deux souches EPS⁻ de *L. lactis* et *L. cremoris* en leur conférant le caractère épaississant. Van Kranenburg *et al.* (1997) ont prouvé la présence des plasmides codant pour le caractère EPS chez *L. cremoris*. Ils ont également réussi à le transférer à une souche EPS⁻ et ainsi induire la production d'EPS. Par contre, Dupont *et al.* (2000) ont déterminé le profil plasmidique de trois souches de *Lactobacillus* : *L. rhamnosus* RW-9595M, *L. rhamnosus* R et *L. paracasei* Type V. Aucune de ces souches n'a révélé de plasmides et le caractère EPS⁺ semble être chromosomal et très stable. En ce qui concerne les bactéries thermophiles, elles sont généralement dépourvues de plasmides (Cerning, 1994a). Les gènes nécessaires à la synthèse des EPS chez ces bactéries semblent d'origine chromosomal. Leur instabilité génétique pourrait être causée par des éléments génétiques mobiles ou par une instabilité génétique généralisée, impliquant des délétions ou des réarrangements (Stinglele *et al.*, 1996).

1.3.1.4.2 Organisation des gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse des EPS.

La première étude génétique concernant la production d'EPS par des LAB a été publiée par Stingle *et al.* (1996). Cette équipe a identifié et caractérisé le locus des gènes *eps* chez *S. thermophilus* Sfi6 par mutagenèse et par recombinaison homologue. Ils ont trouvé que les gènes responsables de la biosynthèse des exopolysaccharides sont organisés en un seul opéron. En effet, un fragment chromosomique de 14.5 Kb (*eps*ABCDEFGHIJKLM) dirige la synthèse et la sécrétion de l'EPS. Cet opéron est divisé en 4 régions. La première région de l'opéron est responsable de la régulation de la production d'EPS. La région centrale code pour la synthèse et l'enchaînement des sous unités répétitives par l'action des glycosyl-transférases (*epsE* à *epsI*, Figure 1.4). Les 2 régions entourant la région centrale sont les responsables de la polymérisation et de l'exportation des EPS. Les protéines EpsC et EpsD contrôlent la longueur de la chaîne tandis que les protéines EpsK et EpsM sont responsables de l'exportation. Enfin, la protéine EpsJ intervient dans la polymérisation des unités répétitives. La même équipe a cloné la souche *L. lactis* MG1363 EPS⁻ (pFS101) avec le plasmide responsable de la synthèse d'EPS chez *S. thermophilus* Sfi6. Les résultats ont montré que *L. lactis* MG1363 produit d'EPS de composition différente à ceux produits par *S. thermophilus* Sfi6. Par contre, les poids moléculaires des EPS produits par ces deux souches demeurent les mêmes. En effet, l'EPS produit par *L. lactis* MG1363 (pFS101) contient du galactose à la place du N-acétylgalactosamine qui contient l'EPS produit par *S. thermophilus* Sfi6. Ceci pourrait être dû au fait que *L. lactis* ne contient pas l'enzyme l'UDP-N-acétylgalactosamine C4-épimérase, responsable de l'insertion du groupe N-acétylgalactosamine dans la structure du polymère. Il est donc, probable que cette molécule soit remplacée par le galactose. Ceci est le premier travail qui a mis en évidence la faisabilité de l'expression hétérologue d'un micro-organisme modifié génétiquement et la capacité d'adaptation de la bactérie à son environnement par l'action des systèmes de régulation qui intègrent des signaux intracellulaires (Stingle *et al.*, 1999).

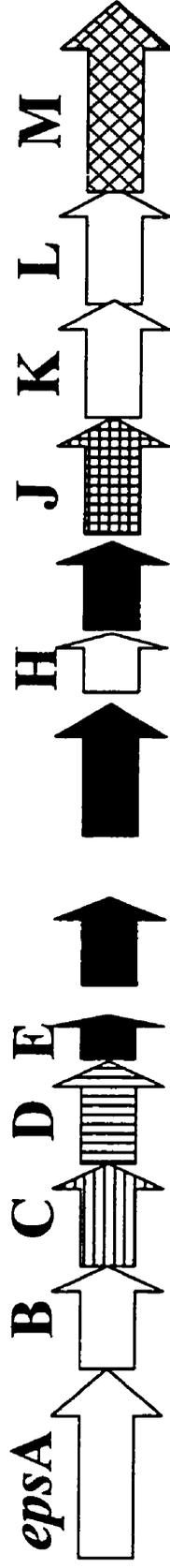
Van Kranenburg *et al.* (1999) ont isolé de la souche de *L. cremoris* NIZO B40 un plasmide de 43 kb portant les gènes pour la production d'un EPS. Une région de 12 kb

contenant 14 gènes (*epsRXABCDEFGHIJKL*) a été identifiée en utilisant l'inactivation insertionnelle par recombinaison homologue. Les gènes codant pour les glycosyl-transférases ont été étudiés par expression homologue et hétérologue. EpsD est la glycosyl-tranférase principale, EpsE et EpsF font la liaison entre le glucose et le complexe lipide-glucose, et EpsG unit le galactose au complexe lipide-cellobiose. La *Figure 1.4* montre l'organisation de l'opéron *eps* chez *S. thermophilus* Sfi6 et chez *L. cremoris* NIZO B40. Il est à noter que les protéines EpsL et EpsM chez *S. thermophilus* Sfi6 ne montrent aucune homologie avec des protéines connues. De plus des souches non mucoïdes de *S. thermophilus* ne possèdent pas les gènes *epsL* et *epsM* ce qui indique qu'ils ne sont pas indispensables à la croissance cellulaire. Stinglee *et al.* (1996) suggèrent que ces gènes soient impliqués dans le transport des EPS à l'extérieur de la cellule, car des souches mutantes qui ne contenaient pas ces gènes accumulaient les EPS dans la cellule. En ce qui concerne *L. cremoris* NIZO B40, les protéines EpsX et EpsC ne montrent pas d'homologie avec des protéines connues, et EpsJ et EpsI montrent une homologie avec des protéines dont la fonction reste inconnue (Van Kranenburg *et al.*, 1997). À l'heure actuelle plusieurs séquences de gènes codant pour le caractère EPS ont été publiées (Griffin *et al.*, 1996; Low *et al.*, 1998). Avec une meilleure connaissance génétique des glycosyl-transférases, les futurs travaux dans ce domaine devraient être orientés vers la production de polysaccharides modifiés dans leur composition. En fait des travaux de mutagenèse hasardeuses sur *L. sake* 0-1 ont été déjà réalisés. En effet, un EPS avec une composition différente et thermo-dépendante a été obtenue (Breedveld *et al.*, 1998). Malheureusement aucune des approches en biologie moléculaire n'a réussi à augmenter de façon significative la production des EPS. Toutefois, Van Kranenburg *et al.* (1999) ont augmenté légèrement la production d'EPS par *L. lactis* NIZO B40 en manipulant le gène *epsD* codant pour la glucosyl-transférase.

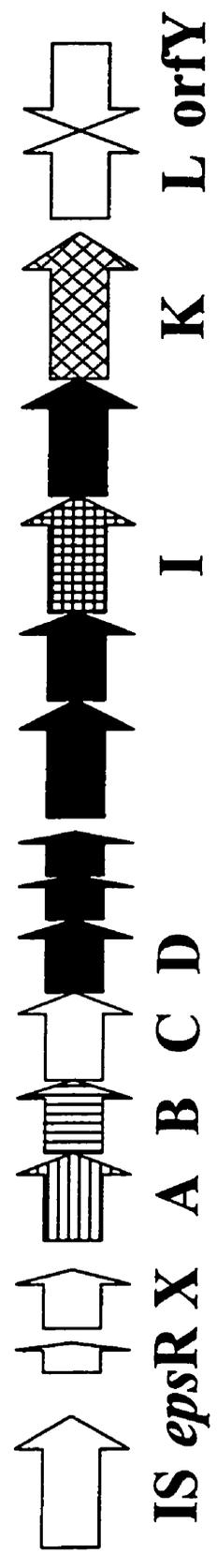
Figure 1.4

Organisation moléculaire des gènes impliqués dans la synthèse des EPS chez *Streptococcus thermophilus* Sfi6 (chromosomique) et chez *Lactococcus lactis* NIZO B40 (plasmidique) (Modifié de Van Kranenburg et al., 1999).

***Streptococcus thermophilus* Sf16**



Régulation Polymérisation/ Glycosyl- Polymérisation/
 transport exportation
 transférases



***Lactococcus lactis* NIZO B40**

1.3.1.5 Détection de la production d'EPS

Il existe plusieurs façons de détecter la production d'EPS. Une façon qualitative utilise un examen visuel de la forme et de la texture de la colonie sur une boîte de pétri, en touchant la colonie avec un l'anse à inoculer: si la formation d'un fil plus long que 5 cm se produit alors il est possible de parler d'une colonie filante (de l'anglais « slime »). Par contre s'il n'y a pas formation d'un fil, on parle de colonies mucoïdes qui ont seulement une apparence humide (Dierksen *et al.*, 1997).

Il est aussi possible d'identifier les souches productrices d'EPS en ajoutant des colorants cationiques dans le milieu de culture, car ces colorants n'ont une affinité que pour les polysaccharides anioniques et neutres des parois cellulaires des bactéries (peptidoglycanes). Le rouge de rhuténium est le colorant utilisé par excellence. Alors, dans un milieu qui contient du rouge de rhuténium, les colonies EPS⁺ ne présenteront pas de coloration car les exopolysaccharides forment une barrière entre la paroi cellulaire des bactéries et le colorant, tandis que les souches EPS⁻ seront colorées en rose. Cette technique a été déjà utilisée pour la sélection de souches EPS⁺ (Gancel et Novel, 1994b; Bouzar *et al.*, 1996; Stingle *et al.*, 1996). Enfin, une technique plus élégante pour mettre en évidence la présence d'EPS et leur interaction avec les autres composants du milieu de culture est la microscopie électronique à balayage (Kaláb *et al.*, 1983; Shellhaass *et al.*, 1985; Teggatz *et al.*, 1990; Skriver *et al.*, 1993).

En revanche, s'il s'agit d'un milieu liquide, Ricciardi *et al.* (1997) proposent la mesure de la viscosité du milieu fermenté avec des micro-capillaires, afin d'identifier des souches EPS⁺. La mesure de la viscosité du surnageant est une façon « semi-quantitative » d'estimer la production d'EPS (Gassem *et al.*, 1995; 1997). Cependant, il est connu que la viscosité d'un milieu est le résultat des interactions de tous les composants. Donc de petites variations dans la composition du milieu de culture pourront modifier la viscosité, sans que cela n'indique une augmentation dans la concentration des EPS. En plus, la conformation des EPS dans un milieu liquide est fonction du pH, de la température, de la force ionique et des interactions avec les autres composés du milieu. Ainsi, un micro-organisme peut former d'une fois à l'autre la même quantité de polymère mais de structure ou conformation légèrement

différente, ce qui modifie le comportement rhéologique de la solution (Sebastiani *et al.*, 1998; De Vuyst et Degeest, 1999). En effet, Faber *et al.* (1998) ont démontré que la viscosité du yogourt était fonction du PM des EPS, en utilisant deux souches qui produisent chacune un EPS semblable en structure et composition mais avec un PM différent. Le yogourt qui a eu la viscosité plus élevée a été celui qui contenait l'EPS avec le plus grand PM.

1.3.1.6 Extraction et purification des EPS

Pour quantifier les EPS produits au cours des fermentations, et connaître l'impact de certains facteurs sur cette production, il faut d'abord les extraire du milieu de culture, faire une purification partielle et enfin doser l'EPS, généralement par une méthode colorimétrique. Par contre, si l'objectif est d'élucider la structure et la conformation de la molécule d'EPS, un haut degré de pureté est requis et les étapes de purification sont plus longues et plus fastidieuses (Doco *et al.*, 1990; Grobben *et al.*, 1997).

L'extraction et la purification des exopolysaccharides dans un milieu complexe tel que le lait, le lactosérum ou l'ultrafiltrat de lait ou dans les milieux synthétiques comme le MRS ou le BMM sont difficiles à cause de la viscosité élevée du milieu, des faibles quantités de polysaccharides présentes et des contaminations importantes en protéines inhérentes à la précipitation des polymères (Cerning, 1994a). La récupération des EPS se fait après une centrifugation afin de séparer les cellules du surnageant. Cependant, cette opération est quelquefois difficile à exécuter à cause de la viscosité du milieu, notamment en présence des EPS capsulaires. Dans ce cas un traitement thermique combiné avec un traitement alcalin, enzymatique ou avec des détergents est recommandé avant centrifugation afin de libérer les polymères de la paroi cellulaire (Kimmel *et al.*, 1998a; Forde et Fitzgerald, 1999). La purification des EPS se fait toujours avec l'addition de solvants organiques (éthanol, acétone) pour les précipiter. L'ajout de sels peut aider à la précipitation des polysaccharides chargés (De Vuyst et Degeest, 1999). L'acide trichloroacétique (TCA) est souvent utilisé pour la précipitation de la partie protéique du milieu (Yvon *et al.*, 1989; Sebastiani et Zelger, 1998). Les dialyses sont recommandées afin de se débarrasser des molécules de faible poids

moléculaire, comme les monosaccharides qui pourraient interférer avec le dosage des EPS (Cerning *et al.*, 1992, 1994b; Grobbsen *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1995).

L'extraction des EPS dans le lait est plus compliquée, car les constituants du lait, notamment les protéines ont tendance à s'associer avec les EPS. Il faut donc hydrolyser les caséines avec des enzymes spécifiques et ensuite précipiter les EPS avec un solvant organique (Bouzar *et al.*, 1996; Bouzar *et al.*, 1997; Rawson et Marshall, 1997; Yang *et al.*, 1999).

D'autres approches ont été utilisées pour la purification des EPS. Par exemple Nakajima *et al.* (1990) ont utilisé la méthode d'ultrafiltration pour la purification d'un phosphopolysaccharide. Doco *et al.* (1991) ont proposé l'utilisation d'une colonne HPLC d'échange anionique afin de séparer et de doser les protéines et les EPS dans une solution sonifiée, centrifugée, et filtrée à travers une mini-colonne Sep-Pak C18. Toba *et al.* (1992) ont utilisé une micro-méthode d'ultrafiltration pour la purification d'un EPS. Riccardi *et al.* (1998) proposent la technique de perméation sur gel pour la purification d'un EPS produit par *L. bulgaricus*, avec de très bons taux de récupération. Looijesteinj et Hugenholtz (1999b) ont aussi utilisé la technique de perméation sur gel pour la purification des EPS. Par contre, ils ont quantifié les EPS en intégrant les signaux des différents pics provenant d'un détecteur à indice de réfraction (IR). De Vuyst *et al.* (1998) proposent la quantification des EPS par une méthode gravimétrique dans laquelle ils purifient les EPS par une précipitation sélective avec plusieurs solvants, suivie de plusieurs lavages exhaustifs et d'une déprotéinisation. La poudre résultant du précipité séché est rapportée comme la masse sèche d'EPS. Les auteurs concluent que cette méthode est la meilleure façon d'exprimer la production d'EPS. Toutefois, il faut s'assurer que la poudre ne contient que des EPS et cette méthode risque d'être longue et d'avoir de fortes pertes à cause du grand nombre d'étapes impliquées.

1.3.1.7 Quantification des EPS

En ce qui concerne le dosage des EPS purifiés, il se fait couramment par une méthode indirecte en dosant les sucres totaux par la méthode phénol-acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1956), sauf pour quelques études (Van den Berg *et al.*, 1995; De Vuyst *et al.*, 1998) qui ont

utilisé la méthode colorimétrique de l'anthrone. La méthode phénol-sulfurique dose les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides ainsi que leurs dérivés méthyle-éthers qui se trouvent dans la solution (Dubois *et al.*, 1956). Lors des dosages d'EPS, il est pris pour acquis que tous les sucres en solution ne sont que des EPS, ce qui peut être aventureux car la plupart des purifications ne sont que partielles. Un autre désavantage de la méthode est que les résultats sont exprimés en équivalent dextrose ou dextrine, parce que ce sont les sucres habituellement utilisés pour faire la courbe étalon, car ils sont les plus couramment retrouvés dans la structure des EPS. Pourtant, il est connu que les EPS sont composés de différents sucres qui ont une réponse colorimétrique différente de celle du glucose dans la méthode phénol-acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1956). Alors une erreur sur la concentration réelle en EPS peut en découler. Ce dernier inconvénient pourrait être réglé si la composition de l'EPS est connue. Mais dans la plupart des cas, le dosage des EPS est réalisé avec le but de quantifier la production pendant la fermentation avant d'élucider sa composition. Buysse et Merckx. (1993) ainsi que Taylor (1995) proposent un ajustement dans le ratio phénol:acide sulfurique utilisé lors de l'analyse des sucres afin d'obtenir une réponse absorbance/concentration égale pour chacun des sucres d'un mélange complexe.

Un de problèmes majeurs rencontrés dans la littérature est l'hétérogénéité des procédés de purification et de quantification d'EPS utilisés. En conséquence, les comparaisons de production entre différentes souches ou différentes conditions de culture sont difficiles. En effet, les quantités rapportées d'EPS dans la littérature sont souvent relatives aux méthodes de purification et de dosage utilisées. Par exemple, l'équipe de Gammar-Nourani *et al.* (1998) ont utilisé seulement une précipitation à l'éthanol (60 %) pour la purification partielle des EPS. Gancel et Novel (1994a) et Kimmel *et al.* (1998b) ont utilisé une micro-méthode pour le dosage des EPS, tandis que Cerning *et al.* (1994 b), Dupont *et al.* (2000) et Pham *et al.* (2000) ont utilisé des précipitations à l'EtOH et au TCA avec plusieurs étapes de dialyse et de lyophilisation. Marshall *et al.* (1995) ont opté pour une dialyse exhaustive seulement.

Tableau 1.4 Production d'exopolysaccharides par les LAB dans différentes conditions de fermentation et différents milieux de culture.

Souche	Milieu de culture	Type de culture	EPS maximal (mg/L)	Référence
<i>S. thermophilus</i> CNRZ 388	Lait écrémé	B	63	Cerning <i>et al.</i> , 1988
<i>S. thermophilus</i> CNRZ 388	Lait écrémé	B	337	Cerning <i>et al.</i> , 1998
<i>S. thermophilus</i>	M17+lac	B, FB; cpH	2500-3000	Petit <i>et al.</i> , 1991
<i>S. thermophilus</i> LY03	MRS	B, cpH	1142 PDM/L	Degeest et De Vuyst, 1999
<i>S. thermophilus</i>	SDM+L+1%P+0.5%YE	B; cpH	546 PDM/L	De Vuyst <i>et al.</i> , 1998
<i>L. bulgaricus</i> CNRZ 416	Lait écrémé	B	285	Cerning <i>et al.</i> , 1986
<i>L. bulgaricus</i> CNRZ 1187	Lait écrémé	B	130	Bouzar <i>et al.</i> , 1996
<i>L. bulgaricus</i> CNRZ 1187 + <i>S. thermophilus</i>	Lait écrémé	B	240	Bouzar <i>et al.</i> , 1997
<i>L. spp. bulgaricus</i> NCFB 2772	CDM + glu	B cpH	80	Grobben <i>et al.</i> , 1995
<i>L. bulgaricus</i> NCFB 2772	CDM + glu + fruc	C, cpH	25-125	Grobben <i>et al.</i> , 1996
<i>L. bulgaricus</i> NCFB 2772	mCDM + glu	B, cpH	250	Grobben <i>et al.</i> , 1997
<i>L. bulgaricus</i> RR	SDM	B, cpH	374	Kimmel <i>et al.</i> , 1998
<i>L. sake</i> 0-1	SDM	B,	1300	Van den Berg <i>et al.</i> , 1995
<i>L. casei</i> CRL 87	CDM + minéraux	B, cpH	488	Mozzi <i>et al.</i> , 1996
<i>L. casei</i> CG11	BMM + glu	B, cpH	160	Cerning <i>et al.</i> , 1994b
<i>L. rhamnosus</i> C83	CDM + man	B, cpH	124	Gammar <i>et al.</i> , 1997
<i>L. rhamnosus</i> RW-9595M	BMM + lac	B, cpH	1275	Dupont <i>et al.</i> , 2000
<i>L. rhamnosus</i> R	BMM + lac	B, cpH	601	Dupont <i>et al.</i> , 2000
<i>L. rhamnosus</i>	BMM + lac	B, cpH	85	Dupont <i>et al.</i> , 2000
<i>L. cremoris</i> SBT 0495	WP	B, cpH	150	Nakajima <i>et al.</i> , 1990
<i>L. cremoris</i>	Lait écrémé	B	164-263	Yang <i>et al.</i> , 1999
<i>L. cremoris</i> NIZO B40	CDM	B	460	Looijesteijn <i>et al.</i> , 1999
<i>Bifidobacterium longum</i>	Lait écrémé + EL	B	105-145	Andaloussi <i>et al.</i> , 1995

CDM : milieu chimiquement défini. SDM : milieu semi- défini. mCDM : milieu chimiquement défini modifié. B : fermentation en batch. FB : fermentation Fed-Batch. C : fermentation continue. cpH : contrôle de pH. PDM/L : EPS exprimé en masse sèche par litre de milieu.

De plus, la plupart des méthodes pour la quantification des EPS sont indirectes, et à cause de la faible production des EPS et des pertes de produits au cours des étapes de purification, ces méthodes ont besoin de grands volumes de milieu, de l'ordre de 100 ml. Une telle quantité de milieu pour les échantillons est difficile à obtenir lors des fermentations en batch, ce qui limite la prise d'échantillons et l'information que l'on peut en tirer sur la cinétique de production. Pour les raisons mentionnées ci-dessus, il est important de trouver des méthodes alternatives qui permettent une quantification plus efficace en termes de temps, coûts, précision et reproductibilité de la production d'EPS dans un échantillon. À cet égard, nous avons testé la méthode du proche infrarouge (NIRS) pour la quantification des EPS (section 1.2 et chapitre V). Dans notre équipe de travail, une méthode basée sur l'ultrafiltration a également été développée récemment. Elle a l'avantage d'utiliser de faibles quantités d'échantillons, elle est facile, rapide à exécuter et très précise (Bergmaier *et al.*, 2001) chapitre II).

Un autre problème relié à la purification et à la quantification des EPS est le milieu de culture utilisé. Tel que décrit précédemment, quelques composants du milieu peuvent interférer avec la purification des EPS, comme par exemple, les polysaccharides tels les mannanes provenant de l'extrait de levure (Champagne *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Avec les méthodes actuelles de dosage des EPS, il n'y a pas de moyen de distinguer les EPS produits des autres polysaccharides du milieu. Il est donc prioritaire de s'assurer que le milieu de culture utilisé pour l'étude de la production des EPS sera exempt de composants qui puissent interférer avec le dosage des EPS. Dans la littérature, plusieurs auteurs ont déjà été confrontés à ce problème. Garcia-Garibay et Marshall (1991) ont trouvé que, dans le milieu MRS, il peut y avoir des interférences avec le dosage d'EPS, probablement dues à la présence d'extrait de levure. Kimmel *et al.* (1998a) et Torino *et al.* (2000) ont rapporté que d'autres sources d'azote telles que l'extrait de bœuf, et les peptones interfèrent également avec la purification et le dosage des EPS.

Très peu d'études ont été réalisées pour mettre au point une méthode d'extraction, de purification et de quantification des EPS à l'échelle pilote et industrielle. Kimmel *et al.* (1998b) ont isolé et purifié l'EPS de *L. bulgaricus* RR avec une précipitation à l'éthanol (96

%) et une ultrafiltration. Cependant de grosses pertes ont été observées lors de la récupération du filtrat après la précipitation à l'éthanol.

Il semblerait qu'il y ait formation de très fines particules d'EPS qui flottent lors de la précipitation. Il est donc prioritaire de développer des technologies de récupération des EPS à l'échelle industrielle, tout en gardant à l'esprit que ces méthodes ne doivent pas modifier la structure et la conformation des EPS. La méthodologie d'ultrafiltration s'avèrait la plus adéquate à ce propos (De Vuyst et Degeest, 1999).

1.3.1.8 Éluclation de la structure des EPS

Si par contre, l'objectif est l'éluclation de la structure et de la composition ou du poids moléculaire des EPS, les techniques de chromatographie d'échange ionique, de filtration sur gel pour l'identification des polysaccharides neutres et la détermination du poids moléculaire (Degeest et De Vuyst, 1999), et les techniques d'électrophorèse ou de chromatographie HPLC préparative et de chromatographie en phase gazeuse, pour l'identification des EPS chargés, sont les premiers choix (Lemoine *et al.*, 1997; Low *et al.*, 1998; Van Casteren *et al.*, 1998; Looijesteijn et Hugenholtz, 1999b; Knoshaug *et al.*, 2000).

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil qui a récemment pris de l'importance pour l'identification et l'éluclation de la structure des EPS. Grâce à cette technique les interactions avec des autres composés comme les lipides ou les protéines peuvent être mises en évidence. Par les spectres de ^1H -RMN et en combinaison avec d'autres techniques analytiques, la structure primaire de la chaîne glycosidique peut être élucidée, en mesurant et en identifiant les changements de certains spins de résonance des ions H^+ dans la molécule, car leur position est fonction du champ magnétique externe causé par la densité électronique des autres atomes. Les spectres des différentes liaisons chimiques ont déjà été compilés dans une base de donnée, et l'éluclation de certaines structures résulte de la comparaison de ces spectres. Stingle *et al.* (1999) ont élucidé la structure de l'EPS produit par la souche recombinante *L. lactis* MG1363 et l'ont comparé à celle de l'EPS provenant de la souche non recombinante avec cette méthode. Les auteurs ont remarqué une différence de

composition entre les deux EPS. Leeftang *et al.* (2000) ont utilisé cette technique pour l'élucidation de la structure de polysaccharides et d'une glycoprotéine. Hugenholtz *et al.* (2000) ont utilisé les spectres de ^{31}P -RMN pour obtenir *in vivo* de l'information sur les intermédiaires clés dans la biosynthèse des EPS et le catabolisme des sucres.

1.3.1.9 Production d'EPS par les BL

De nombreuses études ont été réalisées sur la production d'EPS par les BL dans divers milieux et conditions de culture. La seule conclusion générale qui peut en être tirée, est que la production d'EPS est fortement influencée par la souche, les conditions de culture et la composition du milieu utilisé. Ainsi la production d'EPS par les différentes souches de bactéries lactiques peut varier entre 25 à 3000 mg l⁻¹. Le *Tableau 1.4* fait la compilation des productions maximales d'EPS par différentes bactéries lactiques dans différents milieux de culture et conditions de fermentation. Il faut considérer avec précaution les valeurs rapportées de production car elles proviennent de méthodes d'extraction et de dosage différentes. De plus dans certains cas, le milieu de culture dans lequel les EPS ont été produits contient d'autres polymères pouvant interférer avec le dosage des EPS (Torino *et al.*, 2000). Quoiqu'il en soit, les productions d'EPS par les BL sont très inférieures aux productions d'EPS comme le dextrane ou ceux produits par les bactéries à Gram négatif, ce qui constitue une limite à leur utilisation comme bioingrédients alimentaires.

1.3.1.9.1 Milieux de culture utilisé pour la production d'EPS

Les premiers travaux sur la production d'EPS par les BL ont été réalisés sur le lait, et l'ultrafiltrat de lait (Shellhaass et Morris, 1985; Cerning *et al.*, 1988; Nakajima *et al.*, 1990; Lemoine *et al.*, 1997). Cependant, les chercheurs se sont aperçus que ces milieux n'étaient pas propices à l'étude de la production d'EPS à cause des difficultés rencontrées lors de la purification. Alors des milieux synthétiques complexes comme le MRS, M17, etc. ont ensuite été utilisés, mais l'interférence de certains composants faussait les résultats de production (Garcia-Garibay et Marshall, 1991; Yang *et al.*, 1999). D'autres milieux ont aussi servi à l'étude de la production des EPS. Parmi ceux-ci, le perméat de lactosérum (PLS) est apparu

comme une option fort intéressante, car c'est un milieu facile à préparer, disponible en grande quantité et à un bas coût (Gassem *et al.*, 1997). Toutefois, pour étudier la biosynthèse des EPS et leur cinétique de production ainsi que pour approfondir les études sur l'impact de certains groupes de nutriments sur cette production, il est nécessaire d'utiliser des milieux semi-définis ou définis dans lesquels les composants et leurs concentrations sont connus (Marshall *et al.*, 1995; Kimmel *et al.*, 1998b; Looijesteijn et Hugenholtz, 1999b; Dupont *et al.*, 2000; Grobber *et al.*, 2000).

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère et de l'industrie des concentrés de caséines. Il est considéré comme un produit à faible valeur ajoutée. Pourtant, 1.2×10^6 tonnes de lactose et 2.0×10^5 tonnes de protéines par année provenant du traitement du lactosérum sont produits dans le monde, dont seulement 60 % est utilisé dans la formulation de produits alimentaires ou de nourriture pour le bétail (Pintado *et al.*, 1999). Le perméat de lactosérum (PLS) est le résultat de la séparation des protéines du lactosérum par des techniques d'osmose inverse ou d'ultrafiltration (Zadow, 1992). Avec les innovations dans le domaine de l'ultrafiltration et l'incrément dans l'utilisation des protéines du lactosérum (Zadow, 1992), la production du PLS (qui représente le déchet) est devenue un problème non seulement commercial mais environnemental à cause de sa forte demande d'oxygène. En effet, le perméat de lactosérum contient une forte concentration de lactose et de minéraux et une faible concentration de protéines (environ 82 %, 10 % et 3 % de l'extrait sec, respectivement) (De Boer *et al.*, 1997). L'utilisation du PLS comme base de milieu de culture pour la production de biomasse et de métabolites a été proposée depuis quelques années avec des résultats satisfaisants (Christopherson *et al.*, 1989; Parente *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1994; Lacroix, 1997). L'utilisation du PLS comme milieu de base pour la production d'EPS a aussi été envisagée, surtout parce qu'il contient une forte concentration en lactose et une faible concentration en azote organique, ce qui lui confère des caractéristiques intéressantes. Il a été, en effet, rapporté dans la littérature qu'un ratio C:N élevé favorise la production d'EPS particulièrement chez les bactéries à Gram négatif (Sutherland, 1990; Peiris *et al.*, 1998; Pintado *et al.*, 1999). En ce qui concerne les bactéries lactiques, le PLS a été déjà utilisé pour la production d'EPS. *L. cremoris* SBT 0495 produit dans un milieu à base de PLS, 150 mg l^{-1}

d'un EPS phosphorylé qui contenait seulement 0.5 % de protéines après une purification par chromatographie d'échange ionique (Nakajima *et al.*, 1990). Racine *et al.* (1991) et Gassem *et al.* (1995, 1997) ont également utilisé le PLS comme milieu de base pour la production d'EPS, en utilisant la mesure de la viscosité comme indice de la production d'EPS lors des fermentations.

1.3.1.9.2 Effet de la composition du milieu sur la production d'EPS

D'après Shellhaass et Morris (1985), toutes les souches épaississantes de bactéries lactiques mésophiles et thermophiles sont capables de produire des polysaccharides dans lait ou l'ultrafiltrat de lait additionnés de divers nutriments (Shellhaass et Morris, 1985). Cependant, ces observations sont basées sur des mesures de viscosité du milieu. Les auteurs concluent que la croissance des micro-organismes et la production d'EPS ne dépend pas de la présence de caséines ou de protéines de lactosérum. Cerning *et al.* (1990) ont montré que la production d'EPS est faible dans l'ultrafiltrat de lait enrichi en acides aminés. Ils ont aussi constaté l'effet stimulant des caséines dans la production d'EPS par une souche de *L. bulgaricus*. La supplémentation avec du glucose ou du saccharose dans un milieu à base de lait ultrafiltré augmente la production d'EPS par *L. casei* et modifie même la composition de l'EPS. En effet, le rhamnose est seulement présent quand la souche est cultivée dans un milieu synthétique (Cerning *et al.*, 1992; Cerning *et al.*, 1994 b) *L. bulgaricus* NCFB 2772 produit des quantités considérablement plus grandes d'EPS dans un milieu avec glucose ou lactose comme source de carbone que dans un milieu supplémenté avec du fructose. Dans tous les cas la production de biomasse est semblable. De plus, la composition de l'EPS change en fonction de la source de carbone (Grobben *et al.*, 1995; 1996; 1997). Pour *L. rhamnosus* C83, le glucose ou le mannose sont les meilleures sources de carbone; toutefois, une combinaison de glucose et de fructose augmente la production d'EPS (Gamar *et al.*, 1997). Non seulement la combinaison de la source de carbone a un impact sur la production des EPS, mais également la concentration à laquelle cette source est ajoutée. Ainsi les mêmes auteurs rapportent un incrément de la production d'EPS par un facteur de trois à quatre en présence de mannose (4

% p/v) ou glucose + fructose (2 % p/v, chacun), tandis que la biomasse demeure constante dans les deux cas.

Pour des bactéries à Gram négatif, il semble qu'une limitation en azote favorise la production d'EPS (Sutherland, 1994). Cependant, cela semble être le cas contraire pour les bactéries lactiques. En effet, le peu d'études sur le sujet montrent qu'une valeur optimale du ratio C :N est primordiale pour favoriser la production d'EPS (Sebastiani et al., 1998; De Vuyst *et al.*, 1998; Degeest *et al.*, 1999). Kimmel *et al.* (1998) ont aussi démontré que *L. bulgaricus* RR a besoin d'une bonne source d'azote pour produire des EPS. Ils ont trouvé que la concentration optimale de bactocasitone dans un milieu synthétique était de 30 g l⁻¹. Néanmoins, Marshall *et al.* (1995) ont observé que *L. cremoris* LC 330 produit deux EPS différents : un EPS neutre de haut PM et un autre chargé de faible poids moléculaire (Tableau 1.3). À la différence de l'EPS de faible PM, la production de l'EPS de haut PM augmente dans des conditions limitantes en azote. Degeest *et al.* (1999) ont observé que le PM d'un EPS produit par *S. thermophilus* LY03 change en fonction de la concentration initiale en azote. En effet, la proportion dans laquelle les EPS sont produits est fortement dépendante du ratio C:N. Le déplacement de la production de l'EPS de haut PM vers celui de bas PM a lieu quand la concentration initiale du complexe azoté est augmentée.

L'effet des minéraux et des vitamines sur la production des EPS n'est pas à négliger. La production d'EPS par *L. casei* CRL 7 passe de 56 mg l⁻¹ à 118 mg l⁻¹ quand un milieu défini est supplémenté en MnSO₄ (Mozzi *et al.*, 1995b). Par contre ni l'acétate, le citrate, le phosphate ou le MgSO₄ n'ont eu d'effet sur la production de l'EPS (Mozzi *et al.*, 1995a). *L. rhamnosus* C83 semblerait avoir besoin des macro-éléments MgSO₄, MnSO₄ et FeSO₄ pour la synthèse d'EPS dans un milieu défini (Gamar *et al.*, 1997). Par contre, Grobбен *et al.* (2000) n'ont pas trouvé de différences significatives dans la production d'EPS par *L. bulgaricus* en présence ou absence de Fe²⁺, Zn²⁺ ou NH⁴⁺ dans un milieu défini simplifié. De plus Mn²⁺ a eu seulement un effet positif sur la croissance de la souche.

Les vitamines jouent un rôle important non seulement dans la production d'EPS mais aussi dans la croissance de la souche. Grobбен *et al.* (1998) ont étudié l'effet des vitamines et

des acides aminés sur la production d'EPS par *L. bulgaricus* NCFB 2772 dans un milieu défini. En ce qui concerne les acides aminés, ils n'ont pas eu d'effet important sur la production d'EPS. En revanche, la production d'EPS a augmenté de 130 à 250 mg l⁻¹ quand le milieu contenait seulement de la riboflavine, du panthoténate de calcium et de l'acide nicotinique et lorsque les vitamines acide *p*-aminobenzoïque, biotine, acide folique, pyridoxamine, pyridoxine, thiamine et complexe B₁₂ ont été exclues du milieu de culture défini. Ledesma *et al.* (1977) suggèrent que les besoins en vitamines liposolubles chez *Lactobacillus* peuvent être comblés par les lipides tels que l'oléate présents dans le milieu de culture sous forme de Tween 80.

1.3.1.10 Effet des conditions de culture sur la production d'EPS

La synthèse et l'excrétion des EPS par les BL se passe durant les différentes phases de la croissance. De plus le type de biopolymère en termes de composition et de PM est fortement influencé par les conditions de culture, dont les plus importants paramètres sont la température, le pH ainsi que le temps d'incubation (Ricciardi et Clementi, 2000).

La température de fermentation est un paramètre fort important pour la production d'EPS. Cependant, les résultats rapportés sont contradictoires. Plusieurs travaux rapportent que la production maximale d'EPS a lieu à des températures sub-optimales de croissance. Cerning (1990) a remarqué que la production d'EPS chez certaines bactéries mésophiles augmente de 50 à 60% à une température de 25°C au lieu de 30°C. La souche de *S. thermophilus* utilisée par Gancel et Novel (1994a) atteint sa production maximale d'EPS dans la phase stationnaire de croissance et lorsqu'elle est incubée à 10°C pourvu que la source de carbone soit le saccharose. Gamar *et al.* (1997) rapportent que la production d'EPS est 37 % plus importante entre 20 à 25°C qu'à 37°C, la température optimale de croissance. Par contre, d'autres travaux rapportent que la production d'EPS augmente en augmentant la température de fermentation. Par exemple, la production d'EPS par *L. bulgaricus* est augmentée par un facteur 2 à une température entre 40 à 45°C, en comparaison à 37 °C (Garcia-Garibay et Marshall, 1991). En revanche, une température de 47°C entraîne la perte du caractère épaississant de la souche *L. bulgaricus* NCFB 2772 (Grobber *et al.*, 1995). Cependant, la production maximale d'EPS par

L. casei CRL87 est de 121 mg l⁻¹ avec une production spécifique de 6.4 mg (10¹¹cfu)⁻¹ est obtenue à 30°C, la température optimale de croissance (Mozzi *et al.*, 1996).

En ce qui concerne l'effet du pH du milieu de culture, il peut être contrôlé et maintenu constant au cours de la fermentation ou seulement fixé au début de la fermentation sans contrôle ultérieur. Lors d'études sur l'effet du pH, il a été démontré que le contrôle du pH favorise la production d'EPS chez *L. casei* CRL87 (Mozzi *et al.*, 1994). De la même façon il a été établi qu'un pH initial entre 6.0 et 6.5 favorise la production d'EPS, car la conversion du sucre en EPS est plus efficace dans cet intervalle de pH. En revanche, la conversion des sucres pour la croissance et le maintien de la souche se fait à un pH plus élevé (De Vuyst et Degeest, 1999). Cependant, Kimmel *et al.* (1998b) ont trouvé que les conditions optimales de température, pH et concentration en azote (bactocasitone) pour la production d'EPS chez *L. bulgaricus* RR étaient 38°C, 5.0 et 30 g l⁻¹, respectivement, avec une production maximale d'EPS de 374 mg l⁻¹, soit un pH plus bas que celui pour la production de biomasse. *L. casei* CRL 87 produit 488 mg l⁻¹ d'EPS quand il est cultivé à pH 6.0; par contre la production spécifique maximale d'EPS 3.9x10⁻⁵ g EPS (g de biomasse sèche)⁻¹ a été obtenue à pH 4.0 (Mozzi *et al.*, 1996; De Vuyst et Degeest, 1999). Un pH de 5.8 favorise la production d'EPS chez *L. sake* 0-1, tandis qu'un pH de 6.2 stimule la croissance (Van den Berg *et al.*, 1995). Dans une étude sans contrôle de pH menée par Gancel et Novel (1994a), la production d'EPS était non seulement fonction du pH mais aussi de la source de carbone utilisée. Ainsi, le pH optimal pour *S. thermophilus* S22 était de 7.0 en présence de lactose et de 5.5 quand la source de carbone était le saccharose. En conclusion, il a été observé que le pH optimal de production d'EPS est voisin de celui de la croissance optimale. Par contre la production spécifique d'EPS augmente quand le pH ou la température sont sub-optimaux (Gamar *et al.*, 1997; Ricciardi et Clementi, 2000). Enfin, il semblerait qu'une faible concentration d'O₂ (10 %) stimulerait la biomasse et la production d'EPS par *L. rhamnosus* C83 (Gamar-Nourani *et al.*, 1998).

Une partie des données précédentes sont en accord avec l'hypothèse de Sutherland (1982) qui propose que toutes conditions défavorables à la croissance cellulaire sont favorables à la production d'EPS car certaines des enzymes impliquées dans la synthèse des EPS ont aussi

d'autres rôles dans la cellule. Par exemple, elles sont responsables de la synthèse d'autres polysaccharides de la paroi cellulaire (Looijesteijn et Hugenholtz, 1999b). De plus les intermédiaires lipidiques participent, eux aussi à la formation des polysaccharides de la paroi cellulaire. Donc dans des conditions optimales de croissance, ces enzymes ainsi que les intermédiaires lipidiques sont moins disponibles pour la synthèse des EPS. Par contre, dans des conditions de culture où la croissance est ralentie (conditions de stress ou pendant la phase stationnaire de croissance), la production de polysaccharides de la paroi cellulaire diminue et les enzymes et intermédiaires lipidiques sont alors davantage disponibles pour la synthèse des EPS.

Finalement, de longues périodes d'incubation ont des effets de dégradation sur les EPS. Ceci peut être dû à l'action des hydrolases (Sebastiani et Zelger, 1998; Sutherland, 1999; Pham *et al.*, 2000) ou bien à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des biopolymères (Stingele *et al.*, 1996). Quoi qu'il en soit, ce phénomène est dépendant de la souche et des conditions de culture. Pour cette raison, il est important d'avoir une connaissance approfondie sur la cinétique de production des EPS afin d'arrêter le processus de production avant qu'une hydrolyse n'ait lieu.

1.3.1.11 Cinétique de production des EPS

La production d'EPS chez les BL peut être associée à la croissance cellulaire, comme dans le cas des bactéries thermophiles (Petit *et al.*, 1991; Grobber *et al.*, 1995; De Vuyst et Degeest, 1999). Dans des conditions de contrôle de pH et dans un milieu défini, *L. sake* 0-1 produit des EPS durant la phase de croissance (Van den Berg *et al.*, 1995). *S. thermophilus* SY a une production d'EPS associée à la croissance lorsque cette souche est cultivée dans des conditions optimales de croissance. De plus, dans des conditions de stress, la production d'EPS par unité de biomasse augmente (Ricciardi et Clementi, 2000). De Vuyst *et al.* (1998) attribuent une relation directe entre la production d'EPS, la croissance microbienne et l'équilibre entre la source de carbone et la source d'azote. En effet, *S. thermophilus* LY03 atteint sa production maximale d'EPS dans des conditions optimales de croissance durant la phase exponentielle et avec un ratio C:N équilibré.

La biosynthèse d'EPS pendant la phase stationnaire de croissance ne doit cependant pas être exclue (Marshall *et al.*, 1995; Manca de Naira *et al.*, 1996; Looijesteijn et Hugenholtz, 1999b). Pour *S. thermophilus* la production d'EPS a lieu notamment pendant la phase stationnaire de croissance (Gancel et Novel, 1994a). Pour *L. bulgaricus* NCFB 2772 en fermentation en continu, la production spécifique d'EPS augmente en fonction de la température, tandis qu'en fermentation en batch, la production d'EPS continue lorsque la phase stationnaire a été atteinte, particulièrement si le milieu de culture défini n'est supplémenté qu'avec l'acide nicotinique, le panthoténate de calcium et la riboflavine comme source de vitamines (Grobben *et al.*, 1998). De Vuyst *et al.* (1998) suggèrent que les conclusions de Sutherland sont valables pour les bactéries à Gram négatif mais des voies métaboliques secondaires ont aussi été proposées pour les BL (Gancel et Novel, 1994a; Manca de Nadra *et al.*, 1996).

D'autre part dans certaines conditions de culture ou de composition de milieu, certaines souches peuvent produire plusieurs types d'EPS. En effet, Gancel et Novel (1994a) ont proposé deux mécanismes de production d'EPS pour la souche *S. thermophilus* S22, en fonction de la température et de la source de carbone, avec une production maximale d'EPS durant la phase stationnaire. Si la souche est cultivée avec du lactose, la production maximale d'EPS a lieu à une température optimale de 42°C et elle est indépendante du pH. En revanche si la souche est cultivée dans le saccharose, la production maximale d'EPS a lieu à pH 5.5 et 10°C. Marshall *et al.* (1995) ont aussi constaté la production de deux EPS par *L. cremoris* en fonction des conditions de culture et de la concentration de la source azotée. Grobben *et al.* (1997, 1998) ont trouvé que *L. bulgaricus* C 2772 produisait deux polysaccharides différents en fonction des conditions de culture. Degeest et De Vuyst (1999) ont isolé deux EPS de PM différents produits par *S. thermophilus* LY03. Lorsque la concentration initiale en azote augmentait dans le milieu de culture, la production de l'EPS de haut PM (1.8×10^6 Da) s'arrêtait et la production de l'EPS de faible PM (4.1×10^5 Da) prenait place. Bouzar *et al.* (1997) rapportent un changement de la composition de l'EPS produit par un mélange de *L. bulgaricus* CNRZ 1187 et *S. thermophilus* CNRZ 389 durant la phase exponentielle. Lorsque la phase stationnaire est atteinte, la composition demeure stable. Knoshaug *et al.* (2000) sont arrivés à

la conclusion que pour les souches qui produisent deux EPS différents, un des EPS est généralement associé à la croissance cellulaire et il est produit lorsque les conditions de culture sont optimales, tandis que le deuxième est toujours produit dans des conditions de stress pour la souche.

Enfin, il est possible que la production d'EPS dans des conditions optimales de croissance dépende de la disponibilité des sucres nucléotides et des intermédiaires lipidiques (Sutherland, 1982). Par contre, cette production peut être régulée par les conditions de culture quand ces conditions sont non optimales ou en présence d'un nutriment limitant. Looijesteijn et Hugenholtz (1999) suggèrent que les raisons précédentes puissent expliquer la production deux sortes de exopolysaccharides dans les différentes phases de croissance.

1.3.1.12 Applications des EPS dans les aliments

1.3.1.12.1 Les yoghourts et les laits fermentés brassés

La mondialisation des marchés alimentaires et les demandes de plus en plus exigeantes des consommateurs soucieux de leur santé a obligé les fabricants de yoghourts à développer une nouvelle gamme de produits, tels que les yoghourts brassés, aux fruits, aromatisés ou à boire. Cependant, le yoghourt préparé avec des souches non-épaississantes subit une perte de texture après le brassage ou à cause de la précipitation des caséines à pH acide (Rawson et Marshall, 1997). Il est donc souvent nécessaire d'ajouter des stabilisants d'origine microbienne (xanthanes) ou d'origine végétale (carraghénanes, alginates, pectines) afin de conserver la texture originale du produit et d'empêcher la synérèse. L'utilisation de souches productrices d'EPS est de plus en plus favorisée, parce que ces polymères sont produits *in situ* et ils augmentent la viscosité et aident à garder la texture du produit stable après un traitement mécanique. De plus ils diminuent la synérèse et favorisent le maintien du goût et la texture du produit en bouche (Van Kranenburg *et al.*, 1999; De Vuyst et Degeest, 1999)

Les EPS pourraient donc devenir une alternative intéressante à l'addition des stabilisants dans les produits fermentés avec une faible concentration en solides du lait et dans

des produits allégés. Mais sans doute un enjeu important de leur utilisation en tant que bioingrédients alimentaires serait leur possible effet prébiotique, discuté dans la section suivante. L'utilisation des souches productrices d'EPS est particulièrement exploitée dans les pays de la Communauté Européenne car l'addition de stabilisants dans les yoghourts y est interdite (Zourari *et al.*, 1992).

Il est difficile d'établir une corrélation entre la production des EPS et l'incrément de la viscosité dans les produits fermentés, à cause du changement dans la configuration tridimensionnelle du polymère et de ses interactions avec les autres composés dans le milieu (protéines et bactéries). De plus, l'interprétation de la viscosité de fluides non-newtoniens n'est pas toujours évidente. Des études en microscopie électronique à balayage (SEM) ont démontré qu'il y a la formation d'un réseau entre les bactéries, les caséines et les polysaccharides (*Figure 1.5*). La formation d'un tel réseau conditionne la texture et la viscosité des yoghourts. Cependant, après l'application d'une force de cisaillement croissante, la rupture des attaches entre la surface des bactéries et les EPS a lieu, mais les attaches entre les caséines et les EPS demeurent stables (Teggatz et Morris, 1990).

Des souches mésophiles productrices d'EPS du genre *Lactococcus* sont utilisées traditionnellement dans les pays Scandinaves pour la production des laits fermentés tels que le « Viili » (Kontusaari *et al.*, 1988) en Finlande et le « Longfil » en Suède (Neve *et al.*, 1988). Ces bactéries produisent au cours de la fermentation un EPS qui forme un réseau entre les bactéries et les caséines où ces dernières forment un conglomerat, ce qui donne d'ailleurs les caractéristiques organoleptiques particulières à ces produits.

Hess *et al.* (1997) ont comparé les propriétés rhéologiques des yoghourts fabriqués avec trois souches EPS⁺ et une souche EPS⁻ de *L. bulgaricus*. Ils ont trouvé que les yoghourts fabriqués avec les souches EPS⁺ formaient un gel moins susceptible à la synérèse, mais plus fragile à la rupture. Ils ont conclu que la quantité d'EPS produite ne joue pas un rôle important dans les caractéristiques rhéologiques du produit, mais que c'est plutôt les caractéristiques moléculaires de l'EPS qui favorisent les interactions entre les protéines, les cellules et les EPS pendant la fermentation et confèrent les caractéristiques rhéologiques du produit. Rawson et

Marshall (1997) ont constaté que la concentration, la composition et la structure des EPS ont une forte influence sur le comportement rhéologique du yoghourt, ce qui est directement relié à la souche utilisée, car certaines souches productrices d'EPS n'ont aucun effet sur les propriétés rhéologiques du yoghourt. La *Figure 1.6* illustre l'interaction des facteurs qui interviennent dans la texture du yoghourt.

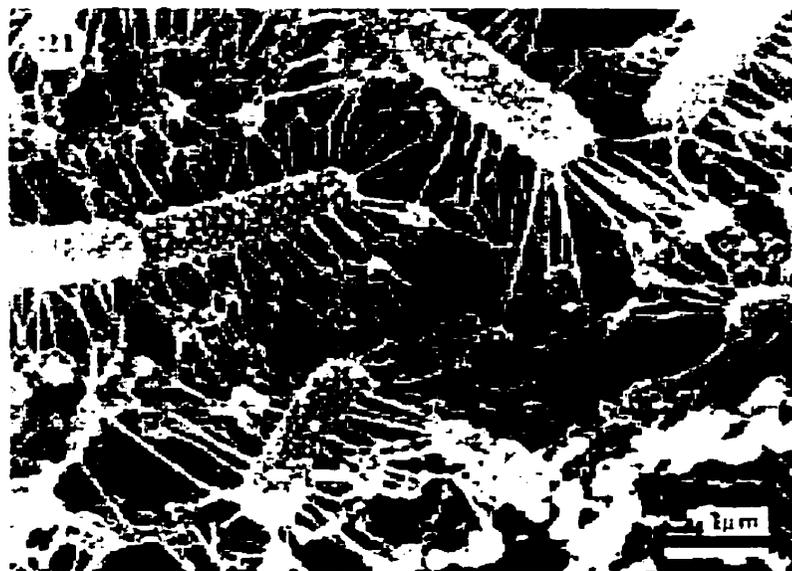


Figure 1.5 Mise en évidence de la formation d'un réseau entre les EPS, les cellules de *Lactobacillus* et les caséines par la technique de microscopie électronique à balayage, lors de la fabrication du yoghourt commercial (Kalab *et al.*, 1983).

1.3.1.12.2 Les produits allégés en matière grasse

Ces dernières années, le développement des produits laitiers faibles en matière grasses a pris beaucoup d'importance. Cependant, la diminution de cet important composé dans les produits entraîne des problèmes de stabilité et de perception organoléptique, il est donc nécessaire d'utiliser des stabilisant. Les EPS produits par les BL semble un option intéressante. Perry *et al.* (1997) ont fabriqué des fromages mozzarella allégés avec un couple *L. bulgaricus* MR-1R/ *S. thermophilus* MR-1C EPS⁺ et un couple *L. bulgaricus*/ *S. thermophilus* EPS⁻. Ils ont comparé l'effet des EPS sur la rétention d'eau et la fusion du fromages. Ils ont observé que

les fromages fabriqués avec les souches EPS⁺ avaient une rétention d'eau de 3 % ainsi qu'une augmentation des propriétés de fusion en comparaison avec les fromages fabriqués avec les souches EPS⁻. Dans une expérience ultérieure, les mêmes auteurs ont additionné des bactéries mésophiles EPS⁺ et EPS⁻ pour la fabrication de fromages. Ils n'ont pas trouvé une augmentation significative dans la rétention d'eau. La poursuite de ce travail a permis d'élucider que la souce responsable de la rétention d'eau était *S. thermophilus* MR-1C, et que la présence de capsules était nécessaire à la rétention d'eau. Pour arriver à ces résultats, les auteurs ont préparé des fromages en utilisant *S. thermophilus* MR-1C EPS⁺ et une souche recombinante qui avait perdu son caractère EPS (Low *et al.*, 1998). *L. cremoris* 322 producteur d'EPS a été utilisé pour la fabrication de la crème glacée afin d'étudier le rôle des EPS en tant qu'agent stabilisant. Les crèmes glacées contenant des EPS ont montré une bonne stabilité aux fluctuations de température. Par contre, leurs propriétés organoleptiques ont été diminuées, dû en partie, à la suracidification de la souche EPS⁺ (Christiansen *et al.*, 1999). Enfin, une étude sur la perception de la couleur blanche du lait écrémé non fermenté et fermenté a été réalisée par Rankin et Brewer (1998) avec *L. lactis* spp. *lactis* HB (EPS⁺) et *L. lactis* spp. *lactis* SCO-236 (EPS⁻). Les résultats montrent que les laits fermentés ressemblent plus aux laits entiers dont l'effet des EPS⁺ augmente encore cette perception.

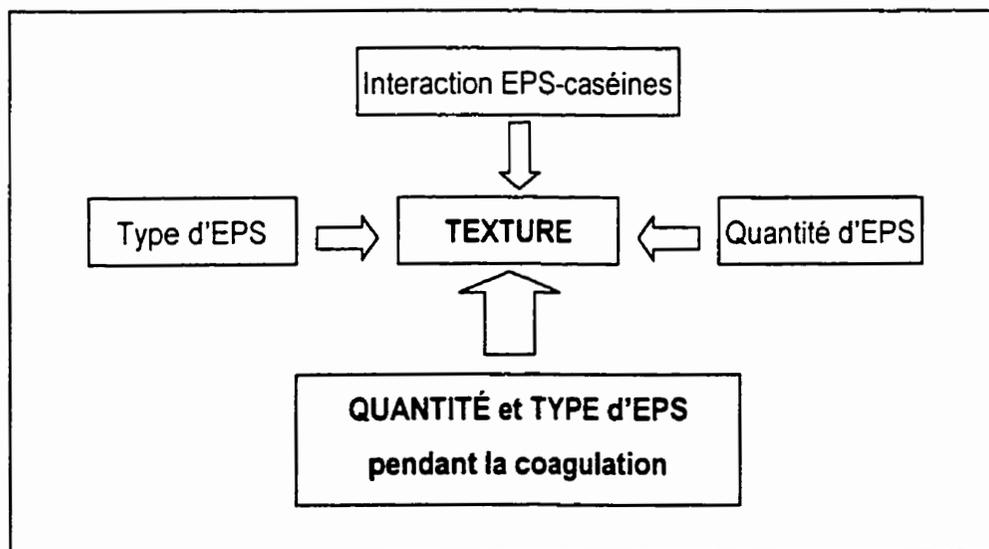


Figure 1.6 Les différents facteurs agissant avec les EPS pour donner la texture aux yaourts (Lavezzari *et al.*, 1997).

1.3.1.13 Le rôle bénéfique des EPS sur la santé

Plusieurs recherches ont démontré les effets bénéfiques de certains polysaccharides produits par les LAB. Le nombre croissant d'études sur les EPS des BL est donc justifié parce que ces polymères pourraient avoir des propriétés prébiotiques (Young, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999; Heyman, 2000). En 1983, les études d'Oda *et al.* ont démontré une activité antitumorale pour l'EPS synthétisé par *L. helveticus* var. *yugurti*. Ils ont utilisé des souris greffées de sarcomes à qui ont injectées pendant 9 jours une préparation du polymère. La durée de survie des souris a augmenté de 62 %. Nakajima *et al.* (1992) ont trouvé que les rats ayant consommé du lait fermenté par la souche *L. cremoris* SBT 0495 qui produit un polysaccharide composé de rhamnose, glucose, galactose et phosphore, avaient un taux de cholestérol plus faible que ceux qui avait pris soit un lait acidifié, soit un lait fermenté avec le variant EPS⁻.

Kitazawa *et al.* (1996) ont fait une recherche exhaustive pour clarifier le rôle d'un phosphopolysaccharide produit par la souche *L. cremoris* SVK20 utilisée dans la fabrication de « Viili » dans l'augmentation de la cytotoxicité des macrophages péritonéaux. Il semble que cet EPS composé de rhamnose, glucose, galactose et phosphore induit la production d'interféron et d'interleukine dans les macrophages. Les auteurs ont conclu que cet exophosphopolysaccharide agit comme un modulateur de la réponse biologique. Donc tous les produits fermentés avec la souche qui le produit peuvent être catalogués comme aliments physiologiquement fonctionnels. En 1998, Kitazawa *et al.* ont étudié un autre EPS composé de glucose, galactose et phosphore produit par *L. bulgaricus* OLL1073R-1 qui a une activité mitogénique sur les lymphocytes B. Il semblerait que le groupe phosphate agit comme déclencheur de l'induction mitogénique (Kitazawa *et al.*, 1998). Hosono *et al.* (1997) ont caractérisé la partie soluble d'un polysaccharide avec une activité mitogénique. Il favorise la prolifération des splénocytes de la murine. Ce polysaccharide d'un PM moyen de 1.5×10^6 Da est composé de glucose et galactose seulement, mais contient des résidus galacto-furanosyles caractéristiques qui pourraient lui conférer son caractère prébiotique.

Nagaoka *et al.* (1994) ont testé les effets anti-ulcère de trois souches probiotiques *in vivo* et *in vitro*, en provoquant des ulcères chez les souris par induction avec de l'acide acétique

et de l'éthanol et en utilisant les cellules gastro-épithéliales et les macrophages péritonéaux des souris, respectivement. Ils ont trouvé que les polysaccharides capsulaires des souches *Bifidobacterium breve* YIT4014 et 4043 ainsi que *Bifidobacterium bifidum* YIT4007 avaient un effet anti-ulcère *in vivo* et *in vitro*. Cet effet augmentait en fonction de la concentration en rhamnose du biopolymère. Ainsi, les polysaccharides ayant une concentration en rhamnose supérieur à 60% ont été le plus efficaces

1.3.2 Conclusions

L'utilisation des bactéries lactiques épaississantes constitue une excellente alternative à l'addition de stabilisants car elles produisent *in situ* des polymères capables de stabiliser, augmenter la viscosité et empêcher la synérèse. Les EPS peuvent également substituer la matière grasse dans la fabrication des produits allégés ou remplacer une partie des solides du lait, en donnant une bonne texture et en diminuant les coûts de production. De plus, l'origine naturelle et le caractère GRAS constitue un avantage majeur dans l'utilisation de ces composés dans les produits. Cependant, ces polymères sont seulement utilisés *in situ* d'une part à cause de leur faible production et d'autre part à cause des connaissances limitées sur leur propriétés rhéologiques et prébiotiques. Pour ces raisons, il est impératif de trouver une technologie afin d'augmenter leur production, de mieux les caractériser et ainsi de développer une nouvelle gamme de produits alimentaires.

Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques des EPS comme la répétition des unités, le poids moléculaire, la viscosité intrinsèque, la polydiversité, le degré de ramification, le rôle des enzymes impliquées dans leur biosynthèse ainsi que celles qui interviennent dans leur dégradation et leur caractère prébiotique sont en étude. Toutefois, de nombreuses incertitudes demeurent encore sur la relation entre la structure chimique des EPS, leur conformation, leurs associations inter- et intra-moléculaires, leurs effets sur la santé et leurs propriétés fonctionnelles. Les développements importants en biologie moléculaire ont permis d'approfondir les connaissances, de mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse des EPS, et d'expliquer le problème d'instabilité du phénotype du caractère épaississant. Toutefois, cette approche n'a pas encore permis d'augmenter la production des EPS. Pour cette

raison, une meilleure connaissance de la physiologie des BL productrices d'EPS en combinaison avec l'utilisation de techniques de fermentation traditionnelles ou nouvelles et l'implémentation des milieux de culture bien formulés en fonction des besoins particuliers de chaque bactérie pourront permettre d'augmenter et d'optimiser la production des EPS par les BL et de les rendre concurrentiels pour les marchés agro-alimentaire et pharmaceutique.

1.4 Spectroscopie proche infrarouge (NIRS)

Le proche infrarouge (NIR) est une excellente technique spectroscopique d'analyse des propriétés des produits alimentaires. De façon qualitative, la technologie NIR fait l'identification rapide de matériaux. De façon quantitative, le NIR peut déterminer une ou plusieurs propriétés physiques (température, viscosité) ou certaines propriétés chimiques (doubles liaisons, groupes OH, etc.) d'un échantillon en mesurant la lumière transmise à travers celui-ci ou par la réflexion de la lumière sur la surface de l'échantillon (Rodriguez-Otero *et al.*, 1997). La technologie du proche infrarouge est considérée comme une technique secondaire d'analyse, car elle doit être étalonnée en utilisant comme référence, des analyses classiques (primaires). Néanmoins, parmi les avantages de cette méthodologie se trouvent sa rapidité et la faible quantité d'échantillon requise. De plus, c'est une méthode non-destructive, les échantillons n'ont besoin d'aucune préparation et des échantillons opaques peuvent être analysés. Plusieurs composés peuvent être également analysés simultanément.

1.4.1 Bases théoriques

Les molécules organiques composées de C, O, H, N, P et S et d'autres éléments en plus faibles quantités, sont toujours en mouvement. Ce mouvement génère des vibrations qui en fonction de leur intensité, peuvent être captées à différentes longueurs d'onde. Ainsi, les vibrations qui impliquent un mouvement du moment dipolaire génèrent une absorption dans la région infrarouge. L'absorption fondamentale ν_j (composée de l'énergie vibrationnelle (ν) et de l'énergie rotationnelle (j)) prend principalement place dans la région du moyen infrarouge entre 2500 et 15000 nm (400 à 4000 cm^{-1}). Tandis que dans la région du proche infrarouge entre 700 et 2500 nm (4000-12000 cm^{-1}), les harmoniques des bandes fondamentales (800 –

2100 nm) et les bandes de combinaison (2100–2500 nm) prennent place (Giangiaco *et al.*, 1994). Les vibrations dans l'infrarouge sont de deux types : harmoniques et anharmoniques. Les vibrations harmoniques génèrent des ondes sinusoïdales ou cosinusoïdales tandis que les vibrations anharmoniques génèrent des ondes périodiques mais non sinusoïdales. Cependant, ce dernier type d'onde peut être décomposé en composantes sinusoïdales ou cosinusoïdales. Chaque bande d'absorption possède une série d'harmoniques d'intensité décroissante. Par exemple, si la bande fondamentale d'une molécule se situe à 3100 nm, ses premiers harmoniques se situent à 1/2 et 1/3 de cette bande fondamentale, soit à 1640 et 1100 nm, respectivement. Le premier harmonique (ν_{2j_2}) est plus faible en intensité que la bande fondamentale car moins de molécules atteignent ce niveau d'énergie. En effet, l'intensité des bandes en proche infrarouge est plus faible par un facteur entre 10 et 100 que l'intensité des bandes absorbées en infrarouge moyen. Ainsi, le second harmonique sera donc plus faible et ainsi de suite. Pratiquement, les absorptions des harmoniques plus élevées que trois sont peu significatives dans la région proche infrarouge, car leurs intensités sont trop faibles et tendent par surcroît à être masquées par des harmoniques plus intenses appartenant à d'autres types de molécules qui absorbent à la même fréquence (Laporte, 1996).

Les bandes de combinaison sont le résultat de la liaison de deux ou plusieurs absorptions moléculaires. En effet, la bande de combinaison prend place lorsque les photons absorbés excitent deux ou plusieurs vibrations simultanément. Ainsi, les nuages électroniques des atomes impliqués dans la vibration limitent l'approche des deux noyaux et ils créent une barrière d'énergie. Alors la liaison peut se briser si elle est trop étirée (lorsque le niveau d'énergie vibrationnel atteint l'énergie de dissociation) (McKelvy *et al.*, 1998). L'intensité d'absorption décroît habituellement avec l'augmentation du nombre de vibrations couplées. Les bandes de combinaison les plus fortes sont celles provenant de l'élongation d'une liaison C-H et de son premier harmonique (1500 et 3000 nm). Les bandes d'absorption les plus fréquemment rencontrées dans la région proche infrarouge sont les seconde et troisième harmoniques des vibrations d'élongation des bandes fondamentales en moyen infrarouge des liaisons O-H, C-H et N-H. Ces absorptions sont causées en premier lieu par les vibrations d'élongation symétriques et asymétriques ainsi que de déformation (McDonald, 1986). Les

autres liaisons détectées dans le proche infrarouge sont celles de l'élongation sur la double liaison du groupement carbonyle (C=O) ainsi que les vibrations d'élongation sur le lien carbone-carbone (C-C) (Laporte, 1996).

1.4.2 Le modèle chémométrique

Le proche infrarouge vise essentiellement à estimer la composition chimique et / ou les propriétés physiques d'un produit donné à partir des spectres. Cependant, pour que l'information du spectre (X) puisse être traduite en données chimiques ou physiques (Y), il faut établir un modèle mathématique afin de connaître la relation entre X et Y. Développer un modèle d'étalonnage consiste donc à établir, par l'évaluation de divers types de traitement des données ainsi que par l'utilisation de méthodes statistiques variées, la relation entre X et Y sous forme d'équation qui s'ajuste le plus à la réalité (Giangiacomo et Nzabonimpa, 1994). Cette approche mathématique est nommée la chémométrie. Le modèle résultant du traitement mathématique et statistique est ensuite utilisé pour la validation sur des échantillons avec les mêmes caractéristiques qui n'ont pas servi à bâtir le modèle d'étalonnage. Enfin, le modèle est employé pour la prédiction de la composition chimique et / ou des propriétés physiques d'une population d'échantillons semblables à ceux qui ont servi à établir le modèle. La précision et la robustesse du modèle sera fonction d'une part du nombre d'échantillons utilisés pour faire l'étalonnage et, d'autre part, de la représentativité de la population des échantillons (Laporte, 1996).

Afin de traduire l'information spectrale en données chimiques ou physiques, l'utilisation de méthodes mathématiques est indispensable. En premier lieu, grâce à l'utilisation de ces méthodes, il est possible de discriminer les différents signaux de plusieurs composés des échantillons qui ont une nature très complexe. En deuxième lieu, il peut exister une dépendance entre la réflexion et les propriétés dispersives d'un échantillon en regard de la taille de particules (Laporte, 1996).

Parmi les méthodes mathématiques couramment utilisées se trouvent la régression linéaire multiple (MLR) pour la prédiction d'une variable (i.e. teneur en protéines) à partir de plusieurs variables (les signaux spectraux à différentes longueurs d'ondes) :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p \quad (1.1)$$

L'analyse en composantes principales (PCR) est aussi utilisée pour bâtir des modèles mathématiques. La PCR utilise l'information spectrale complète, plutôt que certaines longueurs d'onde, comme c'est le cas de la MLR. La PCR prend les longueurs d'ondes intercorrélées et les transforme en un ensemble de nouvelles variables indépendantes appelées composantes principales. Cette méthode utilise des facteurs qui vont relier les variables réelles et les variables des composantes principales afin de mieux décrire la variabilité de l'information spectrale. Cette méthode génère donc une matrice orthogonale où les valeurs sont échelonnées de -1 à +1.

La méthode des moindres carrés (PLS*) est une des méthodes les plus utilisées. Elle est utilisée quand les bandes d'absorption sont superposées, ou bien quand il y a plusieurs composés à quantifier dans la même solution (Brimmer *et al.*, 1993). Cette méthode repose sur le fait que les données de références sont utilisées, au même titre que les données spectrales au moment de l'établissement du modèle mathématique. Avec l'utilisation des facteurs, la quantification de plusieurs composés est assurée; les interférences causées par des autres composés présents dans la solution sont prises en considération et la ligne de base des spectres est ajustée (Brimmer et Hall, 1993). Pour ce faire, on détermine les facteurs qui représentent une série de composantes principales basés sur les spectres de référence. Les facteurs expliqueront à la fois les variables de références et celles des spectres. Les colonnes d'une matrice de données chimiques (C) sont employées pour déterminer les facteurs pour la matrice des spectres (R) tandis que simultanément les colonnes de cette dernière servent à estimer les facteurs de la matrice de référence. Le modèle peut être décrit de la façon suivante :

$$R = TP + E \quad (1.2)$$

$$C = UQ + F \quad (1.3)$$

Où T et U représentent les valeurs de chaque facteur issus de la combinaison linéaire de ces facteurs afin de reconstruire chacun des spectres d'étalonnage. La quantité de chaque facteur nécessaire à la reconstruction est appelée scores. P et Q expriment la façon comme X (spectre) et Y (référence chimique) sont reliés à chacun des facteurs (loadings). Enfin, E et F représentent les matrices d'erreur.

Le nombre des facteurs nécessaires pour obtenir un étalonnage est établi par un processus de validation croisée. Dans un premier temps, un groupe d'échantillons est mis de côté tandis que le reste sert à établir l'équation d'étalonnage. Ensuite cette dernière sert à effectuer la prédiction sur les échantillons écartés initialement. Dans un deuxième temps, le premier groupe d'échantillons est retourné dans le lot total des échantillons et un deuxième groupe d'échantillons est sélectionné pour être prédit à partir d'une nouvelle équation d'étalonnage et ainsi de suite. À chacun des essais, une erreur de prédiction est calculée (SEP). L'opération recommence jusqu'à que tous les échantillons aient été écartés et aient contribué, par groupe, au calcul de l'erreur de prédiction. Lorsqu'un nouveau facteur s'ajoute dans le modèle d'étalonnage, l'erreur de prédiction diminue car la validation est de mieux en mieux expliquée (Laporte, 1996). La performance du modèle mathématique est donnée donc par la valeur du coefficient de corrélation (R^2) qui indique le pourcentage de la variabilité expliquée par le modèle, l'erreur de validation (SEC) qui indique le pourcentage d'ajustement du modèle mathématique à la réalité, l'erreur de la validation croisée (SECV) qui proportionne une bonne estimation de la précision de l'équation d'étalonnage et l'erreur de prédiction (SEP) qui estime la précision de l'équation d'étalonnage lors d'une quantification.

1.4.3 Utilisation du proche infrarouge pour la quantification de composés

1.4.3.1 Analyses des aliments

Le proche infrarouge a été utilisé depuis les années 80 pour le contrôle de la qualité des grains, en fonction de la concentration en β -glucanes solubles (Allison *et al.*, 1978) et la caractérisation des polysaccharides de l'orge (Szczodrak *et al.*, 1992a; 1992b). La qualité des

grains pour le bétail a été déterminée par NIR en mesurant la concentration d'amidon dans les grains (Kim *et al.*, 1990). La qualité nutritionnelle du fourrage (Smith *et al.*, 1998) et la composition des produits naturels, par exemple la quantification des différents ginsengosides que contient le ginseng américain, a été déterminée par la combinaison de la spectroscopie visible et dans la spectroscopie proche infrarouge (Ren *et al.*, 1999).

Depuis les années 90, la spectroscopie NIR a été utilisée dans l'industrie pharmaceutique et dans l'analyse des produits alimentaires, comme outil de contrôle de la qualité des procédés de fabrication. Elle permet la quantification des acides gras libres dans les graisses et les huiles ou les farines, l'analyse des sucres, des acides organiques et des solides totaux dans les jus des fruits (Putzig *et al.*, 1994) ou le contrôle de qualité des procédés d'élaboration du sucre à partir de la betterave et de la canne à sucre (Edye *et al.*, 1993). La technologie NIR a été utilisée pour déterminer la cristallinité et l'humidité de certains polymères, ainsi que l'effet de la température du procédé sur la structure de ces composés (Zhu *et al.*, 1992). Ces mêmes auteurs ont déterminé par la méthode NIR la viscosité intrinsèque d'un polymère en polycarbonate et la concentration en polybutylène téréphtalate du même polymère.

1.4.3.2 Produits laitiers

La technologie du proche infrarouge est utilisée notamment dans la détermination de l'humidité et de la matière grasse dans les poudres de lait et de lactosérum et du pourcentage de matières sèches ainsi que de la teneur en gras et en protéines dans de nombreux produits laitiers, dont les yogourts, les fromages, les laits en poudre et les laits concentrés. Le proche infrarouge a été aussi utilisé pour suivre la cinétique d'hydrolyse de la κ -caséine, ou pour déterminer le temps de coupage du caillé. Le débit pour l'ultrafiltration du lactosérum a été contrôlé par NIR : le ratio de la concentration de protéines et celle des solides totaux est contrôlé automatiquement par « feed-back » en fonction des données obtenues en ligne (Laporte *et al.*, 1998).

1.4.3.3 **Contrôle des procédés**

L'étude et le contrôle efficace des procédés biocatalytiques requièrent un suivi en temps réel de certains paramètres. Avec l'utilisation des sondes en ligne, il est possible à l'heure actuelle, de mesurer différents paramètres physiques et chimiques dans le milieu de culture. Cependant, des paramètres tels que la concentration des substrats et des autres nutriments, ou la production de métabolites et de biomasse sont généralement obtenus à partir des analyses du laboratoire qui prennent du temps et, dans certains cas, obligent à l'utilisation de solvants non compatibles avec l'environnement. À cause de l'opacité des milieux de culture, l'utilisation des techniques spectroscopiques est limitée puisque la diffusion de la lumière à travers les cellules modifie les caractéristiques spectrales reliées à la composition du milieu. Contrairement aux autres régions spectrales, l'absorption dans la région du proche infrarouge (NIR) est faible et peut être utilisée pour analyser des échantillons absorbant et diffusant fortement la lumière (Brimmer et Hall, 1993; Vaccari *et al.*, 1998). En effet, dans les années 90, l'utilisation de la spectroscopie NIR a pris de l'importance au niveau du contrôle direct des procédés biochimiques, car, avec le développement des fibres optiques et de nouveaux détecteurs, il est possible maintenant de suivre en ligne le déroulement des fermentations. De plus avec le développement des logiciels statistiques, il est maintenant plus facile de soustraire par voie mathématique, les interférences causées par la complexité des échantillons (Ding *et al.*, 1999; Marteau *et al.*, 1999).

Ainsi Macaloney *et al.* (1996) ont mesuré en ligne la concentration en glycérol, ammonium et acétate au cours des fermentations pour la production d'*E. coli*, avec une fibre optique reliée à un spectromètre infrarouge. Ils ont pu établir un système « loop feed-forward » afin d'éviter que le substrat (glycérol) devienne limitant, ce qui aurait comme conséquence l'éventuelle utilisation des acides aminés comme source de carbone, par la bactérie, avec comme résultat la production d'ammonium, produit toxique pour la bactérie. Yeung *et al.* (1999) ont utilisé la méthodologie NIR pour contrôler la concentration et se débarrasser des contaminants tels que des protéines, de l'ARN et des cellules lysées dans un procédé biologique complexe. Li et Brown (1999) ont rencontré des problèmes de non-linéarité entre les spectres NIR et les données de référence pour le dosage du glucose et de l'éthanol lors

d'une fermentation avec *Saccharomyces cerevisiae*. Ceci est dû aux variations dans les bandes spectrales des groupes OH, à cause des variations de la température et du pH et de l'incrément exponentiel de la biomasse au cours de la fermentation. Ils ont résolu ce problème en utilisant un réseau de neurones couplé à une régression multivariée (PLS*). Ainsi, les erreurs de prédictions sont passées de 0.21 % à 0.13 %.

Le procédé automatisé pour la production d'acide lactique en continu à large échelle, incluant la récupération du produit final, est réalisé par le contrôle des paramètres du milieu de culture (concentration en lactose, acide lactique et biomasse) grâce à un logiciel qui utilise les mesures NIR (Gonzalez-Vara *et al.*, 2000). Ainsi l'addition de substrat et la concentration en acide lactique dans le milieu sont toujours contrôlées, afin d'éviter une inhibition par le produit. Ensuite, par un procédé d'ultrafiltration, l'acide lactique est récupéré et purifié en utilisant une résine d'échange ionique, pendant que les cellules et le reste du milieu sont recyclés dans le fermenteur (Vaccari et Dosi, 1998) .

1.4.3.4 Culture des cellules

L'application de la méthode NIR dans les cultures de cellules vise à doser la consommation des nutriments par les cellules afin d'empêcher l'inhibition de croissance par la limitation de substrat. Les composés dosés plus fréquemment sont ceux qui indiquent la performance de la fermentation, tels que les métabolites primaires, glucose et glutamine, et les métabolites du catabolisme, ammonium et lactate. En effet, si la concentration de ces composés au cours de la fermentations est suivie, il sera possible de déterminer le moment précis pour renouveler le milieu de culture. Il a été démontré qu'un tel contrôle minimise l'accumulation des composés du catabolisme et augmente la production cellulaire (Riley *et al.*, 2000a). Cependant, une des limitations de cette méthodologie est le seuil de détection. Riley *et al.* (2000b) ont trouvé que l'erreur de prédiction (SEP) est proportionnelle à la plage des concentrations utilisées pour établir le modèle d'étalonnage. Ainsi, pour des concentrations entre 0 et 0.1 mM en glucose, glutamine, glutamate et ammonium, les SEP sont au moins 10 fois plus élevées que celles obtenues avec des concentrations entre 0 et 0.3 mM. Les auteurs concluent que cette différence est due aux variations de la ligne de base et au fait que les

spectres de ces composés sont très semblables, ce qui provoque un chevauchement des pics d'intérêt. Yano *et al.* (1997) ont suivi la production d'éthanol et d'acide acétique en ligne au cours d'une fermentation dans un milieu de vinaigre du riz. Les coefficients de corrélation (R^2) pour l'éthanol et pour l'acide acétique ont été de 0.99 et 0.94, respectivement. Par la méthode NIR le dosage simultané de l'éthanol et l'acide acétique est réalisé en 5 min, tandis qu'avec les méthodes de chromatographie en phase gazeuse, le temps de préparation des échantillons et de dosage est beaucoup plus long.

1.3.4.5 Détermination de la biomasse

La spectroscopie NIR a été utilisée pour mesurer la production de biomasse au cours des fermentations. Majara *et al.* (1998) ont mesuré en ligne la concentration en glycogène, tréhalose et protéines totales en moins de 30 min., incluant 25 min pour la préparation des échantillons. Les coefficients de corrélation ont été de l'ordre de 0.96. Kaspro *et al.* (1998) ont utilisé la technique NIR pour corréler la qualité des extraits de levure avec le rendement en biomasse et le rendement en biomasse par unité de substrat lors des fermentations. Ils ont obtenu des coefficients de corrélation de 0.99 et 0.96, respectivement, en utilisant la méthode PLS* pour établir les modèles d'étalonnage. Ils ont également constaté que les variations de rendement entre les fermentations sont en partie dues à la variation dans la qualité de l'extrait de levure d'un lot à l'autre. Vaidyanathan *et al.* (1999) ont déterminé les spectres de cinq micro-organismes couramment utilisés dans les fermentations industrielles qui ont des caractéristiques physiologiques différentes (*Escherichia coli*, *Streptomyces fradiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* et *Aureobasidium pullulans*) afin d'établir un modèle d'étalonnage pour la quantification de la biomasse. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives dans les spectres des cinq micro-organismes utilisés. Les résultats ont également montré une bonne corrélation entre la biomasse déterminée par NIR et la biomasse sèche. Enfin, l'âge de culture peut avoir un effet sur les spectres.

À partir de cette revue sommaire, il est facile de prédire que pour les prochaines années, la technologie infrarouge gagnera en importance, surtout en ce qui concerne le contrôle des procédés en ligne, notamment les fermentations, car le développement de nouveaux matériaux

facilitera la prise d'échantillons et réduira le bruit du fond causé par la non-homogénéité des échantillons. Les problèmes reliés à la ligne de base et à l'interférence des composés pourraient être résolus à l'aide de logiciels pour le traitement des données beaucoup plus puissants et avec l'utilisation des réseaux de neurones. Ainsi, le futur de la spectroscopie NIR s'avère très prometteur.

1.5 Hypothèses et objectifs de travail

Étant donnée que la production d'EPS est influencée par les conditions de fermentation et la composition du milieu de culture. La production d'EPS par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M sera fonction de la supplémentation du milieu de base (perméat de lactosérum) et des conditions de fermentation.

1.5.1 Objectif général

- Trouver les conditions de fermentation et la composition du milieu de culture optimales pour la production d'EPS par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M dans un milieu à base de perméat de lactosérum, dans le but d'utiliser ces polymères comme bioingrédients alimentaires ou nutraceutiques.

1.5.2 Objectifs spécifiques

- Formuler un milieu optimal pour la production d'EPS à base de perméat de lactosérum afin de valoriser ce sous-produit de l'industrie laitière.
- Identifier les variables (conditions de culture et composition du milieu de culture) optimales pour la fermentation en batch de *L. rhamnosus* RW-9595M.
- Caractériser la cinétique de production d'EPS par *L. rhamnosus* RW-9595M dans différentes conditions de fermentation.
- Mettre au point une méthode précise, rapide et fiable pour le dosage d'EPS par la spectroscopie en proche infrarouge (NIRS).

Chapitre II

Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus RW-9595M in a whey permeate based medium

M.G. Macedo¹, C. Lacroix¹ and C-P. Champagne²

¹ Dairy Research Centre STELA, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Ste-Foy, PQ, Canada G1K 7P4.

²Food Research and Development Centre, St-Hyacinthe, PQ, Canada J2S 8E3.

Accepted in Biotechnology Progress

2.1 Résumé

L'effet de la température (22-42°C), de la concentration de perméat de lactosérum (PLS, 1.6-8.4 % p/v) et de la concentration de la source azotée (yeast nitrogen base, YNB, 0-2 % v/v) sur la production d'EPS par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M a été étudié lors de fermentations en batch à pH contrôlé (6.0) à l'aide d'un plan central composite (CCD). La production maximale d'EPS, mesurée avec une nouvelle méthode basée sur l'ultrafiltration, a varié entre 126 à 477 mg l⁻¹ et dépend des conditions de culture. La productivité calculée à la concentration d'EPS maximale a varié entre 3.0 à 16.4 mg EPS (l h)⁻¹. La production d'EPS n'est pas liée à la phase exponentielle de croissance dans des conditions de température et concentration en PLS élevées. La viscosité apparente du surnageant a diminué après une longue période d'incubation (fin de fermentation) à 38°C avec 3.0 % de PLS, avec une diminution parallèle de la concentration d'EPS, ce qui pourrait indiquer une hydrolyse des EPS par l'action d'hydrolases. Le YNB n'a pas augmenté la production de biomasse, mais a favorisé la production d'EPS aux fortes concentrations en PLS.

2.2 Summary

The effects of temperature (22-42°C), whey permeate concentration (WP, 1.6-8.4 %) and supplementation level with yeast nitrogen base (YNB, 0-2.0 %) on exopolysaccharide (EPS) production was studied during 20 pH-controlled (pH=6.0) batch cultures with *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M, using a central composite design (CCD) with 20 fermentations. The EPS production was measured using both the conventional method based on ethanol precipitation of EPS and a new ultrafiltration (UF) method. EPS production was not growth-associated for high temperatures (32 to 42°C) and WP concentrations (7 to 8.4 %). In contrast, at sub-optimal temperature (22-26°C) EPS production was growth-associated. Maximal EPS production measured with the UF-method was approximately two-fold higher than those measured with the conventional method, and varied from 126 to 477 mg l⁻¹ and were significantly influenced by WP and YNB*WP interactions, whereas ANOVA for maximum EPS production measured by the conventional method did not show significant factor effects. EPS volumetric productivities varied from 3.0 to 16.4 mg EPS (l h)⁻¹. YNB supplementation did not promote cell growth but did increase EPS production at high WP concentrations. Our data indicated the potential of *L. rhamnosus* RW-9595M for producing EPS in a supplemented WP medium, and suggest that this production could be further increased by the addition of a growth-limiting nutrient in the medium.

2.3 Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) have been used for centuries as starter cultures because they largely contribute to food preservation and enhance the organoleptic characteristics of milk products, such as aroma, flavour or texture. In recent years, interest has developed on the exopolysaccharides (EPS) produced by LAB because these polysaccharides may contribute to textural and rheological properties and enable a decrease of total milk solids in product formulation, with important economical advantages. Indeed, EPS can improve stability and mouth-feel of fermented milk products (De Vuyst and Degeest, 1999). Furthermore, it has been claimed that EPS produced by LAB have various beneficial physiological effects on humans: such as anti-ulcer agents (Nagaoka *et al.*, 1994), modulating the immune response (Kitazawa *et al.*, 1998) or improving intestinal adhesion of probiotics (Ouweland *et al.*, 1999). Commercial use of EPS produced by LAB has been limited by the low levels of production during fermentation, which vary from 25 to 3000 mg l⁻¹ (Ricciardi and Clementi, 2000). EPS production largely depends on environmental conditions (temperature, pH, medium composition, carbon or nitrogen source, minerals) and microbial species.

Until now, different EPS-producing LAB have been investigated but studies have mainly been carried out in milk and synthetic media (De Vuyst and Degeest, 1999; Ricciardi and Clementi, 2000), which may contain components interfering with EPS quantification, for example, yeast extract (Kimmel and Roberts, 1998a; Torino *et al.*, 2000). There is still limited knowledge on the physiological aspects of EPS production by LAB in whey. Whey permeate (WP) is a good base medium for LAB cultures (Christopherson and Zottola, 1989). It is a by-product of the cheese industry which is produced in large amounts, during concentration of proteins in whey, using ultrafiltration. WP contains high concentrations lactose (4.8 %) and minerals (0.5 %) (Kosikowski, 1979). Usually, an excess of carbohydrates in combination with nutrient limitation, such as for nitrogen or phosphorus, stimulates EPS production for gram-negative bacteria (Sutherland, 1990); however, the effect of nitrogen concentration on EPS production by LAB has not been examined in detail. Degeest and De Vuyst (1999) found that EPS production by *S. thermophilus* LY03 strongly depended on carbon/ nitrogen levels.

The objective of this work was to study the production of EPS by *Lactobacillus*

rhamnosus RW-9595M in WP medium supplemented with Yeast Nitrogen Base (YNB), a nitrogen source which does not contain polysaccharides that could interfere with EPS quantification. *L. rhamnosus* RW-9595M has shown a high potential for producing EPS (1300 g l⁻¹) in a defined medium (BMM) (Dupont *et al.*, 2000). The influence of combined effects of WP and YNB concentrations, and temperature on EPS production during pH-controlled batch cultures was tested with a central composite design (CCD) using response surface methodology (RSM). The EPS production was measured using both, conventional method based on ethanol precipitation and a new and rapid method using ultrafiltration (UF) for EPS purification (Bergmaier *et al.*, 2001).

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Strain and culture preparation

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M was obtained from the Lactic Acid Bacteria Research Network culture collection (Dairy Research Centre STELA, Université Laval, PQ, Canada). This culture was isolated from *L. rhamnosus* ATCC-9595 and was shown to be a stable EPS producer mutant (Dupont *et al.*, 2000). Stock cultures were kept at -80°C in a medium composed of 5.0 % w/w whey permeate (WP, Foremost, Baraboo, WI, USA), 1.0 % w/v yeast extract (YE, Rosell-Lallemand Inc., Montréal, PQ, Canada) and 10.0 % w/v glycerol. For inoculum preparation, the strain was sub-cultured twice in 5.0 % WP supplemented with 1.0 % YE at 37 °C for 18 h or until pH reached 4.8. This fresh culture was used to inoculate the bioreactors at 1.5 % (v/v).

2.4.2 Culture medium preparation

The WP powder contained 3.5 % of protein, 83 % of lactose, 2 % of lactic acid and 8.5 % of ash and was reconstituted to obtain a final total solid concentration between 1.6 and 8.4 % (w/w) and pH was adjusted to 5.0 with 3M HCl. The medium was autoclaved for 15 min at 121°C.

After cooling to room temperature, the solution was filtered (AP25 prefilters, Millipore, Bedford, MA, USA) in order to separate the precipitate produced during sterilisation. The filtrate solution was then supplemented between 0 and 2.0 % w/v with YNB (Difco, Detroit, MI, USA), which contains 74 % (w/v) NH_4OH , 0.74 % (w/v) amino-acids and 0.08 % (w/v) trace elements in dry matter. Polysaccharide concentration for a solution of 2 % (w/v) of YNB which corresponded to the highest concentration used in the borth media was determined with the UF method and was equal to 30 mg l^{-1} . The pH was then adjusted to 5.0 with 3M HCl, and the medium was heated again for 15 min at 121°C and stored at 4°C .

2.4.3 Culture conditions

Cultures were carried out in two 4-l bioreactors with similar characteristics: an Interactive 4-Gas DO/pH Instrumentation System (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) for Block 1 experiments and a Biogénie bioreactor (Ste-Foy, PQ, Canada) for Block 2 experiments. Stirring with two marine impellers was set at 100 rev min^{-1} and pH was controlled at 6.0 by addition of 3M NH_4OH . Fermentations were carried out until O.D. at 625 nm became constant with time (Novaspec II, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Samples were aseptically withdrawn at regular intervals and analysed for cell growth, EPS and lactic acid productions, lactose consumption and apparent viscosity of supernatant fluid.

2.4.4 Viable cell determination

Appropriate dilutions of samples were plated (pour-plate method) on MRS agar (Rosell-Lallemand Inc., Montréal, PQ, Canada). Plates were incubated aerobically at 37°C for 32 h. The average number of colony-forming units from duplicate analyses was determined.

2.4.5 Lactose and lactic acid concentration

Lactose and lactic acid concentrations were monitored by HPLC (Waters, Millipore Co. Montreal, PQ, Canada), with a Phenomenex ion column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) using $3.2 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$ as eluent at a flow rate of 0.4 ml min^{-1} . Diluted samples were filtered using an Acrodisc LC13 filter, $0.2 \mu\text{m}$ (Acrodisc, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA), and used for HPLC analysis. Reported data are means of triplicate analyses. The

reported lactic acid production was estimated from the difference between lactic acid concentration in the broth samples and that in fresh medium.

2.4.6 EPS purification and quantification

For EPS isolation, 75 ml of broth culture was heated at 100°C for 15 min in order to inactivate potential hydrolase enzymes and release cell-attached EPS. Cells were removed by centrifugation at 13200 g for 20 min at 4°C (Sorval Instrument, Dupont, Newtown, CO, USA). The supernatant fluid was recovered and stored at 4°C before purification.

Two procedures for EPS purification were carried out. The first procedure used the conventional method based on chilled ethanol precipitation followed by a trichloroacetic acid precipitation, with intermediate steps of dialysis and lyophilisation, previously described by Cerning *et al.* (1994 b). The lyophilised powder was referred to purified EPS. The sugar content of the purified EPS powder was analysed by the phenol-sulphuric acid method (Dubois *et al.*, 1956).

The second extraction procedure used ultrafiltration-stirred-cells (UF method), as described recently by Bergmaier *et al.* (2001). Samples of supernatant (2-5 ml, depending on EPS concentration) were ultrafiltered in stirred cells (Omegacell™; MWCO 30 KDa; Filtron Technology Co., Northborough, MA, USA) connected to a reservoir containing a solution of NaCl 0.1 mol l⁻¹ (RC800 mini reservoir, Millipore, Bedford, MA, USA), pressurised with air-regulated entry (103 KPa). This system purifies and/or concentrates samples by diafiltration mode or pressurised air ultrafiltration mode, respectively, using a continuous washing process by applying pressurised liquid. Samples were added in stirred cells and mixing was performed with a multiple magnetic stir plate adjusted to 650 rev min⁻¹. Diafiltration was carried out until all low molecular-weight solutes were removed from the supernatant fluid, i.e. no sugars were detected in the permeate by the phenol-sulphuric acid method (Dubois *et al.*, 1956). The retentate containing EPS was collected, weighed and stored at 4°C for sugar analysis using the phenol-sulphuric acid method. The phenol-sulphuric-acid assay was calibrated using D-glucose as standard. Mean of EPS productions were calculated from three repetitions of the analysis and expressed in mg of glucose equivalents per litre (mg l⁻¹). The EPS production during

cultures was calculated by subtracting the amount of EPS in freshly inoculated medium from the EPS measured in fermented supernatant samples.

2.4.7 Apparent viscosity

Viscometric analyses of supernatants were carried out with an Advanced Rheometric Expansion System equipped with Rhios software for data treatment (Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, USA) and a Couette-type sensor attached to a water-bath set at 25°C. Shear stress flow curves versus shear rate between 10 to 2500 s⁻¹ were determined, and apparent viscosity at a shear rate of 200 s⁻¹ was calculated from duplicate analyses.

2.4.8 Experimental design

The effects and interactions of three factors, incubation temperature (T) between 22 and 42°C, WP concentration from 1.6 to 8.4 % (w/w) and YNB supplementation from 0 to 2.0 % (w/v), were studied using a blocked central composite rotatable design (CCD) (Gacula *et al.*, 1984). The CCD contained a total of 20 fermentation experiments, with 14 unique combinations (8 factorial points, 6 (α) star points and 6 replications (central points)). The value of α of 1.68, on which the rotability of the design depends, was such that $\alpha = (F)^{1/4}$, where F is the number of factorial points of the design. Experimental error of the CCD design was estimated from the error of central points. The 20 fermentation experiments were grouped into two blocks, corresponding to the two bioreactors and experimental treatments in each block were randomised. Table 1 reports real and coded values of independent variables for the CCD design.

2.4.9 Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Statgraphics plus 4.0 (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA). For each dependent variable, a second-order response surface of the following general form was calculated:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \epsilon.$$

The sum of squares (SS) of the model, of the error SS and the total SS were

calculated. The SS model was partitioned further into linear, quadratic and cross-product SS. The SS of error (SSE) is the sum of the SS experimental error (SS_{exp}), estimated from the repetitions of central points, and SS due to lack of fit of the model (SS_f). The equations from RSM analysis were used for plotting the corresponding response surface for each dependent variable.

2.5 Results

The effect of temperature and medium composition on various dependent parameters were measured during pH-controlled batch cultures of *L. rhamnosus* RW-9595M. *Table 2.1* reports the measured response of dependent variables of the 14 unique combinations and the mean of 6 repetitions of central points from the CCD design. Culture time varied from 48 to 72 h depending on the experimental conditions. *Figure 2.1* shows mean of cell growth, EPS production measured by both purification methods, and apparent viscosity of supernatant measured for 6 repetitions of central point (32°C, 5.0 % WP and 1.0 % YNB) which served to estimate experimental error. A good reproducibility of central points experiments was observed, particularly for cell growth and EPS production.

2.5.1 Cell growth

Stationary phase was reached after 16 to 22 h, 22 to 28 h and 28 to 45 h for cultures performed between 38 to 42°C, at 32°C and between 22 to 26°C, respectively. The highest (2.0×10^9 cfu ml⁻¹) and lowest (2.4×10^8 cfu ml⁻¹) maximal cell concentrations were measured for high (8.4 % WP) and low (1.6 to 3.0 % WP) concentrations, respectively. Statistical analysis showed a highly significant effects for the main factor WP ($P < 0.001$) and for YNB ($P = 0.034$) for maximal cell concentrations, but no significant effect ($P > 0.05$) for blocks and temperature. *Table 2.2* shows the analysis of variance for response dependent variables

Optimum conditions for maximal cell growth predicted by the mathematical model were: 32°C, 8.4 % WP and 0 % YNB, with a predicted value of 2.6×10^9 cfu ml⁻¹. *Figure 2.2* shows the response surface of maximal cell concentration as a function of WP and YNB during pH-controlled batch cultures at 32°C. YNB had a negative effect on cell growth, as indicated

by the low populations found for high YNB concentrations. The negative effect of YNB was even more pronounced for low temperatures (data not shown). In contrast WP had a linear and positive effect on cell growth for all tested experimental conditions.

2.5.2 EPS production

EPS production was measured using conventional and UF methods. *Figure 2.1* compares EPS production means for both purification procedures for six repetitions of the central points. The EPS productions measured with the UF method were approximately two-fold higher than those measured with the conventional method. The same differences were observed for maximal EPS production of factorial and α points of the CCD design, with values 1.6 to 4.25-fold higher for the UF than for the conventional method (*Table 2.1*). The maximal EPS productions measured by the conventional and UF methods ranged from 40 to 260 mg l⁻¹ and from 126 to 477 mg ml⁻¹, respectively. On the other hand, the EPS concentration in the freshly inoculated media were low, varying between 7.0 and 14.1 mg l⁻¹.

The highest EPS productions (300–477 mg l⁻¹) were obtained for temperatures from 32 to 42°C and at high WP concentrations (7.0 to 8.4 %). In contrast, EPS production decreased for low temperatures (26 to 32°C) and low WP concentrations (1.6 to 3.0 %). The lowest EPS productions (59 and 40 mg l⁻¹) were measured for the culture conditions 32°C, 1.6 % WP and 1.0 % YNB and 32°C, 5.0 % WP and 0 % YNB (*Table 2.1*). EPS production was not coupled with growth for temperatures between 32 and 42°C. Indeed, under these conditions, EPS was produced towards the end of the exponential phase of growth and continued during the stationary phase, however, EPS production at 26°C stopped when the culture reached stationary phase (*Figure 2.3*).

Analysis of variance for maximal EPS production measured by the conventional method did not reveal significant effects for the three factors ($P > 0.05$), and the correlation coefficient of the model (R^2) was only 44.9 % (*Table 2.2*). In contrast, maximal EPS production measured with the UF method was accurately fitted by the second-order model of the experimental design ($R^2 = 78.5$ %), and a highly significant effect for WP ($P < 0.001$) was found when all factors were included in the ANOVA. In addition, by removing YNB*YNB

and T*YNB interactions which were not significant, the WP*YNB interaction became significant ($P=0.048$), whereas temperature and block effects remained non-significant (*Table 2.2*). *Figure 2.4* shows the response surface of maximal EPS production as a function of WP and YNB effects at 42°C. The optimum conditions for maximal EPS production under our experimental conditions were 42°C, 8.4 % WP and 2.0 % YNB, with a predicted optimum of 732 mg l⁻¹.

In order to elucidate the effects of medium composition and temperature on EPS production kinetics, EPS concentrations during exponential and stationary growth phases at maximal cell concentration were determined using the UF method. The RSM analysis for EPS production during the exponential growth phase did not show significant effects for the three factors ($P>0.05$) and revealed a significant lack of fit for the model ($P=0.001$), which indicated that EPS production during the exponential phase was not accurately fitted by the second-order model. In contrast, RSM for EPS production during stationary phase was accurately fitted by the second-order model and showed significant effects for the main factors WP ($P=0.013$) and T ($P=0.019$), and for WP*T interaction ($P=0.034$). EPS production during the stationary phase increased with T and WP concentration (*Table 2.2*).

The specific EPS yield calculated on maximal EPS production varied from 0.076 to 0.587 g EPS (10⁹ cfu)⁻¹, depending on culture conditions. Statistical analysis showed significant effects for WP ($P=0.002$), YNB ($P=0.001$) and for T*T ($P=0.007$), T*WP ($P=0.007$), as well as WP*WP ($P=0.011$) interactions. The effect of YNB was less important for sub-optimal culture conditions (low temperatures), while for high WP concentration, it was most noticeable (data not shown). The highest specific yields were found for combinations of low temperature and high WP concentration, and high temperature and low WP concentrations.

The EPS volumetric productivity calculated for incubation time corresponding to maximal EPS production, ranged from 3.0 to 16.4 mg EPS (l h)⁻¹ (*Table 2.1*). The highest productivities ranging from 10.4 to 16.4 mg EPS (l h)⁻¹ were obtained with high WP concentration (7.0 to 8.4 %) and high temperature (38 to 42°C), whereas the lowest productivities were measured for cultures carried out at low temperature (22 °C, 5.0 % WP and

1.0 % YNB), without YNB (32°C, 5.0 % WP and 0.0 % YNB), or with low WP (32°C, 1.6 % WP and 1.0 % YNB) (*Table 2.1*) A significant lack of fit of the model ($P=0.004$) indicated that volumetric productivities were not accurately fitted by the second order model (*Table 2. 2*).

2.5.3 Lactose and lactic acid concentration

Limited lactose utilisation, (from 6.3 to 31.7 g l⁻¹) and lactic acid production (from 6.2 to 26.6 g l⁻¹) were measured at the end of cultures incubation (*Table 2.1*). Lactate was the only detectable end-product using HPLC. *L. rhamnosus* RW-9595M was able to metabolise glucose and galactose since these compounds were not detected in culture by HPLC.

2.5.4 Apparent viscosity

The apparent viscosity increased slightly during the first 30 h from 0.46 to 1.17 mPa s to 0.8 to 1.26 mPa s, and remained constant until the end of cultures incubation performed at temperatures between 22 to 32°C, as illustrated in *Figure 2.1*. In contrast, apparent viscosity decreased in the last stage of cultures performed at 38 °C with low WP concentrations (3.0 % WP and 0.4 % YNB; 3.0 %WP and 1.6 % YNB) with a parallel decrease in the EPS concentrations. Statistical analysis did not show significant factor effects ($P>0.05$) on maximal apparent viscosity.

2.6 Discussion

In this study two purification procedures were tested for quantifying EPS production in culture broth, a first method conventionally used in the literature (Cerning *et al.*, 1994b; Dupont *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2000) and the second method, recently developed in our research group (Bergmaier *et al.*, 2001). Data from the conventional method showed a much lower EPS recovery compared with those from the UF method (*Figure 2.1* and *Table 2.1*). The maximal EPS productions varied with the purification procedure and were 1.6 to 4.25-fold higher with UF than with the conventional method. Low EPS recoveries with the conventional method could be explained by loss of product during the numerous steps of purification. In

contrast, Bergmaier *et al.* (2001) reported EPS recovery for the UF method close to 100 % in the BMM basal minimal medium and supplemented whey permeate medium (SWP). Furthermore, these authors demonstrated that the UF method quantitatively separated the EPS produced during fermentation from interfering low molecular weight carbohydrates in a complex fermentation broth and that only small sample volumes were needed. In our work, statistical analysis for maximal EPS productions estimated by the conventional method did not reveal significant effects of factors T, WP and YNB (*Table 2.2*) On the other hand, WP concentration significantly influenced maximal EPS production when estimated with the UF method, and the second-order model of the RSM analysis accurately fitted this dependent variable (*Table 2.2*). These results suggest that the UF method, which is simple and much less time consuming than the conventional method (8 h versus 15 days) is also more accurate for estimating EPS production.

Components of the most widely used semi-defined medium for the propagation of lactobacilli, MRS broth, interfere with EPS analysis (Kimmel and Roberts, 1998a). Therefore, the use of YE, a typical supplement of media designed for lactic cultures, was limited to the medium designed to prepare the inoculum. In this study a polysaccharide-free nitrogen source, YNB, was chosen to avoid interference of compounds found in various supplements such as yeast extract, beef extract, peptone and proteose peptone containing significant amounts of polysaccharides which interfere with EPS purification and quantification (Torino *et al.*, 2000). EPS concentration in the freshly inoculated medium was very low and could come from EPS and polysaccharides contained in the inoculum which was produced in YE-supplemented WP.

To optimise EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595M in supplemented WP, the effects and interactions of temperature and medium composition on cell growth and EPS production were studied using response surface methodology (RSM). The second order models of the CCD design could describe more than 78 % of the total variance for cell growth, maximal EPS production, EPS production during the stationary phase of growth, and specific EPS yield (*Table 2.2*). In contrast, the second-order model could not fit EPS production during exponential growth phase and volumetric productivity, as indicated by a significant lack of fit ($P < 0.05$), which may indicate that the effects of independent variables on these parameters are

complex. The maximum cell population (2.0×10^9 cfu ml⁻¹) obtained for a medium containing high sugar concentration (*Table 2.1*) was about three-fold lower than that obtained with *L. rhamnosus* RW-9595M grown in lactose supplemented-defined BMM medium (6.8×10^9 cfu ml⁻¹), which also resulted in a very high EPS production (1275 mg l⁻¹, (Dupont *et al.*, 2000). The limited cell growth and EPS production in YNB-supplemented WP could be due to a lack of some nutrients in the medium. Indeed the limited lactose utilisation and lactic acid production at the end of cultures growth are strong evidence of nutrient limitation. YNB was successfully used in semi-defined media designed for the production of EPS (Van den Berg *et al.*, 1995; Kimmel and Roberts, 1998a). YNB is considered to be a source of minerals and vitamins (Kimmel and Roberts, 1998a), which have been shown to promote EPS synthesis by lactic cultures (Mozzi *et al.*, 1995a; Grobber *et al.*, 1998). Data from this study showed that YNB supplementation was indeed effective in increasing EPS production (*Figure 2.4*); however, it was ineffective in promoting growth and high biomass levels (*Figure 2.2*). This was probably due to the small amount of organic nitrogen brought by YNB. Therefore, to further improve EPS yields, apparently a better nitrogen source should be added to WP, in conjunction with minerals and vitamins provided by YNB. This was the strategy used by Kimmel and Roberts (1998) with a semi-defined medium. The addition of peptones and YE has been shown to increase EPS production by lactobacilli (Degeest and De Vuyst, 1999), but some caution is required since an increase in nitrogen compounds lowers the carbon-to-nitrogen ratio of the medium, which can be detrimental to EPS production (Sutherland, 1990). Even if EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595M was limited in our culture conditions, maximal productions (300-477 mg l⁻¹) were comparable to production reported for other lactobacilli (De Vuyst and Degeest, 1999; Ricciardi and Clementi, 2000). In fact, the high potential of *L. rhamnosus* RW-9595M for producing EPS has been previously shown, with maximal productions close to 1.3 and 1.8 g l⁻¹ in BMM and WP supplemented with YE and minerals, respectively (Dupont *et al.*, 2000; Bergmaier *et al.*, 2001).

Our data also showed that EPS kinetics depended on culture conditions. EPS production was growth-associated in sub-optimal conditions, such as low temperatures or low WP concentration. In contrast, when temperatures and WP concentrations were increased, EPS production continued during the stationary phase, indicating uncoupling between EPS

production and cell growth. Optimal conditions of maximal cell growth, i.e. high WP and low YNB concentrations (*Figure 2.2*), were different from those for maximal EPS production, i.e. high WP and high YNB concentration (*Figure 2.4*). Looijesteijn and Hugenholtz (1999b) reported that *L. cremoris* NIZO B40 produced EPS during early stationary phase and that optimal temperature and pH for EPS production and growth were not the same. In contrast De Vuyst *et al.* (1998) found that the biosynthesis of EPS by *S. thermophilus* LY03 was growth-associated, and that kinetics and yield of EPS were strongly dependent on culture conditions. Apparent viscosity and EPS concentration decreased during stationary growth phase for two particular culture conditions (38°C and WP 3.0 % with 0.4 or 1.6 % of YNB), which suggests an EPS degradation by hydrolases. The same observation was reported by De Vuyst and Degeest (1999) and Pham *et al.*, (2000); however, additional studies are needed to understand the relationship between viscosity and EPS production of *L. rhamnosus* RW-9595M.

2.7 Conclusions

Our data demonstrated that EPS production was dependent on culture conditions and, certain conditions was not growth-associated. Our results also showed the high potential of *L. rhamnosus* RW-9595M for producing EPS, even if this production was apparently limited by the lack of a nutrient in YNB-supplemented WP medium, such as nitrogen compounds and/or minerals. This study also supported the advantage of the UF-method for rapid and accurate determination of EPS production during fermentation, compared with the conventional method which exhibited a low EPS recovery. Work is currently in progress to test different supplementation in WP medium and high cell density fermentation with immobilised cells, to further increase EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595, with the perspective to developed new functional bio-ingredients or nutraceuticals.

Table 2.1 Measured response for the dependent variables of the central composite design*

Fermentation conditions T (°C), WP (%), YNB (%)	Viable cell counts (cfu ml ⁻¹)	EPS maximal [§] (mg l ⁻¹)	EPS-UF maximal [†] (mg/L)	Specific ESP yield [‡] (gEPS 10 ⁹ cfu ⁻¹)	Volumetric productivity [‡] (mgEPSL·h ⁻¹)	Lactose initial (g l ⁻¹)	Lactose utilised (g l ⁻¹)	Lactic acid production (g l ⁻¹)
32, 5.0, 1.0 [¶]	1.0x10 ⁹ (24 h) ± 4.9x10 ⁸	120 (39.5 h) ± 35	195 (35 h) ± 32	0.22 ± 0.09	5.6 ± 0.5	43. ± 2.4	19.9 ± 3.8	14.3 ± 4.5
22, 5.0, 1.0	6.7x10 ⁸ (54 h)	87 (78 h)	198 (61 h)	0.33	3.3	46.0	21.8	8.1
26, 3.0, 0.4	9.0x10 ⁸ (45 h)	83 (45 h)	255 (45 h)	0.30	5.7	31.1	15.4	11.3
26, 3.0, 1.6	4.8x10 ⁸ (32 h)	124 (48h)	199 (32 h)	0.45	6.2	26.9	8.6	9.4
26, 7.0, 0.4	2.0x10 ⁹ (35 h)	109 (59 h)	221 (28 h)	0.24	7.9	59.6	14.9	9.4
26, 7.0, 1.6	7.9x10 ⁸ (28 h)	77 (47 h)	326 (28 h)	0.54	11.6	61.2	13.0	11.7
32, 5.0, 0.0	1.7x10 ⁹ (36 h)	40 (53 h)	144 (47 h)	0.08	3.1	49.1	31.7	9.6
32, 5.0, 2.0	9.0x10 ⁸ (28 h)	152 (58 h)	339 (47 h)	0.50	7.2	37.6	20.7	18.0
32, 1.6, 1.0	2.4x10 ⁸ (21 h)	59 (51 h)	126 (35 h)	0.58	3.6	15.4	6.3	6.2
32, 8.4, 1.0	1.7x10 ⁹ (24 h)	260 (54 h)	477 (46 h)	0.27	10.4	73.6	29.0	24.4
38, 3.0, 0.4	4.6x10 ⁸ (16 h)	114 (42 h)	263 (16 h)	0.57	16.4	29.9	21.7	17.6
38, 3.0, 1.6	3.1x10 ⁸ (22 h)	106 (45 h)	170 (30 h)	0.53	5.7	25.5	8.5	8.2
38, 7.0, 0.4	1.5x10 ⁹ (21 h)	109 (45 h)	270 (35 h)	0.16	7.7	57.6	22.2	21.5
38, 7.0, 1.6	1.3x10 ⁹ (17 h)	132 (22 h)	375 (31 h)	0.28	12.1	60.1	30.6	26.6
42, 5.0, 1.0	5.9x10 ⁸ (20 h)	130 (35 h)	364 (35 h)	0.59	10.4	48.3	23.1	25.0

* In parenthesis time at which maximum cell growth, EPS production or apparent viscosity were observed.

§ Maximal EPS production measured by the conventional method.

† Maximal EPS production measured by the UF method. Calculated for maximal EPS production.

¶ Mean and standard errors for 6 repetitions of the central point.

Table 2.2 Analysis of variance for dependent variables of the central composite design

Parameter [§]	df [§]	SS (x10 ⁻⁴) §§	df	SS (x10 ⁻³)	Maximal EPS production UF [†] (mg l ⁻¹)		Productivity (mgEPS l h ⁻¹)		Specific EPS yield (g EPS 10 ⁹ cfu ⁻¹)					
					Maximal EPS production † (mg l ⁻¹)	Stationary phase	Exponential phase	Complete model ^{††}		Reduced model ^{¶¶}	SS	df		
T	1	154.8	1	15.80	1	1.37	1	115.23*	1	92.08	1	36.98*	1	152.5
WP	1	7304.5***	1	80.53	1	147.11	1	146.50*	1	587.23***	1	20.49	1	944.2**
YNB	1	1410.3*	1	31.25	1	24.91	1	30.97	1	111.43	1	1.76	1	1127.5***
T*T	1	544.6	1	10.43	1	99.35	1	0.03	1	89.45	1	15.58	1	676.7**
T*WP	1	430.7	1	27.77	1	22.78	1	81.08*	1	17.91	1	12.27	1	591.7**
T*YNB	1	239.8	1	0.13	1	27.52	1	15.91	1	1.58	1	14.17	1	167.5
WP*WP	1	453.9	1	13.26	1	130.31	1	1.39	1	159.15	1	17.38	1	485.2*
WP*YNB	1	0.5	1	28.42	1	116.40	1	3.36	1	159.33	1	41.90*	1	115.5
YNB*YNB	1	273.1	1	24.30	1	85.25	1	22.05	1	20.78	1	2.84	1	16.5
Blocks	1	75.3	1	35.03	1	4.15	1	16.59	1	4.05	1	18.84	1	21.7
Total error	9	2327.4	9	230.27	9	368.24	9	98.66	9	354.12	7	40.74	9	367.8
Model lack of fit	5	286.5	5	34.41	5	361.51***	5	66.59	5	295.52	4	39.60**	5	323.5
R ² ††		84.3		44.9		62.2		81.5		78.5		81.2		91.9

§ Parameters tested identified by Temperature (°C), whey permeate (WP %, w/w) and yeast nitrogen base (YNB %, w/v).

† Maximal EPS production measured by the conventional method.

‡ Maximal EPS production measured by the UF method.

¶ Degree of freedom

§§ Sum of squares

†† Correlation coefficient (%)

‡‡ Complete model with all factors included on maximal EPS production

¶¶ Reduced model without T*YNB and YNB*YNB non significant interactions on maximal EPS production

Significance levels: ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

Figure 2.1 Cell growth (□), EPS production measured by the conventional (▲) and UF methods (■) and apparent viscosity (●) during pH-controlled batch fermentation for 6 repetitions of the central points (32 °C, 5 % WP and 1% YNB). Bars : standard errors of 6 repetitions.

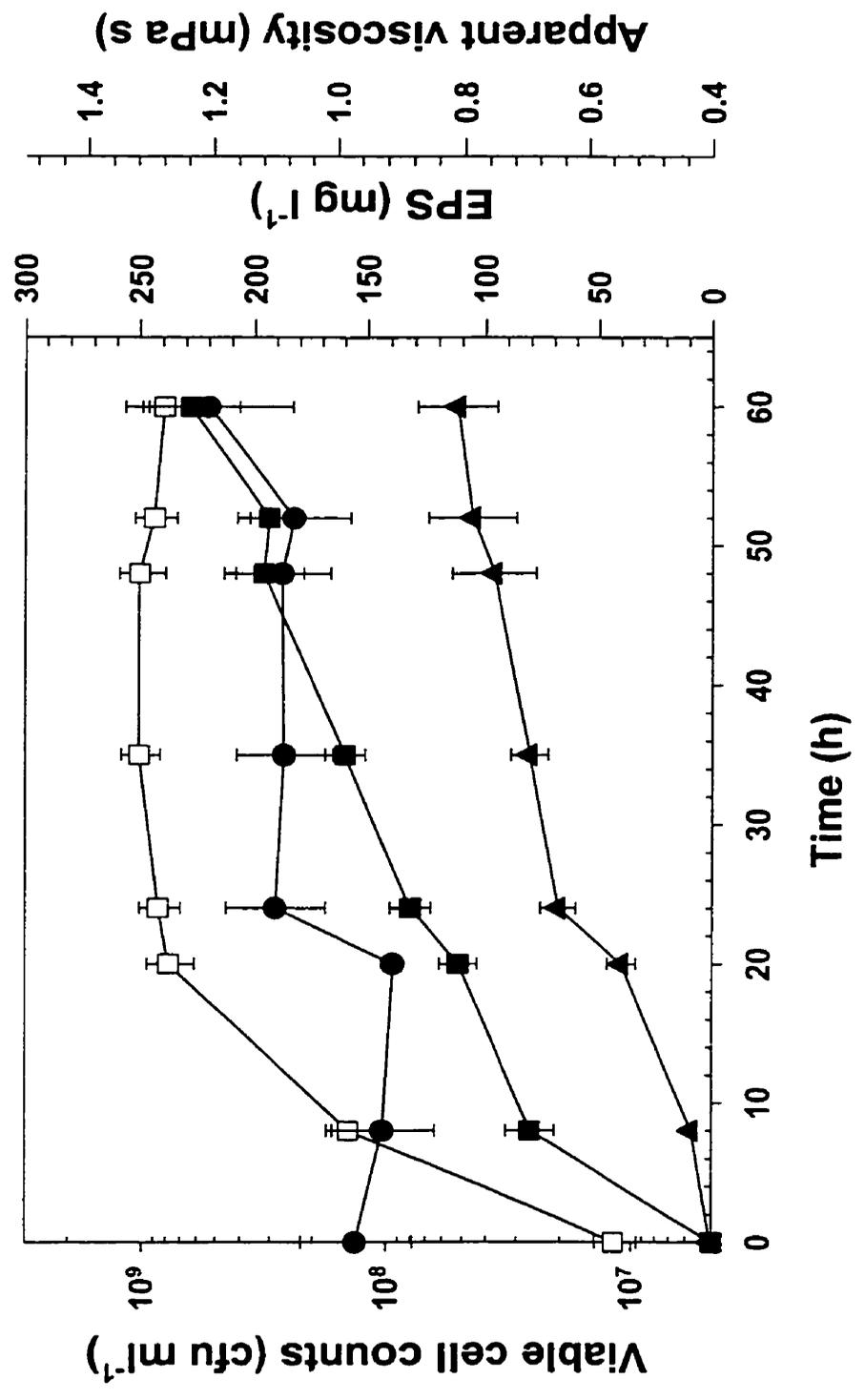


Figure 2.2 Response surface for the effects of whey permeate (WP) and yeast nitrogen base (YNB) concentrations on maximal viable cell counts during pH-controlled batch fermentations at 32°C.

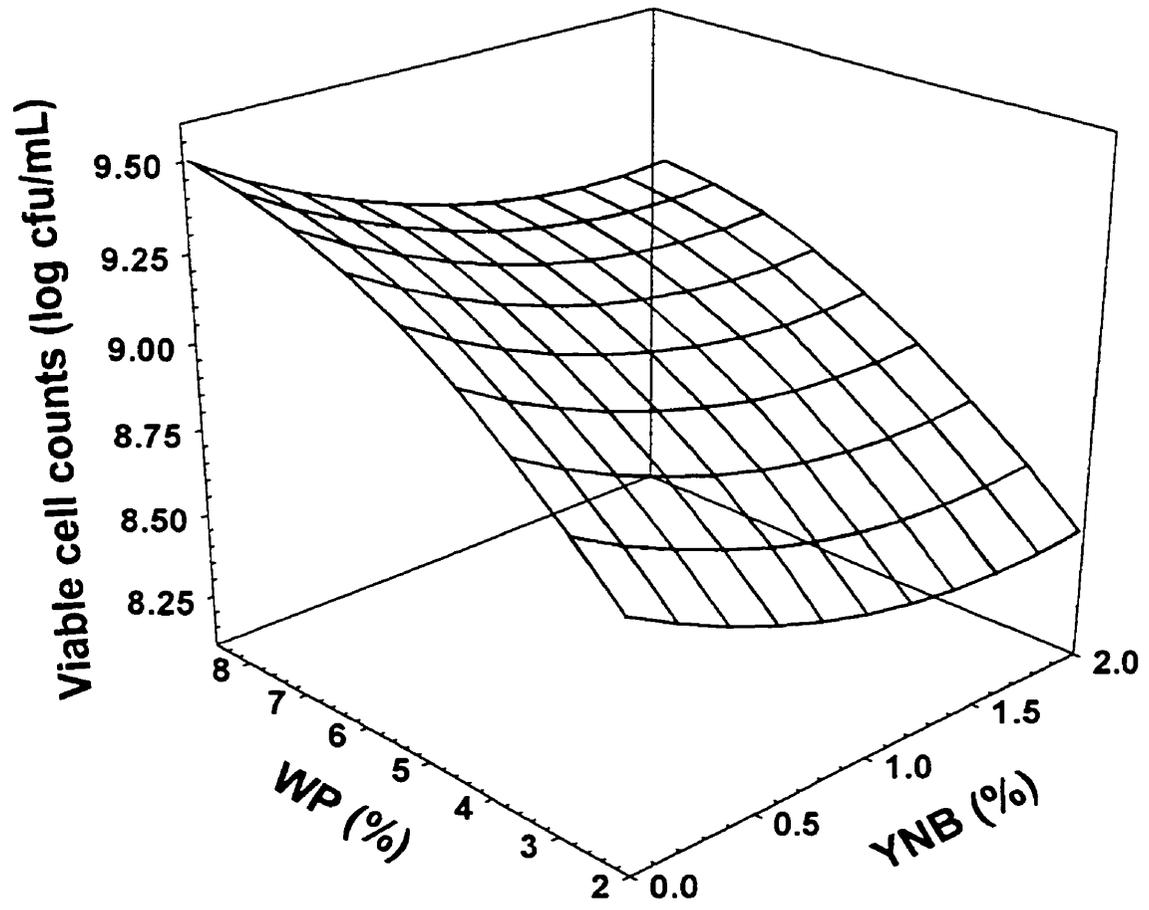


Figure 2.3 Maximal EPS productions during exponential (□) and stationary growth phase (■) during pH-controlled batch fermentations. Fermentations experiments identified by Temperature (°C), and whey permeate (WP %, w/w) and yeast nitrogen base (YNB %, w/v) concentrations.

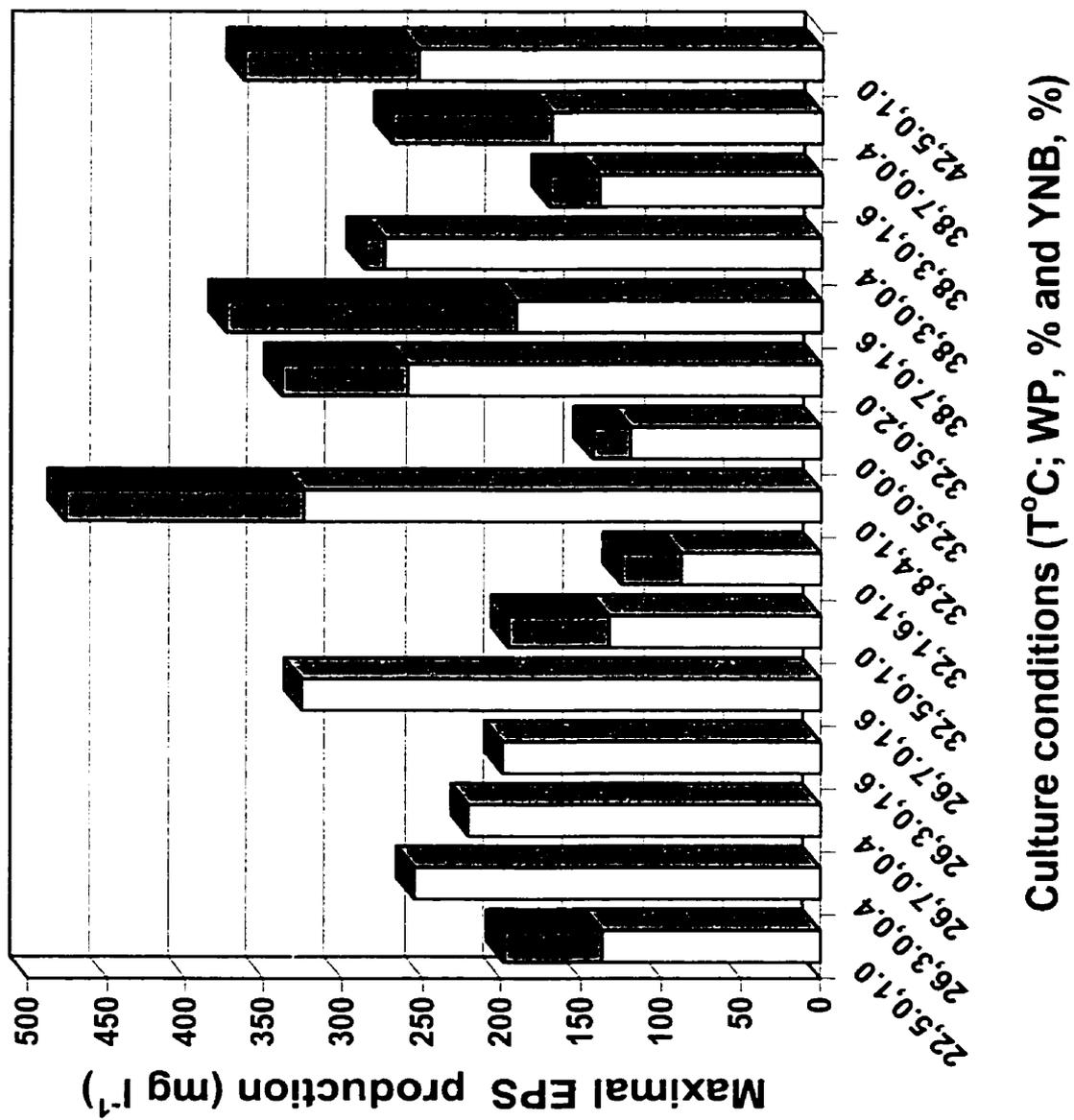
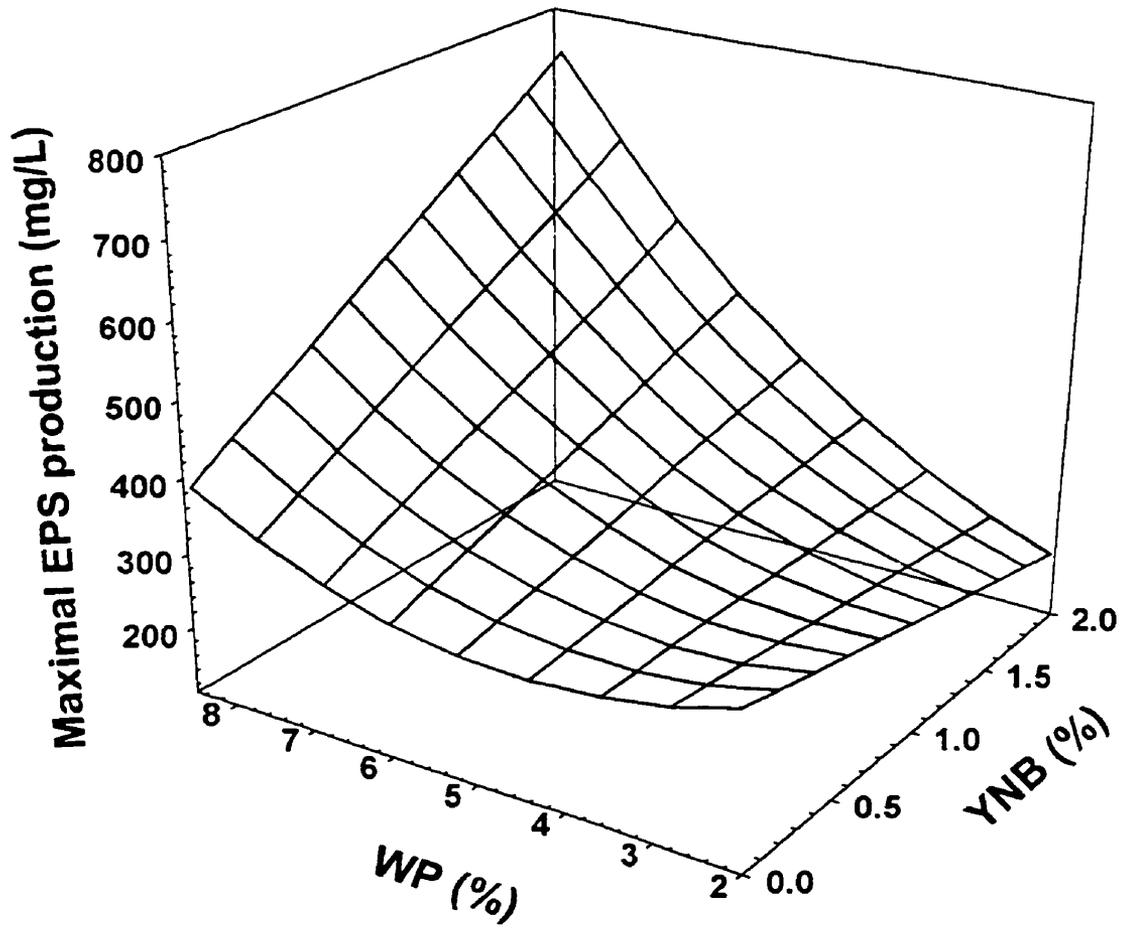


Figure 2.4 Response surface for the effects of whey permeate (WP) and yeast nitrogen base (YNB) on maximal EPS production during pH-controlled batch fermentations at 42°C.



Chapitre III

Screening of Nitrogen Sources for the Growth of an Exopolysaccharide-producing Lactobacillus rhamnosus in Whey Permeate

Maria G. Macedo¹, Christophe Lacroix, C.^{1*} and Claude P. Champagne.²

¹ Dairy Research Centre STELA, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Ste-Foy, QC, Canada G1K 7P4.

² Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-food Canada, St-Hyacinthe, QC, Canada J2S 8E3

3.1 Résumé

L'effet sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M de huit sources d'azote (casamino-acides, bacto-casitone, extrait de levure (EL), ainsi que divers concentrats (WPC) et isolats (WPI) de protéines de lactosérum) ajoutées au milieu à base de perméat de lactosérum (PLS) a été étudié par des tests d'activité acidifiante et spectrophotométrique automatisé. Le type de source d'azote a eu un effet significatif ($P < 0.05$) sur la vitesse maximale d'acidification (V_{\max}) du test d'activité acidifiante et sur la densité optique (DO_{\max}) lors du test spectrophotométrique automatisé. Parmi les sources testées, le WPC-DMV et le WPI-alcalase ont montré les V_{\max} les plus élevées, tandis que l'EL a montré la DO_{\max} la plus élevée. Cependant, aucune corrélation a été trouvée entre ces deux paramètres. Des fermentations en batch à pH contrôlé (6.0) avec *L. rhamnosus* RW-9595M ont été réalisées dans un milieu à base de PLS supplémenté avec les trois sources azotées qui ont montré les meilleurs paramètres cinétiques : WPI-alcalase, WPC-DMV et EL. Il n'y a pas eu de différence significative ($P > 0.05$) sur la biomasse maximale ($3.4-4.9 \times 10^8$ ufc ml⁻¹) pour les trois sources d'azote testées. Par contre, la production maximale d'EPS a été obtenue avec le WPC-DMV (166 mg l⁻¹).

3.2 Summary

Eight nitrogen sources were screened using automated acidification and spectrophotometry (AS) tests in order to select supplements for *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M growth and exopolysaccharide (EPS) production in whey permeate (WP). The nitrogen sources tested were casamino acids, bacto-casitone, yeast extract (YE), as well as various whey protein concentrates (WPC) or whey protein isolates (WPI). The maximum acidification rates (V_{max}) and the maximum optical density readings (OD_{max}) in AS assays were significantly influenced ($P < 0.05$) by the nitrogen sources. Among the products tested, WPC-DMV and WPI Bipro-alcalase enabled the highest maximum acidification rates, while YE gave the highest OD_{max} . However, the V_{max} and OD_{max} data for the different nitrogen sources were not correlated. The AS data was more accurate for predicting the maximum cell populations reached during pH-controlled batch cultures in supplemented WP than acidification data. However, during batch cultures, cell growth and EPS production were affected differently by the nitrogen source. Cell populations measured in WP supplemented with YE, WPI or WPC-DMV were similar, while the highest EPS production was obtained with WP supplemented with WPC-DMV.

3.3 Introduction

Exopolysaccharide-producing cultures are used in fermented milks in order to improve their stability and mouth feel (De Vuyst and Degeest, 1999). It has also been claimed that exopolysaccharides (EPS) have various beneficial physiological effects on humans (Nagaoka *et al.*, 1994; Perez-Fernandez *et al.*, 2000) which could be involved in the probiotic properties of some strains. Therefore, there is interest in the development of fermentation strategies designed for biomass production of EPS-producing strains.

Growth medium has been shown to influence biomass and EPS production by lactic cultures, particularly its content in amino acids, minerals, vitamins and DNA/RNA bases (Grobben *et al.*, 1998; De Vuyst and Degeest, 1999). The amount of EPS produced by bacterial cultures is often linked to biomass production (Grobben *et al.*, 1995), but there are exceptions (Grobben *et al.*, 1998). Furthermore, growth and EPS production is affected by carbon and nitrogen sources (Degeest and De Vuyst, 1999; Looijesteijn *et al.*, 1999a), temperature or pH (Gancel and Novel, 1994a; Van den Berg *et al.*, 1995; Gamar-Nourani *et al.*, 1998). In addition, the selection of growth media for EPS production is tedious, requiring numerous fermentation trials. Therefore, there is interest in determining whether rapid methods for screening growth media, such as automated spectrophotometry (Champagne *et al.*, 1999), could be used to select fermentation media for EPS production.

Of economic concern, with respect to EPS production by lactic acid bacteria (LAB), is the cost of the growth medium, since these cultures are generally tedious, and need a rich medium for optimal development. Inexpensive substrates must be found, and whey permeate (WP) has potential in this respect. WP is a by-product of the cheese industry and is produced in large quantities at low cost. It is mostly composed of lactose and has a high carbon to nitrogen ratio, which is considered desirable for EPS production (Sutherland, 1990). However, the low nitrogen content of WP limits the growth of LAB, and supplementation is thus warranted (Amrane and Prignet, 1998). No study has extensively examined the effects of nitrogen supplementation of WP on both biomass and EPS production by *L. rhamnosus* cultures.

The aim of this work was to evaluate the effectiveness of automated spectrophotometry and acidification methods in selecting nitrogen sources for optimal growth of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in WP. The best nitrogen sources from these tests were then tested on cell growth and EPS production during pH-controlled batch cultures.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Strain and culture preparation

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M was obtained from the Lactic Acid Bacteria Research Network culture collection (Dairy Research Centre STELA, Université Laval, PQ, Canada). This culture was isolated from *L. rhamnosus* ATCC-9595 and was shown to be a stable EPS producer mutant (Dupont *et al.*, 2000). Stock cultures were kept in whey permeate (5% w/w; Foremost, Baraboo, WI, USA) supplemented with yeast extract (1 % w/v; Rosell-Lallemand Inc., Montreal, PQ, Canada) and glycerol (10 % w/v) at -80°C . For inoculum preparation *L. rhamnosus* RW-9595M was sub-cultured twice in MRS (Rosell-Lallemand Inc., Montreal, PQ, Canada) and incubated at 37°C . The first incubation lasted 14 h, while the second incubation was carried out until pH reached 4.8, which generally corresponded to 6 h. This last culture was used as inoculum for the various assays described in this paper.

3.4.2 Acidifying activity test.

This test is based on the fact that growth and activity of LAB is related to the rate of acidification of the medium (Latrille *et al.*, 1992). Reconstituted WP at 5 % w/v solids was adjusted at pH 5.0 with 3M HCl, then autoclaved (121°C for 15 min). After cooling to 25°C , the WP solution was filtered (AP25 prefilters, Millipore, Bedford, MA, USA) and supplemented with 1 g l^{-1} of KH_2PO_4 and 1 g l^{-1} of $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (BHL Inc., Toronto, ON, Canada) in order to increase the buffering capacity of the medium. The WP medium was then supplemented with 1 g l^{-1} of one of the eight nitrogen sources described in *Table 3.1*.

The supplemented whey permeates were autoclaved again at 121°C for 15 min. Erlenmeyer flasks containing 100 ml of sterilized medium were placed in a water bath controlled at 37°C. The medium was inoculated with 2 ml of the MRS-grown culture, and pH immediately adjusted at 6.0 ± 0.1 units using 3M HCl. The pH electrodes previously disinfected with NaClO 10 % v/v and thoroughly rinsed with sterile water, were introduced through bores in the rubber stoppers. Continuous stirring with magnetic bars was used to maintain homogeneity in the flasks during an incubation period of 15 h. The apparatus for automatic pH measurements and data acquisition was composed of 6 pH electrodes (Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, IL, USA), connected to a pH meter Orion EA 940 (Orion Research Inc, Boston, MA, USA) and an electronic interface board Orion 607 (Orion Research Inc, Boston, MA, USA). A program written in Quick-Basic was used for data acquisition. Electrodes were calibrated with two buffers (pH 7.0 and pH 4.0) before chemical sterilisation. The pH vs. time data were first smoothed using a mobile mean over 15 points and the first derivative was calculated. The following parameters were estimated: maximum acidification rate (V_{\max} , in mUpH min^{-1}) and time at which V_{\max} was observed (T_{\max} , in min). Reported data are averages of five independent repetitions for each treatment.

3.4.3 Automated spectrophotometry test

An automated spectrophotometry (AS) assay was also conducted as described by Champagne *et al.* (1999), using the same media and inoculation procedure as for acidification test, except that nitrogen sources were added to WP at 0.4 g l^{-1} . Optical density (OD) was read at 600 nm with a Bioscreen C instrument (Lab-systems, Helsinki, Finland), after mechanical shaking of the plates during incubation at 37°C. Two kinetics parameters were measured: OD_{\max} and maximum growth rate (μ_{\max}). The μ_{\max} data were estimated from the slope of the linear regression calculated for the log OD versus time data, during the exponential growth phase, using the software Sigma Plot (SPSS, Chicago, IL, USA). Reported data are averages of three independent assays, in which each treatment was carried out in duplicate.

3.4.4 pH-controlled batch cultures

Cultures were conducted in a 1.5 l bioreactor (Biogénie, Ste-Foy, QC, Canada) with different media: WP (5 % w/w) supplemented with 10 g l⁻¹ YE, WPC-DMV or WPI-alcalase. The media were prepared as described for the acidifying activity test. Fermentations inoculated at 1.5 % v/v were conducted at 37°C, with agitation at 100 rev min⁻¹ and pH controlled at 6.0 by the addition of NH₄OH 3M. Control fermentations in WP without nitrogen supplement were also carried out. Two independent replicates of each treatment were performed.

3.4.5 Analyses

Viable populations were estimated by pour plating appropriate dilutions (1 g l⁻¹ peptone) in MRS agar (Rosell-Lallemand Inc., Montreal, PQ, Canada). Plates were incubated aerobically at 37°C for 48 h. Reported data are means from duplicate analyses.

The EPS concentration was analyzed in duplicate by an ultrafiltration method (Bergmaier *et al.*, 2001), and residual lactose concentration and lactic acid production were determined in supernatant samples by HPLC as described in chapter 2.

3.4.6 Experimental design and statistical analysis

A randomized design was used to test the effect of nitrogen sources on acidifying activity and cell growth. Analysis of variance and the Least Significant Difference (LSD) method at $P < 0.05$ were used in order to find the most effective nitrogen sources in the automated tests and batch cultures. Statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 4.0 (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA).

3.5 Results and discussion

3.5.1 Nitrogen source concentration for acidifying activity and AS tests

The nitrogen concentrations were chosen according to sensitivity of acidifying activity and AS tests, for detecting differences amongst treatments for the kinetic parameters.

They were determined from preliminary trials carried out with YE at different concentrations between 1 to 5 g l⁻¹ for acidifying activity test and between 0.1 to 1 g l⁻¹ for AS test. For AS assays Champagne *et al.* (1999) recommended the use of low nitrogen concentration in order to keep OD readings between 0.4 to 0.6 to stay in the linear range for absorbance data. Data did not show significant differences ($P>0.05$) for V_{\max} and T_{\max} in the acidifying activity test between 2 to 5 g l⁻¹ YE, whereas differences were found for 1 g l⁻¹ ($P<0.05$). Thus the nitrogen source concentration of 1 g l⁻¹ was chosen for the acidifying activity test. For the AS test a nitrogen concentration of 0.4 g l⁻¹ produced an OD between 0.4 to 0.6 units during incubation.

3.5.2 Effect of nitrogen sources on acidifying activity

Eight nitrogen sources with different AN/NT ratios (*Table 3.1*) were screened in order to find a suitable nitrogen source for growth of *L. rhamnosus* RW-9595M. The nitrogen sources selected did not contain polysaccharide compounds with MW greater than 10000 Da, which could interfere with EPS determination, except for WP with YE, which contained 315 mg l⁻¹ of polysaccharides. In order to test the performance of each source during the exponential growth phase, acidifying activity and AS tests were carried out with a limiting nitrogen concentration.

The maximum acidification rate, V_{\max} , was significantly influenced by the nitrogen source ($P<0.05$; *Table 3.1*). Amongst the products tested, casamino acids, WPC-DMV, WPC-promil, WPI-alcalase and WPI alcalase-flavourzyme led to the highest V_{\max} , varying from 2.95 to 3.35 mUpH min⁻¹. The least effective supplements for acidification were YNB and, surprisingly, YE for which V_{\max} was similar to or lower than the control treatment without added supplement, respectively. Bacto-casitone did not apparently stimulate acidification in the conditions of the test, as indicated by the absence of significant difference for V_{\max} compared with the control. However, the T_{\max} values were not significantly different for the different nitrogen sources. A regression analysis between V_{\max} and T_{\max} data showed a weak but significant correlation between the two parameters ($r=-0.40$, $P=0.004$). Although the correlation coefficient is not high, it suggests that the higher the acidification rate, the shorter

is T_{\max} . This data was expected for fermentations without pH control, as for the acidification trials.

3.5.3 Effect of nitrogen sources on growth

Only YE significantly increased OD_{\max} compared with the control ($P < 0.05$, *Table 3.1*). The rest of nitrogen sources did not show significant differences. The growth rates (μ_{\max}) were not significantly affected by the nitrogen source ($P > 0.05$). A regression analysis between OD_{\max} and μ_{\max} showed a significant but low correlation for both parameters ($r = 0.54$, $P = 0.002$). This result has been observed previously by Gaudreau *et al.* (1999) who reported that the OD_{\max} - μ_{\max} relationship varies between strains and growth medium. Very low non-significant correlations ($P > 0.05$) were observed between acidifying activity (V_{\max} and T_{\max}) and AS parameters (OD_{\max} and μ_{\max}). The limited discrimination among treatments by the statistical test (*Table 3.1*) and the low correlation among parameters could be explained by the small differences for treatment means compared with the variability of the acidifying activity and AS test (*Table 3.1*). Moreover Burry *et al.* (1998; 1999) showed that some WPC and WPI could stimulate cell growth of LAB. The effectiveness of YE as a good nitrogen source for LAB is well recognized (Amrane et Prigent, 1998) and this effect is also observed on OD_{\max} data in this study.

The AS and acidifying activity tests were carried out for screening 8 nitrogen sources in order to find the best sources for enhancing *L. rhamnosus* RW-9595M growth. Since the AS and acidification data were not correlated, the nitrogen sources that gave the highest acidification and growth data, i. e. WPC-DMV, YE as well as WPI-alcalase which performed well in both assays, were tested for cell growth and EPS production during pH-controlled batch cultures.

3.5.4 Cultures in WP media

Maximum population and EPS production during pH-controlled batch cultures in WP without added nitrogen source and WP supplemented with WPC-DMV, YE and WPI-alcalase are presented in *Table 3.2*. A supplementation level of 10 g l^{-1} which was higher than for the

AS and acidification tests was chosen to increase cell growth and EPS production, which occurred at the end of the exponential growth phase (Dupont *et al.*, 2000). The growth curves were characterized by three phases. A rapid growth was observed during the first 4 h of incubation, followed by a slower population increase between 4 and 12 h. The stationary growth phase was reached after 12 h in WP while slow growth was still observed in WP supplemented with YE, WPI-alcalase and WPC-DMV between 12 and 24 h of incubation (Figure 3.1). The nitrogen source significantly affected ($P < 0.05$) the maximum EPS production, which was low and ranged from 92 to 166 mg l⁻¹ (Table 3.2). Cultures supplemented with WPC-DMV and WPI-alcalase showed the highest and lowest EPS productions, respectively. These productions are much lower than the maximum productions of 1275 and 1700 mg l⁻¹ reported in BMM defined medium (Dupont *et al.*, 2000) and in WP supplemented with YE and minerals (Bergmaier *et al.*, 2001), respectively.

There was no significant difference ($P > 0.05$) for the maximum cell population and EPS specific yield among the nitrogen sources tested (Table 3.2), which were approximately five fold higher and four fold lower than for cultures performed in unsupplemented WP. This agrees with AS data which showed that μ_{\max} was not significantly affected by the nitrogen supplements and OD_{max} with the three supplements (0.43 to 0.56) were similar but higher than OD_{max} for the control (0.26, Table 3.1). However, the maximum population obtained in this study with different nitrogen sources are much lower than those reported by Dupont *et al.* (2000) and Bergmaier *et al.* (2001), with 6×10^9 and 1.1×10^{10} cfu ml⁻¹, respectively.

This low discrimination can also be due to different medium composition used for AS test and cultures, in which nitrogen supplements were added at 0.4 and 10 g l⁻¹, respectively. When the same media are used in fermentations and AS assays, correlations are high, but this is not the case when different media are used (unpublished results).

The correlation between maximum cell counts and EPS production was not significant ($P < 0.05$) which could be explained by the fact that only four culture conditions were tested and that all tested nitrogen sources yielded the same maximum biomass and similar EPS production. A significant correlation between biomass and EPS is expected, if the EPS is mainly produced during the exponential growth phase (Grobben *et al.*, 1995). However, the

composition of the medium influences the ratio of EPS to bacterial biomass (Mozzi *et al.*, 1995a). As for nitrogen supplements, Degeest and De Vuyst (1999) showed that the addition of 4.2 % of peptone/yeast extract mixture in a complex medium gave higher EPS yields than for concentrations lower than 2.8 % of nitrogen mixture. A study by Dupont *et al.* (2000) showed that *L. rhamnosus* RW-9595M could reach very high populations close to 6×10^9 cfu ml⁻¹ in BMM and milk-based media, with EPS concentrations of 1275 and 500 mg l⁻¹, respectively. The BMM defined medium of Morishita *et al.* (1981) contained vitamins and minerals in addition to the amino-acids. Minerals and vitamins have been shown to be essential for growth of lactobacilli (Grobben *et al.*, 1995; Mozzi *et al.*, 1995a).

3.6 Conclusions

Our data showed that addition of a nitrogen supplement also affected EPS yield. However, WP medium without nitrogen supplemented resulted in a higher EPS yield than for WP supplemented with YE, WPI-*alcalase* or WPC-DMV (*Table 3.2*). Moreover, cell counts and EPS levels obtained in the WP-based media were low in comparison with those obtained in BMM medium, This results suggest that a further supplementation of a YE-supplemented WP by minerals and vitamins could be warranted for enhance biomass and EPS production.

Table 3.1 Effect of different nitrogen sources on growth and acidifying characteristics determined by the acidification and AS tests for *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M

Nitrogen sources [§]	V _{max} (pHmU min ⁻¹)	T _{max} (min)	OD _{max} (625 nm)	μ _{max} (h ⁻¹)
Casamino-acids (8.8% αAN [‡] , 10.1% TN [¶])	-3.17 a (0.20)	776 (85)	0.36 ab (0.06)	0.17 (0.01)
Bacto-casitone (4.7% αAN, 13.1% TN)	-2.70 bcd (0.45)	855 (95)	0.43 ab (0.09)	0.24 (0.06)
WPC-Promil (65 % of protein hydrolysis)	-3.01 ab (0.18)	815 (85)	0.40 ab (0.14)	0.25 (0.06)
WPC-DMV (80 % of protein hydrolysis)	-3.35 a (0.44)	703 (131)	0.43 ab (0.17)	0.21 (0.01)
WPI-AS650 (2.8 % αAN, 14.0% TN)	-3.06 ab (0.28)	739 (81)	0.44 ab (0.07)	0.25 (0.01)
WPI-alcalse [†] 20 % αAN/TN	-3.21 a (0.30)	792 (108)	0.45 ab (0.13)	0.23 (0.008)
WPI-alcalse-flavourzyme [†] 29.2 % αAN/TN	-2.95 abc (0.17)	766 (64)	0.42 ab (0.09)	0.22 (0.03)
Yeast extract (6.0 % αAN, 10.9 % TN)	-2.31 de (0.58)	776 (83)	0.52 a (0.02)	0.26 (0.02)
Yeast nitrogen base (YNB)	-2.00 e (0.33)	831 (61)	0.30 ab (0.05)	0.23 (0.04)
None (control)	-2.56 cd (0.38)	838 (53)	0.26 b (0.06)	0.21 (0.04)

[¶] Means followed by the same letter are not significant different ($P > 0.05$).

[§] Casamino-acids, bacto-casitone, yeast extract and yeast nitrogen base were obtained from Difco (Difco, Detroit, IL, USA); WPI-AS605 and WPI-Bipro from Davisco (Davisco Food International, Inc., Le Sueur, MN, USA); WPC-Promil from The Institute of Chemical Technology (Prague-Dejvice, Czech Republic) and WPC-DMV from (Veghel, Holland).

[†] WPI-Bipro was treated with two enzymatic treatments: 64.77 U alcalase from *Bacillus licheniformis* at pH 7.0 and 42°C for 2 h (WPI-alcalse) and 64.77 U alcalase and 37.12 U flavourzyme from *Aspergillus oryzae* at pH 8.0 and 45°C for 3 h. The enzymes were obtained from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark).

[‡] αAN = α amino nitrogen

[¶] TN = total nitrogen

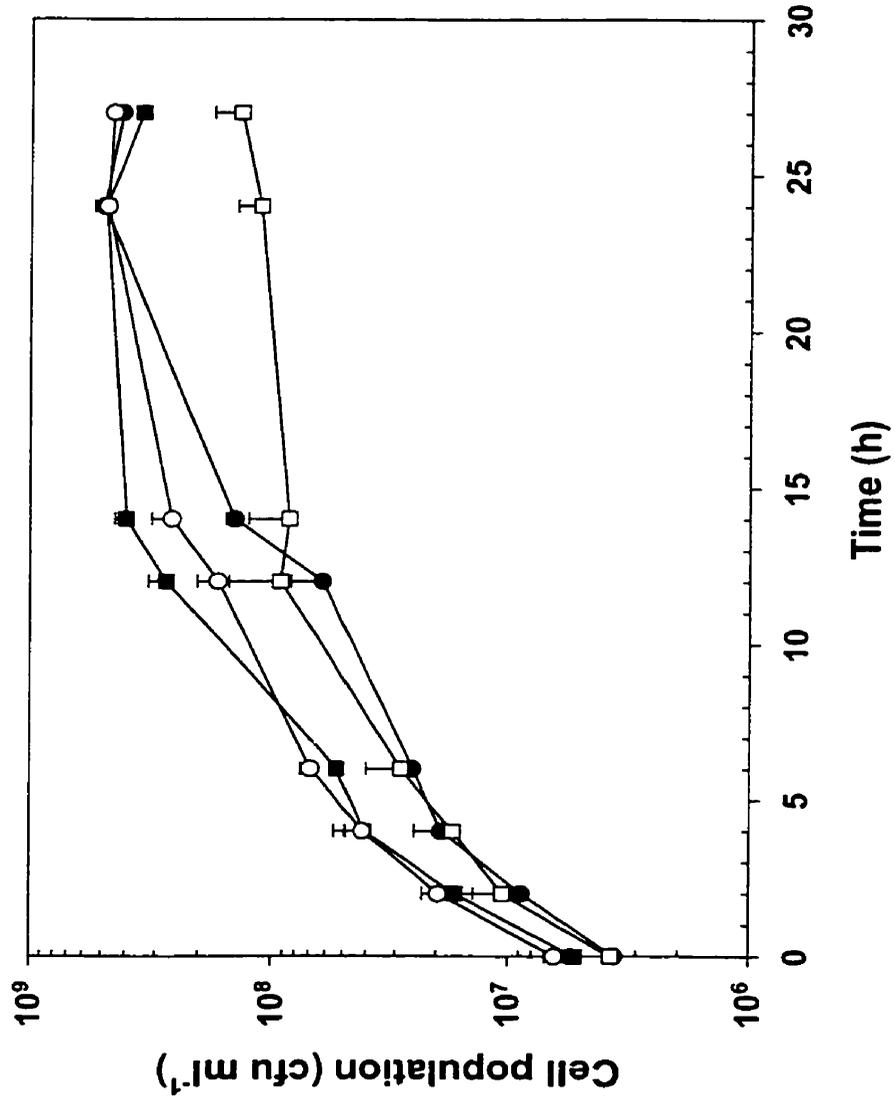
In brackets, standard error of the mean for five repetitions.

Table 3.2. Effect of growth medium on maximum population, EPS production, and EPS specific yield during pH-controlled batch cultures with *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M

Medium	Population (cfu ml⁻¹)	EPS specific yield (mg EPS 10⁶ cfu⁻¹)	EPS (mg l⁻¹)
Whey permeate (WP)	1.1 x 10 ⁸ a (3.95 x 10 ⁷)	1.05 b (0.30)	112 ab (7.8)
WP + YE	4.9 x 10 ⁸ b (7.07 x 10 ⁷)	0.27 a (0.04)	130 b (0.3)
WP + WPC-DMV	3.4 x 10 ⁸ b (7.7 x 10 ⁷)	0.24 a (0.07)	166 c (10.4)
WP + WPI-alcalase	4.7 x 10 ⁸ b (2.83 x 10 ⁷)	0.36 a (0.02)	92 a (19.2)

Means that are followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).
In brackets, standard error of the mean for two repetitions.

Figure 3.1 Comparison of growth of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M during pH-controlled batch cultures in unsupplemented WP (□) and WP supplemented with different nitrogen sources: yeast extract (●), WPI-Bipro-alcalse (○) and WPC-DMV (■).



Chapitre IV

Effect of Medium Supplementation on Exopolysaccharide Production by Lactobacillus rhamnosus RW-9595M in Whey-Permeate.

M.G. Macedo ¹, C. Lacroix¹, C.P. Champagne ² and N.J. Gardner ²

¹ Dairy Research Centre STELA, Pavillon Paul Comtois, Université Laval, Ste-Foy, PQ, Canada, G1K 7P4.

² Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, St-Hyacinthe, PQ, Canada J2S 8E3.

Accepted in International Dairy Journal

4.1 Résumé

La production d'EPS par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M a été étudiée lors de fermentations en batch à pH contrôlé dans un milieu défini (BMM) et un milieu à base de perméat de lactosérum (PLS), additionné d'extrait de levure ultrafiltré (PLSEL) et supplémenté avec les groupes de nutriments utilisés dans la formulation du milieu BMM: vitamines (V), sels (S) et acides aminés (AA). Un plan factoriel randomisé a été utilisé pour déterminer les effets principaux et les interactions entre les groupes de nutriments testés. La biomasse et la production d'EPS maximales dans le milieu BMM ont été de 2.8×10^9 ufc ml⁻¹ et 644 mg l⁻¹, respectivement. La biomasse maximale dans le milieu PLSEL avec différentes suppléments a varié entre 4.4×10^9 à 1.1×10^{10} ufc ml⁻¹, avec une biomasse maximale dans le milieu supplémenté avec V, S et AA. Les productions d'EPS maximales ont varié entre 440 à 2775 mg l⁻¹ et correspondent à des productivités entre 17.6 et 115 mg EPS (l h)⁻¹. La production d'EPS n'a pas été significativement influencée ($P > 0.05$) par la supplémentation en V. En revanche, la supplémentation du milieu avec AA a eu un effet significatif ($P < 0.05$) mais limité, tandis que l'addition de S a influencé très significativement ($P < 0.05$) la production d'EPS. Une forte interaction entre S*AA a été également observée. La supplémentation avec S a augmenté de façon importante le rendement spécifique en EPS en comparaison avec les milieux supplémentés seulement avec AA ou V (0.46 et 0.09 mg EPS (10⁶ ufc)⁻¹, respectivement). La production d'EPS obtenue dans cette étude par *L. rhamnosus* RW-9595M dans un milieu optimal à base de PLS supplémenté avec EL, S, V, et AA est la plus élevée rapportée dans la littérature pour Lactobacilles.

4.2 Summary

Exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M was studied during pH-controlled batch cultures in the BMM-defined medium and a whey-permeate- supplemented medium with yeast extract (WPYE). A multilevel-factorial design was used to determine the main effects and interactions of groups of nutrients, vitamins (V), salts (S) and amino acids (AA) used in the formulation of BMM medium, in order to find the limiting nutrient group for EPS production in WPYE. Maximum population and EPS production, measured by a new UF extraction method, in BMM medium were 2.8×10^9 cfu ml⁻¹ and 644 mg l⁻¹, respectively. Maximum populations in WPYE varied between 4.4×10^9 to 1.1×10^{10} cfu ml⁻¹, with the highest population obtained when V, S and AA supplements were added. Maximum EPS productions were in the range from 440 to 2775 mg l⁻¹ and corresponded to EPS productivities between 17.6 and 115 mg EPS (l h)⁻¹. The addition of V to the WPYE medium did not significantly ($P > 0.05$) influence EPS production. The addition of AA alone to WPYE had a significant ($P < 0.05$) but limited effect on EPS production, but the addition of S largely increased this production, and a strong interaction was observed between AA and S. The addition of S to WPYE largely increased EPS specific yield compared with WPYE supplemented or not with AA and V, with 0.46 and 0.09 mg EPS (10^6 cfu)⁻¹, respectively. In this study, the EPS production obtained using *L. rhamnosus* RW-9595M in the optimum WPYE containing S and V is the highest reported for lactobacilli.

4.3 Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) have been used for centuries for the preservation of foodstuffs due to their ability to produce lactic acid. In recent years, interest in LAB has expanded due to their ability to produce compounds, such as aromas, flavours or enzymes, which influence the sensory characteristics of fermented foods. Furthermore, some LAB are able to produce exopolysaccharides (EPS) which play a considerable role in the rheology and texture of fermented milks, as well as improve their stability and mouth feel (Sebastiani and Zelger, 1998; De Vuyst and Degeest, 1999). It has also been claimed that EPS have various beneficial physiological effects on humans (Nagaoka *et al.*, 1994; Ouwehand *et al.*, 1999; Perez-Fernandez *et al.*, 2000). Based on these characteristics, EPS-producing LAB could be used as natural additives in food products and become an alternative to chemical, plant or animal additives as a source of stabilizing, thickening, gelling or water-binding agents (Sutherland, 1998). However, EPS yields from LAB are low (40-1400 mg l⁻¹). Attempts have been made to improve yields by manipulating medium composition (De Vuyst and Degeest, 1999), such as the carbon source (Grobben *et al.*, 1995; Looijesteijn *et al.*, 1999a), temperature or pH (Gancel and Novel, 1994a; Van den Berg *et al.*, 1995; Gamar-Nourani *et al.*, 1998). However, few works have examined the influence of vitamins, salts or amino acids or their interactions on EPS production (Mozzi *et al.*, 1995a; Gamar *et al.*, 1997; Grobben *et al.*, 1998, 2000).

Of economic concern, with respect to EPS production by LAB, is the cost of growth media, since these cultures are generally tedious and need a rich medium for optimal growth. Inexpensive substrates must be found, and whey permeate (WP) has potential in this respect. WP is a by-product of cheese industry, produced in large quantities at low cost. It is mostly composed of lactose and has a high carbon to nitrogen ratio, which is considered desirable for EPS production (Sutherland, 1990). However, the low nitrogen content of WP limits growth of LAB, and supplementation is thus warranted (Amrane and Prigent, 1998). The effect of nitrogen supplementation on WP medium using yeast nitrogen base (YNB), YE and other nitrogen sources on both biomass and EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595M has been studied previously (chapitre III). All nitrogen sources tested exhibited very limited or no effect

on cell growth or EPS production. In contrast, a high EPS production (1300 mg l⁻¹) was measured in BMM defined medium with this strain (Dupont *et al.*, 2000). These data suggested that WP supplemented with nitrogen sources is deficient in other nutrients, such as minerals or vitamins required for high cell growth and EPS production.

The aim of this work was therefore to examine the influence of medium supplementation on cell growth and EPS production during pH-controlled batch cultures of *L. rhamnosus* RW-9595M in yeast extract supplemented whey permeate (WPYE). WPYE was supplemented with one of three groups of nutrients of BMM-defined medium (vitamins, V; salts, S; and amino-acids, AA) or combinations of these groups.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Bacterial strain and culture preparation

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M was obtained from the Lactic Acid Bacteria research Network culture collection (Université Laval, PQ, Canada). This culture was isolated from *L. rhamnosus* ATCC-9595 and was shown to be a stable EPS producer mutant (Dupont *et al.*, 2000). Stock cultures were kept in whey permeate (5 % w/w; Foremost, Baraboo, WI, USA) supplemented with yeast extract (1% w/v; Rosell-Lallemand, Inc, Montreal, PQ, Canada) and glycerol (10% w/v) at -80 °C. For inoculum preparation, *L. rhamnosus* RW-9595M was sub-cultured twice in MRS (Rosell-Lallemand Inc., Montreal, PQ, Canada) at 37 °C. The first and second sub-cultures were incubated for 14 h and 6 h, respectively, or until pH reached 4.8. The resulting culture was used as inoculum for the various assays described in this paper.

4.4.2 Media

Concentrated solutions of vitamins, amino acids and salts of the basal BMM-defined medium (Moroshita *et al.*, 1981), were prepared separately. The concentrated vitamin solution contained (per l): 0.1 g folic acid, 1 g nicotinic acid, 1 g pantothenic acid, 2 g pyridoxal and

1 g riboflavin. It was sterilised by filtration (0.22 μm , Puradisc, Whatman, Ann Arbor, MI, USA). The amino acid (L form) stock solution contained (per l): 1 g of arginine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, serine, threonine, tryptophane, tyrosine and valine as well as 2 g of aspartic and glutamic acids and cysteine. The salt stock solution contained (per l): 0.5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 g CH_3COONa , 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ and 0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Vitamins and amino acids were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), and salts from BHD Inc. (Toronto, ON, Canada).

The BMM medium had the following composition (per l): 70 g lactose, 32 g of KH_2PO_4 , and K_2HPO_4 , 100 ml of the salt stock solution, 100 ml of the amino acid stock solution, 1 ml of filter-sterilised concentrated vitamin solution and 1 ml Tween 80. The lactose content was increased compared with the 10 g l^{-1} in the formulation of Morishita *et al.* (1981), in order to have the same lactose concentration as in WP and to avoid sugar limitation during cultures. The medium without vitamins was sterilised at 121°C for 5 minutes (real holding time at 121 °C, AMSCO, model 3024, Erie, PA, USA) and cooled to 37°C before adding the vitamin solution.

The WP medium was prepared by rehydrating 78 g WP powder in 800 ml of distilled water, for a final lactose concentration of 70 g l^{-1} . The pH was adjusted to 5.0 with 3M HCl and the medium was heated at 121°C for 5 min (real holding time at 121°C, AMSCO, model 3024, Erie, PA, USA). After cooling to 25°C, it was filtered with 8 μm filter (Whatman, Ann Arbor, MI, USA) to remove the precipitate. The filtered solution (795 ml) was supplemented with 1 ml of Tween 80, 5 g l^{-1} yeast extract (previously ultrafiltered at 10 kDa with to remove polysaccharides, as described by (Champagne *et al.*, 1999) and, depending on the treatment, 100 ml l^{-1} of the salt stock solution and/or 100 ml l^{-1} of the amino acid stock solution. The medium was sterilized at 121°C for 5 min and cooled 37°C. For some treatments 1.0 ml of the concentrated filter-sterilized vitamin stock solution was added. For treatments without addition of salt, amino acid or vitamin, an equivalent amount of water was substituted. Since media were heated for a shorter holding time than is normally recommended (15 min at 121°C), all media were incubated for 3 days at 25°C and sterility was confirmed by the absence of colonies

on MRS agar. The supplementation combination tested with WPYE are described in *Table 4.1*. Cultures were also performed in WP*V*S*AA without YE supplementation.

4.4.3 Fermentations

Batch cultures were carried out for 56 h in two BioFlo III and one BioFlo 3000 bioreactors (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) with a working volume of 2.5 l. The pH was controlled at 6.0 with 5M NH₄OH, and temperature and mixing were set at 37°C and 100 rev min⁻¹. Cultures were inoculated at 0.6 % (v/v) with a fresh culture produced in MRS medium as described above. Samples were aseptically withdrawn every 8 h to determine the viable population, EPS concentration, lactose and lactic acid concentrations, as well as the relative viscosity of culture broth and supernatant. Samples were heated at 100°C for 15 min in order to destroy enzymes which could induce polysaccharide hydrolysis and to liberate polysaccharides attached to the cell walls. The broth samples were centrifuged at 13200 g and at 4°C for 20 min (Sorval Instrument, Newtown, CO, USA). Two independent replicates of each fermentation were carried out, except for cultures in BMM medium with three replicates and experimental culture V*AA which was not repeated.

4.4.4 Analysis

Viable populations were estimated by plating appropriate dilutions (1 g l⁻¹ peptone) in MRS agar (Rosell-Lallemand Inc., Montreal, PQ, Canada). Plates were incubated anaerobically at 37°C for 48 h. Reported data are mean from duplicate analyses. EPS purification and quantification and lactose and lactic acid concentration were carried out as described in chapter II.

A capillary relative viscosity method (CRV) was used to measure viscosity in culture broth and supernatant samples. The samples (15 ml) were introduced in to a Cannon-Fenske Routine capillary Viscometer (size 50, International Research Glassware, Kenilworth, NY, USA) connected to a water bath set at 25°C. After a temperature stabilization period of 10 min, the time required by the sample to flow out in the capillary was determined. The CRV values are reported as the ratio between the flow time for the sample and for water under the same

experimental conditions. Reported data are means of triplicate analyses. Broth samples were taken from the bioreactor and analysed immediately. For supernatants, samples were treated as for EPS determination as described in chapter II.

4.4.5 Experimental design and statistical analysis

A 2³ factorial design with two replications was used to test the effect of WPYE supplementation on cell growth and EPS productions (*Table 4.1*). Real variables were transformed to coded values where -1 represents the absence and +1 the addition of a nutriment group. Analysis of variance was used to test significant factors ($P < 0.05$). To compare treatment means, the LSD test was used (Montgomery, 1997). Statistical analyses were performed with Statgraphics plus 4.0 (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA).

4.5 Results

4.5.1 Effect of medium composition on populations

The maximum viable cell count during experimental batch cultures was significantly influenced by the main effects of salts (S, $P < 0.001$) and amino-acids (AA, $P < 0.05$), as well as the interaction of S*AA ($P < 0.01$). For media containing the three groups (V, S and AA) and the S*AA combination, the viable counts were the highest, reaching 9.30×10^9 and 1.06×10^{10} cfu ml⁻¹, respectively, whereas for the others treatments the maximum cell population was between 4 to 6×10^9 cfu ml⁻¹ (*Table 4.1*). The maximum population in BMM medium, 2.8×10^9 cfu ml⁻¹, was significantly lower than for cultures in WPYE with or without added supplements.

The stationary phase of growth was obtained after 15 to 32 h of incubation, depending on medium composition, with the longest growth period (32 h) measured for WPYE and WPYE*V (*Table 4.1*).

4.5.2 Production of EPS

Maximum EPS production, volumetric productivity and EPS specific yield for experimental batch cultures with *L. rhamnosus* RW-9595M, are reported in *Table 4.1*.

Maximum EPS production was measured after 24 h for all tested culture conditions (*Table 4.1*). The ANOVA showed that EPS production and volumetric productivity were significantly influenced by the main factors S ($P < 0.001$), AA ($P < 0.01$) and interaction S*AA ($P < 0.01$), as for maximum cell counts, whereas the EPS specific yield was only significantly influenced by S ($P < 0.001$) (*Table 4.2*). For maximum EPS production data, the LDS test revealed three distinct groups. The group with low EPS production, from 412 to 644 mg l⁻¹, was composed of cultures in WPYE and WPYE supplemented with V, AA and the combination of V*AA. EPS production in this group was 644 mg l⁻¹ and was not significantly different ($P > 0.05$) from that in BMM. Cultures in WPYE supplemented with S and the combination of V*S was the second group with intermediate EPS production from 1495 to 1673 mg l⁻¹, which was not significantly different ($P > 0.05$) from that in WP supplemented with V, S and AA, but without added YE (1802 mg l⁻¹). Finally, the highest maximum EPS productions of 2767 and 2775 mg l⁻¹ were measured in WPYE supplemented with S*AA and V*S*AA, respectively.

EPS production was associated with cell growth: the correlation between viable cell counts and EPS production calculated for maximum EPS production was significant ($R^2 = 0.70$; $P < 0.05$). The EPS production was very low during the stationary phase of culture, as shown for WPYE supplemented with V, S and AA groups (*Figure 4.1*).

The highest volumetric productivities were measured for cultures in WPYE supplemented with S*AA and V*S*AA which corresponded to the highest maximum EPS production. A large range of EPS specific yield, from 0.088 to 0.464 mg EPS (10⁶ cfu)⁻¹, was measured. The only factor that significantly influenced the EPS specific yield in WPYE media was the addition of salts ($P < 0.001$) (*Table 4.2*). The addition of S increased EPS specific yield by 2.8 to 5.7-fold compared with WPYE (*Table 4.1*).

4.5.3 Lactose and lactic acid

Lactose was totally consumed after 24 h (end of exponential growth phase) for cultures performed in WPYE added with S and other nutrient group combinations (S*AA, V*S, V*S*AA). Lactic acid production was maximum after between 24 to 48 h of culture and

lactic acid yield from lactose, varying from 0.66 to 0.96, was largely dependent upon culture conditions (*Table 4.1*).

Cultures in BMM and WPYE medium showed the lowest lactic acid yields (0.66 to 0.75, respectively), whereas the highest values were obtained for culture in WPYE supplemented with V and AA (0.96).

4.5.4 Relative Viscosity

The maximum relative viscosity values (CRV) for culture broths and supernatants are reported in *Table 4.1*. The correlations between maximum EPS production and CRV for the culture broth and supernatant were very high ($R^2 = 0.94$ and 0.90 , respectively, $P < 0.001$). The CRV analyses of culture broth and supernatant samples showed that relative viscosity changes paralleled EPS production during the exponential phase of growth as illustrated for culture in WPYE supplemented with V, S and AA (*Figure 4.1*). Therefore, relative viscosities were significantly influenced by the same factors (S, AA and S*AA) as for maximum EPS production (*Table 4.2*). However, CRV_{max} values of culture broth in WPYE supplemented with S, S*AA, V*S or V*S*AA were three to five-fold higher than CRV_{max} of supernatant (*Table 4.1*). For these treatments, relative viscosity in the broth dropped steadily during the stationary phase paralleling cell growth, although both EPS concentration and relative viscosity in the supernatant remained constant, as shown in *Figure 4.1*. In contrast, for the other experimented cultures, CRV_{max} in culture broth and supernatant were closer and remained stable during the stationary growth phase (*Table 4.1*).

4.6 Discussion

Supplementation of WP with different nitrogen sources were previously tested to optimize EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595M (Chapire III). However, none of the tested N sources resulted in maximum EPS production comparable to that obtained in BMM medium (1275 mg l^{-1}) reported by Dupont *et al.* (2000).

In this study supplementation of WPYE by groups of components in BMM medium resulted in the formulation of an efficient medium for *L. rhamnosus* RW-9595M growth and EPS production. The maximum population in WPYE supplemented with V*S*AA (1.0×10^{10} cfu ml⁻¹) was remarkably high for a thermophilic lactobacilli. The addition of S, V or AA alone did not improve growth compared with control WPYE, but combinations of supplements that included S and AA resulted in maximum populations greater than 9×10^9 cfu ml⁻¹ (Table 4.1). Studies on the effect of components on growth are normally conducted by omitting one compound at a time (Grobben *et al.*, 1998). However, with this procedure, it is difficult to test for possible interactions between factors, which can be shown by factorial design. To our knowledge, this is the first report on interactions between salts and amino acids on the growth of *L. rhamnosus*. However, in our study, the compounds responsible for the beneficial effect of S and AA supplements on growth of strain RW-9595M were not determined.

The maximum cell populations in BMM was low (2.8×10^9 cfu ml⁻¹) compared with the other media tested with the same strain, medium and culture conditions. Dupont *et al.* (1998) reported approximately two-fold higher maximum cell population (5.7×10^9 cfu ml⁻¹) and EPS production (1030 mg l^{-1}) than in this study (2.8×10^9 cfu ml⁻¹ and 644 mg l^{-1} , respectively). There were at least two differences between procedures for the two studies: fermentation equipment and method of medium sterilisation. Although the factors responsible for the differences were not determined, it is suspected that the separate sterilisation of sugar and amino acids, as carried out by Dupont *et al.* (2000), is an aspect that should be further examined. Little work has been done on the effect of medium sterilisation, which is one of the elements identified as influencing results when scaling-up a laboratory-developed process fermentations. The autoclave used for the laboratory assays in this study was equipped with a probe that started the holding time when the temperature of the medium had reached 121 °C. This approach could be more representative for *in situ* sterilisation in large bioreactors.

The highest EPS production (2770 mg l^{-1}) was measured in WPYE supplemented with S and AA or V, S and AA, and it was almost four-fold higher than in BMM medium under our experimental conditions. This EPS production is the highest reported in the literature

for lactobacilli during batch and continuous cultures which did not exceeded 1700 mg l^{-1} (De Vuyst and Degeest, 1999; Dupont *et al.*, 2000; Bergmaier *et al.*, 2001).

The EPS production was only partially related to cell growth, since a regression analysis between maximum EPS production and corresponding population at this time data was significant ($P < 0.05$), but gave an R^2 value of only 0.70. Statistical analysis showed that S was the only factor that had a significant effect on EPS specific yield which could explain this. It has been shown that Mn^{2+} and Mg^{2+} salts are essential growth factors for lactobacilli, and that they promoted EPS production at least through enhanced growth (Mozzi *et al.*, 1995a; Grobben *et al.*, 1998). For example, Mg^{2+} influences the activity of the phosphoglucosyltransferase enzyme, which participates in EPS biosynthesis, catalysing the transfer of a phosphate group between glucose carbon C_1 and C_6 (Gamar *et al.*, 1997). Thus, data from this study suggest that the beneficial effect of supplementing WPYE goes beyond simple increases in cell growth.

Lactobacilli require various vitamins for growth (Moroshita *et al.*, 1981) and production of EPS (Grobben *et al.*, 1998). The lack of effect of added vitamins on cell growth and EPS production suggests that the WPYE-based-medium provided the vitamin requirements of the strain and further additions were not effective. Yeast extracts are advantageous over many purified peptones as a source of nitrogen compounds since they also provide vitamins and nucleic acid base components (Smith *et al.*, 1973; Amrane and Prigent, 1998). In this sense, YE is an economical source for many growth factors for lactic cultures (Hujanen *et al.*, 1996). On the other hand, it has been suggested that oleate contained in Tween 80 added at 0.1 % in WP media could be a precursor of some vitamins for growth of lactobacilli (Ledesma *et al.*, 1977).

The addition of YE to WP supplemented with all 3 groups of components of BMM increased both cell growth and EPS levels (*Table 4.1*). The addition of AA to WPYE supplemented with S still increased growth and EPS production, although no effect was observed when AA was added individually to WPYE (*Table 1*). However, from an economic standpoint, the addition of purified amino acids is expensive and specific components or other strategies must be considered. The data of Degeest and De Vuyst (1999) showed that, for *S. thermophilus*, the highest EPS yield was reached with a high concentration of 42 g l^{-1} of a yeast

extract and peptone mixture. In this study, it should also be emphasized that EPS production in WPYE supplemented with S was very high (1673 mg l^{-1}), and addition of AA increased this production by approximately 60 % (2767 mg l^{-1}). An increase in the concentration in YE in combination with peptones could be tested. Our results suggest that not only a good nitrogen: carbon balance in an industrial medium is important for enhancing EPS production (De Vuyst and Degeest, 1999), but other nutrients such as salts should be tested, even for a medium containing a very high salt content ($>1 \%$), such as WP reconstituted to 7.4 % total solids. This data is consistent with previous studies which showed that different nitrogen sources alone did not increase biomass and EPS production (Chapitre III).

Total consumption of lactose and maximum lactic acid production as well as maximum EPS production were measured after 24 h corresponding to the end of exponential growth phase for cultures in WPYE supplemented with S and AA. These data suggest that, in these conditions, EPS production was limited by the carbon source, and a higher lactose initial concentration might further increase EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595M. In addition the lactic acid productions were low for a homofermentative lactic culture, which could be partly explained by the partial conversion of lactose into EPS.

The relative viscosity of supernatant samples and EPS production remained constant during the stationary phase of growth. However, relative viscosity in culture broth decreased during the stationary phase of cultures in supplemented WPYE media formulation which contained S factor, and particularly when cell viability dropped (*Figure 4.1*). These data suggest an interaction between cells and exopolysaccharides that may affect the relative viscosity in culture broth samples. When cells died, the capsular polysaccharide could be partly degraded by hydrolytic enzymes released from the lysed cells (Sutherland, 1999; Pham *et al.*, 2000).

Our data suggest that YE ultrafiltration could have a positive effect on biomass and EPS production. In chapter III we reported that biomass and EPS productions of cultures carried out in WP supplemented with YE were very low compared with cultures in WP supplemented with ultrafiltered YE, which shown high biomass and EPS productions (*Table 4.1*). Differences between both cultures could be due to the ultrafiltration treatment of YE.

Indeed, low molecular weight micronutriments could be concentrated during the ultrafiltration (molecular weight cut off of 10, 000 Da). Since for both experiments, YE and UFYE were added at a constant level, the selective concentration of micronutrients in UFYE resulted in a higher concentration of these nutrients in WP-supplemented UFYE compared with WP supplemented with YE.

4.7 Conclusions

This study showed the large importance of salts and the strong interaction between salts and amino-acids on growth and EPS production by *L. rhamnosus* RW-9595M and the high potential of WP as base medium for the EPS production. The high EPS yields were measured in WPYE supplemented with amino acids and salts contained in BMM defined medium. However, pure amino acids are expensive, and may not be economically justified. Since YE partially provides the nitrogen requirements, studies could be conducted with other nitrogen sources, such as peptones or crude amino-acid preparations. The AA and S groups in BMM include numerous compounds, and identification of single components that are responsible for the stimulation effect are warranted to further reduce costs. The EPS productions found in this work are the highest reported in the literature for lactobacilli. The EPS produced in supplemented WPYE could be partially purified and used as a functional or nutraceutical bioingredient in foods.

Table 4.1 Means of dependent variables measured during pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in different media¹

Medium ²	Cell population ¹ (cfu ml ⁻¹)	Maximum EPS ¹ (mg l ⁻¹)	Volumetric productivity ¹ mgEPS (l h) ⁻¹	EPS specific yield ¹ mgEPS (10 ⁶ cfu) ⁻¹	Lactic acid/lactose yield	CRV _{max} ³ of culture broth	CRV _{max} ³ of supernatant
BMM	2.80 x 10 ⁹ a (24 h)	644 a (24 h)	23 a	0.115 cd	0.66 a	2.1 a (24 h)	1.6 a (24 h)
WPYE	5.99 x 10 ⁹ bc (32 h)	438 a (24 h)	18 a	0.088 a	0.75 a	3.0 ab (24 h)	1.6 a (24 h)
WPYE*V	6.09 x 10 ⁹ bc (32 h)	563 a (32 h)	18 a	0.089 a	0.88 cd	3.2 b (24 h)	1.7 a (24 h)
WPYE*AA	5.13 x 10 ⁹ b (24 h)	458 a (24 h)	19 a	0.089 a	0.85 bcd	2.9 ab (24 h)	1.8 a (24 h)
WPYE*S	4.44 x 10 ⁹ b (15 h)	1673 b (24 h)	70 b	0.464 d	0.84 bcd	7.4 c (24 h)	2.5 b (24 h)
WPYE*V*AA	5.20 x 10 ⁹ bc (24 h)	412 a (24 h)	13 a	0.093 ab	0.96 d	2.8 ab (32 h)	1.5 a (24 h)
WPYE*S*AA	9.30 x 10 ⁹ cd (24 h)	2767 c (24 h)	115 c	0.298 cd	0.79 ab	14.4 f (15 h)	3.0 c (24 h)
WPYE*V*S	6.73 x 10 ⁹ bc (24 h)	1495 b (24 h)	62 b	0.222 bc	0.80 ab	8.4 e (24 h)	2.6 b (24 h)
WPYE*V*S*AA	1.06 x 10 ¹⁰ d (24 h)	2775 c (24 h)	116 c	0.261 cd	0.84 bcd	15.0 f (15 h)	2.9 c (15 h)
WP*V*S*AA	8.00 x 10 ⁹ c (24 h)	1802 b (24 h)	78 b	0.333 cd	0.86 cd	6.4 d (24 h)	2.2 b (24 h)

¹ Means in a column followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$). Means were calculated from two repetitions of treatments, except for WPYE*V*AA (only one repetition) and BMM (three repetitions).

² V = vitamins; S = salts; AA = amino acids in BMM-defined medium; WP = whey permeate; WPYE = whey permeate supplemented with yeast extracts.

³ In brackets, incubation times corresponding to maximum population, EPS production and CRV max of broth or supernatant.

⁴ Calculated for maximum EPS production. ⁵ Maximum capillary relative viscosity.

Table 4.2 Analysis of variance for dependent variables of the factorial design¹

Source of variation	df [§]	SS [†]	SS	SS	SS	SS	
		Maximum cell counts (log cfu ml ⁻¹)	Maximum EPS production (x10 ⁻³ , mg l ⁻¹)	Volumetric productivity [‡] (mg EPS (l h) ⁻¹)	EPS specific yield [‡] (mg EPS (10 ⁶ cfu) ⁻¹)	Maximum relative viscosity Culture broth	Supernatant
V	1	0.0153	1.8	58.2	0.0086	2.2	0.0142
S	1	0.0482**	10000***	19655.0***	0.1512***	270.3***	3.9016***
AA	1	0.0308*	1100**	1913.9**	0.0009	44.3***	0.1755*
V*AA	1	0.0044	0.053	0.0004	0.0021	0.3	0.0192
V*S	1	0.0102	13.8	0.9	0.0070	2.9	0.0018
S*AA	1	0.0985**	1400**	2455.3***	0.0001	47.9***	0.1800*
V*S*AA	1	0.0023	28.0	53.3	0.0041	0.7	0.000
Total error	7	0.0260	430.0	740.5	0.0134	8.4	0.1420
R ² model		89.8	96.9	97.1	92.9	97.9	97.0

¹ calculated for two culture replicates, except for experimental culture V*AA (one replicate)

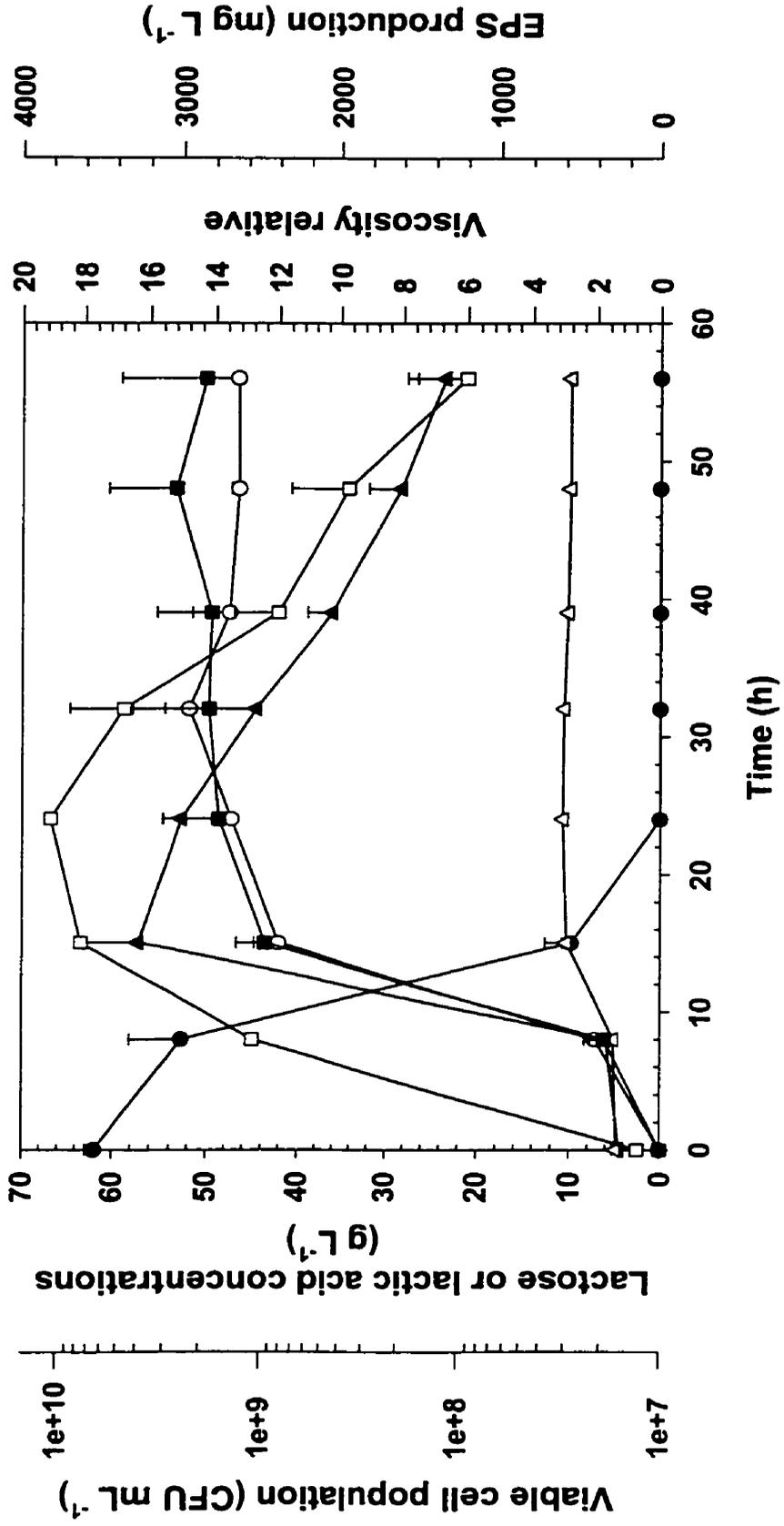
[§] degrees of freedom

[†] sum of squares

[‡] calculated for maximum EPS production

Significance levels *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Figure 4.1 Viable cell population (□), EPS production (■), lactose (●) and lactic acid concentrations (○), and capillary relative viscosity of culture broth (▲) and supernatant (Δ) during pH-controlled batch cultures in WPYE supplemented with S, AA and V (means of two repetitions).



Chapitre V

Quantification of Exopolysaccharide, Lactic Acid and Lactose Concentrations in Culture Broth by NIR Spectroscopy

Maria-Guadalupe Macedo, Marie-France Laporte and Christophe Lacroix*

Dairy Research Centre STELA, Pavillon Paul-Comtois, Université, Laval, Ste-Foy, PQ, Canada G1K 7P4.

Summited at The Journal of Agricultural and Food Chemistry

5.1 Résumé

La technique de spectroscopie en proche infrarouge (NIRS) a été utilisée pour le dosage simultané des exopolysaccharides (EPS), de l'acide lactique (AL) et du lactose (L) dans les échantillons de surnageant provenant des fermentations en batch de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M dans un milieu de perméat de lactosérum (PLS) additionné d'extrait de levure ultrafiltré (EL) et supplémenté avec les nutriments utilisés dans la formulation du milieu BMM: vitamines (V), sels (S) et acides aminés (AA). Afin d'obtenir les équations de calibration pour EPS, AL et L, la dérivée seconde des spectres en transmittance de 164 échantillons a été utilisée pour corrélérer les valeurs NIR, par la méthode des moindres carrés partiels (PLS*), dans les régions entre 6050 et 5650 et entre 4000 et 4250 cm^{-1} avec les valeurs obtenues par les méthodes d'analyses de référence. Le HPLC a été utilisé pour le dosage d'AL et L et la méthode d'ultrafiltration a servi au dosage d'EPS. Les coefficients de corrélations (R^2) et les erreurs de validation croisée (SECV) pour les trois composants ont été de: 91 % et 0.26 g l^{-1} pour l'EPS, 99 % et 2.54 g l^{-1} pour AL et 98 % et 3.32 g l^{-1} pour L. Afin de valider les équations de calibration pour EPS, AL et L, 45 échantillons provenant de 6 fermentations qui n'ont pas servi à bâtir le modèle mathématique, ont été dosés par la méthode NIR et les résultats ont été comparés avec ceux des méthodes de référence. D'excellentes corrélations ont été trouvées entre la méthode NIR et les méthodes conventionnelles avec les coefficients de corrélation (R^2) et les erreurs de prédiction (SEP) suivants: 99 % et 1.64 g l^{-1} pour le L, 99 % et 4.5 g l^{-1} pour l'AL et 91 % et 0.32 g l^{-1} pour l'EPS. Ces résultats indiquent le grand potentiel de la méthode NIR pour doser de façon rapide et simultanée des métabolites issus des procédés de fermentation, dans ce cas en particulier, Les EPS produits par les bactéries lactiques.

5.2 Summary

Near infrared spectroscopy (NIRS) was used for the simultaneous prediction of exopolysaccharide (EPS, 0-3 g l⁻¹) and lactic acid (LA, 0-59 g l⁻¹) productions as well as lactose (L, 0-68 g l⁻¹) concentration in supernatant samples from pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in supplemented whey permeate medium. To develop calibration equations, the correlation between the second derivative of 164 NIRS transmittance spectra and concentration data obtained with reference methods was calculated at the wavenumber between 6050 to 5650 and 4900 to 4250 cm⁻¹, using partial least square method (PLS). The LA and L concentrations were measured by HPLC and the EPS concentration was estimated by a new ultrafiltration method. The PLS correlation coefficient (R²) and the standard error of cross calibration (SECV) for the calibrations were of 91 % and 0.26 g l⁻¹ for EPS, 99 % and 2.54 g l⁻¹ for LA and, 98 % and 3.32 g l⁻¹ for L, respectively. The calibration equations were validated with randomly selected culture samples that were not used for calibration. A high agreement between data of the reference methods and those of NIRS was observed, with correlation coefficients and standard errors of prediction (SEP) of 99 % and 1.64 g l⁻¹ for L; 99 % and 4.5 g l⁻¹ for LA, as well as 91 % and 0.32 g l⁻¹ for EPS. The results suggest that NIRS is a useful method for rapid monitoring and controlling of EPS lactic fermentations.

5.3 Introduction

For accurate control of fermentation processes, it is very important to monitor accurately and rapidly substrate and product concentrations during incubation. However, the analysis of these compounds requires sample preparations and in some cases several steps of purification are needed which delays the obtention of final results analyses. Recently, There has been increasing interest for the production of exopolysaccharides (EPS) by lactic acid bacteria (De Vuyst and Degeest, 1999). The EPS produced in complex fermentation media could be used as bioingredients, for their ability to enhance rheological properties in lactic fermented products (De Vuyst and Degeest, 1999). However, their production is very low in the range of 0.05 to 2.5 g l⁻¹, compared with other microbial polysaccharides (Sutherland, 1997). Additionally, EPS quantification is a long process and takes one day using a new ultrafiltration methodology (Bergmaier *et al.*, 2001), or up to two weeks using a conventional method (Cerning *et al.*, 1994b). Quantification of lactic acid (LA) and lactose (L) in culture medium by HPLC methodology also requires several hours for sample preparation, and analysis. Thus, the development of a simple, rapid and non-invasive method for monitoring simultaneously EPS and LA production, as well as L consumption, in a complex medium during fermentation is desired.

The near-infrared transmittance spectroscopy (NIRS) offers the advantage of rapid sample processing with results available within 5 minutes. It is a non-destructive technique that requires no sample preparation and can measure several broth constituents simultaneously (Macaloney *et al.*, 1996). Furthermore, authentic standards are not necessary after the prediction equation is developed. With the use of NIRS as a routine analysis method, the opportunities for in-process control, and fault analysis are much greater than can presently be achieved with existing measurement, such as HPLC (Macaloney *et al.*, 1996). Nevertheless, the NIRS method also has disadvantages, such as interference caused by unexpected components in the sample, with overlapping spectral features, which can introduces errors in the analysis (Riley *et al.*, 2000a). However, the main advantage for the use of NIRS is its ability to monitor in real time the progress of fermentation. This make possible the optimization of the harvesting time during batch culture, the selection of feeding times with

growth-limiting substrate during fed-batch fermentation, and the detection of steady state for continuous fermentation. In all cases NIRS could save medium and operation time (Vaccari and Dosi, 1998). NIRS has mainly been used for the evaluation of nutritional components in animal feed (Smith *et al.*, 1998). Recently it has been used for determining natural products in plants (Ren et Chen, 1999), monitoring cell (Riley *et al.*, 1998; 1999) and biomass concentrations (Vaidyanathan *et al.*, 1999), characterizing polymers (Zhu and Hieftje, 1992), enhancing production of lactic acid in a fully automated plant controlled process (Vaccari and Dosi, 1998; Gonzalez-Vara *et al.*, 2000) and also for analyzing dairy foods (Laporte et Paquin, 1998).

Our objective was to determine the feasibility of NIRS for quantifying simultaneously the EPS and lactic acid productions, as well as the lactose concentration, during batch cultures of *L. rhamnosus* RW-9595M in complex whey permeate medium with different supplement formulations.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 Samples

Twenty-nine pH-controlled batch cultures were carried out with the EPS producer strain *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M, (Dupont *et al.*, 2000) obtained from the Lactic Acid Bacteria Research Network culture collection (Dairy Research Centre STELA, Université Laval, PQ, Canada), in whey permeate (7.8 % w/w; Foremost, Baraboo, WI, USA) and yeast extract medium (0.5 %, Difco, Detroit, MI, USA). Yeast extract was ultrafiltered at 10 kDa with to remove polysaccharides, as described by (Champagne *et al.*, 1999). This medium was supplemented with Tween 80 and individual or combinations of the nutrient group of BMM medium (Moroshita *et al.*, 1981): vitamins (V), salts (S) and amino acids (AA) and Concentrated solutions of nutriment were prepared separately. The concentrated vitamin solution contained (per l): 0.1 g folic acid, 1 g nicotinic acid, 1 g pantothenic acid, 2 g pyridoxal and 1g riboflavin. It was sterilised by filtration (0.22 µm, Puradisc, Whatman, Ann Arbor, MI, USA). The amino acid (L form) stock solution contained (per l): 1 g of arginine,

isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, serine, threonine, tryptophane, tyrosine and valine, as well as 2 g of aspartic and glutamic acids and cysteine. The salt stock solution contained (per l): 0.5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 g CH_3COONa , 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ and 0.20 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Vitamins and amino acids were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), and salts from BHD Inc. (Toronto, ON, Canada). Cultures were performed for 56 h at 37°C with mixing at 100 rev min⁻¹, and pH was controlled at 6.0 by addition of 5 N NH_4OH . Samples were aseptically withdrawn at different culture times and heated at 100°C for 15 min to destroy potential hydrolytic enzymes which could degrade the polysaccharide, and to liberate polysaccharides attached to cell walls. The culture samples were centrifuged at 13218 g and 4°C for 20 min (Sorval Instrument, Newtown, CO, USA) to recover supernatants which were used for the analysis of EPS, lactose and lactic acid contents. For calibration model development, a set of 164 samples from 23 cultures randomly selected were used. For validation, a set of 45 samples from the 6 remaining fermentations, which were not used for calibration, were tested.

5.4.2 Reference analytical methods

Residual lactose concentration and lactic acid production in supernatant were determined by HPLC. EPS concentration was determined in duplicate by an ultrafiltration method (Bergmaier *et al.*, 2001) as described in chapter II.

5.4.3 NIR spectroscopy

NIR transmittance spectra were collected at room temperature (21°C) using a Bomem MB-Series spectrophotometer (ABB Bomem Inc., Quebec, PQ, Canada), in the 4000 - 13500 cm⁻¹ region at 16 cm⁻¹ resolution (128 scans) using a 0.5 mm quartz cell. Data collection was done with a water spectrum background.

5.4.4 Statistical analysis

Data collection and spectral mathematical treatment using partial least squares method (PLS) were performed using Grams/32 software (Galactic Industries Corp., Salem, NH, USA) supplied with the NIRS instrument. All regression analysis were performed on the

second-derivative of the spectral data using the Savitzky-Golay algorithm (polynomial 2 and point 13) in the 6050–5650 cm^{-1} and 4900–4250 cm^{-1} spectral ranges. Samples presenting spectral or concentration ratios ≥ 3.0 were considered as outliers and were removed from the calibration set. For easiest representation, NIR-derivative spectra were multiplied by -1.

PLS* is a multivariate statistical procedure which use a mathematical technique known as spectral decomposition to reduce the quantity of spectral data. By using mathematical combinations of these new and reduced data, called factors, it is possible to regenerate or model the original data. Generally the first factors account for the majority of the analytical spectral variation. The individual factors calculated from the PLS* spectral decomposition are useful for finding spectral regions of importance in the calibration of certain components. The interpretation of regression coefficients for PLS* factor is a key issue in interpretation of chemometric models (PLSplus/IQ for Grams 32 and 386, 1996).

The correlation coefficient (R^2) and standard error of calibration or standard error of differences between reference and NIR data (SEC) are indicators of calibration performance. R^2 indicates the percentage of total variability explained by the PLS* model. The SEC gives an indication on the quality of the NIRS calibration fitting of model. For calibration data, the number of factors was assessed by the cross-validation procedure. The standard error of cross validation (SECV) was obtained by removing and predicting one sample at a time while all the remaining samples were used in the calibration until every sample had been predicted once. The predicted values gave validation errors, which were combined into SECV. The standard error of prediction (SEP) were calculated with all PLS* predictions. The SEP represents the standard deviation of the differences between the predicted and measured validation data. The percent errors, % SECV and % SEP, calculated by the ratios of SECV and SEP to maximum concentration range of the compound $\times 100$ were used to compare the relative errors for the three compounds calibrated by NIRS.

5.5 Results

5.5.1 NIR spectra of EPS, lactic acid and lactose

In order to determine the specific bands and their relationships with the concentrations of EPS, LA and L, the NIR second-derivative spectra of standard solutions at different concentrations of the three compounds were analyzed in the particular regions between 6050 and 5650 and 4900 and 4250 cm^{-1} (*Figure 5.1*). In these regions, the NIR bands that presented the strongest intensity were identified and associated with the corresponding components. For EPS, the principal bands were located at 5941, 5808, 5708, 4439, 4365 and 4295 cm^{-1} . For LA and L, these bands were located at 4473, 4389 and 4307 cm^{-1} , and at 4457 and 4366 cm^{-1} , respectively (*Figure 5.1*). EPS was the only compound that showed large distinctive bands in the region between 6050 to 5650 cm^{-1} . A correlation between band intensity and concentrations were observed for the three compounds, except for the band 4366 cm^{-1} for L (*Figure 5.1*).

5.5.2 NIR spectra of cultures samples

The changes of the second-derivative spectra of supernatant samples from a pH-controlled batch culture in WPYE supplemented with vitamins, amino acids and salts, as a function of time is shown in *Figure 5.2*. The relationship between band intensity and concentration is also observed. Indeed, the strongest NIR bands that increased with incubation time are located in the same wavenumber regions as for EPS, LA and L bands (*Figure 5.1*). During the first 8 h of incubation, when EPS and LA production was low (0.35 and 11.36 g l^{-1} , respectively) and L concentration was high (43.33 g l^{-1}), a low intensity in the bands associated with EPS at 5941, 5808 and 5780 cm^{-1} and a shift of bands in the region between 4450 to 4250 cm^{-1} was observed. After 15 h of incubation, when all the lactose was already consumed and EPS as well as LA production became important (2.4 and 44 g l^{-1} respectively), the strongest NIR bands were placed at 4439 and 4365 cm^{-1} and the bands in the region of 6050 to 5650 cm^{-1} became important. The intensity of EPS bands increased with EPS concentration in the sample.

5.5.3 NIR determination of EPS, lactic acid and lactose

Calibration and validation were carried out on separate subsets of culture samples obtained from pH-controlled batch cultures with different medium composition and which represented concentration ranges typically found for lactic acid fermentation (*Table 5.1*). The best calibration equations for individual compounds were those with the lowest SECV and the highest R^2 . For all models, the spectra factors were evaluated to ensure that adequate spectral information was available for calibrations. *Figure 5.3* compares EPS standard solution spectrum (6%) and the first PLS* calibration factor for EPS. Both spectra showed the same spectral features. Indeed, the mean absorption bands in factor spectrum correspond to the EPS NIR bands for the regions between 6050 to 5650 and 4900 to 4250 cm^{-1} .

Figure 5.4 shows the calibration curves and *Table 5.2* reports the calibration and validation statistical data for EPS, LA, and L. The highest R^2 and the lowest SECV were obtained for 9 PLS factors for EPS and 5 PLS factors for LA and L. The NIRS model accurately fitted LA and L concentration data. The calibration data predicted by NIRS were in a good agreement with those measured by the reference method (HPLC) as shown by high R^2 of 99 and 98 % and low SECV of 2.54 g l^{-1} and 3.32 g l^{-1} , respectively. In contrast the EPS calibration was less accurate as indicated by an R^2 of only 91 % and a large SECV value of 0.26 g l^{-1} (*Table 5.2*). The percent errors (% SECV) for EPS (9.0 %) was two-fold higher than for LA and L (4.3 and 4.9 %, respectively).

In order to test the validity of calibration equations, compositions of samples from 6 culture experiments which were not used for calibration were predicted using the calibration model developed. The validation data for the three calibration compounds are summarized in *Table 5.2* and *Figure 5.5*. LA and L concentrations were accurately predicted by NIRS with high R^2 of 99 % for both parameters and SEP of 1.64 g l^{-1} and 4.5 g l^{-1} , respectively, but EPS prediction was less accurate with R^2 of 91% and SEP of 0.32 g l^{-1} , respectively. The % SEP were two-fold higher for EPS (11 %) than for LA or L (6.6 and 5.77 %, respectively, *Table 5.2*).

5.6 Discussion

The spectra recorded with pure solution of EPS, LA and L (*Figure 5.1*) allowed a precise location of NIR bands for each components and clearly showed the relationship between concentration and band intensity. For the three compounds, the strongest bands were situated between 4250 to 4900 cm^{-1} , where the OH-stretching and deformation regions are located (Giangiacomo and Nzabonimpa, 1994). The decrease in the intensity of bands at 4400 cm^{-1} , when EPS concentration increased may reflect a decrease in the molar fraction of water in solution (Kamishikiryo *et al.*, 1991). In contrast, the region between 6050 to 5650 cm^{-1} (water and OH-1st overtone region) showed a strong correlation only for some NIR bands and EPS concentration. This region enhanced the global performance of calibration for this compound, but it did not provide information on LA and L. Indeed, calibration of LA and L was relying only on the region between 4900 to 4250 cm^{-1} , where differences in the absorption bands and intensity of signal were observed. Band assignment for LA are not well documented in the literature. The NIR bands identified for LA were reported to largely depend on other compounds present in the solution. Riley and Crider, (2000b) observed two distinct absorbance bands for lactate (4420 and 4370 cm^{-1}) in the presence of glucose. McShane *et al.* (1999) observed two characteristic bands at 4444 and 4347 cm^{-1} in the presence of glucose, glutamate, glutamine and ammonia, while in our study LA bands were observed at 4473, 4389 and 4307 cm^{-1} . This band shift could be due to the presence of EPS and L bands in the same spectral region or to the complexity of the culture medium. Lactose and EPS bands have not been reported in the literature. The spectral region between 5000 and 5500 cm^{-1} showed the high interference mainly due to water and protein absorption (Giangiacomo and Nzabonimpa, 1994), and for this reason was not considered for calibration.

Bands that exhibited strong variation in the spectra, as a function of culture time (*Figure 5.2*) were the same EPS bands identified in *Figure 5.1*. However, a slight shift of bands was observed for supernatant spectra of culture samples compared to standard solutions, probably due to medium complexity. The characteristic LA and L bands in the region from 4900 to 4250 cm^{-1} were overlapped by EPS bands (*Figure 5.2*), but a relationship between bands and LA and L concentrations was found with PLS regression. This data illustrates the

advantage of the PLS* chemometric model that is able to calibrate systems that have several constituents, with large concentration variation. Our data suggest that NIR spectroscopy can be used to quantify EPS and LA production, as well as lactose consumption, in culture samples.

For calibration, the NIRS method requires a substantial number of samples for which chemical components (the desired and interfering compounds) have different concentrations that are representative of the range found in future unknown samples. The concentration of individual compounds in the samples must be also independent and not correlated. The number of calibration samples required should be approximately six times the number of varying components (Riley *et al.*, 1999). Additionally, it is important to obtain samples across the entire expected concentration range. This is necessary to ensure that the slope of calibration curve is linear across the entire range (Majara *et al.*, 1998). The models developed in this study for EPS, LA and L concentrations were robust because they were calculated with 164 selected samples randomly, which had a large concentration range corresponding to real concentrations found in lactic fermentation (*Table 5.1*).

Calculation of the second-derivative of the spectra could enhance spectral features and reduce baseline offsets with no obvious degradation in the analytical result (Brimmer et Hall, 1993). This is an important parameter to take into account for calibration of samples, such as culture samples, which contain a complex mixture of components (proteins, amino-acid, vitamins, minerals) and high concentrations of lactate and lactose. Moreover, complex nutrient sources contain many different organic species that generate highly overlapping absorption bands and increase spectra variation (Riley and Crider, 2000b).

Calibrations for LA and L were accurately performed by NIRS calibration because models showed high R^2 and low SECV (*Table 5.2*), and only 5 factors were needed for developing the model. Although SECV provides a good estimate of model accuracy, validation of the model with an independent set of samples is still necessary to determinate the real model accuracy (*Table 5.2*). For validation, the R^2 and SEP obtained in this study for LA and L are in agreement with LA data reported by Vaccari *et al.*, 1994 and Vaccari and Dosi, 1998, and for acetic and ethanol production during rice vinegar fermentation (Yano *et al.*, 1997).

On the other hand, EPS calibration required nine PLS* factors which means that a substantial number of wavelength combination were used for the calibration model. Riley *et al.* (2000a) found that the number of PLS factors required to generate satisfactory calibration models increases with the number of components. The first PLS factor spectrum for EPS calibration is shown in *Figure 5.3*. Factor spectral features were similar to EPS standard solution spectrum. This figure clearly shows that the PLS* calibration was developed using PLS* factor spectral information which was related to EPS concentration. However, a shift of bands was observed for EPS factor spectrum from supernatant samples, probably due to the medium complexity interferences. To our knowledge, this is the first study showing a correlation between NIR specific bands and polysaccharide concentration.

On the other hand, the high dispersion of EPS data measured by NIRS compared with LA and L could be due to the large difference of concentrations for EPS and L or LA concentration in culture samples. Indeed, LA and L mean concentrations were approximately ten to twenty-fold higher than mean EPS concentration (*Table 5.1*) which may explain the two-fold higher percent errors (% SECV and % SEP) for EPS than for LA and L (*Table 5.2*). Riley and Crider, (2000b) found that SEP is a function of the compound concentration. They quantified the concentration of five compounds produced during animal cell cultivation at different initial concentrations and they also determined SEP values for each compounds as function of concentrations. They found that for a reduce concentration range (0 to 0.1 mM) percent error ranged roughly at 11 % of initial concentration. By contrast, with a large concentration range (0 to 30 mM) the percent error decreased to 1.6 % of the concentration range.

Interference of components in the broth could explain the low performance for EPS calibration ($R^2 = 91\%$) and the high value of ordain axes from validation equation (0.28, *Figure 5.5a*). Indeed, the medium used was complex and large composition changes during fermentation occurred. Actually, in fermentation processes it is difficult to ensure that all sources of spectra variation, whether identified or not, have been included in the calibration model (Brimmer and Hall, 1993). In fact, the real utility of NIRS predictive model is its ability to quantify rapidly and simultaneously EPS, LA and L concentrations in supernatant samples

from pH-controlled batch cultures which were not previously used for model development, even if NIRS error are higher than reference method error. Less accurate models for fermentation processes are still acceptable because the reproducibility of a measurement, in a process control context, is much more important than its accuracy. Thus, even if accuracy is reduced, it is preferable to get more robust models which can be applied to processes with different medium formulation (Carr-Brion, 1991). For this reason the performance of an indirect method, such as NIRS, can be seen from the perspective of NIRS analysis prediction efficacy versus reference methods. Furthermore, accuracy of NIR EPS prediction could be enhanced by using sophisticated mathematical treatments, such as artificial neural networks (Blanco *et al.*, 1999; Li and Brown, 1999) or other kinds of algorithms (Ding *et al.*, 1999; Mcshane *et al.*, 1999; Swierenga *et al.*, 2000). It has been demonstrated that the use of simulated spectra could provide a substantial control of the spectra noise, baseline, and absorbance band heights and widths (Riley *et al.*, 1999).

5.7 Conclusions

Data from this study demonstrate the applicability of NIRS to predict EPS and LA productions as well as L consumption during fermentation. The speed of NIRS analyses (less than 5 minutes, as opposed to up typically one day or more for the reference methods) will reduce cost and could improve control and optimization of lactic acid fermentation processes. Data from this study indicate that NIRS may be a powerful alternative methodology for real time quantification of other microbial polysaccharides particularly those produced at high concentrations during fermentation, such as (Sutherland, 1997).

Table 5.1 Chemical composition of supernatant samples from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M cultures for NIR calibration.

Component	Mean (g l⁻¹)	Minimum (g l⁻¹)	Maximum (g l⁻¹)	SD[§] (g l⁻¹)
EPS-UF	0.92	0.013	2.9	0.05
Lactose-HPLC	28.20	0	68.0	0.30
Lactic acid-HPLC	28.40	0	59.0	0.19

[§] Standard deviation of reference method

Table 5.2 Statistical descriptors for NIR calibration and validation for analyses of EPS, lactose and lactic acid concentrations in supernatant culture samples.

Component	Calibration				Validation		
	PLS [§] factors	R ^{2†} (%)	SECV [¶] (g l ⁻¹)	% SECV* (%)	R ^{2†} (%)	SEP ^{§§} (g l ⁻¹)	% SEP* (%)
EPS	9	91	0.26	9.0	91	0.32	11
Lactose	5	98	3.32	4.9	99	4.50	6.6
Lactic acid	5	99	2.54	4.3	99	1.64	5.8

[§] partial least squared mathematical method

[†] coefficient of correlation

[¶] standard error of cross validation

* percent error, defined as SECV/ maximal range concentration value of component x 100

^{§§} standard error of prediction

Figure 5.1 NIR second derivative spectra of standard solutions of a) EPS, b) lactic acid and c) lactose at different concentrations of 3 % (----), 5 % (—) and 6 % (...).

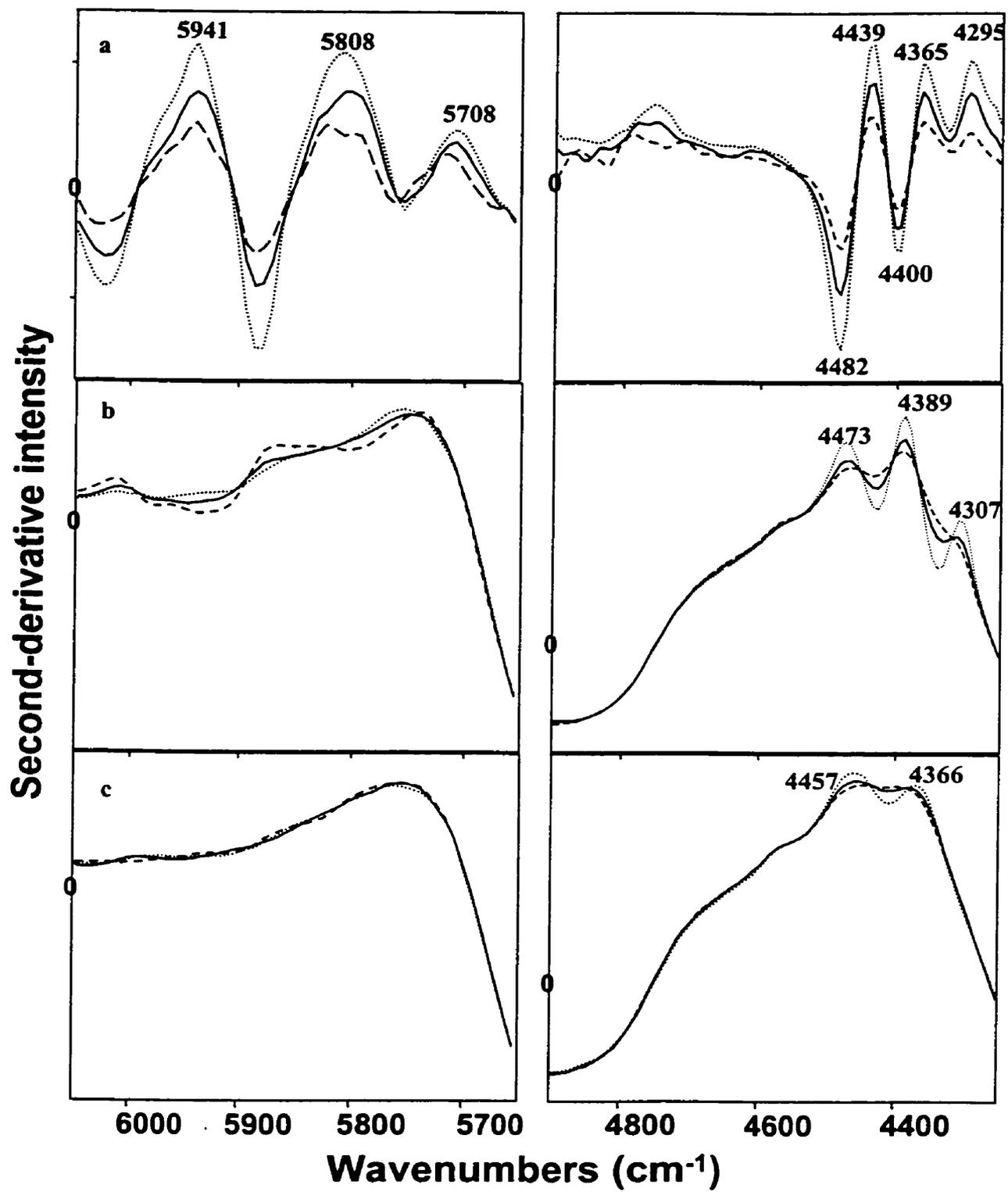


Figure 5.2 NIR second derivative spectra of supernatants obtained from a pH-controlled batch culture in whey permeate based medium as a function of time: 0 h (—), 8 h (----), 15 h (—), 32 h (....), and 56 h (—).

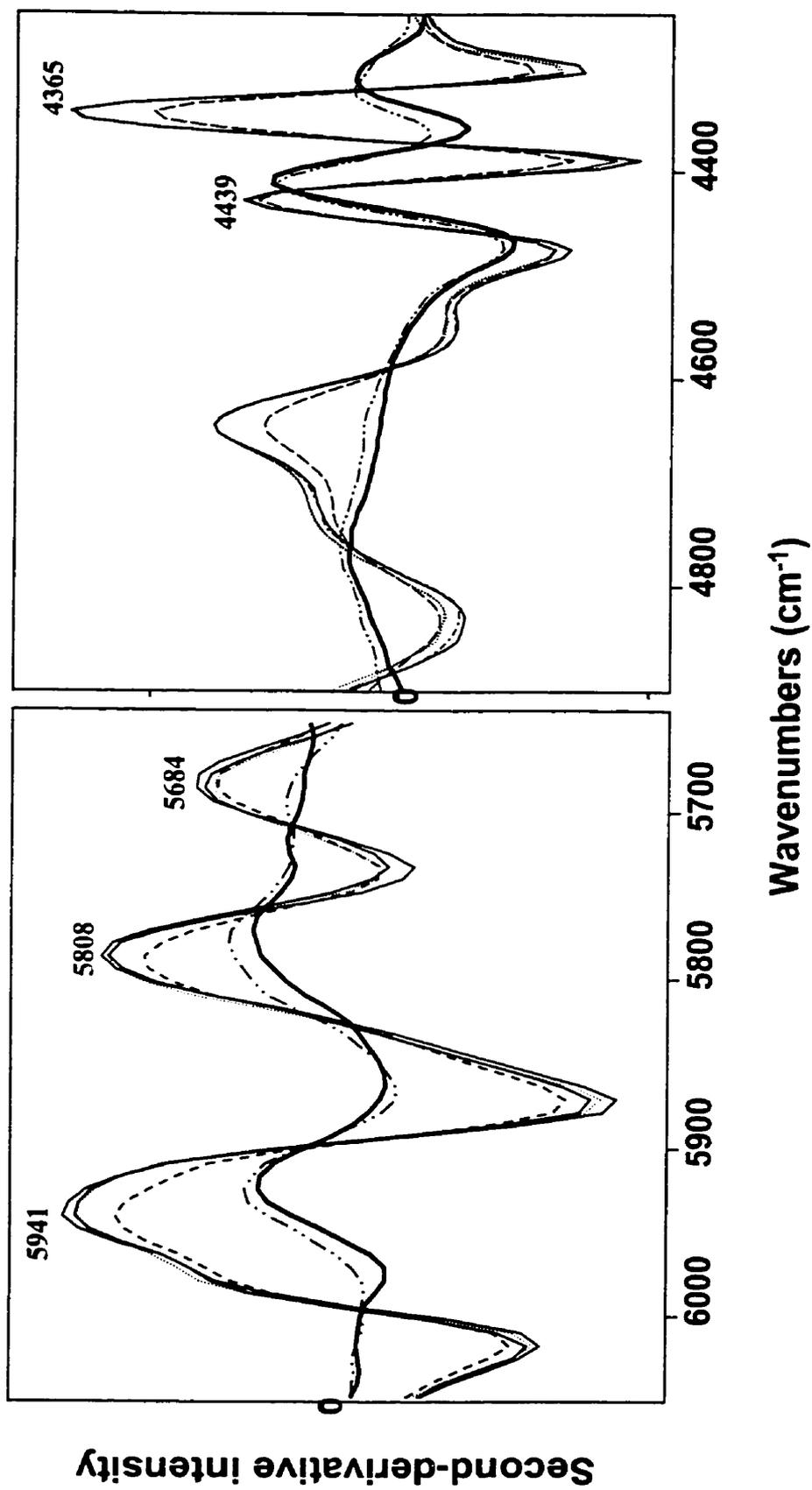


Figure 5.3 NIR second derivative spectra of EPS standard solutions at 6 % (—) and EPS factor (...).

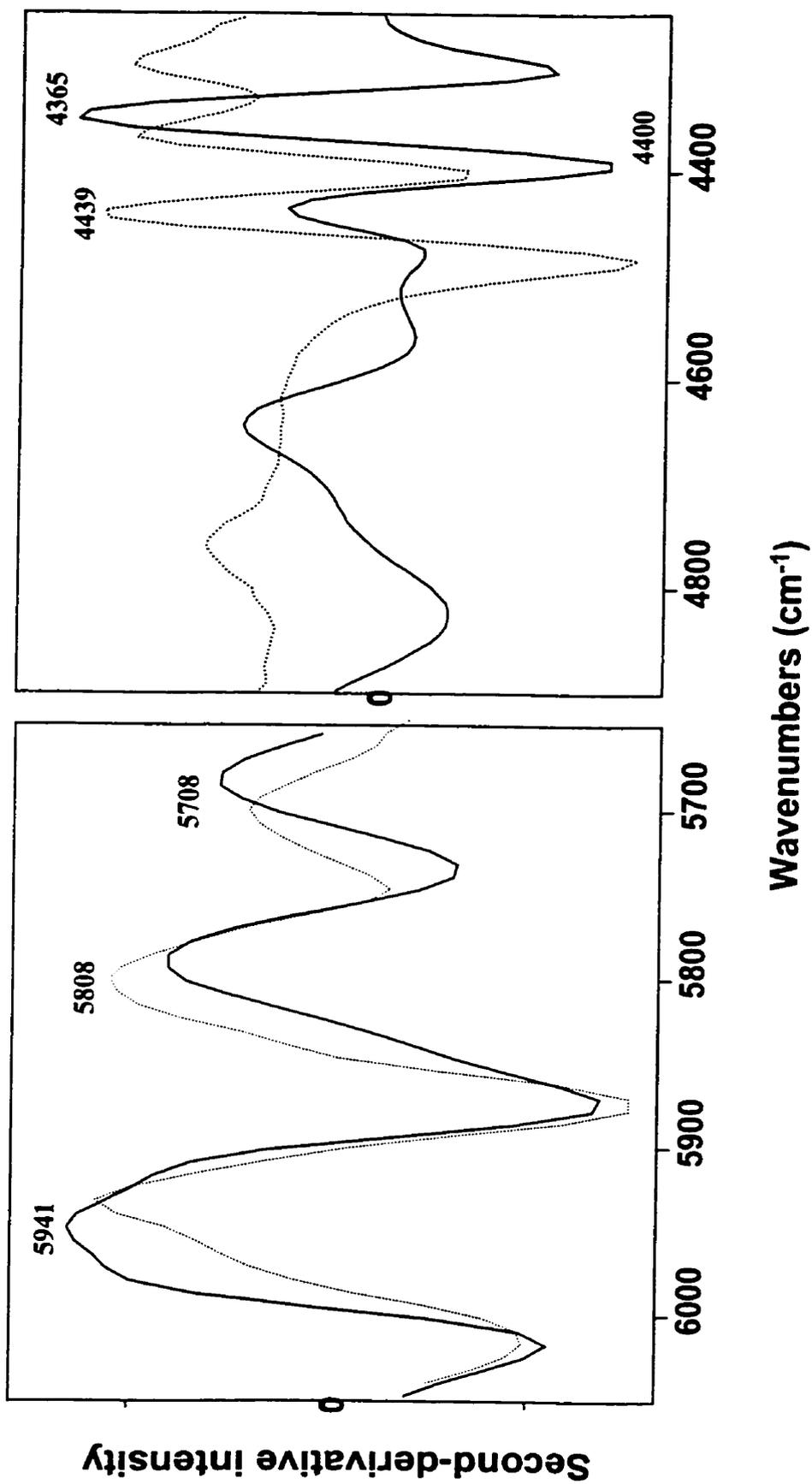


Figure 5.4 NIR calibration curves for a) EPS ($y = 0.913x + 0.0808$, $R^2 = 90.7$), b) lactose ($y = 0.977x + 0.7172$, $R^2 = 98.1$) and c) lactic acid ($y = 0.982x + 0.3314$, $R^2 = 99.1$). Prediction (....) and confidence (---) 95% of intervals.

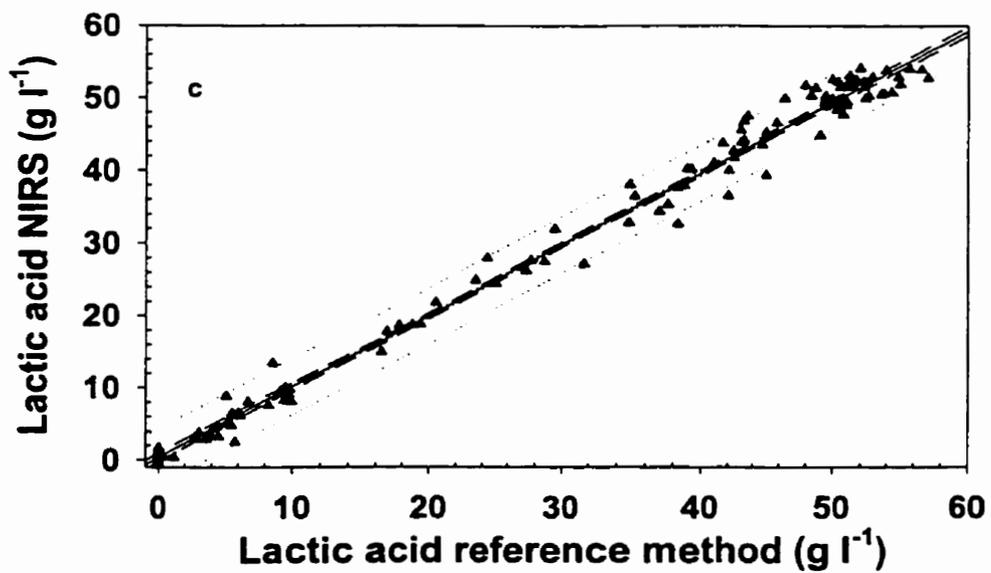
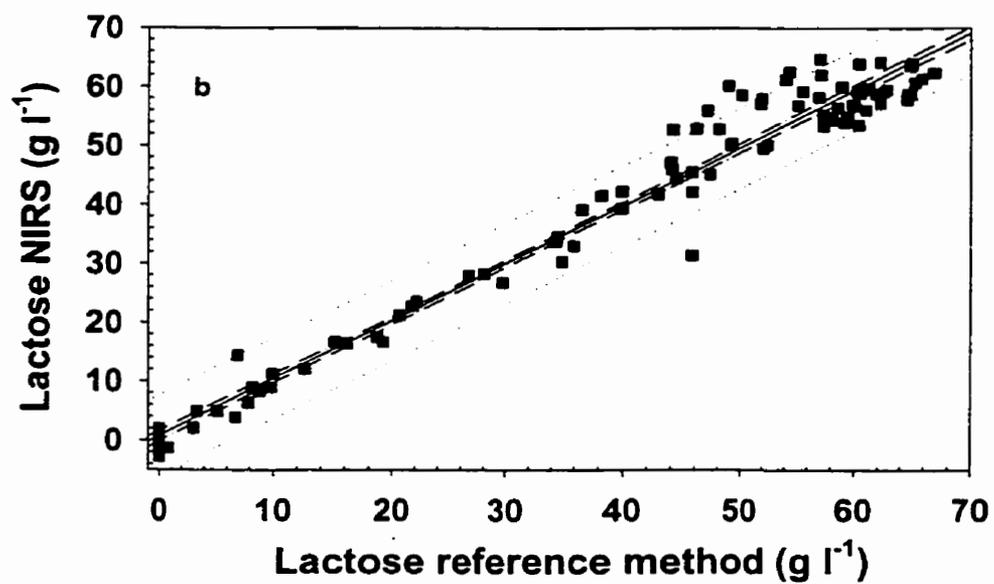
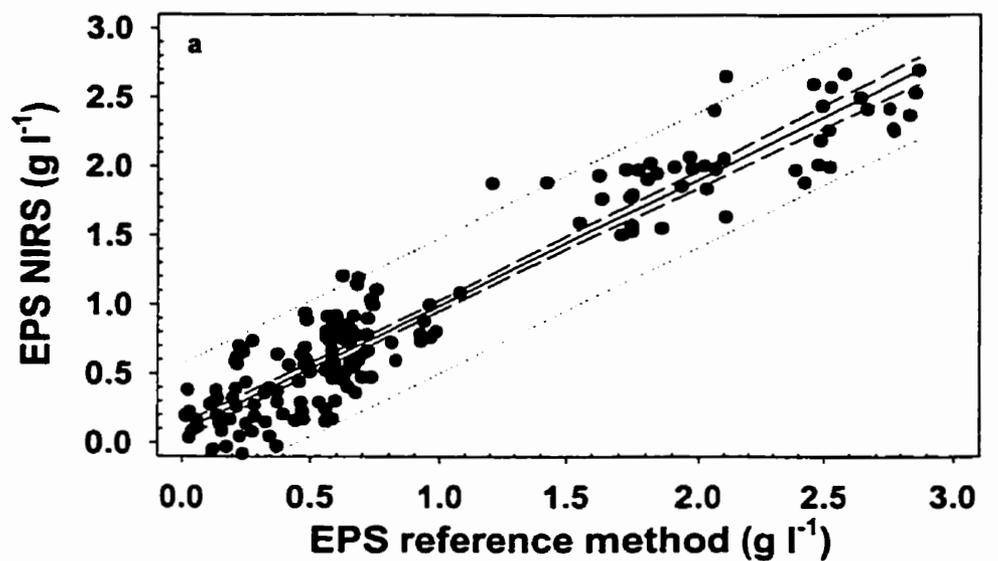
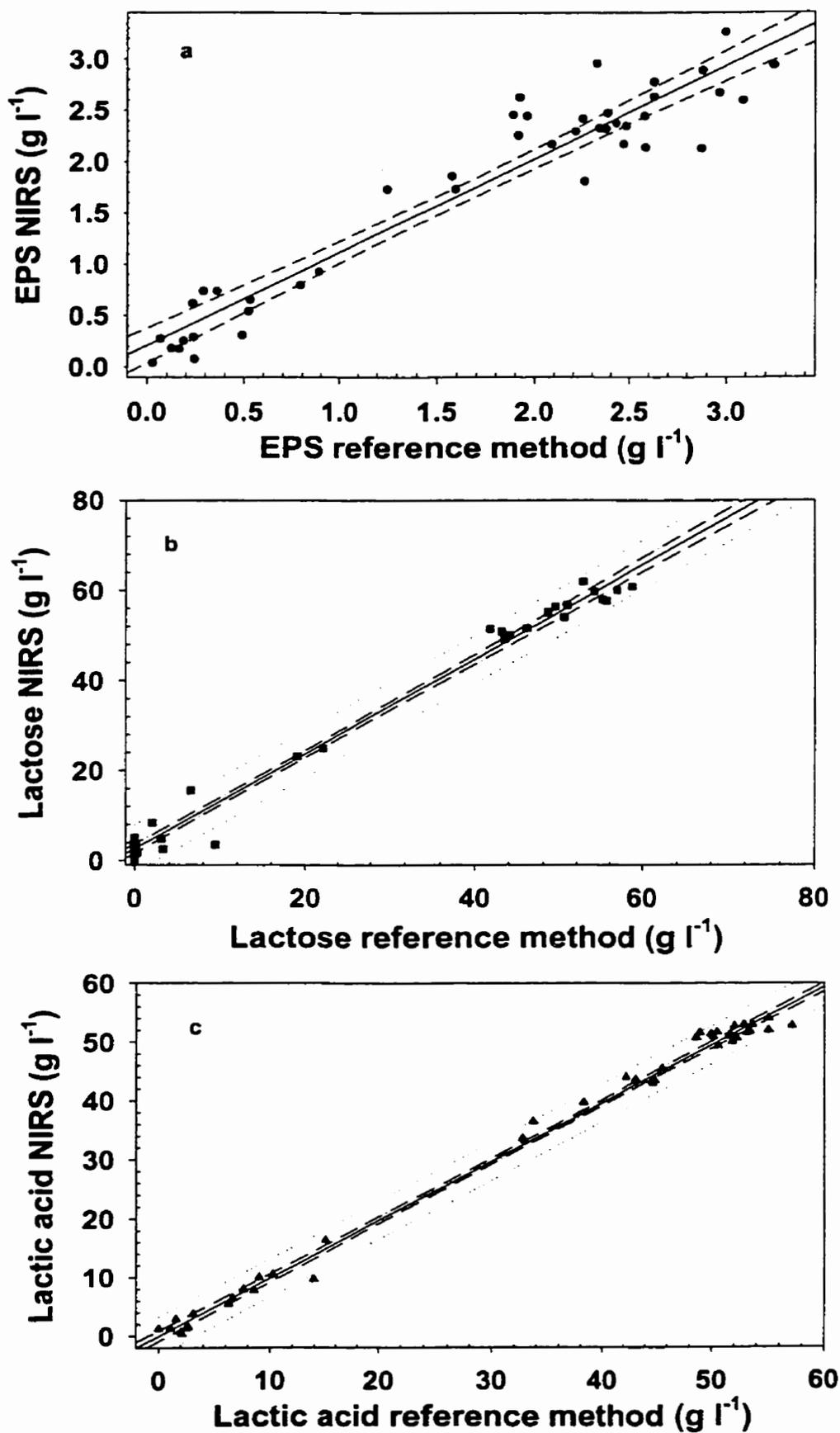


Figure 5.5 NIR validation curves for a) EPS ($y= 0.907x+0.2070$, $R^2= 90.30$), b) lactose ($y= 1.051x+2.645$, $R^2= 98.7$) and c) lactic acid ($y=0.990x+0,0295$, $R^2= 99.4$). Prediction (....) and confidence (---) 95% of intervals.



CONCLUSION GÉNÉRALE

Les études sur les bactéries lactiques (BL) productrices d'EPS se sont développées dans les dernières années parce que ces polymères jouent un rôle très important sur les caractéristiques organoleptiques et rhéologiques des produits fermentés comme le yogourt, le fromage ou les laits et les crèmes fermentés. En effet, les EPS favorisent la stabilité, augmentent la viscosité et améliorent la texture des produits. De plus, des recherches récentes ont montré que certains EPS produits par les BL ont un effet prébiotique. Avec tous ces avantages, les EPS pourraient être utilisés comme des bio-ingrédients alimentaires, soit comme substitut de polymères d'origine animale ou végétale dans les produits alimentaires, soit pour remplacer partiellement les solides de lait ou améliorer la rétention d'eau et les caractéristiques organoleptiques des produits allégés. Cependant, les bio-ingrédients à base d'EPS des BL ne sont pas encore exploités au niveau industriel, à cause de leur faible production. Certains travaux antérieurs ont déjà montré le grand potentiel de la souche *L. rhamnosus* RW-9595M pour produire un EPS dans un milieu défini comme le BMM. Par contre, peu d'informations sont disponibles, en ce qui concerne la production d'EPS dans un milieu complexe comme le PLS et les effets individuels ainsi que les interactions des différents nutriments (sels, acides aminés, vitamines) sur cette production. Ce travail a donc visé à trouver les conditions de fermentation et la composition optimale du milieu de culture pour augmenter la production d'EPS par *L. rhamnosus* RW-9595M dans un milieu à base de perméat de lactosérum au cours de fermentations en batch à pH contrôlé. Ainsi, durant ce projet, nous avons tout d'abord étudié, en interaction, l'effet de la température, de la concentration de PLS et de la supplémentation de YNB, une source d'azote sans polysaccharides pouvant interférer avec le dosage des EPS. Par la suite l'effet de différentes sources d'azote sur la production d'EPS a été examiné. Enfin l'effet des sels, acides aminés et vitamines sur cette production a également été étudié en vue d'augmenter la production d'EPS dans le PLS supplémenté avec une source d'azote. Parallèlement une méthode de dosage simultané d'EPS, d'acide lactique et de lactose a été développée en utilisant la spectroscopie proche infrarouge (NIRS).

Dans un premier temps, ce projet a mis en évidence, l'importance d'un rapport C:N équilibré afin d'augmenter la biomasse et la production d'EPS, l'impact positif des sels sur cette production et l'importance des interactions entre les nutriments qui composent le milieu de culture. Contrairement, aux bactéries à Gram négatif, qui ont besoin d'un milieu relativement pauvre, *L. rhamnosus* a besoin d'un milieu riche en nutriments, avec fortes concentrations en carbone, une source d'azote complète, comme l'extrait de levure et des sels afin de produire de fortes concentrations de biomasse et d'EPS.

Dans un deuxième temps nos résultats ont montré que la production d'EPS est fonction des conditions de culture. Ainsi elle n'est pas complètement liée à la croissance cellulaire car la production d'EPS se poursuivait durant la phase stationnaire de croissance dans des conditions limitantes en azote et à fortes concentrations en carbone. Par contre à des températures inférieures à 32°C ou dans un milieu à base de perméat de lactosérum supplémenté avec de l'extrait de levure, des sels et des acides aminés, cette production est dépendante de la croissance cellulaire. Ces données indiquent clairement que la manipulation des conditions de fermentation et la composition du milieu de culture permet d'améliorer ou de mieux contrôler la production d'EPS, et suggère que des technologiques de fermentation alternatives comme les procédés feed-batch ou en continu pourraient être envisagées afin d'augmenter cette production.

D'autre part, nos résultats ont aussi confirmé, le fort potentiel de la souche *L. rhamnosus* RW-9595M pour produire des EPS. Ainsi, lors de cette étude, on a pu augmenter la production d'EPS par cette souche de 1300 mg l⁻¹ dans le milieu BMM à 2800 mg l⁻¹ dans un milieu supplémenté de PLS. Cette production, est d'ailleurs, la plus élevée rapportée dans la littérature avec les lactobacilles. Ces résultats sont encourageants car cette production pourrait éventuellement être encore augmentée, en optimisant le milieu de culture et la stratégie de fermentation. De plus le PLS s'est avéré comme un milieu de base fort intéressant pour un procédé industriel.

Enfin, la mise au point d'une méthode rapide et fiable pour le dosage simultané des EPS, de l'acide lactique et du lactose au cours des fermentations par la spectroscopie en proche infrarouge (NIRS) devrait conduire à un meilleur contrôle et faciliter l'optimisation du procédé

de fermentation. Cependant, il reste à améliorer la précision lors du dosage d'EPS afin de diminuer l'erreur de prédiction. Des outils mathématiques sophistiqués pourraient aider à diminuer le bruit de fond causé par la complexité du milieu de culture et ainsi augmenter la précision de la méthode. Toutefois, la mise au point de cette méthode, pour le dosage rapide des métabolites lors des fermentation lactique, a mis en évidence le fort potentiel de cette méthode indirecte, non seulement pour le dosage des EPS des BL, mais aussi pour le dosage en générale de biopolymères d'origine microbien.

Ce travail a démontré le fort potentiel de la souche *L. rhamnosus* RW-9595M pour la production des EPS. Des études parallèles sur la caractérisation rhéologique des EPS produits par cette souche, ainsi que la connaissance sur la génétique de cette production sont en cours Ces nouvelles connaissances permettront éventuellement de mieux exploiter les propriétés rhéologiques et prébiotiques de ces biopolymères, en vue de les utiliser comme des bioingrédients alimentaires fonctionnels et des produits nutraceutiques.

Du côté de la technologie de fermentation, les perspectives sont prometteuses et pourraient viser l'optimisation du milieu de culture et la diminution du coût de supplémentation pour la production d'EPS, en identifiant les sels et les acides aminés responsables de l'incrément de cette production. Toutefois pour réduire les coûts de production, il serait intéressant d'utiliser d'autres sources d'azote de moins grande pureté et moins chers pour les combiner avec l'extrait de levure afin de rendre plus compétitif le coût du milieu de culture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allison, M.J., Cowe, I.A. et Mchale, R. (1978) The use of infrared reflectance for the rapid estimation of the soluble b-glucan content of barley. *Journal of Institute of Brewing* **84**, 153-155

Amrane, A. et Prigent, Y. (1998) Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 529-534

Andaloussi, A.S., Talbaoui, H., Marczak, R. et Bonaly, R. (1995) Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 995-1000

Bergmaier, D., Lacroix, C., Macedo, M.G. et Champagne, C.P. (2001) New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 401-406

Berry, A.R., Franco, C.M.M., Zhang, W. et Middelberg, A.P.J. (1999) Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnology Letters* **21**, 163-167

Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. et Pagès, J. (1999) Calibration in non-linear near infrared reflectance spectroscopy: a comparison of several methods. *Analytica Chimica Acta* **384**, 207-214

Bottazzi, V. (1988) An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. *Biochimie* **70**, 303-315

Bouzar, F., Cerning, J. et Desmazeaud, M. (1996) Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus debrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science* **79**, 205-211

Bouzar, F., Cerning, J. et Desmazeaud, M. (1997) Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *Journal Dairy Science* **80**, 2310-2317

Breedveld, M., Bonting, K. et Dijkhuizen, L. (1998) Mutational analysis of exopolysaccharides biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1. *FEMS Microbiology Letters* **169**, 241-249

Brimmer, P.J. et Hall, J.W. (1993) Determination of nutrient levels in a bioprocess using near-infrared spectroscopy. *Canadian Journal of Applied Spectroscopy* **38**, 155-162

Bryers, J.D. (1993) The biotechnology of interfaces. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 98s-109s

Bury, D., Jelen, P. et Kimura, K. (1998) Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **8**, 149-151

Bury, D., Hajsmanova, M. et Jelen, P. (1999) Growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 11842 in whey supplemented with various whey protein concentrates. *Milchwissenschaft* **54**, 610-612

Buysse, J. et Merckx, R. (1993) An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *Journal of Experimental Botany* **44**, 1627-1629

Carr-Brion, K.G. (1991) dans Measurement and control in bioprocessing (Carr-Brion, K. G., ed.), pp. 37-66, Elsevier Science Co. Inc, NY, USA

Cerning, J., C., B., Desmazeaud, M.J. et Landon, M. (1988) Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters* **10**, 255-260

Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **87**, 113-130

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. et Desmazeaud, M.J. (1990) Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sciences des aliments* **10**, 443-451

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. et Desmazeaud, M. (1992) Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **75**, 692-699

Cerning, J. (1994a) Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques, dans *Bactéries Lactiques*, vol. 1 (Roissart, I. H., Luquet, F.M., ed.), pp. 309-329, Grenoble, France

Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. et Topisirovic, L. (1994 b) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3914-3919

Champagne, C.-P., Gaudreau, H. et Conway, J. (1999) Effect of ultrafiltration of bakers' and brewers' yeast extracts on their nitrogen content and turbidity. *Acta Alimentaria* **28**, 321-328

Christiansen, P.S., Madeira, A.I.M.R. et Edelsten, D. (1999) The use of ropy milk as stabilizer in the manufacture of ice cream. *Milchwissenschaft* **54**, 138-140

Christopherson, A.T. et Zottola, E.A. (1989) Whey permeate as a medium for mesophilic lactic acid Streptococci. *Journal of Dairy Science* **72**, 1701-1706

De Boer, R. et Dijksterhuis, J. (1997) Permeate, milk sugar, and derivatives- an overview dans *Whey* (International Dairy Federation ed.), pp 220-226, Chicago, IL, USA

De Vos, W.M. (1996) Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 223-242

De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. et Degeest, B. (1998) Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 1059-1068

De Vuyst, L. et Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 152-177

Degeest, B. et De Vuyst, L. (1999) Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2863-2870

Dierksen, K.P., Sandine, W.E. et Trempy, J.E. (1997) Expression of rropy and mucoid phenotypes in *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* **80**, 1528-1536

Ding, Q., Small, G.W. et Arnold, M.A. (1999) Evaluation of data pretreatment and model building methods for the determination of glucose from near-infrared single-beam spectra. *Applied Spectroscopy* **53**, 402-414

Doco, T., Wieruszkeski, J.-M. et Fournet, B. (1990) Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research* **198**, 313-321

Doco, T., Carcano, D., Ramos, P., Loones, A. et Fournet, B. (1991) Rapid isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research* **58**, 147-150

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. et Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356

Dupont, I. (1998) Identificatin moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharide par trois de ces souches. Mémoire de maîtrise, pp. 135, Université Laval, Québec, Canada

Dupont, I., Roy, D. et Lapointe, G. (2000) Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **24**, 251-255

Edye, L.A., Clarke, M.A., To, N.T. et McDonald-Lewis, C. (1993) dans Carbohydrates and Carbohydrate polymers, vol. I (Yalpani, M., ed.), pp. 198-205, ATL Press, NY, USA

Faber, E.J., Zoon, P., J.P., K. et Vliegthart, F.G. (1998) Exopolysaccharide produce by *Streptococcus thermophilus* Rs and Rts have the same repeating units but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research* **310**, 269-276

Forde, A. et Fitzgerald, G.F. (1999) Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *International Dairy Journal* **9**, 465-472

Gacula, M.C. et Singh, J. (1984) dans Statistical methods in food and consumer research (Schwergert, B., Hawthorn, J. et Stewart, G. F., eds.), pp. 575-610, Academic Press, Inc., NY, USA

Gamar, L., Blondeau, K. et Simonet, J.-M. (1997) Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 281-287

Gamar-Nourani, L., Blondeau, K. et Simonet, J.-M. (1998) Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 664-672

Gancel, F. et Novel, G. (1994a) Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *Journal of Dairy Science* **77**, 685-688

Gancel, F. et Novel, G. (1994b) Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *Journal of Dairy Science* **77**, 689-695

Garcia-Garibay, M. et Marshall, V.M.E. (1991) Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 325-328

Gassem, M.A., Schmidt, K.A. et Frank, J.F. (1995) Exopolysaccharide production in different media by lactic acid bacteria. *Dairy Products Journal* **30**, 18-21

Gassem, M.A., Schmidt, K.A. et Frank, J.F. (1997) Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Science* **62**, 171-173 et 207

Gaudreau, H., Champagne, C.-P., Conway, J. et Degré, R. (1999) Effect of ultrafiltration of yeast extracts on their ability to promote lactic acid bacteria growth. *Canadian Journal of Microbiology* **45**, 891-897

Giangiaco, R. et Nzabonimpa, R. (1994) Approach to near infrared spectroscopy. *International Dairy Federation Bulletin* **298**, 37-42

Gonzalez-Vara, A., Vaccari, R.G., Dosi, E., Trilli, A., Rossi, M. et Matteuzzi, D. (2000) Enhanced production of L-(+)-lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 using ion-exchange resins and cross-flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via NIR. *Biotechnology and Bioengineering* **67**, 147-156

Griffin, A.M., Morris, V.J. et Gasson, M.J. (1996) The *eps*ABCDE genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* strain NCBF 2393. *Gene* **183**, 23-27

Grobben, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R. et De Bont, J.A.M. (1995) Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 103-107

Grobben, G.J., Smith, M.R., Sikkema, J. et De Bont, J.A.M. (1996) Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**, 279-284

Grobben, G.J., Van Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M.R., Sikkema, J. et De Bont, J.A.M. (1997) Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**, 516-521

Grobben, G.J., Chin-Joe, I., Kitzen, V.A., Boels, I.C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M.R. et De Bont, J.A.M. (1998) Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1333-1337

Grobben, G.J., Boels, I.C., Sikkema, J., Smith, M. et De Bont, J.A.M. (2000) Influence of ions on growth and production of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Journal of Dairy Research* **67**, 131-135

Gupta, R. et Gandhi, D.N. (1994) Effect of supplementation of some nutrients in whey on the production of lactic acid. *Indian Journal of Dairy Science* **48**, 636-641

Hess, S.J., Roberts, R.F. et Ziegler, G.R. (1997) Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer systems. *Journal of Dairy Science* **80**, 252-263

Heyman, M. (2000) Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *Journal of the American College of Nutrition* **19**, 137S-146S

Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T. et Kaminogawa, S. (1997) Characterisation of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**, 312-316

Hughenoltz, J., Looijesteijn, E., Starrenburg, M. et Dijkema, C. (2000) Analysis of sugar metabolism in an EPS producing *Lactococcus lactis* by ³¹P NMR. *Journal of Biotechnology* **77**, 17-23

Hujanen, M. et Linko, Y.-Y. (1996) Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 307-313

Kaláb, M., Allan-Wojtas, P. et Phipps-Todd, B.E. (1983) Development of microstructure in set-style nonfat yoghurt a review. *Food Microstructure* **2**, 51-66

Kamishikiryo, H., Hasewaga, K. et Matoba, T. (1991) Stability of 2170 nm as a key wavelength for protein analysis by near-infrared spectroscopy. *Journal of Japon Food Sciences and Technology* **38**, 850

Kasprow, R.P., Lange, A.J. et Kirman, D.J. (1998) Correlation of fermentation yield with yeast extract composition as characterized by near-infrared spectroscopy. *Biotechnology Progress* **14**, 318-325

Kim, H.-O. et Williams, P.C. (1990) Determination of starch and energy in feed grains by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 682-688

Kimmel, S.A. et Roberts, R.F. (1998a) Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 87-92

Kimmel, S.A., Roberts, R.F. et Ziegler, G.R. (1998b) Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 659-664

Kitazawa, H. Nomura, M., Itoh, T. (1991) Functional alteration of macrophages by a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*. *Journal of Dairy Science* **74**, 2082-208

Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizagaki, M. et Yamaguchi, T. (1996) Induction of IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulates with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 99-106

Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T. et Itoh, T. (1998) Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 169-175

Knoshaug, E.P., Ahlgrent, J.A. et Trempey, J.E. (2000) Growth associated exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* Ropy 352. *Journal Dairy Science* **83**, 633-640

Kontusaari, S. et Forsen, R. (1988) Finnish fermented milk "Viili" : involvement of two cell surface proteins in production of slime by *Streptococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science* **71**, 3197-3202

Korpela, R., Peuhkuri, K., Lähteenmaki, T., Sievi, E., Saxelin, M. et Vapaatalo, H. (1997) *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft* **52**, 503-505

Kosikowski, F.V. (1979) Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science* **62**, 1149-1160

Kumar, C.G. et Anand, S.K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 9-27

Lacroix, C. (1997) Production of bacteriocin from whey permeate by fermentation with lactic acid bacteria dans Whey (International Dairy Federation ed.), pp. 272-284, Chicago, IL, USA

Laporte, M.-F. (1996) Utilisation d'une sonde optique infrarouge proche pour la suivi de la coagulation enzymatique et la détermination du temps de coupage d'un caillé fromager. Mémoire de maîtrise, pp. 92, Université Laval, Québec, Canada

Laporte, M.F. et Paquin, P. (1998) Near-infrared technology and dairy food products analysis: a review. *Seminars in Food Analysis* **3**, 173-190

Latrille, É., Picque, D., Perret, B. et Corrieu, G. (1992) Characterizing acidification kinetics by measuring pH and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **74**, 32-38

Lavezzari, T., Sozzi, T. et Pirovano, F. (1997) Microorganisms producing polysaccharides: differentiation betweenropy and thickening strains dans Texture of fermented milk products and dairy desserts (International Dairy Federation), pp. 71-78, Chicago, IL, USA

Ledesma, O.V., De Ruiz Olgado, A.P. et Oliver, G. (1977) A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **42**, 123-133

Leefflang, B.R., Faber, E.J., Erbel, P. et Vliegenthart, J.F.G. (2000) Structure elucidation of glycoprotein glycans and of polysaccharides by NRM spectroscopy. *Journal of Biotechnology* **77**, 115-122

Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszeski, J.-M., Strecker, G., Favre, N. et Neeser, J.-R. (1997) Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3512-3518

Li, Y. et Brown, C.W. (1999) Non-invasive fermentation analysis using an artificial neural network algorithm for processing near infrared spectra. *Near Infrared Spectroscopy*, 101'108

Looijesteijn, P.J., Boels, I.C., Kleerebezem, M. et Hugenholtz, J. (1999a) Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5003-5008

Looijesteijn, P.J. et Hugenholtz, J. (1999b) Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**, 178-182

Low, D., Ahlgren, J.A., Home, D., McMahon, D.J., Oberg, C.J. et Broadbent, J.R. (1998) Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2147-2151

Macaloney, G., Draper, I., Preston, J., Anderson, K.B., Rollins, M.J., Thompson, B.G., Hall, J.W. et McNeil, B. (1996) At-line control and fault analysis in an industrial high cell density *Escherichia Coli* fermentation, using NIR spectroscopy. *Trans I Chem E* **74**, part C, 212-220

Macura, D. et Townsley, P.M. (1984) Scandinavian ropy milk- identification and characterization of endogenous ropy lactic Streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science* **67**, 735-744

Majara, M., Mochaba, F.M., O'Connor-Cox, E.S.C. et Axcell, B.C. (1998) Yeast protein measurement using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Institute of Brewing* **104**, 143-146

Manca de Nadra, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A. et Nicolaus, B. (1996) Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarticus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3265-3269

Marshall, V.M., Cowie, E.N. et Moreton, R.S. (1995) Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research* **62**, 621-628

Marteau, P. et Tobaly, P. (1999) Accurate concentration measurements using infrared adsorption without determination of the baselines. *Applied Spectroscopy* **53**, 396401

McDonald, R.S. (1986) Review: Infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* **58**, 1906-1925

McKelvy, M.L., Britt, T.R., Davis, B.L., Gillie, J.K., Graves, F.B. et Lentz, L.A. (1998) Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **70**, 119R-177R

Mcshane, M.J., Cameron, B.D., Coté, G.L. et Spiegelman, C.H. (1999) Improving complex near-IR calibration using a new wavelength selection algorithm. *Applied Spectroscopy* **53**, 1575-1581

Montgomery, D.C. (1997) Design and analysis of experiments, (John Wiley and sons Eds.) pp 704, NY, USA

Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J. et Guerrero, M.G. (1998) Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology* **60**, 175-182

Moroshita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. et Yura, T. (1981) Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli*: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology* **148**, 64-71

Mozzi, F., De Giori, G.S., Oliver, G. et De Valdez, G.F. (1994) Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft* **49**, 667-670

Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Oliver, G. et Font de Valdez, G. (1995a) Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. I. Influence of salts. *Milchwissenschaft* **50**, 186-188

Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Oliver, G. et Font de Valdez, G. (1995b) Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. II. Influence of the carbon source. *Milchwissenschaft* **50**, 307-309

Mozzi, F., De Giori, G.S., Oliver, G. et Font de Valdez, G.F. (1996) Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnology Letters* **10**, 435-439

Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Teruo, Y. et Mori, Y. (1994) Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **17**, 1012-1017

Nagaoka, M., Muto, M., Nomoto, K., Matuzaki, T., Watanabe, T. et Yokokura, T. (1990) Structure of polysaccharide-peptidoglycan complex from the cell wall of *Lactobacillus casei* YIT9018. *Journal of Biochemistry* **108**, 568-571

Nakajima, H., Toyoda, S., Toba, T., Itoh, T., Mukai, T. et Adachi, S. (1990) A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Journal of Dairy Science* **73**, 1472-1477

Nakajima, H., Suzuki, Y., Kaizu, H. et Hirota, T. (1992) Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *Journal of Food Science* **57**, 1327-1329

Neve, H., Geis, A. et Teuber, M. (1988) Plasmid-encoded functions of ropylactic acid streptococcal strains from Scandinavian fermented milk. *Biochimie* **70**, 437-442

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, V., Shortt, C. et Salminen, S. (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* **9**, 43-52

Parente, E. et Zottola, E.A. (1991) Growth of thermophilic starters in whey permeate media. *Journal of Dairy Science* **74**, 20-28

Peiris, P.S., Dlamini, A.M. et Bavor, H.J. (1998) Short communication: Optimization of bioprocess conditions for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 917-919

Perez-Fernandez, M.E., Quesada, E., Galvez, J. et Ruiz, C. (2000) Effect of exopolysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas eurihalina*, on the proliferation *in vitro* of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **22**, 131-141

Petit, C., Grill, J.P., Maazouzi, N. et Marczak, R. (1991) Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 216-221

Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. et Cerning, J. (2000) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2302-2310

Pintado, M.E., Pintado, A.I.E. et Malcata, X. (1999) Fate of nitrogen during metabolism of whey lactose by *Rhizobium aquatilis*. *Journal of Dairy Sciences* **82**, 2315-2326

PLSplus/IQ for Grams 32 and 386. (1996) User's guide;pp. Pages, Galactic industries Corporation, Salem, NH, USA

Putzig, C.L., Leugers, M.A., Mckelvy, M.L., Mitchell, G.E., Nyquist, R.A., Papenfuss, R.P. et Yurga, L. (1994) Infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* **66**, 26R-66R

Racine, M., Dumont, J., Champagne, C.P. et Morin, A. (1991) Production and characterization of the polysaccharide from *Propionibacterium acidi-propionici* on whey-based medium. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 233-238

Rankin, S.A. et Brewer, S.L. (1998) Color in not fat fluid milk as affected by fermentation. *Journal of Food Science* **63**, 178-180

Rawson, H.L. et Marshall, V. (1997) Effect of ropy strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus and *Streptococcus* on rheology of stirrer yogurt. *International Journal of Food Science and Technology* **32**, 213-220

Ren, G. et Chen, F. (1999) Simultaneous quantification of ginsenosides in american ginseng (*Panax quiquefolium*) root power by visible/near-infrared. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **47**, 2771-2775

Ricciardi, A., Parente, E. et Clementi, F. (1997) A simple method for the screening of lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides in liquid media. *Biotechnology Techniques* **11**, 271-275

Ricciardi, A., Parente, E., Aquino, M. et Clementi, F. (1998) Use of desalting gel for the rapid separation of simple sugars from exopolisaccharides produced by lactic acid bacteria. *Biotechnology Techniques* **12**, 649-642

Ricciardi, A. et Clementi, F. (2000) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science* **12**, 23-45

Riley, M.R., Arnold, M.A., Murhammer, D.W., Walls, E.L. et De la Cruz, N. (1998) Adaptive calibration scheme for quantification of nutriments and byproducts in insect cell bioreactors by near-infrared spectroscopy. *Biotechnology Progress* **14**, 527-533

Riley, M.R., Okenson, C.D. et Frazier, B.L. (1999) Rapid calibration of near-infrared spectroscopy measurements of mammalian cell cultivations. *Biotechnology Progress* **15**, 1133-1141

Riley, M., Arnold, M.A. et Murhammer, W.D. (2000a) Effect of sample complexity on quantification of analytes in aqueous samples by near-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **54**

Riley, M.R. et Crider, H.M. (2000b) The effect of analyte concentration range on measurement error obtained by NIR spectroscopy. *Talanta* **52**, 473-484

Rodriguez-Otero, J.L., Hermida, M. et Centeno, J. (1997) Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: a review. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2815-2819

Sebastiani, H. et Zelger, G. (1998) Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **53**, 15-20

Shellhaass, S.M. et Morris, H.A. (1985) Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Microstructure* **4**, 279-287

Skriver, A., Roemer, H. et Qvist, K.B. (1993) Rheological characterization of stirred yoghurt: viscometry. *Journal of Texture Studies* **24**, 185-198

Smith, J.S., Hillier, A.J., Lees, G.J. et Jago, G.R. (1973) The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *Journal of Dairy Research* **42**, 123-138

Smith, K.F., Simpson, R.J. et Armstrong, R.D. (1998) Using near infrared reflectance spectroscopy to estimate the nutritive value of senescing annual ryegrass (*Lolium rigidum*): a comparison of calibration methods. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **38**, 45-54

Stingele, F., Nesser, J.-R. et Mollet, B. (1996) Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology* **178**, 1680-1690

Stingele, F., Vincent, S.J.F., Faber, E.J., Newell, J.W., Kamerling, J.P. et Neeser, J.-R. (1999) Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular Microbiology* **32**, 1287-1295

Sutherland, I.W. (1982) Biosynthesis of microbial exopolysaccharides dans *Advances in Microbial Physiology*, vol. 23 (Morris, A. H. R. a. J. G., ed.), pp. 80-150, Academic Press, NY, USA

Sutherland, I.W. (1990) *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*; pp. 163, Cambridge University Press, NY, USA

Sutherland, I.W. (1994) Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* **12**, 393-448

Sutherland, I.W. (1997) Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure and Applied Chemistry* **69**, 1911-1917

Sutherland, I.W. (1998) Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH* **16**, 41-46

Sutherland, I.W. (1999) Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **38**, 319-328

Swierenga, H., Wulfert, F., De Noord, O.E., A.P., D.W., Smilde, A.K. et Buydens, L.M.C. (2000) Development of robust calibration models in near infra-red spectrometric applications. *Analytica Chimica Acta* **411**, 121-135

Szczodrak, J., Czuchajowska, Z. et Pomeranz, Y. (1992a) Characterization and estimation of barley polysaccharides by near-infrared spectroscopy. I. Barleys, starches, and b-d-glucans. *Cereal Chemistry* **69**, 413-418

Szczodrak, J., Czuchajowska, Z. et Pomeranz, Y. (1992b) Characterization and estimation of barley polysaccharides by near-infrared spectroscopy. II. Estimation of total b-d-glucans. *Cereal Chemistry* **69**, 419-423

Taylor, K.A.C.C. (1995) A modification of the phenol-sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **53**, 207-214

Teggatz, J.A. et Morris, H.A. (1990) Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Structure* **9**, 133-138

Toba, T., Uemura, H. et Itoh, T. (1992) A new method for the quantitative determination of microbial extracellular polysaccharide production using a disposable ultrafilter membrane unit. *Letters in Applied Microbiology* **14**, 30-32

Toba, T., Uemura, H., Mukai, T., Fujii, T., Itoh, T. et Adachi, S. (1991) A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranofaciens* isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research* **58**, 497-502

Torino, M.I., Sesma, F. et Font de Valdez, G. (2000) Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification. *Milchwissenschaft* **55**, 314-316

Uemura, J., Itoh, T., Kaneko, T., Noda, K. (1998) Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Milchwissenschaft* **53**, 443-446

Vaccari, G. et Dosi, E. (1998) Near-infrared spectroscopy as a tool for real-time monitoring and control of fermentations: an application to lactic acid production. *Seminars in Food Analysis* 3, 191-215

Vaccari, G., Dosi, E., Campi, A.L., Gonzalez-Vara, A., Matteuzzi, R.D. et Mantovani, G. (1994) A near-infrared spectroscopy technique for the control of fermentation processes: An application to lactic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 913-917

Vaidyanathan, S., Macaloney, G. et McNeil, B. (1999) Fundamental investigations on the near-infrared spectra of microbial biomass as applicable to bioprocess monitoring. *The Analyst* 124, 157-162

Valyasevi, R., Sandine, W.E. et Geller, B.L. (1994) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 involves rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *Journal of Dairy Science* 77, 1-6

Van Casteren, W.H.M., Dijkema, C., Schols, H.A., Beldman, G. et Voragen, A.G.J. (1998) Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydrate Polymers* 37, 123-130

Van den Berg, D.J.C., Robijn, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebøer, A.M. et Verrips, C.T. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2840-2844

Van Kranenburg, R., Marugg, J.D., Van Swan, I.I., Willem, N.J. et De Vos, W.M. (1997) Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* 24, 387-397

Van Kranenburg, R., Boels, I.C., Kleerebezem, M. et De Vos, W.M. (1999) Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 498-504

Vedamuthu, E.R. et Neville, J.M. (1986) Involvement of a plasmid in the production of ropiness (mucoïdness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied Environmental Microbiology* **51**, 677-682

Vescovo, M., Scolari, G.L. et Bottazzi, V. (1989) Plasmid-encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnology Letters* **11**, 709-712

Whitfield, C. (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 415-420

Yang, Z., Huttunen, E., Staaf, M., Goran, W. et Heikki, T. (1999) Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. *International Dairy Journal* **9**, 631-638

Yano, T., Aimi, T., Nakano, Y. et Tamai, M. (1997) Prediction of the concentrations of ethanol and acetic acid in the culture broth of a rice vinegar fermentation using near-infrared spectroscopy. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**, 461-465

Yeung, K.S.Y., Hoare, M., Thornhill, N.F., Williams, T. et Vaghjiani, J.D. (1999) Near-infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control. *Biotechnology and Bioengineering* **63**, 685-693

Young, J. (1998) European market developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs. *British Journal of Nutrition* **80**, S231-S233

Yvon, M., Chabanet, C. et J.-P., P. (1989) Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. *International Journal Peptide and Protein Research* **34**, 166-176

Zadow, J.G. (1992) , pp. 475, Elsevier Science, NY, USA

Zhu, C. et Hieftje, G.H. (1992) Near-infrared analysis of chemical constituents and physical characteristics of polymers. *Applied Spectroscopy* **46**, 69-72

Zourari, A., Accolas, J.P. et Desmaseaud, M.J. (1992) Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Le Lait* 72, 1-34