HAL
open science

Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche de la voie de synthèse du diacétyle et d'une mise en œuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire

Emmanuel Rondags

To cite this version:

Emmanuel Rondags. Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche de la voie de synthèse du diacétyle et d'une mise en œuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997. Français. NNT : 1997INPL144N . tel-01751117

HAL Id: tel-01751117

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751117

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

97 INPL 144N

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Laboratoire des Sciences du Génie
Chimique

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité : **Biotechnologies et Industries Alimentaires**

par

Emmanuel RONDAGS

PRODUCTION D'AROMES LAITIERS PAR DES LACTOCOQUES : RECHERCHE DE LA VOIE DE SYNTHESE DU DIACETYLE ET D'UNE MISE EN ŒUVRE EN REACTEUR CONTINU A HAUTE DENSITE CELLULAIRE

soutenue publiquement le 17 Décembre 1997 devant la commission d'examen :

D 136 003571 2

Nancy-Brabois

Pr

Ra

Examinateurs : M. G. DELESPAUL
M. I. MARC

1360035712

97INPL144N

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Laboratoire des Sciences du Génie
Chimique

[M] 1997 RONDAGS, E.

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité : **Biotechnologies et Industries Alimentaires**

par

Emmanuel RONDAGS

PRODUCTION D'AROMES LAITIERS PAR DES LACTOCOQUES : RECHERCHE DE LA VOIE DE SYNTHESE DU DIACETYLE ET D'UNE MISE EN ŒUVRE EN REACTEUR CONTINU A HAUTE DENSITE CELLULAIRE

soutenue publiquement le 17 Décembre 1997 devant la commission d'examen :

Président :	M. P. GERMAIN
Rapporteurs :	M. C. DIVIES
	M. G. GOMA
Examinateurs :	M. G. DELESPAUL
	M. I. MARC

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

A Nathalie et Margot

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique au sein du groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. A ce titre, je remercie Daniel Tondeur et Hans Günther Lintz, directeurs successsifs du laboratoire, ainsi qu'Annie et Ivan Marc, responsables du groupe, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en m'accueillant.

Je suis, de plus, tout particulièrement reconnaissant à Ivan Marc pour sa direction de recherche inspirée et son soutien sans faille tout au long de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Pierre Germain, professeur à l'E.N.S.A.I.A. et directeur du Laboratoire de Fermentations et Bioconversions Industrielles, pour avoir assuré la co-direction de ce travail et accepté de présider le jury de thèse.

Je sais gré à Gérard Goma, professeur à l'I.N.S.A. et Charles Divès, professeur à l'E.N.S.B.A.N.A. d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Gilbert Delespaul, responsable de recherche et de développement aux fromageries Bel, pour avoir bien voulu faire partie de ce jury et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux nombreux étudiants d'horizons fort différents dont les compétences, les efforts et la motivation ont permis de mener à bien ce travail. Un grand merci en particulier à Emma, Wolfgang, Isabelle, Audrey, Céline, Ludovic, Patricia et Emmanuel.

De plus, ce travail a été réalisé avec l'aide des services du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique. Je tiens donc à remercier René Lorrain, Patrick Louis et Gérard Paquot de l'atelier, Louis-Marie Vincent, Richard Lainé et Alain Chenu du service électronique et micro-informatique, Nathalie Antonot de la bibliothèque et Nelly, Christine, Dominique, Marie-Thérèse et Véronique pour le secrétariat, la comptabilité et les photocopies.

L'aide précieuse des ingénieurs de choc Evelyne Ronat et Fabrice Blanchard a, elle aussi, très largement contribué à l'aboutissement de ce travail de recherche.

Enfin, mes pensées vont à ceux que j'ai croisé au cours de cette thèse, anciens de la halle de biotechnologie comme Gilles, Eric et Rémy, petits jeunes de P.R.A.B.I.L. avec Nathalie, Claude, Séraphim, Lionel, Silvère et Vincent, forçats des cellules animales avec Marc, Michel, Marie-Stéphane, Halima et Stéphane, et agités de l'E.N.S.A.I.A. comme Delphine, Thierry, Ali, Damien, Pascale, Florence, Hervé, François, Daniel et Isabelle.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE I

MATERIELS ET METHODES 5

I. Réactifs 11
II. Souches 11
III. Milieux de culture 12
IV. Supports d'immobilisation 13
V. Matériels 14
VI. Conduite des fermentations 16
VII. Techniques analytiques 23
VIII. Suivi de la décarboxylation oxydative de l'α-acétolactate 28
IX. Calcul des paramètres cinétiques - filtrage des valeurs 28
X. Interprétation des résultats 29

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 33

I. Taxonomie des bactéries lactiques 37
II. Métabolismes et besoins nutritionnels 40
II.1. Métabolismes carbonés 40
II.2. Obtention de souches surproductrices de diacétyle 56
II.3. Métabolisme de l'oxygène chez les lactocoques 59
III. Modes de mise en œuvre *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 61
III.1. Introduction 61
III.2. Culture en réacteur parfaitement agité 62
III.3. Culture sous forme immobilisée 64
III.4. Fermentation extractive 68

RESULTATS - DISCUSSION 71

Etude d'une voie de production de diacétyle par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 73

I. Introduction 77
II. Production microbiologique de diacétyle 78
III. Décarboxylation oxydative de l'AAL dans l'eau 82
IV. Production biologique de diacétyle par décarboxylation oxydative extracellulaire de l'AAL 84
V. Décarboxylation oxydative de l'AAL dans des extraits cellulaires 91
VI. Conclusions 97

Etudes prospectives pour la mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en réacteurs continus à haute densité cellulaire 99

I. Introduction 105
II. Etude préliminaire du comportement métabolique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* cultivé en mode discontinu 107
III. Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en réacteur continu à recyclage cellulaire 118
IV. Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en réacteur continu à cellules immobilisées en lit fixe 136
V. Domaines d'application et limites de l'utilisation de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en réacteur continu à recyclage cellulaire et en réacteur continu à cellules immobilisées en lit fixe 157

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES 159

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 167

GLOSSAIRE 183

NOMENCLATURE 187

INTRODUCTION GENERALE

Les bactéries lactiques sont largement utilisées pour la conservation de produits laitiers, mais aussi carnés et végétaux. Le principal mécanisme d'amélioration de la conservation de ces aliments réside dans la consommation de glucides par ces cellules avec production d'acide lactique. Ainsi, d'une part, la présence d'acide lactique inhibe le développement d'une éventuelle flore pathogène et, d'autre part, la consommation des glucides limite leur croissance rapide dans l'hypothèse où l'effet de la production d'acide lactique ne serait pas suffisant. Cependant, en dehors de ce rôle primordial de conservation des aliments, l'action des bactéries lactiques se traduit aussi par des effets importants sur la texture, le goût ou l'arôme du produit fermenté, effets s'ajoutant aux propriétés initiales de l'aliment.

En particulier, l'arôme final d'un produit laitier fermenté provient à la fois des arômes présents initialement dans le lait ou ses dérivés, des traitements subis par le lait après la traite et avant la fermentation, et de la fermentation. Il résulte de cette origine multiple des composants d'arômes des bouquets complexes avec, qui plus est, de nombreuses interactions entre composants d'arômes et des seuils de sensibilité variant avec la nature du produit. En conséquence, l'identification de l'effet d'une molécule particulière sur l'arôme final d'un produit est difficile à évaluer. Néanmoins, parmi les nombreuses molécules composant ces arômes laitiers, le diacétyle a été parfaitement identifié comme étant responsable de l'arôme typique de noisette présent dans le beurre, mais aussi dans de nombreux produits laitiers tels que crèmes et laits fermentés, ou non comme la margarine.

L'origine de cette molécule dans les produits laitiers fermentés provient de l'action microbiologique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Le fort intérêt économique que revêt la production microbiologique du diacétyle a entraîné le développement de nombreuses études physiologiques et génétiques dont il ressort que deux voies métaboliques peuvent être empruntées pour synthétiser ce composé : la première fait intervenir une réaction entre un complexe acétaldéhyde-TPP issu d'une activité pyruvate décarboxylase et l'acétyl-CoA catalysée par la diacétyle synthétase pour former directement le diacétyle (Speckman et Collins, 1968 et 1973), alors que la seconde implique la formation d'une molécule d'acétaldéhyde-TPP et sa condensation avec une molécule de pyruvate en α-acétolactate (AAL) au niveau d'une acétolactate synthétase, puis la décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle (Verhue et Tjan, 1991).

Toutefois, en dépit de la démonstration de l'existence de ces deux voies, leurs participations cinétiques respectives pour la production microbiologique de diacétyle n'a pu être établie. A l'heure actuelle, l'absence d'identification de la diacétyle synthétase fait que la voie de l'AAL est considérée comme cinétiquement prépondérante. Néanmoins, la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle demeure elle aussi mal connue. En effet, bien que la capacité importante de ce composé à subir une décarboxylation oxydative spontanée ait été constatée (Veringa *et al.*, 1984 ; Monnet *et al.*,

1994), ces données semblent contredites tout d'abord par l'accumulation d'AAL lors de cultures aérobies pourtant favorables à la décarboxylation oxydative (Curic, 1977) mais aussi, à l'inverse, par l'observation d'une production de diacétyle par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* dans des conditions anaérobies et à faible potentiel rédox défavorables pour une décarboxylation oxydative (Stien, 1993). Au vu de ces données parcellaires et contradictoires, il apparaît nécessaire de recueillir des données cinétiques complémentaires concernant la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL.

Ainsi, la première voie de recherche de ce travail consiste tout d'abord en l'amélioration du niveau de connaissance concernant la réaction de décarboxylation oxydative dans des conditions physico-chimiques existant lors de cultures de bactéries lactiques productrices d'arômes, avec pour objectif principal de déterminer si la décarboxylation oxydative de l'AAL peut effectivement être à l'origine de la production microbiologique du diacétyle. Pour ce faire, nous nous proposons d'établir une comparaison entre des cinétiques de production microbiologique de diacétyle en anaérobiose par la souche de référence du laboratoire, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* SD 933, et une production de diacétyle par décarboxylation oxydative d'AAL dans des conditions extra ou intracellulaires correspondant à cette culture. Cette comparaison doit permettre non seulement de déterminer la part cinétique que peut avoir la décarboxylation oxydative de l'AAL dans la production microbiologique du diacétyle, mais aussi, si cette part se révèle importante, de connaître la localisation cellulaire de cette réaction. Par la suite, ces connaissances pourront éventuellement être mises à profit pour envisager des modifications des procédés de mise en œuvre de bactéries lactiques productrices de diacétyle afin d'en améliorer les niveaux de production, la productivité et la fiabilité.

C'est pourquoi la deuxième voie de recherche de ce travail se propose d'évaluer des modes de mise en œuvre en continu des bactéries lactiques productrices d'arômes. La production d'arômes dans les produits laitiers fermentés tend de plus en plus à être découplée des autres opérations unitaires comme c'est le cas avec le procédé NIZO de production de beurre dans lequel la production d'arômes, d'acides et de cellules est séparée de la maturation physique de la crème. Ce découplage présente l'avantage de simplifier le contrôle et l'amélioration des performances de chaque opération unitaire de façon à obtenir un produit fini ayant une texture, une acidité ou une concentration en arômes données et constantes.

L'amélioration de la production de diacétyle peut être atteinte dans un premier temps par sélection ou développement de souches surproductrices, ainsi que par optimisation des conditions de culture en influant sur des paramètres tels que la température, le pH ou la composition du milieu. Cependant, cette approche se trouve, d'une part, confrontée à des barrières d'ordre physiologique, les performances des bactéries lactiques productrices d'arômes étant limitées, mais aussi réglementaires pour l'utilisation

de souches issues de l'ingénierie génétique. Pour pouvoir accroître encore la productivité en arômes, et, par là même, diminuer la taille des installations tout en les rendant plus polyvalentes, il devient donc nécessaire de considérer des changements importants du mode de culture de ces bactéries productrices d'arômes.

La mise en œuvre des bactéries lactiques productrices d'arômes a, en effet, principalement lieu en culture discontinue, qui, bien que présentant l'avantage de limiter les risques technologiques, ne permet pas de tirer tout le parti des performances des souches productrices. A l'inverse, le mode de culture continu, quoique plus complexe technologiquement, permet de maintenir sur de longues périodes les cellules dans un état physiologique donné, apportant à la fois une meilleure productivité en arômes et une meilleure maîtrise de la qualité du produit aromatisé. La productivité en diacétyle peut, de plus, être encore améliorée en mode continu par l'utilisation de réacteurs à haute densité cellulaire. Le gain de productivité peut alors être suffisant pour justifier aux yeux des industriels l'investissement dans de nouvelles installations et l'augmentation de la complexité du procédé de production. Toutefois, le choix du mode de culture à haute densité cellulaire le plus adapté parmi le large éventail disponible semble assez ardu, vu l'absence de données comparatives.

Ainsi, l'objectif de cette deuxième voie de recherche consiste à établir une comparaison entre deux modes de culture continue à haute densité cellulaire éloignés sur un plan technique, pour en déterminer les potentialités et les limitations propres. La comparaison doit tout d'abord être effectuée en terme de comportement métabolique d'une souche productrice d'arômes, par la détermination de macrocinétiques d'orientation du flux provenant des deux substrats carbonés, lactose et citrate, vers le catabolite principal, le lactate, mais aussi vers la production de molécules issues de voies mineures, comme le diacétyle. Ces données macrocinétiques, seront ensuite mises à profit pour établir une nouvelle comparaison, mais cette fois-ci, en terme de performances. L'ensemble de ces résultats doit alors permettre d'établir une analyse de choix du procédé en fonction de la physiologie de la souche et des performances recherchées.

Les deux modes de culture continue à haute densité cellulaire sélectionnés dans le cadre de ce travail sont la culture continue en réacteur à recyclage cellulaire par microfiltration tangentielle et la culture continue de cellules immobilisées sous forme de biofilm en réacteur à lit fixe. Ces modes de mise en œuvre ont été choisis, tout d'abord, parce que leur transfert au niveau industriel semble raisonnablement réalisable, le recours aux procédés à membrane étant admis en industrie laitière et la robustesse tout comme les faibles coûts de fonctionnement du réacteur à lit fixe présentant un fort intérêt. De plus, ces modes de culture sont très éloignés d'un point de vue technologique et physiologique, l'un faisant appel à des cellules libres contingentées dans un réacteur parfaitement agité, l'autre mettant en œuvre des cellules immobilisées sous forme de biofilm, ce qui permet d'espérer

recueillir une grande quantité d'informations sur le comportement métabolique et les performances d'une souche de référence en culture continue à haute densité cellulaire.

L'étude comparative doit être effectuée par la mise en œuvre d'une même souche, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A, apparentée à la souche SD 933 dont la commercialisation a cessé, dans des conditions comparables (milieu de culture, température, anaérobiose) et à deux pH favorisant soit la production de biomasse soit l'orientation du flux carboné vers l'ensemble des voies cataboliques. Ainsi, ces conditions de culture, bien que loin d'être optimales, doivent permettre de mettre en évidence les influences de chaque mode de culture sur la croissance et l'orientation du flux carboné catabolisé par les cellules. La détermination des productivités en biomasse et métabolites ainsi que l'évaluation de la nature des effets des modes de culture sur la physiologie de la souche doivent ensuite permettre de définir des domaines d'application de chaque mode de culture en industrie laitière.

Le premier chapitre de ce document décrit les matériels employés, ainsi que les méthodes développées pour explorer les deux voies de recherche concernées.

Le chapitre suivant consiste en une étude bibliographique qui décrit l'état de l'art concernant le métabolisme des lactocoques producteurs de diacétyle et leurs modes de mise en œuvre.

Ensuite, la première partie du chapitre résultats - discussion est consacrée à la présentation de cinétiques de production microbiologique de diacétyle et de décarboxylation oxydative extra et intracellulaires d'AAL ainsi qu'à leur interprétation. La deuxième et dernière partie de ce chapitre présente les résultats macrocinétiques obtenus avec les deux procédés de culture continue à haute densité cellulaire dans différentes conditions de fonctionnement et en dresse une analyse tant sur le plan physiologique que technologique.

MATERIELS ET METHODES

I. REACTIFS 11

I.1. Milieux de culture et de conservation des souches 11
I.2. Réactifs pour dénombrement, analyses et entretien 11
I.3. Effluents gazeux 11

II. SOUCHES 11

III. MILIEUX DE CULTURE 12

III.1. Milieux liquides 12
III.1.1. Milieu lait 12
III.1.2. Milieu semi-synthétique dit milieu Y 12

IV. SUPPORTS D'IMMOBILISATION 13

IV.1. Supports minéraux 13
IV.2. Supports biologiques 13
IV.3. Supports à base de charbon activé 13
IV.4. Supports à base de résines échangeuses d'ions 13

V. MATERIELS 14

V.1. Matériels d'analyse 14
V.2. Matériels de fermentation et de culture 14
V.3. Matériels divers 15

VI. CONDUITE DES FERMENTATIONS 16

VI.1. Conservation des souches et préculture 16
VI.2. Cultures discontinues en fermenteur de 2 l 16
VI.2.1. Régulation du pH 16
VI.2.2. Régulation de la température 16
VI.2.3. Agitation 17
VI.2.4. Conditions de travail 17
VI.3. Cultures continues en réacteur de 2 l 17
VI.4. Cultures discontinues en fermenteur de 20 l 17
VI.5. Cultures continues avec recyclage cellulaire en réacteur de 20 l 19

VI.5.1. Conduite des cultures 19
VI.6. Cultures discontinues de cellules immobilisées 19
VI.7. Cultures continues de cellules immobilisées 21
VI.7.1. Colonisation du support 21
VI.7.2. Conduite des cultures 21
VI.8. Prélèvement d'échantillons 21
VI.9. Stérilisation 21

VII. TECHNIQUES ANALYTIQUES 23

VII.1. Séparation cellules - milieu 23
VII.2. Mesure de la biomasse 23
VII.2.1. Méthode turbidimétrique 23
VII.2.2. Méthode gravimétrique 23
VII.2.3. Méthodes de numération 24
VII.3. Mesure des concentrations en lactose et acides organiques 24
VII.4. Mesure des concentrations en diacétyle, en acétaldéhyde et en éthanol 26
VII.5. Mesure des concentrations en acétoïne et en 2,3-butanediol 27

VIII. SUIVI DE LA DÉCARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'α-ACETOLACTATE 28

VIII.1. Milieux réactionnels 28
VIII.2. Préparation de l'α-acétolactate 28
VIII.3. Suivi de la réaction 28

IX. CALCUL DES PARAMETRES CINETIQUES - FILTRAGE DES VALEURS 28

X. INTERPRETATION DES RESULTATS 29

X.1. Vitesses et vitesses spécifiques 29
X.1.1. Culture discontinue 29
X.1.2. Culture continue 30
X.1.3. Culture continue avec recyclage cellulaire 31
X.2. Rendements 31
X.2.1. Culture discontinue 31
X.2.2. Culture continue 32

I. REACTIFS

I.1. MILIEUX DE CULTURE ET DE CONSERVATION DES SOUCHES

Lait écrémé en poudre	Elle et Vire, Condé-sur-Vire
Peptone de caséine réf. 15.544	Organotechnie, Melun
Extrait de levure réf. 19.512	Organotechnie, Melun
Sulfate de magnésium réf. A 771886	Merck, Nogent-sur-Marne
D(+) lactose monohydraté réf. 24945.360	Prolabo, Fontenay-sous-Bois
Acétate de sodium réf. A 4889301	Labosi, Elancourt
Acide citrique monohydraté réf. 20275.298	Prolabo, Fontenay-sous-Bois
Hydroxyde de sodium réf. A 4894953	Labosi, Elancourt

I.2. REACTIFS POUR DENOMBREMENTS, ANALYSES ET ENTRETIEN

Acide formique réf. 1135598	Merck, Nogent-sur-Marne
Acide sulfurique réf. 748	Merck, Nogent-sur-Marne
Ethanol absolu réf. 20821.296	Prolabo, Fontenay-sous-Bois
Acide acétique réf. 45731	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Chlorure de sodium réf. 71380	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Agar - Agar réf. 05038	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Acide pyruvique réf. 15940	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Acide lactique L(+) réf. 69771	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Acétaldéhyde réf. 00070	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Diacétyle (2,3-butanedione) réf. 31530	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Acétoïne (3-hydroxy butanone 2) réf. 00540	Fluka, Saint Quentin Fallavier
2,3-butanediol réf. 18970	Fluka, Saint Quentin Fallavier
Maturex L	Novo Nordisk, Dittingen, Suisse
Permanganate de potassium réf. 26906.290	Prolabo, Fontenay-sous-Bois
Ethyl 2-acetoxy-2-méthyl-acétoacétate réf. 4142733850	Aldrich, Saint Quentin Fallavier
Lysozyme réf. 62971	Fluka, Saint Quentin Fallavier
FAD réf 1102 338	Boehringer, Mannheim Allemagne
NAD^+ réf 127302	Boehringer, Mannheim
NADP réf 127302	Boehringer, Mannheim
Solution de nettoyage Divos 122	Diversey, Ozoir-la-Ferrière
Solution stérilisante Divosan	Diversey, Ozoir-la-Ferrière
Eau milliQ	Millipore, Molsheim

I.3. EFFLUENTS GAZEUX

Azote de qualité R	Air liquide, Paris
Azote de qualité U	Air liquide, Paris
Hydrogène de qualité U	Air liquide, Paris
Hélium de qualité U	Air liquide, Paris

II. SOUCHES

Deux souches de l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ont été utilisées au cours de ce travail :

- la souche SD933 commercialisée par les laboratoires Visby (Tönder, Danemark), souche de référence employée au laboratoire,

- la souche PAL D DIA A commercialisée par Standa Industrie (Caen) qui correspond à une souche employée couramment en industrie laitière.

III. MILIEUX DE CULTURE

III.1. MILIEUX LIQUIDES

Deux milieux liquides, l'un complexe, le lait, et l'autre semi-synthétique le milieu Y, ont été utilisés pour ces études concernant les bactéries lactiques.

III.1.1. MILIEU LAIT

Le lait constitue un bon milieu de culture pour les microorganismes aptes à assimiler le lactose et les protéines (Desmazeaud, 1994). Cependant, pour diverses raisons ce n'est pas un milieu de culture universel. La première est liée aux variations des concentrations en vitamines, en bases azotées et en autres facteurs de croissance présents naturellement dans le lait, indispensables à la croissance de la plupart des bactéries lactiques, mais dont les concentrations peuvent être variables suivant la période de la traite et l'alimentation animale. La seconde est liée à la composition du lait en matière azotée et, en particulier, en composés azotés de faible masse molaire (acides aminés libres et petits peptides) qui sont les plus efficaces pour stimuler la croissance et dont la teneur dans le lait est dix fois plus faible que la concentration nécessaire pour une bonne croissance des bactéries lactiques dans un milieu synthétique (Alais, 1984). La troisième est liée aux traitements thermiques du lait, d'abord industriel, puis en autoclave (121°C, 15 mn), qui détruisent partiellement certaines substances naturelles stimulantes du lait cru ainsi que les acides aminés libres. La dernière raison est d'ordre pratique car le lait ne permet pas un suivi facile des fermentations, en premier lieu du fait de sa non-transparence qui empêche le recours à la turbidimétrie pour l'évaluation rapide de la concentration en biomasse, ensuite, à cause des traitements préalables, parfois source d'erreurs, imposés avant l'utilisation de méthodes d'analyses chromatographiques (CPG, CLHP) et, enfin, parce que les variations de viscosité de ce milieu sont susceptibles de perturber l'agitation du milieu de culture et le suivi en ligne des composés volatils par la technique analytique mise en œuvre au laboratoire.

III.1.2. MILIEU SEMI-SYNTHETIQUE DIT MILIEU Y

Les milieux semi-synthétiques présentent de nombreux avantages qui justifient leur large utilisation comme milieux d'étude cinétique. A la fois complets du point de vue nutritionnel et facilement modifiables (diminution ou augmentation de la quantité d'un des constituants), ils sont moins soumis aux aléas de variation des lots et aux difficultés d'approvisionnement et de conservation. Leur transparence et leur composition permettent généralement un suivi simple et précis des fermentations, atout supplémentaire aux yeux

de l'expérimentateur. Le milieu Y, employé lors de ce travail, est un milieu semi-synthétique dérivé du milieu MRS (De Man *et al.*, 1960), qui a été mis au point au laboratoire (Stien, 1993) après une série d'essais en fioles d'Erlenmeyer et en fermenteurs de milieux naturels (lait, perméat de lactosérum) et semi-synthétiques. Sa composition est la suivante :

- D (+) Lactose monohydraté	10 g
- Peptone de caséine	10 g
- Extrait de levure	5 g
- Acétate de sodium	5 g
- Acide citrique monohydraté	1,5 g
- $MgSO_4$, $7H_2O$	0,1g
- Eau MilliQ qsp	1000 ml.

Le pH du milieu est amené à la valeur requise par ajout de soude ou d'acide sulfurique 4 N. La forme solide du milieu Y est obtenue en ajoutant 15 g/l d'Agar-Agar au milieu Y liquide, et est utilisée pour le dénombrement des espèces utilisées sur boîte de Pétri.

IV. SUPPORTS D'IMMOBILISATION

IV.1. SUPPORTS MINERAUX

Diatomées agglomérées R635 (D X L : 6,35 X 12,7 mm)	Célite, Rueil Malmaison
Billes de verre (D : 2 mm)	Bioblock scientific, Strasbourg
Billes de verre (D : 3 mm)	Bioblock scientific, Strasbourg

IV.2. SUPPORTS BIOLOGIQUES

Granulés de rafles de maïs RM 16 (D : 1 à 1,25 mm)	Lur Berri, Aïcirits
Granulés de rafles de maïs RM 12 (D : 1,5 à 2 mm)	Lur Berri, Aïcirits
Granulés de rafles de maïs RM 8 (D : 1,8 à 2,8 mm)	Lur Berri, Aïcirits

IV.3. SUPPORTS A BASE DE CHARBON ACTIVE

Acticarbone GAC 1240 (D : 0,9 à 1 mm)	Ceca Ato, Parentis-en-Born
Acticarbone NC 35 (D : 2,5 à 5 mm)	Ceca Ato, Parentis-en-Born
Acticarbone SA 1810 (D : 0,4 à 2 mm)	Ceca Ato, Parentis-en-Born

IV.4. SUPPORTS A BASE DE RESINES ECHANGEUSES D'IONS

Amberlite 200 C (D < 1 mm)	Rohm et Haas, Chauny
Amberlite IRA 900 (D : 0,3 à 1,2 mm)	Rohm et Haas, Chauny
Amberlite RF 14 (D < 1 mm)	Rohm et Haas, Chauny
Amberlyst A 21 (D : 0,4 à 1,2 mm)	Rohm et Haas, Chauny
Amberlyst 15 WET (D : 0,4 à 1,2 mm)	Rohm et Haas, Chauny
Duolite A 378 (D < 1 mm)	Rohm et Haas, Chauny
Duolite C 26 LF (D < 1 mm)	Rohm et Haas, Chauny

V. MATERIELS

V.1. MATERIELS D'ANALYSE

Spectrophotomètre visible LKB Novaspec	Biochrom, Cambridge, Angleterre
Chromatographe liquide haute performance M.6000 A	Waters, Milford, E.U.A.
- Réfractomètre différentiel R.410	Waters, Milford, E.U.A.
- Spectrophotomètre Lambda-Max 481	Waters, Milford, E.U.A.
- Injecteur automatique WISP	Waters, Milford, E.U.A.
- Four pour colonne CLHP HTR	Waters, Milford, E.U.A.
- Pompe Spectraphysics P 1000	TSP, Riviera Beach, E.U.A.
- Colonne Polypore H (PPH - 257)	Brownlee Lab, Foster City, E.U.A.
- Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma	Biosystèmes, Dijon
Chromatographe en phase gazeuse IGC 121 FL	Intersmat, Chelles-les-Coudreaux
- Vanne d'injection gazeuse automatique	Delsi Nermag, Suresnes
- Détecteur à ionisation de flamme	Delsi Nermag, Suresnes
- Détecteur à capture d'électron EC4	Delsi Nermag, Suresnes
- Coffret d'automatisme	Delsi Nermag, Suresnes
- Colonne inox (2m x 1/8 de pouce), garnie de 5% PEG 20M sur Chromosorb W AW-DMCS (80 - 100 mesh)	Chrompack, Les Ulis
- Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma	Biosystèmes, Dijon
Chromatographe en phase gazeuse DI 200	Delsi Nermag, Suresnes
- Vanne d'injection liquide automatique	Delsi Nermag, Suresnes
- Détecteur à ionisation de flamme	Delsi Nermag, Suresnes
- Colonne capillaire COT de 30 m en silice fondue, phase stationnaire : Carbowax 20M 0,25 µm	J&W Scientific, Courtabœuf
- Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma	Biosystèmes, Dijon
Echantillonneur de molécules volatiles (D 25 et 47 mm)	LSGC-CNRS, Nancy
- Membrane de PTFE pur SM 11807-25N (D 25)	Sartorius, Göttingen, Allemagne
- Membrane de PTFE pur SM 11807-47N (D 47)	Sartorius, Göttingen, Allemagne

V.2. MATERIELS DE FERMENTATION ET DE CULTURE

Etuve bactériologique	Astel, Château Gontier
Etuve à matière sèche Memmert	Bioblock Scientific, Strasbourg
Hotte à flux laminaire vertical	SIBM Plastec, Ivry-sur-Seine
Autoclave 100 l	Lequeux, Dourdan
Table d'agitation Certomat R	Braun, Melsungen, Allemagne

Fermenteurs de 3 l (2 l de volume utile)	Applikon, Schiedam, Pays-Bas
- Boîtier de régulation ADI 1030	Applikon, Schiedam, Pays-Bas
- Système d'agitation ADI 1016	Applikon, Schiedam, Pays-Bas
- Electrodes pH, O_2 et rédox stérilisables	Ingold, Zürich, Suisse
- Pompes péristaltiques 7521-35 et 7544-20	Masterflex, Chicago, E.U.A.
- Bain thermostaté F10/HC	Julabo, Seelbach, Allemagne
- Station d'acquisition et de pilotage	Z.M.I., Nancy
- Logiciel d'acquistion et de pilotage sous Testpoint (Keithley, Taunton, E.U.A.)	L.S.G.C.-C.N.R.S., Nancy
Fermenteur de 20 l	Chemapec, Bron
- Boîtier de régulation ADI 1030	Applikon, Schiedam, Pays Bas
- Coffret d'agitation de contrôle d'agitation	Chemapec, Bron
- Electrodes pH, O_2 et rédox stérilisables	Ingold, Zürich, Suisse
- Pompes péristaltiques 7521-35 et 7544-20	Masterflex, Chicago, E.U.A.
- Bain thermostaté RM 20/RCS/R22	Lauda, Königshofen, Allemagne
- Station d'acquisition et de pilotage	Z.M.I., Nancy
- Logiciel d'acquistion et de pilotage sous Testpoint (Keithley, Taunton, E.U.A.)	L.S.G.C.-C.N.R.S., Nancy
Installation de microfiltration tangentielle	L.S.G.C.-C.N.R.S., Nancy
- Module de microfiltration tangentielle, 19 canaux, surface : 0,2 m^2, seuil de coupure de 0,2 µm	Ceraver, Tarbes
- Pompe de recirculation 28220.7105	ITT Jabsco, Hoddeston, Angleterre
- Capteur de pression Cerabar	Endress Hauser, Huningue
- Débitmètre massique Picomag II	Endress Hauser, Huningue
- Vanne pilotée 687/15/D	Gemü, Ingelfingen, Allemagne
- Bain thermostaté F10/C	Julabo, Seelbach, Allemagne
- Station d'acquisition et de pilotage	Z.M.I., Nancy
- Logiciel d'acquistion et de pilotage sous Testpoint (Keithley, Taunton, E.U.A.)	L.S.G.C.-C.N.R.S., Nancy
Dispositif de culture continue de cellules immobilisées	L.S.G.C.-C.N.R.S., Nancy
- Réacteur thermostaté de 520 ml de volume utile	L.S.G.C.-C.N.R.S., Nancy
- Pompes péristaltiques 101 U et 501 U	Watson Marlow, Falmouth, Angleterre
- Bain thermostaté F10/C	Julabo, Seelbach, Allemagne

V.3. MATERIELS DIVERS

Microscope LABORLUX 12	Leitz, Wetzlar, Allemagne
Balance de précision AT 200	Mettler, Greifensee, Suisse
Balance Precisa 6000 D	PAG Oerlikon, Zürich, Suisse
Débitmètres massiques RDM4	Air liquide, Paris
Cartouche Oxysorb	Messer Griesheim, Saint Denis
Membranes filtrantes en acétate de cellulose (diamètre 25 mm; seuil de coupure : 0,2 µm) Millex GS	Millipore, Molsheim
Cartouche microfiltrante (0,2 µm) Sartobran	Sartorius, Göttingen, Allemagne
Filtres d'entrée et de sortie des gaz pour fermenteur	Millipore, Molsheim
Micro-seringue de 1 µl 1BR-5-RA8	SGE, Villeneuve Saint Georges
Boîtes de Pétri, étaleurs stériles, verrerie	

VI. CONDUITE DES FERMENTATIONS

VI.1. CONSERVATION DES SOUCHES ET PRECULTURE

Les souches sont livrées sous forme lyophilisée pure dans des sachets destinés à l'inoculation directe des cuves de levains. Régulièrement, un sachet de souche pure commerciale est utilisé pour l'inoculation de 1 l de lait écrémé reconstitué stérile. Cette culture en fiole d'Erlenmeyer est incubée pendant 15 h à 30°C. 5 ml de cette première culture sur lait sont introduits stérilement dans des fioles de ce type contenant 200 ml de milieu Y et à nouveau, l'ensemble est incubé à 30°C pendant 15 h pour la souche SD 933 et 8 h pour la souche PAL D DIA A.

Les stocks de souches destinés à la préparation des inoculums de fermentation sont préparés à partir de ces cultures sur milieu Y. Une série de tubes contenant du milieu Y stérile est inoculée à 10 % à partir des fioles d'Erlenmeyer de seconde culture. L'ensemble des tubes est placé 5 heures à 30°C puis est rapidement congelé à -18°C. La conservation des différentes souches pures sous cette forme est limitée à deux mois.

Pour les cultures en réacteur de 2 l, un volume de culture pure décongelée correspondant à 5 % du volume de préculture est transféré dans une fiole de milieu Y stérile contenant 12,5 % du volume de milieu final dans le réacteur. Cette fiole, après incubation à 30 °C pendant respectivement 15 h et 8 h pour SD 933 et PAL D DIA A sert à inoculer le réacteur. Pour les cultures en réacteur à cellules immobilisées, le même protocole est suivi, avec un volume final d'inoculum de 100 ml. Dans le cas de cultures en réacteur de 20 l, une étape de pré-préculture dans des conditions identiques à celles de la préculture est nécessaire pour obtenir un volume d'inoculum suffisant pour la préculture.

VI.2. CULTURES DISCONTINUES EN FERMENTEUR DE 2 l

Le volume initial de milieu Y dans le réacteur est fixé à 1,4 l pour l'ensemble des fermentations réalisées. Après stérilisation, le réacteur est inoculé avec 200 ml de préculture.

VI.2.1. REGULATION DU pH

La régulation du pH est obtenue à l'aide d'une solution de soude 4 N et permet de maintenir un pH constant à 0,02 unité pH près.

VI.2.2. REGULATION DE LA TEMPÉRATURE

La température est régulée par circulation d'eau thermostatée au sein d'une double enveloppe entourant le réacteur. Ce système de régulation assure une température constante du milieu de fermentation à 0,2 °C près .

VI.2.3. AGITATION

Le système d'agitation comporte trois turbines Rushton fixées sur un arbre entraîné par le haut de la cuve et deux contre-pales fixes. La vitesse de rotation du moteur est fixée à 250 tr/mn.

VI.2.4. CONDITIONS DE TRAVAIL

La plupart des cultures ont été réalisées en anaérobiose stricte sauf précision apportée dans le texte. De l'azote est injecté dans le réacteur durant 20 mn avant inoculation puis, à nouveau durant 5 mn après inoculation. Par la suite, plus aucun gaz n'est introduit dans le réacteur de manière à éviter la perte de molécules volatiles aromatisantes par "stripping". Une sortie de gaz stérile est prévue afin d'éviter toute surpression ou dépression dans le réacteur (production de CO_2, prélèvement d'échantillon). Cette sortie est reliée à une fiole d'Erlenmeyer vide de trois litres balayé en permanence par de l'azote stérile. Ce système permet de maintenir les conditions anaérobies en évitant toute rétrodiffusion de l'oxygène de l'air à partir de la sortie "gaz" du fermenteur. Un schéma complet du réacteur et de ces accessoires est présenté figure I.1.

VI.3. CULTURES CONTINUES EN REACTEUR DE 2 l

Les régulations et conditions de travail sont identiques à celles employées en culture discontinue en réacteur de 2 l. Les cultures continues commencent par une phase discontinue classique. Lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle, une alimentation en milieu Y est déclenchée. Dans le même temps, un dispositif de soutirage faisant appel à une pompe de débit supérieur à celui de la pompe d'alimentation est lui aussi déclenché. Le placement précis d'une canule connectée à la pompe de soutirage dans le réacteur permet de connaître et maintenir ce volume réactionnel (1 l). Le taux de dilution est fixé par action sur la pompe d'alimentation préalablement calibrée et vérifié régulièrement par mesure des débits de soutirage.

VI.4. CULTURES DISCONTINUES EN FERMENTEUR DE 20 l

Des cultures de SD933 ont été réalisées en fermenteur de 20 l en vue de la production de quantités suffisantes de cellules pour l'obtention d'extraits cellulaires. La conduite des fermentations, la régulation du pH, de la température et de l'agitation du milieu de culture sont similaires à celles décrites pour les cultures réalisées en réacteur de 2 l. Le volume initial de milieu présent dans le réacteur est fixé à 14 l. Après stérilisation "in situ" à la vapeur du réacteur, 2 litres de préculture sont introduits lors de l'inoculation. Le montage expérimental complet est similaire à celui présenté figure I.1, à l'échelle près.

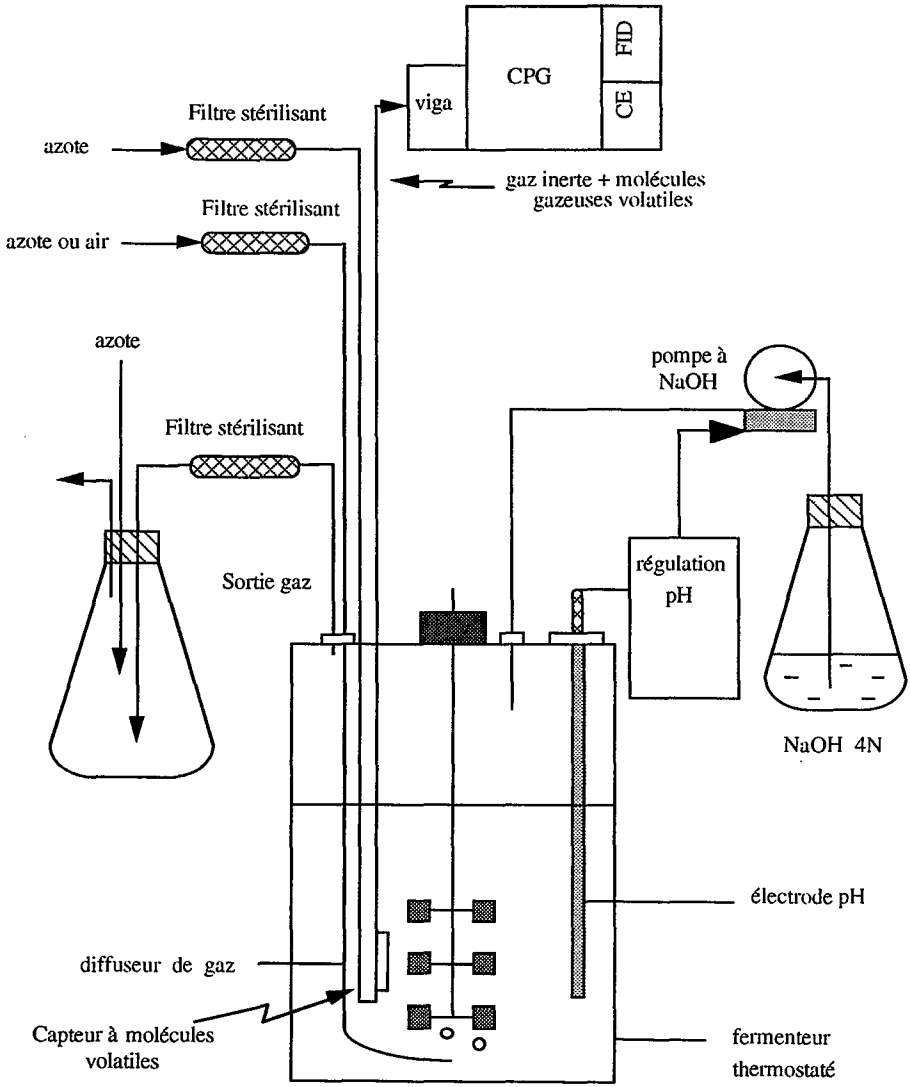


Figure I.1 : schéma complet du réacteur de 2 l utilisé et de ses accessoires (D'après Stien, 1993).

VI.5. CULTURES CONTINUES AVEC RECYCLAGE CELLULAIRE EN REACTEUR DE 20 l

Ces cultures mettant en œuvre la souche PAL D DIA A ont eu lieu dans le réacteur Chemap de 20 l utilisé pour les cultures discontinues en fermenteur de 20 l, et bénéficiaient des mêmes régulations et modes de prélèvement à l'exception de la régulation de pH qui comprenait, en plus, un dispositif d'injection d'acide sulfurique 4 N. Pour ce type d'expérience, le bioréacteur était muni d'une boucle de microfiltration tangentielle thermostatée alimentée par une pompe dont le débit est fixé par un variateur de fréquence. Le débit de purge était obtenu par branchement d'une pompe péristaltique au niveau d'un piquage dans la boucle en amont de la membrane. Le décolmatage était assuré par injection d'air comprimé à 6 bars poussant du perméat au travers de la membrane (Fig. I.2).

VI.5.1. CONDUITE DES CULTURES

La conduite de ces expériences est, au départ, identique à celle de cultures en fermenteur de 20 l. Après une phase discontinue de démarrage de la culture, la boucle de circulation avec microfiltration tangentielle est alimentée avec le contenu du bioréacteur. Le volume de milieu de culture, dans l'ensemble de l'installation, est fixé par un asservissement du débit d'alimentation en milieu frais aux débits de perméat et de purge et aux additions en soude et acide sulfurique. Le contrôle des expériences est assuré par un logiciel d'acquisition et de pilotage développé pour cette application à partir du logiciel de programmation orienté objet Testpoint (Capital Equipment Corporation). Ce logiciel est implanté sur un PC sous la forme d'un fichier exécutable gérant :

- les communications avec le boîtier de régulation du fermenteur ADI 1030 (acquisition pH, Rédox, O_2 et volumes ajoutés par pompes péristaltiques de régulation du pH, pilotage du pH et de l'aération),
- l'acquisition de la pression transmembranaire et du débit de perméat, son contrôle avec une vanne pilotable,
- le pilotage d'une vanne pneumatique sur le circuit de recirculation assurant le contrôle de la pression dans ce circuit,
- le pilotage de la pompe d'alimentation en milieu frais,
- le décolmatage du module de filtration.

VI.6. CULTURES DISCONTINUES DE CELLULES IMMOBILISEES

Ces cultures, destinées à évaluer l'aptitude de différents supports pour l'immobilisation de la souche PAL D DIA A ont été réalisées en fiole d'Erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml de support et complétés à 200 ml avec du milieu Y.

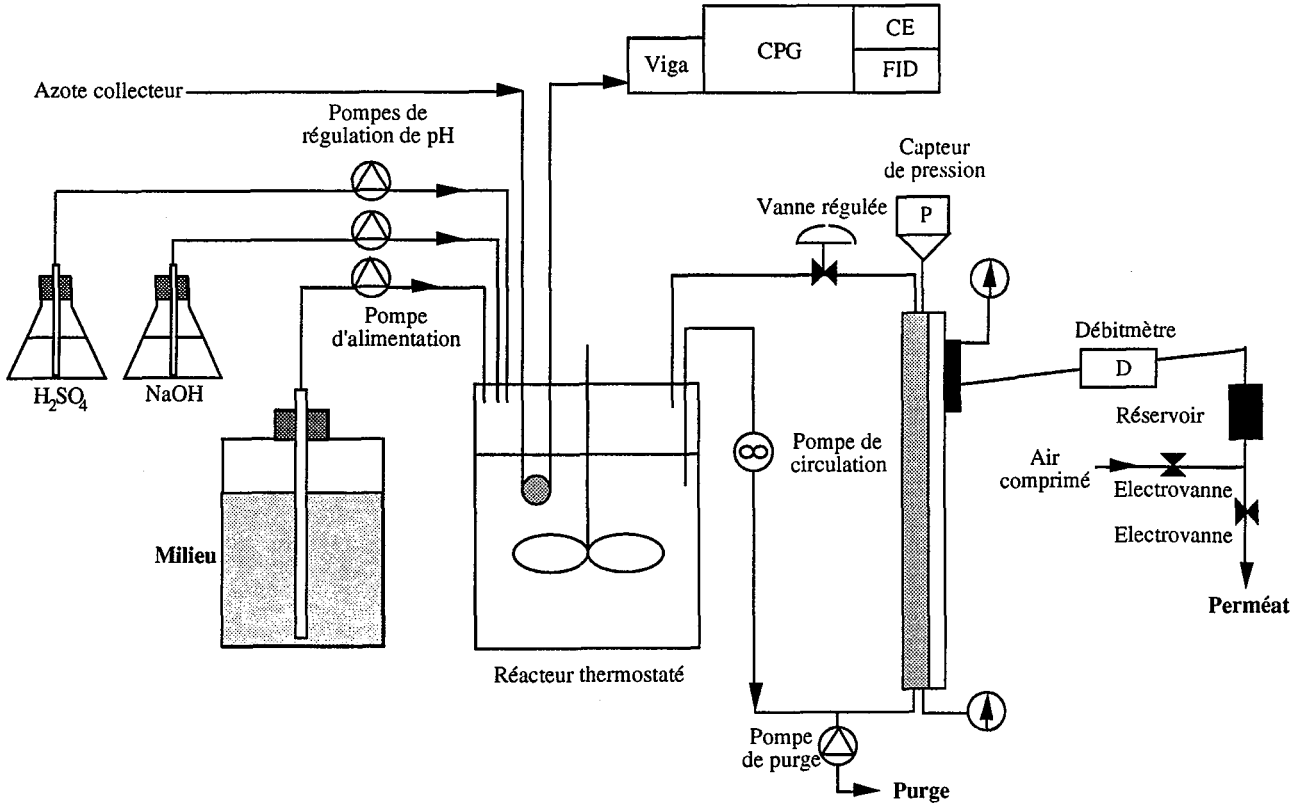


Figure I.2 : schéma général de l'installation de fermentation continue avec recyclage cellulaire par microfiltration tangentielle

Ces fioles sont inoculés avec un tube de préculture de 5 ml préalablement décongelé. Ils sont ensuite placés sur une table d'agitation avec une vitesse de rotation de 40 tr/mn dans une chambre chaude régulée à 25 °C. Le suivi des cultures est assuré par des prélèvements hors ligne de surnageant. La quantité de biomasse adsorbée est évaluée, après élimination du surnageant, rinçage des supports à l'eau physiologique stérile et remise en suspension dans l'eau physiologique stérile, par la mesure de la quantité de biomasse remise en suspension après 12 h d'agitation à 200 tr/mn.

VI.7. CULTURES CONTINUES DE CELLULES IMMOBILISEES

Les cultures de cellules immobilisées ont eu lieu en réacteur à lit fixe de 520 ml de contenance thermostaté à 25 °C. Pour le suivi de ces cultures, ce réacteur est équipé en sortie d'un capteur à molécules volatiles (Fig. I.3).

VI.7.1. COLONISATION DU SUPPORT

La phase de colonisation du support est initiée par l'injection en haut de colonne de 100 ml de préculture, suivie par une alimentation en circuit fermé de haut en bas pendant 12 h à 25 °C à partir d'une bonbonne de 5 l de milieu Y à pH 7. L'alimentation en circuit fermé est ensuite orientée de bas en haut pendant 12 h. Cette alimentation alternée a pour but de réduire le gradient de biomasse longitudinal dans le lit. La phase de colonisation est à la fois suivie visuellement et par mesure des concentrations en substrats et métabolites par prélèvements hors ligne dans le circuit de recirculation. Cette phase de circulation alternée est suivie par une alimentation en milieu Y frais à pH 7 pendant 12 h à 300 ml/h.

VI.7.2. CONDUITE DES CULTURES

Une fois la phase d'immobilisation des cellules sur le support réalisée, les cultures sont réalisées en faisant varier le débit d'alimentation en milieu frais en base de colonne.

VI.8. PRELEVEMENT D'ECHANTILLONS

Les prélèvements liquides sont effectués stérilement à l'aide d'une seringue à proximité d'un bec Bunsen. Le volume prélevé est respectivement de l'ordre de 8 ml et de 20 ml pour les réacteurs de 2 l et 20 l, à l'exception des prélèvements destinés à la détermination du poids sec de cellules où 25 ml de milieu sont prélevés.

VI.9. STERILISATION

Les fermenteurs de 2 l, de même que le réacteur à cellules immobilisées, sont stérilisés à l'autoclave avec tous leurs accessoires et le milieu de fermentation. La stérilisation est effectuée à 121 °C pendant 20 mn.

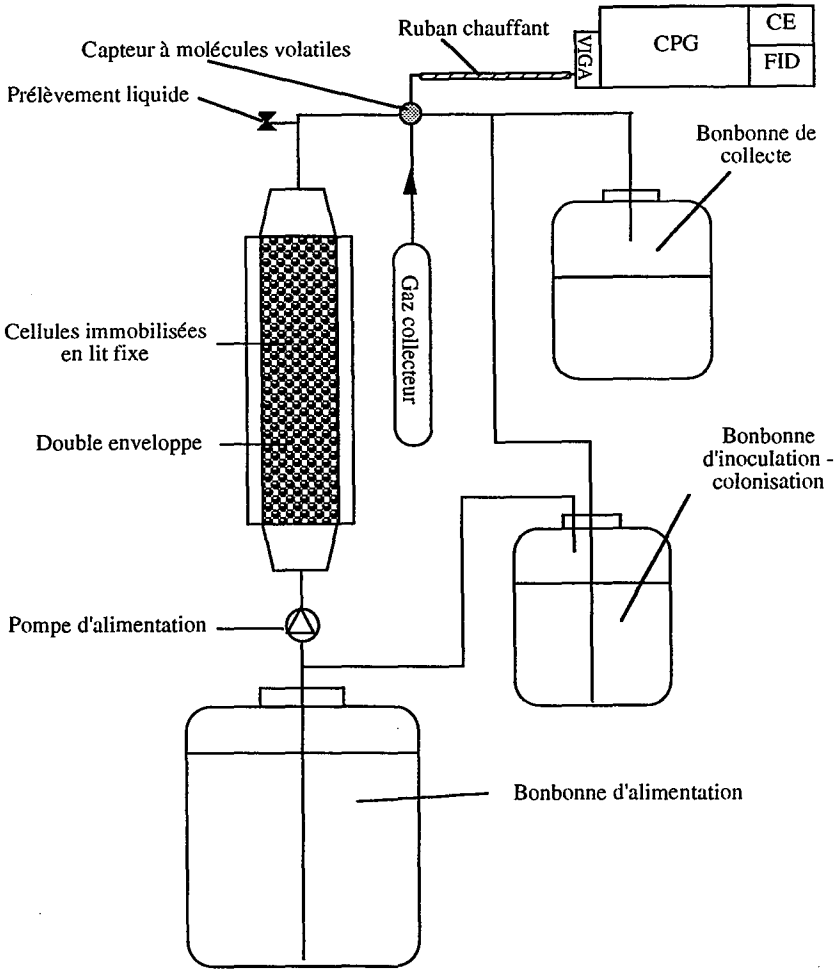


Figure I.3 : schéma général de l'installation de culture continue de cellules immobilisées en lit fixe.

Le fermenteur de 20 l est stérilisé directement à la vapeur pour les cultures discontinues. En ce qui concerne les cultures continues avec recyclage cellulaire, l'installation, réacteur de 20 l et circuit de microfiltration tangentielle, est stérilisée chimiquement pendant 4 h avec du Divozan Mezzo à 1 % V/V, après nettoyage à 70 °C avec une solution de Divos 122 à 1 % pendant 6 h.

VII. TECHNIQUES ANALYTIQUES

VII.1. SEPARATION CELLULES - MILIEU

Cette séparation est réalisée par filtration sur membrane de seuil de coupure de 0,2 µm. Des membranes Millipore de 25 mm de diamètre d'acétate de cellulose ont été utilisées pour séparer les cellules du milieu de culture afin de récupérer le filtrat pour analyse. Les échantillons de milieu de culture récupérés de cette manière sont stockés à -20 °C.

VII.2. MESURE DE LA BIOMASSE

VII.2.1. METHODE TURBIDIMETRIQUE

Elle est basée sur la propriété que présente toute solution d'absorber une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite. L'absorbance (DO) mesurée est proportionnelle à la concentration (C) des particules (cellules) en suspension, tant que cette concentration ne dépasse pas un certain seuil. Alors,

$DO = k . C$ avec k le coefficient d'absorption.

La longueur d'onde optimale pour laquelle le milieu Y, dépourvu de cellule absorbe le moins, est de 650 nm et la DO maximale pour laquelle la relation $DO = k . C$ est encore vérifiée correspond à 0,30 unité de DO (Stien 1993). La figure I.4 présente des courbes d'étalonnage des mesures d'absorbance par rapport aux mesures de concentration en biomasse par méthode gravimétrique permettant de déterminer la valeur du coefficient k pour les deux souches utilisées lors de ce travail.

VII.2.2. METHODE GRAVIMETRIQUE

Cette méthode longue et délicate nécessitant des volumes de culture non négligeables a été utilisée pour établir les corrélations entre la densité optique à 650 nm et le poids de cellules sèches pour les deux souches de nos travaux. Les cellules contenues dans 25 ml de

milieu de culture sont retenues sur des membranes de filtration SARTORIUS en acétate de cellulose préalablement tarées, puis sont lavées avec 3 fois le volume filtré d'eau physiologique (NaCl 0,9%). Les membranes sont ensuite mises à l'étuve à 105°C pendant 24 h. Après refroidissement au dessicateur, les membranes sont pesées pour déterminer le poids de cellules sèches présentes initialement dans l'échantillon filtré.

VII.2.3. METHODES DE NUMERATION

- Etalements sur boîte de Pétri

Les numérations ont lieu par étalement de dilutions du milieu de fermentation sur boîtes de Pétri dans lesquelles est coulé du milieu Y gélosé dont le pH est fixé à 6,5. Les prélèvements de milieu de fermentation sont dilués en cascade dans une solution de sérum physiologique. Pour chaque dilution, 0,1 ml de suspension est déposé et étalé sur la surface de la gélose. Trois étalements sont réalisés pour chaque dilution. L'ensemble est incubé à 30 °C pendant deux jours après lesquels un comptage est effectué.

- Numération sur cellule de Thoma

Une cellule de Thoma est une lame sur laquelle sont gravées des lignes délimitant des carreaux de surface connue (0,0025 mm^2) au-dessus de laquelle est placée une lamelle à une hauteur fixée (0,1 mm). Un échantillon dilué du milieu de culture est introduit entre lame et lamelle et les cellules sont comptées au microscope avec un grossissement de 400 X. Le nombre de cellules est alors rapporté au volume dans lequel elles ont été comptées (surface des carreaux x hauteur) pour obtenir le titre cellulaire.

VII.3. MESURE DES CONCENTRATIONS EN LACTOSE ET EN ACIDES ORGANIQUES

Le dosage du lactose et des acides organiques provenant du milieu et du métabolisme des espèces étudiées (acide lactique, acide citrique, acide acétique et acide pyruvique) est réalisé par chromatographie liquide à haute performance. Le dosage des sucres et des acides est réalisé en une seule injection d'un échantillon filtré sur membrane. La séparation des différents composés est effectuée au sein de la colonne polypore H par un mécanisme mixte d'exclusion et d'échange d'ions. En sortie de colonne, deux détecteurs placés en série permettent le suivi des différents composés (réfractomètre différentiel pour le lactose, spectrophotomètre UV à 210 nm pour les acides organiques). Les signaux issus des deux détecteurs sont reçus par une station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma (Biosystèmes). Ce dosage est réalisé hors ligne avec un passeur automatique d'échantillons.

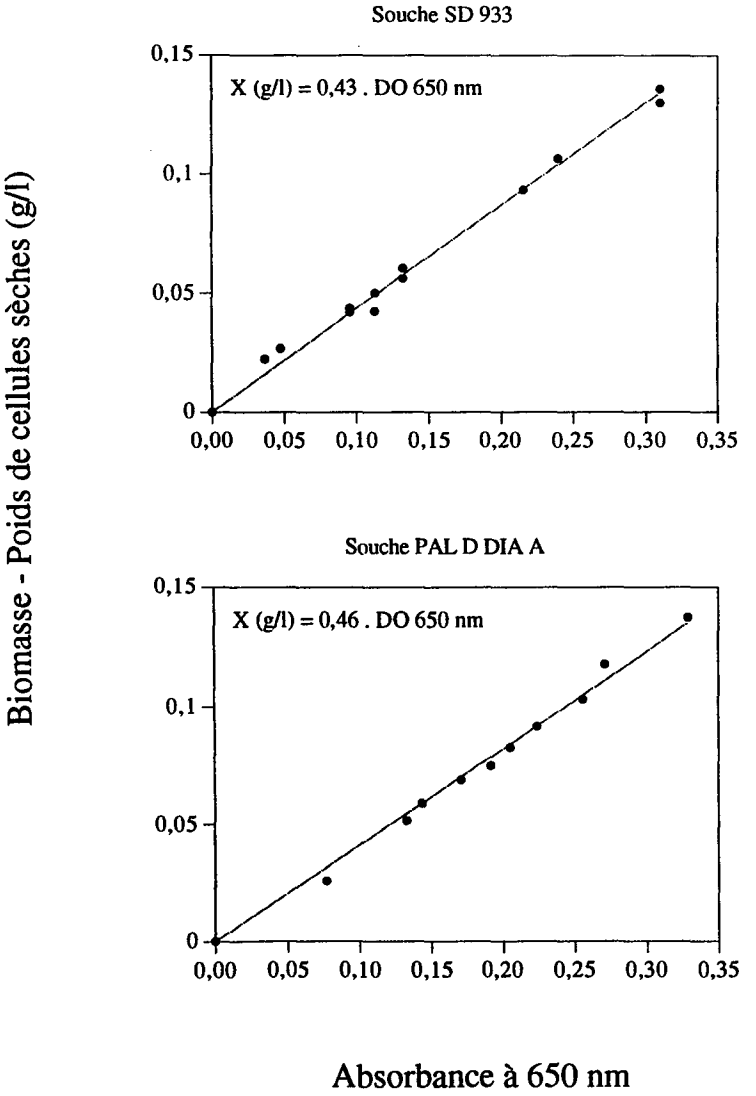


Figure I.4 : exemples de corrélations obtenues sur le milieu Y entre l'absorbance à 650 nm et le poids sec cellulaire des souches SD933 et PAL D DIA A.

Les paramètres utilisés sont les suivants :

volume injecté : 10 µl
éluant : H_2SO_4, 0,04 N
température du four : 65°C
débit de la pompe : 0,9 ml/mn

L'étalonnage est réalisé avec une gamme de solutions aqueuses des cinq acides purs et du lactose. La durée totale d'une analyse complète est voisine de 17 mn. La réponse est linéaire de 0 à 50 g/l pour le lactose, l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide citrique et de 0 à 5 g/l pour l'acide pyruvique.

VII.4. MESURE DES CONCENTRATIONS EN DIACETYLE, EN ACETALDEHYDE ET EN ETHANOL

Le dosage de ces trois molécules est réalisé au moyen d'un échantillonneur de composés volatils à membrane, couplé à une méthode chromatographique en phase gazeuse (Stien, 1993). Le capteur à membrane, mis au point au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, se compose d'une chambre en acier inox intercalée dans l'une des branches d'un tube en U, dans lequel circule un gaz collecteur de molécules volatiles, de l'azote de qualité "R" de l'AIR LIQUIDE (figures I.5 et I.6).

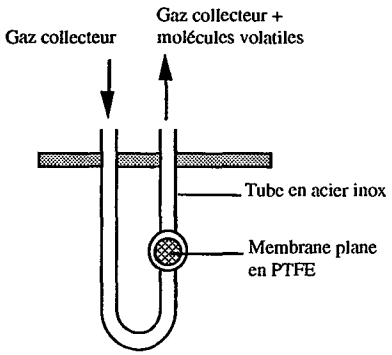


Figure I.5 : Schéma général du capteur à membrane plane (D'après Stien, 1993).

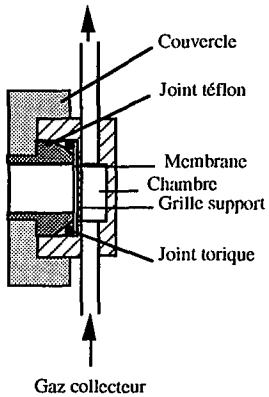


Figure I.6 : Vue en coupe de la chambre (D'après Stien, 1993).

Une membrane microporeuse hydrophobe en polytétrafluoroéthylène pur (épaisseur : 65 µm, seuil de coupure : 0,2 µm) disposée sur une grille métallique permet le transfert des molécules volatiles du milieu de culture vers le gaz collecteur. Les molécules volatiles ainsi "captées" sont entraînées vers le chromatographe en phase gazeuse IGC 121 FL dans

une tubulure métallique chauffée à 60°C pour éviter les phénomènes de condensation et injectées par une vanne d'injection de gaz automatique. Les molécules volatiles, séparées sur la colonne alimentée par de l'azote de qualité U filtré sur cartouche OXYSORB comme gaz vecteur, sont détectées en sortie de chromatographe par deux détecteurs placés en série : un détecteur à capture d'électrons pour le suivi du diacétyle et un détecteur à ionisation de flamme (FID) pour l'acétaldéhyde et l'éthanol.

Les paramètres de fonctionnement sont les suivants :

volume de boucle d'injection : 1 ml
température du circuit de transfert et d'injection : 60 °C
durée de balayage de la boucle d'injection par le gaz vecteur : 15 s
température du four : 100°C
température du détecteur à capture d'électrons : 200 °C
température du détecteur à ionisation de flamme : 220°C
débit de gaz vecteur : 30 ml/mn
débit d'hydrogène (FID) : 30 ml/mn
débit d'air (FID) : 350 ml/mn.

VII.5. MESURE DES CONCENTRATIONS EN ACETOINE ET EN 2,3-BUTANEDIOL

Le dosage de ces deux composés est réalisé au moyen d'une méthode chromatographique en phase gazeuse (Stien, 1993) : un échantillon filtré de fermentation est injecté dans le chromatographe DI 200 qui est entraîné par de l'hélium comme gaz vecteur sur une colonne capillaire ayant une phase stationnaire en carbowax 20 M. L'acétoïne et les deux isomères du 2,3-butanediol sont détectés en sortie de colonne par un FID, la durée totale d'une analyse avoisinant 10 mn. Une séparation correcte de ces molécules est obtenue avec les conditions opératoires suivantes :

volume d'injection : 1 ml
débit de division : 75 ml/mn
débit de fuite : 0,5 ml/mn
température du four : 80°C pendant 1 mn 30
80 à 160°C à 13°C/mn
160°C pendant 30 s
160 à 165°C à 10°C/mn
165°C pendant 15 s
165 à 80°C à 15°C/mn.

VIII. SUIVI DE LA DECARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'α-ACETOLACTATE

VIII.1. MILIEUX REACTIONNELS

La réaction de décarboxylation oxydative de l'α-acétolactate est suivie en anaérobiose dans de l'eau, du milieu de culture Y, du microfiltrat de milieu de culture fermenté et dans des extraits de cellules cultivées dans du milieu Y. Le microfiltrat de culture est obtenu par filtration sous atmosphère d'azote sur cartouche Sartobran. Les extraits cellulaires sont préparés en anaérobiose selon le protocole suivant : les cellules sont traitées pendant 2 h à 25 °C avec du lysozyme à raison de 0,71 g/g de matière sèche. Les cellules sont ensuite séparées du milieu de culture par sédimentation à 8 °C. Après élimination du surnageant, le culot est soumis à un choc osmotique correspondant à l'ajout de 2,5 g/l de NaCl. La lyse totale est contrôlée par observation sur cellule de Thoma.

VIII.2. PREPARATION DE L'α-ACETOLACTATE

500 mg d'éthyl 2-acétoxy-2-méthylacétoacétate sont hydrolysés en α-acétolactate, éthanol et acétate par addition de 2 ml de soude 4 M dans une seringue maintenue sous azote. Après 30 mn de réaction, le mélange est injecté dans le bioréacteur contenant 1 l de milieu réactionnel et où le rendement est évalué par mesure en ligne de la concentration en éthanol.

VIII.3. SUIVI DE LA REACTION

La réaction de décarboxylation oxydative est suivie en ligne par mesure de la concentration en diacétyle. L'éventuelle formation de produits de réduction du diacétyle et de décarboxylation non oxydative de l'α-acétolactate (Acétoïne et 2,3-butanediol) est évaluée par CPG hors ligne.

IX. CALCUL DES PARAMETRES CINETIQUES - FILTRAGE DES VALEURS

Au cours de ce travail, un filtre numérique passe-bas a été employé pour traiter les valeurs brutes mesurées au cours des différentes fermentations mises en œuvre. Mis au point au LSGC (Mosrati *et al.*, 1993), ce logiciel permet de réaliser un filtrage des données cinétiques expérimentales en éliminant le bruit des valeurs brutes, c'est-à-dire l'erreur réalisée sur chaque mesure (erreur due à l'appareillage, aux calibrations, à l'irrégularité de la base de temps...). Ce logiciel permet également de générer, par calcul, des points

intermédiaires aux mesures effectivement réalisées. Enfin, il calcule automatiquement les vitesses instantanées à tout moment t de la fermentation, t étant réel (mesure) ou généré (point intermédiaire). Pour la présentation des résultats, quand le filtre a été employé, les valeurs brutes sont toujours indiquées avec les valeurs filtrées correspondantes.

X. INTERPRETATION DES RESULTATS

Pour chaque culture, les évolutions du pH, de la température, du potentiel rédox, de la quantité de biomasse, des substrats carbonés (lactose, acide citrique) et de nombreux produits (acide lactique, acide acétique, acide pyruvique, acétaldéhyde, éthanol, diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol) ont été suivies. L'ensemble des paramètres cinétiques relatifs à la croissance, à l'utilisation de substrats et à la production de métabolites est déterminé à partir de ces données de base.

X.1. VITESSES ET VITESSES SPECIFIQUES

Si les vitesses de formation de biomasse (X), d'utilisation d'un substrat (S) et de formation d'un produit (P) (exprimées en g/l/h) à l'instant t, sont notées respectivement r_X, r_S et r_P , alors, les vitesses spécifiques à ce même instant sont données par les expressions suivantes :

- vitesse spécifique de croissance : $\mu = \frac{r_X}{X}$

- vitesse spécifique de consommation du substrat Si : $V_S = \frac{r_S}{X}$

- vitesse spécifique de formation du produit Pi : $V_{Pi} = \frac{r_P}{X}$

où X est la concentration de biomasse à l'instant t.

μ, V_S et V_P s'expriment en gramme de biomasse, de substrat ou de produit formé ou consommé par gramme de biomasse et par heure (g/g(X)/h).

X.1.1. CULTURE DISCONTINUE

En fermentation discontinue, il est possible de déterminer les vitesses r_X, r_S et r_P à différents temps t en déterminant les valeurs des tangentes aux courbes de croissance (X = f(t)), d'assimilation de substrat (S = f(t)) et de formation de produit (P = f(t)) à chaque instant t. Cela est parfaitement réalisé par le logiciel de filtrage numérique. Connaissant la valeur de X à chaque instant t, il est alors possible d'évaluer les valeurs de μ, V_S et de V_{Pi}au cours du temps par une division de ces vitesses par la valeur de la concentration en biomasse au même instant t. La détermination des vitesses spécifiques maximales est

réalisée à partir des courbes de vitesses spécifiques obtenues en fonction du temps.

Un autre moyen rapide de détermination de μmax est de tracer la représentation Ln(X) = f(t). En négligeant le décès cellulaire, la pente de la droite obtenue lors de la phase exponentielle de croissance correspond à μmax (figure I.7).

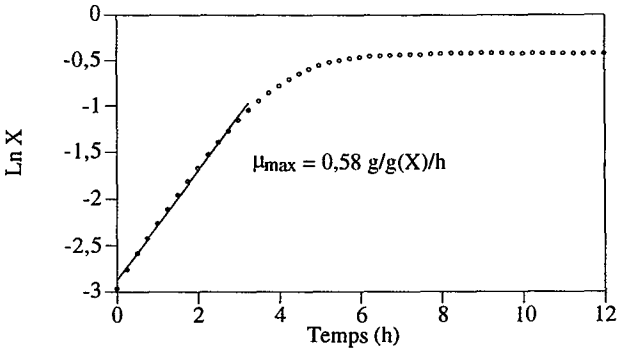


Figure I.7 : détermination de la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) durant la phase exponentielle de croissance d'une fermentation discontinue de la souche PAL D DIA A à pH non régulé.

X.1.2. CULTURE CONTINUE

En fermentation continue simple, avec un débit d'alimentation Q, un volume utile V et des concentrations en substrat S_A et en produits P_A dans le milieu d'alimentation, les équations de bilans en biomasse, substrat et métabolites sur le réacteur à l'état stationnaire permettent d'accéder aisément aux vitesses et vitesses spécifiques de croissance, consommation de substrats et production de métabolites.

Vitesse de production de biomasse : $r_X = \frac{Q}{V} X.$

Vitesse spécifique de production de biomasse : $\mu = \frac{r_X}{X} = \frac{Q}{V}.$

Vitesse de consommation de substrat : $r_S = \frac{Q}{V}(S_A - S).$

Vitesse spécifique de consommation de substrat : $V_S = \frac{Q}{V}\frac{(S_A - S)}{X}.$

Vitesse de production d'un métabolite : $r_P = \frac{Q}{V}(P - P_A)$.

Vitesse spécifique de production d'un métabolite : $V_P = \frac{Q}{V}\frac{(P - P_A)}{X}$.

X.1.3. CULTURE CONTINUE AVEC RECYCLAGE CELLULAIRE

En fermentation continue avec recyclage cellulaire, avec cette fois-ci un débit d'alimentation Q égal à la somme du débit de perméat Q_F et du débit de purge Q_P, une démarche analogue permet de déterminer les différentes vitesses et vitesses spécifiques. La vitesse de production de biomasse et la vitesse spécifique de production de biomasse sont alors exprimées en fonction de Q_P et non de Q, alors que les expressions des vitesses et vitesses spécifiques de consommation de substrat et production de métabolites demeurent identiques par rapport à une culture continue simple.

Vitesse de production de biomasse : $r_X = \frac{Q_P}{V}X$.

Vitesse spécifique de production de biomasse : $\mu = \frac{r_X}{X} = \frac{Q_P}{V}$.

X.2. RENDEMENTS

X.2.1. CULTURE DISCONTINUE

□ Rendements globaux

Les rendements globaux $Y_{X/S}$ et $Y_{P/S}$ sont définis comme les rapports de masse de biomasse (poids de cellules sèches) (X) ou de métabolites formés (P) par la masse de substrat carboné consommé (S) depuis le début de la fermentation :

$$Y_{X/S} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \qquad Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)}$$

où X_0, S_0 et P_0 sont les concentrations initiales en biomasse, en substrat et en produit définies au départ des cultures.

❐ Rendements instantanés

Cependant, ce type de rendement global ne permet pas de révéler d'éventuelles variations instantanées. C'est pourquoi, il est préférable de recourir au calcul de rendements instantanés. Ces rendements sont accessibles graphiquement par les tracés de $X = f(S)$ et $Pi = f(S)$. La pente des courbes est égale au rendement à l'instant t correspondant. Les rendements instantanés $Yi_{X/S}$ et $Yi_{P/S}$ peuvent aussi être obtenus en effectuant le rapport de des vitesses instantanées respectives obtenues avec le logiciel de filtrage :

$$Y_{iX/S} = \frac{r_X}{r_S}$$

et

$$Y_{iP/S} = \frac{r_P}{r_S}.$$

X.2.2. CULTURE CONTINUE

En réacteur continu à l'état stationnaire, les rendements $Y_{X/S}$ et $Y_{P/S}$ sont établis comme les rapports de masse de biomasse X ou de métabolites formés ($P - P_A$) par la masse de substrat carboné consommé ($S_A - S$) depuis le début de la fermentation :

$$Y_{X/S} = \frac{X}{(S_A - S)} \qquad Y_{P/S} = \frac{(P - P_A)}{(S_A - S)}.$$

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. TAXONOMIE DES BACTERIES LACTIQUES 37

I.1. Taxonomie des souches utilisées dans ce travail 37

II. METABOLISMES ET BESOINS NUTRITIONNELS 40

II.1. Métabolismes carbonés 40
II.1.1. Métabolisme du lactose 41
II.1.1.1. Transport 41
II.1.1.2. Catabolisme 42
II.1.1.3. Régulation du métabolisme du lactose 44
II.1.1.4. Génétique 45
II.1.2. Métabolisme de l'acide citrique 46
II.1.2.1. Transport et clivage de l'acide citrique 47
II.1.2.2. Catabolisme de l'acide pyruvique 49
II.2. Obtention de souches surproductrices de diacétyle 56
II.2.1. Sélection de mutants à capacité de production améliorée 56
II.2.2. Développement de souches surproductrices par ingénierie métabolique 57
II.2.3. Limites de l'utilisation de mutants spontanés ou de souches modifiées génétiquement 58
II.3. Métabolisme de l'oxygène chez les lactocoques 59

III. MODES DE MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 61

III.1. Introduction 61
III.2. Culture en réacteur parfaitement agité 62
III.3. Culture sous forme immobilisée 64
II.3.1. Introduction 64
II.3.2. Modes d'immobilisation cellulaire 65
II.3.3. Domaines d'application de l'immobilisation cellulaire 67
III.4. Fermentation extractive 68
III.4.1. Introduction 68
III.4.2. Domaines d'application 69

I. TAXONOMIE DES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques, du fait de leur importance pour la conservation et la transformation des aliments, ont, très tôt, suscité l'intérêt des microbiologistes. Cet intérêt s'est, entre autres, traduit par la nécessité d'en répertorier et classer les différentes souches. Ainsi, une première classification basée sur des critères morphologiques et physiologiques est apparue dès 1919 avec les travaux d'Orla-Jensen. Cette classification faisait au départ la distinction entre deux groupes de bactéries lactiques : le groupe homofermentaire et le groupe hétérofermentaire. Le groupe homofermentaire rassemblait les bactéries qui ne forment que des traces de produits accessoires à côté de l'acide lactique, qui représente 90 à 97% du lactose catabolisé. Le groupe hétérofermentaire rassemblait des bactéries qui forment moins d'acide lactique en raison de la production, à partir du lactose consommé, d'autres acides, de substances diverses et de CO_2. Au sein des deux groupes, les bactéries étaient ensuite réparties en sous-groupes en fonction de critères morphologiques et physiologiques (Dellaglio *et al.*, 1994).

La taxonomie bactérienne a depuis lors évolué au fil des progrès en biochimie, immunologie, biologie moléculaire et à l'heure actuelle principalement en génétique (Novel, 1991; Kersters *et al.*, 1991; Gasser *et al.*, 1994). En effet, il est maintenant admis que le critère de référence pour les comparaisons entre souches doit être la séquence désoxyribonucléotidique complète permettant de déterminer la phylogénèse dont découle la taxonomie (Wayne *et al.*, 1987; Schleifer *et al.*, 1991). La prise en compte de ces nouveaux critères a clairement montré que les différents genres bactériens regroupés sous l'appellation "bactéries lactiques" ne forment pas une entité homogène. En effet, bien que les différents genres composant les bactéries lactiques appartiennent au phylum des bactéries à Gram positif, ils sont répartis dans des subdivisions très différentes : celle des clostridia et celle des actinomycètes. En conséquence, l'appellation bactérie lactique, bien que présentant un caractère pratique évident, n'a pas de signification taxonomique.

I.1. TAXONOMIE DES SOUCHES UTILISEES DANS CE TRAVAIL

En se référant à la classification du Bergey's Manual (Holt *et al.*, 1994), les souches mises en œuvre dans le cadre de ce travail (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) appartiennent à la catégorie II de la classification bactérienne générale, qui regroupe les eubactéries Gram positives à paroi cellulaire. Dans cette catégorie, elles font partie de la subdivision II (coques microaérophiles et anaérobies facultatives présentes en paires, tétrades, chaînettes ou agrégats) du groupe 17 (coques gram positives). Elles appartiennent au genre *Lactococcus*, établi en 1985 par Schleifer *et al.* regroupant les streptocoques lactiques mésophiles et certains lactobacilles. Antérieurement, les lactocoques étaient classés comme appartenant au genre *Streptococcus* en tant que

streptocoques lactiques mésophiles du lait appartenant au groupe sérologique "N" (Garvie, 1984). Les souches aromatisantes considérées avaient alors la dénomination de *Streptococcus diacetylactis*. Les principaux caractères de l'espèce utilisée lors de nos travaux sont reportés dans les tableaux II.1 et II.2.

Arrangement prédominant des cellules	Paires et courtes chaînes
Mode de fermentation des sucres	Homofermentaire
Configuration de l'acide lactique formé	L (+)
Production de diacétyle	+
Fermentation du citrate	+
Groupe sérologique	N
% G+C dans l'ADN	34 à 36 %
Acides téichoïques dans la paroi cellulaire	+
Peptidoglycane :	
Position 1	Ala
Position 2	Lys
Pont interpeptidique	D-Asp, Gly-Ala, Ser-Ala, Thr-Ala
Ménaquinone dominant	MK 9
Croissance à 10 °C	+
Croissance à 37 °C	+
Croissance à 45 °C	+
Croissance à pH 9,6	-
Croissance avec 2 % de NaCl	+
Croissance avec 4 % de NaCl	+
Croissance avec 6,5 % de NaCl	-
Production de NH_3 à partir d'arginine	+
Réduction rapide du lait tournesolé	+
Hydrolyse :	
Esculine	+
Hippurate	+
Production :	
Arginine dihydrolase	+
α-galactosidase	-
β-galactosidase	-
β-glucuronidase	-
Leucine arylamidase	+
Phosphatase alcaline	-

Tableau II.1 : principaux caractères distinctifs de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (D'après Holt *et al.*, 1994 et Dellaglio *et al.*, 1994).

Substrat	Utilisation	Substrat	Utilisation
Adonitol	-	Mélibiose	-
Amidon	v	Mélézitose	-
L-arabinose	-	α-méthyl-D-glucoside	-
Amygdaline	v	α-méthyl-D-mannoside	-
Arbutine	+	Raffinose	-
Cellobiose	+	Rhamnose	-
Fructose	+	Ribose	+
Galactose	+	Salicine	+
β-gentiobiose	+	L-sorbose	-
Glucose	+	Sorbitol	-
Glycérol	-	Saccharose	v
Glycogène	-	Tréhalose	+
Inuline	v	D-tagatose	-
Lactose	+	D-turanose	-
Maltose	+	D-xylose	v

Tableau II.2 : profil fermentaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (D'après Holt *et al.*, 1994). v : utilisation variable.

Acides aminés		**Vitamines**	
Lysine	-	Vitamine B12	+
Leucine	+	Biotine	+
Histidine	+	Niacine	+
Valine	+	Pantothénate	+
Cystéine	s	Riboflavine	+
Acide aspartique	nc	Thiamine	+
Acide glutamique	+	Pyridoxal	+
Isoleucine	+	Acide folique	+
Tyrosine	nc	**Acides nucléiques**	
Méthionine	+	Hypoxanthine	-
Phénylalanine	v	Adénine	-
Proline	v	Guanine	-
Acides organiques		Thymine	-
Acide acétique	+	Thymidine	-
Acide oléique	+	Uracile	-

+ essentiel pour la croissance; - non essentiel pour la croissance; v exigence variable selon les souches; s action stimulante sur la croissance; nc non connu.

Tableau II.3 : besoins nutritionnels de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (D'après Marshall et Law, 1984; Pettersson, 1988; Stien, 1993; Desmazeaud, 1994).

II. METABOLISMES ET BESOINS NUTRITIONNELS

Les genres bactériens regroupés sous l'appellation bactéries lactiques, de par leur faible aptitude biosynthétique, peuvent être considérés comme les plus exigeants du point de vue nutritionnel. Ils requièrent, pour leur croissance, non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi, des catalyseurs comme certaines vitamines et des oligoéléments (Marshall et Law, 1984). En ce qui concerne *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, les différents besoins connus sont répertoriés dans le tableau II.3.

Dans le cadre de nos travaux, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a été cultivé principalement dans un milieu semi-défini riche, en condition de limitation en substats carbonés. En conséquence, la suite de ce chapitre sera principalement consacrée à l'utilisation des sources carbonées par les lactocoques. Néanmoins, il faut garder à l'esprit les interactions pouvant exister entre flux métaboliques provenant de l'utilisation des sources azotées et carbonées (Loubière *et al.* 1996). De plus, les effets importants de l'oxygène sur les flux carbonés justifient la description du métabolisme de l'oxygène clôturant cette partie consacrée au métabolisme de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

II.1. METABOLISMES CARBONES

Les composés carbonés fermentescibles majeurs du lait, métabolisables par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sont au nombre de deux. La source principale de carbone et d'énergie est le lactose, disaccharide formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose encore appelé [O-ß-D-galactopyranosyl-(1->4)-ß-D-glucopyranose] dont la concentration dans le lait varie de 4 à 5% (Cogan, 1980; Desmazeaud, 1994). Le catabolisme de ce sucre par les lactocoques en mode homofermentaire est à l'origine de la production de quantités élevées d'acide lactique de forme lévogyre représentant au moins 90 % du lactose métabolisé (Gottschalk, 1986).

L'autre substrat carboné du lait, métabolisé par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* est l'acide citrique. Présent sous forme saline à une concentration comprise entre 1,2 et 2,2 g/l (Desmazeaud, 1994), ce composé est d'une importance capitale pour la formation des molécules aromatisantes simples participant à l'arôme final de nombreux produits laitiers fermentés.

Nous allons maintenant présenter l'état des connaissances concernant le transport et l'utilisation de ces deux substrats carbonés par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

II.1.1. METABOLISME DU LACTOSE

II.1.1.1. Transport

Chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, le transport actif du lactose à travers la membrane cellulaire met principalement en jeu un système phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle le lactose aux dépens du phosphoénolpyruvate ou PEP (de Vos et Vaughan, 1994). Le lactose est phosphorylé au cours de ce transport et apparaît dans la cellule sous forme de glucosyl-ß-(1,4)-galactoside-6P (ou lactose-6-phosphate). Ce système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS-PEP) a été mis en évidence et étudié par McKay *et al.* (1969) et Thompson (1979) chez les lactocoques (Figure II.1). Il comprend des éléments d'usage général pour le transport des glucides tels que l'enzyme EI et la protéine thermostable transporteuse de phosphate HPr. La spécificité envers le glucide est apportée par la protéine EII et le facteur EIII. Cette protéine et ce facteur sont aussi connus sous l'appellation enzyme $IIBC^{la}$ et enzyme IIA^{la} dans la nomenclature uniformisée des systèmes phosphotranférasiques proposée par Saier et Reizer (1992). Dans le cas du système Lactose-PT, EII^{lac} et $EIII^{lac}$ sont induites en présence de lactose alors que les protéines de fonctionnement général EI et HPr sont constitutives (Cogan, 1980).

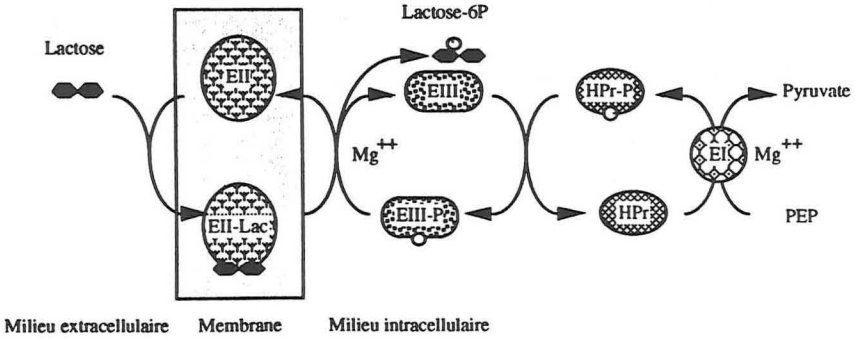


Figure II.1 : transport du lactose chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* par le système phosphotransférase phosphoénol dépendant.

Un deuxième système de transport actif mettant en œuvre une perméase dépendante de la force proton-motrice (symport lactose : H^+) a lui aussi mis en évidence par McKay *et al.* (1969) et Thompson (1979). Par l'intermédiaire de ce système, le lactose pénètre à l'intérieur des cellules sous forme non phosphorylée en même temps qu'un proton (de Vos et Vaughan, 1994).

II.1.1.2. Catabolisme

Le catabolisme du lactose est lié à son mode de transport. Suivant les cas, le lactose intracellulaire peut se présenter sous forme phosphorylée ou non, avec intervention d'une enzyme spécifique pour chaque forme pour la catalyse la première étape du catabolisme.

Chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, le lactose-phosphate ayant pénétré dans la cellule par le système PTS est hydrolysé en glucose et en galactose-6-phosphate par la phospho-β-galactosidase (ou β-D-phosphogalactoside galactohydrolase) (Johnson et McDonald, 1974; Kandler, 1983; Konings *et al.*, 1994). A cette activité enzymatique prédominante s'adjoint fréquemment une seconde activité β-galactosidase ou β-D-galactoside galactohydrolase beaucoup plus faible hydrolysant le lactose ayant pénétré par le système perméasique dépendant de la force proton-motrice (De Roissart, 1986; Desmazeaud et de Roissart, 1994). Le glucose libéré par la phospho-β-galactosidase et la β-galactosidase est dégradé suivant la voie glycolytique de Embden-Meyerhof-Parnas (Voie EMP) encore appelée voie des hexoses-diphosphates (Cogan, 1980; Kandler, 1983; De Roissart, 1986; Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Le galactose-6-phosphate issu de l'hydrolyse du lactose-6-phosphate emprunte la voie du tagatose-6-phosphate qui rejoint la voie EMP au niveau des trioses phosphates : glycéraldéhyde-3-phosphate et dihydroxyacétone-phosphate (Bisset et Anderson, 1974). Le galactose libéré par l'action de la β-galactosidase est phosphorylé par une kinase spécifique et métabolisé suivant la voie de Leloir avant de rejoindre la glycolyse (Thompson et Gentry-Weeks, 1994; Grossiord et de Vos, 1997). Le produit terminal de la fermentation du lactose est l'acide lactique (Cogan, 1980; Garvie, 1980; Kandler, 1983). Le gradient de concentration en lactate entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est utilisé pour la co-excrétion de deux protons en même temps qu'une molécule de lactate (Konings *et al.* 1994). Les voies cataboliques du lactose chez l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sont présentées dans la figure II.2.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* est aussi capable de fermenter les pentoses et possède la plupart des enzymes de la voie des pentoses phosphates, en particulier, la phosphocétolase inductible par les pentoses. Sous induction, la fermentation des pentoses chez les lactocoques homofermentaires emprunte les mêmes voies métaboliques que chez les bactéries lactiques hétérofermentaires, conduisant à la formation de quantités équimolaires d'acides lactique et acétique. La fermentation des pentoses chez les lactocoques est donc hétérofermentaire (Kandler, 1983). Toutefois, en présence de glucose ou de lactose, l'activité des enzymes de la voie des pentoses phosphates est très faible. Elle ne servirait qu'à couvrir les besoins des lactocoques en pentoses pour la synthèse des nucléotides ou du NADPH nécessaire à la synthèse des acides gras (Desmazeaud, 1983).

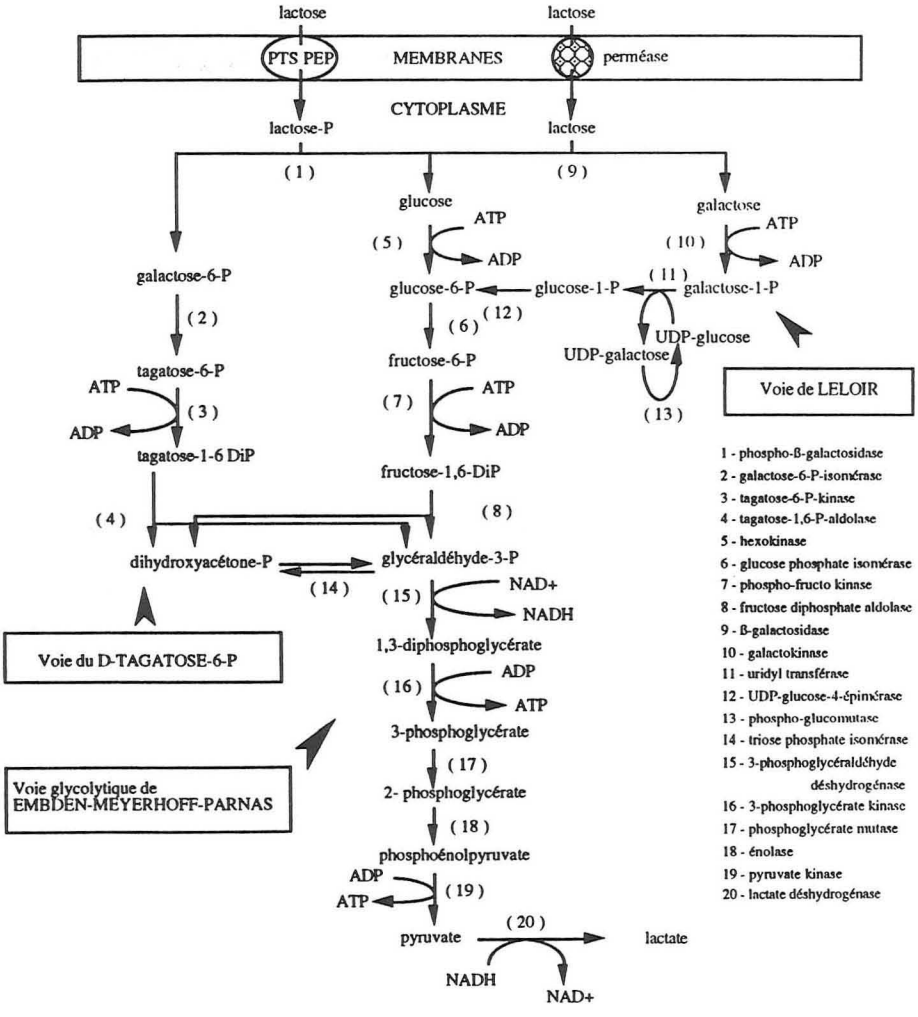


Figure II.2 : transport et catabolisme du lactose chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (d'après Bisset et Anderson, 1974; Cogan, 1980; Desmazeaud, 1983; Moat, 1985; Stien, 1993; Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

II.1.1.3. Régulation du métabolisme du lactose

La régulation du métabolisme du lactose chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* peut être effectuée via deux grands types de mécanismes (Weil *et al.*, 1990) :

- la répression ou l'induction de la synthèse d'enzymes inductibles,
- la modification du niveau d'activité des enzymes synthétisées par activation ou inhibition.

Au niveau de la régulation de l'activité des enzymes du cycle PT-glycolyse de transport et d'utilisation du lactose, quatre protéines sont principalement impliquées : la protéine transporteuse de phosphate HPr, l'HPr kinase, la pyruvate kinase (PK) et la lactate déshydrogénase (LDH).

La capacité de la protéine HPr à transporter les groupements phosphate est inhibée, en présence d'excès glucidique, par phosphorylation de la fonction hydroxyle du résidu sérine 46 (Ye et Saier, 1996). Ce type d'inhibition permet de moduler le flux de carbone entrant dans la cellule.

L'HPr kinase et la pyruvate kinase sont activées par l'intermédiaire de la glycolyse fructose-1,6-di phosphate (FDP) et inhibées par le phosphate inorganique (Pi) (Thomas, 1976). Lors d'un afflux glucidique important, la concentration en FDP augmente et celle en Pi diminue, d'où une augmentation de l'activité PK pour faire face à ce flux carboné dans la glycolyse. L'HPr kinase est elle aussi activée et diminue l'activité HPr en phosphorylant cette protéine, ce qui permet de contrôler le flux de lactose pénétrant dans la cellule. En limitation glucidique, la concentration en Pi est élevée et celle en FDP est faible. Il en résulte une activité PK faible avec accumulation de PEP et de ses deux précurseurs (Thompson, 1987). Ce fort potentiel PEP doit permettre, d'une part, à la cellule de survivre en lui apportant l'énergie nécessaire à sa maintenance, et, d'autre, part de métaboliser rapidement une source glucidique apparaissant dans le milieu par l'intermédiaire du système phosphotransférasique PEP dépendant. En effet, dans de telles conditions, du PEP est présent pour faire fonctionner le système PT et, du fait de la faible activité HPr kinase, l'HPr est présente majoritairement sous forme non phosphorylée active. Ainsi, cette double régulation au niveau du transport du lactose et de son catabolisme permet de contrôler le flux carboné provenant du lactose dans la cellule.

La quatrième enzyme intervenant dans cette régulation est la lactate déshydrogénase. Cette enzyme allostérique est activée soit par le FDP, soit par le tagatose-1,6-diphosphate (TDP) (Marshall et Law, 1984). Ce mécanisme de régulation permet d'adapter l'activité LDH au flux glycolytique en évitant l'accumulation de pyruvate et sa réorientation vers d'autres voies métaboliques (Thomas, 1976). La glycolyse peut, de cette manière, correctement se poursuivre puisque les coenzymes réduits NADH + H^+ sont réoxydés en NAD^+ et peuvent donc être de nouveau utilisés dans la chaîne glycolytique (Cogan, 1980).

Plus récemment, Garrigues *et al.* (1997) ont proposé l'existence d'un autre mécanisme de régulation et d'orientation du flux carboné par l'intermédiaire du rapport NADH + H^+/NAD^+ à partir d'expérimentations menées sur la souche *Lactococcus lactis* NCDO 2118. Lorsque le flux glycolytique est élevé, le rapport NADH + H^+/NAD^+ augmente, ce qui lève la régulation de la LDH et inhibe la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). L'accumulation de trioses phosphate qui en découle inhibe la pyruvate formate lyase ou PFL (figure II.5), d'où l'orientation du flux carboné vers la LDH et l'obtention d'un profil homofermentaire. En faible flux carboné, la PFL est relaxée et entre en compétition avec la LDH pour l'utilisation du pyruvate, avec apparition d'un profil fermentaire acide mixte. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés par des études sur des souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

II.1.1.4. Génétique

Chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, les gènes codant pour la perméation spécifique du lactose par le système lac-PT et l'utilisation du lactose-6-P sont localisés au niveau plasmidique (Thompson et Gentry-Weeks, 1994; Nechaeva et Sukhodolets, 1996). L'instabilité génétique qui en résulte est à l'origine des irrégularités d'acidification parfois observées avec ce type de souche (McKay *et al.* 1972; Anderson et McKay, 1977; Kempler et McKay, 1979b; Foucaud et Hemme, 1990). Ces éléments génétiques localisés sur un même opéron du plasmide lac sont :

- le gène lac R codant pour la protéine-répresseur Lac R,
- les gènes lac FEG codant pour le transport spécifique du lactose par la système phosphotransférase et l'hydrolyse du lactose-6-P avec :
  - lac F codant pour le phosphotransporteur $EIII^{lac}$,
  - lac E codant pour le transporteur de lactose EII^{lac},
  - lac G codant pour la phospho-β-galactosidase,
- les gènes lac ABCD des enzymes de la voie du tagatose-6-phosphate :
  - lac A et B codant pour la galactose-6-phosphate isomérase multimérique,
  - lac C pour la tagatose-6-phosphate kinase
  - lac D pour la D-tagatose-1,6-diphosphate aldolase,
- le gène lac X codant pour une protéine inconnue.

L'organisation de cet opéron est reportée dans la figure II.3.

La régulation de l'opéron se fait de la façon suivante : la protéine Lac R est exprimée de façon constitutive et se fixe sur la région opératrice de l'opéron en réprimant l'expression des autres gènes lac. En présence de lactose ou de galactose-6-phosphate, un inducteur est formé. Celui-ci interagit avec Lac R, empêchant son interaction avec

l'opérateur. La transcription des gènes de l'opéron lactose devient alors possible (de Vos et Vaughan, 1994).

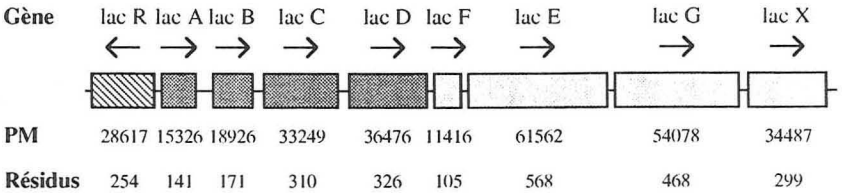


Figure II.3 : organisation de l'opéron lactose (D'après De Vos et Vaughan, 1994; Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

II.1.2. METABOLISME DE L'ACIDE CITRIQUE

Le métabolisme de cette seconde source de carbone du lait qu'est l'acide citrique joue un rôle important, technologiquement parlant, en apportant un large éventail de métabolites autres que l'acide lactique dans de nombreuses fermentations alimentaires (Diviès *et al.*, 1994; Paquot *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1994). En particulier, le diacétyle et l'acétaldéhyde sont particulièrement recherchés pour les qualités organoleptiques qu'ils confèrent aux produits fermentés (Dumont et Adda, 1978; Alais, 1984; Heath et Reineccius, 1986; Marshall, 1987; Lemoine, 1991; Welsh, 1994).

D'un point de vue physiologique, le métabolisme du citrate permet à la cellule d'assurer des fonctions essentielles telles que la régénération de coenzymes d'oxydo-réduction ou la production d'énergie (Harvey et Collins, 1963a; Marshall et Law, 1984; Hugenholtz, 1993). Toutefois, l'implication de l'acide citrique dans la croissance cellulaire est à l'heure actuelle sujette à controverses (Hugenholtz, 1993) : certains auteurs (Collins, 1972; Jönsson et Petterson, 1977; Kempler et McKay, 1981; Cogan, 1981) affirment que le citrate ne participe pas à la croissance chez les lactocoques au vu de l'absence de croissance de ces bactéries sur acide citrique comme seule source énergétique contrairement à d'autres auteurs qui ont observé soit une stimulation de la croissance par ajout de citrate dans un milieu de culture contenant déjà un sucre fermentescible soit une croissance sur citrate comme seule source d'énergie (Starrenburg et Hugenholtz, 1991; Cogan, 1981 et 1987; Schmitt et Diviès, 1991; Stien, 1994).

Le métabolisme de ce substrat peut être décomposé en plusieurs phases (Gottschalk, 1986; Hugenholtz, 1993; Diviès, 1994) : le transport actif à travers la membrane cellulaire, le clivage de l'acide citrique en acétate, dioxyde de carbone et pyruvate et enfin l'orientation du pyruvate vers les voies de la lactate déshydrogénase, de la pyruvate-formate lyase (PFL), de la pyruvate déshydrogénase (PDH) ou de la production des molécules en C4 que sont le diacétyle, l'acétoïne et le 2,3-butanediol (Figures II.4, II.5, II.6 et II.7).

II.1.2.1. Transport et clivage de l'acide citrique

Les différentes étapes de transport et de clivage de l'acide citrique en acide pyruvique et dioxyde de carbone sont présentées dans la figure II.4.

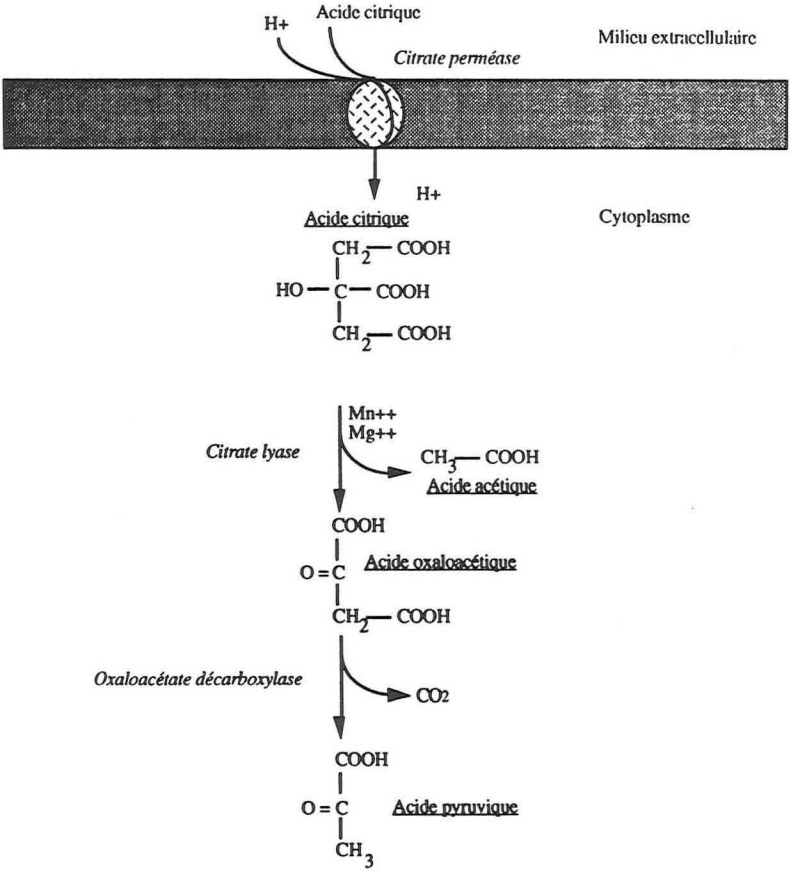


Figure II.4 : transport et clivage du citrate en CO_2, acétate et pyruvate (D'après Stien, 1993).

La première étape du métabolisme du citrate est son transport dans la cellule. Cette étape constitue le premier point de régulation du métabolisme du citrate (Hugenholtz, 1993). La pénétration de l'acide citrique à l'intérieur de la cellule a lieu par un mécanisme de transport actif faisant intervenir une protéine spécifique inductible, la citrate perméase (Harvey et Collins, 1962). Cette perméase ne modifie pas chimiquement l'acide citrique mais assure son accumulation dans le cytoplasme. Cette enzyme co-transporte la forme

divalente du citrate et un proton selon un mécanisme michaëlien de réaction à deux substrats avec fixation au hasard dont l'étape limitante est la formation du complexe ternaire perméase-citrate-proton (Cachon *et al.*, 1995). Cette enzyme est fonctionnelle aux pH acides avec une étroite zone optimale entre pH 4,5 et 5,5 et quasi inactive à pH neutre (Harvey et Collins, 1962). La citrate perméase est codée par le gène cit P de l'opéron cit QRP situé sur le plasmide citrate de 7,9 Kb. La perte de ce plasmide se traduit par l'incapacité pour la bactérie de transporter l'acide citrique au travers de sa membrane (Kempler et McKay, 1979a et 1981; Davies et Gasson, 1981). Néanmoins, l'instabilité du métabolisme du citrate due à la perte du plasmide en absence de citrate semble être moins importante que celle due à la perte du plasmide lactose en absence de ce substrat dans le milieu (Smith *et al.*, 1992). La production de la citrate perméase ou protéine Cit P est induite par acidification du milieu et réprimée par le produit du gène cit R. La régulation de la synthèse de la citrate perméase peut provenir au niveau post-transcriptionnel sur l'ARNm de cit QRP : une compétition a lieu entre la traduction du messager et son clivage par des ribonucléases (endoribonucléase III et 3'-5' polynucléotide phosphorylase) au niveau de structures secondaires. Ainsi, les cinétiques de formation de ces structures secondaires et de traduction permettent-elles de contrôler le niveau d'expression de la citrate perméase (Lopez *et al.*, 1997).

Une fois à l'intérieur de la cellule, l'acide citrique est scindé en acide acétique et en acide oxaloacétique par la citrate-lyase (ou citritase). Cette enzyme est constitutive chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Harvey et Collins, 1961; Cogan, 1981; Mellerick et Cogan, 1981). Son pH optimum est voisin de 7,5, et la présence des cations Mn^{++} et Mg^{++} est favorable à son activité (Harvey et Collins, 1961). Cette enzyme est constituée des trois sous-unités suivantes :

α : citrate : acétyl-ACP transférase,

β : citryl-S-ACP lyase,

γ : protéine transporteuse de groupement acyle (ACP).

L'activité de l'enzyme est activée par modification covalente sous l'action d'une citrate-lyase-ligase (Bowien et Gottschalk, 1977). La citrate lyase ligase acétyle le groupement prosthétique de la citryl-S-ACP lyase initialement inactive en acétyl-citryl-S-ACP lyase active (Harvey et Collins, 1963b; Kümmel *et al.*, 1975; Diviès *et al.*, 1994; Bekal *et al.*, 1997).

L'acide acétique formé est soit excrété, soit orienté vers la synthèse d'acétyl-CoA par l'acétate kinase puis la phospho trans-acétylase avec consommation d'une molécule d'ATP (figures II.5 et II.6). Au cours de l'étape suivante, l'acide oxaloacétique est converti en CO_2 et en acide pyruvique par une oxaloacétate-décarboxylase (Harvey et Collins, 1961 et 1962; Collins, 1972; Cogan, 1980; Kempler et McKay, 1981; Ramos *et al.*, 1994). Cette enzyme intracellulaire a un pH optimum de 7 mais sa forme, constitutive ou inductible est encore inconnue (Diviès *et al.*, 1994).

II.1.2.2. Catabolisme de l'acide pyruvique

L'acide pyruvique occupe une position clé dans le métabolisme général des bactéries lactiques. Cet acide a trois origines essentielles. D'abord, le métabolisme des sucres, ensuite, le métabolisme de l'acide citrique, enfin, et beaucoup plus modestement, le métabolisme de certains acides aminés (Lees et Jago, 1978; Desmazeaud et de Roissart, 1994; Monnet et Gripon, 1994; Thompson et Gentry-Weeks, 1994; Loubière *et al.*, 1996). Au niveau catabolique, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* dispose de plusieurs voies pour dégrader ce composé :

- la lactate déshydrogénase pour la formation de L(+) lactate,
- la pyruvate-formate lyase pour la production de formate, acétate, acétaldéhyde et éthanol, via l'acétyl-coenzyme A,
- le complexe pyruvate déshydrogénase, avec synthèse de dioxyde de carbone, acétate, acétaldéhyde et éthanol, ici encore via l'acétyl-coenzyme A,
- la formation des composés en C4 à partir de l'α-acétolactate synthétase (ALS) ou de la pyruvate décarboxylase (PDC).

□ Catabolisme du citrate par la lactate déshydrogénase

En conditions fermentaires normales, avec un sucre fermentescible (lactose ou glucose) comme unique source de carbone, en absence d'accepteurs d'électrons extérieurs au métabolisme cellulaire, la formation d'acide lactique est la voie métabolique principale d'utilisation de l'acide pyruvique (Desmazeaud et de Roissart, 1994; Thompson et Gentry-Weeks, 1994). En effet, elle constitue la dernière étape de la glycolyse par laquelle le NADH + H^+ formé lors de la dégradation du glucide est réoxydé en acide lactique. Cette dernière réaction de régénération du NAD^+ est indispensable à la poursuite de la fermentation des sucres par les bactéries lactiques (Harvey et Collins, 1961; Anders *et al.*, 1970; Collins, 1972; Garvie, 1980). En dépit de l'existence de quelques autres accepteurs d'électrons dans les cellules, l'acide pyruvique reste donc peu disponible dans ces conditions pour permettre l'expression d'autres voies métaboliques, le mode de régulation de la lactate déshydrogénase maintenant la concentration intracellulaire d'acide pyruvique à un niveau très bas (Thomas, 1976; Marshall et Law, 1984). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* présente donc dans de telles conditions un comportement homolactique.

Toutefois, dans certaines conditions de fermentation telles que la présence d'un deuxième substrat carboné de niveau d'oxydation élevé comme l'acide citrique, et donc dégradé sans production de NADH + H^+, ou la présence d'un accepteur d'électrons, l'acide pyruvique s'accumule sans nécessité de régénérer du NAD^+ (Hugenholtz, 1993). Le pyruvate toxique pour la cellule et non nécessaire à la réoxydation des cofacteurs NADH +

H^+ et à la synthèse de matériel cellulaire va être transformé en molécules moins toxiques et, le cas échéant, en énergie. En conséquence, des voies métaboliques autres que celles de la lactate déshydrogénase peuvent être empruntées (Ramos *et al.*, 1994). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* adopte alors un comportement fermentaire décrit précédemment chez *Streptococcus faecalis* par Lindmark *et al.* (1969) et chez *Streptococcus mutans* par Takahashi *et al.* (1982) comme étant de type "acide mixte" (Hugenholtz, 1993).

❒ Catabolisme du pyruvate par la pyruvate-formate lyase

Le catabolisme du pyruvate par la pyruvate-formate lyase est la seconde voie pouvant être empruntée par le pyruvate. Cette enzyme transforme l'acide pyruvique en acide formique et en acétyl-coenzyme A (Diviès *et al.*, 1994). L'acétyl-coenzyme A constitue le précurseur de l'acide acétique, l'acétaldéhyde et l'éthanol (Figure II.5).

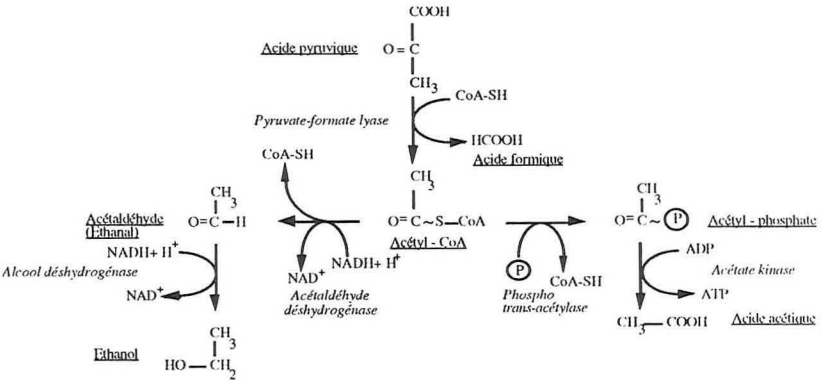


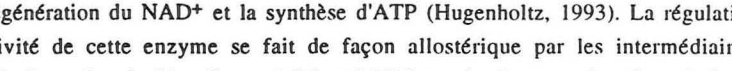
Figure II.5 : devenir du pyruvate métabolisé au niveau de la pyruvate-formate lyase (D'après Stien, 1993).

La production d'acide acétique est accompagnée par la production équimolaire d'ATP selon le bilan réactionnel suivant :

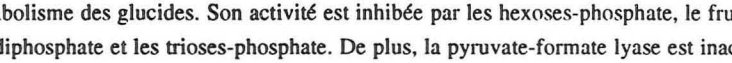
Pyruvate + ADP + P_i → Acétate + Formate + ATP.

Cette voie peut donc constituer une source additionnelle d'énergie pour la cellule. Il faut noter que les réactions de production d'acide acétique à partir d'acétyl-coenzyme A sont réversibles et que l'acide acétique produit peut, les conditions de culture évoluant, être reconsommé pour servir de source d'acétyl-coenzyme A (Collins et Bruhn, 1970; Speckman et Collins, 1973). Ce mécanisme coûteux en énergie est normalement peu important, sauf en cas de carence du milieu en acide lipoïque (Collins, 1972).

Les formations d'acétaldéhyde et d'éthanol s'accompagnent, quant à elles, de la régénération de NAD^+ suivant les stœchiométries indiquées ci-dessous :



Pyruvate + NADH + H^+ → Acétaldéhyde + Formate + NAD^+



Pyruvate + 2 NADH + H^+ → Ethanol + Formate + 2 NAD^+.

Cette gamme de produits formés par le catabolisme du pyruvate par la pyruvate-formate lyase permet à la cellule d'assurer des fonctions métaboliques essentielles que sont la régénération du NAD^+ et la synthèse d'ATP (Hugenholtz, 1993). La régulation de l'activité de cette enzyme se fait de façon allostérique par les intermédiaires du métabolisme des glucides. Son activité est inhibée par les hexoses-phosphate, le fructose-1,6-diphosphate et les trioses-phosphate. De plus, la pyruvate-formate lyase est inactive à faible saturation en oxygène. Son pH optimal est voisin de 6 (Kandler, 1983; De Roissart, 1986; Condon, 1987; Divès *et al.*, 1994). En conséquence, l'activité de cette enzyme est faible quand le flux carboné provenant de la glycolyse est élevé et en conditions d'aération. Par contre, lorsque l'activité glycolytique diminue, cette inhibition est levée et la cellule est capable, grâce à cette voie, de régénérer la totalité de ses cofacteurs d'oxydation cellulaires ou/et de former de l'ATP (Hugenholtz, 1993).

□ Catabolisme du pyruvate par le complexe pyruvate déshydrogénase

Ce complexe multienzymatique tétramérique catalyse, chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, la formation d'acétyl-coenzyme A à partir de pyruvate (Figure II.6), avec co-production de CO_2 et NADH + H^+ sans qu'il y ait production d'acide formique (Snoep *et al.*, 1992). Après l'étape initiale de formation de l'acétaldéhyde-TPP par la pyruvate décarboxylase, celui-ci réagit avec l'acide lipoïque lié de façon covalente à la seconde enzyme du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), la lipoate acétyltransférase. Cette étape assure le transfert d'un groupe acétyle du complexe acétaldéhyde-TPP au coenzyme A avec production d'acétyl-CoA. Cette réaction libère de l'acide dihydrolipoïque qui est reconverti en acide lipoïque par la flavoprotéine lipoyle déshydrogénase avec réduction d'un cofacteur d'oxydo-réduction NAD^+ (Collins et Bruhn, 1970; Collins, 1972; Broome *et al.*, 1980; Hugenholtz, 1993).

L'acétyl-coenzyme A ainsi formé peut ensuite être orienté, comme c'est le cas avec la pyruvate-formate lyase, vers les aldéhyde et alcool déshydrogénases avec réduction en acétaldéhyde puis en éthanol et réoxydation de deux cofacteurs réduits (NADH + H^+) ou vers la phospho trans-acétylase et l'acétate kinase formant de l'acide acétique et de l'ATP (Figure II.6).

Les bilans de production d'acétate, acétaldéhyde et éthanol à partir du pyruvate catabolisé par le complexe pyruvate déshydrogénase sont les suivants :

$$\text{Pyruvate} + NAD^+ + ADP + P_i \rightarrow \text{Acétate} + CO_2 + NADH + H^+ + ATP$$

$$\text{Pyruvate} \rightarrow \text{Acétaldéhyde} + CO_2$$

$$\text{Pyruvate} + NADH + H^+ \rightarrow \text{Ethanol} + CO_2 + NAD^+.$$

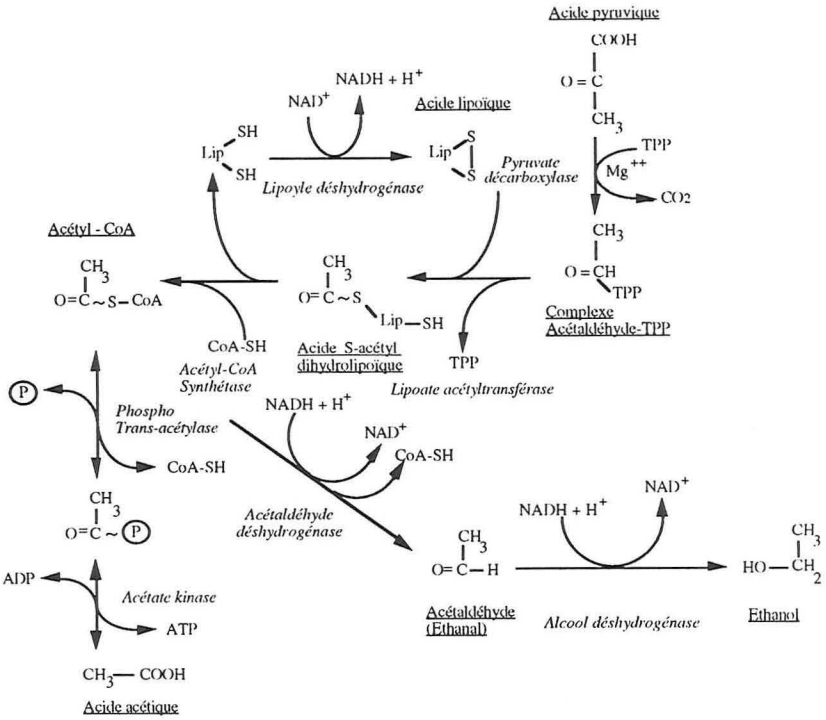


Figure II.6 : devenir du pyruvate métabolisé par le complexe pyruvate déshydrogénase (D'après Stien, 1993).

L'activité de ce complexe enzymatique est difficile à mettre en évidence étant donné qu'elle nécessite la disponibilité de TPP, NAD^+ et d'acide lipoïque pour fonctionner. Ainsi, les conditions opératoires pour lesquelles cette activité est observable sont assez réduites; en absence d'oxygène ou lorsque la croissance est très active, la LDH et la PFL ont un avantage sur le complexe PDH vis-à-vis du catabolisme de l'acide pyruvique, le NAD^+ nécessaire au bon fonctionnement du complexe n'étant pas disponible (Hugenholtz, 1993).

Par contre, en présence d'oxygène, le NADH + H^+ peut être réoxydé en NAD^+ par une NADH + H^+ oxydase. La disponibilité du NAD^+ n'étant plus limitante, le pyruvate pourra emprunter la voie métabolique du complexe pyruvate déshydrogénase. Dans de telles conditions, la formation de CO_2 et d'acétylCoA sera favorisée par rapport aux voies de la LDH et de la PFL (Condon, 1987). L'acétyl-CoA formé, en présence d'oxygène, est transformé en acide acétique via l'acétyl-phosphate plutôt qu'en acétaldéhyde et en éthanol. En effet, l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'éthanol déshydrogénase ont besoin de NADH + H^+ pour fonctionner et sont donc en compétition avec le système NADH + H^+ oxydase/peroxydase alors que la conversion de l'acétyl-CoA en acide acétique par la phospho-trans acétylase et l'acétate kinase permet la formation d'ATP (Condon, 1987).

- Catabolisme du pyruvate par l'acétolactate synthétase ou la pyruvate décarboxylase

Cette partie du catabolisme du pyruvate revêt un intérêt technologique très important étant donné qu'elle est à l'origine de la production de l'arôme laitier diacétyle, présent dans le beurre, la crème fermentée et autres produits laitiers (Dumont et Adda, 1978; Heath et Reineccius, 1986; Paquot *et al.*, 1994; Welsh *et al.*, 1994). En dépit de ce vif intérêt, l'étude de ces voies métaboliques est rendue difficile par les faibles quantités de diacétyle produites, de l'ordre de quelques mg/l à quelques dizaines de mg/l (Stien, 1993), par la forte parenté chimique entre les métabolites de ces voies (le diacétyle, l'acétoïne et le 2,3-butanediol ne diffèrent que par des degrés d'oxydation ou de réduction) et par la présence d'un intermédiaire instable, l'α-acétolactate (AAL), pouvant subir une transformation spontanée en diacétyle, peuvent avoir des effets désastreux pour la précision des méthodes de dosage du diacétyle (Jönsson et Pettersson, 1977; Veringa *et al.*, 1984).

Cependant, malgré ces difficultés d'étude, deux voies de production du diacétyle ont été mises en évidence. L'existence de la première de ces voies a été démontrée par les études de Speckman et Collins (1968 et 1973). Une première série de travaux (Speckman et Collins, 1968) avec des extraits cellulaires et ajout de substrats marqués au ^{14}C a montré l'intégration de carbone provenant du pyruvate et de l'acétyl-coenzyme-A dans les molécules de diacétyle et d'acétoïne. La réaction de production de diacétyle nécessite la présence de TPP et d'ions Mg^{++} ou Mn^{++}. Ces résultats ont été confirmés en 1973 par des expériences d'incorporation d'acétate marqué par des cellules en carence d'acide lipoïque. Dans ces conditions de culture, l'acétate marqué sert de source d'acétyl-coenzyme A et est incorporé dans le diacétyle et l'acétoïne. Speckman et Collins ont donc proposé le schéma suivant pour la synthèse des molécules en C4 : dans un premier temps, le pyruvate est transformé en acétaldéhyde-TPP au niveau d'une pyruvate décarboxylase (Juni, 1952; Seitz *et al.*, 1963). Cette forme activée de l'acétaldéhyde se condense ensuite avec l'acétyl-coenzyme-A sous l'action d'une diacétyle synthétase pour former directement du diacétyle

avec relargage de TPP et de coenzyme A. Le diacétyle formé peut ensuite être réduit de façon irréversible en acétoïne par la diacétyle réductase, puis, à nouveau en 2,3-butanediol par cette même enzyme aussi nommée acétoïne réductase (Speckman et Collins, 1968; Crow, 1990). La voie de Speckman et Collins est décrite au niveau de la figure II.7.

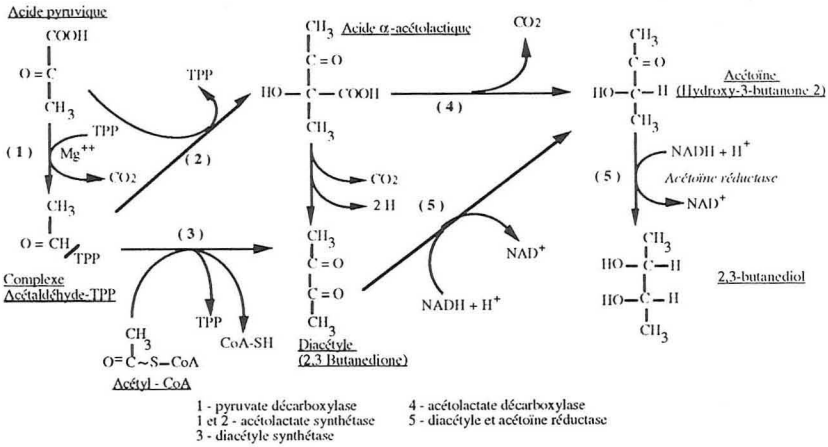
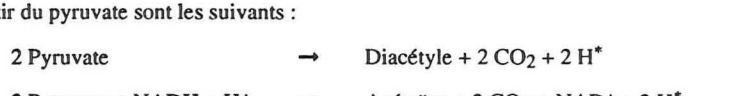


Figure II.7 : formation de composés en C4 à partir du pyruvate (D'après Stien, 1993).

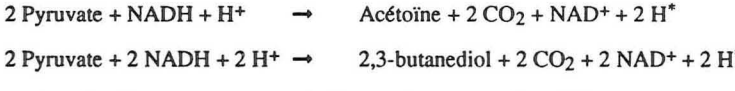
Au cours de leurs travaux, Speckman et Collins (1973) ont aussi remarqué une diminution de l'activité spécifique du diacétyle et de l'acétoïne formés à partir d'acétate radioactif lorsque du pyruvate non marqué est ajouté au milieu de culture. Ils ont donc supposé l'existence d'une deuxième voie de synthèse des molécules en C4 qui a été mise en évidence en 1991 par Verhue et Tjan en suivant par RMN ^{13}C le devenir d'acides citrique et pyruvique marqués. Dans cette nouvelle voie, le diacétyle est formé à partir d'un intermédiaire métabolique instable, l'AAL. Cet intermédiaire est produit par une acétolactate synthétase (ALS) à partir du pyruvate : dans un premier temps, une activité pyruvate décarboxylase de cette enzyme transforme une molécule de pyruvate en acétaldéhyde-TPP (Snoep *et al.* 1992) qui est ensuite condensé avec la deuxième molécule de pyruvate pour former l'AAL avec relargage du TPP. L'AAL peut ensuite subir une décarboxylation oxydative en diacétyle (Jönsson et Pettersson, 1977; Veringa *et al.* 1984) ou une décarboxylation simple en acétoïne par l'acétolactate décarboxylase (ADC). Le diacétyle et l'acétoïne formés sont à nouveau susceptibles d'être réduits par la diacétyle/acétoïne réductase. A l'heure actuelle, la voie de l'AAL est considérée comme étant dominante par rapport à celle de Speckman et Collins du fait du lien existant entre surproduction de diacétyle et accumulation d'AAL par les souches productrices d'arômes, et de l'effet positif de l'aération sur la production de diacétyle, cette aération favorisant aussi la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle. Il faut tout de même

nuancer une telle supposition car cette voie n'a pu être mise en évidence que chez des souches produisant du diacétyle en forte concentration, à cause de la faible limite inférieure de détection de la RMN. En conséquence, chez ces souches surproductrices, il n'est pas impossible que la voie de Speckman et Collins soit empruntée dans une faible proportion (production de diacétyle à partir d'acétyl-CoA en concentration inférieure à la limite inférieure de détection) et, chez des souches plus communes produisant des quantités moyennes ou faibles de diacétyle, cette dernière voie pourrait très bien ne pas être négligeable (Verhue et Tjan, 1991).

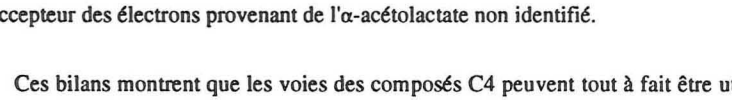
Quelle que soit la voie empruntée, les bilans de production des composés en C4 à partir du pyruvate sont les suivants :



$$2\ \text{Pyruvate} \rightarrow \text{Diacétyle} + 2\ CO_2 + 2\ H^*$$



$$2\ \text{Pyruvate} + NADH + H^+ \rightarrow \text{Acétoïne} + 2\ CO_2 + NAD^+ + 2\ H^*$$



$$2\ \text{Pyruvate} + 2\ NADH + 2\ H^+ \rightarrow \text{2,3-butanediol} + 2\ CO_2 + 2\ NAD^+ + 2\ H^*$$

* : accepteur des électrons provenant de l'α-acétolactate non identifié.

Ces bilans montrent que les voies des composés C4 peuvent tout à fait être utilisées pour la régénération du NAD^+, dans le cas où du 2,3-butanediol serait formé, ou servir à évacuer un excès de pyruvate potentiellement toxique sous forme d'acétoïne sans affecter le rapport $NADH + H^+ / NAD^+$ (Harvey et Collins, 1963; Speckman et Collins, 1968). L'acétolactate synthétase, l'acétolactate décarboxylase, la diacétyle/acétoïne réductase sont des enzymes constitutives (Cogan, 1981), alors que la diacétyle synthétase est inductible (De Roissart, 1986). L'ALS, dans le cas où la synthèse des composés C4 emprunterait cette voie, catalyse l'étape limitante pour la production du diacétyle, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol. En effet, cette enzyme présentant une faible affinité pour le pyruvate (50 mM), même avec une forte coopérativité positive, le flux carboné qui emprunte cette voie est normalement très limité (Snoep *et al.*, 1992). Cette voie peut, par contre, être empruntée dans des conditions très particulières où le flux carboné alimentant les autres voies (LDH, PDC, PDH) dépasse leurs capacités de transformation, ou alors dans lesquelles ces enzymes sont inhibées. De telles conditions sont obtenues lors de cultures dans un milieu contenant du lactose et du citrate, où le citrate apporte un flux de pyruvate important sans production des inducteurs de la LDH fructose-1,6-diphosphate et $NADPH + H^+$, et en aérobiose, pour inhiber la PFL (Hugenholtz, 1993).

Une fois le pyruvate orienté vers les voies des C4, toujours selon l'hypothèse où la voie de l'AAL serait dominante, la répartition entre le diacétyle, l'acétoïne et le 2,3-butanediol dépend dans un premier temps de la compétition qui s'établit entre la réaction de décarboxylation de l'AAL en acétoïne par l'ADC et la décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle. Le mode de compétition entre ces deux réactions reste pour l'instant

difficile à établir, le mécanisme de décarboxylation oxydative de l'AAL étant à ce jour inconnu. Le deuxième facteur de répartition provient de l'acétoïne/diacétyle réductase (DR) car cette enzyme présente une affinité bien supérieure pour l'acétoïne (Km = 0,2 mM) que pour le diacétyle (Km = 9 mM). De plus, l'activité de cette enzyme est inhibée de façon non compétitive par l'acétoïne à des concentrations supérieures à 2 mM (Crow, 1990; Hugenholtz, 1993). Enfin, le synthèse de la DR est réprimée par l'acide citrique (Cogan, 1981; Mellerick et Cogan, 1981). Ces deux étapes de régulation permettent d'expliquer, d'une part, la disproportion entre les quantités très faibles de diacétyle et plus importantes d'acétoïne et de 2,3-butanediol (compétition entre décarboxylation et décarboxylation oxydative), et, d'autre part, les lentes vitesses de réduction de diacétyle dans les produits laitiers fermentés (régulation de la DR).

II.2. OBTENTION DE SOUCHES SURPRODUCTRICES DE DIACETYLE

Depuis les travaux de Verhue et Tjan de 1991, la recherche ou le développement de souches surproductrices de diacétyle s'est orientée vers la surproduction d'AAL. Deux stratégies ont été appliquées pour obtenir de telles souches :

- la première consiste à sélectionner, à l'aide de cribles appropriés, des mutants spontanés ou induits de façon aléatoire de souches présentant au départ un intérêt technologique certain,
- la deuxième, plus radicale, exploite plus profondément les connaissances acquises en génétique et physiologie des lactocoques pour en modifier les voies métaboliques; il s'agit de l'ingénierie métabolique.

II.2.1. SELECTION DE MUTANTS A CAPACITE DE PRODUCTION AMELIOREE

Cette stratégie repose sur le développement de cribles efficaces permettant de sélectionner dans une population donnée des souches surproduisant du diacétyle ou, dans un premier temps, accumulant l'AAL.

Un premier type de crible, développé par Monnet *et al.* (1997), repose sur l'adaptation de techniques colorimétriques de dosage du diacétyle et de l'AAL à des cultures sur citrate en boîtes de Pétri. Ce premier type de crible est intéressant car il ne nécessite pas de connaissance préalable du métabolisme de production du diacétyle. Des mutants spontanés peuvent être sélectionnés, pour peu que les évènement génétiques conduisant à leur apparition soient suffisamment fréquents. Dans le cas contraire, une mutagénèse au hasard peut alors être appliquée. Qui plus est, le recours à une mutagénèse par transposition doit pouvoir permettre, en plus d'obtenir des souches performantes, de localiser et déterminer la ou les mutations intervenues, et donc d'accroître les connaissances sur ces voies métaboliques.

Un deuxième type de crible repose sur le phénotype dit d'inhibition par la leucine chez les souches prototrophes pour les acides aminés branchés leucine, isoleucine et valine pour sélectionner des souches déficientes en ADC, enzyme effectuant la décarboxylation de l'AAL en acétoïne (Goupil *et al.*, 1996). En effet, chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, l'AAL se trouve être un intermédiaire commun du catabolisme des sources carbonées et de l'anabolisme des acides aminés branchés. L'AAL peut, dans l'anabolisme des acides aminés, servir de précurseur aux acides aminés branchés. La régulation de ces voies fait intervenir l'activation par la leucine d'une ADC différente de l'ADC du catabolisme des sources carbonées. Ainsi, lorsque la quantité de leucine formée est suffisante, le flux d'AAL est orienté vers l'ADC anabolique. Le phénomène d'inhibition par la leucine apparaît pour des cultures pauvres en valine mais riches en leucine. La leucine, en activant l'ADC anabolique, empêche l'AAL d'emprunter l'anabolisme des acides aminés branchés, d'où une carence en valine qui limite la croissance. Un moyen de sélectionner des mutants déficients en ADC anabolique est donc de sélectionner les souches réussissant à croître sur un milieu dépourvu de valine et riche en leucine. De tels mutants déficients en ADC, enzyme responsable des faibles rendements en diacétyle formé à partir d'AAL, ont des capacités d'accumulation d'AAL accrues et par conséquent un potentiel de synthèse de diacétyle amélioré (Goupil *et al.*, 1996; Curic *et al.*, 1997).

II.2.2. DEVELOPPEMENT DE SOUCHES SURPRODUCTRICES PAR INGENIERIE METABOLIQUE

La stratégie employée vise à déterminer les réactions limitantes pour la production de diacétyle et à faire en sorte que ces limitations soient levées par le biais de modifications génétiques modifiant la synthèse d'enzymes ou leur activité (Gasson, 1993). Chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, la première limitation réside dans l'orientation du flux carboné sous forme de pyruvate vers les différentes voies métaboliques. La principale voie responsable de fuites pour la production de diacétyle est celle de la lactate déshydrogénase, l'activité PFL pouvant être limitée par les conditions de culture (pH et aération) et l'activité PDH étant généralement faible (Platteeuw *et al.*, 1995; Gasson *et al.*, 1996). La deuxième limitation provient de l'activité ALS assez réduite. Toujours dans la voie des C4, des fuites importantes peuvent être imputées à l'ADC, qu'elle soit catabolique ou anabolique et à la diacétyle/acétoïne réductase. Des productions améliorées de diacétyle peuvent donc être obtenues par inactivation de la LDH, des ADC (enzymes anaboliques et cataboliques) et de la diacétyle réductase et par surexpression de l'activité acétolactate synthétase (Gasson *et al.*, 1996). Toutefois, la combinaison optimale des modifications génétiques et de conditions de culture est loin d'être aisée à déterminer. A titre d'exemples, des améliorations de production de diacétyle et/ou d'AAL ont été obtenues par Benson *et al.* (1996) avec une souche surexprimant une ALS anabolique, par

Swindell et al. (1996) avec une souche avec ADC anabolique délétée et ALS anabolique surexprimée, par Platteeuw *et al.* (1995) avec une souche déficiente en ADC et surproduisant une ALS anabolique, par Gasson *et al.* (1996) avec une souche déficiente en LDH, ADC et diacétyle réductase, avec une activité ALS surexprimée. Néanmoins, au vu des résultats publiés, il est à l'heure actuelle difficile de comparer l'efficacité respective des modifications réalisées, les informations cinétiques faisant défaut et les conditions expérimentales différant d'une équipe à l'autre.

II.2.3. LIMITES DE L'UTILISATION DE MUTANTS SPONTANES OU DE SOUCHES MODIFIEES GENETIQUEMENT

La première limite pour l'utilisation de telles souches concerne principalement celles obtenues par ingénierie génétique et est d'ordre réglementaire : l'emploi de souches modifiées génétiquement est considérablement restreint, en particulier, pour une utilisation alimentaire (Welsh, 1994). Des études ont été réalisées pour déterminer l'impact de l'introduction de bactéries lactiques génétiquement modifiées dans les aliments en termes de colonisation du tractus intestinal, relargage dans l'environnement, et de transfert d'information génétique à des souches résidentes (Klijn *et al.*, 1995 a et b; Guédon *et al.*, 1995; Brockman *et al.*, 1996). Les résultats montrent que ces cellules peuvent survivre au transit intestinal et être relarguées dans l'environnement. Qui plus est, des échanges d'informations génétiques sont susceptibles d'avoir lieu avec des bactéries implantées au niveau intestinal ou dans l'environnement. Pour tenter de minimiser l'apport de matériel génétique étranger, des techniques de modification génétique ont été mises au point en vue d'obtenir des mutants dits "food-grade" pouvant éventuellement satisfaire à certaines exigences réglementaires. Ces méthodes font appel à l'utilisation d'éléments génétiques mobiles (transposons ou éléments IS) ou à des séquences de régulation présentes chez les lactocoques pour empêcher la transcription des gènes indésirables, perturber la traduction des transcrits correspondants, produire des protéines sous forme inactive ou surexprimer les produits des gènes intéressants (Maguin *et al.*, 1996; Platteeuw *et al.*, 1996). Néanmoins, même avec des cellules modifiées par de telles méthodes, il demeure difficile d'évaluer correctement la nature du danger auquel seraient soumis les consommateurs et le reste du biotope.

Qui plus est, les cellules ainsi modifiées peuvent se trouver confrontées à de nouvelles limitations physiologiques :

- l'inactivation de la LDH, enzyme appartenant à l'une des voies métaboliques principales des lactocoques, risque de perturber la croissance des cellules à un point tel que l'obtention d'une biomasse suffisante pour la production d'arômes risque de s'avérer problématique,

▫ la transformation de quantités importantes d'AAL peut devenir limitante pour l'obtention du diacétyle, la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL étant loin d'être maîtrisée à l'heure actuelle qu'il s'agisse de son mécanisme, de sa cinétique ou de sa thermodynamique (Veringa *et al.*, 1984; Ho Park *et al.*, 1995),

▫ les quantités importantes de diacétyle obtenues risquent d'atteindre le seuil de toxicité diacétyle sur les lactocoques (proche de 1 g/l) ou sur les autres bactéries lactiques (proche de 350 mg/l) susceptibles d'être cultivées en présence des lactocoques (Jay, 1982).

▫ Enfin, la dernière limite provient de la nécessité de disposer en production d'un large éventail de souches surproductrices pour limiter les conséquences d'infections phagiques (Hill *et al.*, 1995). Le développement d'un tel éventail risque à terme de peser lourdement sur les coûts de production d'aliments aromatisés.

II.3. METABOLISME DE L'OXYGENE CHEZ LES LACTOCOQUES

Le comportement de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* vis-à-vis de l'oxygène est du type microaérophile : de faibles teneurs en oxygène sont favorables au développement des cellules alors que des concentrations plus élevées ont des effets néfastes (Desmazeaud et de Roissart, 1994). Cette classification ne doit pas être prise à la lettre car elle est relativement floue, du fait de l'emploi de termes peu quantifiables tels que "concentration plus élevée" ou "faible teneur" et le qualificatif donné à une souche peut dans une large mesure dépendre des conditions de culture, la limite entre souches microaérophiles, aérotolérantes ou anaérobies facultatives étant ténue (Condon, 1983). Quoi qu'il en soit, le caractère microaérophile traduit la coexistence de deux effets antagonistes de l'oxygène avec un effet positif dû à la présence d'un accepteur d'électrons supplémentaire pour le métabolisme de la cellule, et un effet négatif résultant de la formation et éventuellement de l'accumulation d'espèces activées de l'oxygène.

Sur un plan positif, l'oxygène peut accepter des électrons par exemple en provenance du NADH + H^+ et permettre ainsi de régénérer du NAD^+. Les enzymes responsables de cette réaction d'oxydo-réduction (Figure II.8) peuvent être la NADH + H^+ : H_2O_2 oxydase catalysant la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (Anders *et al.*, 1970) ou la NADH + H^+ : H_2O oxydase catalysant la réduction de l'oxygène en eau (Bruhn et Collins, 1970). Ces deux enzymes entrent en compétition avec la LDH pour la régénération du NAD^+. De plus, Smart et Thomas (1987) ont noté une diminution de l'activité spécifique de la LDH en présence d'oxygène imputable à la diminution de la concentration de l'activateur fructose-1,6-diphosphate. Ces effets permettent une réorientation du flux de pyruvate vers la pyruvate décarboxylase, la pyruvate déshydrogénase ou l'ALS. La PFL, par contre, est inhibée par la présence d'oxygène (Condon, 1987). La réorientation du pyruvate est le premier effet positif de l'oxygène sur le métabolisme des composés en C4, l'ALS ou la pyruvate décarboxylase étant mieux alimentées en source carbonée. La

production de diacétyle est en plus améliorée par l'influence bénéfique de l'oxygène sur la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle. Cette influence positive de l'oxygène peut être exploitée pour améliorer les rendements de production de diacétyle par rapport aux substrats carbonés consommés, le rapport diacétyle / acétoïne et la productivité de procédés de production d'arômes laitiers (Bassit *et al.*, 1993 et 1994 ; Boudermassi *et al.*, 1996).

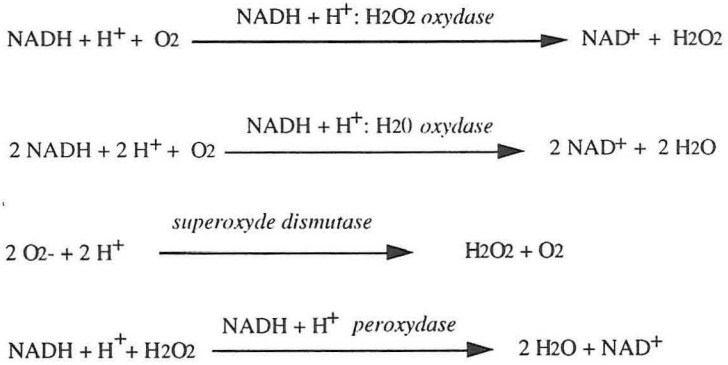


Figure II.8 : Utilisation de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène chez les lactocoques (d'après Condon, 1987 et Stien, 1993).

En parallèle, le métabolisme de l'oxygène s'accompagne de la formation d'espèces activées toxiques pour les cellules, telles l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène (Anders *et al.*, 1970 ; Condon, 1987). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* dispose de systèmes de détoxification de ces espèces avec la superoxyde dismutase, qui réduit l'anion superoxyde d'un niveau de toxicité élevé en peroxyde d'hydrogène d'une toxicité moindre, et la NADH + H^+ peroxydase qui réduit le peroxyde d'hydrogène provenant des activités superoxyde dismutase (Britton *et al.*, 1978) et NADH + H^+ : H_2O_2 oxydase (Figure II.8). L' activité de la NADH + H^+ : H_2O oxydase est néanmoins faible par rapport à celles des superoxyde dismutase et NADH + H^+ : H_2O_2 oxydase, ce qui entraîne une accumulation de peroxyde d'hydrogène à partir d'un certain seuil d'aération et se traduit par un comportement microaérophile. Cette activité NADH + H^+ : H_2O oxydase insuffisante peut être palliée par l'adjonction dans le milieu d'un dérivé hémique, permettant aux cellules de produire des cytochromes (Ritchey et Seeley, 1976) ou une catalase (Sijpesteijn, 1970 ; Desmazeaud et de Roissart, 1994), ou par un ajout direct de catalase (Desmazeaud et de Roissart, 1994). De telles modifications du milieu de culture permettent aux cellules de supporter des teneurs accrues en oxygène et donc d'accroître les effets positifs de l'oxygène sur le métabolisme. Ces particularités du métabolisme de l'oxygène ont en particulier été exploitées par Ochi *et al.* (1991) pour produire du diacétyle en aérobiose à partir de cultures de lactocoques co-immobilisés dans des fibres d'alginate avec des extraits de foie de bovins, source peu onéreuse de catalase.

III. MODES DE MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

III.1. INTRODUCTION

Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis est une souche très répandue en industrie laitière, qui intervient notamment dans les procédés de production de laits fermentés, beurres et crèmes acides, fromages frais et affinés (Schmidt *et al.*, 1994). La propriété la plus recherchée apportée par cette souche est l'aromatisation par production principalement de diacétyle et d'acétaldéhyde. Ces deux composés ont un rôle dominant dans l'arôme du beurre ou des crèmes fermentées et participent aux qualités organoleptiques des laits fermentés et autres fromages. En parallèle à leur activité d'aromatisation, ces lactocoques produisent également de l'acide lactique, bien que leurs capacités d'acidification soient inférieures à celles des lactobacilles (Schmidt *et al.* 1994). De plus, dans certaines conditions, les lactocoques adoptent un comportement fermentaire de type acide mixte qui s'accompagne d'une production non négligeable de dioxyde de carbone, pouvant participer au propriétés texturales des produits laitiers fermentés (Diviès *et al.*, 1994).

Un autre caractère intéressant de *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*. est sa capacité à produire des peptides aux propriétés antimicrobiennes appelés bactériocines (Gasson, 1993; Coffey *et al.*, 1994; Cenatiempo *et al.* 1996). Les bactériocines, produits à plus forte valeur ajoutée que les arômes ou acides issus du métabolisme des lactocoques, apportent aux aliments qui en contiennent des propriétés dites probiotiques. Le plus connu de ces composés est la nisine, dont les applications vont de l'utilisation comme conservateur en industrie alimentaire au traîtement de pathologies humaines ou animales telles que certaines formes d'ulcères ou de mastites bovines (Delvesbroughton *et al.* 1996; Siegers et Entian, 1995; Vandenhooven *et al.*, 1996 a et b; Kelly, *et al.* 1996; Matsusaki *et al.* 1996; VantHul et Gibbons, 1996).

Une autre propriété des lactocoques réside dans la relative aisance de modification génétique de ce micro-organisme qui en fait un candidat valable comme système à haut niveau d'expression de protéines hétérologues. De plus, au vu de la large et longue utilisation des lactocoques en industrie alimentaire, ces bactéries voient leur innocuité généralement admise (Generally Recognized As Safe ou GRAS). La combinaison de ces deux qualités fait des lactocoques des supports intéressants pour des protéines hétérologues à propriétés antigéniques. De telles cellules, modifiées génétiquement, sont à l'heure actuelle l'objet d'études approfondies en vue d'être utilisées comme vaccins mucosaux (Gasson, 1993; Norton, 1995).

Pour toutes les applications évoquées ci-dessus, le mode de mise en œuvre des lactocoques influe fortement sur les performances des procédés. Dans la suite de cette

étude, nous ne nous intéresserons pas aux modes traditionnels de mise en œuvre employés en laiterie, faisant bien souvent appel à des cultures mixtes (starters mixtes levains hétérogènes) opérant dans des milieux polyphasiques complexes et en évolution au cours du procédé tels que des gels protéiques acides dans les yaourts et laits fermentés, des gels protéiques obtenus par protéolyse dans les fromages et d'émulsions eau dans huile avec cristallisation partielle de la phase lipidique dans le beurre. En effet, ces procédés ont grandement été maîtrisés de façon empirique et la compréhension du comportement des lactocoques vis-à-vis des autres souches ainsi que de l'environnement est encore par trop parcellaire (Marc *et al.*, 1997). En revanche, dans la partie qui va suivre seront traitées la mise en œuvre des lactocoques en milieu liquide en culture discontinue, semi-continue ou continue. Nous nous intéresserons aussi à l'utilisation des lactocoques sous forme immobilisée ou en fermentation extractive. L'optique de cette revue bibliographique est de faire le point sur les modes de culture permettant la production de biomasse (starters ou vaccins mucosaux ...) ou de métabolites secondaires avec une attention toute particulière pour le diacétyle.

III.2. CULTURE EN REACTEUR PARFAITEMENT AGITE

Au niveau des industries laitières, la mise en œuvre de lactocoques en milieu parfaitement agité a subi un regain d'intérêt dû à l'évolution des procédés de production du beurre. En effet, à la fin des années 1970 est apparu un procédé continu de production de beurre découplant la maturation physique de la crème de sa maturation biologique par les bactéries lactiques (Paquot *et al.*, 1994). Avec ce procédé, la maturation biologique a lieu en milieu liquide dans des cuves assurant la production de suspensions acides et aromatisées injectées directement au niveau de l'étape de barattage en continu dans le butyrateur pour apporter au beurre des concentrations voulues en biomasse viable, acides et arômes (Figure II.9). Les avantages de ce procédé, augmentation de la productivité induite par la continuité, meilleure stabilité de la qualité du produit par découplage des opérations unitaires de traitement physique de la crème et de fermentation lactique, obtention de babeurre doux plus aisément valorisable que le babeurre acide du fait de la non-inoculation de la crème, ont fait qu'il s'est rapidement imposé dans l'industrie laitière, avec en parallèle le développement de nombreuses études concernant l'optimisation de cultures en milieu parfaitement agité (Bassit *et al.*, 1993 et 1994; Boudermassi *et al.*, 1997; Guttierez *et al.*, 1996) non seulement pour l'aromatisation et l'acidification, mais aussi pour la production de bactériocines (Matsusaki, 1996).

Au niveau industriel, les cultures de lactocoques ont quasi-exclusivement lieu en mode discontinu, pour des raisons pratiques de simplicité de mise en œuvre et de limitation des pertes en cas d'accident de fermentation. Ce mode de culture, bien que permettant aisément de tirer parti des connaissances acquises en physiologie sur l'influence des

composants du milieu (acide citrique principalement) et des conditions physico-chimiques de fermentation (température, aération, pH ...), ne permet pas un contrôle suffisamment précis pour en tirer pleinement parti, à cause des évolutions permanentes en biomasse, substrats et métabolites. Il en résulte que le mode de culture discontinu n'est pas le plus adapté à l'obtention d'une productivité optimale.

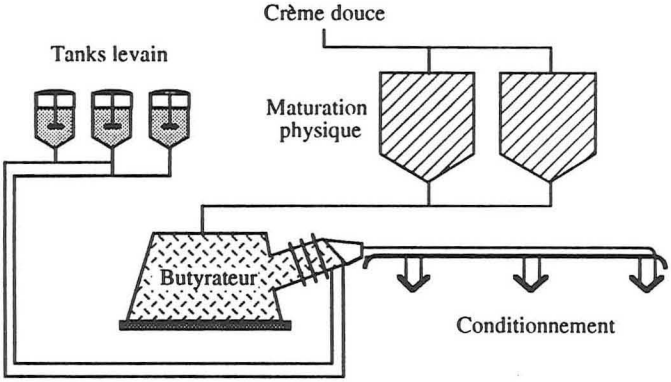


Figure II.9 : schéma du procédé continu de production de beurre.

Le niveau de performances peut être accru, sans modification drastique des installations, par le passage en mode semi-continu. Le mode semi-continu, comme le mode discontinu, permet de limiter l'ampleur des risques dus aux accidents fermentaires. L'amélioration des performances par le passage à ce mode de culture tient d'une part à l'affranchissement des mécanismes d'inhibition par excès de substrat et, d'autre part, à la possibilité de réaliser des cultures comprenant plusieurs phases physiologiques. Ces cultures pluriphasiques peuvent, par exemple, comprendre une phase de production de biomasse assurant la formation d'une quantité suffisante de biocatalyseur, suivie d'une phase de production de métabolites déclenchée par une alimentation en milieu (Montville *et al.*, 1987). Dans le cas de la production de bactériocines, le passage de la phase de croissance à la phase de production est initié par modification physico-chimique du milieu (pH, T°) et par alimentation avec un milieu réorientant le métabolisme (Tween 80, éthanol) et les précurseurs des molécules recherchées (Devuyst *et al.*, 1996).

L'obtention de conditions de production physiologiquement optimales peut, quant à elle, être atteinte par le biais de procédés de culture continus de cellules libres (Schmitt *et al.*, 1990 et 1992; Starrenburg et Hugenholtz, 1991; Boyaval, 1994). Cet avantage physiologique est renforcé par l'utilisation plus efficace des installations de production, le temps de nettoyage et de remise en condition étant proportionnellement plus court avec des cultures longues comme les cultures continues qu'avec des cultures discontinues ou semi-continues. De plus, le nombre de précultures nécessaires à quantité de produit formé égale

est inférieur dans le cas de fermentations continues par rapport aux cultures discontinues et semi-continues. Les gains de productivité en culture continue sont en général si importants qu'à production égale, le volume réactionnel d'une installation de culture continue est 5 à 10 fois plus faible que celui d'une installation discontinue (Boyaval, 1994). Cependant, le coût des réacteurs continus est plus élevé que celui des installations de culture discontinue et semi-continue et leur mise en œuvre demeure problématique pour une utilisation industrielle courante, à cause, notamment, des pertes potentiellement très importantes en cas d'accident de fermentation sur une culture représentant, du fait de sa grande durée, un volume important de produit. Pour ces raisons, ce mode de culture ne semble pas s'implanter au niveau industriel, même si l'activité de ferments obtenus par ce type de procédé ou les productivités atteintes peuvent se révéler avantageuses (Lloyd et Ponts, 1973; Bibal *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1988).

III.3. CULTURE SOUS FORME IMMOBILISEE

III.3.1. INTRODUCTION

Les avantages de l'immobilisation cellulaire sont nombreux (Champagne *et al.*, 1994). le premier d'entre eux est l'obtention de hautes densités cellulaires, de l'ordre de 10^{11} UFC/ml de support (Audet *et al.*, 1988; Champagne *et al.*, 1993; Prévost et Diviès, 1987). De plus, l'immobilisation des cellules permet de s'affranchir des phénomènes de lessivage et de travailler avec des temps de séjour très courts. D'un point de vue pratique, les biocatalyseurs immobilisés sont relativement aisés à manipuler, rendant leur utilisation possible par du personnel éventuellement peu qualifié pendant des phases telles que leur mise en place ou leur récupération (Champagne *et al.*, 1994). Qui plus est, les cellules immobilisées voient leur stabilité génétique accrue (Champagne *et al.* 1994), fait très important pour *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* dont le métabolisme carboné dépend des plasmides citrate et lactose (Hugenholtz, 1993; de Vos et Vaughan, 1994). Les contaminations par des levures ou bactéries sont également moindres avec les cellules immobilisées, les contaminants éprouvant de grandes difficultés à s'implanter et pouvant être rapidement lessivés dès leur détection (Champagne *et al.*, 1989). La sensibilité aux bactériophages semble, elle aussi, être réduite par l'immobilisation, même si le développement phagique se poursuit et risque de nuire aux étapes suivantes du procédé (Steenson *et al.*, 1987). La résistance des cellules immobilisées est également accrue à certains antibiotiques responsables d'accidents de fermentation comme la pénicilline et dont l'efficacité est dépendante de chocs osmotiques (Champagne, 1992). Les cellules immobilisés sont aussi moins sensibles aux variations de température, ce qui permet la production de biocatalyseurs conservant une meilleure activité après un stockage au froid et même après des variations de température accidentelles (Kim *et al.*, 1988; Kearney *et*

al., 1990; Champagne *et al.*, 1992 b). De l'ensemble de ces éléments, il résulte que l'emploi de biomasse immobilisée améliore grandement la robustesse des procédés. Enfin, un dernier avantage de l'immobilisation découle de la possibilité de co-immobiliser différents biocatalyseurs, enzymes ou cellules pour améliorer les performances du procédé (Ochi *et al.*, 1991; Audet *et al.*, 1995). ou réaliser des inoculations définies.

L'immobilisation cellulaire comporte néanmoins un certain nombre d'inconvénients. Le premier provient des limitations diffusionnelles qui perturbent le transfert des substrats vers les cellules et provoquent l'accumulation de métabolites parfois inhibiteurs comme l'acide lactique (Riley *et al.*, 1996; Roukas et Kotzekidou, 1996). Ces limitations diffusionnelles sont parfois à l'origine de variations du métabolisme des cellules par rapport à leur comportement sous forme non immobilisée. Le recours à de tels biocatalyseurs nécessite donc la mise en œuvre de bioréacteurs dont l'hydrodynamique permet d'amenuiser les limitations diffusionnelles sans provoquer d'attrition excessive de l'ensemble cellules-support. La conception, le dimensionnement de tels réacteurs ainsi que l'optimisation des conditions de culture peuvent, par conséquent, se révéler particulièrement ardues. Qui plus est, la production de tels biocatalyseurs pose évidemment le problème de leur devenir, une fois les biotransformations réalisées. Un éventuel réemploi en tant que matrices de chromatographie d'affinité pour la purification de milieux liquides a été évoqué (Champagne *et al.*, 1994). Les supports peuvent par exemple retenir des pesticides, des mutagènes (Zhang et Ohta, 1991), des antibiotiques (Champagne *et al.*, 1992 b) ou des pyrolysats d'acides aminés (Hosono *et al.*, 1990). Cette réutilisation ne fait toutefois que retarder le problème du traitement de tels déchets. Enfin, d'un point de vue réglementaire, certains pays comme le Canada refusent l'emploi, dans le procédé de fabrication de produits laitiers, de réactifs ne provenant pas du lait, excluant ainsi les supports d'immobilisation et autres polymères d'inclusion et d'encapsulation (Champagne *et al.*, 1994).

III.3.2. MODES D'IMMOBILISATION CELLULAIRE

La technique la plus simple à mettre en œuvre demeure l'immobilisation des cellules à la surface de supports par adsorption (Divès *et al.*, 1994 b; Ruhaut, 1994). Un choix judicieux du support par rapport aux cellules permet l'établissement de liaisons de niveaux énergétiques suffisants pour permettre l'adsorption des cellules (McFeters, 1984; Rutter, 1984). Ces supports peuvent être aussi bien organiques que minéraux, et correspondre à des matériaux bruts comme des déchets agricoles, des broyats de matériaux de construction ou des supports beaucoup plus évolués comme des résines chromatographiques greffées avec des fonctions chimiques bien définies (Ruhaut, 1994). Une fois l'adsorption réalisée, a lieu une phase de colonisation du support avec formation

d'un biofilm à sa surface avec, en parallèle, des phénomènes de décrochement des cellules résultant de l'hydrodynamique dans le réacteur ou de la physiologie des cellules (autolyse ou cycle lytique phagique).

Un deuxième moyen d'immobiliser les cellules consiste à créer des liaisons covalentes entre les cellules et le support ou entre les cellules elles-même par adjonction de molécules réactives comme le glutaraldéhyde (Diviès *et al.*, 1994 b, Ruhaut, 1994). Ce type de liaison de forte énergie permet d'obtenir des recouvrements des supports ou des agrégats résistants à l'attrition. L'inconvénient principal de cette technique réside dans la toxicité des réactifs employés vis-à-vis des cellules, qui peut nuire, par inhibition de la croissance, à la colonisation du support suivant la phase d'accrochage des cellules, ou aux performances globales de la biotransformation du fait d'une trop faible activité microbiologique résiduelle. La présence éventuelle de traces de ces toxiques au niveau des produits alimentaires explique le peu de travaux réalisés avec ce type de biomasse immobilisée en vue d'une application en industrie laitière. De plus, dans le cas de la formation d'agrégats par liaisons entre cellules, la faible activité des cellules est encore agravée par l'apparition de limitations diffusionnelles.

La technique la plus courante d'immobilisation des bactéries lactiques demeure l'inclusion dans une matrice polymérique (Champagne *et al.*, 1994; Diviès *et al.*, 1994 b). Les polymères les plus communément employés sont naturels comme l'alginate, les carraghénanes, l'agar, le chitosane, ou la cellulose dont les conditions de formation, en général, douces permettent une bonne conservation de l'activité microbiologique (Boyaval et Goulet, 1988; Schmitt *et al.*, 1988; Morin *et al.*, 1992; Prévost et Diviès, 1992; Champagne *et al.*, 1992 a et 1994; Jankovski *et al.*, 1997; Sodini *et al.*, 1997 a et b). Cette activité est parfois telle qu'un relargage important des cellules peut être observé (Champagne *et al.*, 1992 a; Prévost et Diviès, 1992). Ce phénomène de relargage peut être exploité pour l'inoculation en continu d'un milieu de culture ou limité, dans les cas où il se révèle indésirable par l'utilisation de polymères synthétiques plus résistants, mais aux conditions de formation plus dommageables pour les cellules comme le polyacrylamide, le polyuréthane ou le chlorure de polyvinyle. De même, l'enrobage des matrices avec une seconde couche de polymère permet aussi de contrôler le relargage (Prévost et Diviès, 1992; Prévost *et al.*, 1994). Comme dans le cas de la formation d'agrégats, les limitations diffusionnelles sont susceptibles d'influer grandement sur les performances du procédé. Ces limitations peuvent être réduites en jouant sur la nature chimique de la matrice d'inclusion, sur la géométrie des matrices d'inclusion sous forme de billes ou de fibres (Takahashi *et al.*, 1990) ou sur leur taille pour en augmenter la surface volumique.

Le deuxième mode d'immobilisation naturel après l'adsorption est la floculation qui permet d'obtenir des agrégats cellulaires dans des conditions plus douces qu'avec la formation de liaisons covalentes, mais dont les performances fermentaires sont limitées par les phénomènes de transfert de matière. Néanmoins, la floculation est à la base de la

formation des grains de Kéfir, co-immobilisats de bactéries et de levures (Garrote *et al.*, 1997).

Enfin, le dernier mode d'immobilisation fait appel à des membranes perméables aux solutés mais retenant les cellules. Ces membranes peuvent être formées autour de suspensions bactériennes. Des capsules ou microcapsules sont alors obtenues. L'encapsulation du biocatalyseur est obtenue par polymérisation de molécules telles que la gélatine, le chitosane, le nylon ou encore le polyéthylèneimine à l'interface de deux phases dont l'une contient les cellules (Groboillot *et al.*, 1993; Hyndman *et al.*, 1993; Poncelet *et al.*, 1990 et 1992). L'avantage principal de la microencapsulation découle de la relativement faible taille des capsules et dans la faible épaisseur des membranes, qui permettent de favoriser le transfert de matière (Poncelet *et al.*, 1990). De plus, un choix correct de la nature des membranes peut permettre une rétention quasi-totale des micro-organismes et éventuellement apporter une résistance accrue à l'attrition. Les limitations de la microencapsulation proviennent des réactions chimiques de formation *in situ* des membranes, faisant appel à des produits parfois toxiques pour les cellules et de la complexité de mise en œuvre de réactions interfaciales en présence de biocatalyseurs. Toujours dans le cadre de l'immobilisation par membrane, des modules de séparation par micro ou ultrafiltration intégrés à des réacteurs biologiques peuvent être employés pour le confinement des cellules mais aussi pour l'extraction des métabolites. C'est pourquoi ces modes de culture des lactocoques seront traités dans les paragraphes ultérieurs consacrés aux fermentations extractives.

III.3.3. DOMAINES D'APPLICATION DE L'IMMOBILISATION CELLULAIRE

Les cellules immobilisées peuvent se révéler très intéressantes pour des utilisations en industrie laitière : *Lactobacillus delbruecki bulgaricus* et *Streptococcus salivarius thermophilus* immobilisés par inclusion ont été employées pour la pré-acidification et l'inoculation en continu du lait pour la fabrication de yoghourt (Prévost et Diviès, 1988). Ce procédé permet un gain de productivité découlant, d'une part, de la haute densité cellulaire et, d'autre part, du bon état physiologique des cellules relarguées du support et inoculant le lait en continu (Prévost *et al.*, 1994). L'ensemencement en continu du lait a aussi été mis en œuvre avec des cultures mixtes de lactocoques contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis pour la production de fromage frais (Prévost *et al.*, 1994; Sodini *et al.*, 1997 a et b). L'immobilisation permet, dans ce cas, d'améliorer le rendement de conversion du citrate en diacétyle et donc améliore l'aromatisation du produit fini. Qui plus est, ce mode de fermentation permet de travailler à de très forts taux de dilution, excédant largement le taux de dilution critique en culture continue simple, et donc d'augmenter sensiblement la productivité du procédé. Des co-cultures de lactocoques ont aussi été employées pour la préfermentation de la crème. Cette pré-fermentation

permet une acidification modérée de la crème, ainsi qu'une bonne aromatisation (Prévost et Diviès, 1992). Pour cette application, l'avantage supplémentaire apporté par ce mode de fermentation réside dans le contrôle du relargage des cellules, qui limite les accidents de suracidification de la crème, nuisant à son traitement en aval (Champagne *et al.*, 1994). Enfin, des cellules de *Carnobacterium divergens* ont été immobilisées dans des billes d'alginate pour la production d'une bactériocine, la divercine, avec une productivité 30 fois supérieure à celle d'une culture discontinue (Boyaval *et al.*, 1997) et ce type d'application pourrait fort bien être étendu à d'autres bactéries productrices de bactériocines comme les lactocoques.

III.4. FERMENTATION EXTRACTIVE

III.4.1. INTRODUCTION

La mise en œuvre des lactocoques en fermentation extractive se fait principalement à l'aide de modules à membrane couplés à des bioréacteurs. Ces membranes assurent le confinement des cellules, tout en permettant l'extraction de métabolites, dont certains, comme l'acide lactique, peuvent nuire aux performances fermentaires des cellules. Cette levée de l'inhibition par excès de lactate est un des avantages décisifs de l'utilisation de membranes couplées aux bioréacteurs par rapport aux autres méthodes d'immobilisation cellulaire où, du fait des limitations diffusionnelles, l'acide lactique produit s'accumule au niveau des cellules (Altaba, 1991). De plus, dans une optique de production d'arômes laitiers, l'absence de flore microbienne dans le produit fermenté assure une meilleure conservation des molécules produites. Pour le diacétyle, la présence résiduelle de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et particulièrement son activité diacétyle réductase sont à l'origine de pertes importantes lors du stockage (Klaver *et al.*, 1992).

L'utilisation de procédés à membrane couplés à des cultures de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* peut, par contre, s'avérer très complexe. En effet, la maîtrise du couplage des deux opérations unitaires de biotransformation et de séparation peut se révéler très ardue, et ce, même si le métabolisme des lactocoques est en partie cerné et l'utilisation des membranes répandue en industrie laitière avec, par exemple, la stérilisation à froid du lait par microfiltration, la standardisation du taux protéique du lait ou l'extraction des protéines du lactosérum par ultrafiltration (Maugas et Daufin, 1992; Boyaval, 1994). Il peut par exemple devenir très difficile de définir un optimum de fonctionnement correct pour une installation de fermentation couplée à un module de microfiltration tangentielle, de fortes contraintes hydrodynamiques augmentant les flux de perméat mais nuisant à la viabilité et à l'activité des cellules (Bibal *et al.*, 1991). Enfin, une fois l'optimisation globale effectuée, les gains de productivité doivent se révéler

suffisamment importants pour justifier l'emploi de séparateurs coûteux à l'achat et en entretien (Altaba, 1991).

III.4.2. DOMAINES D'APPLICATION

Le principal domaine d'application de la fermentation extractive est bien évidemment la production d'acide lactique, vu les avantages physiologiques pouvant être tirés de l'extraction en continu de ce produit (Mehaia et Cheryan, 1986). Néanmoins, pour cette application, les lactobacilles, du fait de leur très forte activité acidifiante, sont largement préférés aux lactocoques (Timmer et Kronkamp, 1994; Schmidt *et al.*, 1994). L'extraction en continu de l'acide lactique peut être réalisée à l'aide de modules de microfiltration ou d'ultrafiltration (Ohleyer *et al.*, 1985; Altaba, 1991; Bibal *et al.*, 1991), d'osmose inverse (Timmer *et al.*, 1993 et 1994), de nanofiltration (Timmer *et al.*, 1993 et 1994) de dialyse (Friedman et Gaden, 1970; Stieber et Gerhardt, 1981), d'électrodialyse (Hongo *et al.*, 1986), ou encore par extraction liquide-liquide (Lazarova et Peeva, 1994) ou cristallisation (Vickroy, 1985).

Le deuxième domaine d'application de la fermentation extractive est la production de biomasse concentrée utilisée comme starter en industrie laitière (Taniguchi *et al.*, 1987; Prigent *et al.*, 1988; Bibal *et al.*, 1991). De fortes densités cellulaires ont en effet été atteintes en couplant un réacteur parfaitement agité avec un module d'ultrafiltration ou de microfiltration tangentielle. Néanmoins, les conditions hydrodynamiques prévalant dans la boucle d'ultrafiltration se sont révélées néfastes pour les cellules, avec une augmentation de la mortalité des cellules avec le nombre de passages dans la boucle de filtration, induisant des temps de latence pour les fermentations utilisant de tels ferments. Pour remédier à ce problème, Suzuki (1996) a introduit une cartouche de microfiltration directement dans un réacteur parfaitement agité. Avec un tel dispositif, une concentration cellulaire élevée de 141 g/l de matière sèche est obtenue avec une viabilité très satisfaisante de 94 %, les conditions douces d'agitation du réacteur aidant.

La fermentation extractive des lactocoques a aussi été envisagée pour la concentration de biomasse en vue de la production de superoxyde dismutase (Holst *et al.*, 1985) ou pour la production de bactériocines (Boyaval *et al.*, 1997). Pour ce qui est de la production d'arômes laitiers, Smith *et al.*, 1993 ont étudié le métabolisme de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* immobilisé en fibre creuse et ont noté une amélioration de production du diacétyle à pH faible (aussi bas que 4) et en présence de citrate en plus du sucre fermentescible. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a aussi été utilisé par Klaver *et al.* (1992) pour réaliser l'aromatisation de lait par fermentation dite interactive par deux souches de lactocoques, l'une métabolisant le citrate et réalisant l'aromatisation et l'autre non, dans deux réacteurs communiquant par le biais d'une membrane de dialyse. Au cours de telles cultures, le diacétyle formé dans le

réacteur d'aromatisation contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* est transféré à travers la membrane de dialyse dans le deuxième réacteur contenant le produit fini. Le diacétyle introduit ainsi dans le produit ne peut plus alors subir de réduction en acétoïne ou 2,3-butanediol, la souche croissant dans le réacteur de produit ne possédant pas cette activité réductasique. Un lait légèrement acidifié avec une aromatisation stable est ainsi obtenu. Toutefois, des performances identiques peuvent être atteintes pour un coût bien moindre avec des cellules immobilisées (Prévost *et al.*, 1994). Enfin, Ishii *et al.* (1995) ont réalisé le couplage d'un réacteur airlift contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* co-immobilisé avec de la catalase (Ochi *et al.*, 1991) avec un module de pervaporation pour l'extraction du diacétyle. La concentration élevée en diacétyle dans le réacteur, de l'ordre de plusieurs centaines de mg/l, et les bons rendements d'extraction ont permis, en mode discontinu, l'obtention de concentrations en diacétyle dans le perméat proches de 2 g/l. Ces performances très intéressantes doivent néanmoins être rapportées au coût d'un procédé aussi complexe. Un deuxième inconvénient de ce procédé provient de l'utilisation de catalase sous forme d'un extrait de foie bovin dont l'inocuité pour les consommateurs est sujette à caution.

RESULTATS - DISCUSSION

ETUDE D'UNE VOIE DE PRODUCTION DU DIACETYLE PAR *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

I. INTRODUCTION 77

II. PRODUCTION MICROBIOLOGIQUE DE DIACETYLE 78

III. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'AAL DANS L'EAU 82

IV. PRODUCTION BIOLOGIQUE DE DIACETYLE PAR DECARBOXYLATION OXYDATIVE EXTRACELLULAIRE DE L'AAL 84

IV.1. Cinétiques de décarboxylation oxydative extracellulaire 84
IV.1.1. Décarboxylation oxydative dans du milieu non fermenté 84
IV.1.2. Décarboxylation oxydative dans du microfiltrat de milieu fermenté 85
IV.2. Accumulation extracellulaire de l'AAL 86
IV.2.1. Recherche par méthode enzymatique 86
IV.2.2. Recherche par méthode chimique 89
IV.3. Conclusions 90

V. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'AAL DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES 91

V.1. Introduction 91
V.2. Décarboxylation oxydative intracellulaire de l'AAL 91
V.3. Effet d'un traitement thermique sur la décarboxylation oxydative 93
V.4. Influence de cofacteurs d'oxydo-réduction sur la décarboxylation oxydative 94

VI. CONCLUSIONS 97

I. INTRODUCTION

La production microbiologique du diacétyle, arôme dominant du beurre mais participant de façon non négligeable aux propriétés organoleptiques de nombreux produits laitiers fermentés présente un intérêt économique évident. Néanmoins, en dépit d'un grand nombre d'études menées sur ce sujet, des zones d'ombre subsistent concernant le mode de production de ce composé par les souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. En effet, deux voies métaboliques ont été formellement mises en évidence (figure III.1) : la première fait intervenir une réaction entre un complexe acétaldéhyde-TPP issu d'une activité pyruvate décarboxylase et l'acétyl-CoA catalysée par la diacétyle synthétase pour former directement le diacétyle (Speckman et Collins, 1968 et 1973), alors que la seconde implique la formation d'une molécule d'acétaldéhyde-TPP et sa condensation avec une molécule de pyruvate en AAL au niveau d'une acétolactate synthétase, puis la décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle (Verhue et Tjan, 1991).

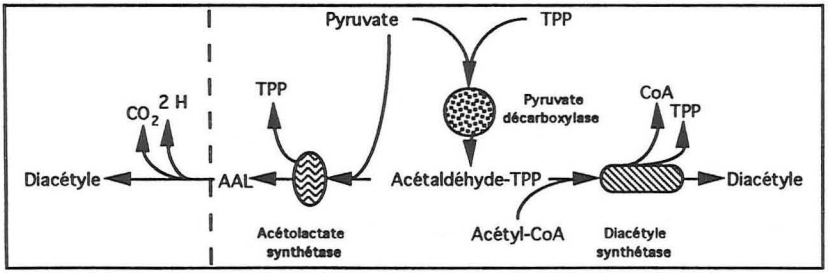


Figure III.1 : voies métaboliques de production du diacétyle.

Cependant, la participation cinétique respective de chacune de ces voies dans la production biologique du diacétyle n'a pas été déterminée, Speckman et Collins ayant constaté, sans pouvoir la quantifier, la coexistence d'une autre voie, et Verhue et Tjan n'ayant pas bénéficié d'une technique analytique à la limite inférieure de détection suffisamment faible pour évaluer la part de la voie de Speckman et Collins. L'absence d'identification de la diacétyle synthétase fait qu'à l'heure actuelle, la voie de l'AAL est considérée comme cinétiquement prépondérante. Toutefois, une étape demeure mal connue dans cette voie : la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle. En effet, bien que la capacité de ce composé à subir une décarboxylation oxydative spontanée soit reconnue (Veringa *et al*, 1984; Monnet *et al*, 1994), il n'est en aucun cas prouvé que la cinétique de cette réaction puisse correspondre aux productions microbiologiques observées. En particulier, il semble surprenant qu'une production de diacétyle puisse être obtenue par décarboxylation oxydative de l'AAL lors de cultures

anaérobies et à potentiel rédox négatif, conditions expérimentales défavorables pour une telle réaction (Stien, 1993). Qui plus est, certains auteurs ont observé une forte accumulation d'AAL par certaines cultures, sans possibilité de transformer ce composé en diacétyle, et ce même en aérant le milieu de culture (Curic, 1997). Enfin, les travaux de Ho Park *et al.* (1995) sur la décarboxylation oxydative *in vitro* d'AAL avec des coenzymes d'oxydo-réduction comme accepteurs d'électrons suggèrent un mécanisme plus complexe qu'une simple réaction spontanée en présence d'oxygène.

Devant ces données contradictoires, il nous a semblé nécessaire de nous intéresser à la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL dans des conditions physico-chimiques existant dans le milieu de culture et dans les cellules productrices de diacétyle pour déterminer si, d'un point de vue cinétique, la décarboxylation oxydative de l'AAL peut effectivement être à l'origine de la production microbiologique du diacétyle. Notre approche expérimentale est basée sur la comparaison cinétique de la production microbiologique de diacétyle avec les vitesses de décarboxylation oxydative, dans le milieu extracellulaire ou à l'intérieur des cellules. Cette comparaison, effectuée dans des conditions expérimentales défavorables pour la décarboxylation oxydative que sont l'anaérobiose et un faible potentiel rédox, doit non seulement permettre de déterminer la part éventuelle de la décarboxylation oxydative de l'AAL dans la production microbiologique du diacétyle, mais aussi, dans le cas où cette part serait importante, d'en déterminer la localisation et, enfin, de contribuer à l'amélioration des connaissances portant sur le mécanisme réactionnel éventuellement mis en jeu.

II. PRODUCTION MICROBIOLOGIQUE DE DIACETYLE

La production microbiologique de diacétyle est suivie au cours d'une culture de référence. Celle-ci a lieu avec la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacétylactis* SD 933 mise en œuvre au laboratoire au cours de précédentes études physiologiques (Stien, 1993). La culture se déroule dans le milieu semi-synthétique Y, et en anaérobiose, condition défavorable pour la décarboxylation oxydative de l'AAL. La température est fixée à 25 °C pour atteindre à la fois un niveau de production correct de diacétyle, et une croissance intéressante, nécessaire pour l'obtention ultérieure d'extraits cellulaires. Le pH choisi pour cette culture est de 5,5, suffisamment acide pour observer une bonne production de diacétyle, mais pas trop pour limiter l'apparition d'éventuels phénomènes de coagulation protéique.

❐ Production de biomasse

Dans de telles conditions expérimentales, la production de biomasse est relativement lente et régulière (figure III.2) avec une vitesse spécifique maximale de croissance proche de 0,4 h^{-1} atteinte après 2 h 30 de culture.

□ Catabolisme du lactose

Le lactose, substrat carboné principal, est totalement consommé lors de la culture, avec un pic de vitesse de consommation à 2,2 g/(l.h) en fin de culture (figure III.3). La vitesse spécifique de consommation est, par contre, maximale en début de culture (0,7 g de lactose consommé par g de biomasse et par h) et décroît tout au long de celle-ci. La cinétique de production d'acide lactique découle logiquement de celle de consommation du lactose. La concentration maximale en acide lactique est obtenue après 16 h de culture et la vitesse spécifique de production diminue tout au long de la culture. Le rendement global lactate/lactose est de 0,89 g/g, soit inférieur à la valeur théorique de 1,05 g/g pour une conversion totale du lactose en lactate. Donc, dans de telles conditions, plus de 10 % du flux carboné provenant du lactose est orienté vers des voies métaboliques autres que celle de la lactate déshydrogénase.

□ Clivage de l'acide citrique

Concernant l'acide citrique (figure III.4), la consommation totale intervient après un peu plus de 6 h de culture. La vitesse maximale de consommation de 0,3 g/(l.h) est atteinte avant 5 h de culture alors que la vitesse spécifique de consommation décroît de 0,4 g/g de biomasse/h en début de culture à 0 après 7 h. L'acide acétique est produit d'abord avec une vitesse importante (0,09 à 0,04 g/(l.h)) en parallèle de la consommation de l'acide citrique, au cours des 7 premières heures de culture. Après consommation totale du citrate, la production d'acétate continue, du fait de l'activité pyruvate-formate lyase (PFL) ou pyruvate déshydrogénase (PDH), mais avec une vitesse moins élevée (initialement 0,01 g/(l.h)) et en décroissance constante. La vitesse spécifique de production diminue tout au long de la culture pour atteindre une valeur quasi nulle après 10 h. Le rendement de production d'acétate à partir du citrate est de 0,4 g/g, soit supérieur au rendement de production d'acétate par la citrate lyase de théoriquement 0,3125 g/g. De l'acide acétique est donc formé à partir du pyruvate découlant de la dégradation du citrate ou du lactose, et ce probablement par la PFL, l'activité PDH étant limitée dans les conditions expérimentales adoptées (Hugenholtz, 1993).

□ Production d'acide pyruvique

L'acide pyruvique, intermédiaire commun du métabolisme du lactose et du citrate, voit sa concentration dans le milieu augmenter au cours des 4 premières heures de co-consommation du lactose et du citrate. La concentration se stabilise ensuite jusqu'à 9 h où intervient une diminution progressive (figure III.5).

Culture anaérobie de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* SD 933 en anaérobiose, à 25 °C dans du milieu Yet à un pH régulé à 5,5.

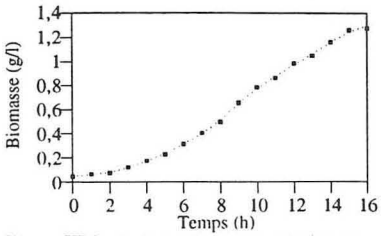


Figure III.2 : évolution de la concentration en biomasse.

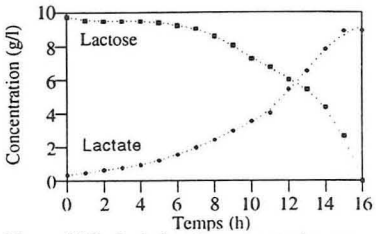


Figure III.3 : évolution des concentrations en lactose et acide lactique.

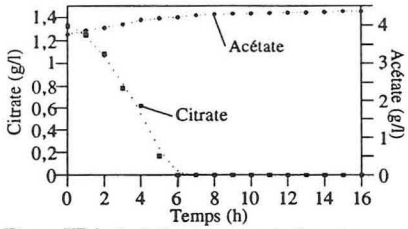


Figure III.4 : évolution des concentrations en acides citrique et acétique.

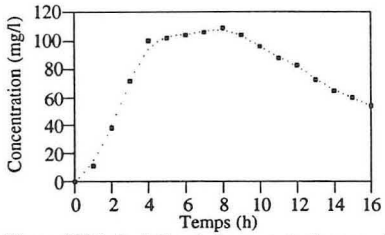


Figure III.5 : évolution de la concentration en acide pyruvique.

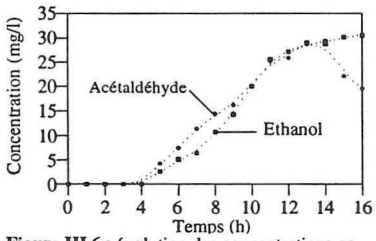


Figure III.6 : évolution des concentrations en acétaldéhyde et éthanol.

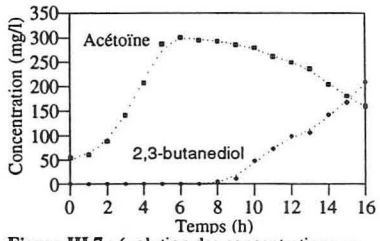


Figure III.7 : évolution des concentrations en acétoïne et 2,3-butanediol.

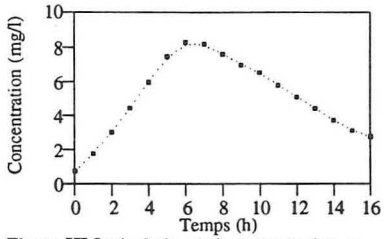


Figure III.8 : évolution de la concentration en diacétyle.

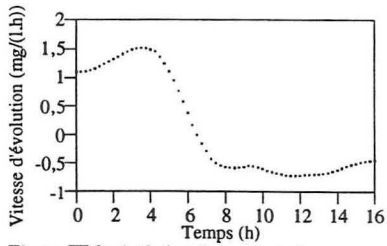


Figure III.9 : évolution de la vitesse de production/consommation du diacétyle.

□ Orientation du flux carboné vers la PFL et la PDH

Comme nous l'avons vus dans le paragraphe consacré au clivage du citrate, une production excédentaire d'acétate a lieu après épuisement du citrate dans le milieu de culture, cet acide acétique pouvant être formé à partir de l'acétyl-coenzyme A issu de l'action de la PFL ou de la PDH. La production d'acétaldéhyde et d'éthanol, pouvant eux-aussi provenir de l'action de la PFL et de la PDH, commence à partir du moment où la concentration en acide pyruvique atteint un plateau (figures III.5 et III.6). La production d'éthanol se poursuit pendant la fermentation alors que la concentration en acétaldéhyde décroît à partir de 13 h de culture. Le démarrage de la production d'acétaldéhyde et d'éthanol, après 4 h de culture, peut être associé à une dérépression de la PFL par les intermédiaires de la glycolyse, c'est-à-dire à l'atteinte d'un flux glycolytique critique dans les cellules, du fait de la diminution de la vitesse spécifique de consommation du lactose au cours de la culture. L'atteinte du plateau concernant la concentration d'acide pyruvique peut de même être expliquée par l'augmentation de l'activité PFL et / ou PDH, fournissant un débouché supplémentaire au pyruvate, et mettant donc un terme à son accumulation dans le milieu.

□ Orientation du flux carboné vers la production de molécules en C4

Les concentrations en acétoïne et diacétyle augmentent dès le début de la culture pour atteindre un maximum avec l'épuisement du citrate (figures III.7 et III.8). Ensuite, les concentrations de ces deux composés diminuent, avec en parallèle le début de la production de leur dérivé réduit, le 2,3-butanediol. Ce phénomène peut facilement être expliqué par la dérépression de la diacétyle réductase en absence d'acide citrique (Mellerick et Cogan, 1981). Pour ce qui est du diacétyle, la vitesse de production est importante dès le début de la fermentation (supérieure à 1 mg/(l.h)) puis augmente jusqu'à un maximum de 1,5 mg/(l.h) après 4 h de culture. La vitesse diminue ensuite jusqu'à 0, au moment où le citrate est épuisé (figure III.9). La diminution de la vitesse à 4 h de culture correspond au début de la dérépression de la PFL, qui prive alors la ou les voies de production du diacétyle d'une partie de l'acide pyruvique. Après 6 h, la vitesse devient négative, le diacétyle produit et excrété étant peu à peu reconsommé par réduction en acétoïne ou 2,3-butanediol par action de la diacétyle réductase.

La valeur maximale de la vitesse de production de diacétyle observée au cours de cette culture sera utilisée comme référence pour la comparaison avec les vitesses de production de diacétyle par décarboxylation oxydative de l'AAL. A cet instant de la culture, la concentration en biomasse atteint 150 mg/l, soit une vitesse spécifique de production de 10 mg/g de biomasse/h. Qui plus est, le potentiel rédox atteint alors - 83,7 mV, valeur *a priori* défavorable pour une réaction de décarboxylation oxydative.

III. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'AAL DANS L'EAU

La réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL est suivie, dans un premier temps, dans de l'eau, en anaérobiose, et dans des conditions de température et d'agitation identiques à celles de la culture réalisée à pH 5,5. Cette première étape vise à valider le dispositif expérimental pour le suivi de la réaction de décarboxylation oxydative et à en définir les modalités de fonctionnement. De plus, ces expériences doivent fournir des valeurs témoins de réactivité de l'AAL.

Pour ce faire, les cinétiques de décarboxylation oxydative de l'AAL sont déterminées dans de l'eau osmosée dans une large gamme de pH, allant de 4 à 9,1, avec un intervalle approximatif de 0,5 unité pH. Quel que soit le pH, des courbes linéaires d'évolution de la concentration en diacétyle au cours du temps sont obtenues, des exemples étant montrés au niveau de la figure III.10. Les évolutions sont indiquées en concentration relative (concentration initiale rapportée à 0) pour faciliter la comparaison.

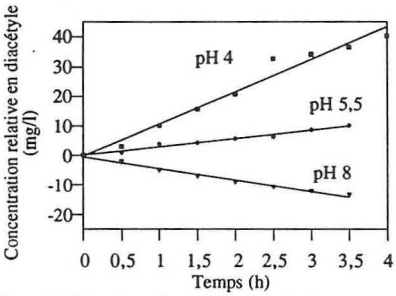


Figure III.10 : évolution de la concentration en diacétyle en fonction du temps à différents pH dans de l'eau bi-osmosée.

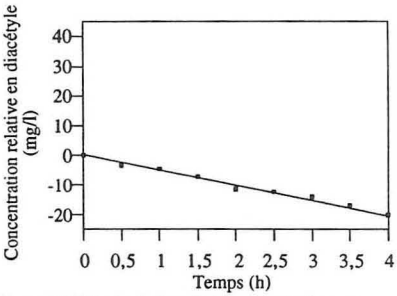


Figure III.11 : évolution de la concentration en diacétyle en fonction du temps dans de l'eau bi-osmosée.

Pour des pH allant de 4 à 7,5, des productions de diacétyle sont observées alors que pour des pH supérieurs à 7,5, une diminution de la concentration en diacétyle a lieu. Dans ce dernier cas, des dosages d'acétoïne et de 2,3-butanediol dans le milieu ne révèlent aucune production de ces composés à partir du diacétyle. Cette perte de diacétyle est donc la conséquence du mode de fonctionnement du dispositif expérimental. La cause la plus évidente de ces pertes est la purge régulière du réacteur avec de l'azote pour maintenir l'anaérobiose, et ce malgré l'utilisation d'un dispositif de condensation en sortie de gaz. Pour évaluer les pertes en diacétyle dues au fonctionnement du réacteur, une solution diluée de diacétyle est introduite dans le réacteur et l'évolution de la concentration est suivie (figure III.11). Une perte constante de 5,2 mg/(l.h) est observée, suite au balayage du réacteur par de l'azote. En additionnant cette valeur de pertes aux vitesses de production et disparition brutes du diacétyle dans un milieu contenant de l'AAL, des valeurs de

réactivités réelles de l'AAL en anaérobiose dans l'eau ou valeurs corrigées sont obtenues (figure III.12).

Les vitesses de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle ainsi obtenues sont très élevées à bas pH et décroissent avec l'augmentation du pH. Ces vitesses de production très élevées n'étaient pas attendues, le milieu réactionnel, de l'eau bi-osmosée purgée à l'azote, ne contenant pas d'accepteur d'électrons pour la réaction de décarboxylation oxydative. Qui plus est, ces réactivités ont été observées à des potentiels rédox eux aussi défavorables, variant entre - 80 et -160 mV. En dépit de la diminution de la vitesse de réaction avec l'augmentation du pH, la vitesse de décarboxylation oxydative est encore très élevée à pH 5,5 dans l'eau : 8 mg/(l.h). Cette valeur est 5 fois supérieure à la vitesse de production microbiologique de diacétyle observée à ce même pH. Néanmoins, cette réactivité élevée dans l'eau n'augure rien des vitesses de décarboxylation oxydative de l'AAL dans le milieu de culture ou à l'intérieur des cellules. Cette valeur doit donc plutôt être considérée comme un témoin que comme une indication réellement significative.

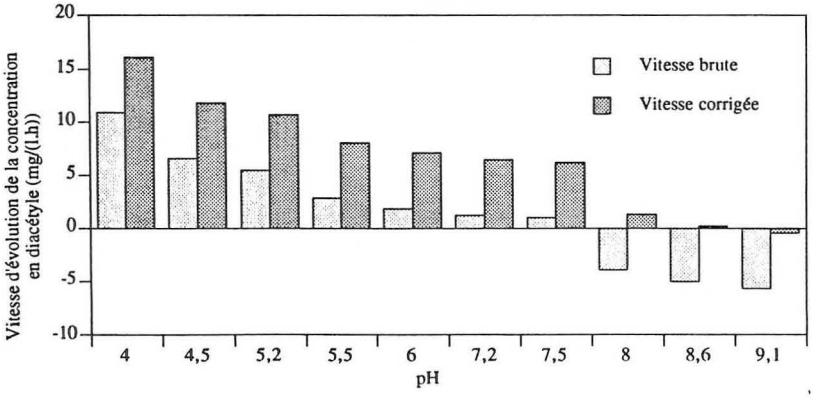


Figure III.12 : vitesses brutes et corrigées de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle en anaérobiose dans de l'eau osmosée.

Quoi qu'il en soit, cette forte réactivité de l'AAL et la décroissance de la vitesse de décarboxylation oxydative avec l'augmentation du pH sont tout à fait en accord avec les résultats de la littérature (Veringa *et al.*, 1984), ce qui confirme le bon fonctionnement de notre dispositif expérimental. D'un point de vue pratique, pour un meilleur suivi des cinétiques de décarboxylation oxydative ultérieures, celles-ci se dérouleront sans flux constant d'azote, le recours à des injections de ce gaz étant limité à la purge initiale du milieu réactionnel de toute trace d'oxygène et aux phases d'ajout des réactifs.

IV. PRODUCTION BIOLOGIQUE DE DIACETYLE PAR DECARBOXYLATION OXYDATIVE EXTRACELLULAIRE DE L'AAL

IV.1. CINETIQUES DE DECARBOXYLATION OXYDATIVE EXTRACELLULAIRE

La réaction de décarboxylation oxydative est ensuite étudiée dans des conditions physico-chimiques extracellulaires. De telles conditions peuvent être atteintes dans du milieu de culture frais, correspondant aux conditions initiales extracellulaires de fermentation, et dans du milieu fermenté filtré, correspondant aux conditions extracellulaires en cours de culture.

IV.1.1. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DANS DU MILIEU NON FERMENTE

Tout comme pour l'eau, la réactivité de l'AAL a été évaluée dans le milieu Y en fonction du pH et des cinétiques de production linéaires de diacétyle à partir d'AAL sont obtenues, avec une vitesse de réaction fortement dépendante du pH. Des vitesses très importantes sont atteintes entre pH 4 et 5 avec un maximum de 5,9 mg/(l.h) à pH 4, alors qu'au delà de pH 5, les vitesses de production sont faibles ou nulles. Ces expériences prouvent qu'à bas pH, en anaérobiose et à faible potentiel rédox (entre -97,7 et -181,5 mV), la décarboxylation oxydative de l'AAL est possible dans le milieu de culture non fermenté.

Les valeurs obtenues indiquent cependant une réactivité plus faible de l'AAL dans le milieu Y que dans l'eau, chose surprenante, le milieu Y étant *a priori* susceptible de contenir des accepteurs d'électrons pour la réaction de décarboxylation oxydative. Qui plus est, cette réactivité plus faible ne peut être due à une décarboxylation non oxydative de l'AAL ou à une réduction du diacétyle produit, les concentrations en acétoïne et 2,3-butanediol restant constantes au cours des expériences, après une légère phase de production lors de l'hydrolyse de l'ester d'AAL.

En ce qui concerne la décarboxylation oxydative d'AAL à pH 5,5, aucune production de diacétyle n'est détectée. Pourtant, les conditions expérimentales dans lesquelles est suivie la réaction, avec en particulier un potentiel rédox de -108 mV, sont proches de celles relevées en culture discontinue à pH 5,5 au moment où la vitesse de production microbiologique du diacétyle est maximale avec un potentiel rédox de -83,7 mV. Il apparaît donc que la décarboxylation oxydative de l'AAL en anaérobiose dans le milieu Y non fermenté n'est pas un mécanisme cinétiquement très important pour justifier la production microbiologique de diacétyle dans des conditions comparables. Toutefois, il est possible que la présence des cellules dans le milieu induise des modifications physico-chimiques importantes et favorise la décarboxylation oxydative.

IV.1.2. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DANS DU MICROFILTRAT DE MILIEU FERMENTE

Des expériences du même type réalisées dans du microfiltrat de culture anaérobie réalisée à pH 5,5 ont montré une fois encore la forte dépendance de la réaction de décarboxylation oxydative du pH du milieu. Une réactivité maximale correspondant à une vitesse de production de 2,2 mg/(l.h) a été atteinte à un pH de 4. La vitesse de production de diacétyle à partir d'AAL décroît ici encore avec l'augmentation du pH. Bien que la valeur maximale de la réactivité soit plus faible dans le milieu fermenté microfiltré que dans le milieu frais, la décroissance de l'activité en fonction du pH est plus lente dans le microfiltrat de culture.

Ainsi, pour un pH de 5,5, la réactivité de l'AAL correspond encore à 0,5 mg/(l.h), ce qui est supérieur à la valeur obtenue dans du milieu non filtré. De même qu'avec le milieu non filtré, ces réactivités plus faibles que dans l'eau ne peuvent être imputées à une décarboxylation non oxydative de l'AAL ou à une réduction du diacétyle formé, les concentrations en acétoïne et 2,3-butanediol n'évoluant pas au cours des expériences après l'hydrolyse de l'ester d'AAL. Néanmoins, cette valeur de 0,5 mg/(l.h), bien que non négligeable, reste encore trop faible pour pouvoir expliquer la vitesse maximale de production de diacétyle observée en culture anaérobie à pH 5,5 (tableau III.1). Le potentiel rédox, légèrement plus bas au cours des expériences dans les milieux de culture qu'au cours de la phase de production maximale de diacétyle en fermentation, ne peut entraîner une telle diminution de la réactivité de l'AAL.

Conditions	Culture	Eau	Milieu Y	Microfiltrat de milieu Y
Vitesse de production de diacétyle (mg/(l.h))	1,5	8	0	0,5
Potentiel rédox (mV)	-83,7	-94	-108	-126

Tableau III.1 : tableau récapitulatif des vitesses de production biologique et décarboxylation oxydative de l'AAL en anaérobiose et à pH 5,5.

Ces expériences montrent donc que la production microbiologique de diacétyle ne peut cinétiquement parlant provenir uniquement d'une décarboxylation oxydative extracellulaire de l'AAL. Néanmoins, au vu de ces résultats, un tiers de la production de diacétyle pourrait toutefois en provenir, pour peu que de l'AAL soit effectivement présent dans le milieu, comme c'était le cas au cours des expériences de suivi de décarboxylation oxydative. L'étape suivante de notre travail consiste donc à rechercher une éventuelle accumulation extracellulaire d'AAL au cours de cultures anaérobies à pH 5,5 de la souche de référence.

IV.2. ACCUMULATION EXTRACELLULAIRE DE L'AAL

La présence ou l'accumulation transitoire d'AAL dans le milieu de culture est recherchée afin de déterminer si le substrat de la réaction de décarboxylation oxydative est effectivement présent au niveau extracellulaire et donc de savoir si les vitesses de décarboxylation oxydative déterminées dans des conditions extracellulaires peuvent être considérées comme significatives.

IV.2.1. RECHERCHE PAR METHODE ENZYMATIQUE

La méthode enzymatique de détection extracellulaire de l'AAL est basée sur une modification cinétique de l'éventuelle production extracellulaire de diacétyle par décarboxylation oxydative d'AAL par ajout dans le milieu d'une enzyme catalysant la production d'acétoïne au détriment du diacétyle, l'acétolactate décarboxylase ou ADC (figure III.13). Ainsi, la présence d'AAL est révélée par une diminution de la production de diacétyle dans une culture avec ADC par rapport à une culture sans l'enzyme.

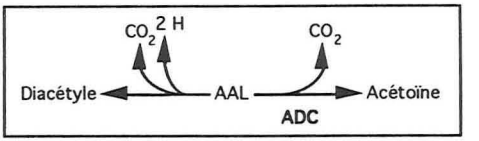


Figure III.13 : réactions de décarboxylation de l'AAL.

Des cultures comparatives avec et sans ADC ont été réalisées en anaérobiose et à un pH de 5,5. Les consommations des substrats carbonés, les productions des métabolites primaires et des composés en C4 sont reportées dans le tableau III.2.

ADC	-	+
Biomasse produite (g/l)	0,9	1,1
Lactose consommé (g/l)	9,8	9,9
Lactate produit (g/l)	9,3	9,4
Citrate consommé (g/l)	1,5	1,5
Acétate produit (g/l)	0,5	0,5
Diacétyle produit (mg/l) *	7,3	7,8
Acétoïne produite (mg/l) *	214	264
2,3-butanediol produit (mg/l) *	226	241

Tableau III.2 : effet de l'ADC sur le métabolisme primaire et la production de molécules en C4 par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacétylactis* SD 933 cultivé en anaérobiose à pH 5,5.
+ présence d'ADC - absence d'ADC * Niveau maximal atteint durant les 16 h de culture.

La comparaison des fermentations avec et sans ADC ne révèle pas de différence flagrante au niveau du métabolisme du citrate et du lactose : ces deux composés sont tous deux totalement consommés dans des temps comparables, avec formation d'acétate et de citrate dans des proportions identiques. Seule la production de biomasse est légèrement améliorée par la présence d'ADC dans le milieu de culture. Il apparaît donc que l'extrait enzymatique contenant l'ADC n'a pas d'effet drastique sur le métabolisme primaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* SD 933.

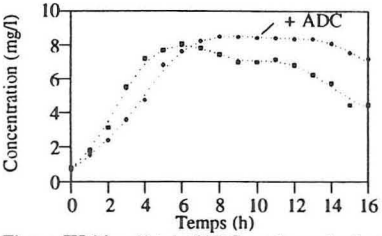


Figure III.14 : effet de l'ADC sur la production de diacétyle lors de cultures anaérobies à pH 5,5.

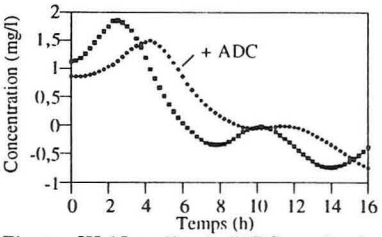


Figure III.15 : effet de l'ADC sur la vitesse d'évolution de la concentration en diacétyle lors de cultures anaérobies à pH 5,5.

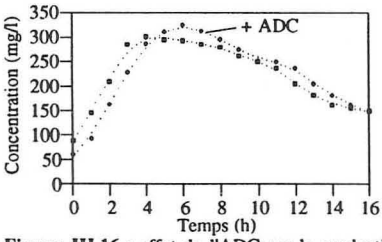


Figure III.16 : effet de l'ADC sur la production d'acétoïne lors de cultures anaérobies à pH 5,5.

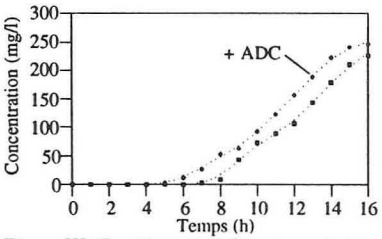


Figure III.17 : effet de l'ADC sur la production de 2,3-butanediol lors de cultures anaérobies à pH 5,5.

Concernant le métabolisme des composés en C4, la quantité de diacétyle produite avec de l'ADC est supérieure à celle produite lors de la culture de référence (figure III.14). La production de diacétyle en présence d'ADC démarre plus lentement que sans l'enzyme et atteint une vitesse maximale inférieure à celle observée sans ADC. Néanmoins, la décroissance de la vitesse de production est plus lente en présence d'ADC, d'où une concentration supérieure en diacétyle atteinte (figure III.15). L'acétoïne et sa forme réduite, le 2,3-butanediol, sont plus produits en présence de l'enzyme, avec une différence de 50 mg/l pour l'acétoïne et de 15 mg/l pour le 2,3-butanediol, représentant respectivement une amélioration de 23 et 7 % (figures III.16 et III.17). La production d'acétoïne commence dès le début de la culture avec ou sans enzyme, mais se prolonge plus en présence d'ADC. En conséquence, l'acétoïne atteint une concentration plus importante en présence d'ADC et le niveau maximal est atteint plus tardivement en présence d'ADC avec un décalage de 2 h par rapport à la culture sans ADC. Par contre, la production de 2,3-butanediol commence avec 2 h d'avance lors de la culture avec ADC par rapport à la culture sans, les vitesses de production étant ensuite équivalentes.

Il ressort de ces résultats qu'un large excès d'activité ADC, ajouté au niveau extracellulaire, n'a pas permis de diminuer significativement la quantité de diacétyle produite. Il est toutefois difficile de conclure à l'absence d'AAL au niveau extracellulaire, la quantité d'acétoïne produite ayant été accrue en présence d'ADC. En effet, cette surproduction d'AAL peut tout à fait être un artéfact dû à la composition de l'extrait enzymatique, ou être la conséquence d'une présence effective d'AAL au niveau extracellulaire, le diacétyle étant quant à lui formé au niveau intracellulaire et voyant sa production non affectée par l'ADC.

Pour tirer des informations supplémentaires, cette méthode a été appliquée à une culture continue anaérobie réalisée à pH de 5,5 et à un taux de dilution correspondant à la vitesse spécifique de croissance observée en mode discontinu lors de la phase de production maximale de diacétyle. Après atteinte de l'état stationnaire sans ADC à ce taux de dilution (0,29 h^{-1}), un échelon d'ADC a été appliqué et un nouvel état stationnaire observé. Le tableau III.3 récapitule les concentrations en substrats, biomasse, métabolites primaires et composés en C4 atteintes pour ces deux états stationnaires.

ADC	-	+
Biomasse (g/l)	0,8	0,6
Lactose (g/l)	7,3	7,2
Lactate (g/l)	2,4	2,5
Citrate (g/l)	0,6	0,6
Acétate (g/l)	4,0	4,0
Diacétyle (mg/l)	3,8	3,7
Acétoïne (mg/l)	194	222
2,3-butanediol (mg/l)	33	32

Tableau III.3 : effet de l'ADC sur le métabolisme primaire et la production de molécules en C4 par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacétylactis* SD 933 cultivé en mode continu à un taux de dilution de 0,29 h^{-1} en anaérobiose et à pH 5,5. + présence d'ADC - absence d'ADC.

Les états stationnaires obtenus confirment les résultats obtenus en mode discontinu. La croissance est légèrement améliorée par la présence de l'extrait enzymatique alors que les consommations de lactose et citrate et les productions de lactate et d'acétate ne sont pas affectées par l'ajout de l'enzyme. L'extrait enzymatique n'a donc pas d'effet perturbateur majeur sur le métabolisme primaire de la souche employée en culture continue. Pour ce qui est de la production de molécules en C4, les concentrations en diacétyle et 2,3-butanediol sont comparables avec ou sans enzyme. L'absence d'effet sur la concentration en 2,3-butanediol tient au fait que, dans les conditions opératoires, du citrate est encore présent et inhibe la reconsommation de l'acétoïne par l'acétoïne réductase. Le 2,3-butanediol reste donc présent à une faible concentration. Concernant le diacétyle, la conservation du niveau de production en présence d'une forte activité ADC extracellulaire suggère que sa synthèse

a lieu au niveau intracellulaire. Qui plus est, comme c'est le cas pour le 2,3-butanediol, l'ajout de l'ADC n'influe pas sur une éventuelle reconsommation par la diacétyle réductase. Néanmoins, l'augmentation de la production d'acétoïne peut très bien résulter de la présence extracellulaire d'AAL.

Il ressort donc de l'utilisation extracellulaire de l'ADC que la localisation de la production de diacétyle est très probablement intracellulaire, sans pouvoir conclure quant à la voie métabolique empruntée (voie de Speckman et Collins ou voie de l'AAL). L'observation d'une augmentation de la concentration en acétoïne en présence d'ADC est plus problématique, car elle peut provenir de la présence extracellulaire d'AAL. Il devient donc nécessaire de recourir à une autre méthode de dosage extracellulaire de l'AAL pour pouvoir évaluer efficacement la part de la décarboxylation oxydative extracellulaire de l'AAL dans la production microbiologique du diacétyle.

IV.2.2. RECHERCHE PAR METHODE CHIMIQUE

Le principe de cette méthode, mise en œuvre initialement par Mathis (1989) dans des moûts brassicoles, est le suivant : du milieu extracellulaire est prélevé en anaérobiose stricte par microfiltation et la concentration en diacétyle est alors mesurée. L'échantillon subit ensuite, soit une oxydation douce en présence d'oxygène (injection d'air à 30 VVM pendant 30 s), soit une oxydation plus dure avec du $KMnO_4$ à raison de 250 mg/l d'échantillon. Ces opérations d'oxydation de l'échantillon permettent la rapide transformation d'AAL éventuellement présent en diacétyle. La concentration en diacétyle est ensuite mesurée toutes les 15 mn pendant 2 à 3 h pour détecter une production de ce composé. La différence de concentrations en diacétyle dans l'échantillon avant et après oxydation est révélatrice de la présence extracellulaire d'AAL dans le milieu extracellulaire.

Durée de culture (h)	3			6			9		
Oxydation	-	O_2	$KMnO_4$	-	O_2	$KMnO_4$	-	O_2	$KMnO_4$
Lactose (g/l)	8,9	8,8	8,9	8,0	7,9	7,9	5,6	5,6	5,6
Lactate (g/l)	0,8	0,8	0,8	1,7	1,8	1,8	4,0	3,9	3,9
Citrate (g/l)	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
Acétate (g/l)	4,1	4,1	4,1	4,2	4,1	4,2	4,2	4,2	4,2
Diacétyle (mg/l)	6,2	6,2	6,2	7,2	7,1	7,2	7,1	7,1	7,1
Acétoïne (mg/l)	131	133	129	165	163	170	265	260	268
2,3-butanediol (mg/l)	28	25	27	27	27	29	25	32	27

Tableau III.4 : effet d'oxydations au permanganate de potassium et à l'oxygène sur le contenu extracellulaire à différents temps d'une culture discontinue anaérobie réalisée à pH 5,5.

En premier lieu, il a été constaté que l'étape de microfiltration ne modifie pas le contenu du milieu de culture. Aucune rétention n'a été détectée concernant les substrats et

métabolites dosés (lactose, lactate, citrate, acétate, pyruvate, acétaldéhyde, éthanol et composés en C4), les concentrations de ces produits obtenues par dosage dans le milieu de culture ou par dosage dans le microfiltrat étant quasi identiques.

Au niveau des échantillons de milieu extracellulaire recueillis après 3, 6 ou 9 h de culture, les opérations d'oxydation par oxygénation ou ajout de permanganate n'ont pas modifié les concentrations des substrats et métabolites principaux (tableau III.4). En ce qui concerne les composés en C4, en général et le diacétyle en particulier, aucun changement de concentration n'a été induit par les oxydations. Ces résultats indiquent donc que l'AAL n'est pas présent en quantité détectable dans le milieu extracellulaire.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par méthode enzymatique montre que la surproduction d'acétoïne observée en présence d'ADC est due à un artéfact causé par l'extrait enzymatique, l'AAL n'étant pas présent au niveau extracellulaire. L'analyse par CLHP des acides organiques et glucides de l'extrait enzymatique révèle que l'enzyme est conservée dans du glycérol, non métabolisé par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (chapitre II, paragraphe I.1) avec des concentrations faibles de substrats éventuellement catabolisables par la souche (Lactose : 1,2 g/l et glucose : 0,64 g/l). Cet apport en substrats étant très limité vu le faible volume d'extrait ajouté au milieu (ml/l), cette surproduction d'acétoïne doit donc provenir d'autres composés présents dans l'extrait, mais non identifiés. Il est donc préférable, à l'avenir de recourir à une forme purifiée de l'ADC disponible maintenant chez Sigma pour la mise en œuvre de la méthode enzymatique de détection de l'AAL.

IV.3. CONCLUSIONS

Au vu des cinétiques de décarboxylation oxydative de l'AAL dans des conditions physico-chimiques proches de celles existant au niveau extracellulaire en culture discontinue anaérobie à pH 5,5, il apparaît clairement que cette réaction extracellulaire n'est pas assez importante, cinétiquement parlant, pour pouvoir expliquer les productions microbiologiques de diacétyle observées dans des conditions identiques. Qui plus est, le dosage du substrat de la réaction, l'AAL, dans des microfiltrats de milieu de culture n'a pas permis de mettre en évidence une quantité détectable de ce composé. Enfin, l'ajout extracellulaire d'une enzyme entrant en compétition avec la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle n'a pas permis de diminuer la quantité de diacétyle formé. En conséquence, il est possible d'écarter la décarboxylation oxydative extracellulaire de l'AAL en tant que mécanisme dominant de production du diacétyle par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* SD 933 cultivé en anaérobiose à pH 5,5.

Les expériences réalisées avec l'ADC suggérant un mode de production intracellulaire du diacétyle, sans présager de la voie empruntée, l'étude de la décarboxylation oxydative de l'AAL doit être poursuivie au niveau intracellulaire.

V. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'AAL DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES

V.1. INTRODUCTION

Afin de déterminer des cinétiques de décarboxylation oxydative de l'AAL dans des conditions intracellulaires, des extraits cellulaires correspondants sont préparés par traitement au lysozyme puis choc osmotique de cellules de la souche de référence issues d'une culture anaérobie à pH 5,5 en réacteur parfaitement agité de 20 l concentrées par microfiltration. Ces extraits, préparés sous atmosphère d'azote, sont ensuite transférés en réacteur parfaitement agité de 2 l avec capteur à molécules volatiles pour l'évaluation des cinétiques de décarboxylation oxydative intracellulaire. Les vitesses indiquées dans les paragraphes suivants sont exprimées à quantité de biomasse équivalente à celle présente en culture discontinue à pH 5,5 quand la vitesse maximale de production de diacétyle est atteinte (150 mg/l de matière sèche), de façon à établir plus aisément les comparaisons entre cinétiques de décarboxylation oxydative intracellulaire et production microbiologique de diacétyle. De plus, la culture de référence étant réalisée à pH 5,5, les cinétiques de décarboxylation oxydative intracellulaire de l'AAL sont déterminées pour une gamme de pH correspondant au pH intracellulaire d'une culture de lactocoques effectuée à un pH extracellulaire de 5,5. Les pH choisis, 6,25, 6,75 et 7,25, tiennent compte à la fois de mesures effectuées au laboratoire par cytométrie en flux, et de résultats d'études d'autres équipes sur les lactocoques (Poolman *et al.* 1987; Cook et Russel 1994).

V.2. DECARBOXYLATION OXYDATIVE INTRACELLULAIRE DE L'AAL

La réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL est étudiée pour les 3 pH considérés en anaérobiose par ajout d'AAL dans les extraits cellulaires et suivi de la production de diacétyle. Les substrats carbonés et métabolites ont été dosés au cours de ces expériences pour quantifier d'éventuelles activités enzymatiques résiduelles. Les concentrations initiales et finales, après 8 h de réaction, de ces composés sont reportées dans le tableau III.5. Concernant les substrats carbonés et métabolites primaires (lactose, lactate, citrate et acétate), aucune variation significative de la concentration n'est observée au cours des différentes expériences. Pourtant, pour chacune de ces expériences, une augmentation de la concentration du pyruvate, intermédiaire du métabolisme du lactose et du citrate a lieu dans le milieu réactionnel. L'origine de cette production est difficile à identifier, le pyruvate pouvant provenir de la transformation d'intermédiaires de la glycolyse non dosés ou du métabolisme des acides aminés. Pour ce qui est des autres composés, comme pour les substrats et métabolites primaires, aucune variation significative de concentration n'est mise en évidence. Il en résulte, pour le métabolisme des

composés en C4, que les activités ADC et diacétyle réductase de l'extrait cellulaire n'interfèrent pas avec les mesures de décarboxylation oxydative de l'AAL en diacétyle.

pH	6,25		6,75		7,25	
Concentration	initiale	finale	initiale	finale	initiale	finale
Lactose (g/l)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Lactate (g/l)	2,0	2,0	1,9	2,0	1,9	2,0
Citrate (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acétate (g/l)	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
Pyruvate (mg/l)	9,9	30,5	5,8	18,1	3,6	41,7
Acétaldéhyde (mg/l)	0	0	0	0	0	0
Ethanol (mg/l)	121	128	126	122	121	124
Diacétyle (mg/l)	2,0	8,4	0,5	7,2	1,3	3,9
Acétoïne (mg/l)	12	14	13	10	9	10
2,3-butanediol (mg/l)	101	95	108	102	115	121

Tableau III.5 : comparaison des concentrations initiales et finales des substrats et métabolites carbonés lors d'expériences de suivi de décarboxylation oxydative dans des extraits cellulaires de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bv. *diacetylactis SD 933* .

Une production importante de diacétyle à partir d'AAL est observée, quel que soit le pH (figures III.18 à III.20). Les cinétiques de production de diacétyle sont biphasiques, avec une première phase rapide à vitesse constante dénommée v_1 suivie d'une seconde phase plus lente elle aussi à vitesse constante et dénommée v_2 (tableau III.6).

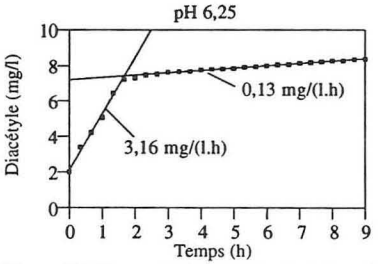


Figure III.18 : production de diacétyle à partir d'AAL dans un extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à pH 6,25.

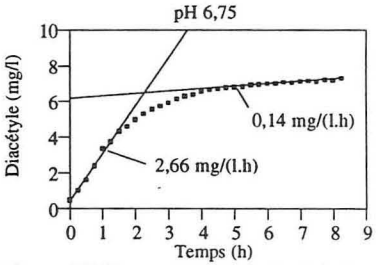


Figure III.19 : production de diacétyle à partir d'AAL dans un extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à pH 6,75.

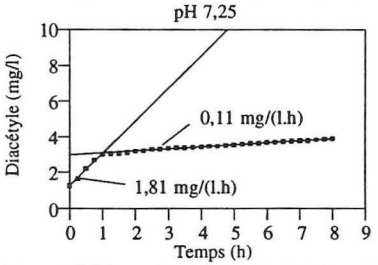


Figure III.20 : production de diacétyle à partir d'AAL dans un extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à pH 7,25.

pH	v_1 (mg/(l.h)	v_2 (mg/(l.h)
6,25	3,16	0,13
6,75	2,66	0,14
7,25	1,81	0,11

Tableau III.6 : vitesses de décarboxylation oxydative de l'AAL dans un extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en fonction du pH.

La première phase est relativement courte (1 h à 1 h 30 mn) avec une vitesse pouvant atteindre plus de 3 mg/(l.h). La vitesse de cette première phase est dépendante du pH, avec une diminution lorsque le pH augmente, tout comme c'est le cas dans l'eau ou le milieu de culture. Par contre, la deuxième phase, d'une durée plus longue, ne voit pas sa cinétique influencée par le pH. Lors de ces expériences, les productions de diacétyle sont limitées (<10 mg/l) en regard de la concentration initiale d'AAL. La disponibilité de l'AAL n'est donc pas le facteur pouvant expliquer la transition d'une phase rapide à une phase lente. La présence de ces deux phases distinctes, avec des effets différents du pH suggère l'existence de deux mécanismes de décarboxylation oxydative de l'AAL. Ce changement de phase peut être expliqué par l'intervention dans la phase rapide d'un composé très réactif présent en quantité limitée dans l'extrait et rapidement épuisé, ne laissant plus qu'une réactivité de base. La dépendance du pH de la vitesse de la phase rapide peut être la conséquence de l'intervention d'un réactif plus complexe que pour la phase lente, dont la cinétique n'est pas influencée par le pH. Quoi qu'il en soit, au vu des vitesses de décarboxylation oxydative de la première phase, il apparaît que la décarboxylation oxydative de l'AAL peut tout à fait être à l'origine de la production microbiologique du diacétyle, et ce, dans des conditions physico-chimiques pourtant défavorables pour une telle réaction (anaérobiose et potentiel rédox inférieur à -350 mV).

V.3. EFFET D'UN TRAITEMENT THERMIQUE SUR LA DECARBOXYLATION OXYDATIVE

Pour recueillir des informations complémentaires sur le mécanime de production du diacétyle par décarboxylation oxydative de l'AAL, l'extrait cellulaire est traité thermiquement (121 °C pendant 20 mn) avant d'être soumis aux mêmes études que précédemment pour essayer de mettre en évidence l'intervention de composés thermolabiles. Lors de ces expériences, aucune modification notable des concentrations en substrats carbonés et en métabolites dosés à l'exception du diacétyle n'est détectée (tableau III.7).

pH	6,25		6,75		7,25	
Concentration	initiale	finale	initiale	finale	initiale	finale
Lactose (g/l)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Lactate (g/l)	1,8	1,8	1,7	1,8	1,8	1,8
Citrate (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acétate (g/l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Pyruvate (mg/l)	25,7	28	23,2	24,8	31,3	32,5
Acétaldéhyde (mg/l)	0	0	0	0	0	0
Ethanol (mg/l)	112	116	114	105	108	101
Diacétyle (mg/l)	0,7	3,0	0,8	2,0	0,9	1,8
Acétoïne (mg/l)	4	4	4	5	4	6
2,3-butanediol (mg/l)	86	78	89	84	64	65

Tableau III.7: comparaison des concentrations initiales et finales des substrats et métabolites carbonés lors d'expériences de suivi de décarboxylation oxydative dans des extraits cellulaires traités thermiquement de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bv. *diacetylactis SD 933* .

En particulier, et à la différence des travaux réalisés avec l'extrait non traité, la concentration en pyruvate n'évolue pas, conséquence probable de l'inactivation des enzymes de l'extrait par la température. L'absence de variation des concentrations en acétoïne et 2,3-butanediol indique qu'aucune activité ADC ou diacétyle réductase présente dans l'extrait n'a pu influer sur les mesures de décarboxylation oxydative de l'AAL.

Les cinétiques de production de diacétyle à partir d'AAL dans l'extrait cellulaire traité thermiquement sont présentées en figure III. 21. Quel que soit le pH, les cinétiques obtenues sont monophasiques, avec une vitesse dénommée v_3, largement inférieure à v_1, vitesse de la phase rapide avec l'extrait non traité (tableau III.8). Qui plus est, v_3 est dépendante du pH. Elle tend vers la valeur de v_2 lorsque le pH augmente. Ainsi, le traitement thermique élimine la phase rapide pour ne laisser qu'une phase lente, mais dont la vitesse dépend du pH contrairement à la phase lente observée avec l'extrait non traité. Cette phase lente semble correspondre à la combinaison d'une activité résiduelle de phase rapide, dépendante du pH, avec l'activité constante de la phase lente, indépendante du pH.

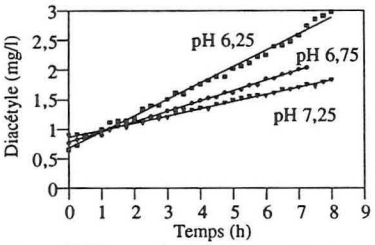


Figure III.21 : production de diacétyle à partir d'AAL dans un extrait cellulaire traité thermiquement de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à différents pH.

pH	v_3 (mg/(l.h))
6,25	0,27
6,75	0,17
7,25	0,12

Tableau III.8 : vitesses de décarboxylation oxydative de l'AAL dans un extrait cellulaire traité thermiquement de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en fonction du pH.

Ces expériences mettent clairement en évidence l'intervention d'un composé thermolabile dans la phase rapide de décarboxylation oxydative de l'AAL. Parmi les composés thermolabiles susceptibles d'intervenir dans cette réaction, les coenzymes d'oxydo-réduction font figure de candidats potentiels idéaux, à même d'accepter les électrons provenant de l'AAL (Ho Park *et al.*, 1995), présents en quantité limitée dans l'extrait cellulaire et rapidement épuisés par absence de régénération.

V.4. INFLUENCE DE COFACTEURS D'OXYDO-REDUCTION SUR LA DECARBOXYLATION OXYDATIVE

Cette étude a pour but de mettre en évidence l'intervention éventuelle de certains coenzymes dans le mécanisme de décarboxylation oxydative. La méthodologie employée consiste, lors d'expériences de décarboxylation oxydative dans de l'extrait cellulaire non traité thermiquement, à ajouter ces coenzymes en phase lente, après épuisement des

composés réagissant rapidement avec l'AAL, et d'observer si un retour à une cinétique plus rapide est obtenu. Ces expériences sont réalisées à pH 6,25, où la vitesse de décarboxylation oxydative en phase rapide est plus importante et donc où un éventuel effet positif des coenzymes sera plus marqué. Les coenzymes dont l'effet est étudié dans le cadre de ce travail sont le NAD^+, pour sa forte implication dans les réactions d'oxydo-réduction du métabolisme des substrats carbonés, le NADP intervenant dans le cycle des pentoses phosphate et le FAD, pour le métabolisme lipidique.

Une première expérience est effectuée avec ajouts successifs de 0,5 mM de NAD^+, NADP et FAD. Ces concentrations en coenzymes doivent chacune permettre la décarboxylation oxydative d'approximativement un quart de l'AAL présent. Comme au cours des expériences précédentes avec l'extrait cellulaire non traité, aucune évolution des concentrations en substrats carbonés, et métabolites dosés n'est observée, à l'exception d'une légère production de pyruvate et bien sûr de la production de diacétyle. Une cinétique de décarboxylation oxydative (figure III.22) tout à fait comparable à celle obtenue lors de la précédente expérience à pH 6,25 avec l'extrait cellulaire non traité est observée. Une phase initiale rapide d'une durée légèrement inférieure à 2 h avec une vitesse de production de 3,3 mg/(l.h) est suivie d'une phase plus lente avec une vitesse de 0,13 mg/(l.h). L'ajout successif des coenzymes ne produit aucune augmentation de la vitesse de la phase lente (tableau III. 9).

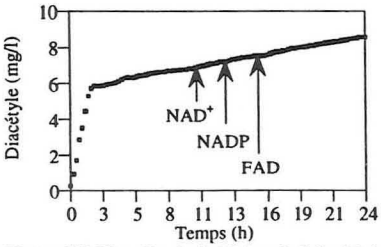


Figure III.22 : effet de l'addition de 0,5 mM de différents coenzymes sur la production de diacétyle à partir d'AAL dans un extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à pH 6,25.

	v_2 (mg/(l.h))
Phase lente	0,13
NAD^+ 0,5 mM	0,13
NADP 0,5 mM	0,12
FAD 0,5 mM	0,12

Tableau III.9 : effet de l'ajout de 0,5 mM de différents coenzymes sur la cinétique de la phase lente de décarboxylation oxydative de l'AAL dans un extrait cellulaire non traité thermiquement.

Cette absence d'effet des coenzymes testés peut être la conséquence soit d'une non-intervention dans le mécanisme de décarboxylation oxydative, soit d'une forte compétition entre les différents systèmes enzymatiques oxydo-réductasiques et l'AAL pour l'utilisation de ces accepteurs d'électrons. Pour réduire le niveau de cette compétition, deux expériences ont été réalisées, l'une avec doublement de la concentration en coenzymes et la seconde avec doublement de la concentration coenzymatique et traitement thermique de l'extrait pour dénaturer les différents systèmes enzymatiques oxydo-réductasiques.

Les résultats obtenus avec le milieu non traité et les concentrations en coenzymes doublées sont comparables en tous points avec ceux de l'expérience précédente : les concentrations des différents substrats et métabolites, diacétyle non compris, n'évoluent pas au cours de l'expérience à l'exception d'une légère production de pyruvate. Concernant la cinétique de production de diacétyle par décarboxylation oxydative de l'AAL, aucune modification de la vitesse de décarboxylation oxydative de la phase lente ne peut être détectée après ajout des concentrations doublées en coenzymes (figure III.23 et tableau III.10).

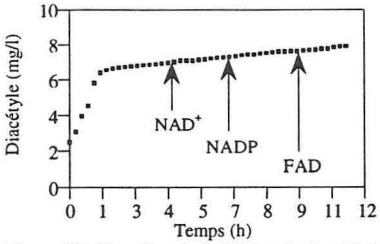


Figure III.23 : effet de l'addition de 1 mM de différents coenzymes sur la production de diacétyle à partir d'AAL dans un extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à pH 6,25.

	v_2 (mg/(l.h))
Phase lente	0,13
NAD+ 1 mM	0,12
NADP 1 mM	0,13
FAD 1 mM	0,13

Tableau III.10 : effet de l'ajout de 1 mM de différents coenzymes sur la cinétique de la phase lente de décarboxylation oxydative de l'AAL dans un extrait cellulaire non traité thermiquement.

La deuxième expérience réalisée avec l'extrait traité thermiquement et les concentrations doublées en coenzymes a donné des résultats tout à fait similaires à ceux de l'étude de décarboxylation oxydative de l'AAL à pH 6,25 dans l'extrait cellulaire traité thermiquement sans ajout de coenzymes. Ainsi, aucune augmentation de la vitesse de production de diacétyle à partir d'AAL après ajout des coenzymes n'a été observée (**tableau III.11**).

	v_3 (mg/(l.h))
Vtesse de base	0,25
NAD+ 1 mM	0,25
NADP 1 mM	0,25
FAD 1 mM	0,24

Tableau III.11 : effet de l'ajout de 1 mM de différents coenzymes sur la cinétique de décarboxylation oxydative de l'AAL dans un extrait cellulaire traité thermiquement.

Il découle de ces expériences que la compétition entre des composants de l'extrait cellulaire et l'AAL pour l'utilisation des coenzymes évalués n'est pas à l'origine de l'absence d'effet de ceux-ci sur les cinétiques de décarboxylation oxydative. Il peut donc être conclu que les coenzymes NAD+, NADP et FAD ne favorisent pas la réaction de

décarboxylation oxydative de l'AAL dans l'extrait cellulaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* SD 933. Leur intervention directe dans la réaction de décarboxylation oxydative est donc peu probable.

VI. CONCLUSIONS

Ces travaux sur la décarboxylation oxydative de l'AAL ont permis dans un premier temps de vérifier que, d'un point de vue cinétique, cette réaction peut être à l'origine de la production microbiologique du diacétyle par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* SD 933, et ce, dans des conditions *a priori* fortement défavorables, comme l'anaérobiose et un faible potentiel rédox. Ces observations d'une vitesse de décarboxylation oxydative en rapport avec la vitesse de production microbiologique du diacétyle n'excluent toutefois pas pour autant la possibilité que le diacétyle soit produit partiellement ou non par la voie de Speckman et Collins (1968 et 1973).

Cependant, dans le cas où le diacétyle serait produit par décarboxylation oxydative, les résultats de notre étude montrent que la localisation de cette réaction serait obligatoirement intracellulaire. En effet, si la réactivité intracellulaire de l'AAL est importante, la vitesse de décarboxylation oxydative de l'AAL dans des conditions extracellulaires est réduite. Ces données peuvent donc tout à fait expliquer les difficultés rencontrées pour transformer en diacétyle de l'AAL ayant été accumulé par une souche productrice dans le milieu de culture (Curic, 1997).

Pour ce qui est du mode de décarboxylation oxydative de l'AAL, nos travaux ont montré la coexistence de deux mécanismes, dont l'un, rapide, fait intervenir un composé thermolabile. Une tentative d'identification de ces composés thermolabiles comme étant les coenzymes d'oxydo-réduction NAD^+, NADP ou FAD n'a pas apporté de résultats probants, aucune réaction n'étant détectée dans des conditions intracellulaires avec l'AAL. Ces travaux montrent que la réaction de décarboxylation de l'AAL dans un milieu intracellulaire est un phénomène bien plus complexe que dans l'eau, où les coenzymes précités réagissent directement avec l'AAL (Ho Park *et al.*, 1995). Au vu de ces résultats, les deux principales hypothèses permettant d'expliquer la vitesse élevée de production intracellulaire de diacétyle à partir d'AAL sont soit une réaction directe de l'AAL avec des coenzymes d'oxydo-réduction autres que le NAD^+, le NADP ou le FAD, soit l'intervention d'un système enzymatique dans l'accomplissement de la réaction.

ETUDES PROSPECTIVES POUR LA MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEURS CONTINUS A HAUTE DENSITE CELLULAIRE

I. INTRODUCTION 105

II. ETUDE PRELIMINAIRE DU COMPORTEMENT METABOLIQUE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CULTIVE EN MODE DISCONTINU 107

II.1. Culture discontinue de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* à pH non régulé 107
II.2. Cultures discontinues de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sous contrainte de pH 109
II.2.1. Croissance, consommation de substrats et production de métabolites 110
II.2.2. Orientation générale du flux carboné 114
II.3. Conclusions 116

III. MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEUR CONTINU A RECYCLAGE CELLULAIRE 118

III.1. Etudes préliminaires 118
III.2. Mise en œuvre en conditions de croissance 119
III.2.1. Consommation de substrats carbonés et production de biomasse et de métabolites 119
III.2.2. Données cinétiques de consommation de substrats carbonés et de production de biomasse et de métabolites 121
III.2.3. Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate 124
III.2.4. Conclusions 125
III.3. Mise en œuvre en conditions de croissance/aromatisation 126
III.3.1. Consommation de substrats carbonés et production de biomasse et de métabolites 127
III.3.2. Données cinétiques de consommation de substrats carbonés et de production de biomasse et de métabolites 129
III.3.3. Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate 131
III.3.4. Conclusions 132
III.4. Conclusions 134

IV. MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEUR CONTINU A CELLULES IMMOBILISEES EN LIT FIXE 136

IV.1. Etudes préliminaires 136
IV.2. Mise en œuvre en conditions de croissance 139
IV.2.1. Consommation de substrats carbonés et production de biomasse et de métabolites 139
IV.2.2. Données cinétiques de consommation de substrats carbonés et de production de biomasse et de métabolites 142
IV.2.3. Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate 144
IV.2.4. Conclusions 146
IV.3. Mise en œuvre en conditions de croissance/aromatisation 147
IV.3.1. Consommation de substrats carbonés et production de biomasse et de métabolites 147
IV.3.2. Données cinétiques de consommation de substrats carbonés et de production de biomasse et de métabolites 149
IV.3.3. Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate 153
IV.3.4. Conclusions 154
IV.4. Conclusions 155

V. DOMAINES D'APPLICATION ET LIMITES DE L'UTILISATION DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEUR CONTINU À RECYCLAGE CELLULAIRE ET EN REACTEUR CONTINU A CELLULES IMMOBILISEES EN LIT FIXE 157

V.1. Domaines d'application 157
V.2. Limites d'utilisation 158

I. INTRODUCTION

A l'heure actuelle, la production microbiologique d'arômes laitiers par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a principalement lieu en culture discontinue, bien que ce mode de production n'apporte pas des niveaux de productivité élevés. Pour pallier cet inconvénient, sans remettre en cause ce mode de culture, des souches plus performantes tant en niveau de production qu'en productivité ont été sélectionnées, voire même développées, sur la base d'études physiologiques et génétiques (Gasson *et al.*, 1996). Néanmoins, cette approche du problème est confrontée à des limitations tant métaboliques que réglementaires (Welsh, 1994).

Pour accroître encore la productivité, il devient nécessaire de considérer des changements plus importants du mode de mise en œuvre des bactéries lactiques productrices d'arômes, pour pouvoir tirer un meilleur parti de leurs capacités de biotransformation. Le mode de culture continu est en cela très attractif car il permet de placer les cellules dans un état physiologique adapté (Boyaval, 1994). Toutefois, les modifications d'installations de production existantes ou leur remplacement, induits par le passage à un mode de culture continu, ne sont pas assez largement compensés par les gains en productivité attendus. Il est donc nécessaire de recourir à des cultures à haute densité cellulaire pour espérer obtenir un gain significatif et satisfaisant des performances de production d'arômes (Smith *et al.*, 1993 ; Champagne *et al.*, 1994 ; Diviès *et al.*, 1994b).

Toutefois, le choix du mode de culture à haute densité cellulaire le plus adapté parmi le large éventail disponible est assez ardu, vu l'absence de données comparatives. En conséquence, l'objectif principal de la présente étude est d'établir une comparaison de deux modes de mise en œuvre de bactéries lactiques productrices d'arômes en haute densité cellulaire les plus éloignés possibles théoriquement et techniquement. La comparaison entre ces deux procédés est établie, d'une part, en terme d'influence sur le métabolisme de la souche et en particulier sur l'orientation du flux carboné provenant du lactose et du citrate vers les différentes voies métaboliques (figure III.24) et, d'autre part, en terme de performances fermentaires principalement pour la production de biomasse ou d'arômes.

Le premier mode de culture choisi est la culture continue en réacteur à recyclage cellulaire par microfiltration tangentielle. Ce type de culture est techniquement parlant complexe à mettre en œuvre puisqu'il consiste en un couplage de deux opérations unitaires, l'une de fermentation et l'autre de séparation, les performances de l'une influant sur celles de l'autre. Cette complexité n'est pourtant pas en soi un inconvénient pour une éventuelle utilisation industrielle, ce type de procédé étant loin d'être étranger en industrie laitière. Qui plus est, ce type de réacteur, permet l'obtention de cellules dans des états physiologiques intéressants grâce à la réduction des limitations diffusionnelles découlant

d'une agitation efficace et à la réduction des phénomènes d'inhibition par l'extraction en continu de métabolites toxiques.

Le deuxième mode de mise en œuvre sélectionné est la culture continue de cellules immobilisées sous forme de biofilm en réacteur à lit fixe. Il est couramment employé à l'échelle de laboratoire, aisé de mise en œuvre, robuste, et fait appel aux propriétés naturelles de la souche de référence à coloniser divers supports. Ces avantages font de ce mode de culture un candidat intéressant pour une implantation industrielle, les risques technologiques étant réduits. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ce type de culture réside dans les importantes limitations diffusionnelles et forts gradients au sein du réacteur, dont l'influence sur le métabolisme de la souche et les performances du procédé peut se révéler critique.

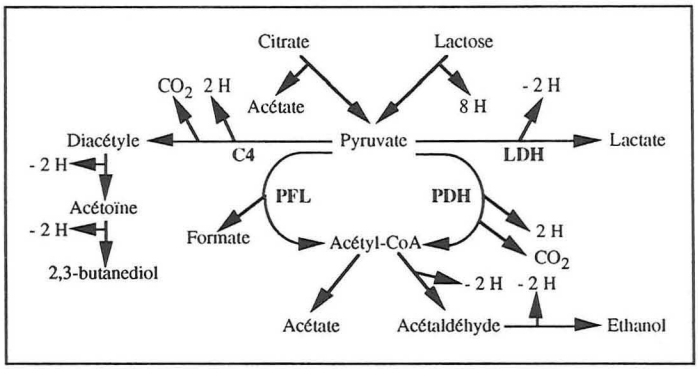


Figure III.24 : représentation simplifiée des voies métaboliques pouvant être empruntées par le flux carboné issu du lactose et du citrate.

Avant de réaliser l'étude comparative de ces deux modes de culture, la première étape de cette partie du travail consiste à déterminer, en mode discontinu, le comportement métabolique et les performances d'une souche productrice de diacétyle de référence, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A, de façon non seulement à établir une base de données comparative pour les procédés de culture à haute densité cellulaire, mais aussi pour choisir des conditions expérimentales adéquates pour réaliser la comparaison entre les deux modes de culture continue à haute densité cellulaire.

La deuxième étape de ce travail est la mise en œuvre de la souche de référence dans des conditions définies d'après la première partie expérimentale en réacteur continu avec recyclage cellulaire et en réacteur continu à cellules immobilisées.

Enfin, la troisième étape de cette étude consiste à exploiter les données recueillies en culture discontinue et en cultures continues à haute densité cellulaire pour déterminer l'influence de chacun de ces modes de mise en œuvre sur le métabolisme de la souche et leurs domaines d'application en industrie laitière.

II. ETUDE PRELIMINAIRE DU COMPORTEMENT METABOLIQUE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CULTIVE EN MODE DISCONTINU

Cette première partie expérimentale a pour objectifs d'appréhender le métabolisme de la souche de référence et de déterminer des conditions expérimentales dans lesquelles effectuer la comparaison entre les deux modes de culture à haute densité cellulaire. Le comportement métabolique de cette souche est déterminé en fonction d'un paramètre aisé à contrôler en fermentation et connu pour sa forte influence sur la répartition du flux carboné entre les différentes voies cataboliques : le pH. Les cultures sont toutes réalisées en anaérobiose et à une température intermédiaire de 25 °C constituant un bon compromis pour l'obtention d'une croissance satisfaisante et pour la biosynthèse des différents produits du métabolisme du lactose et du citrate.

II.1. CULTURE DISCONTINUE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* A pH NON REGULE

Cette première culture est effectuée dans le milieu Y, en anaérobiose et sans régulation de pH. Le pH du milieu est fixé initialement à la valeur rencontrée dans le lait : 6,5. Cette expérience a pour but d'évaluer les performances de base de la souche employée.

La croissance de la souche dans ces conditions expérimentales est faible, avec une production de 0,6 g/l de biomasse (figure III.25). La croissance a lieu pendant les 6 premières heures de la culture, et est importante lors de la cométabolisation du lactose et du citrate. Après épuisement du citrate observé après 5h de culture, la croissance ralentit puis cesse (figures III.25 et III.27).

Le pH décroît de 6,5 à 4,6 au cours de la culture. La diminution du pH est d'abord rapide pendant les 6 premières heures, avant de ralentir progressivement (figure III.25). Cette acidification du milieu est la conséquence directe de la consommation du lactose et de sa transformation en lactate (figure III.26). La consommation du lactose, et donc la production de lactate, sont en effet simultanées à la décroissance du pH. Le lactose n'est que partiellement assimilé par les cellules, et le rendement en lactate formé par rapport au lactose consommé est légèrement supérieur à 1,05 g/g. Ceci traduit la production de lactate à partir d'une source additionnelle de carbone, probablement le citrate.

Le citrate est consommé totalement en environ 5 h, avec une production associée d'acétate (figure III.27). Le rendement global en acétate formé par rapport au citrate consommé est de 0,9 mol/mol, ce qui indique que de l'acétate issu du clivage du citrate est orienté vers la production d'acétyl-coenzyme A.

La concentration en acide pyruvique, initialement élevée, décroît pendant la première heure, avant d'augmenter jusqu'à 6 h de fermentation (figure III.28). Cette

Culture anaérobie de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* PAL D DIA A en anaérobiose, à 25 °C dans du milieu Y.

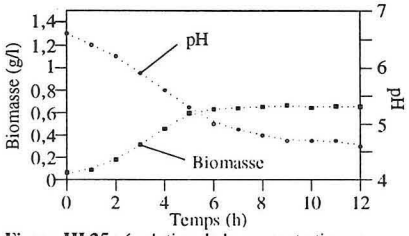


Figure III.25 : évolution de la concentration en biomasse et du pH.

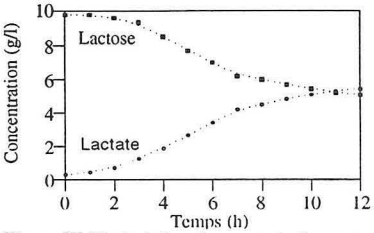


Figure III.26: évolution des concentrations en lactose et acide lactique.

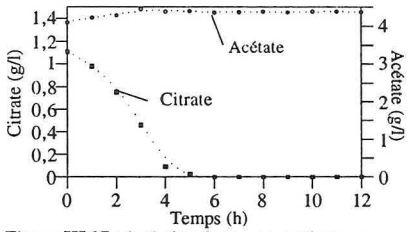


Figure III.27 : évolution des concentrations en acides citrique et acétique.

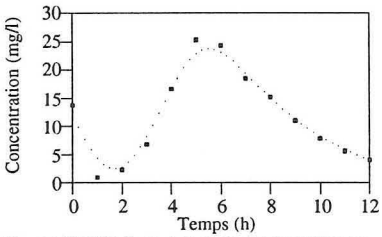


Figure III.28 : évolution de la concentration en acide pyruvique.

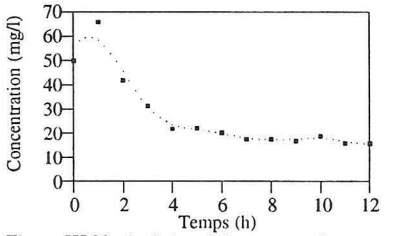


Figure III.29 : évolution de la concentration en acide formique.

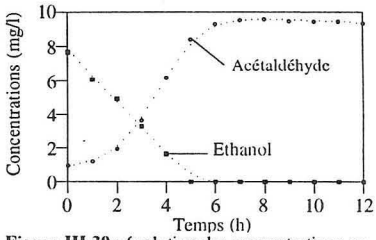


Figure III.30 : évolution des concentrations en acétaldéhyde et éthanol.

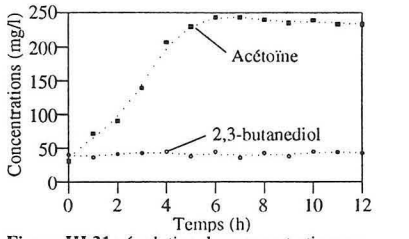


Figure III.31 : évolution des concentrations en acétoïne et 2,3-butanediol.

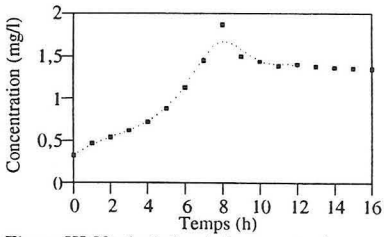


Figure III.32 : évolution de la concentration en diacétyle.

accumulation de pyruvate correspond ici encore à la période durant laquelle le citrate et le lactose sont cométabolisés et provient probablement de la formation de pyruvate à partir du citrate sans formation de NADH + H^+, ne pouvant être métabolisé par la LDH (figure III.24). Il en résulte cette augmentation transitoire de la concentration en pyruvate. Ensuite, une fois le citrate épuisé, la concentration en pyruvate diminue jusqu'à la fin de la culture.

La concentration en formate, après un pic à la première heure, diminue tout au long de la fermentation, d'abord rapidement entre 1 et 5 h, puis plus lentement (figure III.29). La concentration en éthanol diminue jusqu'à s'annuler après 6 h de culture (figure III.30). En parallèle, une quantité équivalente du dérivé oxydé apparaît dans la même période de temps (figure III.30). La concentration globale en éthanol plus acétaldéhyde n'évolue donc pas au cours de l'expérience. Ainsi, vu les absences de production de formate et d'acétaldéhyde plus éthanol, ainsi que le rendement en acétate produit / citrate consommé inférieur à 1 mol / mol, il est évident que le flux carboné provenant du lactose et du citrate n'emprunte pas la voie de la PFL, pas plus d'ailleurs que celle de la PDH.

Concernant le métabolisme des composés en C4, l'acétoïne et le diacétyle sont produits durant le cométabolisme du lactose et du citrate au cours duquel le pyruvate s'accumule (figures III.28, III.31 et III.32). Cette accumulation de pyruvate doit être suffisante pour permettre son orientation vers l'ALS, présentant une affinité faible pour ce composé. Avec l'arrêt du cométabolisme, la concentration en pyruvate diminue, ce qui met un terme à l'orientation du flux carboné vers la voie des C4. Les concentrations en diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol n'évoluent alors plus, ce qui indique que les activités diacétyle / acétoïne réductase sont minimes (figures III.31 et III. 32).

Ainsi, le déroulement d'une telle culture peut être divisé en deux phases : la première durant laquelle le lactose et le citrate sont cométabolisés, avec production de biomasse, d'acide lactique et de molécules en C4 et la seconde, après épuisement du citrate, où seul subsiste un catabolisme lent et incomplet du lactose en lactate. Du fait que seule une partie de la fermentation est réellement productive pour l'aromatisation, les performances obtenues sont très moyennes. En cela, cette culture est tout à fait révélatrice des limitations du mode de culture discontinu.

II.2. CULTURES DISCONTINUES DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* SOUS CONTRAINTE DE pH

A l'issue de cette culture de référence sans régulation de pH, une série de fermentations discontinues à pH régulé est réalisée dans une zone de pH comprise entre 4 et 9. Cette série de cultures a pour but de déterminer l'influence du pH, paramètre à la fois crucial et aisé à fixer dans un procédé de culture, sur l'orientation du flux carboné provenant du lactose et du citrate vers les différents produits du métabolisme, pour choisir des conditions opératoires permettant la comparaison des deux procédés de mise en œuvre

de lactocoques en culture continue à haute densité cellulaire. L'ensemble des données présentées dans cette partie correspond aux productions et aux consommations observées après arrêt de la croissance, ou, en cas d'absence de croissance, après arrêt de la consommation de lactose et de citrate.

II.2.1. CROISSANCE, CONSOMMATION DE SUBSTRATS ET PRODUCTION DE METABOLITES

❒ Production de biomasse

Une production maximale de biomasse, proche de 2 g/l, est obtenue à pH 6,5 avec une diminution de la quantité de biomasse formée en augmentant ou diminuant le pH (figure III.33). En diminuant le pH, aucune croissance n'est observée en deçà de pH 4,5. La vitesse spécifique de croissance maximale suit une évolution tout à fait semblable à celle de la production de biomasse, avec toutefois un optimum de 0,79 h^{-1} à pH 7 au lieu de 6,5 (figure III.34). Pour ces cultures, lorsqu'une croissance a lieu, la vitesse spécifique de croissance maximale est atteinte peu de temps après l'inoculation (moins de 2 h), avec ensuite une rapide diminution.

❒ Catabolisme du lactose

La consommation de lactose est totale dans un intervalle de pH compris entre 5,5 et 8,5 (figure III.35). Pour des pH extérieurs à cet intervalle, son utilisation est limitée avec, en particulier, une consommation très faible ou nulle en dessous de pH 5. Dans tous les cas, le lactate est produit dans des proportions équivalentes à celles du lactose consommé, avec en conséquence un rendement global proche de 1,05 g/g (figure III.36). Ceci est révélateur de la très faible orientation du flux carboné provenant du lactose vers des voies autres que la LDH, ou du très faible apport complémentaire de pyruvate vers la LDH par d'autres sources de carbone .

La vitesse spécifique maximale de consommation de lactose est atteinte peu de temps après l'inoculation pour les cultures où le lactose est utilisé, comme c'est le cas pour la biomasse, avec ensuite un ralentissement notable et rapide. Un pic isolé de vitesse spécifique maximale de consommation de lactose est observé pour la même valeur de pH que la vitesse spécifique maximale de production de biomasse, à pH 7, mettant ainsi en exergue les rôles de source de carbone et d'énergie du lactose (figure III.37). En dehors de ce pic, la vitesse spécifique maximale de consommation de lactose augmente avec le pH.

❒ Clivage du citrate

La consommation du citrate est totale de pH 4 à la neutralité, avec ensuite une diminution de son utilisation jusqu'à seulement 20 % à pH 9 (figure III.38). La vitesse spécifique maximale de consommation, elle aussi atteinte dans les 2 premières heures de chaque culture, présente un optimum proche de 3,5 g/(g.h) à pH 6 (figure III.39).

Influence du pH sur le métabolisme de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* PAL D DIA A cultivé en mode discontinu, en anaérobiose et à 25 °C dans du milieu Y.

NR : pH initial de 6,5 puis non régulé.

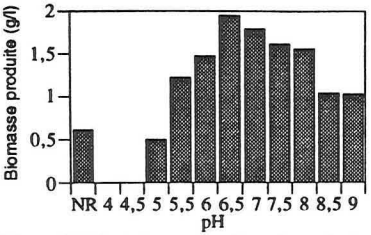


Figure III.33 : influence du pH sur la production de biomasse.

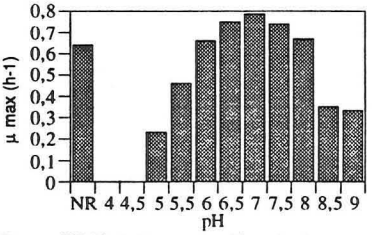


Figure III.34 : influence du pH sur la vitesse maximale spécifique apparente de production de biomasse.

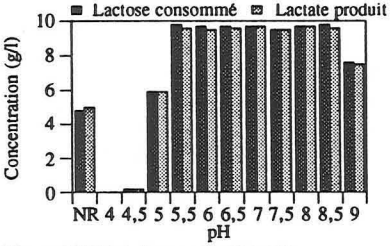


Figure III.35 : influence du pH sur la consommation de lactose et la production de lactate.

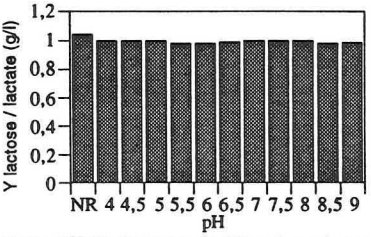


Figure III.36 : influence du pH sur le rendement global de conversion de lactose en lactate.

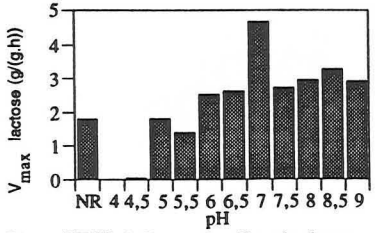


Figure III.37 : influence du pH sur la vitesse spécifique maximale de consommation du lactose.

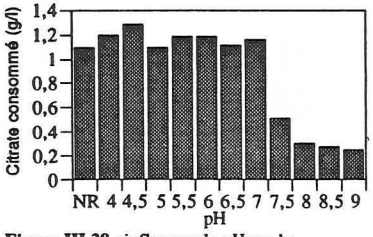


Figure III.38 : influence du pH sur la consommation de citrate.

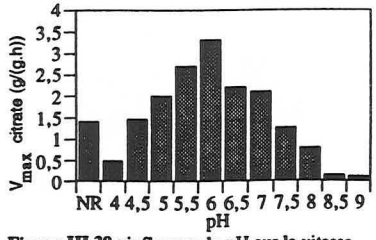


Figure III.39 : influence du pH sur la vitesse spécifique maximale de consommation du citrate.

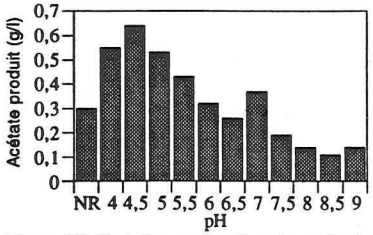


Figure III.40 : influence du pH sur la production d'acide acétique.

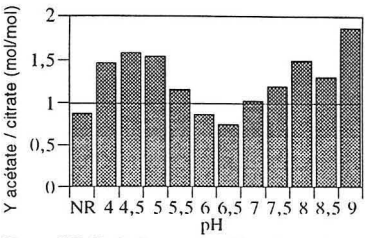


Figure III.41 : influence du pH sur le rendement global de conversion de citrate en acide acétique.

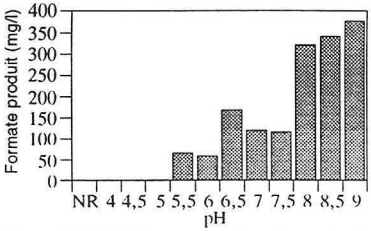


Figure III.42 : influence du pH sur la production d'acide formique.

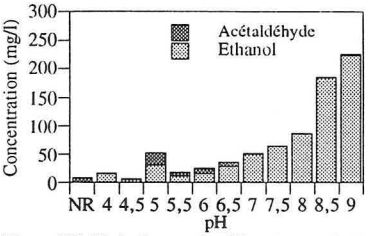


Figure III.43 : influence du pH sur les productions d'acétaldéhyde et d'éthanol.

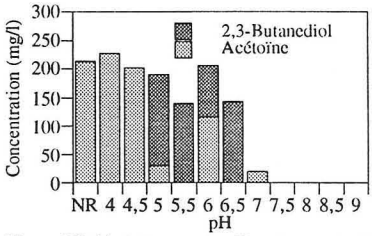


Figure III.44 : influence du pH sur les productions d'acétoïne et de 2,3-butanediol.

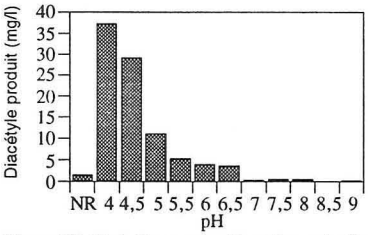


Figure III.45 : influence du pH sur la production de diacétyle.

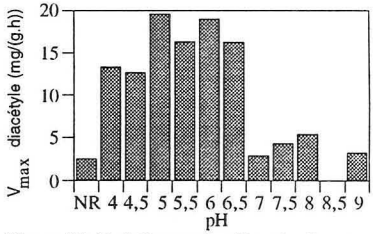


Figure III.46 : influence du pH sur la vitesse spécifique maximale de production du diacétyle.

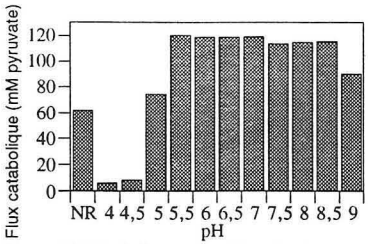


Figure III.47 : influence du pH sur le niveau d'utilisation des sources carbonées lactose et citrate.

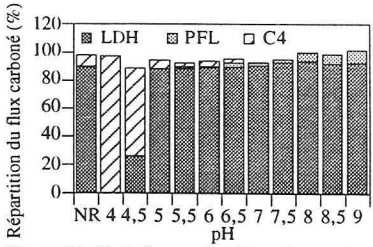


Figure III.48 : influence du pH sur l'orientation du flux carboné provenant du lactose et du citrate vers la LDH, la PFL et la production de molécules en C4.

De part et d'autre de cette valeur, la vitesse spécifique maximale diminue, tout en restant à une valeur assez élevée, supérieure ou égale à 2 g/(g.h), entre pH 5 et 7. Ce profil d'effet du pH sur la vitesse spécifique maximale d'utilisation du citrate est à relier avec la faible zone de pH optimale, légèrement acide, de la citrate perméase. La production d'acétate, dérivant en partie du clivage du citrate, ne suit pourtant pas une évolution comparable à celle de consommation du citrate. En particulier, la production d'acétate ne diminue pas avec le pH entre pH 4,5 et pH 7 comme le fait la consommation du citrate. La production d'acétate par les voies de la PFL ou dans une moindre mesure, de la PDH, ou une transformation d'acétate en acétyl-coenzyme A ont donc lieu (figure III.40). Le rendement global en acétate formé / citrate consommé (figure III.41) est très parlant à cet égard : pour des pH inférieurs à 6 et supérieurs à 7, celui-ci est supérieur à 1 mol/mol, ce qui correspond à une production complémentaire d'acétate pouvant provenir des voies de la PFL ou de la PDH, alors qu'entre pH 6 et 7, le rendement est inférieur à 1, ce qui indique une transformation d'acétate en acétyl-coenzyme A. La destination précise de cet acétyl-coenzyme A est difficile à déterminer, tant ce composé peut intervenir dans de nombreuses réactions cellulaires, mais il est intéressant de noter la correspondance entre la zone optimale de croissance et la zone pour laquelle le rendement acétate / citrate est inférieur à 1 (figures III.33, III.34 et III.41).

□ Flux carboné issu du lactose et du citrate orienté vers la PFL et la PDH

Les rendements de production d'acétate par rapport à la consommation de citrate (figure III.41) sont révélateurs de l'orientation du flux carboné vers la PFL ou la PDH, de même que la production croissante de formate et d'éthanol avec le pH (figures III.42 et 43). Si la détermination de la part du flux carboné orientée vers la PFL est aisée à déterminer à partir du dosage de la quantité de formate produite, la part du flux carboné empruntant la PDH est plus difficile à évaluer. Une méthode pour déterminer cette part consiste à faire la somme des concentrations molaires des métabolites communs aux deux voies, l'acétate produit en excédent par rapport au clivage du citrate, l'éthanol et l'acétaldéhyde, et d'en soustraire la concentration en formate, révélatrice du flux orienté vers la PFL. Une évaluation du flux carboné orienté vers la PDH peut ainsi être obtenue. Cependant, cette évaluation ne peut être significative que si l'acétyl-coenzyme A produit tant par la PFL que par la PDH est effectivement utilisé pour la synthèse d'acétate, d'acétaldéhyde et d'éthanol et si une reconsommation d'acétate pour former de l'acétyl-coenzyme A n'a pas lieu. A l'aide de cette méthode, la prépondérance de l'action de la PFL ou de la PDH pour la production d'acétate excédentaire, d'acétaldéhyde et d'éthanol peut être déterminée.

✓ Pour des pH compris entre 4 et 5, en l'absence de production de formate (figure III.42), l'acétate excédentaire ainsi que l'éthanol et l'acétaldéhyde ne peuvent provenir que de la seule action de la PDH.

✓ A pH 5,5 la seule action de la PFL peut expliquer les niveaux de production de ces 3 molécules.

✓ A pH 6 et 6,5, le calcul de la part du flux orienté vers la PDH indique des valeurs négatives, ce qui traduit l'orientation d'une partie de l'acétyl-coenzyme A issu de l'action de la PFL ou de la PDH vers la production d'autres métabolites que l'acétate, l'éthanol ou l'acétaldéhyde, avec pour conséquence l'impossibilité de déterminer la voie à l'origine de la production de ces trois composés. Toutefois, la production croissante de formate avec le pH laisse à penser que la PFL joue un rôle prépondérant par rapport à la PDH.

✓ De pH 7 à 9, la production d'acétate excédentaire, d'acétaldéhyde et d'éthanol peut provenir de la seule action de la PFL.

❒ Flux carboné issu du lactose orienté vers la production de composés en C4

La production globale des composés en C4 augmente lorsque le pH diminue (figures III.44 et III.45). Alors que la production de la somme acétoïne + 2,3-butanediol est d'abord négligeable à des pH supérieurs à 7, elle tend rapidement vers un plateau proche de 200 mg/l avec la diminution du pH (figure III.44), la production de diacétyle augmente régulièrement de pH 9 à pH 4 avec une valeur maximale de 37 mg/l (figure III.45). La vitesse spécifique maximale de production de diacétyle est atteinte pour toutes les cultures en début de fermentation, lorsque le cométabolisme du lactose et du citrate est important (fortes vitesses spécifiques de consommation de lactose et de citrate). La vitesse spécifique maximale de production du diacétyle est importante (> 10 mg/(g.h)) pour les cultures réalisées à des pH compris entre 4 et 6,5, c'est-à-dire dans la gamme de pH où le citrate est totalement métabolisé (figures III.46 et III.38). A partir de pH 7, la vitesse spécifique maximale de production devient bien moindre.

II.2.2. ORIENTATION GENERALE DU FLUX CARBONE

L'utilisation des sources carbonées que sont le lactose et le citrate est totale entre pH 5,5 et 7 (figure III.47). Au delà de pH 7, la diminution du flux carboné métabolisé provient de l'utilisation incomplète du citrate alors qu'en dessous de pH 5,5, cette diminution est imputable à la consommation partielle ou nulle du lactose. L'orientation de ce flux carboné entre les voies cataboliques majeures (LDH, PFL, PDH et C4) est elle aussi fortement dépendante du pH (figure III.48). La part de la LDH dans le flux carboné catabolisé reste constante entre pH 5 et 9. En dessous de pH 5, du fait de l'utilisation incomplète du lactose, la part de la LDH dans le catabolisme du flux carboné décroît naturellement. La part de la PFL, quant à elle, augmente avec le pH, en conséquence logique de la combinaison de l'augmentation de la production de formate avec le pH (figure III.42) et de la diminution du flux carboné total métabolisé de pH 7,5 à 9 (figures III. 35, III.38 et III.47). Une utilisation du flux carboné par la PDH n'est clairement

démontrée qu'à faible pH (4 à 5), bien qu'une intervention mineure à des pH légèrement supérieurs soit possible. La part du flux catabolique orienté vers la production de molécules en C4 augmente avec la diminution du pH du fait de l'action combinée d'une augmentation brute de la production de molécules en C4 à bas pH (figures III.40 et III.41) et de la diminution du flux carboné par métabolisation partielle du lactose (figures III.31 et III.43).

Ainsi, en fonction du pH de culture, trois zones de répartition du flux carboné entre LDH, PFL, PDH et C4 peuvent être mises en évidence (tableau III.12).

pH	4 9
Utilisation du lactose	
Utilisation du citrate	
Citrate consommé / lactose consommé	
Flux carboné orienté vers la LDH	
Flux carboné orienté vers la PFL	
Flux carboné orienté vers la PDH	
Flux carboné orienté vers la production de molécules en C4	

Tableau III. 12 : tableau récapitulatif de la consommation de lactose et de citrate et de l'orientation du flux carboné qui en résulte vers les différentes voies cataboliques lors de cultures discontinues de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A sous contrainte de pH.

- A faible pH (4 à 5), le pyruvate issu du catabolisme du citrate et d'une partie seulement du lactose est orienté vers la voie des molécules en C4, la PDH et vers la LDH, suivant la quantité de lactose consommé,
- A pH modérément acide (5,5 à 6,5), le flux provenant de l'utilisation complète du lactose et du citrate est orienté principalement vers la LDH, une part mineure du carbone se répartissant entre la PFL et la production de molécules en C4, l'intervention de la PDH n'étant toutefois pas exclue,
- De pH neutre à modérément basique (7 à 9), la LDH occupe toujours une part prépondérante dans l'utilisation du flux carboné, mais seule la PFL catabolise une partie du carbone résiduel, la production de molécules en C4 n'ayant pas lieu.

II.3. CONCLUSIONS

Cette étude physiologique a permis de mettre en évidence l'effet du pH sur la croissance et la répartition du flux carboné chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A. Ces résultats, en eux-mêmes, fournissent une base de données pour la comparaison avec le comportement de la souche de référence en culture continue à haute densité cellulaire. Qui plus est, ils permettent de déterminer des valeurs de pH pour lesquelles les comparaisons entre les deux modes de culture continue à haute densité cellulaire et entre cultures continues à haute densité cellulaire et cultures discontinues peuvent s'avérer les plus fructueuses.

La première valeur de pH sélectionnée est bien évidemment pH 7, valeur pour laquelle la vitesse spécifique maximale de croissance est la plus élevée (tableau III.13). Ce pH doit permettre de mettre en lumière les potentialités des deux modes de culture à haute densité cellulaire pour l'atteinte de hautes concentrations en biocatalyseur.

	Production ou Consommation	Productivité	Vitesse spécifique de production ou consommation
Biomasse	1,8 g/l	0,22 g/(l.h)	0,79 g/(g.h)
Lactose	9,7 g/l	1,21 g/(l.h)	4,67 g/(g.h)
Citrate	1,2 g/l	0,15 g/(l.h)	2,10 g/(g.h)
Diacétyle	0,3 g/l	0,04 mg/(l.h)	2,9 mg/(g.h)

Tableau III.13 : rappel de données sur le métabolisme de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A cultivé en mode discontinu à 25 °C en anaérobiose dans du milieu Y et à pH 7.

De plus, à ce pH, les substrats carbonés citrate et lactose sont totalement consommés, avec, en particulier, une vitesse maximale spécifique de consommation du lactose optimale pour l'intervalle de pH considéré (tableau III.13). Le carbone provenant du lactose et du citrate est métabolisé principalement par la LDH et dans une moindre mesure par la PFL. Le choix de ce pH doit donc aussi apporter des informations sur l'influence que peut avoir le mode de culture sur les consommations du lactose et du citrate par les cellules, ainsi que sur les voies empruntées par ce flux catabolique.

	Production ou Consommation	Productivité	Vitesse spécifique de production ou consommation
Biomasse	1,2 g/l	0,05 g/(l.h)	0,46 g/(g.h)
Lactose	9,7 g/l	0,41 g/(l.h)	1,41 g/(g.h)
Citrate	1,2 g/l	0,05 g/(l.h)	2,70 g/(g.h)
Diacétyle	6,2 g/l	0,26 mg/(l.h)	16,3 mg/(g.h)

Tableau III.14 : rappel de données sur le métabolisme de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A cultivé en mode discontinu en anaérobiose à 25 °C dans du milieu Y et à pH 5,5.

La deuxième valeur de pH sélectionnée pour la mise en œuvre de la souche de référence en réacteurs continus à haute densité cellulaire est pH 5,5 (tableau III.14). Pour cette valeur, un compromis intéressant entre la croissance et la production des différents métabolites par les 3 voies cataboliques principales (LDH, PFL et C4) est obtenu. Ainsi, le choix de ce pH permet d'évaluer l'influence du mode de culture tant sur la croissance que sur la répartition du flux carboné entre la LDH, la PFL et la production de molécules en C4. Qui plus est, la production de diacétyle étant satisfaisante en culture discontinue à pH 5,5, ce pH se révèle tout à fait adapté à l'évaluation du potentiel de procédés de culture continue à haute densité cellulaire pour la production d'arômes laitiers.

III. MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEUR CONTINU A RECYCLAGE CELLULAIRE

Cette partie expérimentale a pour objectifs, d'une part, d'évaluer l'influence que peut avoir la mise en œuvre de la souche de référence en culture continue avec recyclage cellulaire sur son métabolisme, et, d'autre part, de déterminer l'incidence que ce mode de mise en œuvre est susceptible d'avoir sur les performances fermentaires par rapport à des cultures discontinues de référence réalisées à pH 7 et 5,5. Ces valeurs de pH correspondent respectivement à des conditions favorables à la croissance et à des conditions mixtes permettant l'orientation du flux de pyruvate vers les trois voies principales de dégradation.

III.1. ETUDES PRELIMINAIRES

Afin d'établir des conditions de fonctionnement correctes de l'installation de microfiltration tangentielle, des expériences sans débit de purge sont entreprises. Celles-ci visent tout d'abord à déterminer la concentration maximale en biomasse pouvant être atteinte et, ensuite, avec cette haute densité cellulaire, à adapter les paramètres de décolmatage, de pression transmembranaire, et de débit dans la boucle de recirculation de façon à obtenir un débit de perméat important et constant.

Pour ce qui est de la production de biomasse, avec le milieu Y standard, seule une concentration de 4,5 g/l est atteinte. Pour accroître la concentration en biomasse afin de mener à bien la recherche de paramètres opératoires adéquats pour le maintien d'un flux de perméat élevé, le milieu Y est enrichi en lactose (30 g/l en concentration initiale au lieu de 10 g/l). Avec le milieu Y ainsi enrichi, une concentration stable en biomasse de 6,3 g/l est obtenue en culture continue avec recyclage cellulaire. Ce bon niveau de production de biomasse est mis à profit pour fixer les paramètres de fonctionnement de l'installation suivants :

Débit de recirculation : 900 l/h (régime turbulent au niveau du module de filtration)
Pression transmembranaire : 0,3 bar
Durée de décolmatage : 0,1 s
Période de décolmatage : 3 mn.

Dans de telles conditions, un débit de perméat de 2,6 l/h, soit un flux de 13 l/(h.m2 de membrane) est maintenu pendant plus de trente heures. Les cultures continues avec recyclage cellulaire présentées par la suite sont réalisées avec le milieu Y enrichi et en adoptant les paramètres ainsi déterminés. Ces cultures ont lieu aux deux pH sélectionnés en culture discontinue, en appliquant des taux de purge décroissants.

III.2. MISE EN ŒUVRE EN CONDITIONS DE CROISSANCE

Cette culture continue avec recyclage cellulaire est réalisée à pH 7, favorable à la croissance et au catabolisme du lactose en culture discontinue. Durant cette expérience, 4 états stationnaires sont atteints, pour des taux de purge variant de 0,41 à 0,07 h^{-1} (tableau III.15). Lors de cette expérience, le taux de purge maximal appliqué n'est que de 0,41 h^{-1}, et est donc très éloigné de la vitesse spécifique maximale de croissance de cette souche déterminée en culture discontinue (0,79 h^{-1}). En conséquence, le domaine expérimental en terme de taux de purge n'a pu être totalement exploré. De plus, et contrairement à ce qui était constaté lors des études préliminaires, un débit de perméat important n'est pas obtenu tout au long de l'expérience. Cependant, le débit de perméat peut être considéré comme stabilisé pour chaque état stationnaire.

Taux de purge (h^{-1})	0,41	0,21	0,12	0,07
Taux de perméat (h^{-1})	0,19	0,03	0,02	0,01
Taux de dilution (h^{-1})	0,60	0,24	0,14	0,08
Biomasse produite (g/l)	1,7	1,6	2,5	2,7
Lactose consommé (g/l)	6,1	23,3	26,0	25,8
Lactate formé (g/l)	5,0	21,7	23,6	25,3
$Y_{lactate/lactose}$ (g/g)	0,82	0,93	0,91	0,98
Citrate consommé (g/l)	0,33	0,39	0,44	0,39
Acétate produit (g/l)	0,09	0,24	0,20	0,90
$Y_{acétate/citrate}$ (mol/mol)	0,90	1,95	1,45	7,42
Pyruvate accumulé (mg/l)	137	183	42	41
Formate produit (mg/l)	221	588	707	795
Ethanol produit (mg/l)	19	249	255	223
Acétaldéhyde produit (mg/l)	10	12	6	6
Diacétyle accumulé (mg/l)	3,3	1,7	1,5	1,4
Acétoïne accumulée (mg/l)	433	327	286	309
2,3-butanediol produit (mg/l)	76	78	108	101

Tableau III.15 : tableau récapitulatif des consommations de substrats et productions de métabolites et de biomasse aux états stationnaires atteints à pH 7 en culture continue à recyclage cellulaire.

III.2.1. CONSOMMATION DE SUBSTRATS CARBONES ET PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

□ Production de biomasse

La concentration de biomasse dans le réacteur diminue logiquement lorsque le taux de purge augmente, tout en restant au minimum du même ordre de grandeur que celle obtenue en mode discontinu à pH 7 (1,8 g/l). Le gain induit par le recours au mode de

culture continu avec recyclage cellulaire est donc faible si la concentration en biomasse atteinte est considérée. Néanmoins, l'état physiologique de cette quantité de biomasse est très différent de celui de la biomasse obtenue en fin de culture discontinue, les cellules étant maintenues à un taux de croissance allant jusqu'à 0,41 h^{-1}.

❒ Catabolisme du lactose

L'utilisation du lactose avec ce milieu enrichi est toujours incomplète, quel que soit le taux de dilution appliqué, et diminue lorsque celui-ci augmente. Toutefois, il est probable qu'avec un milieu Y standard, la consommation du lactose aurait été totale. La consommation de lactose est accompagnée d'une production de lactate, mais avec un rendement de conversion toujours inférieur à 1,05 g/g. Le flux carboné provenant du catabolisme du lactose n'est donc pas exclusivement orienté vers la LDH dans ces conditions expérimentales et l'ampleur de cette fuite de carbone augmente avec le taux de dilution.

❒ Clivage du citrate

La consommation du citrate, tout comme celle du lactose, n'est pas totale pour les différents taux de dilution considérés. La proportion de citrate métabolisée est faiblement affectée par la variation du taux de dilution. En parallèle, de l'acétate est produit, mais avec une concentration largement influencée par le taux de dilution. En effet, la concentration en acétate produit diminue avec l'augmentation du taux de dilution. En conséquence, le rendement en acétate formé / citrate consommé augmente quand le taux de dilution décroît, pour atteindre une valeur aussi élevée que 7,4 mol / mol à un taux de dilution de 0,08 h^{-1}. L'excédent d'acétate, tout comme l'éthanol produit, semblent découler du flux carboné orienté vers la PFL ou vers la PDH.

❒ Production de métabolites via la PFL et la PDH

La concentration de formate augmente avec la diminution du taux de dilution. Cette augmentation de la concentration en formate peut d'ailleurs être rapportée à l'augmentation du rendement en acétate formé / citrate consommé dans les mêmes conditions. La concentration en éthanol ne suit pas la même évolution ; elle est faible au plus important taux de dilution puis devient importante et stable pour les 3 taux de dilution inférieurs. Enfin, la concentration en acétaldéhyde demeure faible, quel que soit le taux de dilution. La comparaison entre la somme de l'acétate excédentaire, de l'acétaldéhyde et de l'éthanol avec le formate produit permet d'établir que la PFL est à l'origine de la majorité de la production d'acétate excédentaire, quand elle a lieu, ainsi que de celle d'éthanol et

d'acétaldéhyde. L'action de la PDH n'est mise en évidence à l'aide de cette comparaison qu'au taux de dilution le plus faible, où son activité représente 25 % de l'activité totale de production d'acétate excédentaire, d'éthanol et d'acétaldéhyde. Cependant, Il est intéressant de constater qu'aux 3 taux de dilution les plus élevés, la somme des productions d'acétate excédentaire, d'éthanol et d'acétaldéhyde est inférieure à la production de formate. Il apparaît donc qu'une partie du flux métabolique d'acétyl-coenzyme A produit par la PFL n'est pas orientée vers la production d'acétate, d'éthanol ou d'acétaldéhyde. Dans ces conditions, il est tout à fait possible qu'une activité PDH non négligeable existe, et que l'acétyl-coenzyme A produit soit lui aussi orienté vers la production de molécules autres que l'acétate, l'acétaldéhyde ou l'éthanol.

□ Production de molécules en C4

La concentration globale de ces molécules augmente avec le taux de dilution, tout comme celle de leur précurseur, le pyruvate. Alors que les concentrations en acétoïne et diacétyle augmentent fortement au taux de dilution le plus élevé, la concentration en 2,3-butanediol n'est que modérément affectée. Ceci est probablement, en partie, la conséquence de la consommation incomplète, et peu sensible au taux de dilution, du citrate. Une concentration stable en citrate est donc maintenue dans le réacteur et peut réprimer la synthèse de l'acétoïne réductase. A ce phénomène de répression s'ajoute un phénomène d'inhibition de l'AR par l'acétoïne produite, qui limite encore la réduction d'acétoïne en 2,3-butanediol. Pour ce qui est du diacétyle, la concentration maximale atteinte est faible (1,3 mg/l), mais néanmoins nettement supérieure à celle obtenue en culture discontinue à pH 7 (0,3 mg/l).

III.2.2. DONNEES CINETIQUES DE CONSOMMATION DE SUBSTRATS CARBONES ET DE PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

L'étude des vitesses de production (ou productivités volumiques) ou de consommation de la biomasse, des deux substrats carbonés et des différents métabolites, apporte des données complémentaires quant au métabolisme et aux performances de cette souche cultivée en réacteur continu à recyclage cellulaire.

□ Production de biomasse

La vitesse de production de biomasse augmente avec la progression du taux de purge. Cette augmentation n'est pas simultanée à l'évolution de la vitesse de consommation du lactose, mais correspond par contre à l'évolution de la vitesse de consommation du citrate (figures III.49 , III.50 et III.51). Ainsi, ces cinétiques montrent un effet positif de

Culture continue de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A en réacteur à recyclage cellulaire en anaérobiose à pH 7.

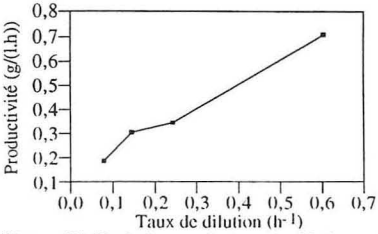


Figure III.49 : influence du taux de dilution sur la productivité en biomasse en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

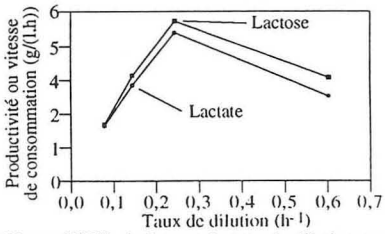


Figure III.50 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du lactose et la productivité en acide lactique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

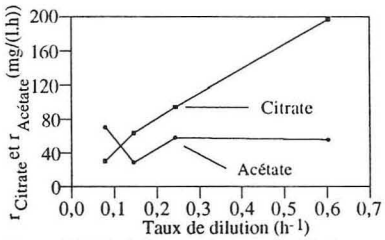


Figure III.51 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du citrate et la productivité en acide acétique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

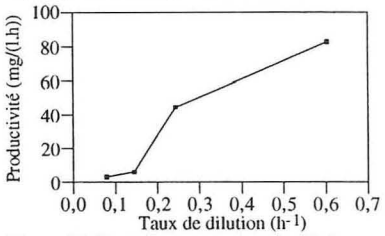


Figure III.52 : influence du taux de dilution sur la productivité en acide pyruvique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

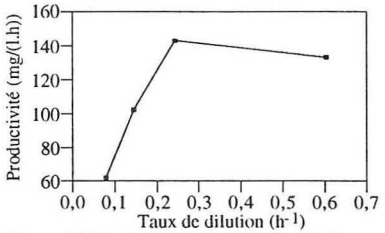


Figure III.53 : influence du taux de dilution sur la productivité en acide formique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

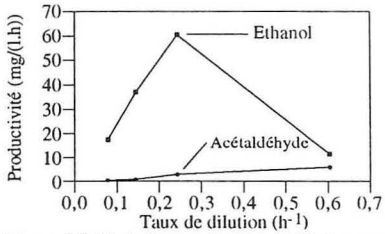


Figure III.54 : influence du taux de dilution sur les productivités en éthanol et acétaldéhyde en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

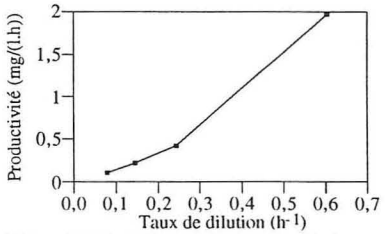


Figure III.55 : influence du taux de dilution sur la productivité en diacétyle en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

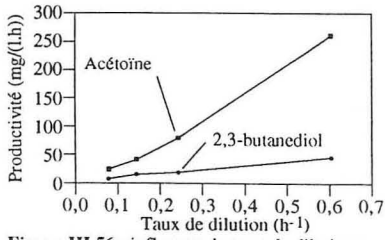


Figure III.56 : influence du taux de dilution sur les productivités en acétoïne et 2,3-butanediol en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

la consommation du citrate sur la croissance. Cet effet positif peut tout à fait provenir de la quantité croissante d'acétyl-coenzyme A produit par la PFL non transformé en acétate, éthanol ou acétaldéhyde lorsque le taux de dilution augmente, l'augmentation de cette quantité étant elle-même liée au métabolisme du citrate.

□ Catabolisme du lactose

La vitesse de consommation du lactose atteint un maximum pour la valeur intermédiaire de taux de dilution de 0,14 h^{-1}, tout comme la vitesse de production du lactate. Néanmoins, la différence entre la vitesse de consommation de lactose et celle de production de lactate augmente avec le taux de dilution (figure III.50).

□ Clivage du citrate

La vitesse de consommation du citrate augmente régulièrement avec le taux de dilution, contrairement à la vitesse de production de l'acétate qui a globalement tendance à décroître avec le taux de dilution (figure III.51). Cette comparaison des cinétiques de production d'acétate et de consommation du citrate confirme les premières constatations concernant une production d'acétate par un mécanisme autre que le clivage du citrate (Tableau III.15).

□ Accumulation de pyruvate

La vitesse d'accumulation du pyruvate augmente avec le taux de dilution (figure III.52). Ce résultat découle de l'augmentation du flux carboné provenant du lactose et non métabolisé en lactate ainsi que de l'augmentation de la vitesse de consommation du citrate (figures III.50 et III.51).

□ Production de métabolites via la PFL et de la PDH

La vitesse de production du formate, reflétant la vitesse de production de l'acétyl-coenzyme A, suit la même évolution que celle de consommation du lactose (figures III.50 et III.53). Un lien semble donc exister entre la vitesse de consommation du lactose et la vitesse de production de métabolites à partir de la PFL et ce lien existe aussi au niveau des vitesses spécifiques. Néanmoins le devenir de l'acétyl-coenzyme A produit par la PFL dépend des vitesses de consommation du lactose ou du citrate. La vitesse de production d'éthanol est dépendante de celle de consommation du lactose alors que la vitesse de production d'acétaldéhyde ou l'orientation d'acétyl-coenzyme A vers des productions autres que celles d'acétate, d'acétaldéhyde ou d'éthanol sont liées à la vitesse de

consommation du citrate (figures III.50, III.51 et III.54). Ces influences respectives peuvent être simplement expliquées par le pouvoir réducteur nécessaire à la synthèse de ces métabolites : plus un pouvoir réducteur important est nécessaire, plus la production de ce composé dépend de la vitesse de consommation du lactose, qui fournit le NADH + H^+ et moins la formation du métabolite nécessite de pouvoir réducteur, moins sa production est liée à la consommation du lactose et plus elle dépend de celle du citrate, source additionnelle de carbone sans formation de NADH + H^+.

- Production de molécules en C4

Les vitesses de production de diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol augmentent avec le taux de dilution (figures III.55 et III.56). Cette augmentation est en relation avec l'augmentation de la vitesse de production du pyruvate (figure III.52). L'augmentation de la vitesse de production du pyruvate rend l'ALS, peu affine initialement pour ce substrat, capable de traiter un flux croissant de pyruvate.

III.2.3. ORIENTATION DU FLUX CARBONE ISSU DU LACTOSE ET DU CITRATE

La vitesse spécifique globale d'utilisation des sources carbonées découle de celles de consommation du lactose et du citrate, mais, du fait de la prépondérance de la vitesse de consommation du lactose sur celle du citrate, l'évolution est comparable à celle de la vitesse spécifique de consommation du lactose, avec un maximum pour un taux de dilution de 0,24 h^{-1} (figure III.57).

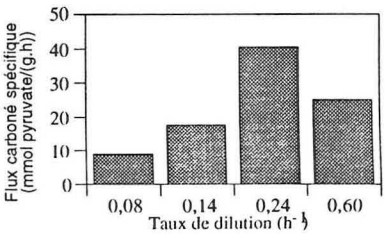


Figure III.57 : influence du taux de dilution sur le flux carboné spécifique catabolisé en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

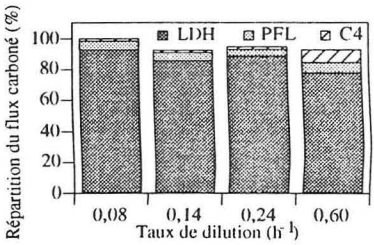


Figure III.58 : influence du taux de dilution sur la répartition du flux carboné catabolisé en culture continue à recyclage cellulaire à pH 7.

Le recouvrement carboné calculé aux différents taux de dilution paraît très satisfaisant, avec au minimum 93 % (figure III.58), ce qui indique que les éléments complexes du milieu de culture (extrait de levure et peptones de caséines ne semblent pas interférer avec le catabolisme du lactose et du citrate. Les légers écarts par rapport à 100 % peuvent être reliés à la production par la PFL d'acétyl-coenzyme A non utilisé pour la

synthèse d'acétate, d'éthanol ou d'acétaldéhyde. Ainsi, il apparaît que les voies majeures de dégradation du pyruvate provenant du catabolisme du lactose et du citrate sont toutes identifiées.

La part du flux catabolique global alimentant la LDH diminue lorsque le taux de dilution augmente (figure III.58). La cause de ce phénomène est la participation croissante du citrate au flux carboné global. Ainsi, un flux croissant de pyruvate formé sans production de NADH + H^+ est produit. Ce flux croissant ne peut donc être traité par la LDH du fait d'un manque de disponibilité de ce coenzyme. Ce flux de pyruvate croissant avec le taux de dilution est alors orienté vers la production de molécules en C4, la faible affinité de l'ALS pour le pyruvate devenant de moins en moins limitante (figure III.58).

La part du flux catabolique orienté vers la PFL ne semble pas être affectée par les variations du taux de dilution et reste toujours proche de 5 % dans l'intervalle de taux de dilution considéré (figure III.54). Enfin, l'orientation du flux carboné vers la PDH est difficile à évaluer, vu l'orientation d'une partie de l'acétyl-coenzyme A vers la production de molécules autres que l'acétate, l'acétaldéhyde ou l'éthanol.

III.2.4. CONCLUSIONS

La quantité de biomasse produite en culture continue avec recyclage cellulaire est au minimum du même ordre de grandeur que celle obtenue en culture discontinue, pour les taux de purge appliqués. La concentration maximale en biomasse atteinte avec le taux de purge le plus faible n'est que 2,7 g/l, soit seulement 50 % supérieure à la production de biomasse en culture discontinue. Néanmoins, en dépit de ce résultat très moyen, la productivité en biomasse est améliorée d'un facteur 3 par la mise en œuvre des cellules en réacteur continu à recyclage cellulaire au plus fort taux de dilution appliqué. De plus, à ce taux de dilution, le rendement de production de biomasse par rapport à la consommation de lactose est amélioré de plus de 50 % par rapport à la culture discontinue de référence.

	Production ou consommation		Vitesse de production ou consommation		Vitesse spécifique de production ou consommation	
Culture	Discontinue	Recyclage cellulaire	Discontinue	Recyclage cellulaire	Discontinue	Recyclage cellulaire
Biomasse	1,8 g/l	1,7 g/l	0,22 g/(l.h)*	0,71 g/(l.h)	0,79 g/(g.h)°	0,41 g/(g.h)
Lactose	9,7 g/l	6,1 g/l	1,21 g/(l.h)*	6,64 g/(l.h)	4,67 g/(g.h)°	4,04 g/(g.h)
Citrate	1,2 g/l	0,33 g/l	0,15 g/(l.h)*	0,20 g/(l.h)	2,10 g/(g.h)°	0,11 g/(g.h)
Diacétyle	0,3 mg/l	1,3 mg/l	0,04 mg/(l.h)*	1,97 mg/(l.h)	2,9 mg/(g.h)°	1,1 mg/(g.h)

Tableau III.16 : comparaison à pH 7 des performances de cultures discontinue et continue avec recyclage cellulaire à un taux de dilution de 0,60 h^{-1}, correspondant aux vitesses de production de biomasse et de diacétyle maximales.
* : vitesse moyenne ° : vitesse spécifique maximale.

Le recours au mode de culture continu avec recyclage cellulaire permet aussi l'obtention de milieux de culture fermentés contenant une quantité plus élevée de diacétyle qu'en culture discontinue. Cette augmentation de la concentration en diacétyle est accompagnée d'un gain de productivité de 50 fois par rapport à la culture discontinue à pH 7 (tableau III.16). La productivité en diacétyle augmentant avec le taux de dilution et le taux de purge maximal appliqué étant éloigné du taux de purge critique, l'obtention de gains en productivité encore plus importants à des taux de dilution accrus est prévisible.

Ce mode de mise en œuvre des bactéries lactiques productrices d'arômes se révèle donc intéressant pour la production de diacétyle, à un pH pourtant assez peu favorable. Les gains induits en production et vitesse de production de biomasse sont par contre relativement minimes par rapport à l'augmentation de la complexité du procédé. Qui plus est, les vitesses spécifiques de consommation des deux substrats carbonés et de production de diacétyle étant inférieures aux vitesses spécifiques maximales de production/consommation en culture discontinue (tableau III.16), il en résulte que l'état physiologique dans lequel sont les cellules mises en œuvre en réacteur continu avec recyclage cellulaire est loin d'être l'état optimal, avec des conséquences néfastes pour l'utilisation de la biomasse produite par ce procédé comme ferment industriel. Enfin, ces productivités améliorées en diacétyle et biomasse sont accompagnées d'une utilisation incomplète des sources carbonées lactose et citrate découlant naturellement des forts taux de dilution appliqués. Ce faible niveau d'utilisation des sources carbonées peut être recherché si l'obtention d'un produit modérément acide est souhaitée, mais représente aussi un risque technologique important d'évolution microbiologique non contrôlée du produit.

III.3. MISE EN ŒUVRE EN CONDITIONS DE CROISSANCE/AROMATISATION

La souche de référence est cette fois-ci mise en œuvre à pH 5,5, condition permettant, en culture discontinue, l'obtention d'une croissance modeste, et surtout l'orientation du flux catabolique à la fois vers la LDH, la PFL et la ou les voies de production de molécules en C4.

Comme pour la culture précédente, un débit de perméat important au cours de l'expérience n'est pas obtenu (tableau III.17). Seuls 3 états stationnaires sont atteints, dont un pour lequel une lyse cellulaire importante est observée, ce qui rend les interprétations plus difficiles. Néanmoins, un taux de purge maximal de 0,47 h^{-1}, quasi identique à la vitesse spécifique maximale de production de biomasse en culture discontinue à pH 5,5, a été appliqué. L'éventail des taux de purge pouvant être appliqués a donc été couvert, malgré le faible nombre d'états stationnaires.

Taux de purge (h^{-1})	0,47	0,31	0,20
Taux de perméat (h^{-1})	0,98	0,66	0,03
Taux de dilution (h^{-1})	1,45	0,97	0,23
Biomasse produite (g/l)	0,06	0,64	0,01
Lactose consommé (g/l)	0,9	2,1	4,4
Lactate formé (g/l)	0,3	1,9	4,3
$Y_{lactate/lactose}$ (g/g)	0,39	0,90	0,99
Citrate consommé (g/l)	0,08	1,17	1,25
Acétate produit (g/l)	0,22	0,53	0,45
$Y_{acétate/citrate}$ (mol/mol)	8,88	1,44	1,15
Pyruvate accumulé (mg/l)	44	68	271
Formate produit (mg/l)	90	11	12
Ethanol produit (mg/l)	1	6	9
Acétaldéhyde produit (mg/l)	3	5	5
Diacétyle accumulé (mg/l)	5,2	3,3	4,4
Acétoïne accumulée (mg/l)	413	452	409
2,3-butanediol produit (mg/l)	31	48	44

Tableau III.17 : tableau récapitulatif des consommations de substrats et productions de métabolites et de biomasse aux états stationnaires atteints à pH 5,5 en culture continue à recyclage cellulaire.

III.3.1. CONSOMMATION DE SUBSTRATS CARBONES ET PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

❒ Production de biomasse

La concentration en biomasse est toujours faible et est maximale au taux de purge intermédiaire de 0,31 h^{-1}. Au taux de purge supérieur, cette concentration diminue de façon logique. Par contre, la diminution de la concentration en biomasse à faible taux de dilution est surprenante, d'autant plus qu'elle est intervenue brutalement après le changement de taux de purge et a été accompagnée par un colmatage très rapide et important de la membrane de microfiltration. L'observation microscopique du milieu réactionnel à cet état stationnaire révèle la présence de nombreux fantômes de bactéries. Ainsi, la diminution de la quantité de biomasse à faible taux de dilution peut être attribuée à un phénomène de lyse, entraînant le relargage dans le milieu du contenu cellulaire avec des conséquences importantes sur les performances du module de filtration. La cause de cette lyse cellulaire n'a pu être déterminée. Néanmoins, l'atteinte d'un état stationnaire avec une activité métabolique importante ne semble pas cohérente avec une succession de

cycles lytiques phagiques. L'hypothèse la plus probable est donc le déclenchement d'un phénomène d'autolyse avec la diminution du taux de purge à pH 5,5.

❐ Catabolisme du lactose

La consommation du lactose est toujours très incomplète et faible, avec toutefois une augmentation du niveau de consommation lorsque le taux de dilution diminue. Cette consommation de lactose est accompagnée d'une production d'acide lactique avec un rendement lactate produit / lactose consommé diminuant avec l'augmentation du taux de dilution. En particulier, au taux de dilution maximal, le rendement lactate produit / lactose consommé est très faible (0,39 g/g), ce qui indique qu'une partie importante du flux carboné issu du lactose consommé n'est pas orienté vers la LDH.

❐ Clivage du citrate

La consommation du citrate est totale à faible taux de dilution, et diminue lorsque celui-ci augmente. La production globale d'acétate n'est pas liée à la consommation de citrate, ce qui doit provenir d'une forte production d'acétate à partir du pyruvate métabolisé par la PFL ou la PDH. En effet, le rendement acétate produit / citrate consommé est toujours supérieur à 1 et augmente avec le taux de dilution.

❐ Accumulation de pyruvate

La concentration en pyruvate augmente lorsque le taux de dilution diminue avec, en particulier, une concentration élevée de l'ordre de 270 mg/l pour le taux de dilution le plus faible. Cette augmentation de la concentration en pyruvate découle des niveaux d'utilisation croissants de ses précurseurs que sont le lactose et le citrate.

❐ Production de métabolites via la PFL et la PDH

Le rendement en acétate produit / citrate consommé toujours supérieur à 1 indique que l'acétate est un métabolite fortement produit par la PFL ou la PDH. Comparées à cette production d'acétate, les productions d'éthanol et d'acétaldéhyde sont minimes. La comparaison entre la quantité excédentaire d'acétate produite additionnée des productions d'éthanol et d'acétaldéhyde avec la quantité de formate montre qu'une part non négligeable du flux carboné orienté vers la PFL et la PDH est en fait traitée par la PDH (tableau III.18). Qui plus est, cette part du flux orienté vers la PDH évolue de la même façon que la part du citrate dans le flux carboné global (tableau III.18). L'explication de ce phénomène provient de la nécessité pour la cellule de maintenir un équilibre pour les coenzymes

d'oxydoréduction. Plus la part du citrate dans le flux carboné total augmente, plus grande est la part de pyruvate formé sans production de NADH + H^+ ne pouvant pas être réduite en lactate et plus une accumulation toxique de pyruvate peut avoir lieu. Alors, l'orientation de pyruvate vers la PDH présente un double intérêt : du pyruvate potentiellement toxique est éliminé et surtout, dans le cas de la production d'acétate, un potentiel réducteur sous forme de NADH + H^+ est obtenu, potentiel pouvant être utilisé par la LDH pour cataboliser une quantité supplémentaire de pyruvate, et donc améliorant l'activité glycolytique de la cellule.

Taux de dilution (h^{-1})	1,45	0,97	0,23
Part du citrate dans le flux carboné total (mol/mol)	0,14	0,50	0,34
Part de la PDH dans le flux total PDH + PFL (mol/mol)	0,41	0,92	0,79

Tableau III.18 : évolution de la part du flux métabolisé par la PDH par rapport au flux total métabolisé par la PFL et la PDH en fonction de la part du citrate dans le flux carboné global à différents taux de dilution.

□ Production de molécules en C4

La production de molécules en C4 est assez peu sensible aux importantes variations du taux de dilution imposées au réacteur. Ceci est surprenant car une forte augmentation de la production de pyruvate a lieu au taux de dilution le plus faible, sans effet sur la production de molécules en C4 qui en découlent pourtant physiologiquement. Cette indépendance entre la production de molécules en C4 et la production de pyruvate pourrait en fait être la conséquence, au plus faible taux de dilution, de la lyse des cellules induisant une augmentation importante de la concentration en pyruvate dans le milieu, sans que la concentration intracellulaire en pyruvate des cellules non affectées par la lyse soit grandement modifiée.

III.3.2. DONNEES CINETIQUES DE CONSOMMATION DE SUBSTRATS CARBONES ET DE PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

□ Production de biomasse

La vitesse de production de biomasse atteint une valeur maximale pour le taux de dilution intermédiaire de 0,97 h^{-1}. Ce type d'évolution est difficile à interpréter vu le nombre réduit de points expérimentaux et la lyse cellulaire apparue au plus faible taux de dilution.

Culture continue de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A en réacteur à recyclage cellulaire en anaérobiose à pH 5,5.

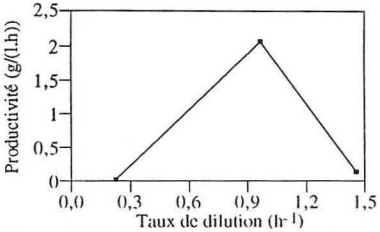


Figure III.59 : influence du taux de dilution sur la productivité en biomasse en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

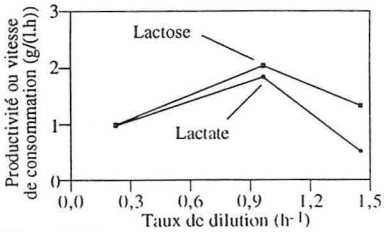


Figure III.60 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du lactose et la productivité en acide lactique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

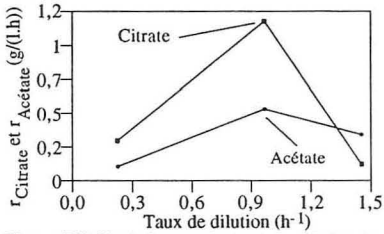


Figure III.61 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du citrate et la productivité en acide acétique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

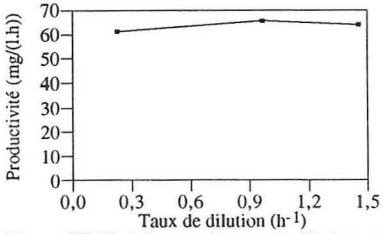


Figure III.62: influence du taux de dilution sur la productivité en acide pyruvique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

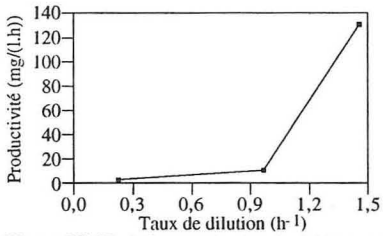


Figure III.63 : influence du taux de dilution sur la productivité en acide formique en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

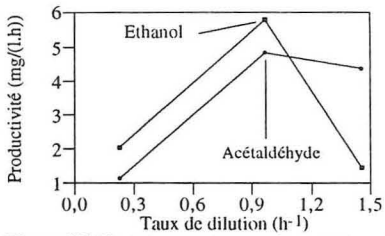


Figure III.64 : influence du taux de dilution sur les productivités en éthanol et acétaldéhyde en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

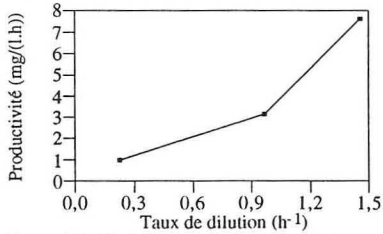


Figure III.65 : influence du taux de dilution sur la productivité en diacétyle en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

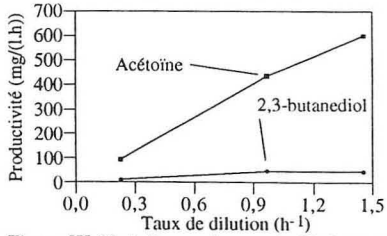


Figure III.66 : influence du taux de dilution sur les productivités en acétoïne et 2,3-butanediol en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

□ Voies métaboliques principales

Les vitesses de consommation des substrats principaux lactose et citrate ainsi que les vitesses de production de lactate et d'acétate présentent toutes un maximum apparent pour le taux de dilution intermédiaire de 0,97 h^{-1} (figures III.59 et III.60). Néanmoins, la vitesse de production du lactate s'éloigne de celle de consommation du lactose quand le taux de dilution augmente. De plus, il n'existe pas de proportionnalité entre l'évolution de la vitesse de consommation du citrate et celle de production d'acétate. Il en résulte qu'une part croissante avec le taux de dilution de flux carboné provenant du lactose n'est pas orientée vers la LDH et qu'une production additionnelle d'acétate par un mécanisme autre que le clivage du citrate a lieu. La vitesse d'accumulation du pyruvate reste stable pour les trois taux de dilution (figure III.62), ce qui signifie que malgré les variations importantes des vitesses de consommation du lactose et du citrate, la vitesse d'utilisation du pyruvate s'adapte à la vitesse de production dans l'intervalle de taux de dilution considéré.

□ Orientation du pyruvate vers les voies métaboliques mineures

La vitesse de formation du formate, révélatrice de l'activité de la PFL, augmente avec le taux de dilution, en relation d'ailleurs avec l'écart entre vitesse de consommation du lactose et vitesse de production du lactate (figures III.60 et III.63). Par contre, les vitesses de production des métabolites formés à partir de l'acétyl-coenzyme A issu de l'action de la PFL et de la PDH présentent toutes un maximum au taux de dilution intermédiaire de 0,97 h^{-1}, comme les vitesses de consommation de lactose et de citrate (figures III.60, III.61 et III.64). Cette différence d'évolution entre les vitesses de production d'acétate, d'éthanol et d'acétaldéhyde et celle de production du formate est elle aussi révélatrice du rôle important de la PDH dans le catabolisme du pyruvate. Les vitesses de production de molécules en C4 peuvent, tout comme celle de production du formate, être reliées à l'écart entre vitesse de consommation du lactose et vitesse de production du lactate (figures III.60, III.65 et III.66). Ainsi, la présence d'une disponibilité supérieure en pyruvate influe sur son orientation vers ces voies métaboliques.

III.3.3. ORIENTATION DU FLUX CARBONE ISSU DU LACTOSE ET DU CITRATE

La vitesse spécifique globale d'utilisation des sources carbonées lactose et citrate croît en fonction du taux de dilution pour les deux taux de dilution les plus élevés, en conséquence d'une diminution en proportion plus importante de la concentration en biomasse par rapport aux diminutions des vitesses de consommation du lactose et du citrate (tableau III.17 et figures III.60, III.61 et III.67). Cependant, la valeur de vitesse spécifique d'utilisation du flux carboné au taux de dilution le plus faible ne doit pas être

prise en compte, vu les fortes incertitudes portant sur la mesure de la très faible concentration en biomasse. Le recouvrement carboné est toujours très proche de 100 %, comme à pH 7 et l'écart par rapport à 100 % peut ici encore être relié à l'importance du flux carboné orienté vers la PDH.

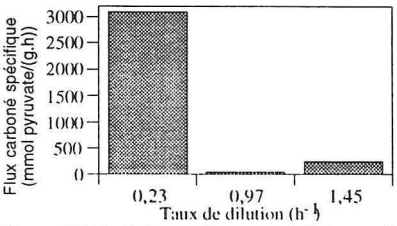


Figure III.67 : influence du taux de dilution sur le flux carboné spécifique catabolisé en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

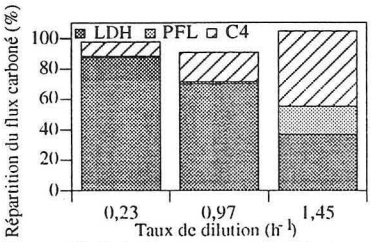


Figure III.68 : influence du taux de dilution sur la répartition du flux carboné catabolisé en culture continue à recyclage cellulaire à pH 5,5.

Comme à pH 7, la part du flux carboné orientée vers la LDH diminue avec le taux de dilution, sans toutefois qu'un lien puisse être établi avec la part du citrate dans le flux catabolique global (figure III.68 et tableau III.17). Néanmoins, la LDH catabolisant une proportion moindre du flux carboné avec l'augmentation du taux de dilution, la part restante est orientée vers la PFL et la production de molécules en C4 (figure III.68). L'orientation du flux carboné vers la PDH (tableau III.18) dépend par contre de la proportion du citrate dans le flux catabolique global. Plus la part du citrate est importante, plus la quantité de pyruvate produite sans réduction de NAD^+ augmente, et plus une part importante du flux est orientée vers la PDH avec production d'acétate, de façon à produire du NADH + H^+.

III.3.4. CONCLUSIONS

La mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en réacteur continu à recyclage cellulaire à pH 5,5 permet l'obtention d'un milieu de culture fermenté correctement aromatisé en diacétyle, avec toutefois une concentration légèrement inférieure à celle atteinte en mode discontinu (tableau III.19). Toutefois, le rendement en diacétyle formé par rapport au citrate consommé est amélioré d'un facteur 12,5 avec l'utilisation d'un réacteur continu à recyclage cellulaire par rapport à une culture discontinue. De plus, un gain de productivité en diacétyle apporté par le recours au mode de culture continu avec recyclage cellulaire, proche d'un facteur 30, semble très prometteur puisqu'il a été obtenu sans contrôle optimal du débit de perméat. Ainsi, des progrès plus importants pourraient être observés.

	Production ou consommation		Vitesse de production ou consommation		Vitesse spécifique de production ou consommation	
Culture	Discontinue	Recyclage cellulaire	Discontinue	Recyclage cellulaire	Discontinue	Recyclage cellulaire
Biomasse	1,2 g/l	0,06 g/l	0,05 g/(l.h)*	0,14 g/(l.h)	0,46 g/(g.h)°	0,47 g/(g.h)
Lactose	9,7 g/l	0,9 g/l	0,41 g/(l.h)*	0,59g/(l.h)	1,41 g/(g.h)°	9,31 g/(g.h)
Citrate	1,2 g/l	0,08 g/l	0,05 g/(l.h)*	0,12 g/(l.h)	2,70 g/(g.h)°	1,84 g/(g.h)
Diacétyle	6,2 mg/l	5,2 mg/l	0,26 mg/(l.h)*	7,62 mg/(l.h)	16,3 mg/(g.h)°	119,1 mg/(g.h)

Tableau III.19 : comparaison à pH 5,5 des performances de cultures discontinue et continue avec recyclage cellulaire à un taux de dilution de 1,45 h^{-1}, correspondant à la vitesse maximale de production de diacétyle.
* : vitesse moyenne ° : vitesse spécifique maximale.

Le niveau de biomasse dans le réacteur au taux de dilution où la productivité en diacétyle est maximale est très faible. Néanmoins, la productivité en biomasse est quasiment triplée par rapport à celle d'une culture discontinue à pH 5,5, du fait de l'importance du taux de purge. De plus, l'état physiologique de cette biomasse est excellent, puisque les vitesses spécifiques de consommation du lactose et du citrate et de production du diacétyle sont soit largement supérieures, soit du même ordre de grandeur que les vitesses maximales déterminées en culture discontinue. Cet excellent état physiologique peut être attribué à la combinaison de l'élimination en continu du lactate ou d'autres métabolites toxiques par le module de recyclage cellulaire et du fort taux de purge appliqué, maintenant les cellules à une forte vitesse spécifique de croissance. Au vu de ces résultats, il est d'ailleurs probable qu'une activité physiologique bien meilleure aurait pu être obtenue à pH 7 si des taux de purge et de dilution suffisamment élevés avaient pu être appliqués.

Un tel mode de culture s'avère donc adapté tant à l'aromatisation qu'à l'inoculation en continu de produits laitiers. Le niveau d'aromatisation obtenu, bien qu'inférieur en valeur absolue à celui atteint en culture discontinue est toutefois intéressant car le diacétyle présent dans le perméat n'est pas sensible à une réduction en acétoïne ou 2,3-butanediol du fait de l'absence des cellules. De même, bien que le niveau d'inoculation soit réduit, l'activité de la biomasse est excellente.

Néanmoins, en dépit de ces performances intéressantes, ce mode de culture présente certains inconvénients. En effet, les productivités élevées sont obtenues à forts taux de dilution et de purge au détriment de la consommation complète des substrats carbonés, qui peut s'avérer dommageable pour la conservation du produit fermenté. Qui plus est, cette expérience, comme la précédente, met en évidence la complexité de mise en œuvre d'un tel mode de culture, avec en particulier la difficulté de contrôler le flux de perméat. Enfin, l'observation d'un phénomène de lyse laisse planer des doutes quant à la fiabilité d'un procédé d'aromatisation faisant appel à ce mode de culture.

III.4. CONCLUSIONS

D'un point de vue physiologique, ces cultures continues avec recyclage cellulaire ont permis de mettre en évidence des règles d'orientation du flux carboné vers la LDH, la PFL, la PDH ou la production de molécules en C4.

En premier lieu, l'orientation du flux carboné vers la LDH est d'autant plus faible que le taux de dilution est important (tableau III.20). Ceci est en relation, à pH 7, avec l'augmentation de la part du citrate dans le flux carboné total catabolisé. Quand le taux de dilution augmente, le rapport citrate consommé / lactose consommé augmente lui aussi, et une part croissante de pyruvate est produite sans formation de NADH + H^+ indispensable à sa réduction en lactate par la LDH. Du fait du manque de données expérimentales, un tel lien entre augmentation du taux de dilution et augmentation du rapport citrate / lactose n'a toutefois pu être établi à pH 5,5.

Taux de dilution	↗
Flux carboné orienté vers la LDH	↘
Flux carboné orienté vers la production de molécules en C4	↗

Tableau III.20 : représentation simplifiée de l'effet du taux de dilution sur l'orientation du flux carboné provenant du lactose et du citrate vers la LDH et la production de molécules en C4.

En conséquence de cet apport croissant de pyruvate avec l'augmentation du taux de dilution, la part globale du flux carboné orientée vers les voies cataboliques autres que la LDH augmente, avec des comportements qui peuvent varier suivant le pH. La part du flux catabolique total orientée vers la PFL ne semble pas dépendre du taux de dilution à pH 7 alors qu'elle augmente avec le taux de dilution à pH 5,5. La part orientée vers la production de molécules en C4 augmente quant à elle systématiquement avec le taux de dilution. La part du flux catabolique total métabolisée par la PDH n'évolue pas directement en fonction du taux de dilution puisqu'elle est soumise à l'évolution du rapport de consommations citrate / lactose. En effet, le rôle physiologique de l'orientation du flux carboné vers la PDH avec production d'acétate en aval semble être de régénérer du NADH + H^+ pour maintenir le rapport NADH + H^+ / NAD^+ à un niveau suffisamment élevé, ce rapport étant perturbé du fait de la progression de la part du citrate dans le flux catabolique global.

D'un point de vue technologique, ces expériences montrent que ce mode de culture apporte des gains notables de productivité tant en diacétyle, avec une amélioration d'un facteur 30 par rapport à la culture discontinue à pH 5,5, qu'en biomasse avec une multiplication par 3 de la productivité par rapport à une culture discontinue à pH 7. Qui

plus est, en ce qui concerne la production de diacétyle, une amélioration du rendement en diacétyle formé par rapport au citrate consommé d'un facteur 12,5 a été obtenue à pH 5,5. De plus, la biomasse produite en culture continue à haute densité cellulaire à fort taux de dilution présente des vitesses spécifiques de consommation des substrats carbonés et de production de diacétyle élevées, gage d'efficacité pour une utilisation en tant qu'inoculum.

Néanmoins, ces gains, il est vrai améliorables, sont obtenus au prix d'un accroissement important de la complexité du procédé. En effet, l'intégration dans un procédé de production de produits laitiers fermentés d'une installation de culture continue avec recyclage cellulaire assurant, d'une part, une fonction d'inoculation-aromatisation par le débit de purge et, d'autre part, une fonction d'aromatisation par le débit de perméat risque de s'avérer particulièrement ardue. Enfin, l'apparition d'une lyse à pH 5,5 en diminuant le taux de dilution permet d'émettre des doutes quant à la robustesse d'un tel mode de production sachant que de nombreux dysfonctionnements affectant les systèmes d'alimentation en substrat, de purge ou de décolmatage peuvent provoquer des changements physiologiques nécessitant l'arrêt et le reconditionnement de l'installation.

IV. MISE EN ŒUVRE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEUR CONTINU A CELLULES IMMOBILISEES EN LIT FIXE

Cette étude vise à évaluer l'influence d'un second mode de culture continue à haute densité cellulaire, la culture continue de cellules immobilisées en réacteur à lit fixe, sur la physiologie de la souche de référence et sur les performances en aromatisation et éventuellement en production de biomasse. La phase initiale de cette étude consiste en la sélection d'un support d'immobilisation adéquat. Par la suite, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A est mis en œuvre à différents taux de dilution en culture continue sur un lit fixe constitué de ce support dans des conditions initiales soit favorables à la croissance (pH 7), soit favorables à une coexpression des différentes voies cataboliques (pH 5,5).

IV.1. ETUDES PRELIMINAIRES

Ce travail préalable à la mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A en réacteur continu à cellules immobilisées en lit fixe consiste à sélectionner un support pour l'immobilisation des cellules. Les critères de choix retenus sont la non-toxicité du support vis-à-vis des cellules, ses capacités d'immobilisation, la force des interactions cellules-support et enfin, sa résistance à l'action des cellules et aux contraintes hydrodynamiques. Les différents supports dont les propriétés sont évaluées sont répertoriés dans le tableau III.21. Les catégories de supports considérées vont des matériaux organiques ou minéraux les plus rustiques à des résines échangeuses d'ions plus évoluées techniquement.

Nature du support	Appellation commerciale	Code
Diatomées	Célite R 635	R635
Verre	Verre (D : 2mm)	BV1
Verre	Verre (D : 3 mm)	BV2
Rafles de maïs	Rafles de maïs RM16	RM16
Rafles de maïs	Rafles de maïs RM 12	RM12
Rafles de maïs	Rafles de maïs RM 8	RM8
Charbon activé	Acticarbone GAC 1240	GAC1240
Charbon activé	Acticarbone NC 35	NC35
Charbon activé	Acticarbone SA 1810	SA1810
Résine échangeuse d'ions	Amberlite 200 C	200C
Résine échangeuse d'ions	Amberlite IRA 900	IRA900
Résine échangeuse d'ions	Amberlite RF 14	RF14
Résine échangeuse d'ions	Amberlyst A 21	A 21
Résine échangeuse d'ions	Amberlyst 15 WET	15 WET
Résine échangeuse d'ions	Duolite A 378	A378
Résine échangeuse d'ions	Duolite C 26LF	C26LF

Tableau III.21: tableau récapitulatif des supports employés.

Cette sélection est réalisée à partir d'une série d'expériences de dépôt-colonisation-désorption en fiole d'Erlenmeyer. Dans un premier temps, les cellules sont mises en croissance pendant 72 h en présence du support dans ce type de fiole faiblement agitée (40 tr/mn) contenant du milieu Y à un pH initial de 7. Cette phase permet d'établir le contact initial entre les cellules et le support, ainsi que la colonisation ultérieure de celui-ci. Le suivi de cette phase consiste en des mesures de quantité de biomasse libre, de substrats carbonés résiduels et des observations visuelles de l'état du support. La faible consommation de ces substrats, pourtant totale dans les mêmes conditions mais en absence de supports, est révélatrice d'une toxicité du support pour les cellules. La quantité de biomasse libre est mesurée pour déterminer ultérieurement la quantité totale de biomasse formée durant la culture et le rapport entre biomasse immobilisée et biomasse libre pour chaque support.

Au cours de cette phase d'immobilisation, une consommation très incomplète des substrats carbonés par les cellules cultivées en présence des supports Amberlite 200 C, Amberlyst 15 WET et Duolite C 26 LF est observée. Ces supports, tous des résines échangeuses d'ions, ont des effets délétères sur le métabolisme des cellules. Ils ne sont donc pas aptes à la mise en œuvre de la souche de référence immobilisée en réacteur continu à lit fixe. De plus, les observations des différents fioles d'Erlenmeyer révèlent une forte attrition des matériaux à base de charbon activé Acticarbone GAC 1240, NC 35 et SA 1810 dans des conditions hydrodynamiques pourtant douces. Cette attrition est, en outre, accompagnée d'une coloration noire du milieu de culture indésirable pour la transformation de produits laitiers. Ces trois supports ne sont donc pas non plus adaptés à l'immobilisation de bactéries lactiques productrices d'arômes.

Suite à la phase d'immobilisation, a lieu une phase de désorption des cellules du support. Après élimination du milieu de culture et remise en suspension du support dans de l'eau physiologique stérile, la désorption des cellules s'effectue en trois étapes successives de 24 h à agitation croissante de 40, 150 et 250 tr/mn, permettant de désorber les cellules faiblement, moyennement ou fortement liées au support. Pour chaque étape, des mesures de biomasse dans la phase liquide sont effectuées, ainsi que des observations de l'état du support. Ainsi, la quantité de biomasse immobilisée, la qualité de l'immobilisation et la résistance du support aux conditions hydrodynamiques sont déterminées lors de cette phase.

Les meilleurs supports en terme de quantité de biomasse immobilisée par unité de volume de support sont les charbons activés, dont l'utilisation est par ailleurs exclue (figure III.69). Néanmoins, les rafles de maïs et résines échangeuses d'ions Amberlite IRA 900, Amberlyst A21 et Duolite A 378 permettent l'immobilisation d'une quantité intéressante de biomasse d'environ 10^9 cellules / ml de support. Les capacités des supports restants sont minimes et ne justifient pas leur mise en œuvre. Enfin, la qualité des interactions cellules-support est élevée (plus de 70 % de la biomasse immobilisée par des interactions fortes)

pour la grande majorité des supports (figure III.70). Seules la Célite R 635, les billes de verre et les résines Amberlyst A21 et Duolite A 378 présentent des interactions cellules-support de qualité moindre.

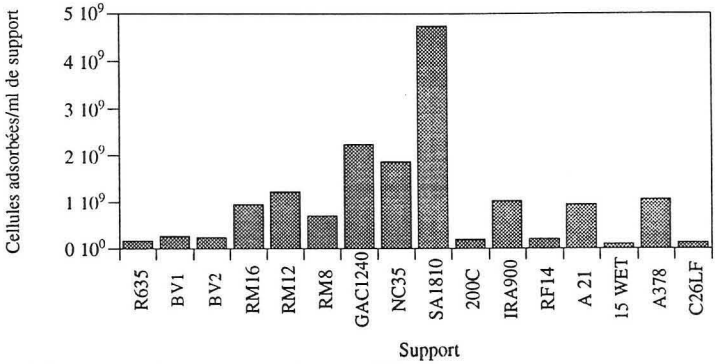


Figure III.69 : capacités d'adsorption volumiques des différents supports.

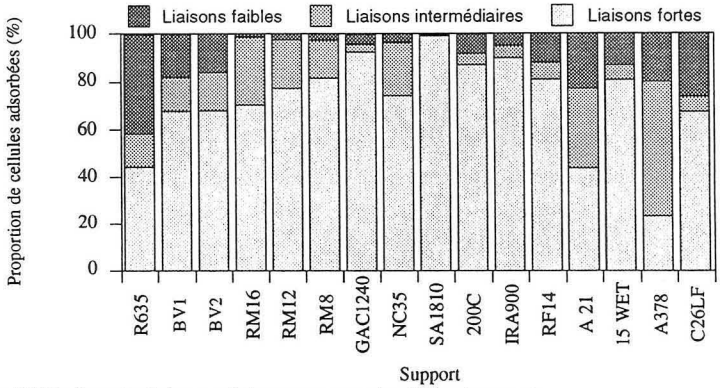


Figure III.70 : force des liaisons cellules-support pour les différents supports.

Ainsi, les seuls supports jugés aptes à l'emploi en réacteur continu à lit fixe, car étant non toxiques, résistant aux conditions hydrodynamiques et à l'action des cellules, présentant de bonnes capacités volumiques d'immobilisation et des forces d'interaction cellules-support élevées, sont les rafles de maïs et la résine échangeuse d'ions Amberlite IRA 900. Toutefois, la mise en œuvre plus complexe de la résine échangeuse d'ions (stérilisation chimique, rinçage et équilibrage), son coût élevé et les surcoûts induits par son traitement en aval du procédé font des rafles de maïs le support choisi pour mener à bien la suite de cette étude. Enfin, parmi les différentes granulométries de rafles de maïs, le produit RM 8 a été sélectionné pour la meilleure qualité des liaisons cellules-support, les expériences en réacteur à lit fixe devant être effectuées à des taux de dilution importants, et donc avec des conditions hydrodynamiques mettant le biofilm à rude épreuve.

IV.2. MISE EN ŒUVRE EN CONDITIONS DE CROISSANCE

Cette culture continue en réacteur à lit fixe a été effectuée avec un milieu d'alimentation dont le pH est fixé initialement à 7, pour favoriser la production de biomasse. Des taux de dilution croissants de 0,47 à 8,84 h^{-1} sont successivement appliqués. Pour chacun de ces taux de dilution, les concentrations en substrats, biomasse libre en sortie de réacteur et métabolites, ainsi que le pH sont mesurés à l'état stationnaire (Tableau III.22). Ces mesures en sortie ne permettent toutefois pas d'accéder à la connaissance des gradients de pH, de substrats et de métabolites existant au sein du lit fixe. La concentration en biomasse immobilisée n'est mesurée qu'en fin d'expérience par désorption des cellules du support. Les taux de dilution et vitesses de production et consommation sont exprimées en fonction du volume total du réacteur, et non du volume accessible au liquide qui ne représente que 25 % du volume total en fin d'expérience.

IV.2.1. CONSOMMATION DES SUBSTRATS CARBONES ET PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

□ Production de biomasse

La concentration moyenne en biomasse immobilisée à l'issue de l'expérience est élevée, avec 6,47 g/l de réacteur, avec un important gradient de la base vers le haut de la colonne. Par rapport à cette importante concentration en biomasse immobilisée, la concentration en biomasse libre en sortie de réacteur est très faible, quel que soit le taux de dilution. Cette observation confirme les résultats des études préliminaires sur la qualité des liaisons cellules-rafles de maïs et indique que la phase de dépôt-colonisation s'est effectuée dans des conditions satisfaisantes.

□ Catabolisme du lactose

Le lactose n'est jamais totalement consommé, quel que soit le taux de dilution étudié. Son taux d'utilisation diminue de façon attendue lorsque le taux de dilution augmente, du fait de la réduction du temps de passage. En parallèle, une production de lactate, elle aussi diminuant avec l'augmentation du taux de dilution, a lieu, avec, pour conséquence, une acidification moindre du milieu en sortie de réacteur à fort taux de dilution. Le rendement lactate produit / lactose consommé varie entre 1,15 et 0,87 g/g pour les différents états stationnaires. Il en résulte donc que le lactate est bien le principal métabolite dérivant du catabolisme du lactose mais aussi que, suivant le taux de dilution, le flux carboné provenant du lactose peut être orienté dans de faibles proportions vers

d'autres voies métaboliques, ou que d'autres sources de carbone peuvent fournir une quantité additionnelle de pyruvate pour la LDH.

Taux de dilution (h^{-1})	0,47	0,86	1,24	2,67	5,91	8,84
pH en sortie	4,9	5,1	5,3	5,6	5,9	6,0
Biomasse en sortie (g/l)	0,08	0,04	0,04	0,04	0,05	0,06
Lactose consommé (g/l)	4,3	3,9	3,1	2,2	1,4	1,2
Lactate formé (g/l)	4,4	4,4	2,7	2,0	1,3	1,1
$Y_{lactate/lactose}$ (g/g)	1,03	1,15	0,87	0,92	0,99	0,96
Citrate consommé (g/l)	1,15	1,15	1,05	0,77	0,70	0,35
Acétate produit (g/l)	0,48	0,87	0,66	0,20	0,34	0,26
$Y_{acétate/citrate}$ (mol/mol)	1,35	2,45	2,05	0,86	1,57	2,41
Pyruvate accumulé (mg/l)	46	58	67	54	42	123
Formate produit (mg/l)	0	0	0	0	40	196
Ethanol produit (mg/l)	176	388	511	647	169	298
Acétaldéhyde produit (mg/l)	0	0	1	2	1	0
Diacétyle accumulé (mg/l)	0	0	0	0	0	0
Acétoïne accumulée (mg/l)	152	110	99	112	180	96
2,3-butanediol produit (mg/l)	66	13	31	28	36	31

Tableau III.22 : tableau récapitulatif des consommations de substrats et productions de métabolites et de biomasse aux états stationnaires atteints à pH 7 en culture continue en réacteur à lit fixe.

❒ Clivage du citrate

L'utilisation du citrate est totale pour les plus faibles taux de dilution, mais diminue avec la progression du taux de dilution. La production d'acétate ne suit pas du tout la même évolution que la consommation de citrate, avec un rapport acétate produit / citrate consommé inférieur à 1 mol/mol à un taux de dilution de 2,67 h^{-1}, mais très supérieur à cette valeur pour les taux de dilution supérieurs et inférieurs. Ainsi, au taux de dilution de 2,67 h^{-1}, l'acétate issu du clivage du citrate est consommé alors qu'aux autres taux de dilution, une production additionnelle d'acétate a lieu, par action de la PFL ou de la PDH.

❒ Accumulation de pyruvate

La concentration en pyruvate, intermédiaire commun du métabolisme du lactose et du citrate, atteint une valeur maximale au plus fort taux de dilution, où paradoxalement l'utilisation tant du lactose que du lactate sont minimes. Cette évolution peut probablement

être due à des vitesses et vitesses spécifiques élevées de dégradation du lactose et du citrate aux forts taux de dilution.

▫ Flux carboné issu du lactose et du citrate orienté vers la PFL et la PDH

L'observation d'un rapport acétate formé / citrate consommé supérieur à 2 pour tous les taux de dilution sauf 2,67 h^{-1} prouve qu'une source additionnelle à celle du citrate existe. Cette formation d'acétate peut provenir de l'acétyl-coenzyme A formé par la PFL ou la PDH. L'absence de production de formate aux 4 taux de dilution les plus faibles indique que l'acétate excédentaire et l'éthanol produits à ces états stationnaires proviennent uniquement de l'activité PDH (tableau III.23).

Taux de dilution (h^{-1})	0,47	0,86	1,24	2,67	5,91	8,84
Part de la PDH dans le flux total PDH + PFL (mol/mol)	1,00	1,00	1,00	1,00	0,85	0,53

Tableau III.23 : évolution de la part du flux métabolisé par la PDH par rapport au flux total métabolisé par la PFL et la PDH en fonction de la part du citrate dans le flux carboné global à différents taux de dilution.

Pour tous les taux de dilution évalués, la part de la PDH dans le flux métabolique traité par la PDH et la PFL reste majoritaire, même si la part de la PFL augmente avec le taux de dilution. L'évolution décroissante puis croissante avec l'augmentation du taux de dilution du rapport acétate formé / citrate consommé avec la progression du taux de dilution peut donc provenir d'une diminution du flux carboné orienté vers la PDH, et d'une augmentation de celui orienté vers la PFL lorsque le taux de dilution croît.

La production d'acétate par la PDH semble ici encore jouer un rôle régulateur sur le rapport NADH + H^+ / NAD^+ en étant accompagnée de la production de NADH + H^+. La production d'éthanol est observée à tous les taux de dilution et peut donc provenir aussi bien de l'activité de la PFL que de la PDH. L'acétaldéhyde est produit quant à lui en quantités très réduites.

▫ Flux carboné issu du lactose et du citrate orienté vers la production de molécules en C4

La concentration en molécules en C4 reste modeste pour tous les taux de dilution avec une concentration totale inférieure à 220 mg/l. Seuls l'acétoïne et le 2,3-butanediol sont produits, aucune formation de diacétyle n'étant détectée. Cette absence de production peut être expliquée par une activité diacétyle réductase supérieure à la vitesse de décarboxylation oxydative de l'AAL, ou à une activité ADC supérieure ou égale à l'activité ALS.

IV.2.2. DONNEES CINETIQUES DE CONSOMMATION DE SUBSTRATS CARBONES ET DE PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

Considérons maintenant les vitesses de consommation et de production, qui, du fait de la stabilité du biofilm et du faible relargage des cellules à tous les taux de dilution, donnent aussi une bonne indication de l'évolution des vitesses spécifiques.

❒ Production de biomasse

La vitesse de production de biomasse libre en sortie de réacteur augmente avec le taux de dilution, en relation directe avec la vitesse de consommation du lactose, source principale de carbone et d'énergie (Figures III.71 et III.72).

❒ Catabolisme du lactose

La vitesse de consommation augmente avec le taux de dilution (figure III.72), du fait de l'apport d'une quantité accrue de lactose et d'une réduction des limitations diffusionnelles par augmentation des contraintes hydrodynamiques dans le réacteur qui favorisent l'assimilation du lactose et l'élimination du lactate par les cellules. Ces contraintes hydrodynamiques restent cependant relativement limitées, le régime d'écoulement passant de laminaire aux faibles taux de dilution à inertiel pour les taux les plus élevés. Une augmentation de la vitesse de production du lactate est associée à l'augmentation de la vitesse de consommation du lactose lorsque le taux de dilution croît. De plus, les vitesses de consommation du lactose et de production du lactate restent très proches.

❒ Clivage du citrate

L'évolution de la vitesse de consommation du citrate est différente de celle de consommation du lactose : la vitesse de consommation du citrate augmente avec le taux de dilution jusqu'à 5,91 h^{-1}, avant de décroître au taux supérieur (figure III.73). Cette évolution peut être expliquée par la combinaison de deux phénomènes : d'une part, l'augmentation du taux de dilution accroît le flux de citrate disponible pour les cellules et réduit les limitations diffusionnelles nuisant au transport du citrate dans les cellules, mais, d'autre part, cette augmentation est accompagnée d'une utilisation moindre du lactose et d'un niveau d'acidification du milieu de plus en plus faible (tableau III.22), limitant progressivement la perméation du citrate dans la cellule, l'activité de la citrate perméase étant maximale entre pH 4,5 et 5,5. L'évolution de la vitesse de production d'acétate n'est pas corrélée à celle de consommation du citrate puisqu'elle augmente globalement avec le taux de dilution, à l'exception notable de l'état stationnaire atteint à 2,67 h^{-1}, où de l'acétate

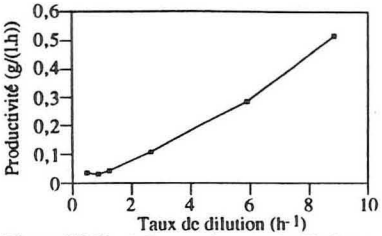


Figure III.71 : influence du taux de dilution sur la productivité en biomasse en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

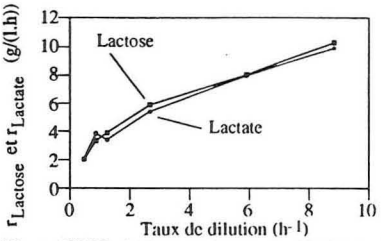


Figure III.72 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du lactose et la productivité en acide lactique en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

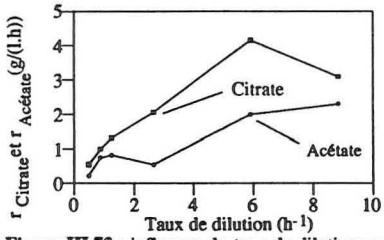


Figure III.73 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du citrate et la productivité en acide acétique en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

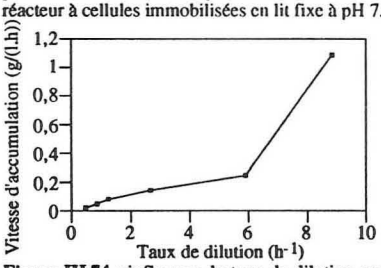


Figure III.74 : influence du taux de dilution sur la vitesse d'accumulation d'acide pyruvique en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

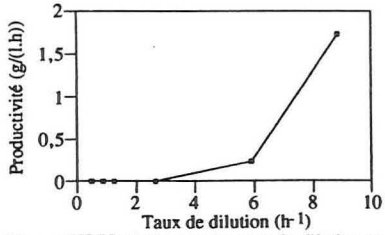


Figure III.75 : influence du taux de dilution sur la productivité en formate en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

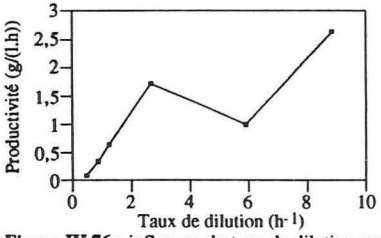


Figure III.76 : influence du taux de dilution sur la productivité en éthanol en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

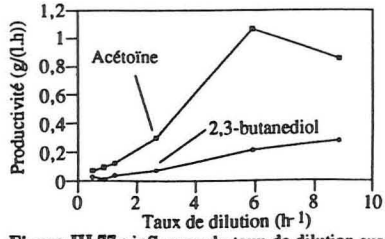


Figure III.77 : influence du taux de dilution sur les productivités en acétoïne et 2,3-butanediol en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 7.

provenant du clivage du citrate est consommé pour apporter une source additionnelle d'acétyl-coenzyme A (figure III.73).

❒ Accumulation de pyruvate

La vitesse d'accumulation du pyruvate augmente avec le taux de dilution, avec une progression très importante pour le taux de dilution le plus élevé (figure III.74). Cette forte progression ne peut en rien être reliée à l'évolution des vitesses de consommation du lactose et du citrate pour ce taux de dilution (figures III.72 et III.73) et doit plutôt provenir d'un catabolisme limitant du pyruvate.

❒ Flux carboné issu du lactose et du citrate orienté vers la PFL et la PDH

La vitesse de production du formate est nulle aux taux de dilution les plus faibles, puis augmente à partir de 5,91 h^{-1}. Cette évolution peut provenir d'une disponibilité moindre du pyruvate aux faibles taux de dilution (figure III.74). Les vitesses de production d'acétate et d'éthanol ont des évolutions saccadées, découlant pour la première de la triple origine de l'acétate et pour la deuxième de la double origine de l'éthanol (figures III.73 et III. 76). Néanmoins, des vitesses importantes sont observées pour les taux de dilution où aucune production de formate n'est détectée : un flux de pyruvate important est donc orienté vers la PDH.

❒ Flux carboné issu du lactose et du citrate orienté vers la production de molécules en C4

La vitesse de production de molécules en C4 semble liée à l'évolution de la vitesse de consommation du citrate : la vitesse maximale de production d'acétoïne, composé dominant parmi les molécules en C4, est maximale pour le taux de dilution de 5,91 h^{-1} (figure III.77). La vitesse de production de 2,3-butanediol, composé minoritaire, augmente faiblement avec le taux de dilution, probablement en conséquence du flux carboné croissant alimentant les voies de production des molécules en C4.

IV.2.3. ORIENTATION DU FLUX CARBONE ISSU DU LACTOSE ET DU CITRATE

❒ Le flux carboné spécifique catabolisé par les cellules augmente avec le taux de dilution, du fait de l'apport croissant de substrat, mais aussi de la diminution de l'ampleur des limitations diffusionnelles avec l'augmentation du débit d'alimentation (figure III.78). Le recouvrement carboné atteint parfois des valeurs très supérieures à 100 %. Ces valeurs ne semblent pas provenir d'une non atteinte d'état stationnaire, car n'ont été prises en

compte que les mesures stabilisées effectuées entre 6 et 8 temps de passage après les changements de débit d'alimentation. Des problèmes analytiques ne peuvent pas non plus expliquer ces valeurs puisque les analyses concernant la mise en œuvre de cette souche en réacteur continu avec recyclage cellulaire ont eu lieu simultanément et ont abouti à des recouvrements carbonés proches de 100 %. L'hypothèse la plus plausible est donc l'intervention dans le flux carboné de substrats autres que le lactose et le citrate. Ces substrats ne semblent pas provenir du support car aucune attrition n'est détectée mais il est, par contre, fort possible que la présence de ce support biologique influe sur la métabolisation des substrats complexes du milieu Y : l'extrait de levure et les peptones de caséine.

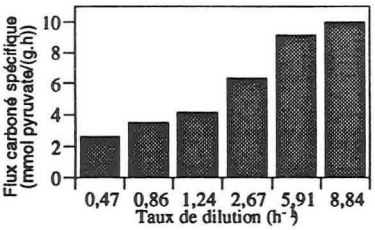


Figure III.78 : influence du taux de dilution sur le flux carboné spécifique issu du lactose et du citrate catabolisé en culture continue en réacteur à cellules immobilisées à pH 7.

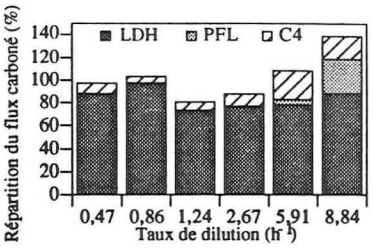


Figure III.79 : influence du taux de dilution sur la répartition du flux carboné catabolisé en culture continue en réacteur à cellules immobilisées à pH 7.

❒ Au cours de cette culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe, l'orientation du flux carboné est influencée à un double niveau par la variation du taux de dilution. Dans un premier temps, l'augmentation du taux de dilution augmente la quantité de substrat carboné disponible pour les cellules et diminue le niveau des limitations diffusionnelles pouvant affecter leur utilisation. Il en résulte un flux carboné catabolique spécifique en augmentation avec le taux de dilution (figure III.78). Néanmoins, en parallèle à cette augmentation du taux de dilution, le taux d'utilisation des substrats carbonés, dont principalement le lactose, diminue. L'acidification du milieu par production d'acide lactique diminue par là même, avec des conséquences importantes sur l'orientation du flux catabolisé (figure III.79).

❒ La part du flux carboné orienté vers la LDH est toujours prépondérante par rapport aux autres voies, mais sujette à d'importantes variations non corrélables avec les variations du taux de dilution. Ces variations peuvent être la conséquence de l'utilisation d'autres sources de carboné que le lactose et le citrate comme les supports ou l'extrait de levure et les peptones de caséine.

❒ La proportion du flux carboné orienté vers la PFL augmente avec le taux de dilution pour les taux de dilution les plus élevés (5,91 et 8,84 h^{-1}), en relation ici avec

l'augmentation du flux carboné catabolisé global et surtout l'augmentation de la disponibilité du pyruvate avec la progression du taux de dilution (figure III.74). L'absence d'orientation du flux carboné vers la PFL aux faibles taux de dilution est surprenante car, en culture continue en réacteur à recyclage cellulaire à pH 7, une faible proportion du flux carboné est toujours orientée vers la PFL, et ce pour des taux de dilution et des vitesses de production de pyruvate pourtant faibles. Ce phénomène peut être attribué à la diminution du pH aux faibles taux de dilution, diminution du pH dont les études en culture discontinue ont montré les effets néfastes pour l'orientation du flux carboné vers la PFL (figure III.48). Néanmoins, le pH n'est pas le seul facteur pouvant expliquer cette orientation, les gradients de substrats et de produits dans le réacteur peuvent aussi en être la cause.

❒ L'orientation d'une part importante du flux carboné vers la PDH a été mise en évidence (tableau III.23). De plus, il apparaît que la part du flux carboné empruntant cette voie diminue lorsque le taux de dilution augmente.

❒ Enfin, la part du flux carboné catabolisé par la voie de production des molécules en C4 augmente avec le taux de dilution jusqu'à 5,91 h^{-1}, en relation avec l'augmentation globale du flux carboné, pour diminuer au taux supérieur, le pH du milieu n'étant plus assez acide pour permettre une perméation importante de leur précurseur, le citrate (figures III.73 et III.79).

IV.2.4. CONCLUSIONS

Cette expérience révèle que ces conditions favorables pour la croissance tout à fait adaptées pour l'immobilisation d'une forte quantité de biomasse dans le réacteur. Cependant, cette forte immobilisation s'accompagne d'une production de biomasse libre somme toute modeste et, qui plus, est assez hétérogène (tableau III.22).

Les niveaux de consommation des substrats carbonés lactose et citrate sont faibles par rapport à ceux atteints en culture discontinue (tableaux III.22 et III.24), ce qui peut être intéressant si une modification minimale du produit fermenté est recherchée, mais aussi gênant pour la stabilité du produit.

Enfin, aucune production de diacétyle n'est détectée à pH 7 en culture continue en réacteur à lit fixe dans l'intervalle de taux de dilution considéré, alors qu'une faible production a lieu en mode discontinu.

Il résulte de ces observations que la mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A sous forme immobilisée en réacteur à lit fixe à dans des conditions favorables pour la croissance permet l'obtention d'une haute densité cellulaire, mais que les vitesses spécifiques d'utilisation des substrats carbonés par cette biomasse restent limitées. Une adaptation des conditions de culture après immobilisation doit être envisagée pour permettre de tirer tout le parti de cette importante quantité de biocatalyseur immobilisée.

	Production ou consommation		Vitesse de production ou consommation		Vitesse spécifique de production ou consommation	
Culture	Discontinue	Cellules immobilisées	Discontinue	Cellules immobilisées	Discontinue	Cellules immobilisées
Biomasse	1,8 g/l	0,06 g/l	0,22 g/(l.h)*	0,52 g/(l.h)	0,79 g/(g.h)°	0,08 g/(g.h)
Lactose	9,7 g/l	1,2 g/l	1,21 g/(l.h)*	10,28 g/(l.h)	4,67 g/(g.h)°	1,59 g/(g.h)
Citrate	1,2 g/l	0,35g/l	0,15 g/(l.h)*	3,09 g/(l.h)	2,10 g/(g.h)°	0,48 g/(g.h)
Diacétyle	0,3 mg/l	0,0 mg/l	0,04 mg/(l.h)*	0,00 mg/(l.h)	2,9 mg/(g.h)°	0,0 mg/(g.h)

Tableau III.24 : comparaison à pH 7 des performances de cultures discontinue et continue avec recyclage cellulaire à un taux de dilution de 8,84 h^{-1} apportant la meilleure vitesse de production de biomasse.
* : vitesse moyenne ° : vitesse spécifique maximale.

IV.3. MISE EN ŒUVRE EN CONDITIONS DE CROISSANCE/AROMATISATION

Cette seconde culture continue en réacteur à lit fixe a été réalisée avec un pH du milieu d'alimentation fixé à 5,5, pour lequel les voies métaboliques secondaires sont empruntées par le flux carboné en culture discontinue. Des taux de dilution croissants et identiques à ceux de l'expérience précédente sont appliqués à l'installation, et les mêmes mesures sont effectuées aux différents états stationnaires (tableau III.25).

IV.3.1. CONSOMMATION DES SUBSTRATS CARBONES ET PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

□ Production de biomasse

La concentration en biomasse immobilisée dans le réacteur déterminée en fin d'expérience est plus importante encore que celle atteinte avec du milieu d'alimentation à pH 7 avec 7,48 g/l de volume réactionnel. La concentration en biomasse libre en sortie de réacteur est en comparaison très faible par rapport à celle adsorbée, et du même ordre de grandeur que celle relarguée lors de l'expérience avec le milieu d'alimentation à pH 7, et ce sans effet notable du taux de dilution. Ainsi, la diminution du pH d'alimentation de 7 à 5,5 n'est pas néfaste pour l'immobilisation des cellules sur le support et pour la production de biomasse en suspension.

□ Catabolisme du lactose

Comme à pH 7, le lactose n'est consommé que partiellement, avec une diminution attendue du taux d'utilisation avec l'augmentation du taux de dilution. La production

d'acide lactique est associée à la consommation du lactose, avec toutefois des rendements en lactate produit / lactose consommé pouvant être nettement supérieurs à 1,05 g/g. Ces valeurs indiquent qu'à certains états stationnaires, un flux carboné provenant d'une source autre que le lactose est orienté vers la LDH. Le niveau de production de lactate en baisse avec la progression du taux de dilution entraîne une diminution de l'acidification du milieu aux taux de dilution les plus élevés, avec un pH se rapprochant de sa valeur dans le milieu d'alimentation.

Taux de dilution (h^{-1})	0,47	0,85	1,24	2,67	5,91	8,84
pH en sortie	4,7	4,9	5,0	5,1	5,2	5,3
Biomasse en sortie (g/l)	0,06	0,05	0,05	0,05	0,02	0,05
Lactose consommé (g/l)	2,9	2,1	1,3	1,1	0,5	0,3
Lactate formé (g/l)	2,8	2,1	1,6	1,1	0,7	0,4
$Y_{lactate/lactose}$ (g/g)	0,97	1,01	1,18	0,97	1,32	1,17
Citrate consommé (g/l)	1,15	1,15	1,10	0,96	0,72	0,50
Acétate produit (g/l)	1,20	1,09	0,89	0,74	0,75	0,99
$Y_{acétate/citrate}$ (mol/mol)	3,39	3,08	2,62	2,51	3,38	6,46
Pyruvate accumulé (mg/l)	48	63	66	66	56	81
Formate produit (mg/l)	12	13	12	14	19	22
Ethanol produit (mg/l)	192	168	194	148	90	52
Acétaldéhyde produit (mg/l)	16	13	12	10	12	11
Diacétyle accumulé (mg/l)	4,1	2,8	3,1	3,4	3,0	2,8
Acétoïne accumulée (mg/l)	147	161	116	108	93	47
2,3-butanediol produit (mg/l)	1	10	9	15	18	11

Tableau III.25 : tableau récapitulatif des consommations de substrats et productions de métabolites et de biomasse aux états stationnaires atteints à pH 5,5 en culture continue en réacteur à lit fixe.

❒ Clivage du citrate

L'utilisation du citrate est quasi totale pour les 3 plus faibles taux de dilution, puis diminue avec la progression du taux de dilution. De même qu'à pH 7, la production globale d'acétate n'est pas associée à la consommation de citrate. Le rapport acétate produit / citrate consommé diminue pour les taux de dilution allant de 0,5 à 2,7 h^{-1}, pour augmenter ensuite avec les valeurs supérieures de taux de dilution. Ce rendement est toujours supérieur à 2,5 mol / mol, ce qui traduit une forte production d'acétate par des mécanismes autres que le clivage du citrate, comme la transformation d'acétyl-coenzyme A provenant du catabolisme du pyruvate par la PFL ou la PDH.

□ Accumulation du pyruvate

La concentration en pyruvate, issu principalement du catabolisme du lactose et du citrate, varie peu, et sans relation apparente avec l'évolution du taux de dilution.

□ Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate vers la PFL et la PDH

Une concentration en formate très faible et croissante avec le taux de dilution est observée. Cette concentration est incompatible avec les forts niveaux de production d'éthanol et d'acétate excédentaire (tableau III.26). En effet, la part du flux carboné global catabolisé par la PFL et la PDH qui est orientée vers la PFL est toujours inférieure ou égale à 4 %. La PDH joue donc un rôle prépondérant dans la production d'acétate, d'éthanol et d'acétaldéhyde. La répartition de ces trois composés est toujours conservée : la quantité d'acétate excédentaire produite est supérieure à celle de l'éthanol, elle-même supérieure à celle de l'acétaldéhyde. La conséquence en terme d'oxydo-réduction est que l'action de la PDH permet la régénération de NADH + H^+.

Taux de dilution (h^{-1})	0,47	0,86	1,24	2,67	5,91	8,84
Part de la PDH dans le flux total PDH + PFL (mol/mol)	0,99	0,98	0,98	0,97	0,96	0,97

Tableau III.26: évolution de la part du flux métabolisé par la PDH par rapport au flux total métabolisé par la PFL et la PDH en fonction de la part du citrate dans le flux carboné global à différents taux de dilution.

□ Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate vers la production de molécules en C4

Concernant les molécules en C4, la somme des concentrations en diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol diminue avec l'augmentation du taux de dilution, en relation avec le niveau moindre de consommation des substrats carbonés. Néanmoins, pour ces 3 molécules, l'effet du taux de dilution n'est pas le même. La concentration en diacétyle n'est que faiblement affectée par les augmentations du taux de dilution aux valeurs les plus élevées, alors que la concentration en acétoïne diminue régulièrement en fonction de l'augmentation du taux de dilution. La concentration en 2,3-butanediol, quant à elle, n'est pas affectée de façon significative par l'augmentation du taux de dilution.

IV.3.2. DONNEES CINETIQUES DE CONSOMMATION DES SUBSTRATS CARBONES ET DE PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE METABOLITES

En prenant maintenant en compte les vitesses de consommation et de production, qui, comme pour la culture précédente, donnent une bonne indication de l'évolution des vitesses spécifiques de consommation et de production, l'orientation du flux carboné catabolique en fonction des conditions expérimentales peut être mieux appréhendée.

❒ Production de biomasse libre

La vitesse de production de biomasse en suspension augmente globalement avec le taux de dilution, mais de façon irrégulière, probablement en conséquence des concentrations en biomasse très faibles mesurées (tableau III.25 et figure III.80).

❒ Catabolisme du lactose

La vitesse de consommation du lactose augmente tout d'abord elle aussi avec le taux de dilution du fait de l'apport supplémentaire de lactose, et ce jusqu'à 2,7 h^{-1}, avant de stagner aux taux de dilution supérieurs (figure III.81). Cette stagnation peut être la conséquence de l'inhibition de l'activité de la protéine HPr nécessaire au transport du lactose à l'intérieur de la cellule par la concentration croissante en lactose dans le réacteur. La vitesse de production du lactate augmente jusqu'à 5,91 h^{-1}, avant de décroître au taux de dilution le plus élevé (figure III.81). La vitesse de production du lactate est largement supérieure à celle de consommation du lactose pour les deux taux de dilution les plus élevés. Une production excédentaire de lactate par rapport à la consommation de lactose a alors lieu.

❒ Clivage du citrate

L'évolution de la vitesse de consommation du citrate est similaire à celle de production du lactate. Elle augmente avec le taux de dilution pour stagner au taux de dilution le plus élevé (figure III.82). La stagnation de la vitesse de consommation du citrate au taux de dilution le plus élevé peut, comme à pH 7, être reliée à une diminution moindre du pH par consommation moindre du lactose, dommageable pour l'activité de la citrate perméase. La progression de la vitesse de consommation du citrate pour les autres taux de dilution peut provenir, quant à elle, de l'augmentation du flux de citrate apporté aux cellules par augmentation du taux de dilution. Qui plus est, la progression de la vitesse de consommation du citrate est très importante par rapport à celle de consommation du lactose. Ainsi, la part du citrate dans le flux carboné catabolisé augmente avec le taux de dilution (tableau III.27). Il est donc fort probable que le catabolisme du citrate soit à l'origine de la production de pyruvate orienté vers la LDH.

Taux de dilution (h^{-1})	0,47	0,86	1,24	2,67	5,91	8,84
Citrate consommé / citrate + lactose consommés (mol/mol)	0,41	0,49	0,60	0,61	0,72	0,75

Tableau III.27: évolution de la part du citrate dans le flux carboné catabolisé en fonction du taux de dilution.

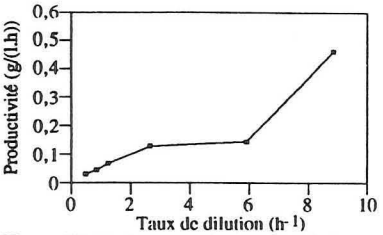


Figure III.80 : influence du taux de dilution sur la productivité en biomasse en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

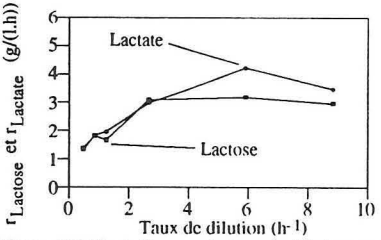


Figure III.81 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du lactose et la productivité en acide lactique en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

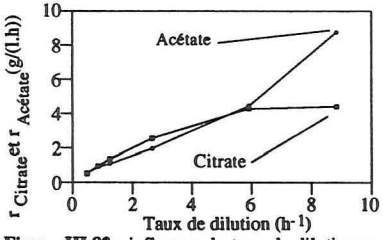


Figure III.82 : influence du taux de dilution sur la vitesse de consommation du citrate et la productivité en acide acétique en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

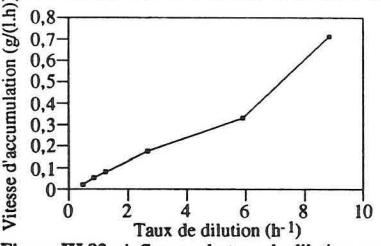


Figure III.83 : influence du taux de dilution sur la vitesse d'accumulation de l'acide pyruvique en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

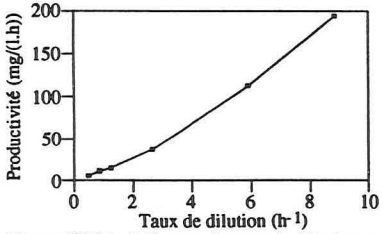


Figure III.84 : influence du taux de dilution sur la productivité en formate en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

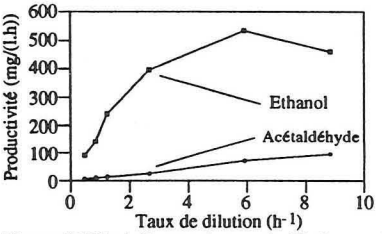


Figure III.85 : influence du taux de dilution sur les productivités en éthanol et acétaldéhyde en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

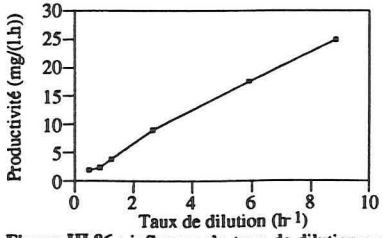


Figure III.86 : influence du taux de dilution sur la productivité en diacétyle en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

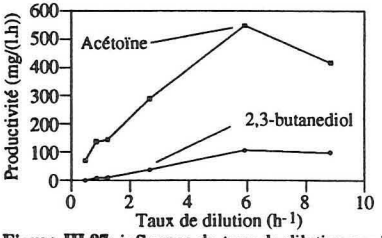


Figure III.87: influence du taux de dilution sur les productivités en acétoïne et 2,3-butanediol en culture continue en réacteur à cellules immobilisées en lit fixe à pH 5,5.

Par contre, la vitesse de production de l'acétate augmente constamment avec le taux de dilution (figure III.82), et ne peut provenir du seul clivage du citrate. L'orientation croissante du flux carboné orienté vers la PFL, mais surtout vers la PDH est donc à l'origine de cette augmentation de la vitesse de production de l'acétate avec le taux de dilution (tableau III.26).

❒ Accumulation du pyruvate

La vitesse d'accumulation du pyruvate augmente régulièrement avec le taux de dilution (figure III.83). Cette augmentation de la vitesse d'accumulation du pyruvate coïncide avec la part grandissante du citrate dans le flux carboné catabolisé et peut être interprétée comme une vitesse d'utilisation moindre du pyruvate formé à partir d'une proportion grandissante de citrate due à un manque de disponibilité du NADH + H^+.

❒ Orientation du flux carboné provenant du citrate et du lactose vers la PFL et la PDH

L'orientation du flux carboné vers la PDH peut, elle aussi, être reliée à l'augmentation de la part du citrate dans le flux carboné. Plus cette part augmente et plus une part importante du pyruvate produit l'est sans formation de NADH + H^+. En conséquence, une part croissante du pyruvate est orientée vers la PDH et la production d'acétate (figure III.82) pour réduire du NAD^+. Ce NADH + H^+ régénéré peut ensuite être utilisé par la LDH pour réduire du pyruvate en lactate, ce qui explique les rendements en lactate formé / lactose consommé supérieurs à 1,05 g/g. L'acétate n'est cependant pas le seul métabolite dérivé de l'action de la PDH : des vitesses de production importantes d'éthanol (très supérieures à celle de production de formate) corrélées à la consommation de lactose sont observées (figures III.81 et III.85). Cette corrélation est logique puisque le catabolisme du lactose peut fournir le pouvoir réducteur nécessaire à la synthèse de l'éthanol. La vitesse de production de l'acétaldéhyde demeure quant à elle très faible et augmente régulièrement avec le taux de dilution (figure III.85). Enfin, la vitesse de production de formate (figure III.84), elle aussi faible en regard des vitesses de production d'acétate et d'éthanol (figures III.82 et III.85), augmente avec la vitesse d'accumulation de son précurseur immédiat : le pyruvate (figure III.83).

❒ Orientation du flux carboné issu du lactose et du citrate vers la production de molécules en C4

La vitesse de production de la somme des molécules en C4 suit la même évolution que celle de consommation de leur précurseur éloigné, le citrate (figures III.86 et III.87). Cette évolution globale provient de l'évolution des vitesses de production des composés

majoritaires que sont l'acétoïne et le 2,3-butanediol. La vitesse de production du diacétyle, par contre, suit celle d'accumulation du précurseur plus direct, le pyruvate.

IV.3.3. ORIENTATION DU FLUX CARBONE ISSU DU LACTOSE ET DU CITRATE

□ Le flux carboné spécifique issu du catabolisme du lactose et du citrate augmente avec le taux de dilution jusqu'à 5,91 h^{-1} avant de décroître (figure III.88). L'augmentation du flux avec le taux de dilution provient de l'apport d'un flux plus important de substrat carboné avec une réduction du niveau des limitations diffusionnelles. La diminution du flux au taux de dilution semble provenir de limitations physiologiques dues à une utilisation moindre du lactose (inhibition possible de la protéine HPr par le lactose et diminution de l'activité citrate perméase par acidification insuffisante). Ce flux spécifique reste toujours inférieur aux valeurs observées à pH 7 dans les mêmes conditions (figure III.78)

□ Comme pour la culture réalisée à pH 7, des recouvrements carbonés supérieurs à 100 % sont obtenus (figures III.79 et III.89) et, ici encore, l'hypothèse la plus plausible demeure un effet du support sur l'utilisation des substrats complexes du milieu d'alimentation, avec interférences avec le flux carboné.

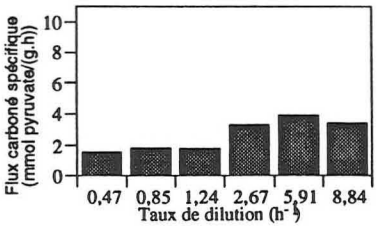


Figure III.88 : influence du taux de dilution sur le flux carboné spécifique catabolisé en culture continue en réacteur à cellules immobilisées à pH 5,5.

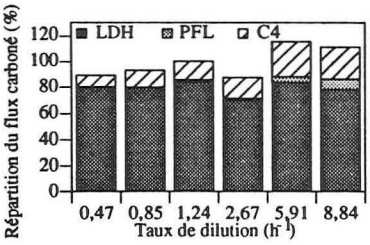


Figure III.89 : influence du taux de dilution sur la répartition du flux carboné catabolisé en culture continue en réacteur à cellules immobilisées à pH 5,5.

□ Concernant maintenant l'orientation du flux carboné vers les différentes voies cataboliques, l'élément dominant semble être le rapport des vitesses de consommation de citrate et de lactose, rapport influencé par le taux de dilution par le jeu de mécanismes de limitations physiologiques et diffusionnelles.

□ La part de la LDH dans le flux carboné total reste prédominante mais fluctue avec le taux de dilution, probablement en conséquence de la double provenance du pyruvate alimentant la LDH.

❒ La part du flux carboné alimentant la PDH augmente avec le rapport citrate consommé / lactose consommé, dans ce cas avec le taux de dilution, pour fournir de l'énergie réductrice à la cellule par le biais de la production d'acétate.

❒ La part du flux carboné orientée vers la PFL augmente elle aussi avec la progression du rapport citrate consommé / lactose consommé qui entraîne une disponibilité plus grande du pyruvate pour les voies métaboliques secondaires, la LDH étant limitée en NADH + H^+.

❒ Enfin, la part du flux carboné orientée vers la production de molécules en C4 semble n'être liée qu'au flux carboné total. Cependant, la production du diacétyle, minoritaire parmi les C4, est dépendante du rapport citrate consommé / lactose consommé, c'est-à-dire de la disponibilité du pyruvate.

IV.3.4. CONCLUSIONS

Cette culture continue de cellules immobilisées en réacteur à lit fixe alimentées par du milieu Y à pH 5,5 révèle des performances très intéressantes en production de diacétyle. Bien que le niveau d'aromatisation en diacétyle soit 2 fois inférieur à celui observé en culture discontinue à pH 5,5, un gain en productivité proche d'un facteur 100 est obtenu (tableau III.28). Toutefois, le gain en rendement de bioconversion par rapport à une culture discontinue à pH 5,5 reste limité avec seulement 8 % d'amélioration.

	Production ou consommation		Vitesse de production ou consommation		Vitesse spécifique de production ou consommation	
Culture	Discontinue	Cellules immobilisées	Discontinue	Cellules immobilisées	Discontinue	Cellules immobilisées
Biomasse	1,2 g/l	0,05 g/l	0,05 g/(l.h)*	0,46g/(l.h)	0,46 g/(g.h)°	0,06 g/(g.h)
Lactose	9,7 g/l	0,3 g/l	0,41 g/(l.h)*	2,95g/(l.h)	1,41 g/(g.h)°	0,39 g/(g.h)
Citrate	1,2 g/l	0,50 g/l	0,05 g/(l.h)*	4,40 g/(l.h)	2,70 g/(g.h)°	0,59 g/(g.h)
Diacétyle	6,2 mg/l	2,8 mg/l	0,26mg/(l.h)*	24,9 mg/(l.h)	16,3 mg/(g.h)°	3,33 mg/(g.h)

Tableau III.28 : comparaison des performances de cultures discontinue et continue en réacteur à cellules immobilisées à un taux de dilution de 8,84 h^{-1} à pH 5,5.
* : vitesse moyenne ° : vitesse spécifique maximale.

La concentration en biomasse libre en sortie en sortie du réacteur à lit fixe est toujours très inférieure à celle obtenue en fin de culture discontinue, mais une amélioration de productivité en biomasse en sortie de réacteur d'un facteur 9 est obtenue en culture en lit fixe. De plus, même si les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de lactose et de citrate et de production de diacétyle se rapportant à l'ensemble de la biomasse présente dans le réacteur sont nettement inférieures aux valeurs maximales relevées lors de

la culture discontinue de référence, elles ne présagent en rien de l'état physiologique des cellules libres (tableau III.28). Ainsi, une vérification des performances de la biomasse libre en sortie de réacteur s'avère nécessaire pour vérifier l'aptitude de ce mode de culture pour l'inoculation en continu de produits laitiers.

Ainsi, la culture continue de bactéries lactiques productrices d'arômes immobilisées sous forme de biofilm en réacteur continu à lit fixe présente un potentiel important pour l'aromatisation en continu de produits laitiers. Un niveau intéressant d'aromatisation en diacétyle est accompagné d'un relargage minime de biomasse dans le produit, biomasse présentant, qui plus est, un faible potentiel de biotransformation, et d'une consommation réduite des substrats carbonés. L'intérêt de ce mode de culture pour l'inoculation reste quant à lui à vérifier.

IV.4. CONCLUSIONS

Ces deux expériences de mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A sous forme immobilisée en réacteur continu à lit fixe ont, en premier lieu, montré la capacité d'immobiliser une quantité importante de biocatalyseur dans le réacteur par cette méthode rustique. Ce mode de culture peut donc à juste titre être qualifié de culture à haute densité cellulaire.

Cette étude a aussi permis de déterminer des règles simplifiées d'orientation du flux carboné en fonction du taux de dilution (tableau III.29). Ainsi, si l'augmentation du taux de dilution ne semble pas avoir d'effet sur la part du flux carboné orienté vers la LDH, elle entraîne, par contre, une augmentation du flux dirigé vers la PFL et la production de molécules en C4, et une diminution du flux orienté vers la PDH.

Taux de dilution	↗
Flux carboné orienté vers la LDH	→
Flux carboné orienté vers la PFL	↗
Flux carboné orienté vers la PDH	↘
Flux carboné orienté vers la production de molécules en C4	↗

Tableau III.29 : représentation simplifiée de l'effet du taux de dilution sur l'orientation du flux carboné provenant du lactose et du citrate vers la LDH et la production de molécules en C4.

Cette orientation du flux provient, d'une part, de l'amélioration de la disponibilité des substrats carbonés pour les cellules avec l'augmentation du taux de dilution, mais aussi, d'autre part, de la conversion d'une proportion moindre de lactose aux forts taux de dilution entraînant une acidification moindre du milieu et donc une diminution de l'activité citrate perméase. Il en résulte que l'augmentation du taux de dilution influe non seulement sur le flux catabolique global, mais aussi sur le degré de cométabolisme. Le degré de cométabolisme influant quant à lui sur les voies empruntées et les produits de ces voies préférentiellement formés, il en résulte des profils d'évolution de production en fonction du taux de dilution propres à chaque métabolite.

En terme d'application, ce mode de culture s'avère très prometteur pour l'aromatisation en continu de produits laitiers, une concentration correcte en diacétyle pouvant être obtenue avec des productivités très élevées, sans modifications importantes de la composition initiale du produit. Cependant, l'utilité de ce mode de culture pour la production de biomasse en continu reste à démontrer, les performances des cellules sortant du réacteur restant à définir.

V. DOMAINES D'APPLICATION ET LIMITES DE L'UTILISATION DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* EN REACTEUR CONTINU À RECYCLAGE CELLULAIRE ET EN REACTEUR CONTINU A CELLULES IMMOBILISEES EN LIT FIXE

V.1. DOMAINES D'APPLICATION

La mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A en réacteur continu à recyclage cellulaire s'avère tout à fait adaptée tant à l'aromatisation qu'à l'inoculation en continu de produits laitiers avec une biomasse active (tableau III.30). En effet, d'une part, la concentration et la productivité en diacétyle sont intéressantes par rapport à une culture discontinue et, d'autre part, la productivité en biomasse et la qualité des cellules produites marquent elles aussi un net progrès par rapport à une culture discontinue à pH 5,5 (tableaux III.19 et III.30).

	Production ou consommation		Vitesse de production ou consommation		Vitesse spécifique de production ou consommation	
Culture	Recyclage cellulaire	Cellules immobilisées	Recyclage cellulaire	Cellules immobilisées	Recyclage cellulaire	Cellules immobilisées
Biomasse	0,06 g/l	0,05 g/l	0,14 g/(l.h)	0,46g/(l.h)	0,47 g/(g.h)	0,06 g/(g.h)
Lactose	0,9 g/l	0,3 g/l	0,59 g/(l.h)	2,95g/(l.h)	9,31 g/(g.h)	0,39 g/(g.h)
Citrate	0,08 g/l	0,50 g/l	0,12 g/(l.h)	4,40 g/(l.h)	1,84 g/(g.h)	0,59 g/(g.h)
Diacétyle	5,2 mg/l	2,8 mg/l	7,62 mg/(l.h)	24,9 mg/(l.h)	119,1 mg/(g.h)	3,33 mg/(g.h)

Tableau III.30 : comparaison des performances de cultures continues avec recyclage cellulaire ou à cellules immobilisées en lit fixe aux taux de dilution les plus élevés appliqués et à pH 5,5.

La mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* PAL D DIA A sous forme immobilisée en réacteur continu à lit fixe permet, elle aussi, d'atteindre des niveaux de productivité en diacétyle élevés (tableau III.30). Toutefois, le recours à ce mode de mise en œuvre pour la production en continu de biomasse ne doit pas être envisagé tant que des données complémentaires sur l'activité de la biomasse produite en sortie de réacteur n'auront pas été acquises. Ainsi, au vu de ces résultats partiels, la principale application de ce mode de culture semble être l'aromatisation légère en continu de produits laitiers.

Une caractéristique commune de ces deux modes de mise en œuvre en continu par rapport aux cultures discontinues réside dans le faible degré d'utilisation des sources carbonées (tableau III.30), qui peut être recherchée si une modification légère du produit est recherchée, mais présente des risques importants pour l'évolution ultérieure du produit.

V.1. LIMITES D'UTILISATION

Le principal obstacle à la mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en réacteur continu à recyclage cellulaire provient de sa complexité technique qui influe largement sur les coûts de production mais peut aussi avoir des conséquences néfastes sur la fiabilité du procédé de production d'arômes. Néanmoins, cette complexité technique peut parfaitement être maîtrisée à l'échelle industrielle et ne constitue un réel problème qu'aux faibles échelles.

Les obstacles pour l'utilisation industrielle de bactéries lactiques productrices d'arômes immobilisées sous forme de biofilm en réacteur continu à lit fixe résident dans la grande hétérogénéité au sein du lit. En effet, des gradients importants en concentartion de biomasse, pH , substrats et métabolites sont observés à l'échelle de laboratoire et ont une influence notable sur les performances du procédé. La mise en œuvre industrielle de ces cellules ne doit donc être envisagée qu'après un important travail de conception et de dimensionnement du réacteur à lit fixe pour réduire l'ampleur de ces gradients, ou en assurer un contrôle suffisant pour garantir des performances intéressantes.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

Ce travail apporte une contribution à un double niveau pour l'amélioration des connaissances et de la maîtrise du métabolisme de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Les résultats des études le composant fournissent, en effet, des données intéressantes, tant pour la détermination du mode de production du diacétyle par ce microorganisme, que pour la compréhension des mécanismes d'orientation du flux carboné vers les différents métabolites en culture continue à haute densité cellulaire, avec des implications évidentes pour l'amélioration et la conduite de procédés de production d'arômes laitiers.

En effet, ce travail comportait deux voies de recherche. La première concernait l'étude cinétique d'une des réactions les moins maîtrisées d'une des voies métaboliques de production du diacétyle, la décarboxylation oxydative de l'AAL, pour en déterminer la participation dans la production microbiologique du diacétyle ainsi que la localisation et, éventuellement, le mécanisme mis en jeu afin, d'une part, d'accroître le niveau de connaissances, mais aussi, d'autre part, de réinvestir ces connaissances dans l'amélioration de la mise en œuvre de ces bactéries lactiques productrices d'arômes. La deuxième voie de recherche concernait l'évaluation du comportement métabolique de ces bactéries lactiques productrices d'arômes mises en œuvre en culture continue à haute densité cellulaire pour, ici encore, mettre à profit ces données complémentaires pour définir des solutions nouvelles pour la culture de ces bactéries lactiques.

▫ Mécanisme de production du diacétyle

Pour explorer la première voie de recherche, une méthodologie cinétique comparative a été employée. Une comparaison des cinétiques de production microbiologique de diacétyle avec des cinétiques de production de diacétyle par décarboxylation oxydative d'AAL dans des conditions intra ou extracellulaires a été effectuée pour connaître la part de la décarboxylation oxydative de l'AAL dans la production microbiologique du diacétyle et en préciser la localisation. Cette comparaison a, qui plus est, été complétée par d'autres expériences visant, d'une part, à mettre en évidence la présence extracellulaire d'AAL dans l'hypothèse d'une production microbiologique de diacétyle par décarboxylation oxydative extracellulaire de l'AAL et, d'autre part, à identifier des molécules intervenant dans la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL.

Les résultats obtenus montrent que, même dans des conditions physico-chimiques particulièrement défavorables pour une réaction de décarboxylation oxydative, la production microbiologique du diacétyle peut tout à fait provenir de la décarboxylation oxydative de l'AAL, sans pour autant exclure la possibilité d'une production par la voie de Speckman et Collins (1968 et 1973). Toutefois, en considérant que le diacétyle est formé par décarboxylation oxydative de l'AAL, la localisation de cette réaction est intracellulaire.

De plus, cette étude a montré l'existence de deux mécanismes de décarboxylation oxydative intracellulaire de l'AAL, avec intervention dans le mécanisme cinétiquement dominant d'un ou plusieurs composés thermolabiles présents en quantité limitée dans les extraits cellulaires avec lesquels ont été réalisées les expériences. Des expériences complémentaires ont permis de constater que les coenzymes NAD^+, NADP ou FAD ne sont pas ces composés thermolabiles. Ainsi, cette partie du travail a permis d'accroître notablement le niveau des connaissances concernant la production du diacétyle par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* , mais elle a aussi montré qu'il est difficile, dans l'état actuel des connaissances, d'améliorer la production ou la productivité en diacétyle par ces bactéries lactiques productrices d'arômes en influant sur la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL.

□ Mise en œuvre en culture continue à haute densité cellulaire

La deuxième voie de recherche a, elle aussi, été explorée à l'aide d'une méthodologie comparative. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a été mis en œuvre à différents taux de dilution avec les deux procédés de culture sélectionnés, la culture continue en réacteur à recyclage cellulaire et la culture continue de cellules immobilisées en lit fixe, avec un même milieu de culture. Cette mise en œuvre a été effectuée dans des conditions physico-chimiques identiques (température, aération et pH) favorisant soit la croissance, soit l'orientation du flux carboné vers les différents voies cataboliques, ces conditions ayant été préalablement déterminées grâce à une étude physiologique portant sur le comportement métabolique de cette souche sous contrainte de pH. L'influence de chaque mode de culture sur la physiologie de la souche a été évaluée en termes de production de biomasse et d'orientation du flux carboné vers les différentes voies métaboliques, ces données physiologiques étant, par la suite, mises à profit pour dresser une comparaison des performances de ces deux modes de mise en œuvre.

Quel que soit le mode de culture, les résultats obtenus montrent que le taux de dilution influe grandement l'orientation du flux carboné vers les voies cataboliques primaire (lactate déshydrogénase ou LDH) et secondaires (pyruvate-formate lyase ou PFL, pyruvate déshydrogénase ou PDH et production de molécules en C4). Ainsi, une augmentation du taux de dilution entraîne une augmentation du flux carboné de lactose et de citrate catabolisé, avec, toutefois, une variation du rapport citrate consommé / lactose consommé. Il en résulte une variation du degré de co-métabolisme citrate / lactose influant largement sur les voies cataboliques empruntées. Plus ce degré de co-métabolisme est important, plus les voies métaboliques secondaires sont empruntées au détriment de la production d'acide lactique. Cependant, en culture continue de cellules immobilisées en réacteur à lit fixe, l'effet du taux de dilution est plus complexe. Son augmentation entraîne le passage d'un fonctionnement en limitations diffusionnelles dominantes à un

fonctionnement en limitations physiologiques dominantes, avec des effets variables de ces limitations physiologiques sur le catabolisme du lactose et du citrate.

De plus, ces travaux ont permis de mettre en évidence un mécanisme de stabilisation du rapport NADH, H^+ / NAD^+ par l'intermédiaire de l'action de la PDH. En effet, dans des conditions de déséquilibre coenzymatique, comme lorsque la part du citrate dans le flux carboné métabolisé est importante, de l'acétyl-coenzyme A, issu du catabolisme du pyruvate par la PDH, est transformé en acétate. Le bilan global d'oxydo-réduction de cette voie aboutit à la formation d'une mole de NADH, H^+ par mole d'acétate produite. Ce mécanisme est intéressant parce qu'il explique la part non négligeable du flux carboné orienté vers la PDH lors d'un fort co-métabolisme lactose-citrate.

Concernant maintenant les performances de ces deux modes de culture, les expériences réalisées ont permis de révéler des gains en productivité importants pour la production de diacétyle, d'un facteur 30 pour la culture continue en réacteur à recyclage cellulaire et d'un facteur 100 pour la culture continue de cellules immobilisées par rapport à une culture discontinue effectuée dans des conditions comparables de pH, température, oxygénation. Il serait cependant précipité de conclure à un avantage de la mise en œuvre des cellules sous forme immobilisée sur la mise en œuvre libre en réacteur à recyclage cellulaire, les débits de perméat obtenus avec le réacteur à recyclage cellulaire ayant été largement inférieurs aux taux de dilution appliqués au réacteur à lit fixe.

Pour ce qui est de la production de biomasse libre, les deux modes de culture apportent aussi des améliorations notables mais non décisives en productivité par rapport à une culture discontinue dans des conditions favorables pour la croissance, avec un gain d'un facteur 3,2 pour le réacteur à recyclage cellulaire et d'un facteur 2,3 pour le réacteur à lit fixe. La culture continue en réacteur à recyclage cellulaire ne permet pas d'atteindre des concentrations en biomasse très élevées par rapport au mode de culture discontinu mais, cependant, la biomasse produite se trouve dans un état physiologique excellent avec des vitesses spécifiques de croissance et de consommation de substrats carbonés supérieures aux vitesses maximales relevées lors de cultures discontinues. Par contre, l'immobilisation des cellules en réacteur à lit fixe permet la rétention dans le réacteur d'une très forte quantité de biocatalyseur, avec néanmoins des vitesses spécifiques de consommation de substrat inférieures aux valeurs maximales des cultures discontinues.

Ainsi, la culture continue de bactéries lactiques immobilisées sous forme de biofilm en réacteur à lit fixe se révèle très prometteuse pour l'aromatisation en continu de produits laitiers. Cependant, ce mode de culture semble peu adapté comme système d'inoculation en continu du fait de l'hétérogénéité et de l'état physiologique assez moyen de la biomasse présente dans le réacteur. Par contre, la culture de bactéries lactiques productrices d'arômes en réacteur continu à recyclage cellulaire permet de produire une biomasse dont les performances fermentaires excellentes peuvent être valorisées pour la production de starters, mais se révèle moins performante que la culture continue de cellules immobilisées

en lit fixe pour la production de diacétyle. Ainsi, la culture continue avec recyclage cellulaire, mode de mise en œuvre onéreux, devrait plutôt être employée pour la production de ferments, dont la valeur ajoutée est importante, alors que la culture continue de cellules immobilisées en lit fixe devrait être utilisée pour la production de diacétyle.

PERSPECTIVES

❐ Mécanisme de production du diacétyle

Les perspectives les plus immédiates de cette partie du travail résident dans la poursuite des recherches d'identification des substances réagissant *in vivo* avec l'AAL en étendant tout d'abord les recherches aux autres coenzymes d'oxydo-réduction, voire même à des systèmes enzymatiques complets de régénération de ces coenzymes, afin de déterminer la nature du mécanisme réactionnel cinétiquement dominant. Qui plus est, la même méthodologie et le même dispositif expérimental peuvent être utilisés pour évaluer l'influence de la modification de certains paramètres physico-chimiques, avec en premier lieu le potentiel rédox, ou de l'addition de certaines molécules sur la cinétique de la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL. L'ensemble des données ainsi recueillies peut en effet se révéler capital pour l'adaptation des conditions de culture de bactéries lactiques productrices de diacétyle pour faire en sorte que la réaction de décarboxylation oxydative de l'AAL ne soit pas limitante pour la production de diacétyle. De plus, de telles informations peuvent aussi être mises à profit pour améliorer le traitement de produits laitiers en aval de leur fermentation par des bactéries accumulant de l'AAL, de façon à exploiter pleinement ce potentiel en diacétyle.

❐ Mise en œuvre en culture continue à haute densité cellulaire

L'étude portant sur la mise en œuvre des cellules en réacteur continu à recyclage cellulaire devrait être poursuivie par des expériences complémentaires à des taux de dilution soit plus élevés, en améliorant les performances du module de filtration pour vérifier que des gains de productivité comparables à ceux obtenus avec les cellules immobilisées peuvent être atteints, soit plus faibles, pour déterminer l'origine du phénomène de lyse apparu lors d'une expérience. De plus, des dosages intracellulaires de l'acide pyruvique devraient permettre d'affiner les interprétations quant aux mécanismes d'orientation du flux carboné vers les différentes voies cataboliques.

De même, un travail d'identification du flux carboné excédentaire observé en culture continue de cellules immobilisées doit être impérativement effectué pour pouvoir mieux cerner le métabolisme des cellules adsorbées sur un support organique. Il serait intéressant, qui plus est, de procéder à une évaluation de l'état physiologique des cellules en sortie de réacteur pour vérifier les doutes émis quant à leur utilisation pour l'inoculation en continu de produit laitiers.

Ensuite, ces informations complémentaires étant acquises, il conviendrait, à moyen terme, d'orienter les expériences suivantes vers la mise en œuvre de souches productrices d'arômes pour des applications et avec des milieux de culture ciblés. Ainsi, une recherche d'optimum de conception et de fonctionnement de telles installations prenant en compte à la fois des critères physiologiques, technologiques et économiques pourrait avoir lieu à l'aide d'outils de planification expérimentale adaptés à l'optimisation multicritère de procédés qui ont été récemment développés au laboratoire (Viennet, 1997). Enfin, à plus long terme, les connaissances physiologiques et technologiques concernant chaque mode de culture pourraient être intégrées dans des modèles mathématiques faisant éventuellement appel à la logique floue pour assurer le pilotage d'installations de production (Perrin, 1996).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C. Alais (1984a). La crème et le beurre. *Science du lait*, éditions Editions SEPAIC, 555 585.

C. Alais (1984b). Les bactéries lactiques et les levains. *Science du lait*. édition SEPAIC, 345-387.

S. Altaba (1991). Production d'acide lactique en culture continue à haute densité cellulaire dans un bioréacteur à membrane : cinétique, modélisation et analyse économique. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*.

R.F. Anders, H.A. Jonas et G.R. Jago (1970). A survey of the lactate dehydrogenase activities in group N *streptococci*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 19, 73-76.

D.G. Anderson et L.L. McKay (1977). Plasmids, loss of lactose metabolism and appearance of partial and full lactose-fermenting revertants in *Streptococcus cremoris* B1. *Journal of Bacteriology*, 129, 367-377.

P. Audet, C. Paquin et C. Lacroix (1988). Immobilized growing lactic acid bacteria with κ-carrageenan - locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 11-18.

P. Audet, D. St-Gelais et D. Roy (1995). Production of mixed cultures of non-isogenic *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* using immobilized cells. *Milchwissenschaft*, 50, 18-22.

N. Bassit, C.Y. Boquien, D. Picque et G. Corrieu (1993). Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 1893-1897.

N. Bassit, E. Latrille, C.Y. Bocquien, D. Picque et G. Corrieu (1994). Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Le Lait*, 74, 115-126.

S. Bekal, C. Diviès et H. Prévost (1997). Caractérisation de la citrate lyase des bactéries lactiques. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

K.H. Benson, J.J. Godon, P. Renault, H.G. Griffin and M.J. Gasson (1996). Effect of ilvBN-encoded alpha-acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-2, 107-111.

B. Bibal, C. Kapp, G. Goma et A. Pareilleux (1989). Continuous culture of *Streptococcus cremoris* on lactose using various medium conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 155-159.

B. Bibal, Y. Vayssier, G. Goma et A. Pareilleux (1991). High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 746-754.

D.L. Bisset et D.L. Anderson (1974). Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci: Presence of enzymes for both the D-galactose-1-phosphate and D-tagatose-6-phosphate pathways. *Journal of bacteriology*, 117, 318-320.

H. Boudermassi, M. Desmazeaud, C. Monnet, C-Y. Boquien et G. Corrieu (1996). Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control. *Journal of Dairy Science*, 79, 775-781.

S. Bowien et G. Gottschalk (1977). Purification and properties of citrate lyase ligase from *Streptococcus diacetylactis*. *European Journal of Biochemistry*, 80, 305-311.

P. Boyaval (1994). Fermentation lactique continue. *Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 2/2, 505-517.

P. Boyaval et J. Goulet (1988). Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 725-728.

P. Boyaval, P. Bhugaloo-Vial, F. Duffes, X. Dousset et D. Marion (1997). Réacteurs à hautes densités cellulaires pour la production de solutions concentrées en bactériocines. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

L. Britton , D.P. Malinowski et I. Fridovich (1978). Superoxide dismutase and oxygen metabolism in *Streptococcus faecalis* and comparisons with other organisms. *Journal of Bacteriology*, 134, 229-236.

E. Brockmann, B.L. Jacobsen, C. Hertel, W. Ludwig et K.H. Schleifer (1996). Monitoring of genetically modified *Lactococcus lactis* in gnobiotic and conventional rats by using antibiotic resistance markers and specific probe or primer based methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 203-212.

M.C. Broome, M.P. Thomas, A.J. Hillier et G.R. Jago (1980). Pyruvate dehydrogenase activity in group N streptococci. *Australian Journal of Biological Sciences*, 33, 15-25.

J.C. Bruhn et E.B. Collins (1970). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of dairy Science*, 53, 857-860.

R. Cachon, S. Daniel et C. Diviès (1995). Proton-dependent kinetics of citrate uptake in growing cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131, 319-323.

Y. Cenatiempo, J.M. Berjeaud, F. Biet, C. Fremaux, Y. Hechard et D. Robichon (1996). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Recent data on their structure, their mode of action and their genetic determinants. *Le Lait*, 76, 169-177.

C.P. Champagne, F. Girard et N. Gardner (1989). Growth of yeast contaminants in an immobilized lactic acid bacteria system. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 207-210.

C.P. Champagne (1992). Effect of penicillin on free or immobilized lactococci: milk acidification and residual antibiotic level. *Journal of Food Safety*, 12, 327-339.

C.P. Champagne, C. Gaudy, D. Poncelet et R.J. Neufeld (1992 a). *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1429-1434.

C.P. Champagne, N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen et C. Lacroix (1992 b). The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Research Interntional*, 25, 419-427.

C.P. Champagne, F. Girard et N. Rodriguez (1993). Production of concentrated suspensions of therophilic lactic acid bacteria in calcium alginate gel. *International Dairy Journal*, 3, 257-275.

C.P. Champagne, C. Lacroix et I. Sodini-Gallot (1994). Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Critical reviews in biotechnology*, 14, 109-134.

A.G. Coffey, C. Daly et G. Fitzgerald (1994). The impact of biotechnology on the dairy industry. *Biotechnological Advances*, 12, 625-633.

T.M. Cogan (1980). Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Le Lait*, LX, 397-425.

T.M. Cogan (1981). Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Journal of Dairy Research*, 48, 489-495.

T.M. Cogan (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 551-558.

E.B. Collins et J.C. Bruhn (1970). Roles of acetate and pyruvate in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of Bacteriology*, 103, 541-546.

E.B. Collins (1972). Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *Journal of dairy Science*, 55, 1022-1028.

S. Condon (1983). Aerobic meatbolism of lactic acid bacteria. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 7, 15-25.

S. Condon (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 269-280.

G. M. Cook et J. B. Russel (1994). The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Sreptococcus bovis*. *Current Microbiology*, 28, 165-168.

V.L. Crow (1990). Properties of 2,3-butanediol dehydrogenases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in relation to citrate fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 1656-1665.

M. Curic (1997). *Communication personnelle*.

M. Curic, A.V. Pedersen et P. Renault (1997). Obtaining of α-acetolactate decarboxylase deficient mutants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

F.L. Davies et M.J. Gasson (1981). Reviews of the progress of dairy science : Genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 48, 363 - 376.

F. Dellaglio, H.de Roissart, S. Torriani, M.C. Curk et D. Janssens (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 25-116.

J. Delvesbroughton, P. Blackburn, R. J. Evans et J. Hugenholtz (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, 193-202.

J.C. de Man, M. Rogasa et M.E. Sharpe (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130 - 135.

H. de Roissart (1986). Laits et Produits Laitiers. *Les bactéries lactiques*. éditions Lavoisier scientifique, Paris, vol.3/3, 386-414.

M.J. Desmazeaud (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*, 63, 267-316.

M.J. Desmazeaud et H. de Roissart (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 169-207.

M.J. Desmazeaud (1994). Le lait milieu de culture. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 2/2, 25-36.

L. Devuyst, R. Callewaert et K. Crabbe (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* , 142, 817-827.

C. Diviès, L. Frey, J.C. Hubert et H. de Roissart (1994 a). Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 291-301.

C. Diviès, J.F. Cavin and H. Prévost (1994 b). Bactéries lactiques immobilisées. *Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 2/2, 527-536.

J.P. Dumont et J. Adda (1978). Flavour formation in dairy products. *Progress in flavour research*, éditions Applied Science Publishers LTD, Londres, vol. 1/1, 245-261.

G.A. McFeters (1984). Biofilm development and its consequences. *Microbial Adhesion and Aggregation*, Dahlem.

C. Foucaud et D. Hemme (1990). Physiologie des bactéries du genre *Lactococcus* en conditions de privation nutritionnelle. Une revue. *Le Lait*, 70, 171-189.

M.R. Friedman et E.L. Gaden (1970). Growth and acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dialysis culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, 12, 961-974.

C. Garrigues, M. Cocaign-Bousquet, P. Loubière et N. Lindley (1997). Comportement métabolique en réponse à l'environnement. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

E.I. Garvie (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, 1, 106-139.

E.I. Garvie (1984). Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. *Advances in the Microbiology and Biochemestry of Cheese and Fermented Milk*, ed. F.L. Davies & B.A. Law, Elsever Science Publishers, 35-66.

G.L. Garrote, A.G. Abraham et G.L. de Antoni (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Food Science and Technology Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30, 77-84.

F. Gasser, MC. Montel, R. Talon et M. Champomier (1994). Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 117-139.

M.J. Gasson (1993). Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 3-20.

M.J. Gasson, K. Benson, S. Swindell et H. Griffin (1996). Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Le Lait*, 1-2, 33-40.

G. Gottschalk (1986). Bacterial fermentations. *Bacterial metabolism*, éditions Springer-Verlag, vol. 1/1, 208-282.

N. Goupil, G. Corthier, S.D. Ehrlich et P. Renault (1996). Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 2636-2640.

A.F. Groboillot, C.P. Champagne, G.D. Darling, D. Poncelet et R.J. Neufeld (1993). Membrane formation dy interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 1157-1163.

B. Grossiord et W.M. de Vos (1997). Molecular characterisation of genes involved in the metabolism of galactose via the Leloir pathway. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

G. Guédon, F. Bourgoin, M. Pébay, Y. Roussel, C. Colmin, J.M. Simonet et B. Decaris (1995). Characterization and distribution of two insertion sequences , IS *1191* and iso-IS*981*, in *Streptococcus thermophilus*: does intergenic transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures?. *Molecular Microbiology*, 1, 69-78.

N.A. Gutierrez, A.D. Debarr et I.S. Maddox (1996). Production of diacetyl from whey permeate using *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 183-184.

R.J. Harvey et E.B. Collins (1961). Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Bacteriology*, 82, 954 - 959.

R.J. Harvey et E.B. Collins (1962). Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of Bacteriology*, 83, 1005-1009.

R.J. Harvey et E.B. Collins (1963a). Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of Bacteriology*, 86, 1301-1307.

R.J. Harvey et E.B. Collins (1963b). The citritase of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of biological chemistry*, 238, 2648-2653.

H.B. Heath et G. Reineccius (1986). Changes in food due to processing - Flavours formed via fermentation. *Flavour chemistry and technology*, éditions Macmillan Publishers, vol. 1/1, 95-111.

C. Hill, P. Garvey et G. Fitzgerald (1995). Bacteriophage-host interactions and resistance mecanisms, analysis of the conjugative resistance plasmid pNP40. *7e colloque du club des bactéries lactiques*, Paris.

O. Holst, L. Hansson, A.C. Berg et B. Mattiasson (1985). Continuous culture with complete cell recycle to obtain high cell densities in product inhibited cultures: cultivation of *Streptococcus lactis* for production of superoxyde dismutase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 10-14.

J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J. T. Staley et S. T. Williams (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, éditions Williams et Wilkins, Baltimore.

M. Hongo, Y. Nomura et M. Iwahara (1986). Novel method of lactic acid production by electrodialysis fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 314-319.

S.H. Ho Park, R.Y. Xing et W.B. Whitman (1995). Nonenzymatic acetolactate oxidation to diacetyl by flavin, nicotinamide and quinone coenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 3, 366-370.

A. Hosono, R. Wardojo et H. Otani (1990). Binding of amino acid pyrolysates by lactic acid bacteria isolated from Dadih. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie* 23, 149-153.

J. Hugenholtz et M.J.C. Starrenburg (1992). Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 17-22.

J. Hugenholtz (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 165-178.

C.L. Hyndman, A.F. Groboillot, D. Poncelet, C.P. Champagne et R.J. Neufeld (1993). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56, 259-263.

N. Ishii, M. Matsamura, H. Kataoka, H. Tanaka et K. Araki (1995). Diacetyl fermentation coupled with pervaporation using oleyl alcohol supported liquid membrane. *Bioprocess Engineering*, 13, 119-123.

T. Jankowski, M. Zielinska et A. Wysakowska (1997). Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnology Techniques*, 11, 31-34.

J.M. Jay (1982). Antimicrobial Properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 525-532.

K.G. Johnson et I.J. McDonald (1974). ß-D-phosphogalactoside galactohydrolase from *Streptococcus cremoris* HP : purification and enzymes properties. *Journal of Bacteriology*, 117, 667-674.

H. Jönsson et H.E. Pettersson (1977). Studies on citric acid fermentation in lactic starter cultures with special interest in α-acetolactic acid. 1. Analytical procedures. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 9, 513-516.

E. Juni (1952). Mechanim of formation of acetoin by bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 715-726.

O. Kandler (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.

B. Katzbauer, M. Narodoslawsky et A. Moser (1995). Classification system for immobilization techniques. *Bioprocess engineering*, 12, 173-179.

L. Kearney, M. Upton et A. McLaughlin (1990). Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium alginate beads incorporating cryoprotectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3112-3116.

W.J. Kelly, R.V. Asmundson et C.M. Huang (1996). Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 209-218.

G.M. Kempler et L.L. Mac Kay (1979a). Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis:* evidence for plasmid-linked citrate utilisation. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 316-323.

G.M. Kempler et L.L. Mac Kay (1979b). Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 1041-1047.

G.M. Kempler et L.L. Mac Kay (1981). Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Journal of Dairy science*, 64, 1527-1539.

K. Kersters et B. Pot (1991). Classification and identification methods for lactic acid bacteria with emphasis on protein gel electrophoresis. *Colloque LACTIC 91*, 33-40.

H.S. Kim, B.J. Kamara, I.C. Good et G.L. Enders (1988). Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 3, 253-257.

F.A.M. Klaver, F. Kingma, J.M.K. Timmer et A.H. Weerkamp (1992). Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermenter: buttermilk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 46, 19-30.

N. Klijn, A.H. Weerkamp et W.M. de Vos (1995a). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 7, 2771-2774.

N. Klijn, A.H. Weerkamp et W.M. de Vos (1995b). Biosafety assessment of the application of genetically modified *Lactococcus lactis* spp. in the production of fermented milk products. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 486-492.

W.N. Konings, B. Poolman, A.J.M. Driessen, E.J. Smid et D. Molenaar (1994). Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 209-238.

A. Kümmel, G. Behrens et G. Gottschalk (1975). Citrate lyase from *Streptococcus diacetylactis*. Association with its acetylating enzyme. *Archives of Microbiol.ogy*, 102, 111-116.

Z. Lazarova et L. Peeva (1994). Solvent extraction of lactic acid from aqueous solution. *Journal of Biotechnology*, 32, 75-82.

G.J. Lees et G.R. Jago (1978). Role of acetaldehyde in metabolism: A Review - 2. The metabolism of acetaldehyde in cultured Dairy products. *Journal of dairy Science*, 61, 1216-1224.

R. Lemoine (1991). Beurres : un singulier pluriel. *Revue Laitière Française*, 503, 13-26.

D.G. Lindmark, P. Polella et N.P. Wood (1969). The pyruvate-formate lyase system of *Streptococcus faecalis*: purification and properties of the formate-pyruvate exchange. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 3605-3612.

G.T. Lloyd et E.G. Pont (1973). Some properties of frozen concentrated starters produced by continuous culture. *Journal of dairy research*, 40,157-167.

P. Lopez, D. Drider, N. Garcia, C. Magni, M. Martin et D.de Mendoza (1997). Regulation of expression of the CITQRP operon of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

P. Loubière, L. Novak, M. Cocaign-Bousquet et N.D. Lindley (1996). Besoins nutritionnels des bactéries lactiques : interactions entre flux de carbone et d'azote. *Le lait*, 1-2, 5-12.

L.L. Mac Kay, L.A. Walter, W.E. Sandine et P.R. Elliker (1969). Involvement of phosphoenolpyruvate in lactose utilization by group N streptococci. *Journal of Bacteriology*, 99, 603-610.

L.L. Mac Kay, K.A. Baldwin et E.A. Zottola (1972). Loss of lactose metabolism in lactic *Streptococci. Applied Microbiology*, 23, 1090-1096.

E. Maguin, H. Prevost et A. Gruss (1996). Construction of food-grade mutants of lactic acid bacteria. *Le Lait*, 1-2, 139-146.

I. Marc, E. Rondags et C. Fonteix (1997). De la connaissance empirique à l'intelligence artificielle : voies offertes pour la modélisation et l'optimisation de procédés complexes. *8e colloque du club des bactéries lactiques*, Dijon.

V.M.E. Marshall et B.A. Law (1984). The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, éditions Elsevier Applied Science Publishers, vol. 1/1, 67-98.

V.M. Marshall (1987). Lactic acid bacteria: starters for flavours. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 327-336.

C. Mathis (1989). Les acétohydroxyacides et les dicétones libres en fermentation brassicole : Etude de leur formation par la levure grâce à de nouvelles méthodes de dosages en ligne. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.*

H. Matsusaki, N. Endo, K. Sonomoto et A. Ishizaki (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 36-40.

J. J. Maugas et G. Daufin (1992). Etude critique d'une installation industrielle de micro et d'ultrafiltration tangentielles pour la production de concentrés de protéines de lactosérum de hautes puretées. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 109, 687-691.

M.A. Mehaia et M. Cheryan (1986). Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 289-292.

D. Mellerick et T.M. Cogan (1981). Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 48, 497-502.

A.G. Moat (1985). Biology of the lactic, acetic, and propionic acid bacteria, *Biology of Industrial Microorganisms*, ed. A.L. Demain and N.A. Solomon, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC., 143-188.

C. Monnet, P. Schmitt et C. Divies (1997). Development and use of a screening procedure for production of alpha-acetolactate by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2, 793-795.

V. Monnet et J. C. Gripon (1994). Métabolisme azoté des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, aspect fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 331-366.

T.J. Montville, A. Han-Ming Hsu et M.E. Meyer (1987). High-efficiency conversion of pyruvate to acetoin by *Lactobacillus plantarum* during pH-controlled and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1798-1802.

N. Morin, M. Bernier-Cardou et C.P. Champagne (1992). Production of *Lactococcus lactis* biomass by immobilized cell technology. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 131-135.

R. Mosrati (1993). Nouvelle approche de la cinétique fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et de la conduite d'un procédé semi-continu : modélisation de la croissance basée sur le bilan énergétique de la levure. Commande prédictive et floue. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.*

A.A. Nechaeva et V.V. Sukhodolets (1996). Genetic study of industrial *Lactococcus lactis* strains: Identification of transmissible plasmids with respect to the lactose fermentation trait. *Genetika*, 2, 218-227.

P.M. Norton, R.W.F. Lepage et J.M. Wells (1995). Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiologica*, 40, 225-230.

G. Novel (1991). Taxonomie et Phylogénie. *Colloque LACTIC 91*, 17-22.

H. Ochi, M. Takahashi, T. Kaneko, H. Suzuki et H. Tanaka (1991). Diacetyl production by co-immobilized citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 and homogeneized bovin liver in alginate fibers with double gel layers. *Biotechnology Letters*, 13, 505-510.

E. Ohleyer, H.W. Blanch et C.R. Wilke (1985). Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11, 317-332.

M. Paquot, J.M. Eustache, D. Roblain et P. Thonart (1994). Crèmes et beurres acides. *Bactéries Lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 2/2, 155-167.

E. Perrin (1996). Stratégie intégrée utilisant des outils de l'intelligence artificielle pour la maîtrise d'un bioprocédé : instrumentation, modélisation, commande. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.*

H.E. Pettersson (1988). Starters for fermented milks - II. Mesophilic starter cultures. *Bulletin - International Dairy Federation*, 227, 19-26.

C. Platteeuw, J. Hugenholtz, M. Starrenburg, I. Vanalenboerrigter and W.M. de Vos (1995). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: Influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 3967-3971.

C. Platteeuw, I. Vanalenboerrigter, S. Schalkwijk and W.M. de Vos (1996). Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 1008-1013.

D. Poncelet, B. Poncelet de Smet et R.J. Neufeld (1990). Nylon membrane formation in biocatalyst microencapsulation: physicochemical modelling. *Journal of Membrane science*, 50, 249-267.

D. Poncelet, T. Alexakis, B. Poncelet de Smet and R.J. Neufeld (1994). Microencapsulation within crosslinked polyethylenimine membranes. *Journal of Microencapsulation*, 11, 31-40.

B. Poolman, A. J. M. Driessen et W. N. Konings (1987). Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiological Reviews*, 51, 498-508.

H. Prévost et C. Diviès (1987). Fresh fermented cheese production with continuous prefermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic streptococci entrapped in Ca-alginate. *Biotechnology Letters*, 9, 789-790.

H. Prévost et C. Diviès (1988). Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria, 1: development of the process. *Milchwissenschaft*, 43, 621-625.

H. Prévost et C. Diviès (1992). Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel. *Biotechnology Letters*, 14, 583-588.

H. Prévost, R. Cachon, J.F. Cavin et C. Diviès (1994). Les microorganismes immobilisés et l'industrie alimentaire. *Biofutur*, Mars, 42-45.

C. Prigent, C. Corre et P. Boyaval (1988). Production of concentrated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. *Journal of Dairy Research*, 55, 569-577.

A. Ramos, K.N. Jordan, T.M. Cogan et H. Santos (1994). ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 1739-1748.

M.R., Riley, F.J. Muzzio, H.M. Buettner et S.C. Reyes (1996). A simple correlation for predicting effective diffusivities in immobilized cell systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 223-227.

T.W. Ritchey et H.W. Seeley (1976). Distribution of cytochrome-like respiration in *Streptococci*. *Journal of General Microbiology*, 93, 195-203.

T. Roukas et P. Kotzekidou (1996). Continuous production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a packed-bed. *Food Biotechnology*, 10, 231-242.

L. Ruhaut (1994). Conception d'un procédé continu de fermentation en lit fixe par levures immobilisées. Etude de son application à la fermentation brassicole. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*.

P.R. Rutter (1984). Mechanisms of adhesion. *Microbial adhesion and aggregation*, Dahlem.

M.H. Saier et J. Reizer (1992). Proposed uniform nomenclature for proteins and protein domains of the bacterial sugar:phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*, 1433-1438.

K.H. Schleifer, J. Kraus, C. Dvorak, R. Klipper-Balz, M.D. Collins et W. Fisher (1985). *Systematic and Applied Microbiology*, 6 -183-195.

K.H. Schleifer, W. Ludwig, R. Amann, C. Hertel, M. Ehrmann, W. Köhler et A. Krause (1991). Phylogenic relationships of lactic acid bacteria and their identification with nucleic acid probes. *Colloque LACTIC 91*, 23-32.

J.L. Schmidt, C. Tourneur et J. Lenoir (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. *Bacteries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 2/2, 37-54.

P. Schmitt, C. Couvreur, J.F. Cavin, H. Prévost et C. Diviès (1988). Citrate utilisation by free and immobilized *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 430-436.

P. Schmitt, C. Diviès and C. Merlot (1990). Utilization of citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* in continuous culture. *Biotechnology Letters*, 12, 127-130.

P. Schmitt et C. Diviès (1991). Co-métabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1, 72-74.

P. Schmitt and C. Diviès (1992). Effect of variyng citrate levels on C4 compound formation and on enzyme levels in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* grown in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 426-430.

E.W. Seitz, W.E. Sandine, P.R. Elliker et E.A. Day (1963). Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptococcus diacetylactis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 4, 431-441.

K. Siegers et K.D. Entian (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6f3. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1082-1089.

A.K. Sijpesteijn (1970). Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by hemin in *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36, 335-348.

J.B. Smart et T.D. Thomas (1987). Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 533-541.

M.R. Smith, J. Hugenholtz, P. Mikoczi, E. de Ree, A.W. Bunch et J.A.M. de Bont (1992). The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 96, 7-12.

M.R. Smith, A. van der Schaaf, E.M. de Ree, J.A.M. de Bont and J. Hugenholtz (1993). The physiology of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* immobilized in hollow fibre bioreactors : glucose, lactose and citrate metabolism at high cell densities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 94-98.

J.L. Snoep, M.J.T.de Matos, M.J.C. Starrenburg et J. Hugenholtz (1992). Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *Journal of Bacteriology*, 14, 4838-4841.

I. Sodini, C.Y. Boquien, G. Corrieu et C. Lacroix (1997). Microbial dynamics of co- and separately entrapped mixed cultures of mesophilic lactic acid bacteria during the continuous prefermentation of milk. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 381-388.

I. Sodini, C.Y. Boquien, G. Corrieu et C. Lacroix (1997). Use of an immobilized cell bioreactor for the continuous inoculation of milk in fresh cheese manufacturing. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 56-61.

R.A. Speckman et E.B. Collins (1968). Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Bacteriology*, 1, 174-180.

R.A. Speckman et E.B. Collins (1973). Incorporation of radioactive acetate into diacetyl by *Streptococcus diacetylactis*. *Applied Microbiology*, 5, 744-746.

M.J.C. Starrenburg et J. Hugenholtz (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 12, 3535-3540.

L.R. Steenson, T.R. Klaenhammer et H.E. Swaisgood (1987). Calcium alginate immobilized cultures of lactic streptococci are protected brom bacteriophage. *Journal of Dairy Science*, 70, 1121-1127.

R.W. Stieber et P. Gerhardt (1981). Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation: simulated and experimental dialysate-feed, immobilized-cell systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 535-549.

G. Stien (1993). Mise en oeuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* en cultures pures et co-cultures : études cinétiques et suivi en ligne de l'influence de l'acide citrique et du pH sur le comportement métabolique. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.*

T. Suzuki (1996). A dense cell culture system for microoganisms using a stirred ceramic membrane reactor incorporating asymmetric porous ceramic filter. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 264-271.

S.R. Swindell, K.H. Benson, H.G. Griffin, P. Renault, S.D. Ehrlich and M.J. Gasson (1996). Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 2641-2643.

S. Takahashi, K. Abbe et T. Yamada (1982). Purification of pyruvate formate lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *Journal of Bacteriology*, 149, 1034-1040.

M. Takahashi, H. Hochi, T. Kaneko, H. Suzuki et H. Tanaka (1990). Diacetyl production by immobilized citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the fibrous Ca-alginate gel. *Biotechnology Letters*, 12, 569-574.

M. Taniguchi, N. Kotani et T. Kobayashi (1987). High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration. *Journal of Fermentation Technology*, 65, 179-184.

T.D. Thomas (1976). Regulation of lactose fermentation in group N streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 474-478.

J. Thompson (1979). Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *Journal of Bacteriology*, 140, 774-785.

J. Thompson (1987). Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 221-231.

J. Thompson et C.R. Gentry-Weeks (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*, éditions Lorica, Uriage, vol. 1/2, 239-290.

J.M.K. Timmer, H.C. Vanderhorst et T. Robbertsen (1993). Transport of lactic acid through reverse osmosis and nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 85, 205-216.

J.M.K. Timmer and J. Kromkamp (1994). Efficiency of lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* in a membrane recycle reactor. *FEMS Microbiology Reviews*, 14, 29-38.

J.M.K. Timmer, J. Kromkamp et T. Robbertsen (1994). Lactic acid separation from fermentation broths by reverse osmosis and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 92, 185-197.

H.W.Vandenhooven, C.C.M. Doeland, M. Vandekamp, R.N.H. Konings, C.W. Hilbers et F.J.M. Vandeven (1996a). Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry*, 235, 382-393.

H.W. Vandenhooven, C.A.E.M. Spronk, M. Vandekamp, R.N.H. Konings, C.W. Hilbers et F.J.M. Vandeven (1996b). Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry*, 235, 394-403.

J.S. VantHul et W.R. Gibbons (1996). Concentration and recovery of the bacteriocin nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 24, 251-256.

W.M. Verhue et F.S.B. Tjan (1991). Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* by means of ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 3371-3377.

H.A. Veringa, E.H. Verburg et J. Stadhouders (1984). Determination of diacetyl in dairy products containing α-acétolactic acid. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 38, 251-263.

T.B. Vickroy (1985). Biochemicals and fuels, Lactic acid. *Comprehensive Biotechnology*, éditions Moo Young, Oxford, 761-774.

R. Viennet (1997). Nouvel outil de planification expérimentale pour l'optimisation multicritère de procédés. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*.

W.M.de Vos et E.E. Vaughan (1994). Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews*, 15, 217-237.

L.G. Wayne, D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevski, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.R. Starr et H.G. Trüper (1987). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 463-464.

F.W. Welsh (1994). Overview of bioprocess flavor and fragrance production. *bioprocess production of flavour, fragrance and color ingredients*, éditions John Wiley & Sons, Inc., New York, vol. 1/1, 1-17.

J.J. Ye et M.H. Saier (1996). Regulation of sugar uptake via the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. *Journal of Bacteriology*, 12, 3557-3563.

X.B. Zhang et Y. Ohta (1991). Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton on lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74, 1477-1481.

GLOSSAIRE

AAL	: α-acétolactate
Acétyl-CoA	: acétyl-coenzyme d'acylation
ADC	: α-acétolactate décarboxylase
ADP	: adénosine-diphosphate
ALS	: α-acétolactate synthétase
ATP	: adénosine-triphosphate
AR	: acétoïne réductase
CE	: capture d'électrons
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
CLHP	: chromatographie liquide à haute performance
DO	: densité optique
DR	: diacétyle réductase
FAD	: flavine-adénine-dinucléotide
FDP	: fructose-1,6-diphopsphate
FID	: détecteur à ionisation de flamme
HPr	: protéine transporteuse de phosphate
LDH	: lactate déshydrogénase
NAD^+	: nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADP	: nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
PDH	: pyruvate déshydrogénase
PEP	: phosphoénolpyruvate
PFL	: pyruvate-formate lyase
Pi	: phosphate inorganique
PK	: pyruvate kinase
PTS	: système phosphotransférase
TDP	: tagatose-1,6-diphopsphate
TPP	: thiamine-pyrophosphate
UV	: ultra violet
VVM	: volume par volume par minute

NOMENCLATURE

S : concentration en substrat ($g.l^{-1}$)

S_0 : concentration initiale en substrat ($g.l^{-1}$)

S_A : concentration en substrat dans l'alimentation ($g.l^{-1}$)

P : concentration en produit ($g.l^{-1}$)

P_0 : concentration initiale en produit ($g.l^{-1}$)

P_A : concentration en produit dans l'alimentation ($g.l^{-1}$)

Q : débit d'alimentation ($l.h^{-1}$)

Q_F : débit de perméat ($l.h^{-1}$)

Q_P : débit de purge ($l.h^{-1}$)

V : volume réactionnel (l)

r_S : vitesse de consommation du substrat S ($g.l^{-1}.\ h^{-1}$)

r_P : vitesse de production du produit P ($g.l^{-1}.\ h^{-1}$)

V_S : vitesse spécifique de consommation du substrat Si (g. g de biomasse^{-1}. h^{-1})

V_P : vitesse spécifique de production du produit Pi (g. g de biomasse^{-1}. h^{-1})

μ : vitesse spécifique de production de biomasse (g. g de biomasse^{-1}. h^{-1})

$Y_{P/S}$: rendement global de formation du produit P à partir du substrat S ($g.g^{-1}$)

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

oOo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur DIVIES Charles, Professeur, ENSBANA Dijon,
Monsieur GOMA Gérard, Professeur, INSA Toulouse.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur RONDAGS Emmanuel

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :
"Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche de la voie de synthèse du diacétyle et d'une mise en oeuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire".

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, **2 Décembre 1997**
Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY

TEL. 33/83.59.59.59
FAX. 33/83.59.59.55

RESUME

Ce travail de recherche, portant sur les bactéries lactiques productrices d'arômes laitiers *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis,* comprend deux parties : la première est consacrée aux voies métaboliques de production du diacétyle, élément dominant de l'arôme de beurre, alors que la seconde concerne la mise en œuvre de ces bactéries lactiques en culture continue à haute densité cellulaire.

La première partie consiste en l'étude d'une des voies métaboliques de production du diacétyle par ce microorganisme, et, en particulier, de la réaction de décarboxylation oxydative de l'α-acétolactate en diacétyle. Les résultats cinétiques obtenus montrent que cette réaction peut être à l'origine de la production microbiologique du diacétyle, et ce, même dans des conditions physico-chimiques défavorables pour une décarboxylation oxydative. De plus, le siège de cette réaction, dans le cas où la production microbiologique de diacétyle proviendrait d'une décarboxylation oxydative de l'α-acétolactate, a été déterminé comme étant intracellulaire, avec un mécanisme cinétiquement dominant faisant intervenir un ou des composés thermolabiles.

La deuxième partie de ce travail consiste en une étude prospective pour la mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en culture continue à haute densité cellulaire. Deux modes de mise en œuvre sont évalués : la culture continue en réacteur à recyclage cellulaire et la culture continue de cellules immobilisées en réacteur à lit fixe. L'évaluation est établie en termes d'influence de ces modes de culture sur le métabolisme des cellules et de performances pour la production de biomasse et de diacétyle. Au niveau physiologique, cette étude permet de mettre en évidence des règles d'orientation du flux catabolique provenant des substrats carbonés lactose et citrate en fonction du taux de dilution et de révéler un mécanisme de régénération du NADH + H^+ en conditions de fort co-métabolisme citrate/lactose. Pour ce qui est des performances, ces résultats montrent que ces deux modes de culture, comparés à des cultures discontinues, apportent des gains notables en productivité, tant pour la biomasse que pour le diacétyle.

MOTS CLEFS

Lactococcus
Diacétyle
α-acétolactate
Décarboxylation oxydative
Procédé continu
Cellules immobilisées
Réacteur à membrane