



HAL
open science

Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum : études cinétiques, modélisation et simulation de procédé intégré

Daniel Morabito

► To cite this version:

Daniel Morabito. Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum : études cinétiques, modélisation et simulation de procédé intégré. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français. NNT : 1994INPL025N . tel-01751330

HAL Id: tel-01751330

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751330>

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.



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>

54 INPL 025N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

**Centre National de Recherche Scientifique
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique**

THESE

présentée à l'INPL

par

Daniel MORABITO

en vue d'obtenir le grade

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Specialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

**PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR *Lactobacillus casei*
SUR LACTOSERUM : ETUDES CINETIQUES, MODELISATION ET
SIMULATION DE PROCEDURE INTEGRE**

soutenue le 15 Février 1994 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :



D 136 028536 0

Rapporteurs : Ph. THONART
G. GOMA

Examineurs :

J.P. PONTALIER
M. FICK
R. MARCZAK

1360285360

94INPL025N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

**Centre National de Recherche Scientifique
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique**

[M] 1994 MORABITO, D.

THESE

présentée à l'INPL

par

Daniel MORABITO

en vue d'obtenir le grade

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Specialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

**PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR *Lactobacillus casei*
SUR LACTOSERUM : ETUDES CINETIQUES, MODELISATION ET
SIMULATION DE PROCEDE INTEGRE**

soutenue le 15 Février 1994 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : J.M. ENGASSER
Rapporteurs : Ph. THONART
G. GOMA

Examineurs : J.P. PONTALIER
M. FICK
R. MARCZAK

AVANT - PROPOS

Je tiens à remercier, pour leur accueil, Monsieur Daniel TONDEUR, Directeur du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, et Madame Annie Marc, Directeur de Recherche au C.N.R.S. dans le groupe du Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Jean-Marc ENGASSER, Professeur I.N.P.L.. Je le remercie d'avoir accepté la présidence de jury et pour ses judicieux conseils.

Je remercie Monsieur Michel FICK, Maître de Conférences à l'E.N.S.A.I.A., d'avoir encadré ces recherches. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour l'intérêt et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je remercie vivement Messieurs PONTALIER et DEHBI, directeur et responsable des projets de recherche chez Bio Sérum Europe, pour leurs conseils et leurs aides durant le déroulement de ma thèse.

Je remercie Monsieur Régis MARCZAK, Maître de Conférences à l'Université de Nancy I, pour ces conseils.

Je remercie Messieurs Gérard GOMA, Professeur à l'I.N.S.A. de Toulouse, et Philippe THONART, Professeur à l'Université de Liège, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Fabrice BLANCHARD, Mohamed GHOLL, Bernard PARJSET et Evelyne RONAT qui se sont montrés disponibles et m'ont apporté une aide efficace.

Mes remerciements vont aux personnes qui m'ont accompagnés au cours de ces années :

Isabelle, Fabienne, Florence, Pierre-Yves, Hervé, Anne, Cécile, Christophe, Bruno, Nassim, Marie-Thérèse, Catherine, Elisabeth, Myriam, collègues de "l'étage", du "hall" et du "C.E.G.E.P.", et tous les amis "hors" du labo et d'Italie...

Je tiens à exprimer un très vif remerciement à l'équipe de recherche qui a participé directement aux travaux de cette thèse, dans l'ordre chronologique:

<i>Laurent DUTHOIS</i>	<i>(BISA, Malzéville)</i>
<i>Karine MAURER</i>	<i>(Maîtrise de Biologie, Metz)</i>
<i>Thierry PAYOT</i>	<i>(Maîtrise de Biochimie, Nancy I et DEA Biotech. et Ind. Alim., INPL Nancy)</i>
<i>Laurent BOUCHER</i>	<i>(DEA Biotech. et Ind. Alim., INPL Nancy)</i>
<i>Eric BRUNCHER</i>	<i>(BISA, Malzéville)</i>
<i>Philippe RICHERT</i>	<i>(Maîtrise de Chimie Biochimie, Metz)</i>
<i>Marielle QUEVEDO</i>	<i>(DIT, Biologie Appliquée, Nancy I)</i>
<i>Emmanuel RONDAGS</i>	<i>(Maîtrise de Biochimie, Nancy I)</i>
<i>David STURM</i>	<i>(DIT, Biologie Appliquée, Nancy I)</i>
<i>Nathalie WEBER</i>	<i>(Maîtrise de Biochimie, Nancy I)</i>
<i>Valérie JORRY-DORJANI</i>	<i>(ENS, Cachan)</i>
<i>Joël GRIMALDIER</i>	<i>(Ecole Technique de la Conservation, Paris)</i>

Mais mes remerciements sont adressés plus particulièrement à mon frère et à mes parents qui ont su me soutenir, m'encourager et me supporter tout au long de ces années.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	2
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. LE LACTOSERUM.....	6
1.1. Généralités.....	6
1.2. Les différents types de lactosérum.....	6
1.3. La composition.....	8
1.4. Valorisation du lactosérum.....	8
2. LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE.....	12
2.1. Par voie chimique.....	12
2.2. Par voie enzymatique.....	12
2.3. Par fermentation.....	14
2.4. Brevets appliqués à la bioproduction et l'extraction d'acide lactique.....	19
3. LE METABOLISME CELLULAIRE.....	19
3.1. Les microorganismes.....	19
3.2. L'énergétique cellulaire.....	20
3.3. Nutrition.....	28
3.4. L'influence du pH et de l'inhibition lactique.....	30
4. LES PROCEDES D'EXTRACTION DE L'ACIDE LACTIQUE.....	34
4.1. Extraction liquide-liquide.....	36
4.2. Dialyse et électrodialyse.....	38
4.3. Cristallisation.....	38
4.4. Microfiltration et ultrafiltration.....	40
4.5. Osmose inverse.....	40
4.6. Chromatographie.....	42
4.7. Distillation.....	42
4.8. Fluides supercritiques.....	44
5. MODELISATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE.....	44
5.1. Définition.....	44
5.2. Croissance.....	46
5.3. Consommation du substrat.....	47
5.4. Production d'acide lactique.....	48

II. MATERIEL et METHODES.....	50
1. MICROORGANISME.....	50
1.1. Conservation et revivification de la souche.....	52
1.2. Propagation et préculture.....	52
2. MILIEUX DE CULTURE.....	52
2.1. Milieu MRS gélosé et MRS lactosé.....	52
2.2. Milieu de fermentation initial.....	54
3. STERILISATION ET TRAITEMENT THERMIQUE.....	54
4. MODE DE CULTURE.....	54
4.1. Fermentation discontinue.....	54
4.2. Fermentation semi-continue.....	55
4.3. Fermentation continue.....	55
5. UTILISATION DE LA METHODE D'IMPULSION ET ECHELON.....	56
6. ANALYSES.....	58
6.1. Estimation de la biomasse.....	58
6.2. Dosage enzymatique de l'acide lactique et du lactose.....	59
6.3. Dosage par HPLC de l'acide lactique et du lactose.....	62
6.4. Dosage des protéines.....	62
6.5. Estimation des protéines précipitées et de l'intensité de la réaction de Maillard.....	63
6.6. Détermination des peptides par HPLC en phase inverse.....	63
7. LYSE BACTERIENNE.....	64
7.1. Par sonication.....	64
7.2. Par lyse physicochimique.....	64
8. INTERPRETATION DES DONNEES.....	65
8.1. Vitesses spécifiques.....	65
8.2. Rendements.....	68
8.3. Productivités.....	69
8.4. Calcul du bilan carboné.....	69
9. MODELISATION DES FERMENTATIONS DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES.....	69
10. APPAREILS.....	70

III. INFLUENCES DES PRINCIPAUX PARAMETRES SUR LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR <i>Lactobacillus casei</i> SUR LACTOSERUM.....	72
1. SELECTION DE SOUCHE.....	73
1.1. Test d'acidification.....	73
1.2. Sélection en réacteur contrôlé.....	74
1.3. Essais d'utilisation de souches adaptées à de fortes concentrations d'acide lactique.....	76
1.4. Essai de culture à température élevée.....	78
1.5. Conclusion.....	79
2. INFLUENCE DES ELEMENTS ESSENTIELS SUR LA CINETIQUE DE <i>L. casei</i>.....	80
2.1. Mise en évidence des besoins nutritionnels.....	82
2.2. Influence de l'extrait de levure	84
2.3. Influence du manganèse et magnésium.....	84
2.4. Influence du Tween 80.....	86
2.5. Conclusions	88
3. REMPLACEMENT DE L'EXTRAIT DE LEVURE.....	90
3.1. Importance de l'extrait de levure en poudre	90
3.2. Remplacement de l'extrait de levure par un lysat acide ou une solution issue d'une sonication de <i>L. casei</i> supplémentée en vitamines.....	92
3.3. Remplacement de l'extrait de levure en poudre par de l'extrait de levure liquide.....	94
3.4. Conclusions	96
4. INFLUENCE DE L'ORIGINE DU LACTOSERUM.....	98
5. INFLUENCE DE L'INOCULUM.....	100
6. INFLUENCE DU PRETRAITEMENT PHYSICOCHIMIQUE DU MILIEU.....	101
6.1. Influence prétraitement (pH et durée) sur les cinétiques des fermentations.....	102
6.2. Explication de l'action du prétraitement sur les performances des fermentations.....	107
6.3. Conclusions	112
7. INFLUENCE DE LA BASE REGULATRICE.....	114
CONCLUSIONS.....	115

IV. ETUDE CINETIQUE DE CULTURES DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES	117
1. ETUDE CINETIQUE DE FERMENTATION DISCONTINUE.....	119
1.1. Cinétiques.....	119
1.2. Croissance et Mortalité.....	121
1.3. Vitesses spécifiques.....	123
1.4. Conclusions.....	125
2. ETUDE CINETIQUE DES FERMENTATIONS SEMI-CONTINUES.....	127
2.1. Influence de la concentration de lactosérum du milieu d'alimentation.....	127
2.2. Influence du débit du milieu d'alimentation.....	134
2.3. Influence de la variation concentration en alimentation à faible débit.....	138
2.4. Vitesses.....	139
CONCLUSIONS.....	143
V. MODELISATION ET SIMULATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE.....	144
1. MODELISATION DES FERMENTATIONS DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES.....	145
1.1. Hypothèses et lois cinétiques.....	145
1.2. Equations de bilans de matière	148
1.3. Estimations des paramètres cinétiques.....	150
1.4. Résultats du modèle.....	152
2. SIMULATIONS EN CULTURE SEMI-CONTINUE ET EN SYSTEME FCF.....	158
2.1. Simulations en culture semi-continue.....	158
2.2. Simulation du procédé FCF.....	162
CONCLUSIONS.....	178
CONCLUSIONS - PERSPECTIVES	180
ABREVIATIONS	I
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	II

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La France produit environ 1/3 du jus lactosé européen avec 8 millions de tonnes par an. 80% de ce lactosérum est obtenu dans les régions de l'Ouest (Bretagne, Normandie) et de l'Est (Lorraine) de la France et est dû principalement à la production de fromage (**figure 1**). Le volume important de cette production entraîne dans ces régions des problèmes d'environnement liés à son rejet.

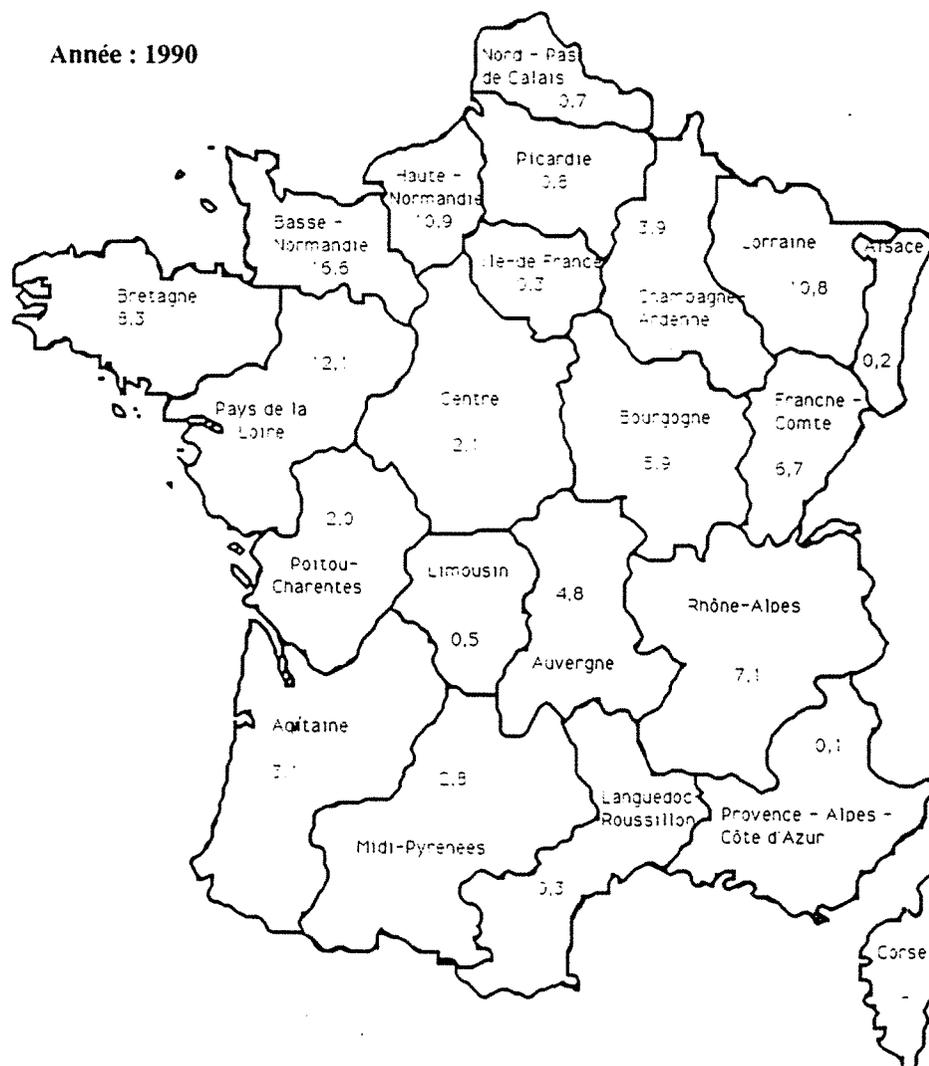
La richesse du lactosérum a conduit certains groupes européens à mettre en œuvre une stratégie de multivalorisation de ce sous-produit. Dans ce contexte, la Lorraine a compris l'importance de cet enjeu et affiche une politique très ambitieuse dans ce sens afin d'utiliser de manière plus efficace les volumes disponibles.

Le traitement par ultrafiltration sur membrane conduit à l'obtention de deux produits. Le premier est un concentré de protéines qui par ses qualités nutritionnelles et fonctionnelles trouve de nombreux et larges débouchés dans les secteurs de la seconde transformation agro-alimentaire et de la diététique classique spécialisée. Le deuxième, un perméat, est caractérisé par une forte teneur en lactose (87% de la substance sèche) et en sels minéraux (9% de la substance sèche). Ces teneurs limitent ses débouchés soit à l'alimentation animale (celle du ruminant ou celle du porc à l'engrais), soit à une utilisation comme substrat de fermentation.

La bioconversion par des levures du lactose (perméat de lactosérum) est déjà une réalité industrielle (procédé Bel) tant pour la production de biomasse que pour la production d'alcool de bouche.

D'autres bioconversions sont envisageables, car nombre de microorganismes ont la capacité de dégrader le lactose et de le convertir en différents métabolites (méthane, solvants, acides aminés, polysaccharides, xanthane ou acides organiques).

Parmi ces derniers, la transformation en acide lactique apparaît la plus prometteuse en raison de la relative ampleur du marché mondial de cet acide et l'adéquation des



(en % de la production nationale égale à 1 353 842 tonnes)

Source : S.C.E.E.S.

Figure 1 : Carte de la production régionale en France des fromages au lait de vache

microorganismes utilisés quotidiennement par l'industrie laitière à cette bioconversion. Les débouchés pour l'acide lactique sont en effet importants et variés. En industrie agro-alimentaire, il est utilisé comme acidulant (boissons gazeuses, bière, cidre), conservateur (choucroute, cornichons, pain), anticristallisant (confiserie) ou acidifiant (beurre). En pharmacie, les lactates de calcium et de fer sont employés pour lutter contre les carences en ces deux oligo-éléments, et plus particulièrement les polymères d'acide lactique sont utilisés comme support biodégradable de principes actifs sous forme d'implants. Enfin, en industrie chimique, il trouve de nombreuses applications (peintures, tannerie, mordants pour teinture, préparation de résines, etc.).

Les principaux obstacles au développement de procédés de production d'acide lactique par voie fermentaire sont de deux ordres : de mauvaises productivités liées à l'inhibition de la fermentation par le lactate produit et une technique inadaptée d'extraction. Pour parvenir à une production idéale nous devons connaître les exigences particulières de cette fermentation : sélectionner une souche adaptée à consommer du lactose et à résister aux fortes concentrations d'acide lactique et suivre l'influence des différents éléments à ajouter dans le milieu, de l'origine du lactosérum, de l'inoculum, du prétraitement, de la base régulatrice et de technique de culture.

Pour y parvenir, le premier objectif est d'isoler (grâce à la collaboration du laboratoire de Chimie Biologique I, de Nancy I) une bactérie ayant les caractères suivants : consommant tout le lactose, sans rejet ou accumulation d'un des deux oses (glucose ou galactose), pouvant se développer en présence de forte concentration de sucre et d'acide lactique, produisant en très fortes concentrations et rapidement la forme isomérique L(+) de l'acide lactique et apte à faire uniquement de l'homofémentation.

Après cette première étape, il est nécessaire de suivre l'influence de la composition du milieu de culture sur la cinétique de croissance, de consommation et de production d'acide lactique. Pour cela, la technique d'impulsion et échelon sera employée afin de suivre l'effet provoqué par l'ajout de certains éléments dans le milieu de culture sur la production d'acide lactique.

La grande diversité des lactosérums modifie la composition du milieu de départ. Ainsi, dans la partie qui suit, nous testerons l'influence de l'origine de deux lactosérums différents sur le développement des bactéries, la consommation du lactose et la production d'acide lactique.

Par la suite, nous déterminerons les effets que peuvent avoir certains paramètres entrant dans la fermentation lactique : conditions de développement de l'inoculum, influence du prétraitement et de la base régulatrice.

Suite à ces travaux, une étude cinétique détaillée sera menée sur les cultures discontinues et semi-continues. Ainsi, il sera possible de définir les lois cinétiques qui régissent la consommation de lactose, la croissance et la production d'acide lactique. Le but final de nos travaux est de connaître les facteurs qui influencent la cinétique de croissance et de production d'acide lactique sur lactosérum.

Pour finir, nous entreprendrons de simuler un procédé alliant à la fois la fermentation et la séparation de l'acide lactique par cristallisation puis filtration.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**Trouver d'abord.
Chercher après.**

Jean COCTEAU

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE LACTOSERUM	6
1.1. Généralités.....	6
1.2. Les différents types de lactosérum.....	6
1.3. La composition.....	8
1.4. Valorisation du lactosérum	8
1.4.1. Valorisation directe	8
1.4.2. Valorisation indirecte.....	10
2. LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE	12
2.1. Par voie chimique.....	12
2.2. Par voie enzymatique.....	12
2.3. Par fermentation	14
2.4. Brevets appliqués à la bioproduction et l'extraction d'acide lactique	19
2.3.1. Les microorganismes utilisés.....	14
2.3.2. Les milieux de culture	15
2.3.3. Les procédés.....	15
3. LE METABOLISME CELLULAIRE	19
3.1. Les microorganismes.....	19
3.2. L'énergétique cellulaire	20
3.2.1. Transport du lactose.....	20
3.2.2. Métabolisme du lactose	20
3.2.3. Voie glycolytique d'Embden-Meyerhof.....	24
3.2.4. Productions de métabolites	24
3.3. Nutrition.....	28
3.3.1. La nutrition azotée.....	28
3.3.2. Les facteurs de croissance et les minéraux.....	28
3.3.3. L'influence de l'oxygène sur la croissance	30
3.4. L'influence du pH et de l'inhibition lactique	30

4.	LES PROCEDES D'EXTRACTION DE L'ACIDE LACTIQUE...	34
4.1.	Extraction liquide-liquide.....	36
4.2.	Dialyse et électrodialyse	38
4.3.	Cristallisation	38
4.4.	Microfiltration et ultrafiltration.....	40
4.5.	Osmose inverse.....	40
4.6.	Chromatographie.....	42
4.7.	Distillation.....	42
4.8.	Fluides supercritiques.....	44
5.	MODELISATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE.....	44
5.1.	Définition.....	44
5.2.	Croissance.....	46
5.3.	Consommation du substrat.....	47
5.4.	Production d'acide lactique.....	48

1. LE LACTOSERUM

1.1. Généralités

Le lactosérum, encore appelé sérum ou petit-lait, est un sous produit liquide de la fromagerie et de la caséinerie. Il provient essentiellement de la séparation de la fraction du lait lors de la précipitation, ou floculation, de la caséine ou caillé.

Le lactosérum représente 50% de la matière sèche issue du lait. C'est un produit "noble", au même titre que le fromage. L'évolution des industries fromagères conduit à une production de plus en plus importante de lactosérum (90 millions de tonnes en 1985 dans le monde). La France produit à elle seule un tiers du jus lactosé européen avec 8 millions de tonnes annuelles (SYLACT, 1991).

La production est considérable puisqu'elle correspond en moyenne, à neuf fois le tonnage des fromages fabriqués (VEISSEYRE, 1975) . En moyenne, on peut considérer qu'il faut 10 litres de lait pour fabriquer 1kg de fromage de type "pâte pressée" (St Paulin, Gruyère) et 9 litres de lactosérum sont récupérés (SATTIEZ et LUQUET, 1972) .

1.2. Les différents types de lactosérum

Deux types de lactosérums sont distingués selon que leur acidité est supérieure ou inférieure à pH=5. Le lactosérum acide est la fraction liquide résultant de la fabrication des fromages à coagulation lactique très marquée, pour lesquels le caillage a lieu sans emprésurage. Il s'agit des pâtes fraîches et des pâtes molles.

Le lactosérum doux est la fraction liquide résultant de la fabrication de fromages à coagulation lactique peu marquée et collectée au stade du moulage et du premier égouttage. Il s'agit des pâtes pressées et des pâtes cuites (SYLACT, 1991). Les lactosérums acides ont une composition trop variable pour que des teneurs moyennes en divers constituants aient une signification. Ils renferment moins de lactose et plus de sels que les sérums doux (VEISSEYRE, 1975) . Le **tableau I.1** ci-contre, nous donne les compositions moyennes des deux types de lactosérums produits en fromagerie.

Composition (g/l)	Lactosérum Doux	Lactosérum Acide
Matière sèche	70	65
Matière grasse	3,0 - 5,0	0,5 - 1,0
Lactose	50 - 51	44 - 46
Matières azotées	8,5 - 9,0	7,5 - 8,0
Matières minérales	5,0 - 5,5	7,5 - 8,0
Acide lactique	0,4 - 0,5	4,5 - 5,0

Tableau I.1 : Compositions moyennes des deux types de lactosérums produits en fromagerie

1.3. La composition

En industries fromagères, la plus grande partie de l'eau contenue dans le lait se retrouve dans le lactosérum et avec elle, toutes les substances solubles : le lactose, les protéines solubles et des peptides, les sels minéraux solubles (lactates, chlorures...) et les matières grasses.

Les protéines présentes sont les matières azotées ne précipitant pas; elles représentent 20% des protéines du lait; ce sont les albumines (75%), les globulines (10%) et divers autres (15%). Pour un litre de lactosérum en sortie d'usine, 66g de matières sèches sont récupérés soit : 49g de lactose (69-75%), 8g de protéines solubles (10-13%), 5g de cendres (5-8%) et 4g de matières grasses (4-7%) (SYLACT, 1991).

Le lactosérum est un aliment intéressant non seulement par la présence du lactose, mais aussi par la teneur en protéines riches en acides aminés indispensables (lysine et tryptophane) et par la présence de nombreuses vitamines du groupe B (thiamine, acide pantothénique, riboflavine...) (VEISSEYRE, 1975) .

1.4. Valorisation du lactosérum

1.4.1. Valorisation directe

Considéré comme polluant lorsqu'il est rejeté dans les cours d'eau et les égoûts, le déversement du sérum doit être nécessairement précédé d'une épuration très coûteuse (VEISSEYRE, 1975) .

Il faut savoir que 50 000 litres de sérum seraient équivalents à la pollution d'une ville de 25 000 habitants. La DBO (Demande Biochimique en Oxygène) d'un litre de sérum se situe entre 30 et 45g/l et nécessite donc l'oxygène de 4500 litres d'eau non polluée (SATTIEZ et LUQUET, 1972) .

Une opération d'épuration vise à éliminer le lactose et les protéines, c'est-à-dire les constituants nutritifs les plus précieux. Au lieu de les détruire, le lactosérum est valorisé en l'additionnant à l'alimentation animale ou humaine.

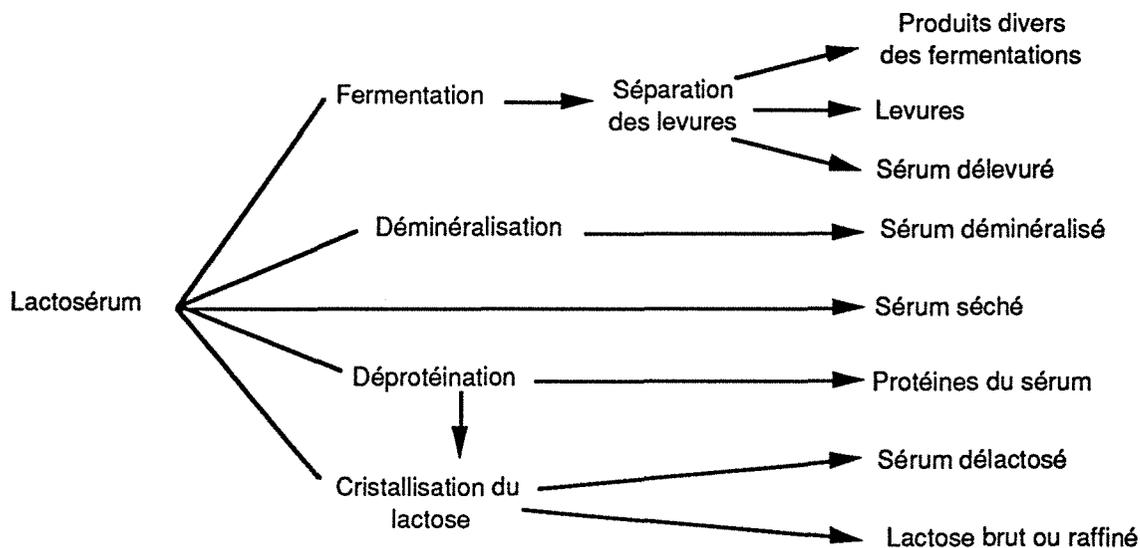


Figure I.1 : Principales transformations industrielles du lactosérum (VEISSEYRE, 1975)

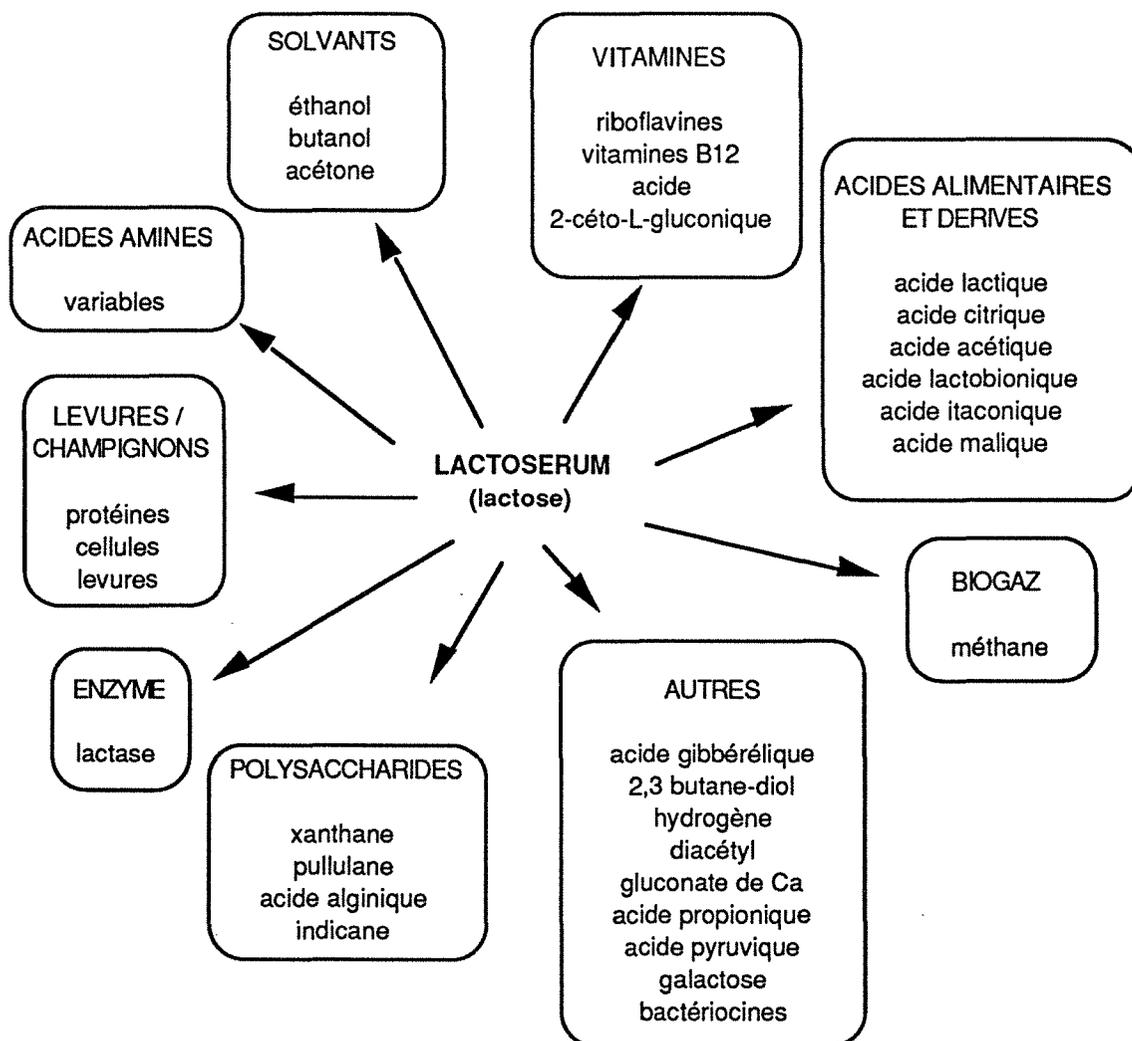


Figure I.2 : Valorisation indirecte du lactosérum (ZADOW, 1989)

Les possibilités d'utilisation du lactosérum dans l'alimentation humaine sont très variées comme dans la panification, la confiserie, la chocolaterie, les sauces, les condiments ou les boissons. Toutefois, la teneur relativement élevée en sels ainsi que la dilution excessive des constituants rendent nécessaires certains traitements pour mieux adapter la composition du produit aux diverses utilisations industrielles (VEISSEYRE, 1975).

La mise en valeur du lactosérum passe par la séparation de ces différents constituants utilisant des techniques diverses et variées (concentration, dessiccation, extraction des protéines et du lactose par filtration précipitation (**figure I.1**)).

Il est possible également de fabriquer des boissons rafraîchissantes et nutritives à partir de lactosérum déprotéinisé (DRIESSEN et BERG, 1990; KRAVCHENKO, 1989) ou fermentées en présence de jus de raisin (VEISSEYRE, 1975; SCIANCALEPORE, 1992) .

1.4.2. Valorisation indirecte

Actuellement, les techniques les plus avancées visent à valoriser ce lactosérum par biotransformation.

Grâce au lactose, il est possible de produire des solvants (PORRO et coll., 1992), des vitamines, des polysaccharides (ZADOW, 1989), du méthane, des enzymes, des acides aminés et organiques (LEWIS et YANG, 1992; MORABITO et FICK, 1992) et de nombreux autres composés (CAMPAGNO et coll., 1993) (**figure I.2**). L'ensemble des procédés de fermentation du lactosérum montre que le système de production d'acide lactique est l'un des plus avantageux.

Les aspects techniques et économiques font parfois défaut pour qu'une telle application à l'échelle industrielle soit réalisable (**tableau I.2**). Les techniques utilisées sont parfois limitées et demandent un plus grand développement pour qu'un procédé soit rentable. L'utilisation d'acide lactique est réservée principalement aux secteurs chimiques et alimentaires et sa demande connaît une croissance modérée.

De nos jours, la production de levure à partir de lactosérum est la principale réalisation industrielle (MOULIN et GALZY, 1984). Les fromageries Bel sont leaders en France et leur premier procédé, existant depuis 1958, n'a cessé d'être amélioré au cours de ces années. Il comprend un ensemble de trois réacteurs ayant chacun un volume utile de 23m³. La fermentation se déroule en continue ($D=0,33h^{-1}$). La teneur en lactose est de 20 à 25g/l et les souches utilisées sont de levures.

PRODUITS	TECHNOLOGIE			MARCHE		
	Disponibilité	Développement nécessaire	Degré de sophistication	Disponibilité	Potentiel de croissance	Potentiel économique
Levure alimentaire	Bonne	Petit	Faible	Bonne	Modéré	Pauvre/modeste
Ethanol industriel	Bonne	Petit	Faible/modéré	Limitée	Limité	Pauvre
Ethanol alimentaire	Bonne	Petit	Faible/modéré	Bonne	Modéré	Excellent
Acétone / butanol	Restreinte	Modéré	Faible/modéré	Limitée à bonne	Limité	Marginal
Méthane	Bonne	Modéré à haut	Faible/modéré	Bonne	Non applicable	Variable
Acides alimentaires	Variable	Haut	Haut	Bonne	Limité	Inconnu
Enzymes	Restreinte	Haut	Haut	Variable/compétitive	Limité	Inconnu
Polysaccharides	Restreinte	Modéré	Haut	Limitée/inconnue	Inconnu	Inconnu
Acides aminés	Restreinte	Haut	Haut	Compétitive	Inconnu	Inconnu

Tableau I.2 :Aspect technologique et part du marché pour la valorisation biotechnologique du lactosérum (HOBAM, 1984)

2. LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

L'acide lactique fut identifié pour la première fois en 1847 par BLONDEAU comme produit de la fermentation bactérienne et mis en évidence pour la première fois dans du lait par SCHEELE en 1870. C'est en 1881 que commença aux USA la production industrielle de cet acide. Treize ans plus tard, cette production atteint 5t/an et est destinée aux industries du cuivre et du textile (VICK ROY, 1985).

2.1. Par voie chimique

La synthèse chimique de l'acide lactique a débuté en 1963 au Japon et aux USA. Elle présente l'intérêt d'utiliser des co-produits de l'industrie chimique, mais surtout de produire de l'acide lactique très thermostable et incolore, indispensable à la synthèse des dérivés de l'acide lactique tel que le stéarol-2-lactate. (VICK ROY, 1985).

Alors que de nombreux procédés de synthèse chimique existent (VAN NESS, 1981), le principal consiste en une hydrolyse du lactonitrile, obtenu à partir de l'acétaldéhyde, par l'acide chlorhydrique.



MONTGOMERY (1952) avait, à l'époque, proposé un système d'hydrolyse alcaline de mélasses ou encore l'oxydation du propylène par l'acide nitrique. Ce dernier procédé a été mis en œuvre par la société RHONE-POULENC, mais il a été rapidement stoppé pour des raisons de sécurité (VICK ROY, 1985).

2.2. Par voie enzymatique

Il a été découvert deux types de 2-halo-acide déshydrogénases bactériennes, qui diffèrent dans leur stéréospécificité (MOTOSUGI et coll., 1984). Elles catalysent la déhalogénéation des acides 2-halo-alkanoïques tel que l'acide 2-halo-propionique avec inversion de la configuration. Ainsi, il est possible de produire deux énantiomères de l'acide lactique à partir de l'acide 2-chloropropionique par l'action de ces enzymes. Ces dernières sont obtenues par fermentation de Pseudomonas.

Genres sous genres	Type de fermentation	Produits finaux (rapport)	Configuration de l'acide lactique
<i>Streptococcus</i>	homolactique	lactate	L(+)
<i>Pediococcus</i>	homolactique	lactate	DL et L(+)
<i>Lactobacillus</i>			
<i>Thermobactérium (grp. I)</i>	homolactique	lactate	D(-), L(+), DL
<i>Streptobacterium (grp. II)</i>	hétérolactique (facultatif)	lactate/acétate 1 1	D(-), L(+), DL
<i>Betabacterium (grp. III)</i>	hétérolactique	lactate/acétate/CO2 1 1 1	DL
<i>Leuconostoc</i>	hétérolactique	lactate/acétate/CO2 1 1 1	D(-)
<i>Bifidobacterium</i>	hétérolactique	lactate/acétate 2 3	L(+)

Tableau I.3 : Récapitulatif des bactéries lactiques avec le type de fermentation et d'isomère d'acide lactique produit (VICK ROY, 1985)

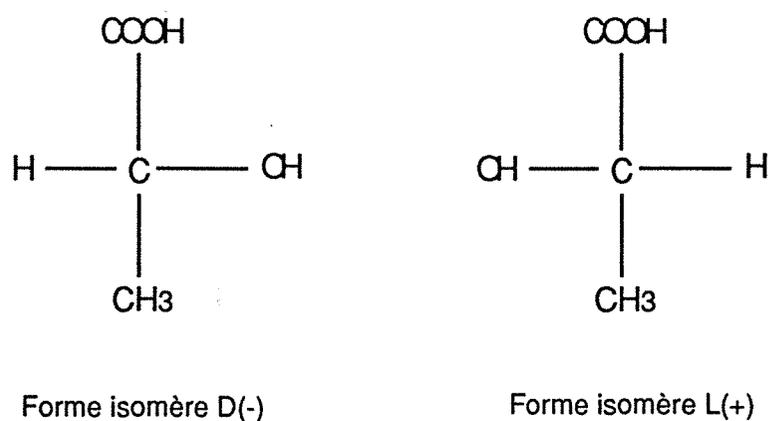
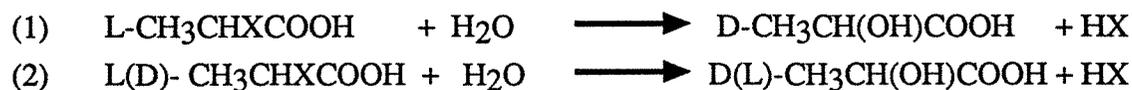


Figure I.3 : Les deux formes isomériques de l'acide lactique

Les réactions (1) et (2) sont catalysées par ces enzymes respectivement :



La L-2-halo-acide déhalogénase agit spécialement sur l'isomère L de l'acide 2-chloropropionique. Alors que la DL-2-halo-acide déhalogénase catalyse la déhalogénéation des deux énantiomères de l'acide sans distinction avec inversion de configuration. Cette procédure enzymatique est unique dans la formation de produits optiquement actifs et de plus la matière de départ, l'acide-2-halo-propionique racémique, est produit à bon marché en industrie chimique.

2.3. Par fermentation

2.3.1. Les microorganismes utilisés

Les microorganismes généralement utilisés pour la production d'acide lactique sont des bactéries homofermentaires (tableau I.3) ne produisant qu'un seul isomère optique D(-) ou L(+) de l'acide lactique (figure I.3). Les qualités recherchées chez ces bactéries sont la rapidité de fermentation, la faible production de co-produits, la résistance à l'acide lactique et des besoins nutritionnels aussi faibles que possible. Les souches pouvant se développer à faible pH (5 à 7) et haute température (40°C) sont particulièrement intéressantes, car dans ces conditions, les risques de contaminations sont réduits. La plupart des bactéries répondant à ces critères appartiennent aux genres streptocoques et lactobacilles.

Les lactobacilles sont les microorganismes les plus fréquemment utilisés pour la production d'acide lactique. Ils ont une résistance à l'acide lactique supérieure à celle des streptocoques (KASHKET, 1987), mais ont par contre des exigences nutritionnelles plus importantes (VINIEGRA et GOMEZ, 1984).

D'autres utilisent les mutations génétiques pour augmenter la production d'acide lactique. C'est le cas de *Lactobacillus delbrueckii* qui produit jusqu'à 117g/l d'acide lactique contre 67g/l pour la souche sauvage de départ. (DEMIRCI et POMETTO, 1992).

D'autres auteurs préfèrent opter pour une co-culture bactérie-levure de *Lactobacillus hilgondii* ou *Lactobacillus casei* plus *Saccharomyces florentinus* (LEROI et PIDOUX, 1993) ou bien par exemple *Lactobacillus plantarum* et *Saccharomyces cerevisiae* (YONDEM et coll., 1992).

2.3.2. Les milieux de culture

La sélection d'une souche dépend de l'hydrate de carbone choisi pour la fermentation. *L. delbrueckii* (OHLEYER et coll., 1985; MAJOR et BULL, 1989) et *L. casei* (DE VRIES, 1970; HJÖRLEIFSDOTTIR, 1990) sont généralement cultivés sur des milieux complexes à base de glucose, tandis que *Streptococcus cremoris* est essentiellement cultivé sur lactose (TANGUCHI et coll., 1987; BIBAL et coll., 1988).

Le perméat de lactosérum constitue un bon milieu complexe à base de lactose pour la production d'acide lactique. *L. helveticus* (BOYAVAL et coll., 1987; AESCHLIMANN et VON STOCKAR, 1989) et *L. bulgaricus* (STIEBER et GERHARDT, 1981; MEHAIA et CHERYAN, 1987) sont plus souvent cultivés sur ce milieu. COX et MAC BEAN (1977) ainsi que AESCHLIMANN et VON STOCKAR (1990), montrent que la complémentation du perméat de lactosérum avec de l'extrait de levure permet d'améliorer la croissance et la production d'acide lactique.

A l'échelle industrielle, les sucres de canne et de betterave bien qu'onéreux, sont souvent utilisés (VICK ROY, 1985). Les celluloses et les mélasses (SCHOPMEYER, 1954; AKSU et KUTSAL, 1986) sont plus rarement employées, car elles compliquent les étapes de purification.

Récemment, un brevet de RHONE-POULENC (SCHNEIDER et LAMONERIE, 1989) mentionne l'utilisation d'amidon comme matière première. Dans ce procédé, l'amidon est hydrolysé par des enzymes amylolytiques saccharifiantes durant la fermentation lactique fournissant ainsi aux cellules un substrat carboné assimilable. Dernièrement, d'autres travaux utilisent le même procédé couplant à la fois une enzyme (α -amylase) et une bactérie (*L. amylovorus*) pour produire de l'acide lactique (CHENG et coll., 1991).

2.3.3. Les procédés

Le procédé industriel de production d'acide lactique le plus répandu consiste en une fermentation discontinue de *L. delbrueckii* (INSKEEP et coll., 1952). La température est comprise entre 45 et 60 °C, le pH est maintenu entre 5 et 6,5, grâce à du carbonate de calcium ajouté initialement en excès. Pour une concentration initiale en glucose de 150g/l, la fermentation dure 1 à 2 jours. La productivité atteinte est comprise entre 1 et 3g/l.h. Les

rendements de conversion du glucose en acide lactique et en biomasse sont respectivement de 90% et moins de 15%. En fin de fermentation, la concentration résiduelle en glucose est de l'ordre de 1g/l.

Le **tableau I.4** résume les performances des fermentations lactiques relevées dans la littérature selon différents modes de culture. En culture discontinue, les productivités obtenues sont inférieures ou égales à 5g/l.h (MEHAIA et CHERYAN, 1987a). Par contre, la concentration finale en acide lactique peut atteindre des valeurs élevées. MEHAIA et CHERYAN (1987 b) obtiennent pour une culture discontinue de *L. bulgaricus* sur lactosérum une concentration en acide lactique de 115g/l.

En culture continue, malgré une faible concentration en biomasse, la productivité est améliorée par rapport à une culture discontinue. Ainsi, ROY et coll. (1987) obtiennent avec *L. helveticus* une productivité de 9,7g/l.h pour une concentration en biomasse de 4g/l.

L'immobilisation de *L. casei* (TULI et coll., 1985) dans des cubes de gel, ou le confinement de *L. bulgaricus* dans un réacteur à fibres creuses (MEHAIA et CHERYAN, 1987a) ne permettent pas d'atteindre des productivités supérieures à 2g/l.h.

Ces techniques se heurtent en effet à des problèmes de limitations diffusionnelles du substrat vers les cellules. Par contre, ANDREWS et FONTA (1989), en réacteur à lit fluidisé avec *S. cremoris* immobilisé sur des particules de carbone, parviennent à obtenir grâce à de très forts débits, une productivité de 12g/l.h.

La mise en œuvre des bactéries lactiques en bioréacteurs à membrane permet d'augmenter considérablement la concentration cellulaire et les productivités. Ainsi, OHLEYER et coll. (1985a) obtiennent jusqu'à 140g/l de biomasse et une productivité de 160g/l.h en cultivant *L. belbrueckii* en recyclage cellulaire.

D'autres procédés utilisent des réacteurs à 3 étages. *S. cremoris* (MULLIGAN et coll., 1991) et obtiennent des productivités d'acide lactique sur lactosérum de 6g/l.h dans le premier étage, de 4,4g/l.h dans le deuxième et 2,4g/l.h dans le dernier.

Mode de culture	Microorganisme	Substrat	Xmax (g/l)	Lactate (g/l)	Productivité (g/l.h)	Références
discontinu	<i>L. bulgaricus</i>	lactose*	-	45	3 - 5	MEHAIA et CHERYAN (1987 a)
	<i>L. bulgaricus</i>	lactose*	8	115	5	MEHAIA et CHERYAN (1987 b)
	<i>L. delbrueckii</i>	glucose	-	45	1 - 2	LUEDERING et PIRET (1959 a)
fibres creuses	<i>L. bulgaricus</i>	lactose*	> 100	12	2	MEHAIA et CHERYAN (1987 a)
continu	<i>L. delbrueckii</i>	glucose	4	25,5	8,93	MAJOR et BULL (1985)
	<i>L. helveticus</i>	lactose*	-	30	9,7	ROY et GOULET (1987)
immobilisation	<i>L. casei</i>	lactose*	-	33	0,5	TULI et coll. (1985)
	<i>L. delbrueckii</i>	glucose	-	46	3	STEENROOS et coll. (1982)
	<i>St. thermophilus</i>	glucose	-	3,3	12	ANDREWS et FONTA (1989)
CRC	RT <i>L. casei</i>	glucose	66	27	10	HJÓRLEIFSDÓTTIR et coll. (1990)
	RT <i>L. delbrueckii</i>	glucose	140	57	160	OHLEYER et coll. (1985 a)
	RP <i>L. bulgaricus</i>	lactose*	63	117	84	MEHAIA et CHERYAN (1987 b)

CRC : continu avec recyclage cellulaire, RT : recyclage total, RP : recyclage partiel.

* milieu à base de lactosérum

Tableau I.4 : Performances des fermentations lactiques selon le mode de culture

Souches	Substrats	Ac. lactiq.	Extraction	Caractéristiques	Références
Bacilles Bactères Microcoques Bréviactères	lactonitriles	L(+) et D(-)	nd	RAS	COMMEYRAS et coll., 1973
Lactobacilles	lactosérum	nd	ultrafiltration échangeuse d'ions	30 à 70g/l de lactose	HOFMAN 1987
Lactobacilles Streptocoques Pediocoques	amidon	L(+) et D(-)	nd	Hydrolyse enzymatique et bactérie. 135g/l d'amidon; 123,3 d'AL en 45h et 2,74g/l.h	SCHNEIDER et LAMONERIE, 1989
Lactobacilles	lactosérum	nd	ultrafiltration électrodialyse	fermentation continue	PRINGENT 1983
Bacilles	glucose	nd	ultrafiltration reverse osmose électrodialyse	60 g/l de glucose fermentation continue	VAN NIPSEN et GERARDER 1989
<i>L. italicus</i>	maltose glucose	L(+) et D(-)	nd	RAS	KENICHIRO ISUMI, 1983
<i>L. bulgaricus</i>	lactose	D(-)	nd	RAS	VERINGA, 1986
<i>Bacillus coagulans</i>	saccharose glucose	L(+)	nd	190g/l de glucide 140g/l d'AL, 50°C, en 39h	KIRKOVITS et EDLAUER, 1990
<i>L. casei</i>	glucose	L(+)	nd	désagrégation mécanique de levure fraîche	COOPER et coll. 1982
<i>L. lactis</i>		D(-)			
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> (Lactobacilles)	glucose (monoses et diholosides)	D(-)	nd	99% pureté, 200g/l de glucose, 128g/l d'AL en 50h	KOSAKI et KAWAI, 1986
<i>L. acidophilus</i>	saccharose lactose fructose dextrose	nd	électrodialyse échangeuse d'ions filtration	fermentation continue	GLASSNER et DATTA, 1990
<i>Rhizopus oryzae</i>	glucose	L(+)	acidification précipitation déméralisation décoloration	RAS	SNELL et coll. 1962
<i>L. bulgaricus</i>	lactose (lait) glucose	D(-)	échangeuse ion	selection souches aux forte concentrations de glucose	VOELSKOW et SUKATSCH, 82
nd	nd	nd	estérification distillation déshydratation	utilisé pour le lactate d'ammonium des jus de fermentation	WALKUP et coll., 1991

Tableau I.5 : Principaux brevets se reportant à la fermentation et procédé d'extraction de l'acide lactique (nd : non déterminé; RAS : rien à signaler)

2.4. Brevets appliqués à la bioproduction et l'extraction d'acide lactique

L'ensemble des brevets déposés au niveau national, européen ou international (tableau I.5) résume des travaux se reportant à la souche utilisée, au substrat à transformer ou au système de purification employé.

Les souches utilisées font parties des bactéries lactiques. Les genres de bactéries les plus productrices sont des lactobacilles (HOFMAN, 1987; PRINGENT, 1983) puis viennent les streptocoques (SCHNEIDER et LAMONERIE, 1989) et les bacilles (COMMERYRAS et coll., 1973; VAN NIPSEN et JONKER, 1989). Parmi les lactobacilles, nous avons plus particulièrement *L. bulgaricus* (VOELSKOW et SUKATSCH, 1982; VERINGA, 1986), *L. lactis*, *L. casei* (COOPER et coll., 1982), *L. acidophilus* (GLASSNER et DATTA, 1990) et *L. italicus* (KENICHIRO et ISUMI, 1983).

En ce qui concernent les substrats, le plus couramment utilisé est le glucose. Très peu de diholosides comme le saccharose (KIRKOVITS et EDLAUER, 1990), la maltose (KENICHIRO et ISUMI, 1983) ou le lactose issu de lactosérum (PRINGENT, 1983) sont utilisés comme source de carbone.

La forme isomérique de l'acide lactique obtenue est variable suivant les bactéries. Le produit final est soit une des formes L(+) ou D(-) (COOPER et coll., 1982) ou bien un mélange racémique (KENICHIRO et ISUMI, 1983).

Les systèmes d'extraction et de purification sont peu variables d'un brevet à l'autre. Trois modes de récupération d'acide lactique sont définis. La première, la plus ancienne et moins coûteuse, utilise le caractère peu soluble du lactate de calcium (SNELL et LOWERY, 1962). D'autres, plus modernes et plus coûteuses, font appel aux systèmes d'électrodialyse, d'ultrafiltration, d'osmose inverse et de colonne échangeuse d'ions. Un dernier système récupère le lactate d'ammonium par une voie chimique plus classique comme l'estérification, la distillation et la déshydratation (WALKUP et coll., 1991).

3. LE METABOLISME CELLULAIRE

De nombreuses études physiologiques ont contribué à la connaissance du métabolisme des bactéries lactiques; nous allons dans ce paragraphe en résumer les principaux points qui caractérisent *Lactobacillus casei* subsp *ramnosus*.

3.1. Les microorganismes

L. casei subsp. *ramnosus* se présente sous la forme de bâtonnet immobile de 1X3µm environ, ayant tendance à former des chaînettes. Comme tous les lactobacilles, ce

sont des bactéries à coloration gram positif, non sporulantes, microaérophiles, ne possédant ni catalase ni cytochrome oxydase. C'est une espèce hétérofermentaire facultatif (groupe II des lactobacilles, selon le BERGEY'S manual), produisant essentiellement du L-lactate à partir de nombreux sucres dont le lactose, le glucose et le rhamnose. La sous espèce *rhamnosus* a la particularité de bien pousser de 15 à 45°C (KANDLER et WEISS, 1986).

3.2. L'énergétique cellulaire

L. casei subsp. *rhamnosus* comme toutes les autres espèces de bactéries lactiques, tire son énergie de la dégradation des sucres par la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof. Nous allons voir les différentes étapes qui caractérisent la production d'énergie à partir du lactose chez *L. casei*.

3.2.1. Transport du lactose

Le transport de lactose à l'intérieur de la cellule se fait par l'intermédiaire de deux systèmes différents (POOLMAN, 1993).

Le premier, et le plus simple (**figure I.4a**), utilise des perméases laissant passer le lactose à travers la paroi et la membrane bactérienne.

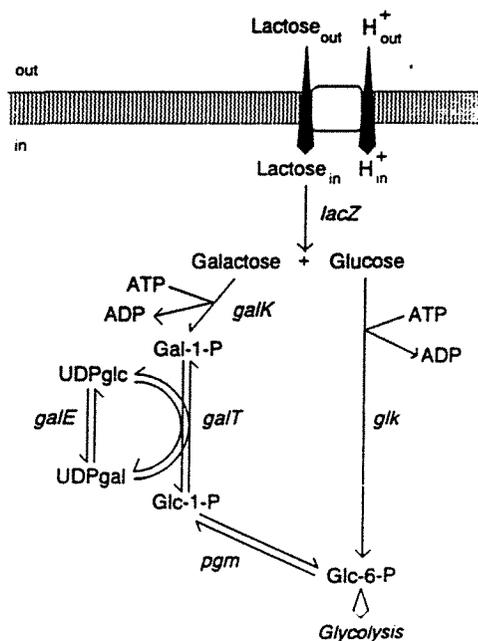
La deuxième, plus complexe (**figure I.4b**), fait appel lors du transport du lactose à une phosphorylation. Le phosphoénolpyruvate (PEP) est le premier donneur de phosphate.

Le transport est assuré par une chaîne d'enzymes : système phosphotransférase (PTS) (ROMANO et coll., 1979; HICKEY et coll., 1986, DESMAZEAUD, 1991).

La régulation du système PEP-PTS s'opère par l'intermédiaire de la concentration en phosphate inorganique (Pi) et en fructose diphosphate (F-1,6diP), respectivement effecteurs négatif et positif de la pyruvate kinase (enzyme contrôlant la transformation du PEP en pyruvate dans la glycolyse) (THOMPSON, 1987). Il existe donc un lien étroit entre le transport et le métabolisme ultérieur.

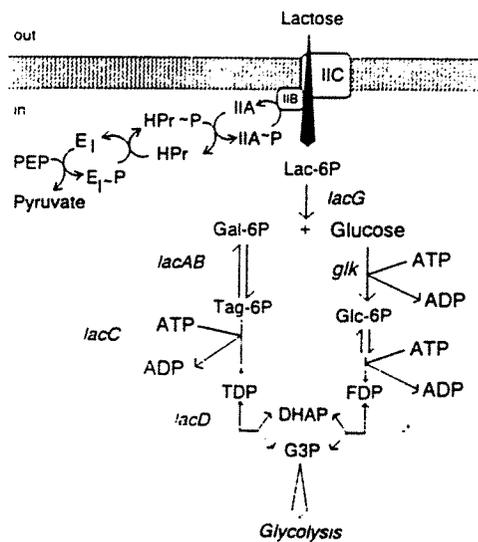
3.2.2. Métabolisme du lactose (figure I.5)

La fermentation des sucres par des bactéries lactiques aboutit principalement à la production d'ATP et d'acide lactique (plus de 85%) pour les homofermentaires et à la production d'ATP, d'acide lactique (50%), d'acétate, d'éthanol et de CO₂ pour les hétérofermentaires (ROISSART, 1986).



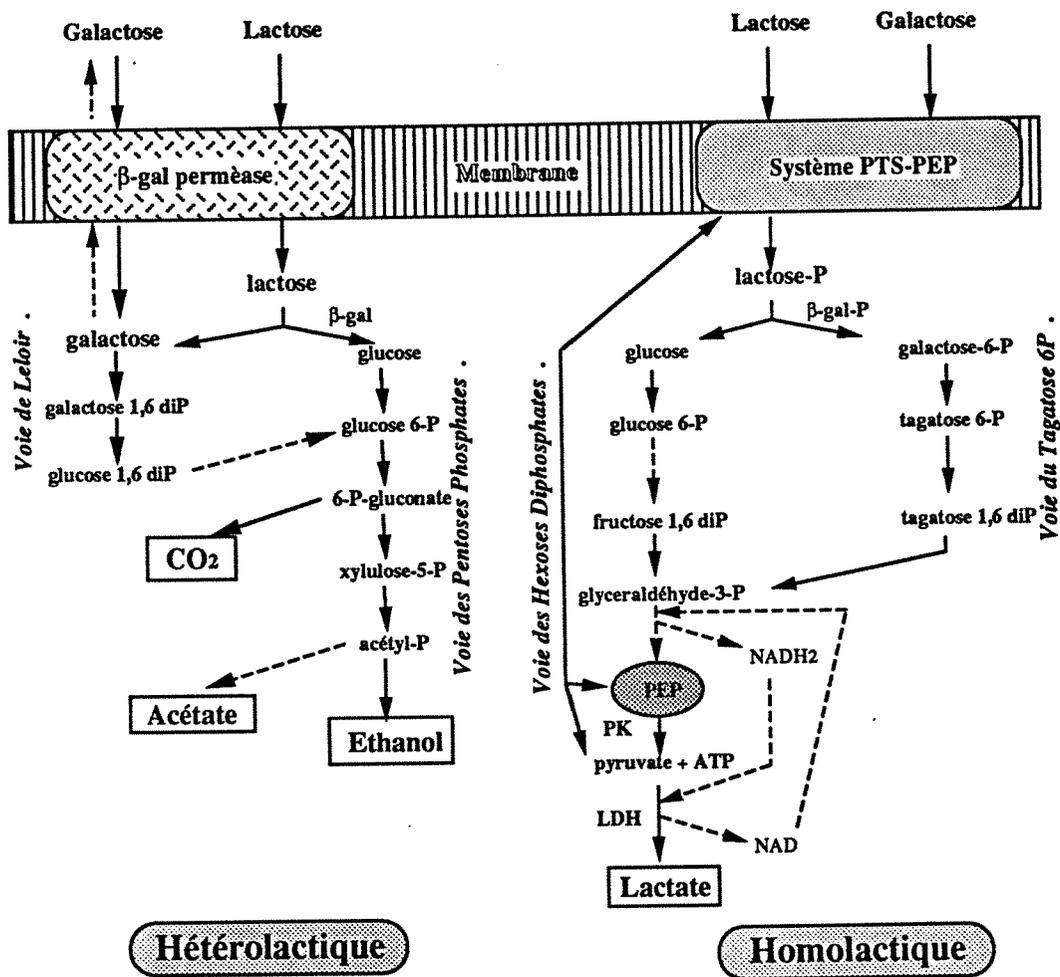
Galactoside-H⁺ symport and Leloir pathway. *lacZ*, β-galactosidase; *galK*, galactokinase; *galT*, UDPglucose : galactose 1-phosphate uridylyl transferase; *galE*, UDPglucose 4-epimerase; *pgm*, phosphoglucomutase; *glk*, glucokinase.

Figure I.4a : Transport du lactose dans la cellule lié au système perméasique (POOLMAN, 1993)



Lactose-PTS and tagatose 6-phosphate pathway. *lacG*, phospho-β-galactosidase; *lacAB*, galactose 6-phosphate isomerase; *lacC*, tagatose 6-phosphate kinase; *lacD*, tagatose 1,6-diphosphate aldolase; *glk*, glucokinase.

Figure I.4b : Transport du lactose dans la cellule lié au système PEP-PTS (POOLMAN, 1993)



(β gal : β galactosidase; PK : pyruvate kinase; LDH : lactate déshydrogénase)

Figure I.5 : Transport et métabolisme homofermentaire et hétérofermentaire du lactose et galactose chez les bactéries lactiques (ROISSART, 1986)

La molécule de lactose est coupée en deux pour former du glucose et du galactose par la β galactosidase (β gal). Le glucose est phosphorylé par la glucokinase qui joue un rôle majeur dans le mécanisme intracellulaire et qui est dépendante de l'ATP. Le glucose-6P emprunte la voie de la glycolyse tandis que le galactose-P la rejoint ultérieurement par la voie du tagatose. Ces réactions peuvent se séparer en deux groupes du glucose-6P aux trioses P d'une part et des trioses P à l'acide pyruvique d'autre part.

L'action de la phosphohexose-isomérase est régulée selon le mode allostérique. Elle est inhibée par l'ATP et le citrate, tandis que l'AMP et le Pi lèvent l'inhibition.

La transformation du 3P glycéraldéhyde en acide pyruvique est catalysée par la 3P-glycéraldéhyde déshydrogénase NAD^+ -dépendante, et par une kinase qui conduit à la formation d'énergie.

La pyruvate kinase, activée par le fructose 1-6 diP, favorise la formation d'ATP et la libération d'acide pyruvique.

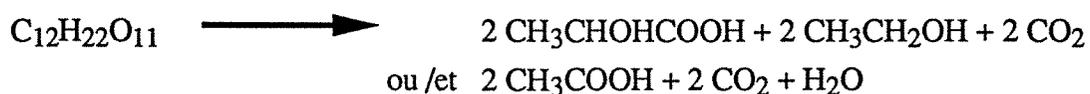
Enfin en anaérobiose, l'acide pyruvique est réduit en acide lactique par la lactate déshydrogénase NADH dépendante. Elle est activée en présence de tampon phosphate et de fructose 1-6 diP (ROISSART, 1986). En fait, cette dernière étape s'avère utile pour régénérer le NAD^+ en NADH qui est utilisé pour la déshydrogénation du glycéraldéhyde-3P. Encore une fois, les gènes codant pour les enzymes des différentes voies métaboliques ont été caractérisés par POOLMAN (1993).

La réaction globale pour une bactérie homofermentaire est la suivante :



Quant aux bactéries hétérofermentaires, elles possèdent une activité pour les enzymes clés de la voie des hexoses monophosphates. Le glucose-6P est transformé en acide 6P-gluconique puis décarboxylé en xylulose-5P avec libération de CO_2 . Ce pentose-P est alors métabolisé en glycéraldéhyde-3P et en acétyl-P et ce dernier en éthanol ou/en acétate.

Pour une bactérie hétérofermentaire la réaction globale est décrite comme suite :



3.2.3. Voie glycolytique d'Embden-Meyerhof (figure I.6)

Les réactions qui produisent l'ATP sont catalysées par la phosphoglycéril kinase et le PEP. Elles permettent la production de 8 moles d'ATP par mole de lactose consommée. Deux molécules d'ATP étant utilisées, l'une pour la formation du glucose-6-P, l'autre pour la formation du F-1,6diP. Or comme le lactose est un diholoside de fructose et de glucose, le gain et la perte d'ATP sont multipliés par deux. Il en résulte donc un surplus de 4 molécules d'ATP par molécule de lactose métabolisée.

Il est à noter que l'oxydation complète d'une molécule de glucose (avec l'oxygène comme accepteur terminal d'électron) fournit 36 molécules d'ATP par molécule de glucose, soit 18 fois plus qu'en anaérobiose. Ceci explique la nécessité pour un microorganisme tel que *L. casei* à consommer rapidement le lactose afin de produire de l'énergie.

Une étape clé de la fermentation est la déshydrogénation du glycéraldéhyde-3-phosphate. Cette réaction, catalysée par la triose-phosphate déshydrogénase, utilise le NAD^+ comme accepteur d'électron. La glycolyse ne peut donc se poursuivre que si le NADH formé est retransformé en NAD^+ . Ceci est possible par la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique, ce qui constitue l'accepteur final d'électrons. Cette réaction est catalysée par une enzyme clé, la lactate déshydrogénase (LDH).

Les LDH bactériennes ont été longtemps étudiées (GARVIE, 1980). Chez *L. casei*, la lactate déshydrogénase est allostérique (KANDLER et WEISS, 1986). Elle est fortement activée par le F-1,6diP (WOLLIN, 1964), et l'ion Mn^{2+} exerce en combinaison avec le F-1,6diP, une action positive sur son activité (HENSEL et coll., 1977). La LDH de *L. casei* est par contre fortement inhibée par l'ATP et l'ADP. Le pH optimum de la L(+)-LDH chez *L. casei* est compris entre 5 et 6 (STETTER et KANDLER, 1973).

3.2.4. Productions de métabolites

L'acide lactique produit par les bactéries lactiques résulte de la fermentation d'une source carbonée. Nous pouvons le considérer, par conséquent, comme un des produits du métabolisme énergétique cellulaire. Nous distinguons deux types de fermentations lactiques : la fermentation homolactique (groupe I) où l'acide lactique représente plus de 85% du lactose consommé et la fermentation hétérolactique (groupe III) où celui-ci ne représente plus que

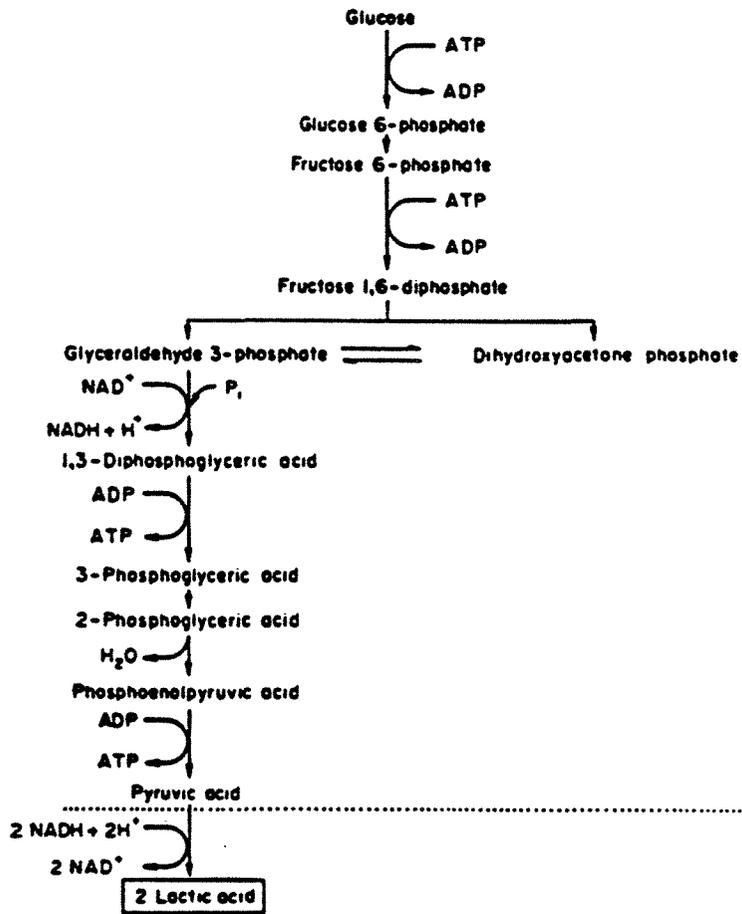


Figure I.6 : Voie glycolytique d'Embden-Meyerhof (MORRIS, 1985)

50% du lactose métabolisé, les autres produits formés étant le dioxyde de carbone, l'éthanol, l'acétate et le formate (MORRIS, 1985). Certaines bactéries lactiques peuvent produire les deux isomères optiques de l'acide lactique. *L. casei*, longtemps considéré comme producteur exclusif de L(+) lactate, peut synthétiser de faibles quantités de D(-) lactate (GARVIE, 1980; HJÖRLEIFSDOTTIR et coll., 1990). DEMOSS et coll. (1951) montrent que les espèces hétérofermentaires de bactéries lactiques ne possèdent pas d'aldolase et ne peuvent donc pas scinder le fructose 1,6-diP en trioses phosphates. Elles empruntent une voie différente, la voie des pentoses phosphates qui aboutit à la formation d'éthanol et de CO₂ en plus du lactate. Cette voie est énergétiquement moins intéressante puisqu'elle ne permet la formation que d'une seule molécule d'ATP.

Certaines bactéries lactiques, les bactéries hétérofermentaires facultatives (du groupe II dont *L. casei* fait partie) peuvent également, dans certaines conditions, avoir un comportement hétérofermentaire. Les voies empruntées sont cependant différentes de celles précédemment décrites. Ainsi DE VRIES et coll. (1970) notent chez *L. casei*, une production d'acétate, d'éthanol et de formate en chemostat à un faible taux de dilution en limitation de glucose. Dans ce cas, le pyruvate est décomposé en formiate et en acétate par une pyruvate lyase. DE VRIES et coll. (1970) constatent en outre que le rendement de conversion du glucose en biomasse est, dans ce cas, supérieur à celui obtenu dans une culture où le glucose est en excès. Les mêmes constatations sont faites par THOMAS et coll. (1979) chez *S. lactis*.

D'autres modifications de l'environnement telle qu'une augmentation de pH (RHEE et PACK, 1980) peuvent provoquer les mêmes changements de métabolisme. Dans le cas de *L. casei*, on note parfois une production de D(-) lactate dans des conditions de limitation en source de carbone (GARVIE, 1980; HJÖRLEIFSDOTTIR et coll., 1990).

Certaines bactéries lactiques produisent également des molécules ayant une activité bactéricide ; les bactériocines (FERNANDES et coll., 1987). Ces substances de structure complexe possèdent une fraction protéique active qui leur confère un pouvoir antibiotique très spécifique. Ainsi UPRETI et HINDSILL (1973) ont mis en évidence chez une souche de *L. casei* la production d'une bactériocine (appelée lactocine) active sur une autre espèce de *L. casei* ainsi que sur *L. helveticus*.

COMPOSES	CONCENTRATION (g/l)
----------	---------------------

ACIDES, SUCRE et SELS

Acétate de potassium	10
D-glucose	10
Dihydrogène de potassium	
Orthophosphate	2
Thioglycolate de sodium	0,50
Citrate de sodium, 2H ₂ O	0,20
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,15
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,02
Sulphate ferreux, 7H ₂ O	0,01
Tween 80	1,10

ACIDES AMINES

Acide L gluconique	0,15
Alanine	0,20
Arginine HCl	0,005
Asparagine	0,20
Cystéine HCl	0,20
Phénylalanine	0,04
Histidine HCl	0,05
Isoleucine	0,05
Leucine	0,06
Lysine HCl	0,05
Méthionine	0,05
Proline	0,04
Sérine	0,10
Tyrosine	0,004
Thréonine	0,05
Tryptophane	0,05
Valine	0,03

BASES

Adénine	0,05
Acide cytidylique	0,05
Désoxyguanosine	0,05
Guanine HCl	0,05
Thymidine	0,05
Uracile	0,05

VITAMINES

Acide p-aminobenzoïque	0,00001
Vitamine B12	0,000001
Biotine	0,00001
Pantothénate de calcium	0,001
Acide folique	0,0001
Niacine	0,001
Pyridoxale éthyl acétate	0,0005
Riboflavine	0,0005
Thiamine	0,001

Tableau I.6 : Composition d'un milieu synthétique pour culture de lactobacilles
(LEDESMA et coll., 1977)

3.3. Nutrition (tableau I.6)

Les bactéries lactiques sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnel. Elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance et des oligo-éléments. Les "sucres" servent le plus souvent aux bactéries lactiques, à la fois comme source d'énergie et comme source de carbone. Ceci rend parfois difficile la distinction dans une culture entre une limitation "énergétique" et "carbonée" (OTTO et coll., 1983).

3.3.1. La nutrition azotée

Les bactéries lactiques sont en principe incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés et doivent par conséquent, faire appel à des sources exogènes pour assurer ce métabolisme. Les besoins en acides aminés de *L. casei* ne sont pas encore parfaitement définis. Selon DESMAZEAUD (1983), cette souche a surtout besoin de sérine et de thréonine pour croître, alors que selon KOSER et THOMAS (1955) ainsi que LEDESMA et coll (1977), les acides aminés essentiels sont l'acide glutamique, la leucine et la valine (tableau I.6). Certaines bactéries lactiques (comme *St. brevis*) peuvent assimiler les ions ammonium sous forme de glutamate, par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase (MOAT, 1985).

Les bactéries lactiques synthétisent des protéinases et des peptidases extracellulaires, fixées aux enveloppes cellulaires, leur permettant de dégrader des protéines du milieu de culture. EL SODA et DESMAZEAUD (1981) mettent en évidence chez *L. casei* une endopeptidase liée aux ribosomes qui hydrolyse les substrats de la chymotrypsine. De même chez *L. casei*, une carboxypeptidase intracellulaire capable de libérer de l'arginine en position COOH terminale a été isolée (EL SODA et coll., 1983).

De nombreux auteurs (OHLEYER et coll., 1985b ; ROY et coll., 1986; AESCHLIMANN, et VON STOCKAR, 1990) constatent que l'ajout d'extrait de levure dans un milieu de culture, améliore la croissance et la production d'acide lactique chez les lactobacilles. Il apparaît que l'extrait de levure apporte à la fois des nutriments azotés et des facteurs de croissance.

3.3.2. Les facteurs de croissance et les minéraux

Le tableau I.7 montre les exigences vitaminiques de *L. casei* (LEDESMA et coll., 1977; ROGOSA et coll., 1961; KOSER et THOMAS, 1955). L'acide folique, la niacine, le pantothénate et la riboflavine semblent être les principaux besoins vitaminiques de *L. casei*.

<i>auteurs</i>	Tucuman	Rogosa et coll. (1961)	Koser (1968)
Biotine	N	N	E
Acide folique	N	E	E
Niacine	N	E	E
Pantothénate	N	E	E
Pyridoxal	N	E,S	E,S
Riboflavine	N	E	E
Thiamine HCl	N	N	N
Vitamine B12	N	N	N

(E : essentiel; N: non essentiel; S : stimulateur)

Tableau I.7 : Exigences vitaminiques de *L.casei* (LEDESMA et coll., 1977)

Cependant, LEDESMA et coll (1977) notent que ces besoins peuvent être comblés par d'autres apports. Ainsi, ces auteurs montrent que l'apport en Tween 80 supprime les besoins en biotine de la souche. Chez *L. casei*, certains peptides dit "peptides facteurs de croissance" stimulent la croissance de cette souche (DESMAZEAUD, 1983).

Peu d'études se rapportent au rôle global des métaux dans la nutrition des bactéries lactiques. Il est cependant montré que les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} (DE MAN et coll., 1960; TULI et coll., 1985) ainsi que le Fe^{2+} (LEDESMA et coll., 1974) ont un effet positif sur la croissance et la production d'acide lactique chez les lactobacilles.

3.3.3. L'influence de l'oxygène sur la croissance

On considère généralement les bactéries lactiques comme des germes anaérobies facultatifs, ayant une préférence pour les conditions anaérobies. En présence d'oxygène, la croissance des bactéries lactiques est généralement ralentie par la production d'eau oxygénée. Chez les lactobacilles, l'enzyme responsable de la formation de l'eau oxygénée serait une pyruvate oxydase (ROISSART, 1986). Bien que ne possédant pas de catalase, les bactéries lactiques possèdent leur propre moyen de défense contre l'effet toxique de l'eau oxygénée. Citons notamment la peroxydase flavinique présente chez les lactobacilles mésophiles qui utilise le NADH pour réduire l'eau oxygénée ou encore, l'accumulation des ions Mn^{2+} chez *L. plantarum* qui en s'oxydant font disparaître les radicaux libres de l'oxygène (ROISSART, 1986).

3.4. L'influence du pH et de l'inhibition lactique

Au cours d'une fermentation lactique le pH a tendance à diminuer. Chez les lactobacilles la fermentation est stoppée lorsque le pH atteint la valeur de 4. Le pH optimal de croissance des lactobacilles se situe selon les espèces entre 4,5 et 6,4 (KANDLER et WEISS, 1986). Les cultures en fermenteur de *L. casei* sont généralement régulées à un pH compris entre 5,5 et 6,5 (TULI et coll., 1985; HJÖRLEISFDOTTIR et coll., 1990; TACHIKAWA et coll., 1988). AESCHLIMANN et VON STOCKAR (1989) étudient l'influence du pH sur les performances d'une culture en continue de *L. helveticus*. Ils obtiennent des concentrations maximales en biomasse et en acide lactique pour un pH de 5,5. KELLER et GERHARDT (1975) constatent pour une culture en continue de *L. bulgaricus*, qu'une augmentation de pH de 5,5 à 6 entraîne une diminution de la concentration en substrat dans le fermenteur.

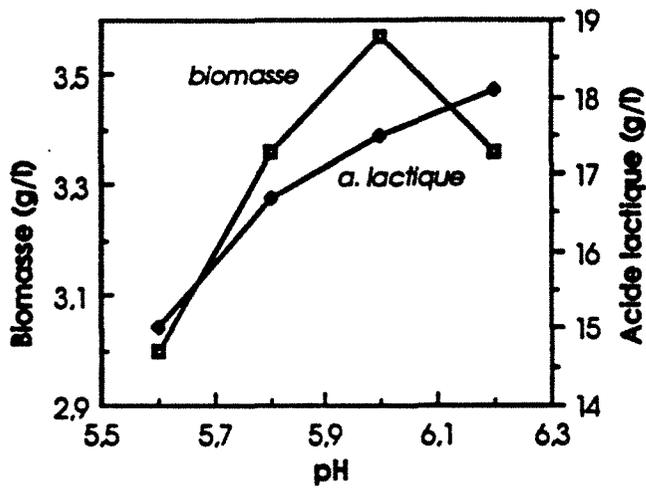
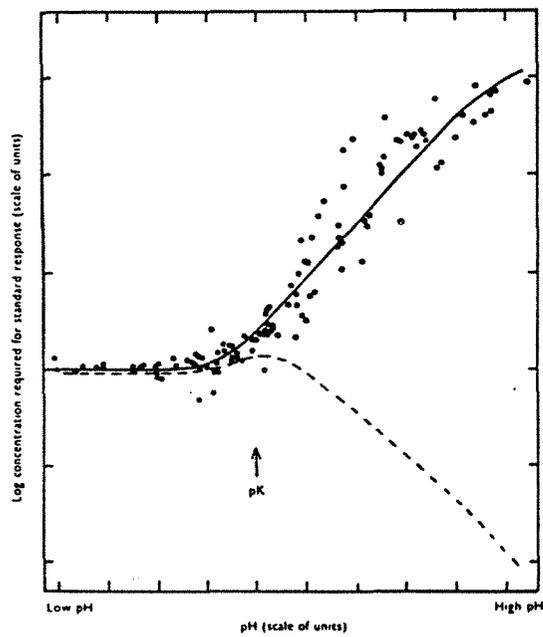


Figure I.7 : Influence du pH sur les concentrations en biomasse et en acide lactique à l'état stationnaire (ALTABA, 1991)



(— : concentration totale en acide; - - - - : concentration en acide non dissocié)

Figure I.8 : Effet du pH sur la concentration en acide faible nécessaire pour provoquer une réponse standard des organismes testés (SIMON et BREVERS, 1952)

Une même augmentation de pH provoque chez *L. delbrueckii* une baisse du taux de croissance (LUEDEKING et PIRET, 1959 b) ainsi que la vitesse spécifique de production d'acide lactique (KEMPE et WEST, 1959).

Les travaux de ALTABA (1991), réalisés sur *L. casei*, montrent que le pH compris entre 5,8 et 6,2 ne provoque pas de grands changements dans les résultats de la fermentation. Alors que pour un pH de 5,6, la concentration en biomasse et en acide lactique chutent légèrement (figure I.7).

Le pH semble également avoir une influence sur le comportement fermentaire des bactéries lactiques. Ainsi RHEE et PACK (1980) constatent chez *L. bulgaricus*, après une augmentation de pH, le passage d'un métabolisme homofermentaire à un métabolisme hétérofermentaire (production de formate, d'acétate et d'éthanol). Corrélativement, ces auteurs observent une diminution de la production de LDH.

Dès 1928, ROGERS et WHITTIER remarquent une meilleure croissance de *S. lactis* à pH régulé (entre 5,8 et 6) que sans régulation de pH. Ces auteurs concluent à une inhibition conjointe des ions hydrogène (chute du pH) et de la forme non dissociée de l'acide lactique. En effet, l'acide lactique a un pKa de 3,86 (dans les conditions standard), la concentration en forme non dissociée est d'autant plus forte que le pH est bas. SIMON et BEEVERS (1952), dans une étude très vaste sur l'effet des acides faibles sur différents organismes vivants, montrent qu'en dessous du pKa, le pH n'a que très peu d'effet sur la réponse d'un organisme et, qu'au delà, la réponse est proportionnelle à la quantité d'acide non dissocié (figure I.8).

Selon ces auteurs, les deux formes de l'acide sont actives, mais seule la forme protonée peut traverser la membrane. Par un système couplé de fermentation-dialyse, permettant de retirer au fur et à mesure de sa production une partie de l'acide lactique formé, FRIEDMAN et GADEN (1970) mettent clairement en évidence, chez *L. delbrueckii*, le rôle inhibiteur de l'acide lactique sur la croissance, comme sur la vitesse spécifique de production de l'acide lactique.

Plus récemment, il a été montré que le pH influençait la vitesse de croissance des bactéries et que la concentration en lactate non dissocié influençait les rendements de conversion du substrat en biomasse et en produit, ainsi que le rendement en ATP, la vitesse de croissance et la productivité (GIRAUD et coll., 1991; CÄTJE et GOTTSCHALK, 1990; GONCALVES et coll., 1991) (tableau I.8a et b).

pH	μ (h-1)	YX/S(g/g)	YP/S(g/g)	Productivité(g/l.h)
4,00	0,19	0,27	0,74	0,29
5,00	0,46	0,25	0,7	0,77
6,00	0,57	0,22	0,75	1,05
7,00	0,52	0,26	0,81	1,04
8,00	0,29	0,18	0,81	0,52

Tableau I.8a : Influence du pH sur le taux de croissance, les rendements et la productivité (GIRAUD et coll., 1991)

Lactate	μ (h-1)	YX/S(g/g)	YP/S(g/g)	Productivité(g/l.h)
0	0,57	0,22	0,75	1,05
12	0,55	0,22	0,73	1,01
24	0,49	0,24	0,75	0,8
33	0,41	0,22	0,74	0,58
48	0,37	0,19	0,61	0,45
90	0,06	0,08	0,65	0,09

Tableau I.8b : Influence de la concentration en acide lactique dans le milieu sur le taux de croissance, les rendements et la productivité (GIRAUD et coll., 1991)

Enfin, l'équilibre chimique entre les formes dissociées et non dissociées de l'acide lactique, peut également être modifié par la température et la présence de bases inorganiques telles que le carbonate ou les hydroxydes de calcium ou de sodium (VINIEGRA et GOMEZ, 1984). KELLER et GERHARDT (1975) affirment qu'en culture discontinue, le lactate d'ammonium est plus inhibiteur que le lactate de calcium.

VICK ROY et coll. (1983) obtiennent de meilleurs résultats avec NH_4OH qu'avec NaOH et attribuent ceci à l'effet toxique de la soude à son point d'impact dans la culture. HONGO et coll. (1986) en accord avec les résultats expérimentaux de VICK ROY et coll. (1983), concluent pour leur part à une assimilation de NH_4OH comme source d'azote. SCHNEIDER et LAMONERIE (1989) annoncent une meilleure production de lactate en culture discontinue avec NH_3 et NH_4OH qu'avec NaOH et KOH .

L'acide lactique ajouté dans le milieu de culture n'a pas selon BIBAL et coll. (1988) le même effet inhibiteur sur *S. cremoris* que l'acide lactique produit. Ces résultats sont en accord avec ceux de GAILLARD (1988) pour *L. casei*, mais s'opposent aux résultats de TANIGUCHI et coll. (1987) obtenus sur *S. cremoris*. Il semblerait que la différence d'effet entre l'acide lactique ajouté et l'acide lactique produit soit due à la superposition d'un phénomène de carence nutritionnelle (BIBAL et coll., 1989a).

Il est généralement admis que les bactéries lactiques établissent et maintiennent un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu_{H^+}$), alcalin et négatif à l'intérieur, au travers de la membrane cytoplasmique (**figure I.9**). Le gradient est convertible en énergie par l'intermédiaire d'une ATPase (MICHELS, 1979).

Au cours de la fermentation, la bactérie lutte contre l'acidification du pH du milieu intracellulaire en refoulant les protons par l'intermédiaire de l'ATPase en consommant de l'ATP. Elle entretient ainsi le gradient de proton (ABRAMS et SMITH, 1974; BIKETOV et coll., 1982). Le pH intracellulaire des bactéries lactiques n'est pas régulé et celui-ci finit par atteindre le pH critique de 4,4 à partir duquel l'activité enzymatique intracellulaire est inhibée.

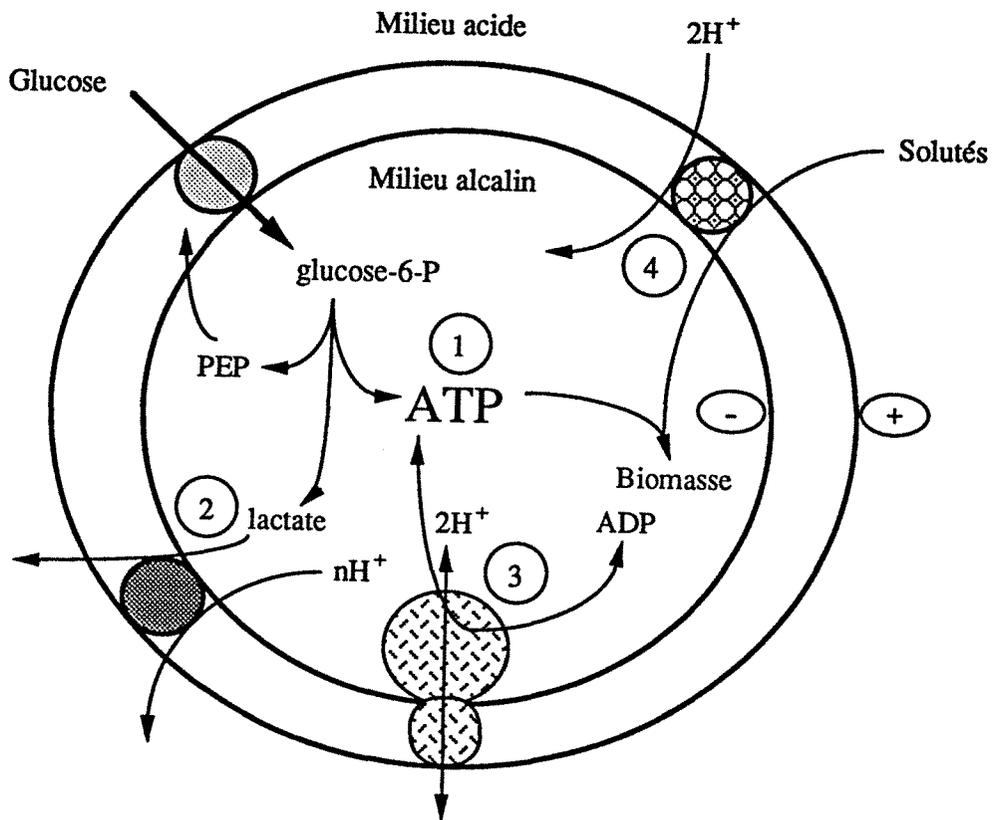
Par ailleurs, l'acide lactique en forte concentration perturbe les phospholipides membranaires et provoque des fuites de protons. Ce flux d'ions H^+ cause la chute du gradient de pH et la cellule meurt. En cas de limitation nutritionnelle, ce processus est accéléré par manque d'ATP (KASHKET, 1987).

BOOTH (1985) montre que l'entrée de nombreux solutés à l'intérieur de la cellule se fait avec une entrée concomitante de protons. De même, KONING (1985) et HAROLD et LEVIN (1974) ont mis en évidence un transport de lactate chez certains streptocoques (FIGURE). Le lactate pourrait ainsi être expulsé de la cellule avec un ou plusieurs protons. KONING (1985) constate qu'au cours de la croissance, le rapport de gradient de lactate sur la force proton motrice diminue. La diminution de ce rapport traduit une baisse de la stœchiométrie H^+ /lactate et indique donc une diminution de la contribution du flux de lactate à l'énergie métabolique.

4. LES PROCÉDES D'EXTRACTION DE L'ACIDE LACTIQUE

Le procédé de séparation et d'extraction doit tenir compte des caractéristiques biologiques, techniques et des facteurs économiques. Les techniques utilisées ne sont pas les mêmes en fonction de la pureté, de la nature du produit et surtout du coût de revient du produit sur le marché (DAMERVAL, 1992).

Les techniques d'extraction sont fort nombreuses, mais en réalité, très peu sont réellement compétitives. Les huit techniques les plus utilisées sont :



- (1) synthèse d'ATP à partir de substrat
- (2) couplage de la sortie des ions H^+ avec celles des ions lactates ($2H^+$ par lactate)
- (3) synthèse d'ATP réalisée tant que la concentration interne en lactate est plus élevée que la concentration externe
- (4) couplage de l'entrée de soluté avec entrée de protons (nH^+ par lactate)

Figure L9 : Schéma du processus de synthèse et d'utilisation de l'énergie chez les bactéries lactiques (KONINGS et OTTO 1983)

- * L'extraction liquide-liquide
- * La dialyse et l'électrodialyse
- * La cristallisation
- * La microfiltration et l'ultrafiltration
- * L'osmose inverse
- * Les techniques chromatographiques
- * La distillation
- * Les fluides supercritiques

Très souvent l'extraction et la purification nécessitent plusieurs de ces techniques couplées.

4.1. Extraction liquide-liquide

Cette technique est souvent utilisée pour la purification de molécules chimiques ou biomolécules (GERSON, 1988).

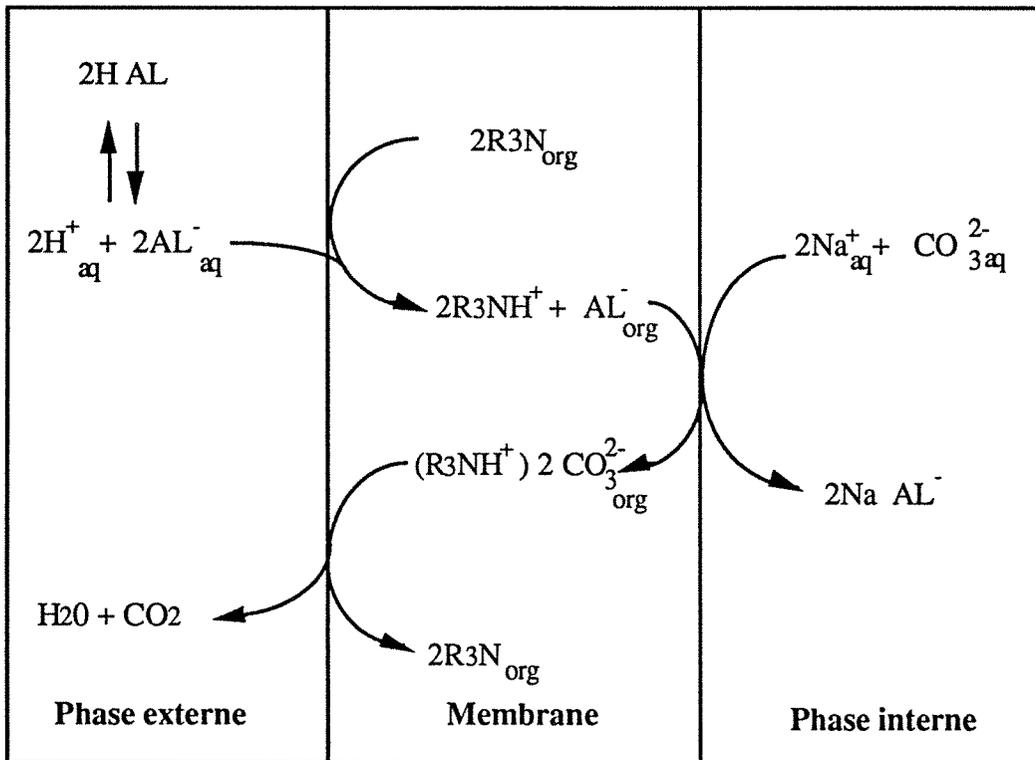
Les acides organiques, ayant plus d'affinité pour la phase aqueuse que pour la phase organique, sont facilement séparés du reste du milieu. Par exemple, l'huile de paraffine (HERRFURTH et HARTMEIER, 1991 ; SEEVARATNAM et coll., 1991) est utilisée avec des substances qui augmentent le pouvoir d'extraction (comme le kérosène ou l'alanine 336) (YABANNAVAR et WANG, 1991 ; FRIELING et coll., 1989) (figure I.10). Le problème majeur de ce procédé est que le solvant est toxique pour les microorganismes.

Certains auteurs ont dévié le problème en travaillant avec des cellules immobilisées (YABANNAVAR et WANG, 1991) ou un système à deux phases (KATZBAUER et coll., 1992).

D'autres ont choisi d'utiliser des cellules immobilisées avec l'extraction liquide-liquide pour récupérer l'acide lactique (CHAUDHURI et PYLE, 1993 ; SIRMAN et coll., 1991).

Enfin des résines de polymères solides (Bonopore) peuvent également augmenter l'efficacité d'extraction, mais augmentent aussi la toxicité sur les cellules libres (SEEVARATNAM et coll., 1991).

En résumé, l'extraction liquide-liquide est couramment utilisée pour la séparation de l'acide lactique, elle est souvent efficace et peu coûteuse, mais son extrapolation au stade industriel est difficile, le passage en mode continu est compliqué du fait de la toxicité du solvant sur les cellules.



(AL : acide lactique; R₃N : amine tertiaire; aq : aqueux; org : organique)

Figure I.10 : Schéma de l'extraction liquide - liquide de l'acide lactique
(SCHÖLLER et coll., 1993)

4.2. Dialyse et électrodialyse

Il est possible de séparer l'acide lactique (ou son sel) du milieu de culture par dialyse (gradient de concentration) et par électrodialyse (avec des membranes anioniques et cationiques, séparation par la charge et la taille de la molécule).

Cette dernière technique de séparation en fonction de la charge est souvent citée dans la littérature (CZYTKO et coll., 1987 ; YAO et TODA, 1990) (figure I.11). Elle permet de récupérer l'acide en continu et donc de diminuer ses effets inhibiteurs (NOMURA et coll., 1991).

Cette technique est associée à d'autres en raison de la diminution rapide du flux membranaire causée par le colmatage par la biomasse et les protéines. Ainsi, une ultrafiltration préalable du milieu de fermentation est nécessaire (PRIGENT et FRANCO, 1984, DE RAUCOURT et coll., 1989; VAN NIPSEN et JONKER, 1989; GLASSNER et DATTA, 1990). Cette méthode d'extraction est facilement réalisable en continu.

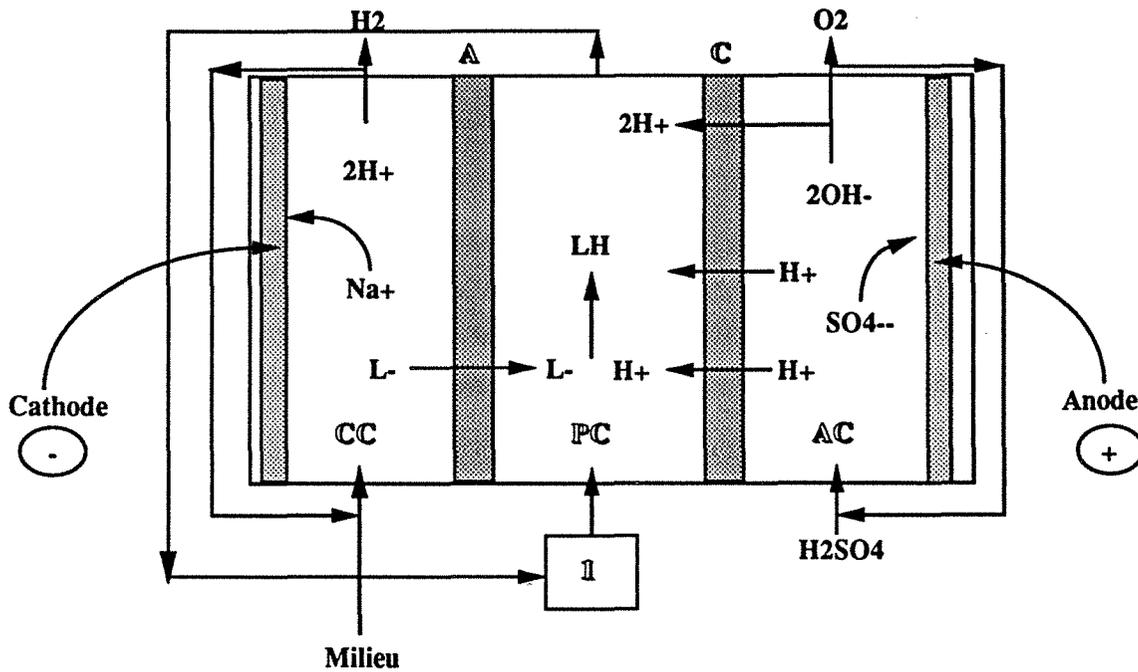
L'extraction de l'acide par dialyse a peu d'intérêt, car le lactose passe en même temps que l'acide et la productivité est très faible, ce qui nécessite d'avoir une surface considérable de membrane (STEIBER et GERHARDT, 1981).

Actuellement, l'électrodialyse coûte cher pour l'extraction de l'acide lactique. Les rendements de bioconversion sont faibles et le passage au stade pilote s'avère difficile.

4.3. Cristallisation

Le lactate de calcium a la propriété de cristalliser à faible température (entre 0°C et 50°C selon sa concentration). De ce fait, il est possible d'extraire le sel d'acide organique du reste du milieu en abaissant progressivement la température (INSKEEP, 1952).

C'est de loin, le système le moins coûteux actuellement. La société CCA Purac, qui est le leader européen pour la production de l'acide lactique par fermentation, semble utiliser cette technique pour récupérer le lactate de calcium à 180 g/l en fin de fermentation.



(1) : perméat de solution d'acide lactique (LH)
 A : membrane échangeuse d'anion
 C : membrane échangeuse de cation

CC : compartiment cathode
 PC : compartiment du perméat
 AC : compartiment anode

Figure I.11 : Schéma d'un électrolyseur à trois canaux pour l'extraction de l'acide lactique (YAO et TODA, 1990)

4.4. Microfiltration et ultrafiltration

Ces procédés interviennent généralement au début de l'extraction de l'acide lactique. Cela permet l'élimination ou le recyclage de la biomasse et la séparation du produit du milieu de fermentation (MEHAIA et CHERYAN, 1987b ; ALTABA, 1991) (figure I.12).

Mais l'extraction-purification de l'acide lactique nécessite d'autres étapes (DE RAUCOURT et coll., 1989), l'ultrafiltration seule ne peut suffire (HOFMAN, 1988). La microfiltration est souvent couplée avec l'électrodialyse ce qui améliore l'efficacité (NOMURA et coll., 1991). Cette technique est très souvent rencontrée dans les recherches et dans les procédés industriels pour des produits à très haute valeur ajoutée (produits pharmaceutiques).

L'ultrafiltration utilisée pour l'extraction de l'acide lactique semble être trop coûteuse actuellement .

4.5. Osmose inverse

En 1977, COX et MAC BEAN réalisent les premiers travaux d'extraction de l'acide lactique par osmose inverse. SCHLICHER et CHERYAN (1990) complètent ces mêmes travaux en utilisant différents types de membranes.

L'ensemble de ces recherches présente de nombreux inconvénients. Par exemple, la séparation lactose/acide lactique est faible (80% de réjection du lactose sur le jus de fermentation).

Quant au procédé, il nécessite plus de 40 bars de pression, d'où une installation coûteuse et une impossibilité de travailler en continu. Les pressions qui sont appliquées, ont pour conséquence d'éclater les cellules.

De plus, les protéines et les cellules colmatent rapidement la membrane de l'osmose inverse d'où une diminution du flux.

Encore une fois, le couplage avec l'ultrafiltration est nécessaire afin d'éliminer cellules et protéines libres du jus de fermentation, ce qui augmente de façon exorbitante le coût de ce système d'extraction. L'osmose inverse est utilisée néanmoins dans un brevet de VAN NIPSEN et JONKER (1989).

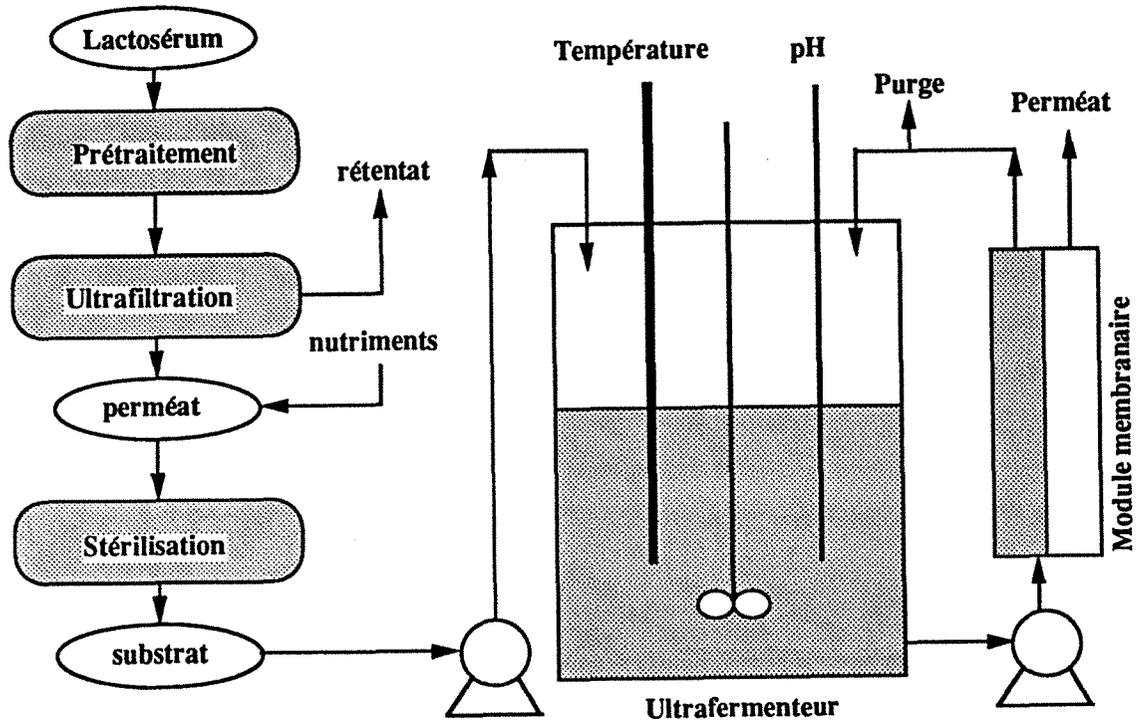


Figure I.12 : Schéma d'un fermenteur à recyclage cellulaire pour la bioconversion du lactosérum (MEHAIA et CHERYAN, 1987b)

4.6. Chromatographie

Les techniques chromatographiques sont moins rencontrées dans les procédés de purification de l'acide lactique. Mais là encore, elles ne peuvent être utilisées seules et généralement interviennent en dernier lieu dans le process (GLASSNER et DATTA, 1990).

La plupart du temps, il s'agit de chromatographie ionique basse pression (HOFMAN, 1988) (figure I.13).

Certains chercheurs montrent qu'il est possible de séparer l'acide lactique en continu par chromatographie couplée avec de l'électrodialyse (YEH et coll., 1989). L'institut des biotechnologies du Michigan a déposé un autre brevet en 1990 (GLASSNER et DATTA, 1990) qui allie précisément ces deux techniques.

D'autres auteurs ont montré qu'il était possible d'utiliser cette technique seule pour extraire l'acide lactique en continu à condition que la composition du milieu soit simple (SRIVASTAVA et coll., 1992).

En général, les techniques chromatographiques sont efficaces, mais difficiles d'utilisation industrielle, d'une part à cause de la complexité des milieux de départ et d'autre part à cause de la lenteur du procédé lui-même.

4.7. Distillation

L'acide L(+) lactique est difficilement distillable (point d'ébullition à 122°C). Une estérification, au préalable, avec un alcool donne un méthyle ou éthyle lactate et seulement ensuite la distillation est réalisée (point d'ébullition respectivement à 58 et 69°C). Cette technique est relativement simple à mettre en oeuvre et peu coûteuse comparée à celles décrites auparavant.

Mais comme à chaque fois, la distillation ne peut être utilisée seule (WALKUP et coll., 1991). Cristallisation et distillation sont couplées pour l'obtention d'acide lactique optiquement pur. Un brevet de Du Pont de Nemours (CROCKREM et JOHNSON, 1993) allie ces deux méthodes avec un réel succès.

Il est vrai que la distillation est actuellement bien maîtrisée, les coûts d'utilisation sont relativement faibles, ce qui en fait une technique économiquement viable pour la production d'acide lactique.

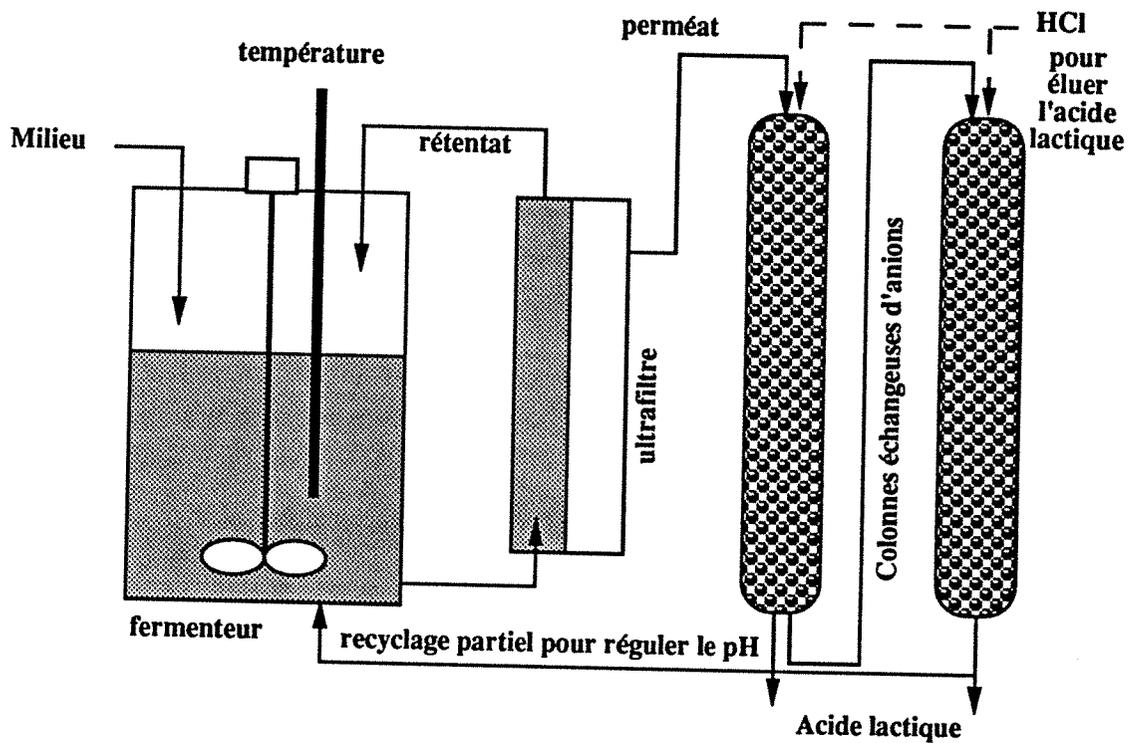


Figure I.13 : Schéma du procédé de fermentation continue couplé à un système d'ultrafiltration et de colonnes échangeuse d'ions (HOFMAN, 1987)

4.8. Fluides supercritiques

Il est possible actuellement d'extraire des biomolécules avec du dioxyde de carbone sous pression ou autres solvants dans des conditions supercritiques (KING et coll., 1987). Comme pour l'acide lactique, l'acide citrique est séparé de l'isocitrate ou d'un milieu par extraction au dioxyde de carbone dans des conditions supercritiques (DAMERVA, 1992).

Il est probable que cette technique sera testée pour l'extraction de l'acide lactique dans un proche avenir, mais l'extrapolation industrielle sera difficile à cause des hautes pressions en CO₂.

5. MODELISATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE

Actuellement, les modèles mathématiques sont utilisés pour l'interprétation des résultats expérimentaux, l'optimisation, l'extrapolation et l'automatisation des bioprocédés. L'objectif premier d'une modélisation est de pouvoir décrire les variations des concentrations en biomasse, substrat et production de métabolite en fonction des contraintes de culture. Avant toute modélisation il est nécessaire d'identifier les principaux phénomènes biochimiques, physiques influençant le comportement du système.

5.1. Définition

Nous avons deux types de modèles. Les premiers, dit modèles cinétiques ou non structurés sont les plus répandus. Ils utilisent les cinétiques microbiennes les plus classiques pour exprimer les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de substrat et de production de métabolites tout en faisant abstraction de la structure interne de la cellule (MOSER, 1984). Cette approche convient bien aux fermentations simples, mais présente le désavantage de ne pouvoir prédire un éventuel changement de métabolisme.

Plus récents, les modèles dit physiologiques ou structurés tiennent compte de l'évolution interne du microorganisme. Ce type de modélisation demande un minimum de connaissances sur les voies métaboliques empruntées et leur régulation, ainsi que sur la transcription de l'information génétique. Ce type de modèle est relativement complexe, mais parvient généralement à modéliser les changements de métabolismes cellulaires. Entre ces deux types de modèles, existent d'autres modèles mécanistiques (KOSEN et OOSTERHUIS, 1985) qui prennent en partie compte des réactions intracellulaires.

La fermentation lactique a été l'objet de nombreuses modélisations. La relative simplicité de cette fermentation fait que la grande majorité des modèles proposés sont du type cinétique de LUEDEKING et PIRET (1959a) ou modifiés (HANSON et TSAO, 1972; KELLER et GERHARDT, 1975; STIEBER et coll, 1977; ROGERS et coll., 1978; JORGENSEN et NIKOLAJSSEN, 1987; TANIGUCHI et coll., 1987; RAUCOURT et coll., 1989).

C'est le cas par exemple du modèle de VENKATESH et coll. (1993) qui tient compte des effets du pH sur l'activité de la β galactosidase, de la concentration de lactate et du substrat. D'autres, par exemple LI-HONG et coll. (1991), tiennent compte des effets inhibiteurs de l'acide lactique non dissocié et de la concentration en H^+ pour définir la croissance bactérienne et la production d'acide lactique.

NIELSEN et coll. (1991a) proposent une étude théorique sur la fermentation lactique. Leur modèle se fonde sur des travaux réalisés sur *S. cremoris*, facilement adaptable à d'autres microorganismes.

Ces auteurs décrivent un modèle à deux compartiments. Le compartiment A (Actif) tient compte des transports des métabolites à travers la membrane cytoplasmique, des ribosomes, des ARNm, des ARNt et des enzymes cataboliques.

Le deuxième, dit à compartiment G (Génétique), est fonction du génome, des plasmides, des lipides, des lipopolysaccharides, de la structure protéique et des carbohydrates de la membrane. Pour que le modèle simule bien la croissance bactérienne, la consommation du substrat et la production d'acide lactique, il est nécessaire de bien connaître les différents éléments comme le taux de dilution, la concentration en substrat, en source d'azote ou la concentration en ARN (NIELSEN, 1991b).

Suite aux travaux de NIELSEN (1991b), NIKOLAJSSEN et coll. (1991) ont démontré qu'il est également possible de simuler un discontinu triphasique, un état stationnaire ou une fermentation transitoire lors d'une fermentation à répression catabolique.

D'autres modèles existent cependant, tels que le modèle mécanistique d'ABORHEY et WILLIAMSON (1977) ou le modèle structuré de NIELSEN et coll (1991a et b). Tous les modèles proposés donnent une expression de la croissance bactérienne, de la production d'acide lactique et de la consommation de substrat.

5.2. Croissance

La croissance est généralement caractérisée par le taux de croissance qui suit la loi de MONOD (1942) :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right)$$

où : μ est le taux de croissance (h-1)

μ_{\max} est le taux de croissance maximum (h-1)

S est la concentration en substrat (g/l)

K_S est la concentration pour laquelle $\mu = \mu_{\max} / 2$ (g/l)

KELLER et GERHARDT (1975) choisissent une simple loi de MONOD (a) pour exprimer la croissance.

$$\mu = k_1 \cdot \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (a)$$

HANSON et TSAO (1972) trouvent de meilleurs résultats en modifiant le dénominateur (b).

$$\mu = k_1 \cdot \left(\frac{S}{k_2 - S} \right) \quad (b)$$

IERUSALEMSKY (1967) ainsi que ISHIZAKI et coll. (1989) proposent un modèle simple d'inhibition de la croissance indépendant de la concentration en substrat S (c).

$$\mu = k_1 \cdot \left(\frac{K_I}{K_I + L} \right) \quad (c)$$

La combinaison de cette dernière expression avec la loi de MONOD est proposée par STIEBER et coll. (1977) (d).

$$\mu = k_1 \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot \left(\frac{K_I}{K_I + L} \right) \quad (d)$$

ROGERS et coll. (1978) ainsi que RAUCOURT et coll. (1989) reprennent ce modèle et en soustraient une constante traduisant un décès cellulaire (e).

$$\mu = k_1 \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot \left(\frac{K_I}{K_I + L} \right) - k_3 \quad (e)$$

TANIGUCHI et coll. (1987) proposent deux expressions de la croissance (f), de type exponentiel, différentes selon la concentration en acide lactique.

$$\begin{aligned} \mu &= k_1 \cdot e^{-k_4 L} && \text{pour } 0 \leq L \leq L_1 && (f) \\ \text{ou} \quad \mu &= k_1 \cdot e^{-k_4 L + k_5} && \text{pour } L_1 \leq L \leq L_2 \end{aligned}$$

Tout comme l'équation (c) elle ne dépend que de la concentration en acide lactique.

5.3. Consommation du substrat

HANSON et TSAO (1972) proposent une simple proportionnalité entre la vitesse spécifique de consommation de substrat et la concentration en substrat (g).

$$\sigma = k_6 \cdot S \quad (g)$$

PIRT (1965), KELLER et GERHARDT (1975) ainsi que TANIGUCHI et coll. (1987) font apparaître une consommation de substrat liée et non liée à la croissance (h).

$$\sigma = \frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \cdot \mu + k_7 \quad (h)$$

Ces auteurs assimilent le terme non lié à la croissance à un terme de maintenance. Il est intéressant de noter que ce terme inclut la consommation de substrat pour la formation du produit alors qu'au contraire DAMIANO et coll. (1985) ainsi qu'URIBELARREA et coll. (1990) définissent pour les levures une vraie maintenance, qui correspond à la consommation de glucose liée, et non à la croissance ni à la formation du produit.

5.4. Production d'acide lactique

Le premier modèle de production d'acide lactique est proposé par LUEDEKING et PIRET (1959a) (i), il est repris tel quel dans le modèle de TANIGUCHI et coll. (1987).

$$\pi = k_8 \cdot \mu + k_9 \quad (i)$$

Cette expression traduisant une vitesse de production d'acide lactique proportionnelle à la fois à la croissance et à la concentration en biomasse, est mieux connue sous le terme générique de production associée et non associée à la croissance.

KELLER et GERHARDT (1975) ainsi que ROGERS et coll (1978) proposent de pondérer le terme non associé à la croissance par une expression où la concentration en substrat S apparaît (j). Elle permet de corriger cette équation qui prolonge la production d'acide lactique même lorsque le substrat est épuisé.

$$\pi = k_8 \mu + \left(k_9 \cdot \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (j)$$

JORGENSEN et NIKOLAJSSEN (1987) constatent expérimentalement que la vitesse spécifique de production de l'acide lactique n'est pas une fonction linéaire du taux de croissance, et expliquent que lorsque le taux de dilution augmente, une quantité moins importante de glucose est fermentée. Ces auteurs proposent par conséquent un terme de production spécifique d'acide lactique corrigé par un terme négatif (k).

$$\pi = k_8 \mu + k_9 - k_{10} S \quad (k)$$

RAUCOURT et coll. (1989) modifient également le terme non associé à la croissance aux vues de la forme des courbes représentant la vitesse spécifique de production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance (l).

$$\pi = k_8 \mu + k_9 \left(1 - e^{\left(-\frac{\mu}{k_{11}} \right)} \right) \quad (l)$$

HANSON et TSAO (1972) proposent quant à eux, un modèle très simple où la vitesse spécifique de production de l'acide lactique est proportionnelle à la concentration en substrat (m).

$$\pi = k_{10} S \quad (m)$$

ABORDEY et WILLIAMSON (1977), dans un modèle mécanistique, tiennent compte du transfert enzymatique du substrat au travers de la membrane. Ces auteurs introduisent une concentration seuil en substrat S_T en dessous de laquelle, la concentration intracellulaire S_C reste nulle (n).

$$\pi = k_{10} \left(\frac{S_C}{S_C + k_{11}} \right) \quad (n)$$

$$\text{avec } S_C = S_i - S_T \text{ et } S_C = 0 \text{ si } S_i \leq S_T$$

Le modèle de ABORHEY et WILLIAMSON (1977) rejoint celui d'HANSON (1972) lorsque S_C est négligeable par rapport à la constante k_{11} .

II. MATERIEL et METHODES

II. MATERIEL et METHODES

1. MICROORGANISME.....	50
1.1. Conservation et revivification de la souche.....	52
1.2. Propagation et préculture.....	52
2. MILIEUX DE CULTURE.....	52
2.1. Milieu MRS gélosé et MRS lactosé.....	52
2.2. Milieu de fermentation initial.....	54
3. STERILISATION ET TRAITEMENT THERMIQUE.....	54
4. MODE DE CULTURE.....	54
4.1. Fermentation discontinue.....	54
4.2. Fermentation semi-continue.....	55
4.3. Fermentation continue.....	55
5. UTILISATION DE LA METHODE D'IMPULSION ET ECHELON.....	56
6. ANALYSES.....	58
6.1. Estimation de la biomasse.....	58
6.2. Dosage enzymatique de l'acide lactique et du lactose.....	59
6.2.1. Principe du dosage du lactose.....	59
6.2.2. Principe de dosage de l'acide lactique.....	59
6.2.3. Technique automatique de dosage de l'acide lactique.....	60
6.3. Dosage par HPLC de l'acide lactique et du lactose.....	62
6.4. Dosage des protéines.....	62
6.5. Estimation des protéines précipitées et de l'intensité de la réaction de Maillard.....	63
6.6. Détermination des peptides par HPLC en phase inverse.....	63

7.	LYSE BACTERIENNE.....	64
7.1.	Par sonication	64
7.2.	Par lyse physicochimique.....	64
8.	INTERPRETATION DES DONNEES.....	65
8.1.	Vitesses spécifiques.....	65
8.1.1.	Cultures discontinues.....	65
8.1.2.	Cultures semi-continues	66
8.1.3.	Cultures continues	67
8.2.	Rendements	68
8.2.1.	Rendements globaux.....	68
8.2.2.	Rendements instantanés	68
8.3.	Productivités.....	69
8.4.	Calcul du bilan carboné.....	69
9.	MODELISATION DES FERMENTATIONS SEMI-CONTINUES.....	69
10.	APPAREILS.....	70

1. MICROORGANISME

La sélection de bactéries, pour la production d'acide lactique, a été réalisée sur le genre *Lactobacillus* provenant de collections industrielles, ou privées.

La souche qui a été retenue pour ce travail, est un *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* fourni par la société STANDA-INDUSTRIE. Ce microorganisme se présente sous la forme de bâtonnet immobile de $1 \times 3 \mu\text{m}$. Il a généralement tendance à former des chaînettes de 2 à 6 bactéries et est rarement seul.

Faisant partie des homofermentaires facultatifs (groupe II), ces lactobacilles ne sporulent pas, ne possèdent pas de catalase et présentent une coloration gram positif. D'après ORY (1988), *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ne semble pas être influencé par la présence d'oxygène, d'azote ou de dioxyde de carbone.

Cette souche produit essentiellement de l'acide L(+) lactique à partir de nombreux sucres comme le fructose, le galactose, le glucose, le maltose et le lactose. Le pourcentage de production de la forme isomérique D(-) est inférieur à 5% par rapport à la production totale d'acide lactique

Peptone trypsique caséine	10g
Macération de viande	10g
Extrait de levure	5g
Acétate de sodium	5g
Citrate bi-ammoniaque	2g
Phosphate bipotassique	2g
Tween 80	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1g
MnSO ₄ , 4H ₂ O	0,05g
Glucose	20g
Eau osmosée	qsp 1 litre
<i>plus du lactose</i>	<i>20g</i>

Tableau II.1 : Composition du milieu MRS (MAN et coll., 1960) lactosé

1.1. Conservation et revivification de la souche

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* est conservé sur un milieu MRS gélosé. Le développement est réalisé à 38°C dans une étuve pendant 20h.

Puis, elle est conservée dans un congélateur à -18°C, au maximum 20 jours. Cette opération est régulièrement répétée afin de revivifier notre souche.

1.2. Propagation et préculture

Avant toute fermentation la souche se développe préalablement dans des tubes de MRS lactosé mis à l'étuve (38°C) pendant 20h, sans aucune agitation et régulation de pH.

Après cette première préculture sur milieu MRS, environ 15ml de ce milieu servent à l'inoculation d'une nouvelle préculture en erlenmeyer contenant du lactosérum. La composition de ce milieu, le traitement physicochimique (pH et température) et le déroulement (pH régulé ou non, sous agitation ou non) sont à définir. Ce passage par cette deuxième préculture permet d'adapter la bactérie au milieu de fermentation.

Les tubes restants sont conservés, pendant un maximum de 15 jours, à -18°C pour la préparation d'une autre fermentation.

2. MILIEUX DE CULTURE

Différents milieux ont été utilisés au cours de cette étude :

2.1. Milieu MRS gélosé et MRS lactosé

Le milieu MRS (MAN et coll., 1960) est spécifique pour le développement de lactobacilles. Composé uniquement de glucose, du lactose est ajouté dans ce milieu afin d'adapter notre souche à sa réelle source de carbone. Il est utilisé sous sa forme préparée (DIFCO) et est stérilisé à 121°C pendant 20 mn.

Pour un litre de milieu MRS lactosé, la composition est définie dans le **tableau II.1.**

Pour la réalisation du milieu MRS gélosé, il est ajouté en plus 15g d'agar-agar (SERVA) par litre de milieu .

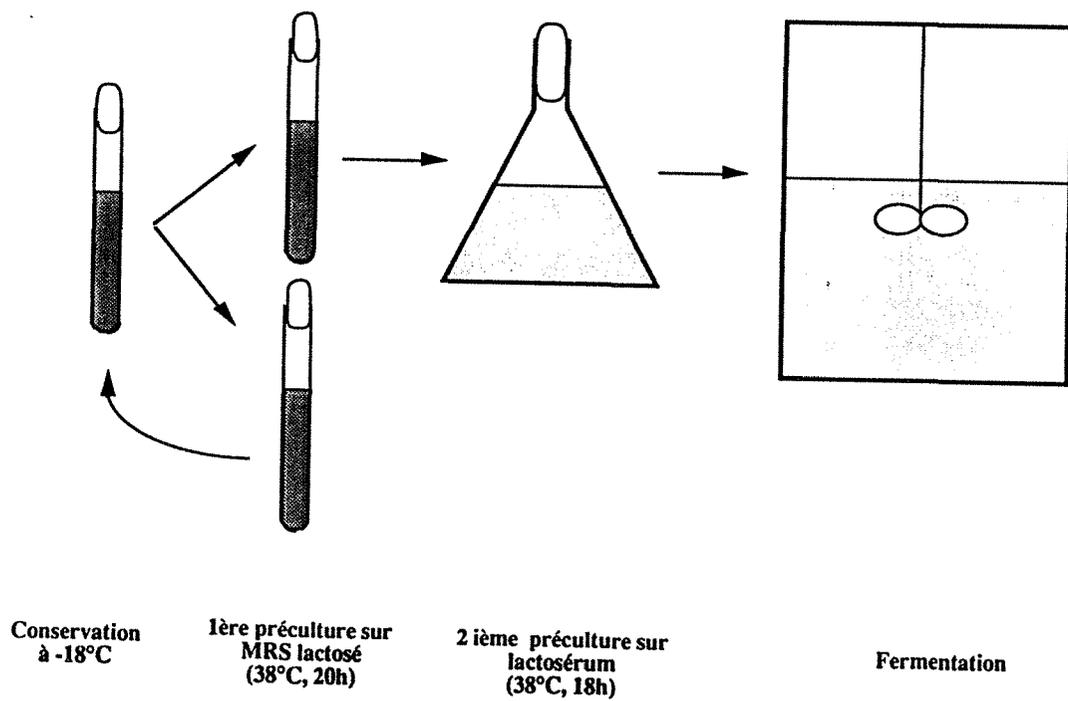


Figure II.1 : Schéma du protocole de préparation des précultures et d'inoculation d'un fermenteur.

2.2. Milieu de fermentation initial

Le milieu de culture au début du projet est défini par ALTABA (1989); il est constitué par litre : extrait de levure 5 g (Fould Springer); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4 g; $MnSO_4 \cdot 1H_2O$, 0,1 g; Tween 80 1 ml.

Il comporte une source carbonée variable selon le type d'expérimentation : lactose, lactosérum doux ou acide en poudre ou liquide concentré, perméat de lait, lactosérum hydrolysé. La concentration de cette source carbonée varie entre 100 et 200 g/l. Ce milieu est traité thermiquement selon une procédure décrite au chapitre suivant.

3. STERILISATION ET TRAITEMENT THERMIQUE

Avant d'entreprendre une fermentation, le matériel (tuyaux d'alimentation, raccords, erlenmeyer utilisé pour la préculture, milieu MRS, fermenteur ...) est autoclavé pendant 20 mn à 121°C.

Le milieu de culture, quant à lui, subit un prétraitement thermique (100°C, 20 mn) pour des raisons de précipitation des protéines et de la formation des composés de Maillard nocifs pour les bactéries (STECCHINI et coll., 1991)

4. MODE DE CULTURE

4.1. Fermentation discontinue

Les fermenteurs sont de deux types.

D'une part, pour les fermentations discontinues, un réacteur S.G.I. (Sétric Génie Industriel) d'un volume utile d'un litre est utilisé. Ce fermenteur est muni d'un système de régulation de l'agitation, de la température et du pH.

Pour les études des fermentations semi-continues, nous utilisons un fermenteur à double enveloppe d'un volume utile de 10 litres et comprenant un système d'agitation, une sonde pH et une sonde de température. Le pH est maintenu à la valeur optimale à l'aide d'une pompe à membrane. L'entrée du milieu dans le réacteur, lors des fermentations semi-continues, utilise une pompe péristaltique

En règle générale, la propagation de *Lactobacillus casei* est définie selon un schéma en trois étapes (**figure II.1**).

Une première préculture est réalisée sur milieu MRS lactosé, pendant 20h à 38°C.

A partir d'un de ces tubes, une deuxième inoculation est réalisée dans une fiole contenant le milieu de fermentation définie comme précédemment. Cette préculture sur lactosérum est mise dans une étuve à 38°C pendant 18h. Le pH et l'agitation feront l'objet d'une étude détaillée dans la partie Résultats Discussions.

Après cette dernière étape d'adaptation de la bactérie à son milieu de fermentation, l'inoculation du fermenteur est réalisé à raison de 5% V/V. Les fermentations s'effectuent sous agitation (350tr/mn), avec une régulation de la température et de pH à 6 grâce à un ajout d'ammoniac (6 N) ou de chaux (Ca(OH)₂ à 200g/l).

4.2. Fermentation semi-continue

Suite à une fermentation discontinue, il est ajouté dans le milieu de fermentation, après 24 heures, du milieu nutritif neuf contenant du lactosérum. Comme aucun soutirage n'est réalisé, le volume du fermenteur augmente.

La composition du milieu d'alimentation sera défini dans le **chapitre III 1.2.**; le débit et les concentrations seront étudiés dans le **chapitre III 1.5.**

4.3. Fermentation continue

Pour les cultures continues, il est procédé de la façon suivante.

Dans un premier temps, une culture discontinue est démarrée selon le protocole précédemment cité. Puis, entre la 15^{ème} et la 20^{ème} heure de fermentation, une alimentation de milieu prétraité thermiquement est mise en route à l'aide d'une pompe péristaltique. Dans le cas des fermenteurs de 1 litre, une canule de soutirage permet d'enlever en continu le milieu de fermentation pour conserver un volume constant.

5. OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE PAR LA METHODE D'IMPULSION ET ECHELON(MORABITO et FICK, 1993)

Lors de l'étape d'optimisation du milieu de culture, la méthode "impulsions et échelons" a été utilisée en culture continue (taux de dilution $D = 0,04h^{-1}$). Cette méthode consiste à injecter stérilement, soit dans le réacteur (impulsion), soit dans l'alimentation (échelon), des concentrations connues de nutriments (minéraux ou vitamines par exemple).

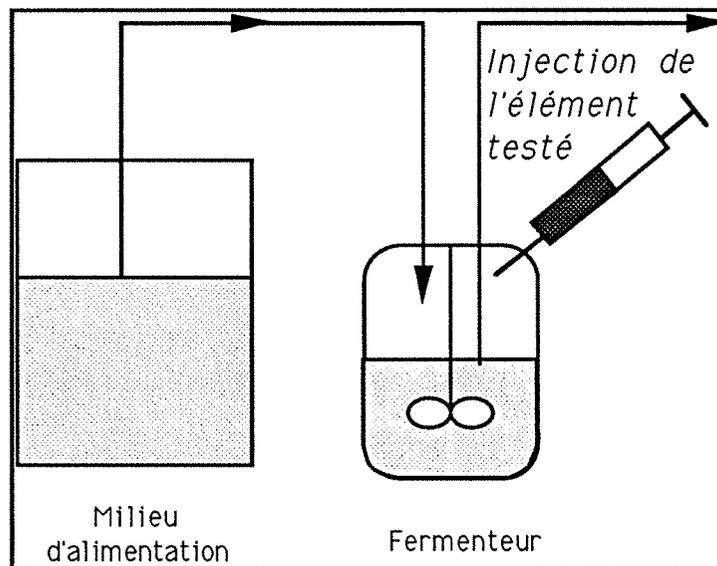


Figure II.2a : Schéma de la technique d'impulsion

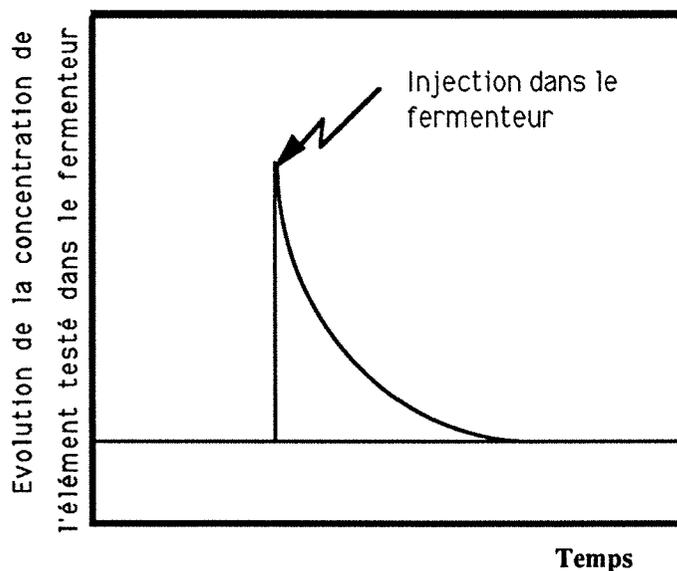


Figure II.1b : Evolution de la concentration de l'élément testé dans le fermenteur en mode impulsion en fonction du temps

La technique d'impulsion permet de savoir si une bactérie est dépendante ou non d'une molécule donnée. Au moment de l'injection, l'élément étudié n'est pas présent dans le milieu. L'effet de la disparition de ce composé est suivi au cours du temps par dosage de l'acide lactique, lactose et biomasse (figure II.2a et b).

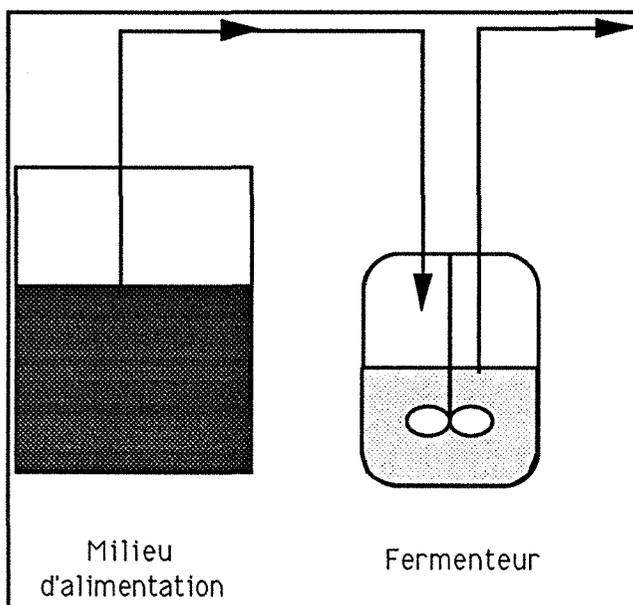


Figure II.3a : schéma de la technique d'échelon

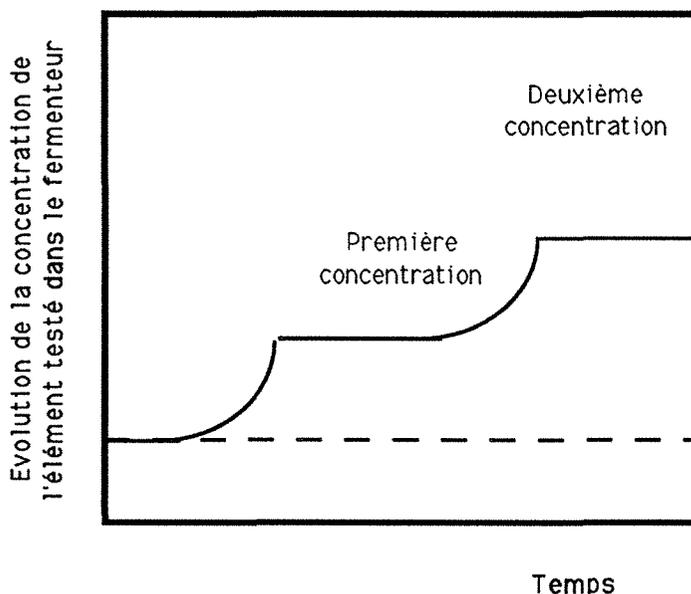


Figure II.3b : Evolution de la concentration de l'élément testé dans le fermenteur en mode échelon en fonction du temps

La technique échelon, par contre, consiste à définir la concentration idéale des éléments à ajouter dans un milieu de fermentation. Comme précédemment, le milieu de

fermentation ne contient pas l'élément testé alors que le milieu d'alimentation possède l'élément testé à une concentration bien déterminée (figure II.3a et b). Le test d'optimisation se termine quand le changement du milieu (avec des concentrations croissantes de la molécule testée) n'a plus aucune influence sur le développement bactérien et la production d'acide lactique.

Pour chaque essai de concentration, la biomasse se stabilise après le passage de trois volumes de milieu fermentaire.

Au cours des expériences d'impulsion et d'échelon, des prélèvements sont effectués afin de suivre l'évolution de la concentration de lactose, de bactéries et de l'acide lactique au cours du temps.

6. ANALYSES

6.1. Estimation de la biomasse

La croissance bactérienne est estimée par prélèvement de quelques ml de culture dont l'absorbance à 570nm est mesurée en effectuant les dilutions adéquates dans de l'eau physiologique (solution de NaCl à 0,9% p/v). La détermination se fait par 2 mesures au moins par un spectrophotomètre LKB Biochrome NOVASPEC II, avec un coefficient de variation inférieur à 10%.

Le prélèvement d'un volume connu de culture en phase exponentielle de croissance permet d'établir une relation entre l'absorbance à 570nm et la masse bactérienne.

Le prélèvement est centrifugé à 6000g pendant 20mn et le culot bactérien récupéré est placé dans une cupule tarée pendant 24 heures à 105°C. Après refroidissement dans un dessiccateur, la masse de bactéries est déterminée, puis rapportée à la mesure d'absorption correspondante. Ainsi une relation de proportionnalité entre la densité optique mesurée et la concentration de biomasse est exprimée en poids sec de cellules est établie.

Pour le spectrophotomètre utilisé, nous avons :

$$1 \text{ unité d'absorbance à } 570\text{nm} = 0,73\text{g de biomasse / de fermentation}$$

Il est à noter que lors des fermentations régulées avec de la chaux, la lecture de l'absorbance à 570nm représente à la fois la concentration en biomasse et en chaux. Le suivi de l'ajout de chaux dans le fermenteur nous permet de soustraire l'absorbance dû à la base régulatrice. Une relation entre absorbance et concentration en chaux est établi, à savoir :

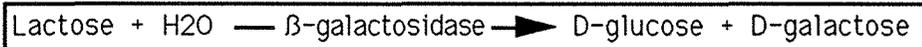
$$1 \text{ g/l de chaux} = 0,0716 \text{ unité d'absorbance à } 570\text{nm}$$

6.2. Dosage enzymatique de l'acide lactique et du lactose

Le mode opératoire pour le dosage du lactose résiduel et de l'acide L(+)lactique est celui préconisé par le fournisseur du coffret enzymatique (BOEHRINGER Réf. 176303 pour le lactose et BOEHRINGER Réf. 139084 pour l'acide lactique).

6.2.1. Principe du dosage du lactose

Le lactose est hydrolysé en D-glucose et en D-galactose en présence d'une β -galactosidase en milieu aqueux.



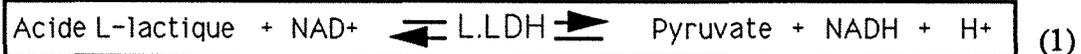
Le D-galactose est oxydé en acide galactonique par la β galactose déshydrogénase (Gal DH) avec utilisation du NAD^+ .



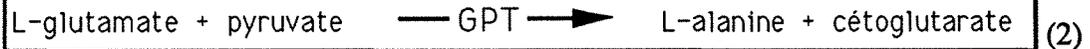
La formation de NADH mesurée par l'augmentation d'absorbance à 340 ou 360nm est proportionnelle à la quantité de lactose.

6.2.2. Principe de dosage de l'acide lactique.

En présence de NAD^+ , l'acide L-lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH).



En présence du L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine grâce à la glutamate pyruvate-transaminase (GPT), ceci afin d'éviter la reformation d'acide L(+)lactique, la réaction (1) étant réversible.



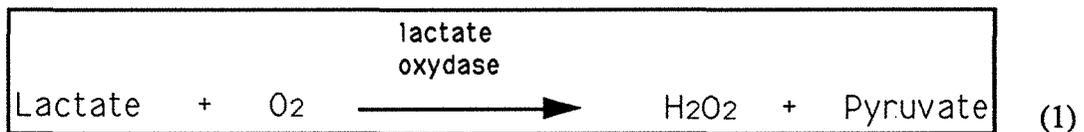
La formation de NADH mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340nm ou 365nm est proportionnelle à la quantité d'acide L(+)lactique.

Ces dosages sont réalisés sur le surnageant des prélèvements, à différentes dilutions.

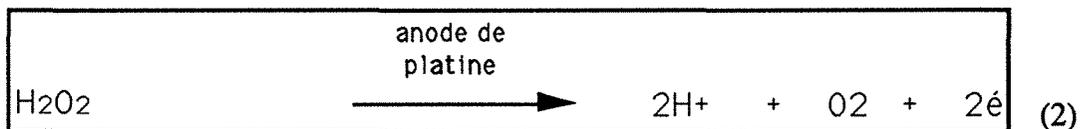
6.2.3. Technique automatique de dosage de l'acide lactique

La technique de dosage est fondée sur le principe des membranes à enzymes fixées : la lactate oxydase (analyseur Y.S.I. 2000).

L'échantillon à doser est pompé puis diffusée à travers la membrane, entrant ainsi en contact avec la L(+) lactate oxydase. L'acide lactique est rapidement oxydé et produit du peroxyde d'hydrogène (1).



Le peroxyde d'hydrogène est à son tour oxydé électrochimiquement par une anode de platine, libérant ainsi des électrons (Réaction 2)



La concentration en acide lactique est directement proportionnelle à la concentration en électron, et le résultat est exprimé en g/l d'acide lactique. Uniquement la forme L(+) lactate est mesuré en raison de la spécificité de l'enzyme pour son substrat.

La gamme d'étalonnage est limitée à 2g/l d'acide lactique.

Les erreurs d'analyses sont de 2% en dessous de 0,45g/l et de 5% jusqu'à 2,0g/l d'acide lactique.

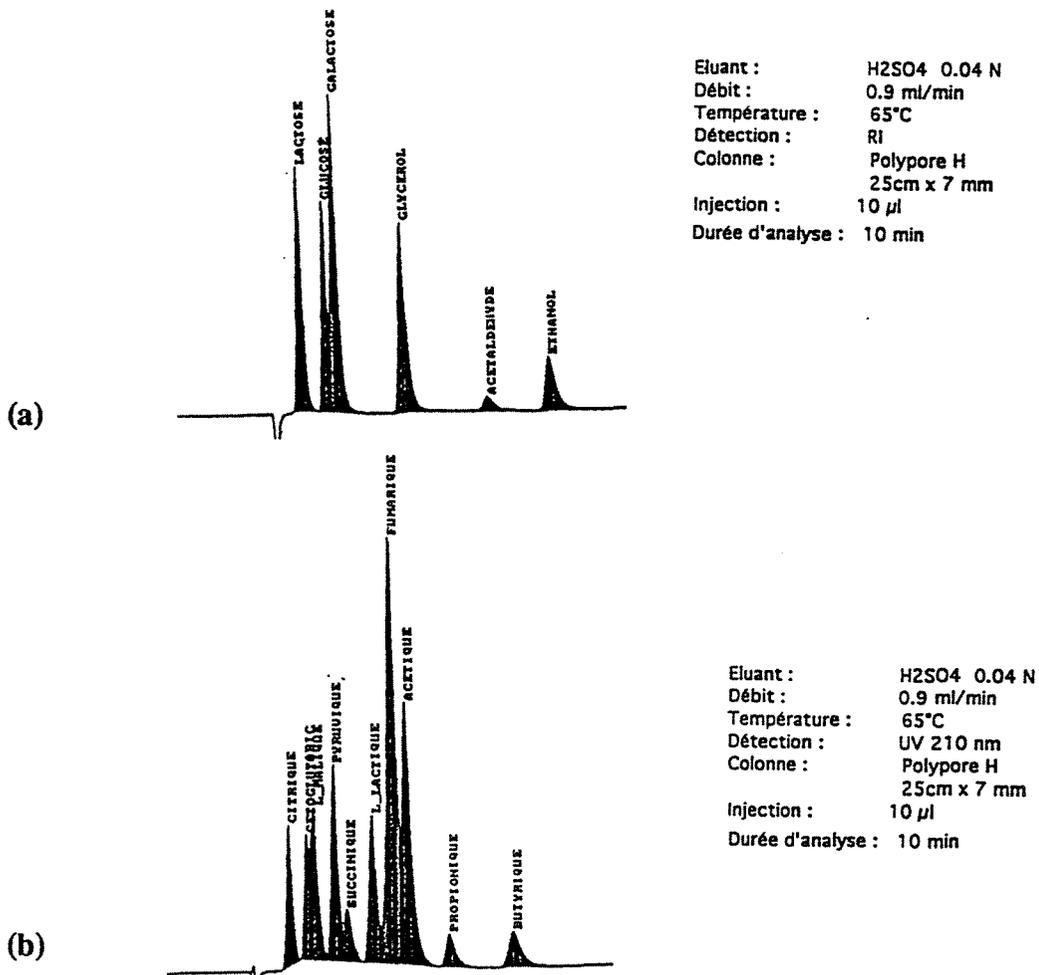


Figure II.4: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC des sucres (a) et acides organiques (b)

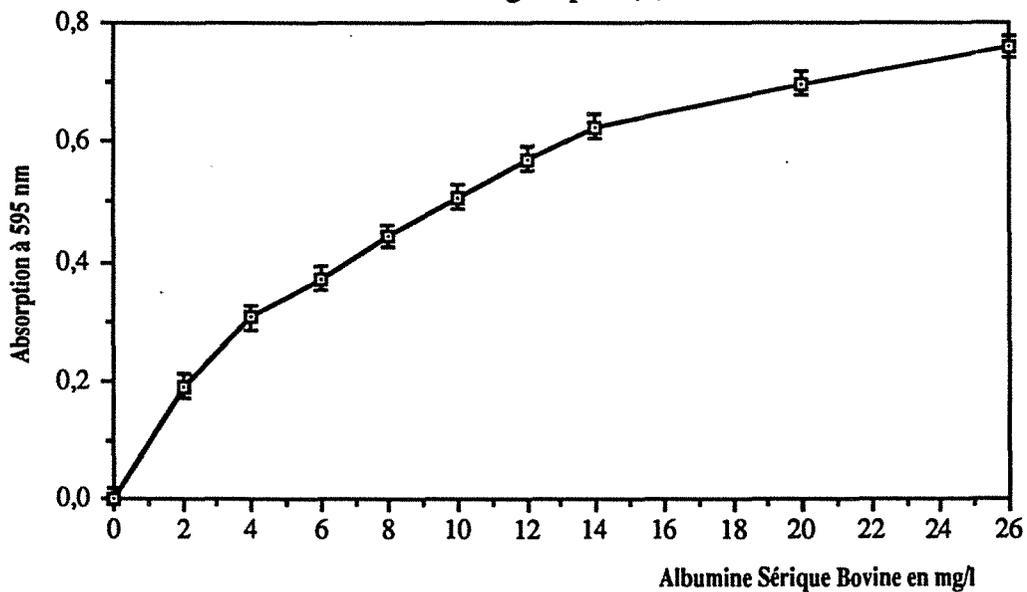


Figure II.5: Courbe d'étalonnage du dosage des protéines (Albumine de Sérum Bovine) d'après la technique de Bradford (1976)

6.3. Dosage par HPLC de l'acide lactique et du lactose

La colonne H.P.L.C. utilisée permet à la fois la séparation par exclusion ionique et stérique des mélanges d'acides organiques, d'alcools et d'hydrates de carbone grâce à une résine échangeuse forte de cations.

Les particules anioniques sont donc éluées en premier, puis les particules neutres et ensuite les particules cationiques, avec les molécules de plus hauts poids moléculaires éluées avant les plus petites.

Les échantillons sont dilués au 1/5^{ème} puis centrifugés à 6 000g pendant 20 minutes. Le volume d'injection est fixé à 10 μ l.

Le lactose, le galactose et le glucose résiduels sont détectés par réfractométrie tandis que les acides organiques sont détectés par U.V. (210nm) (**figure II.4a et b**).

Si les chromatogrammes concernant le sucre sont lisibles, il n'en va pas de même pour le dosage de l'acide L(+)-lactique. Le bruit de fond enregistré par le détecteur U.V. provient de la nature complexe du milieu. C'est pourquoi nous avons interprété les résultats des concentrations en acide lactique uniquement par les résultats du dosage enzymatique.

(Erreurs de dosage de 7% pour le dosage des sucres et de 15% pour le dosage des acides organiques)

6.4. Dosage des protéines

Cette méthode de détermination des protéines est fondée sur la liaison du bleu de Coomassie G250 avec les protéines. Cette liaison entraîne un changement d'absorption du colorant de 465nm à 595nm. Le bleu de Coomassie G250 existe sous deux formes colorées différentes rouge et bleue. La forme rouge est convertie en forme bleue lorsque le colorant se lie à la protéine. Le complexe colorant-protéine a un coefficient d'extinction élevé et donne une grande sensibilité dans la détermination quantitative des protéines.

Un volume de concentration connue ou inconnue d'extrait protéique est porté à 0,5ml avec de l'eau distillée. 0,5ml de réactif de Bradford (Bio-Rad) est ensuite ajouté. Après 10mn, l'absorbance est lue à 595nm contre un témoin sans protéine (**figure II.5**).

La concentration de l'échantillon doit se situer, pour respecter la linéarité du dosage, entre 5 et 12,5 μ g de protéines par ml de milieu réactionnel.

6.5. Estimation des protéines précipitées et de l'intensité de la réaction de Maillard

Afin de mettre en évidence la précipitation de protéines et la formation de mélanoides durant les phases de traitement thermique du milieu de culture (**chapitre II 3. Stérilisation et traitement thermique**), la méthode suivante est appliquée.

Des échantillons de milieu de culture à différents pH sont mis à chauffer à 100°C sur une plaque chauffante pendant des temps variables. Les échantillons prélevés sont refroidis dans la glace pour obtenir une température proche de la température ambiante. La densité optique à 570nm est mesurée après dilution adéquate par une solution tampon Tris HCl (0,2M) au pH de l'échantillon ; cette mesure donne une indication relative de la quantité de protéines précipitées de l'échantillon. Le reste de l'échantillon est centrifugé 5 mn à 3000 g. Les surnageants sont alors comparés en terme d'intensité de coloration brune; l'intensité de coloration étant d'autant plus forte que la quantité de mélanoides formés est importante.

6.6. Détermination des peptides par HPLC en phase inverse

Le protocole mis en place vise à étudier, dans le même temps, l'influence de l'extrait de levure, de la température de chauffage et du pH sur l'aspect du profil peptidique du milieu de fermentation.

La colonne de l'HPLC est une phase inverse, les peptides sont séparés suivant leur taille mais surtout suivant leur hydrophobicité. Par conséquent, il est difficile de déterminer la taille des peptides obtenus.

Après prétraitement physicochimique (pH, température et durée de chauffage), les échantillons sont immédiatement refroidis dans de la glace.

Les prélèvements sont centrifugés 15mn, 3000g à 4°C.

Le surnageant est récupéré et les protéines sont éliminées deux fois de suite d'après le protocole qui suit. Tout d'abord un mélange est réalisé avec 2/3 d'acide trichloroacétique (12% p/v) et 1/3 du surnageant. Après précipitation pendant 1h à -20°C, il s'en suit une centrifugation pendant 15mn, 3000g à 4°C.

Les échantillons ainsi obtenus sont ensuite filtrés sur un filtre de pores de 0,2µm.

L'HPLC en phase inverse est muni d'une colonne Delta Pack C18 300Å 5m (15cm X 2,5mm) maintenue à température ambiante.

Les éluants utilisés sont de l'acide trifluoro-acétique à 0,1% dans de l'eau (éluant A) puis à 0,1% dans de l'acétonitrile plus 39,9% d'eau distillée (éluant B). Le débit est stabilisé à 1ml/mn et le gradient est réalisé sur 60mn passant de 100% de l'éluant A à 100% de l'éluant B. Le dosage des peptides se fait par détection U.V. à 214nm.

Pour chaque peptide, un pic apparaît sur le chromatogramme. La surface des pics est exprimée soit en aire (exprimé en $\mu\text{V}/\text{sec}$), soit en pourcentage (rapport de l'aire du pic sur la somme des aires de l'ensemble des pics).

7. LYSE BACTERIENNE

Pour la réalisation de la lyse de *Lactobacillus casei*, deux méthodes ont utilisées :

7.1. Par sonication

Cette méthode a été choisie car elle est "douce" et préserve d'avantage l'intégrité des molécules intracellulaires de la bactérie. 25 ml d'une solution concentrée de biomasse d'environ 50g/l est traitée par alternance aux ultrasons à fréquence 8 000hertz, pendant 10mn, dans un bain-marie constamment refroidi par de l'eau courante (15°C).

7.2. Par lyse physicochimique

Un volume de 300ml d'une solution d'un concentré de *Lactobacillus casei* (environ 100g/l) est chauffé à 100°C après ajustement du pH à 1,0 en ajoutant de l'acide chlorhydrique (10N), pendant 2h30.

L'ensemble des lysats issus de la sonication ou de la lyse physicochimique fait l'objet d'une estimation de leur poids sec par déshydratation. 2 à 3 ml de lysat, mis dans une coupelle en aluminium, sont placés dans une étuve à 105°C, pendant 24h. La mesure du poids avant et après chauffage détermine la masse de lysat bactérien obtenue pour un volume donné.

8. INTERPRETATION DES DONNEES

Liste des abréviations :

- X : concentration en biomasse (g/l)
- P : concentration en produit (acide lactique) (g/l)
- S : concentration en substrat (lactose) (g/l)
- Sa: concentration en substrat dans l'alimentation (g/l)
- Q : débit d'alimentation (g/l.h)

8.1. Vitesses spécifiques

Si r_x , r_s et r_p sont respectivement les vitesses de formation de biomasse, de consommation de lactose et de production d'acide lactique en g/l.h, les vitesses spécifiques sont données par les expressions suivantes :

- Vitesse spécifique de croissance (h^{-1}) : $\mu = \frac{r_x}{X}$
- Vitesse spécifique de consommation de lactose (h^{-1}) : $\sigma = \frac{r_s}{X}$
- Vitesse spécifique de production d'acide lactique (h^{-1}) : $\pi = \frac{r_p}{X}$

8.1.1. Cultures discontinues

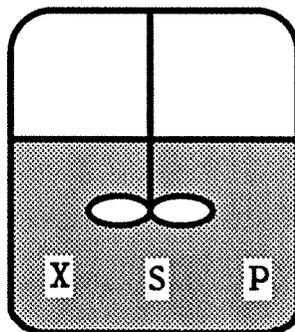


Figure II.6 : Schéma d'une fermentation discontinue

Les équations des bilans aboutissent pour une culture discontinue (**figure II.6**) à :

$$r_x''' = \frac{dX}{dt} \qquad r_s''' = -\frac{dS}{dt} \qquad r_p''' = \frac{dP}{dt}$$

La vitesse spécifique maximale de croissance μ_{\max} est obtenue, après intégration de l'équation différentielle provenant de l'écriture du bilan en biomasse, à partir du tracé du logarithme népérien de la concentration de biomasse en fonction du temps.

Durant la phase exponentielle, ce tracé se matérialise par une droite dont la pente mène à μ_{\max} .

8.1.2. Cultures semi-continues

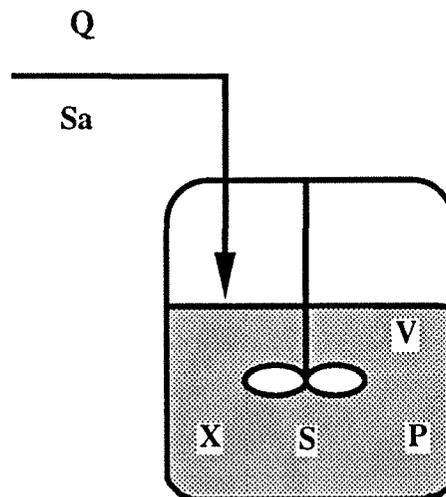


Figure II.7 : Schéma d'une fermentation semi-continue

En fermentation semi-continue (**figure II.7**), le substrat de concentration S_a dans l'alimentation est acheminé à un débit Q dans le fermenteur de volume V .

Les équations de bilans massiques sont :

pour la biomasse :

$$r_x''' V = \frac{dVX}{dt} = V \frac{dX}{dt} + X \frac{dV}{dt}$$

pour le lactose :

$$S_a Q - r_s''' V = \frac{dVS}{dt} = V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt}$$

pour l'acide lactique :

$$r_p''' V = \frac{dPV}{dt} = P \frac{dV}{dt} + V \frac{dP}{dt}$$

8.1.3. Cultures continues

En fermentations continues nous avons une alimentation et un soutirage (figure II.8).

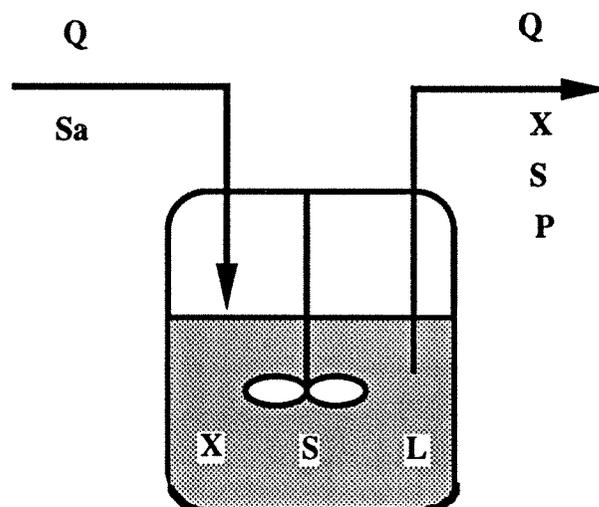


Figure II.8 : Schéma d'une fermentation continue

Soient Q et S_a , le débit volumique d'alimentation et la concentration de lactose dans l'alimentation respectivement et V le volume du fermenteur ; les équations de bilans aboutissent à :

$$r_X''' = DX + \frac{dX}{dt}$$

$$r_S''' = D(S_a - S) - \frac{dS}{dt} \quad \text{avec } D = \frac{Q}{V} \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$r_P''' = DP + \frac{dP}{dt}$$

A l'état stationnaire, ces expressions aboutissent à :

$$\mu = D$$

$$\sigma = \frac{D(S_a - S)}{X}$$

$$\pi = \frac{DP}{X}$$

8.2. Rendements

Les rendements qui seront utilisés lors de cette étude sont des rendements globaux $Y_{x/s}$ et $Y_{p/s}$ qui expriment les rapports des masses de biomasse et d'acide lactique formés par la masse de substrat consommé :

8.2.1. Rendements globaux

En réacteur discontinu et semi-continu :

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \cdot d \quad \text{avec} \quad d = \frac{V_t - V_i}{V_i}$$

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \cdot d$$

où S_0 et P_0 sont les concentrations en lactose et acide lactique initiales.

Le facteur de dilution d correspond à la dilution de la base régulatrice non négligeable (entre 1 et 1,5 selon la production d'acide lactique), V_i et V_t correspondant respectivement aux volumes initiaux et après un temps t de réaction.

En réacteur continu :

Les rendements globaux doivent tenir compte de la quantité de lactose acheminé à la culture.

$$Y_{x/s} = \frac{X}{S_a - S} \quad \text{et} \quad Y_{p/s} = \frac{P}{S_a - S}$$

8.2.2. Rendements instantanés

De la même façon, il est possible de définir des rendements instantanés de bioconversion comme étant la quantité d'acide lactique ou de biomasse produite à chaque instant sur la quantité consommée de lactose au même instant :

$$Y_{x/s} = \frac{X(t+1) - X(t)}{S(t) - S(t+1)}$$

et
$$Y_{p/s} = \frac{P(t+1) - P(t)}{S(t) - S(t+1)}$$

8.3. Productivités

La productivité volumique P exprime la quantité d'acide lactique obtenue par unité de temps et par unité de volume de fermenteur.

En réacteur discontinu et semi-continu, elle est définie par le rapport : $\frac{P_f}{t_f}$, P_f et t_f étant la concentration finale et le temps de fin de fermentation respectivement.

En réacteur continu, à l'état stationnaire, elle est définie par la vitesse de production d'acide lactique : r_p

8.4. Calcul du bilan carboné

Le bilan carboné permet de tester la validité des résultats de la fermentation. Il permet de comparer la quantité de carbone apportée en début et pendant la fermentation avec la quantité retrouvée à la fin de la manipulation.

Mode de calcul :

Lactose: $C_{12}H_{22}O_{11}$ pM = 342g carbone 144g soit 42%
: 1g de lactose correspond à 420 mg de carbone

Acide lactique : $C_3H_6O_3$ pM = 90g
: 1g d'acide lactique correspond à 533 mg de carbone

9. MODELISATION DES FERMENTATIONS DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES

La modélisation des fermentations en discontinu et en semi-continu a été réalisée sur une station de travail SUN à partir d'un modèle fonctionnant en discontinu. Les équations ont été modifiées pour simuler une culture semi-continue. Les résultats obtenus ont été comparés avec les résultats expérimentaux.

Principales équations différentielles :

* Variation de la biomasse.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt}$$

* Variation de la concentration en lactose.

$$\frac{dS}{dt} = \sigma \cdot X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} \right) + \left(\frac{Q \cdot S_a}{V} \right)$$

* Variation de la concentration en acide lactique.

$$\frac{dP}{dt} = \pi \cdot X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V} \right)$$

En réacteur discontinu, les équations sont identiques mise à part l'équation de bilan en substrat dans laquelle le terme d'alimentation est nul.

10. APPAREILS

La liste des principaux appareils utilisés est la suivante :

Microbiologie :

- hotte à flux laminaire S.I.B.M. PLASTECH
- étuve bactériologique JOUAN (EB 55)
- microscope OLYMPUS (BH-2)

Préparation du milieu :

- balance PRECISA (1000-3000D), SARTORIUS
- balance de précision METTLER (AE 240)
- pH-mètre CORNING (ION ANALYSER 250)
- autoclave S.M.I. (136 X)

Fermenteurs :

- 21 SGI avec système d'agitation, de régulation de température et de pH
- 101 MALTON avec un système d'agitation (HEIDOLPH), une sonde pH (INGOLD 10 405 4483) et une sonde de température (MATON). Ces trois derniers éléments sont reliés à des modules électroniques qui permettent de réguler le pH, la température et la vitesse d'agitation dans le fermenteur. La température est contrôlée grâce à une résistance électrique externe et une pompe (MATON lesquin TH 50LF52). Le pH est maintenu à la valeur optimale par injection d'une base à l'aide d'une pompe à membrane (HANNA INSTRUMENT DP 7916)
- pompe multicanaux ISMATEC
- bain thermostaté BIOBLOCK (Polystat 22)

Analyses :

- étuve à matière sèche CHAIX
- centrifugeuse JOUAN (M14-11)
- spectrophotomètre LKB (Biochrom Novaspec 4049)
- spectrophotomètre PYE UNICAM SP8-100 ultraviolet
- HPLC WATERS ASSOCIATE avec un injecteur U6K, système de pompe 600A, réfractomètre différentiel 401, spectrophotomètre à ultraviolet 481, four COL-HTR et Polypore H (25cmX7mm). La durée de l'analyse est réalisée en 12 minutes.
- analyseur de glucose et d'acide lactique modèle YSI 2000 (BIOBLOCK)

Traitement des données :

- ordinateurs SUN (3/60)
- MACINTOSH II

**III. INFLUENCES DES PRINCIPAUX
PARAMETRES SUR LA PRODUCTION
D'ACIDE LACTIQUE PAR
Lactobacillus casei SUR LACTOSERUM**

....et l'on cherche souvent
plus que l'on ne veut
trouver.

MOLIERE

**III. INFLUENCES DES PRINCIPAUX PARAMETRES SUR
LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR
Lactobacillus casei SUR LACTOSERUM**

1.	SELECTION DE SOUCHE.....	73
1.1.	Test d'acidification	73
1.2.	Sélection en réacteur contrôlé	74
1.3.	Essais d'utilisation de souches adaptées à de fortes concentrations d'acide lactique.....	76
1.4.	Essai de culture à température élevée.....	78
1.5.	Conclusion	79
2.	INFLUENCE DES ELEMENTS ESSENTIELS SUR LA CINETIQUE DE <i>L. casei</i>.....	80
2.1.	Mise en évidence des besoins nutritionnels	82
2.2.	Influence de l'extrait de levure.....	84
2.3.	Influence du manganèse et magnésium	84
2.4.	Influence du Tween 80	86
2.5.	Conclusions.....	88
3.	REPLACEMENT DE L'EXTRAIT DE LEVURE	90
3.1.	Importance de l'extrait de levure en poudre.....	90
3.2.	Remplacement de l'extrait de levure par un lysat acide ou une solution issue d'une sonication de <i>L. casei</i> supplémentée en vitamines	92
3.3.	Remplacement de l'extrait de levure en poudre par de l'extrait de levure liquide	94
3.4.	Conclusions.....	96
4.	INFLUENCE DE L'ORIGINE DU LACTOSERUM.....	98
5.	INFLUENCE DE L'INOCULUM.....	100

6. INFLUENCE DU PRETRAITEMENT PHYSICOCHEMIE DU MILIEU	101
6.1. Influence prétraitement (pH et durée) sur les cinétiques des fermentations	102
6.2. Explication de l'action du prétraitement sur les performances des fermentations	107
6.3. Conclusions	112
7. INFLUENCE DE LA BASE REGULATRICE.....	114
CONCLUSIONS.....	115

Pour optimiser la cinétique de croissance et de production d'acide lactique sur lactosérum, nous devons suivre l'influence des différents paramètres opératoires.

Les travaux débiteront par une sélection d'une bactérie lactique capable de transformer le lactose du lactosérum en acide L(+) lactique.

Dans un deuxième temps, nous suivrons l'influence de l'ajout de différents éléments (extrait de levure, sels minéraux et tween 80) dans le milieu de culture sur le développement et la production d'acide lactique. Nous compléterons ces travaux par une étude plus détaillée de l'extrait de levure. Nous étendrons notre recherche à d'autres sérums. Nous étudierons les performances de production d'acide lactique sur un sérum acide ou doux.

Par la suite, nous suivrons l'importance des conditions de déroulement de l'inoculum, du prétraitement du milieu, du choix de la base régulatrice sur la cinétique de développement et de production.

1. SELECTION DE SOUCHE

La bactérie idéale pour la production d'acide lactique à partir de lactosérum doit obéir aux critères suivants :

- consommer le lactose,
- ne pas accumuler le glucose ou le galactose,
- ne pas être inhibée par de fortes concentrations en lactose,
- être homofermentaire,
- produire et résister aux fortes concentrations d'acide lactique,
- produire uniquement la forme L(+) de l'acide lactique en vue d'une application alimentaire,
- vitesse et rendement de production les plus élevés.

Les travaux de sélection ont été réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Biologique I (Faculté des sciences de Nancy I). La recherche a porté sur un test d'acidification, sur une sélection en réacteur contrôlé et l'adaptation des souches aux fortes concentrations d'acide lactique.

1.1. Test d'acidification

Cette sélection est faite en mesurant la cinétique d'acidification des différentes souches cultivées en fiole sur milieu à base de perméat de lactosérum. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de différencier rapidement et avec une mise en œuvre simplifiée un grand nombre de souches.

Vingt souches de *Lactobacillus* provenant de différentes collections sont testées sur un milieu composé de poudre de perméat de lactosérum (250 g/l correspondant à 210 g/l de lactose), d'extrait de levure (5 g/l) ; la température d'incubation est comprise entre 35 et 44°C selon la température optimale de la souche étudiée, le pH initial est de 6,5, l'inoculation est faite à raison de 10^9 cellules/ml.

Les souches étudiées appartiennent aux genres *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* et *L. casei* subsp. *rhamnosus*.

Afin de comparer l'ensemble des souches, trois critères sont pris en compte. Le critère ΔpH correspond à l'écart de pH entre le temps initial et la fin de la culture : il permet de déterminer le pouvoir d'acidification globale de la souche (**figure III.1**).

Le second se résume par la vitesse globale d'acidification obtenue en divisant $\frac{\Delta\text{pH}_{\text{max}}}{2}$ par le temps nécessaire à l'obtention de $\frac{\Delta\text{pH}_{\text{max}}}{2}$; ce critère donne une indication de la vitesse d'acidification de la souche (**figure III.2**).

Le dernier concerne le pouvoir inhibiteur de l'acide lactique sur l'acidification du milieu ; ce critère est calculé en divisant le temps d'obtention du demi-écart maximum de pH par le temps d'obtention de l'écart maximum (**figure III.3**). Si ce critère est faible, cela signifie que la souche, bien que poursuivant son activité à ces concentrations élevées, est fortement inhibée par l'acide produit.

A l'issue de cette première série d'expérimentations et à partir des trois critères définis, la sélection a conduit à extraire cinq souches parmi les vingt souches initiales ; il s'agit de *Lactobacillus bulgaricus* 1, de *L. acidophilus* 1, de *L. helveticus* 1 et des deux souches de *L. casei*. Pour des raisons de commodité, ces souches seront appelées respectivement LB1, LA1, LH1, LC1 et LC2.

1.2. Sélection en réacteur contrôlé

Aux critères issus des courbes d'acidification, viennent se greffer d'autres paramètres visant à éviter de produire un mélange racémique. L'objectif premier est qu'aucun produit autre que l'acide L(+) lactique ne doit apparaître dans le milieu de culture durant la fermentation. De plus, il ne doit pas y avoir d'accumulation d'un des deux oses formant le lactose (glucose et galactose) afin d'éviter des pertes de rendement. Le suivi par analyse des fermentations confirmera que la souche répond bien à toutes ces conditions.

Suite à ces études d'adaptation aux fortes concentrations en acide, nous pourrons par la suite mesurer les capacités des bactéries à se développer sur un milieu contenant de fortes concentrations d'acide lactique.

Parmi les 5 souches testées à 250g/l de perméat de lactosérum, LB1 ne produit que de l'acide D(-)lactique, cette souche est donc éliminée; LA1 et LH1 produisent un mélange D-L ; le pourcentage mesuré L/(D+L) étant de 17% pour LA1 et de 94% pour LH1, LA1 est éliminée, LH1 est conservée dans un premier temps bien qu'une accumulation de galactose et de glucose soit remarquée durant la fermentation.

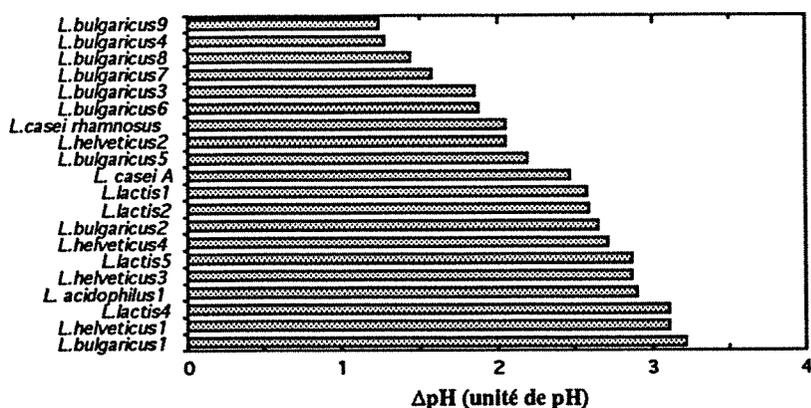


Figure III.1 : ΔpH pour l'ensemble des souches sélectionnées

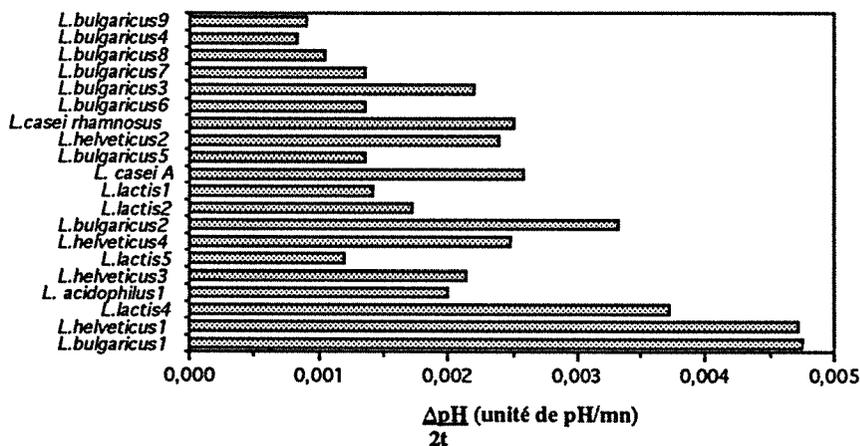


Figure III.2 : ΔpH/2t pour l'ensemble des souches sélectionnées

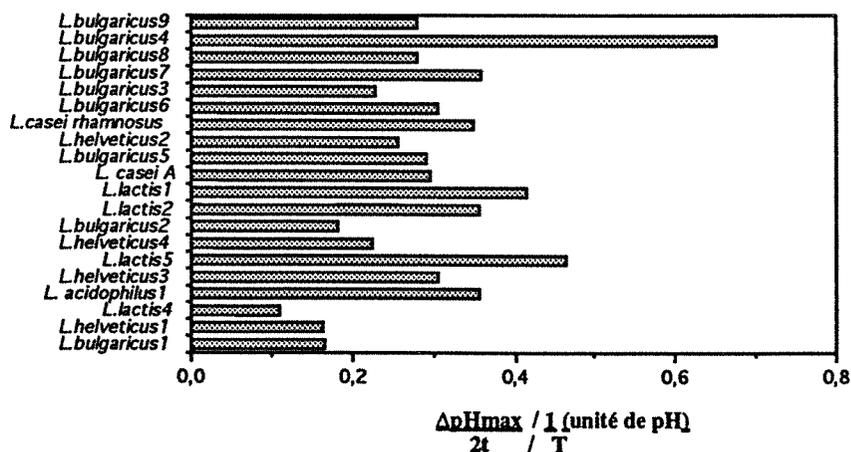


Figure III.3 : ΔpH/(2t.T) en fonction des souches à sélectionner

Concernant LC1 et LC2, les rendements sont faibles, indiquant que ces souches sont, dans ces conditions de culture, hétérofermentaires. Par contre, seul de l'acide L(+)lactique est produit et il n'y a pas d'accumulation de glucose ou galactose dans le milieu.

En diminuant la concentration initiale de lactosérum, les caractéristiques de LH1 sont similaires avec 100g/l de substrat : racémique L-D à majorité L, accumulation de glucose et de galactose dans le milieu. LC1 n'a pas pu consommer la totalité du lactose ; le rendement de conversion de 82% met en évidence une possible production d'autres métabolites. LC2 a consommé la totalité du lactose, le rendement de 96% est caractéristique d'un comportement homofermentaire. La production d'acide L(+)lactique n'est pas accompagnée d'accumulation de glucose ou de galactose.

LC2 est la souche sélectionnée. Cependant, les résultats montrent que cette souche est homofermentaire facultative, c'est-à-dire qu'en fonction des conditions de culture, elle pourra soit produire exclusivement l'acide L(+) lactique, soit produire d'une manière concomitante d'autres métabolites (homofermentaire à 100 g/l de poudre de perméat, hétérofermentaire à 250 g/l). C'est un point qu'il sera nécessaire de surveiller lorsque d'autres modes de culture seront étudiés.

1.3. Essais d'utilisation de souches adaptées à de fortes concentrations d'acide lactique

Cette étude a pour objectif de tester les performances de souches, soit prélevées en fin de fermentation, soit adaptées à de fortes teneurs en acide lactique. Ces bactéries doivent être capable de se développer sur lactosérum sans connaître des limitations de la croissance et de la production. Ces tests doivent mettre en évidence l'opportunité d'utiliser des microorganismes résistants au principal inhibiteur afin d'accroître les vitesses globales de production.

A l'issue de cette série de tests, les bactéries sélectionnées regroupent une grande partie de ces caractéristiques : résistantes au forte concentration d'acide lactique, n'accumulant pas de glucose ou de galactose, produisant de fortes concentrations d'acide L(+) lactique, sans produire la forme isomérique D(-).

Mais malgré tout, en fin de fermentation une concentration non négligeable de lactose reste présente et de plus nous n'avons pas forcément qu'une production d'acide lactique. Dans certaines conditions, nous avons un déplacement de la fermentation vers une hétérofermentation.

La souche qui ressort de cette première série de sélections est *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (LC2).

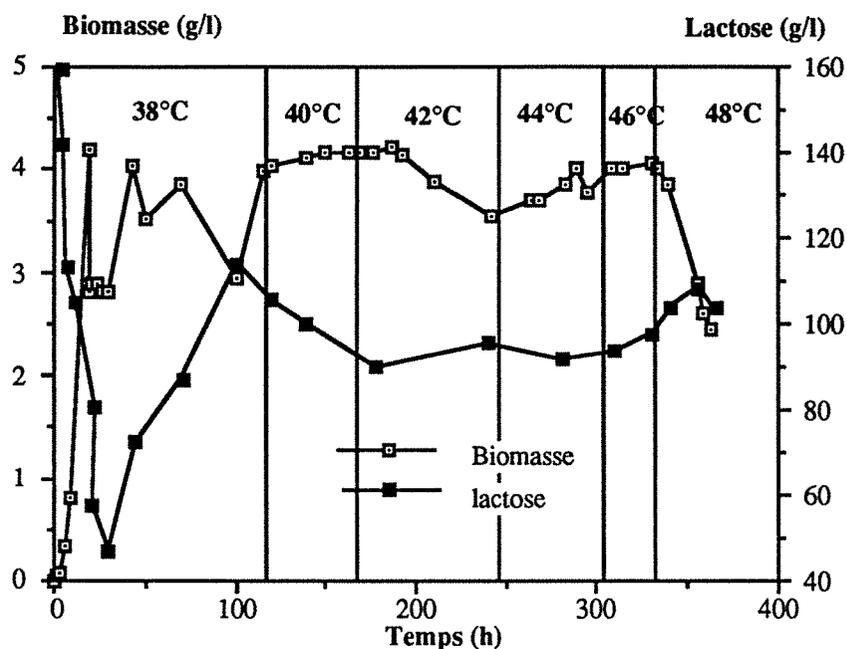


Figure III.4 : Evolution des concentrations de biomasse et de lactose avec le temps à différentes températures de culture en réacteur continu

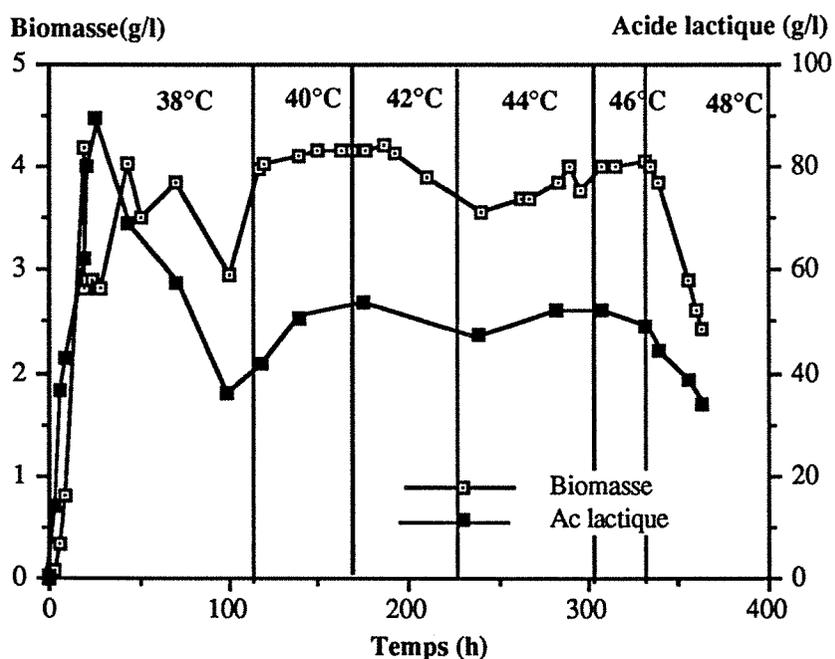


Figure III.5 : Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique en fonction du temps à différentes températures de culture en réacteur continu

1.4. Essai de culture à température élevée

Dans cette partie, nous avons étudié le caractère thermophile de la souche issue de la série de sélection précédente : *L. casei*.

Afin d'exclure tout contaminant du fermenteur, certaines conditions de culture sont à mettre en exergue : traitement thermique du milieu de culture, maintien d'une forte teneur en acide lactique induisant une inhibition des contaminants éventuels et température de fermentation la plus élevée possible pour éliminer la plupart des souches mésophiles.

La souche *L. casei* possède une température optimale de croissance et de production de 38°C (ALTABA, 1991).

Cette étude a pour objectif de montrer la capacité de cette souche à croître et à produire à des températures supérieures à 38°C et à fixer sa température limite de viabilité.

Pour ce faire, deux expérimentations en réacteur continu ont été menées selon la procédure décrite au cours du **chapitre II 4.2**. Le milieu de culture en plus des éléments décrits au cours du **chapitre II 4.2** comporte 200 g/l de perméat de lactosérum en poudre.

Suite à des travaux de fermentation en continu, le taux de dilution est fixé à 0,03 h⁻¹ pour favoriser la croissance la production d'acide lactique; la température est progressivement portée de 38 à 48°C ; les résultats obtenus sont présentés sur les **figures III.4 et III.5**

Il est remarqué que les concentrations de biomasse, lactose et acide lactique évoluent de façon concomitante; entre 38 et 46°C, il n'y a pas de variation significative de ces trois variables : la biomasse varie entre 3,5 et 4 g/l, le lactose entre 85 et 95 g/l et l'acide lactique entre 50 et 55 g/l ; il est à noter que la diminution des concentrations de biomasse et d'acide lactique aux alentours de la 100^{ème} heure est due à une panne de la pompe d'alimentation de la base régulatrice.

Le rendement Y_p/s varie entre 0,68 et 0,75 ; la souche *L. casei* semble avoir un comportement hétérofermentaire dans ces conditions de culture continue.

Dès qu'on impose au système une température de 48°C, on assiste au lessivage de la culture et une diminution de la production.

La température maximale de croissance et de production d'acide lactique est de 46°C. La souche *L. casei* peut s'adapter à des températures supérieures à sa température optimale à condition de ne pas dépasser 46°C.

En réacteur continu, les performances de la souche en terme de concentration d'acide lactique produit sont peu touchées par l'élévation de la température imposée.

1.5 Conclusion

Cette première partie a permis de sélectionner une souche performante (vitesses et rendements de production) : *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Cette souche possède une bonne aptitude à produire de l'acide L(+)-lactique et ne provoque pas d'accumulation de glucose et de galactose dans le milieu de culture. Elle est homofermentaire facultative ; il est donc nécessaire de vérifier en fonction des conditions de culture, sa possibilité de production d'autres métabolites que l'acide lactique.

Les essais d'adaptation de cette souche à croître dans un environnement de teneur en acide lactique supérieure à 180 g/l ont été infructueux.

Enfin, il a été vérifié que cette souche est capable de se développer et de produire de l'acide lactique jusqu'à une température limite de 46°C.

Mais pour que la souche sélectionnée soit capable de se développer dans de parfaites conditions, le milieu doit comporter l'ensemble des éléments essentiels à sa croissance. Dans la partie qui suit, nous allons suivre l'influence de l'ajout de certains éléments dans le milieu provoqué sur la croissance et la production d'acide lactique.

2. INFLUENCE DES ELEMENTS ESSENTIELS SUR LA CINETIQUE DE *L. casei*

L. casei nécessite de nombreux besoins nutritionnels pour son développement et la production d'acide lactique (DESMAZEAUD, 1991). La présence d'ions Mn^{2+} favorise une meilleure tolérance de *L. casei* en présence d'oxygène et il est considéré comme un cofacteur de la lactate déshydrogénase. Mg^{2+} joue le rôle de régulateur dans le transport du lactose et acide lactique à travers la paroi bactérienne. Les vitamines et facteurs de croissance, présents dans l'extrait de levure, favorisent la bonne régulation du métabolisme et des échanges intra et extracellulaires. Il a été démontré que le Tween 80 peut substituer par la biotine (LEDESMA et coll., 1977) et que les propriétés des surfactants permettent en outre de favoriser les échanges intercellulaires.

La mise en œuvre de fermentations lactiques nécessite de compléter le perméat de lactosérum par des éléments indispensables à la croissance du microorganisme et à la production d'acide lactique.

L'étude du milieu de culture a pour but de suivre l'influence des différents éléments sur la croissance et la production d'acide lactique.

Dans un premier temps, nous allons mettre en évidence les besoins nutritionnels de la souche. Nous suivons les performances de *L. casei* à produire de l'acide lactique et à se développer sur un perméat de lactosérum pourvu ou non des différents éléments essentiels.

Par la suite, nous allons tester la présence dans le milieu des différents éléments essentiels sur la croissance de *L. casei* et à la production d'acide lactique par la technique d'impulsion et échelon en réacteur continu.

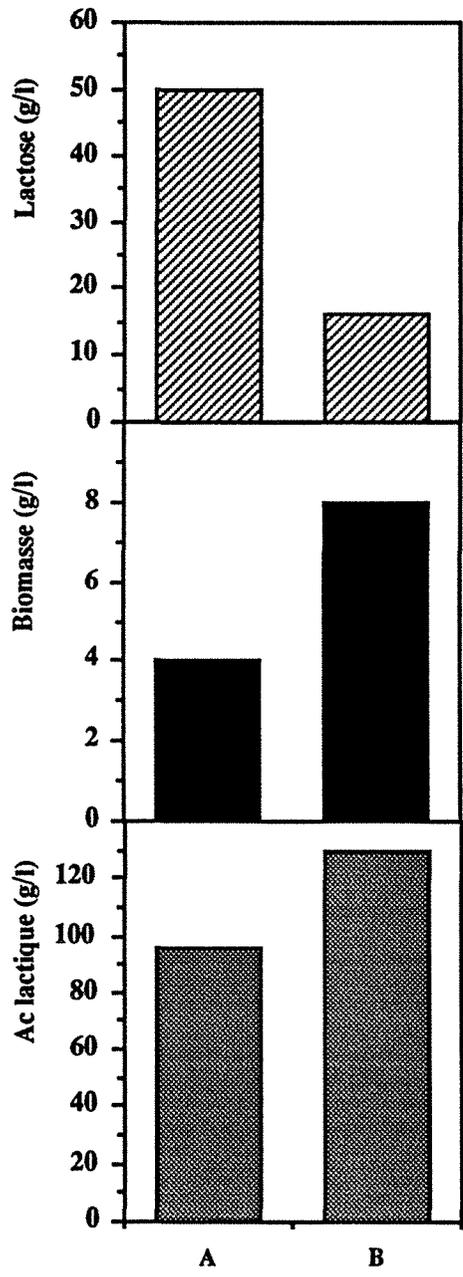


Figure III.6 a : Concentrations de biomasse, du lactose et d'acide lactique en fin de fermentation discontinue sur milieu pauvre (A) et riche (B)

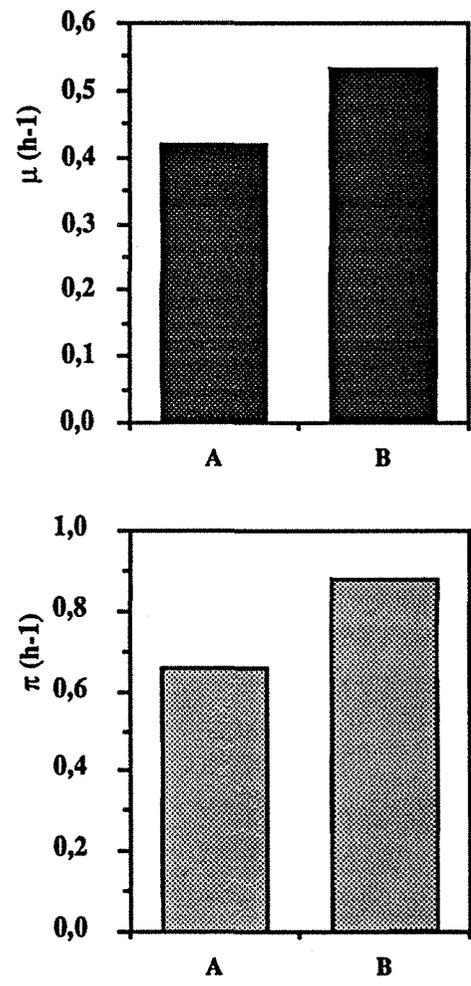


Figure III.6 b : Vitesses spécifiques maximales de croissance (μ) et de production (π) sur milieu pauvre (A) et riche (B)

2.1. Mise en évidence des besoins nutritionnels

La première étape consiste à étudier les performances de cette souche sur deux milieux de composition différente :

- milieu A : milieu contenant uniquement un perméat de lactosérum
- milieu B : milieu contenant du perméat de lactosérum et tous les éléments essentiels en excès : des ions Mn^{2+} (0,5g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$), Mg^{2+} (0,4g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$), de l'extrait de levure (5g/l d'EL) et du Tween 80 (1ml/l de Tween 80). Les **figure III.6 a et b** montrent les concentrations de lactose, de la biomasse et de l'acide lactique et vitesses spécifiques de croissance et de production lors d'une culture en discontinue de *L. casei* sur les milieux A et B.

La production maximale de biomasse atteinte en fin de fermentation est de 4,0 et 8,0g/l respectivement pour les milieux A et B. La vitesse spécifique maximale de croissance est plus élevée sur B ($\mu_{max} = 0,53h^{-1}$) que sur A ($\mu_{max} = 0,42h^{-1}$).

Concernant le lactose, source de carbone, il n'est pas totalement consommé en fin de fermentation discontinue sur le deux milieux. Il reste 50g/l de lactose sur A contre 16g/l sur le milieu B.

Les productions d'acide lactique sont différentes selon le milieu de départ. Les concentrations finales sont de 130g/l sur milieu B et de 96g/l sur milieu A avec une productivité volumique et spécifique respectivement de 0,51g/l.h et de 0,42g/l.h ; 0,88 h^{-1} et 0,66 h^{-1} .

Ces travaux montrent l'importance de l'ajout des différents éléments dans le perméat de lactosérum. Sans ces produits les performances de production d'acide lactique sont diminuées.

La suite des travaux va consister à suivre l'influence des différents éléments du milieu B, tout en conservant les mêmes performances de production d'acide lactique.

Pour y parvenir, nous utiliserons deux techniques : celle de l'injection d'un élément manquant (technique d'impulsion) et celle de l'augmentation progressive de la concentration de l'élément à tester (technique échelon) dans le milieu de fermentation. Ce travail est réalisé en fermentation continue avec un taux de dilution faible pour mettre la souche dans des conditions de fortes productions d'acide lactique tout en maintenant un excès de lactose dans le milieu de fermentation.

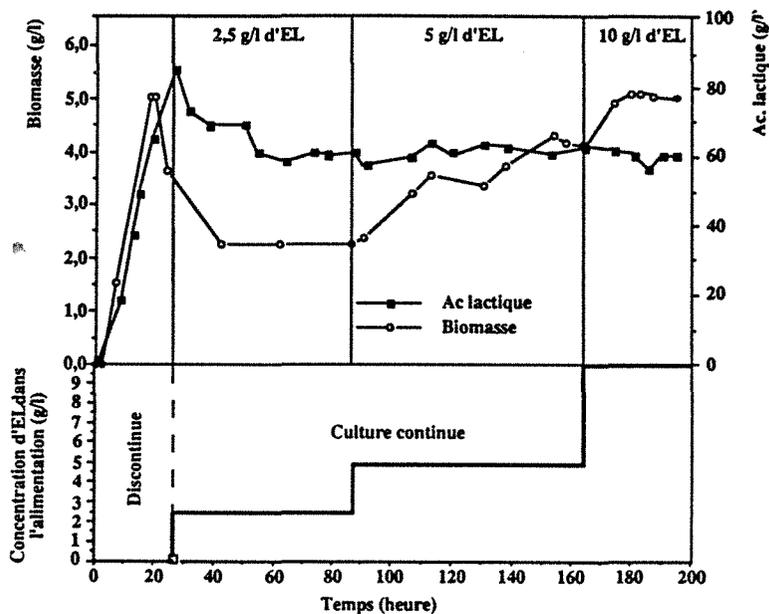


Figure III.7 : Evolution de la biomasse et de l'acide lactique durant une expérience échelon d'EL

(Taux de dilution $0,04^{-1}$, composition du milieu discontinu et continu : 200g/l de perméat de lactosérum; 1ml/l de Tween 80; 0,5g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,4g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

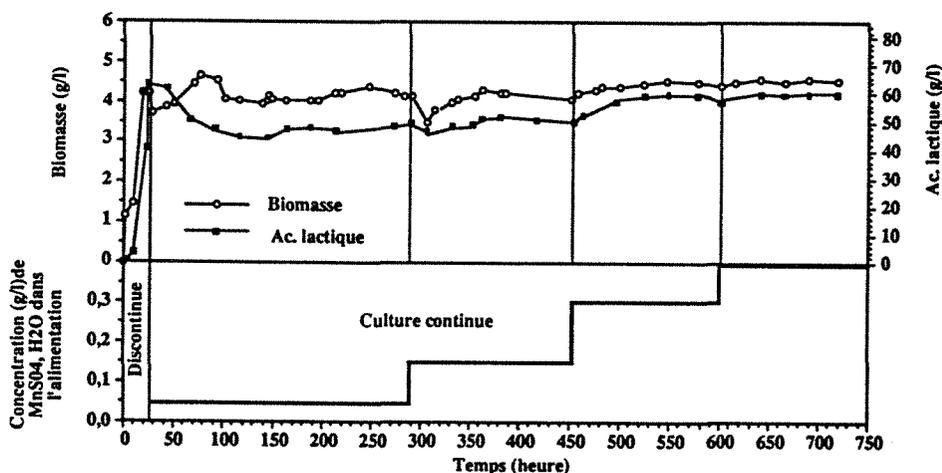


Figure III.8 : Evolution de la biomasse et de l'acide lactique durant une expérience échelon de $MnSO_4 \cdot H_2O$

(Taux de dilution $0,04^{-1}$, composition du milieu discontinu et continu : 200g/l de perméat de lactosérum; 1ml/l de Tween 80; 0,4g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 3,0g/l d'EL)

2.2. Influence de l'extrait de levure (EL)

Une culture discontinue à base de milieu B sans EL est démarrée. A la 23^{ème} heure, l'alimentation et le soutirage sont mis en marche avec un milieu d'alimentation contenant 2,5g/l d'EL à un taux de dilution de $0,04h^{-1}$. La **figure III.7** montre l'évolution des différentes concentrations en fonction du temps ainsi que la courbe de l'évolution de la concentration en EL dans le milieu d'alimentation.

Après 60h la biomasse et la production en acide lactique se stabilisent à 2,2g/l et 60g/l respectivement. A 86h la concentration en EL dans le milieu d'alimentation passe à 5g/l ce qui provoque une augmentation de la biomasse jusqu'à 3,5g/l et peu de changement de la concentration en acide lactique.

L'EL est amené à 10g/l à la 164^{ème}h, la concentration en biomasse augmente jusqu'à 4,5g/l et la concentration en acide lactique reste stable à 58g/l.

L'EL influence la croissance et provoque peu de changement sur la production d'acide lactique. Pour la suite des travaux, la concentration en EL est fixée à 3,0g/l dans le milieu d'alimentation car un ajout supérieur d'EL n'entraîne pas de grand changement sur la production de biomasse et d'acide lactique.

2.3. Influence du manganèse et magnésium

Le test sur les ions débute avec le manganèse. Une culture en discontinu sans Mn^{2+} se déroule pendant 25h, suivie d'une fermentation continue avec des ajouts en échelon (**figure III.8**).

Jusqu'à la 238^{ème}h un milieu nutritif avec 0,05g/l de $MnSO_4$, H_2O alimente le fermenteur entraînant une stabilisation de la biomasse à 4,1g/l et une production d'acide lactique de 52g/l. A la 288^{ème}h, le passage à 0,15g/l de $MnSO_4$, H_2O ne provoque aucun changement alors que 0,3g/l à la 454^{ème} heure fait augmenter la biomasse jusqu'à 4,4g/l et l'acide lactique jusqu'à 60g/l. Une forte concentration de $MnSO_4$, H_2O (0,4g/l) n'entraîne plus aucun changement de ces deux paramètres.

Comme le lactosérum utilisé ne contient pas de Mn^{2+} , l'addition de cet élément est indispensable pour l'optimisation de la production d'acide lactique. Les études suivantes se feront avec une concentration de 0,3g/l de $MnSO_4$, H_2O .

L'étude sur le magnésium est réalisée par la technique d'impulsion; sans aucun ajout de cet ion dans le milieu de culture et dans le milieu d'alimentation du continu débuté 25h après inoculation du fermenteur (**figure III.9**).

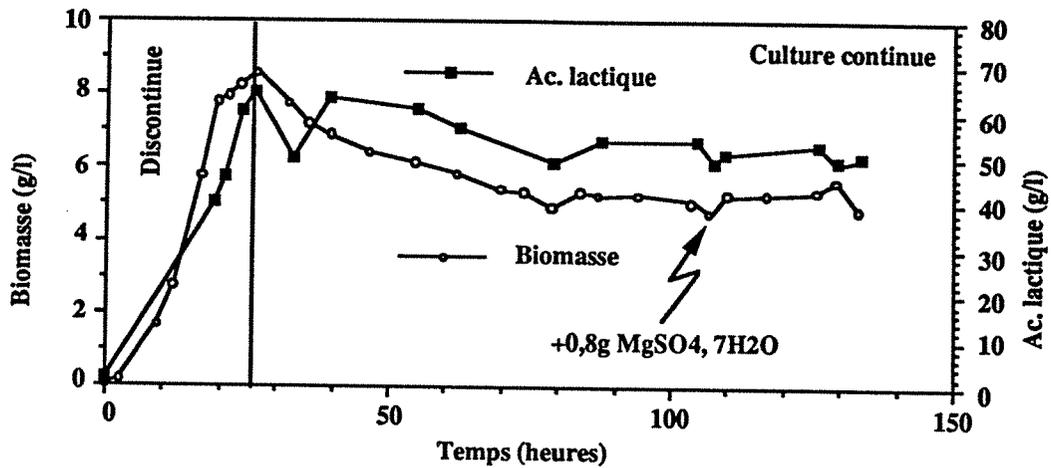


Figure III.9 : Evolution de la biomasse et de l'acide lactique durant une expérience impulsion de $MgSO_4, 7H_2O$

(Taux de dilution $0,04^{-1}$, composition du milieu discontinu et continu : 200g/l de perméat de lactosérum; 1ml/l de Tween 80; 0,3g/l de $MnSO_4, H_2O$; 3g/l d'EL)

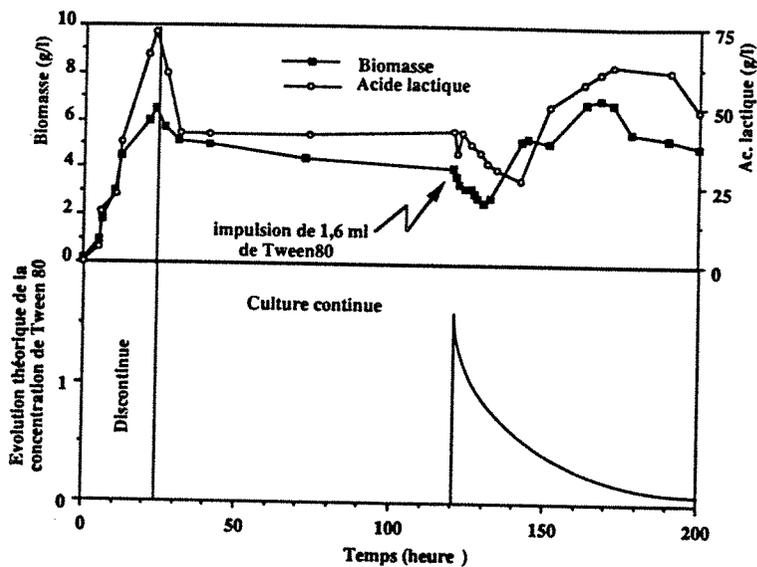


Figure III.10 : Evolution de la biomasse et de l'acide lactique durant une expérience impulsion de Tween 80

(Taux de dilution $0,04^{-1}$, composition du milieu discontinu et continu : 200g/l de perméat de lactosérum; ; 0,3g/l de $MnSO_4, H_2O$; 3g/l d'EL)

A la 100^{ème}h, 0,8g/l de MgSO₄, 7H₂O est injecté par litre de fermenteur. La biomasse et la production d'acide lactique se stabilisent respectivement à 4,3g/l et 58g/l puis chutent brusquement à 0,2g/l et 6g/l après injection. 9 heures après, ces deux concentrations reviennent à leur valeurs initiales. L'ajout de cet élément ne provoque pas d'augmentation de la productivité. La composition du perméat de lactosérum montre une présence importante de Mg²⁺ (0,72g dans de 200g de lactosérum). Cette concentration est suffisante pour répondre à la demande bactérienne. Ainsi, pour la suite des travaux, la composition du milieu de culture se fera sans MgSO₄, 7H₂O.

2.4. Influence du Tween 80

Une fermentation continue est démarrée selon les mêmes procédures que précédemment. Le réacteur est alimenté, après 23h de culture discontinue, par un milieu ne contenant pas de Tween 80. La **figure III.10** montre l'évolution de la concentration de la biomasse, du lactose et du Tween 80 théorique. Le bilan de l'élément ajouté, suite à une impulsion, en réacteur continu après intégration différentielle donne une expression de la

concentration de la forme suivante :

$$C = C_0 e^{-\frac{Q}{V}t}$$

(C₀ : oncentration initiale (g/l), V: volume du fermenteur (l), Q : débit (l/h) et t : temps (h))

Après la 120^{ème} heure, quand les concentrations d'acide lactique (44g/l) et de la biomasse (3,9g/l) se stabilisent, nous injectons 1,6ml/l de Tween 80 dans le fermenteur. Quand la concentration théorique de Tween 80 décroît de 1,6ml/l à 0,8ml/l, la concentration de la biomasse et d'acide lactique passe respectivement à 2,6g/l à la 130^{ème} heure et à 27g/l à la 140^{ème} heure. Entre 0,7 et 0,2ml/l de Tween 80 théorique, la biomasse et l'acide lactique augmentent respectivement à 7g/l à la 168^{ème} heures et 69g/l à la 178^{ème} heure. En dessous de 0,2ml/l de Tween 80 théorique les concentrations de biomasse et d'acide lactique tendent à revenir vers les concentrations initiales avant impulsion. Cette première expérience montre que le Tween 80 a deux effets antagonistes sur *L. casei* : croissance et production sont inhibées au dessus de 0,8ml/l et augmentées entre 0,3 et 0,7ml/l.

Une autre expérience est réalisée dans le but d'optimiser la concentration de Tween 80 (**figure III.11**). Une culture continue est démarrée après 38 heures de fermentation discontinue et la concentration de Tween 80 dans l'alimentation est augmentée de 0,2ml/l à chaque fois. Quand la phase stationnaire est atteinte à la 100^{ème} heure, l'alimentation est changée avec 0,4ml/l de Tween 80. La concentration d'acide lactique augmente jusqu'à 40g/l alors que la biomasse reste inchangée. Avec 0,6ml/l de Tween 80, la biomasse augmente pour arriver à 7g/l et cette fois la concentration d'acide lactique ne change pas. Une forte concentration de Tween 80 (0,8ml/l) provoque la chute de la concentration de la biomasse (5,5g/l) et d'acide lactique (26g/l) à la 400^{ème} heure.

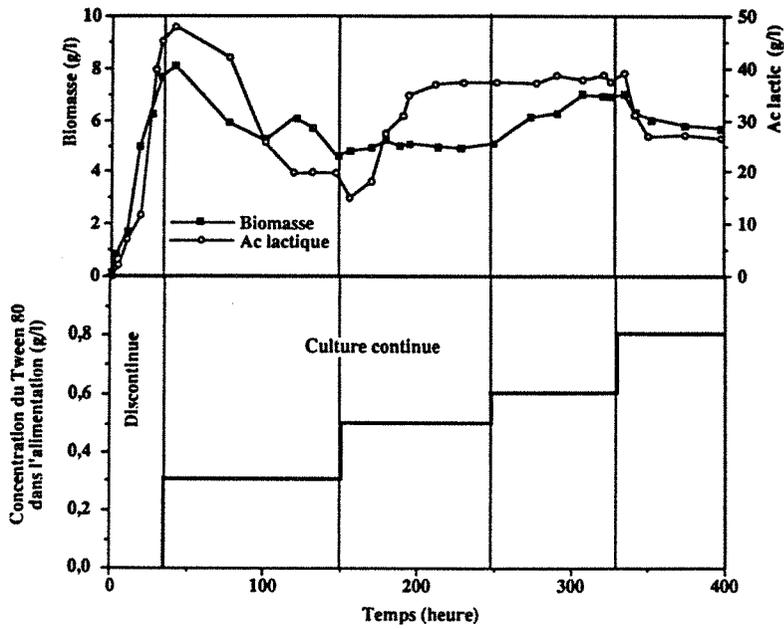


Figure III.11 : Evolution de la biomasse et de l'acide lactique durant une expérience échelon de Tween 80
 (Taux de dilution $0,04^{-1}$, composition du milieu discontinu et continu : 200g/l de perméat de lactosérum; ; 0,3g/l de $MnSO_4$, H_2O ; 3g/l d'EL)

Il semble que le Tween 80 favorise le rejet dans le milieu d'acide lactique intracellulaire produit par la bactérie. Le relargage de l'acide lactique diminue les effets inhibiteurs sur la production et la croissance. Une faible concentration de surfactant ne crée pas de "pore" dans la membrane, d'où une accumulation d'acide lactique et un effet inhibiteur sur la croissance et la production. Au contraire, une forte concentration pourrait lyser les bactéries.

La concentration idéale de 0,5ml/l de Tween 80 dans le milieu de fermentation est maintenue pour la suite des travaux.

2.5. Conclusions

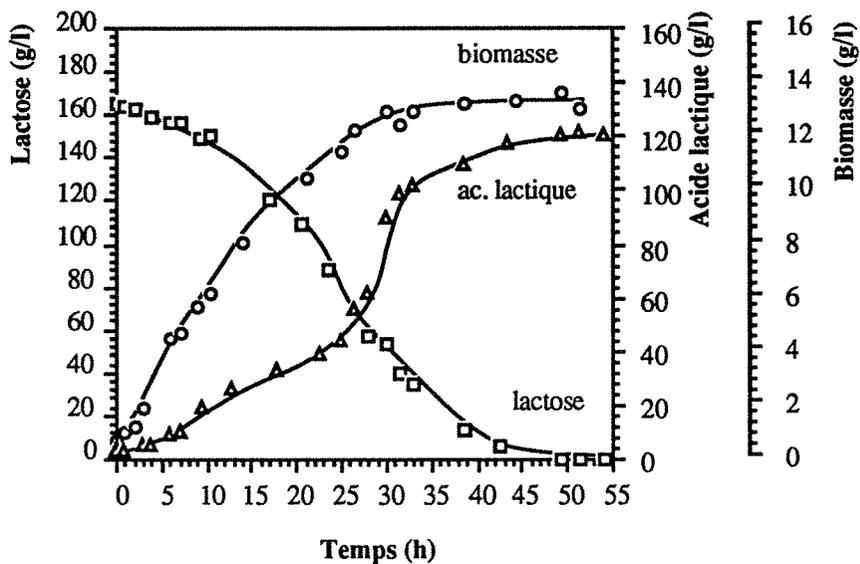
Suite aux expériences sur l'influence des différents éléments nutritifs, un milieu avec 200g/l de perméat de lactosérum a besoin pour favoriser la croissance et la production d'acide lactique d'EL, de $MnSO_4$, H_2O et de Tween 80.

L'EL est un produit très complexe apportant à la bactérie de nombreux éléments (vitamines, nucléotides, protéines, peptides et acides aminés). La présence de 3g/l d'EL est suffisante pour favoriser une bonne croissance de la bactérie et production d'acide lactique.

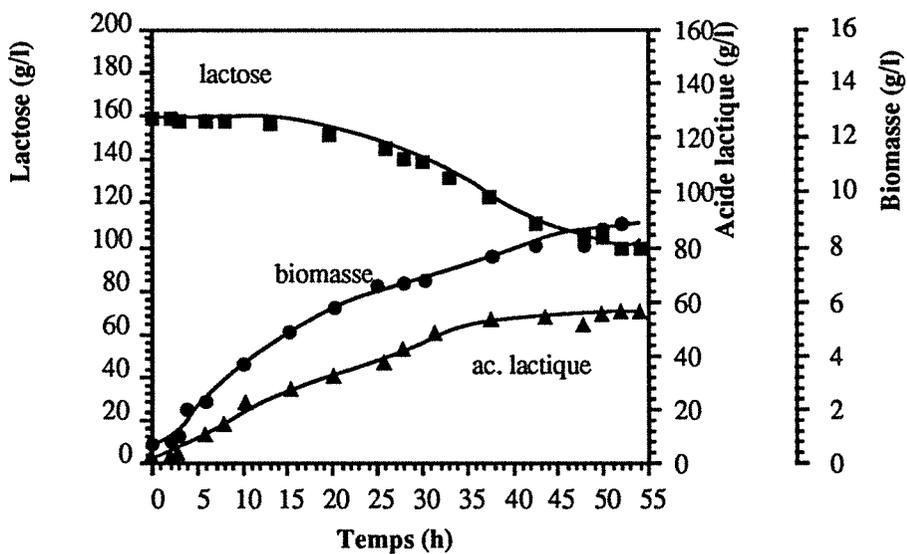
Le Tween 80 favorise probablement la libération de l'acide lactique dans le milieu. Un excès (0,8ml/l) provoque une chute de la concentration de la biomasse et de l'acide lactique.

Par contre, une trop faible quantité de Tween 80 (<à 0,2ml/l) n'est pas suffisante pour favoriser le rejet d'acide lactique intracellulaire dans le milieu.

Les sels minéraux ont des rôles bien spécifiques pour la tolérance à l'oxygène, comme cofacteur de la lactate déshydrogénase et pour le transport du lactose à travers la membrane. La présence du magnésium n'est pas indispensable, car le lactosérum en possède déjà. Le manganèse doit être présent dans le milieu de fermentation avec seulement 0,3g/l pour favoriser la production d'acide lactique.



(a)



(b)

Figure III.13 : Culture discontinue en présence de 3g/l d'extrait de levure (a) et en absence (b)

3. REMPLACEMENT DE L'EXTRAIT DE LEVURE

L'extrait de levure est un élément important pour la production d'acide lactique par *L. casei* sur lactosérum. Cette étude consiste à comparer les différentes formes de l'extrait de levure (poudre ou liquide) et d'envisager sa substitution par un lysat bactérien.

Nous commencerons les travaux par une étude de fermentation avec de l'extrait de levure en poudre. Ces expériences seront considérées comme une référence pour la suite des travaux accomplis avec d'autres lysats de microorganisme. Nous utiliserons des lysats de *L. casei* issus des fermentations. Pour "détruire" ces bactéries lactiques, nous nous servirons de deux techniques : un traitement physicochimique et un traitement aux ultrasons. Nous finirons les travaux par l'étude de remplacement de l'extrait de levure en poudre par une solution d'extrait de levure liquide concentrée. Nous allons suivre, dans cette dernière partie, l'influence que peut avoir l'étape de complète déshydratation (atomisation) de l'extrait de levure sur la cinétique de croissance et de production d'acide lactique.

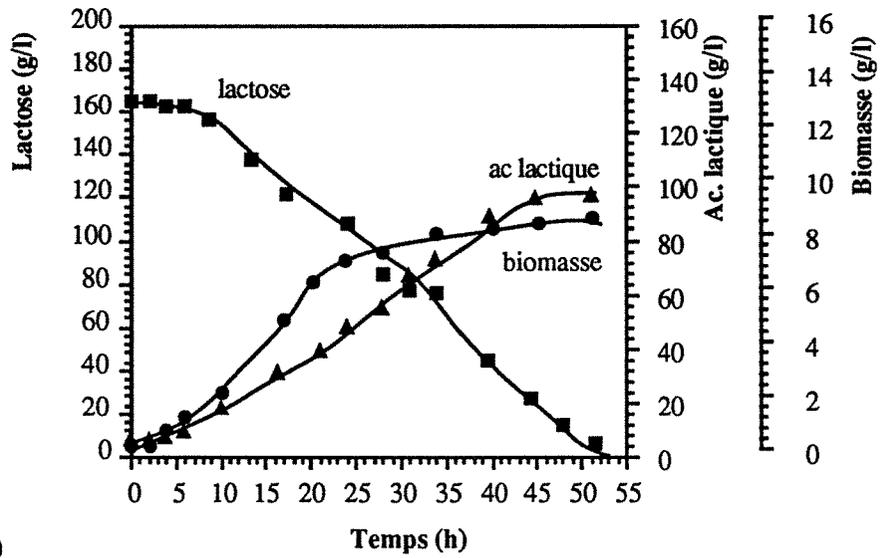
3.1. Importance de l'extrait de levure en poudre

Deux fermentations sont réalisées afin de montrer que l'extrait de levure (EL) utilisé est essentiel pour le développement bactérien et la production d'acide lactique. Suivant les résultats précédents sur l'influence de la composition du milieu de culture (**chapitre III 2.1.**), nous avons établi que la concentration suffisante d'EL en poudre est de 3g/l. Dans un premier temps, nous allons réaliser une fermentation en absence de tout EL suivant les conditions établies dans le **chapitre II. 4.1.** puis comparer ces résultats à une fermentation dans les conditions optimales de milieu de culture.

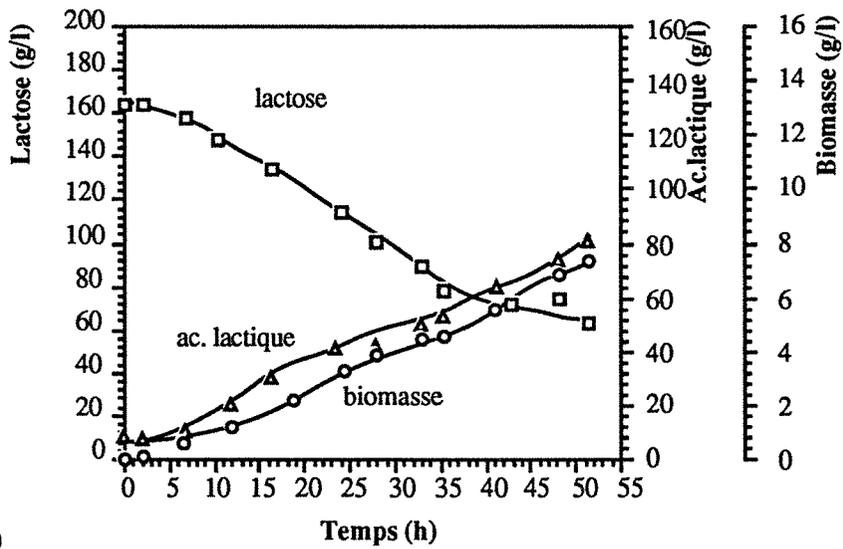
Les **figures III.13 a et b** sont très significatives et montrent l'intérêt de l'ajout d'EL dans le milieu de culture. En présence d'EL, la production de biomasse est de 13,5g/l contre 9,7g/l en son absence. La productivité volumique d'acide lactique passe de 1,1g/l.h à 2,4g/l.h et la vitesse spécifique de croissance baisse de 0,40h⁻¹ à 0,12h⁻¹.

L'évolution du lactose au cours du temps montre que la source de carbone est totalement consommée après 50h quand le milieu contient de l'EL. Seulement 37,5% du lactose initial (soit 100g/l de lactose résiduel) est utilisé par *L. casei* en absence d'EL. La vitesse de consommation volumique et spécifique sont respectivement de 1,2g/l.h et 0,18h⁻¹ contre 3,3g/l.h et 0,64h⁻¹ en présence d'EL dans le milieu.

La concentration maximale d'acide lactique est de 56g/l en absence de l'EL contre 121g/l avec 3g/l d'EL au bout de 50h. La productivité volumique passe de 2,4g/l.h à 1,1g/l.h quand l'EL n'est plus présent dans le milieu. Le rendement de production est



(a)



(b)

Figure III.14 : Culture discontinue en présence d'un extrait d'hydrolysate acide (a) et d'une sonication (b) de *L casei* suppléé en vitamines

supérieur en l'absence d'extrait de levure (93% contre 75%). La vitesse spécifique de production d'acide lactique est plus élevée avec de l'EL dans le milieu ($0,88h^{-1}$ contre $0,66h^{-1}$).

Cette première étude montre que l'ajout d'extrait de levure en poudre est essentiel pour le développement et la production d'acide lactique. Sans ce produit, la production chute de près de 55% et la consommation du lactose n'est pas totale après 50h.

3.2. Remplacement de l'extrait de levure par un lysat acide ou une solution issue d'une sonication de *L. casei* supplémentée en vitamines

Comme l'EL est un produit cher, nous allons essayer de le remplacer par un lysat de lactobacilles et outre cet avantage nous valoriserons en plus les déchets de la fermentation.

Pour remplacer au mieux l'EL, nous devons apporter dans le milieu à la fois des peptides, des bases puriques et pyrimidiques (par un lysat de *L. casei*) et des vitamines. La réutilisation de *L. casei* issu de fermentations précédentes va nous apporter la source d'acides aminés et de bases utile pour la croissance et la production d'acide lactique.

Les travaux de LEDESMA et coll. (1977) ont montré que *L. casei* a besoin de vitamines pour la croissance et la production d'acide lactique, par conséquent nous avons ajouté dans ces deux expériences un mélange de 5 vitamines normalement présent dans l'extrait de levure. Les quantités ajoutées tiennent compte de la quantité relative contenu dans 3g/l d'EL en poudre et des besoins nutritionnels de la souche définie par LEDESMA et coll. (1977).

Compositions du milieu de culture :

- pour la sonication (extrait S) :

5g/l	<i>L. casei</i> soniqué suivant les conditions de chap. II 7.1. (S)	et	1,2mg/l	Pantothénate de calcium (B3)
			0,1mg/l	Ac folique
0,3g/l	MnSO ₄ , H ₂ O		3,0mg/l	Ac nicotinique (PP)
0,5ml/l	Tween 80		0,3mg/l	Pyridoxine (B6)
			0,3mg/l	Riboflavine (B2)
			0,01mg/l	Biotine

- pour l'hydrolyse acide (extrait H) :

5g/l	<i>L. casei</i> hydrolysé suivant les conditions de chap.II.7.1.(H)	et	1,2mg/l	Pantothénate de calcium (B3)
			0,1mg/l	Ac folique
0,3g/l	MnSO ₄ , H ₂ O		3,0mg/l	Ac nicotinique (PP)
0,5ml/l	Tween 80		0,3mg/l	Pyridoxine (B6)
			0,3mg/l	Riboflavine (B2)
			0,01mg/l	Biotine

Les résultats sur le remplacement de l'extrait de levure par *L. casei* sont présentés dans les figures III.14 a et b.

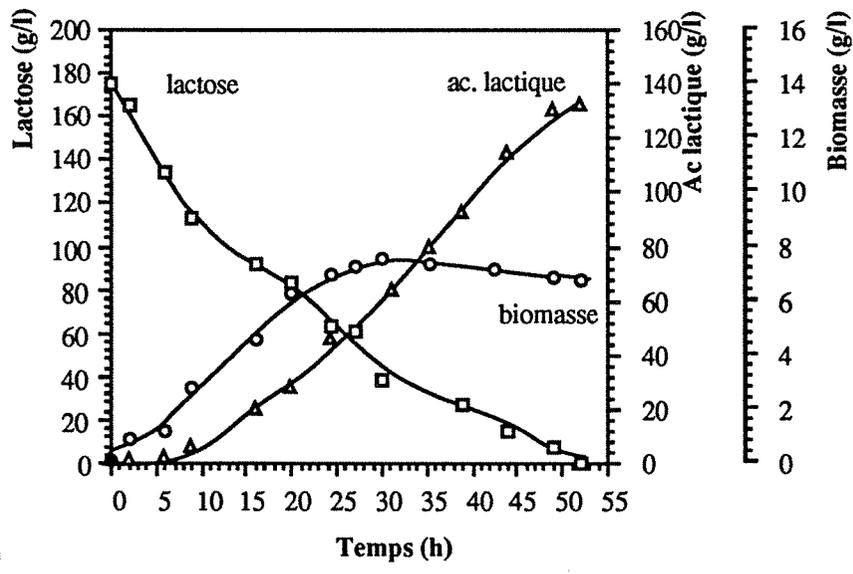
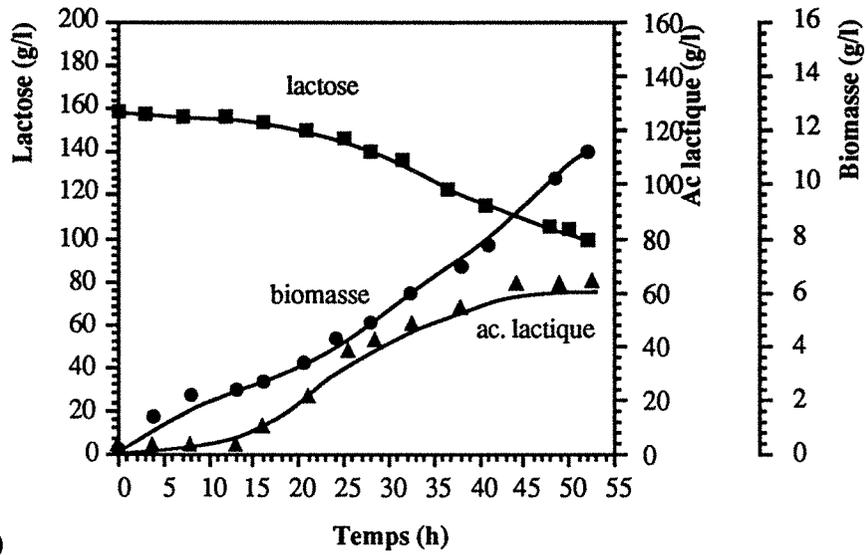


Figure III.15 : Culture discontinue avec 1g/l d'EL liquide (a) et 2g/l d'EL liquide (b)

L'évolution de la biomasse montre que les bactéries se développent moins bien quand l'extrait de levure est remplacé par un hydrolysats (H) ou extrait issu de la sonication (S) de *L. casei*.

La consommation du lactose est différente suivant les conditions. L'utilisation de la source carbone est presque totale avec un extrait H (95%) contre seulement 52% avec un extrait S.

Les figures III.14 a et b montrent que le remplacement d'extrait de levure par une solution H ou S produisent plus d'acide lactique qu'une fermentation sans extrait de levure. Nous avons en fin de culture, 80g/l et 95g/l d'acide lactique pour des milieux contenant respectivement un extrait S et H de *L. casei*. Quand le milieu est sans extrait de levure, nous n'avons que 56g/l d'acide.

L'hydrolyse acide des bactéries libère des peptides et acides aminés dans le milieu. Ces composés, utiles pour le développement et l'activité métabolique de la bactérie, sont disponibles pour le microorganisme. C'est seulement sous la forme de peptides ou d'acides aminés que les protéines peuvent être assimilées par la bactérie (DESMAZEAUD, 1991). Sans cette hydrolyse acide, les protéines de l'extrait S sont hydrolysées par l'activité protéinolytique des enzymes extracellulaires de *L. casei*. Cette activité limite l'assimilation des peptides et acides aminés, d'où une baisse de la production de biomasse, d'acide lactique et de consommation du lactose.

Le remplacement de l'extrait de levure par un hydrolysats acide n'est pas suffisant pour le bon déroulement de la fermentation lactique. La sonication de *L. casei* donne encore de moins bon résultats. Les conditions de remplacement de l'extrait de levure par des extraits de *L. casei* ne sont pas encore optimisées.

3.3. Remplacement de l'extrait de levure en poudre par de l'extrait de levure liquide

L'étude menée dans cette dernière partie avec de l'EL liquide montre les performances d'un produit qui n'a pas subi d'atomisation contrairement à l'EL en poudre.

Plusieurs concentrations d'extrait de levure ont été testées, et les principaux résultats sont présentés dans les figures III.15 a et b. Pour chaque expérience, la quantité d'EL liquide amenée dans le milieu est équivalente en poids sec d'EL solide.

L'ajout d'une quantité variable d'EL liquide montre un changement dans le développement et la production d'acide lactique.

L. casei se développe mieux quand l'EL est à 1,0g/l contre 2,0g/l dans le milieu de culture (11g/l contre 7,2g/l). La vitesse de production spécifique maximale est semblable dans les deux cas $0,23h^{-1}$.

		Og/l d'EL poudre	3g/l d'EL poudre	Extrait S + Vitamines	Extrait H + Vitamines	1g/l d'EL liquide	2g/l d'EL liquide
X (biomasse)	X max (g/l)	9,75	13,50	7,25	8,80	11,10	7,20
	r x (g/l.h)	0,20	0,27	0,15	0,18	0,22	0,14
	Y x/s (%)	16,25	8,00	8,60	5,50	18,50	4,20
	μ_{max} (h-1)	0,12	0,40	0,25	0,24	0,24	0,22
S (lactose)	S r (g/l)	100,00	0,00	64,00	6,00	100,00	0,00
	r s (g/l.h)	1,20	3,34	1,28	3,20	0,64	3,50
	Y _{Sr} /S _t (%)	37,50	100,00	51,20	95,00	37,50	100,00
	σ s (h-1)	0,19	0,64	1,50	1,73	0,25	1,63
P (ac lactique)	P max (g/l)	56,00	121,00	80,00	95,00	62,00	130,00
	r p (g/l.h)	1,12	2,42	1,60	1,90	1,20	2,60
	Y _p /s (%)	93,00	72,50	76,20	59,20	82,60	73,00
	π p (h-1)	0,66	0,88	1,97	1,22	1,02	0,93

Tableau III.1 : Tableau des résultats des fermentations en fonction des diverses conditions de remplacement d'extrait de levure dans le milieu

Comme dans le cas d'une fermentation sans extrait de levure, la consommation de la source de carbone n'est pas totale en présence de 1,0g/l d'extrait de levure. Il reste environ 100g/l de lactose au bout de 50h. Par contre, le substrat est totalement consommé avec 2,0g/l d'EL dans le milieu. Les vitesses de consommations volumiques et spécifiques sont supérieures en présence de 2,0g/l d'EL (0,64g/l.h et $0,24h^{-1}$ contre 3,0g/l.h et $1,6h^{-1}$).

La production d'acide lactique baisse d'environ 70g/l quand le milieu n'a plus que 1,0g/l d'EL (130g/l contre 62g/l) ce qui correspond à la quantité d'acide produite en absence de tout extrait de levure. La productivité volumique d'acide lactique est de 1,2g/l.h et 2,6g/l.h pour les conditions respectives de 1,0g/l et 2,0g/l d'EL.

3.4. Conclusions

Le **tableau III.1** rassemble l'ensemble des résultats des cinétiques de fermentation sur l'étude de remplacement de l'EL.

L'ajout de 3g/l d'EL en poudre ou de 2g/l d'EL liquide favorise la production et productivité volumique d'acide lactique (120 à 130g/l et 2,4 à 2,6g/l.h) et la totale consommation du lactose présent dans le milieu. La poudre, quant à elle, facilite la production de biomasse (13,5g/l). Les rendements de production d'acide lactique sont faibles (72 à 75%) quand la production est élevée. En facilitant la production, nous avons une dérive du métabolisme vers l'hétérofermentation. Par contre sans EL, nous ne produisons plus que 56g/l d'acide lactique avec un rendement de 93%.

La vitesse maximale spécifique de production d'acide lactique est la plus élevée en présence d'une solution en extrait H et S plus vitamines ($1,9$ et $1,2h^{-1}$).

La vitesse spécifique maximale de production de biomasse est la plus élevée en présence de 3g/l d'EL en poudre ($0,4h^{-1}$) et la plus faible en absence d'EL.

Le remplacement par un extrait H ou S de *L. casei* n'est pas suffisant pour favoriser la production d'acide lactique et la croissance de biomasse. L'EL contient des éléments essentiels non retrouvés dans l'extrait S et H : tel que des facteurs de croissances, bases puriques et pyrimidiques et acides aminés.

L'utilisation d'EL liquide favorise la production d'acide lactique au détriment de la production de biomasse. Pour avoir la même production d'acide lactique en fin de fermentation il suffit d'ajouter 2,0g/l pour une solution liquide contre 3,0g/l pour de la poudre.

Il semble que la déshydratation totale de l'extrait de levure en poudre, par atomisation, détériore la qualité de ce dernier. Une solution d'EL liquide est plus appropriée pour la production d'acide lactique. Par contre si nous désirons faciliter la production de biomasse nous devons utiliser de la poudre d'EL.

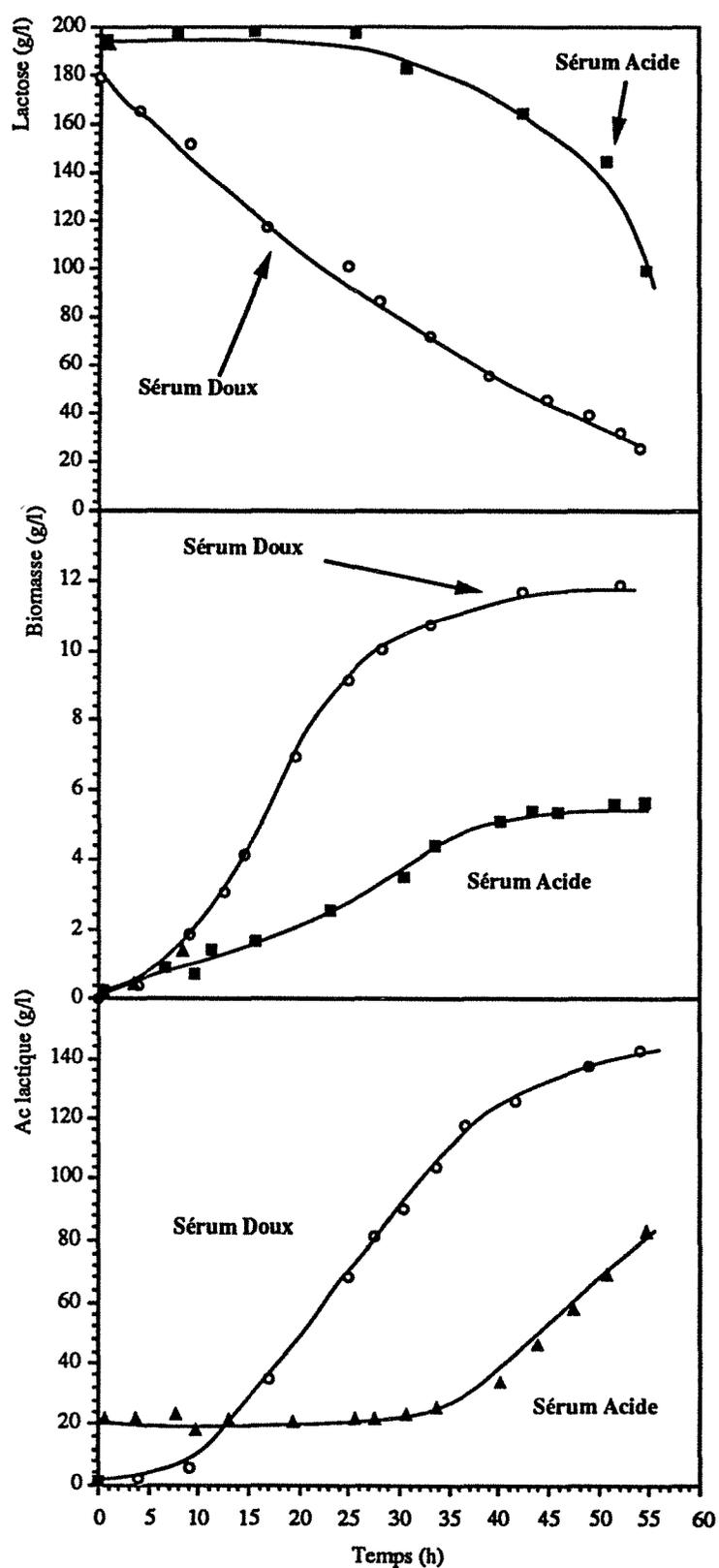


Figure III 16. : Evolution de la concentration de lactose, de la biomasse et de l'acide lactique en fonction d'un lactosérum doux (○) et acide(▲)

4. INFLUENCE DE L'ORIGINE DU LACTOSERUM

Les lactosérums issus des industries fromagères ont des compositions variables suivant le type de fromage. Il est distingué deux types de lactosérum suivant leur acidité : le lactosérum doux et acide. Dans cette partie, nous allons suivre l'influence de l'origine du lactosérum sur la production d'acide lactique et la croissance de la bactérie.

Les milieux sont préparés comme suit : pour 200g/l de lactosérum nous ajoutons 5g/l d'EL, 0,3g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,4g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et 1ml/l de Tween 80.

La **figure III.16.** montre l'évolution de la biomasse, de l'acide lactique et du lactose en fonction du lactosérum doux et acide.

L'évolution de la consommation de lactose est différente suivant l'origine du lactosérum. La consommation démarre rapidement sur lactosérum doux contre près de 26 heures pour le lactosérum acide. Il reste 98g/l de lactose après 54h (soit 50% du lactose consommé) de fermentation sur sérum acide contre 19g/l sur sérum doux (soit 90% de lactose consommé).

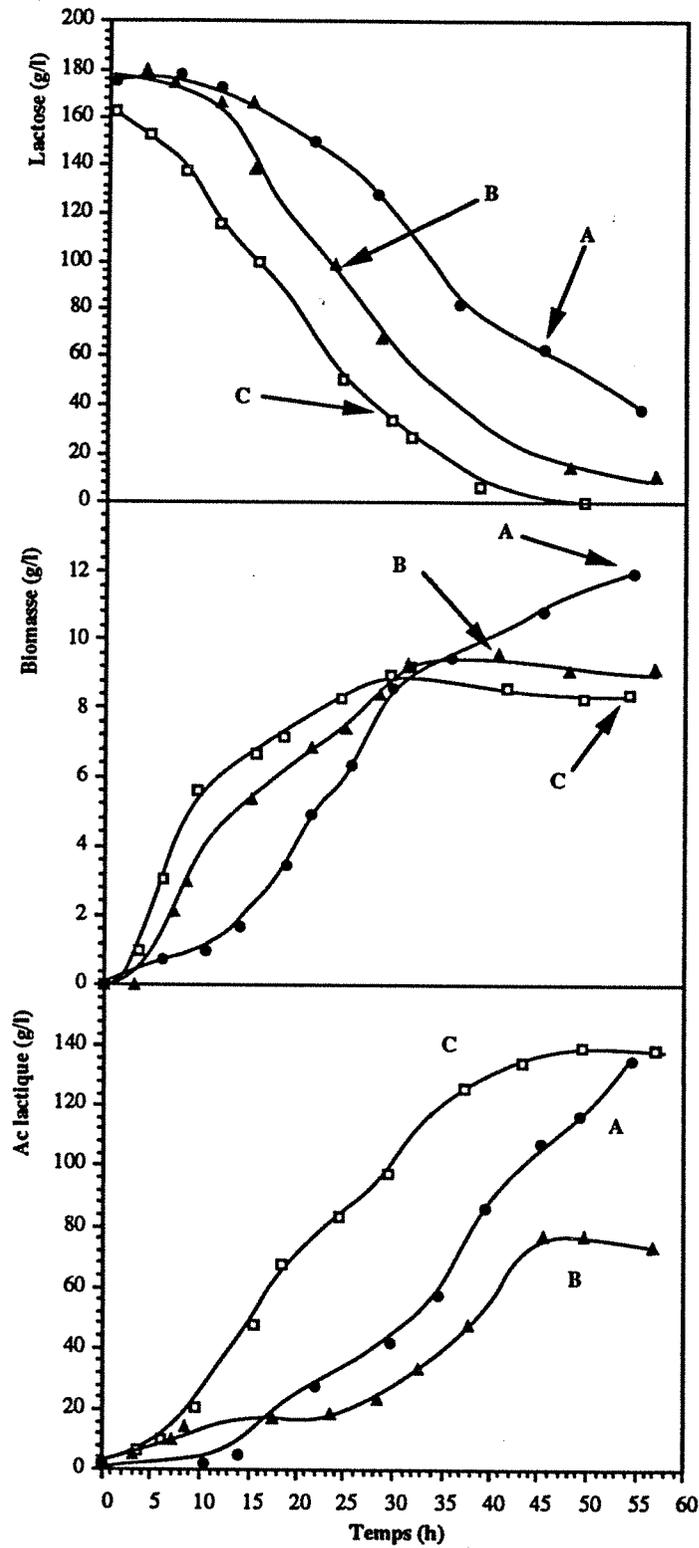
La bactérie croît plus rapidement sur lactosérum doux est produit jusqu'à 12 g/l de biomasse contre 5g/l sur sérum acide. La vitesse spécifique maximale est dix fois plus faible sur lactosérum acide ($0,04h^{-1}$).

L'évolution de la cinétique de production d'acide lactique suit le même profil que la cinétique de la biomasse. La production est retardée sur lactosérum acide et ne démarre que 30h après le début de la fermentation. Par contre, elle est immédiate sur lactosérum doux. La productivité volumique est de 3,8 et 0,5g/l.h respectivement sur lactosérum doux et acide. Les vitesses spécifiques de production maximale sont presque identiques 0,24 et 0,3h⁻¹ respectivement sur sérum acide et doux.

Les rendements de conversion du lactose en acide lactique sont faible 80% sur lactosérum doux et 64% sur lactosérum acide.

La présence d'acide lactique et de sels minéraux dans le lactosérum acide retarde la production , la croissance et la consommation du lactose. Les productivités et les rendements sont diminués en présence de sérum acide.

En accord avec les résultats des travaux sur le stress salin de ROY (1991) et sur la présence d'acide lactique de GIRAUD et coll. (1991), ces éléments ont un effet inhibiteur sur la production et la croissance de la bactérie.



(Préculture ● ou A : sans régulation de pH et d'agitation; ▲ ou B : issue d'une culture continu à $0,030h^{-1}$ et
 ◻ ou C : avec régulation de pH et sous agitation)

Figure III.17 : Evolution de la concentration du lactose, de biomasse et de l'acide lactique en fonction du temps pour les trois types d'inoculation

5. INFLUENCE DE L'INOCULUM

Les conditions de préparation des précultures (pH, agitation et température), la stérilisation du milieu et l'utilisation d'une base bien précise peuvent modifier la cinétique de croissance et de production d'acide lactique.

Par exemple, la préparation des précultures se fait normalement à 38°C, sans agitation et ni régulation de pH. De telles conditions opératoires limitent le développement de la bactérie.

En fermentation discontinue, l'inoculum a un rôle important sur la durée de la phase de latence. La productivité d'un procédé de fermentation discontinu est directement dictée par la durée totale de la fermentation.

En règle générale, les précultures pour les fermentations lactiques sont réalisées dans des tubes à essai mis à l'étuve sans aucune agitation, ni régulation de pH (condition A). Ces conditions seront prises comme référence pour l'étude de comparaison des différentes précultures.

Nous pouvons également inoculer un fermenteur à partir d'une culture continue (condition B). Pour cette étude, nous avons choisi un taux de dilution ($0,03h^{-1}$) qui favorise le développement de *L. casei* en phase de production d'acide lactique. Une dernière condition serait de réguler le pH et l'agitation de la préculture (condition C).

Trois fermentations discontinues sont démarrées à partir des trois inoculums précédemment définis. La **figure III.17** montre l'évolution de la concentration de biomasse et d'acide lactique en fonction du temps pour les trois types d'inoculation.

La phase de latence de la fermentation inoculée par un erlenmeyer non régulé est 3 à 5 fois plus longue que les phases de latence des deux autres fermentations.

Les vitesses spécifiques maximales de croissance sont de $0,18h^{-1}$, $0,37h^{-1}$ et $0,37h^{-1}$ pour les conditions respectives de précultures A, B et C. Le maximum de concentration en biomasse est obtenu pour une culture issue d'une fermentation continue (12g/l), alors que les autres se situent aux alentours de 8g/l.

La production de l'acide lactique est associée à la croissance dans le cas d'une

inoculation à partir d'erlenmeyers régulés ou non. La vitesse spécifique de production d'acide lactique est la plus forte avec une préculture en fiole non régulée ($1,8h^{-1}$) par rapport à $1,4h^{-1}$ et $1,1h^{-1}$ dans les cas B et C.

Une concentration maximale d'acide lactique (135g/l) est obtenue à 40h pour la fermentation inoculée par un erlenmeyer régulé, 55 h pour les deux autres. Cela se traduit par une productivité volumique de l'ordre de 3,4g/l.h dans le premier cas.

La consommation de lactose est totale après 42h quand la fermentation est issue d'une préculture régulée. Quand la préculture n'est pas régulée ou est issue d'une culture en continu, il reste respectivement, en fin de fermentation, 38g/l et 8g/l de lactose.

Le rendement de conversion lactose en acide lactique est faible (75%) dans le cas d'une préculture en continu alors que dans les autres cas, il se situe aux alentours de 87%.

L'utilisation d'une préculture régulée n'améliore pas la concentration d'acide lactique en fin de fermentation mais permet, en réduisant la durée de la phase de latence, d'accroître considérablement la productivité volumique.

L'inoculation à partir d'un prélèvement effectué en réacteur continu à un taux de dilution de $0,03 h^{-1}$ permet un démarrage rapide de la culture ; cependant les cellules ne sont pas aptes à produire l'acide lactique de manière concomitante à leur croissance.

6. INFLUENCE DU PRETRAITEMENT PHYSICOCHIMIQUE DU MILIEU

La stérilisation d'un milieu de culture passe par à un autoclavage à $121^{\circ}C$ pendant 20mn. Comme nous travaillons avec de fortes concentrations en lactosérum (200g/l), nous favorisons des réactions dont nous ne maîtrisons pas le déroulement. Par exemple, la précipitation des protéines diminue la disponibilité des peptides et acides aminés pour la bactérie et les mélanoidines sont nocives pour le microorganisme (STECCHINI et coll., 1991). C'est pour ces deux principales raisons, que nous allons suivre l'influence du prétraitement physicochimique sur la cinétique de croissance et de production.

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations, il est nécessaire de détruire la majorité

des microorganismes présents dans le milieu de culture avant l'ensemencement. La solution la plus facile consiste à faire subir au milieu une stérilisation dans les conditions spécifiques de pression, de température et de durée.

Cependant deux considérations s'opposent à cette alternative.

D'une part, le milieu à base de lactosérum contient des protéines qui risquent de coaguler au cours du traitement thermique.

D'autre part nous favorisons la libération de mélanoidines, produit de la réaction de Maillard, dont certaines bactéries lactiques sont sensibles.

L'étude du prétraitement physicochimique se déroulera en deux volets.

Dans une première partie, nous suivrons l'influence du prétraitement (pH et durée du "chauffage") sur la cinétique de croissance et de production d'acide lactique. Dans une deuxième partie, nous apporterons une explication des effets produits par le prétraitement sur le milieu en suivant la précipitation des protéines et les réactions de Maillard. Ainsi, nous donnerons une première explication quant aux performances des fermentations.

Le traitement envisagé est fondé sur la double action de la température et du pH ; le milieu est acidifié (HCl 10N) puis chauffé un certain temps à une température qui a été fixée à 100°C.

6.1. Influence prétraitement (pH et durée) sur les cinétiques des fermentations

Dans cette partie, nous allons suivre les cinétiques des fermentations en fonction des diverses conditions de prétraitements. Dans un premier temps, la durée du traitement thermique a été fixée à 20mn et l'influence du pH du prétraitement sur les performances de la fermentation ont été étudiées. Puis, les mêmes travaux ont été réalisés en fixant le pH optimum et en changeant la durée de "chauffage" du milieu.

Influence du pH

Le milieu est constitué du milieu de base décrit au **chapitre II.2.2.** additionné de lactosérum en poudre à raison de 200 g/l (170 g/l de lactose)

Après chaque prétraitement, le milieu de culture est refroidi jusqu'à 38°C et le pH est ajusté à 6 par ajout d'ammoniaque (6N).

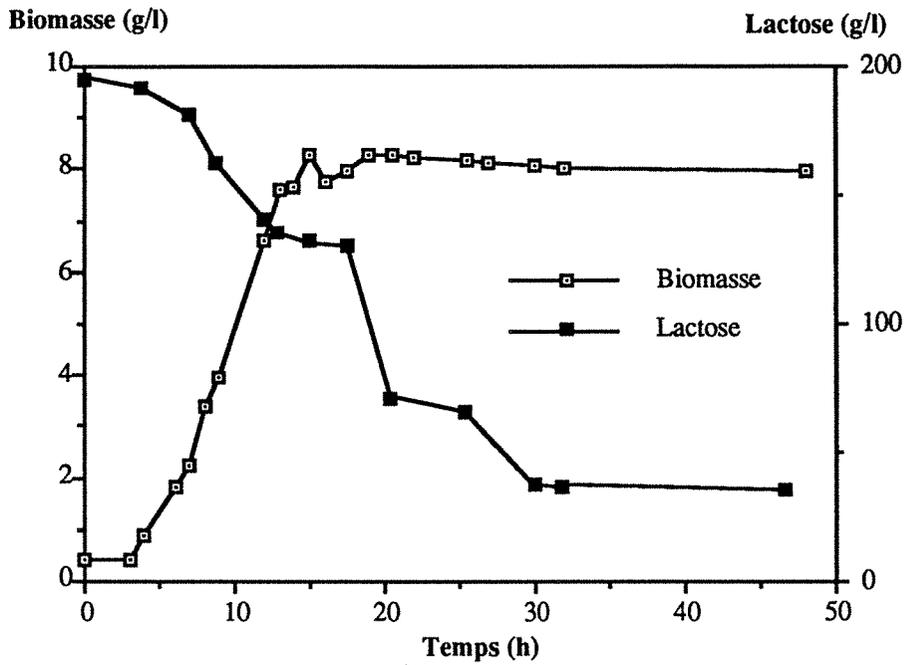


Figure III.18 : Evolution des concentrations de biomasse et de lactose en fonction du temps après prétraitement du milieu de culture 20 mn à 100°C et à pH2

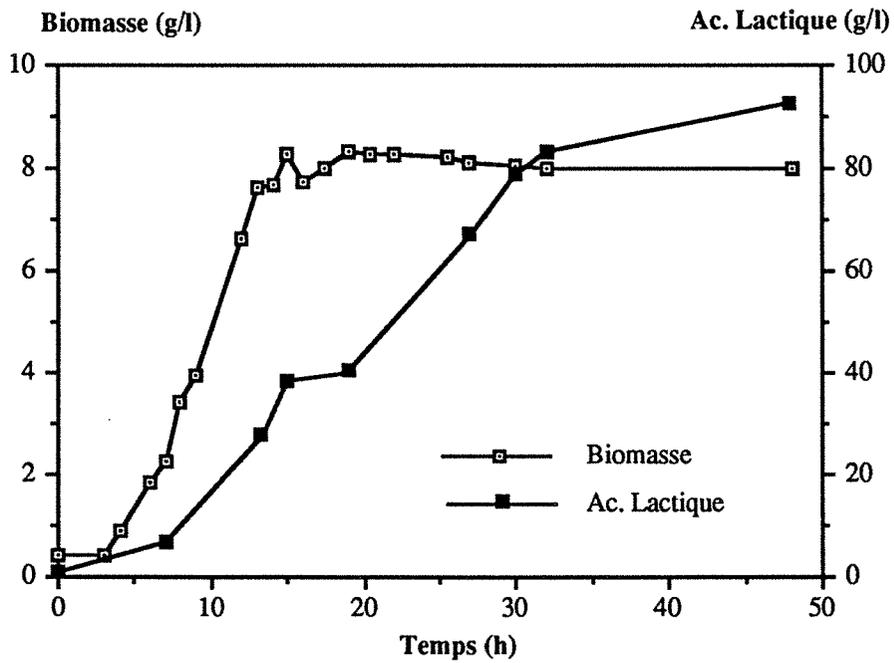


Figure III.19 : Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique en fonction du temps après prétraitement du milieu de culture 20 mn à 100°C et à pH2

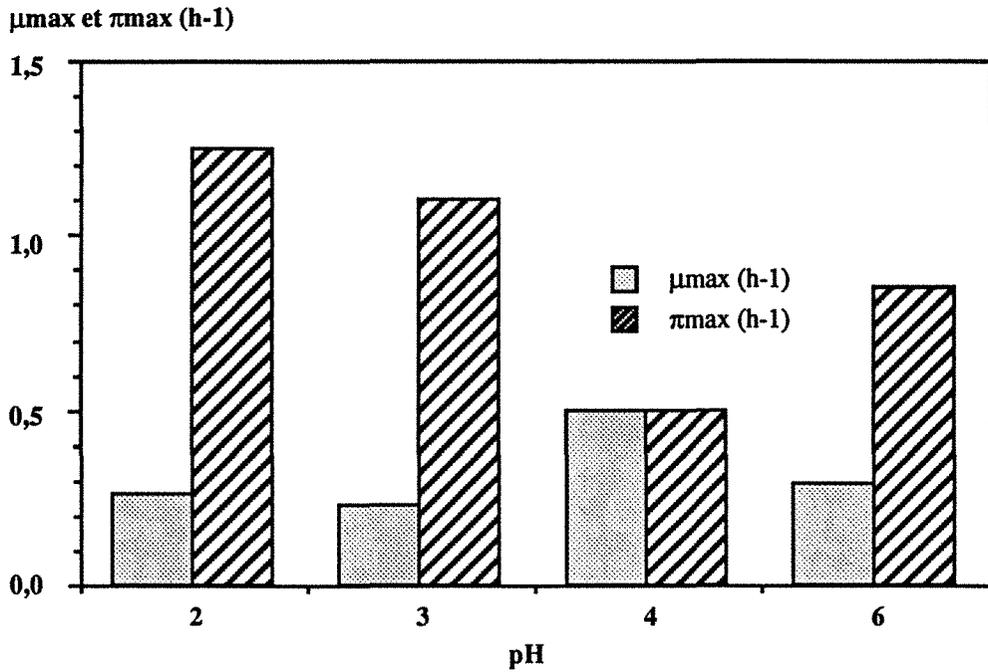


Tableau III.2 : Evolution des vitesses spécifiques maximales de croissance (μ_{max}) et de production d'acide lactique (π_{max}) en fonction du pH de prétraitement du milieu de culture.

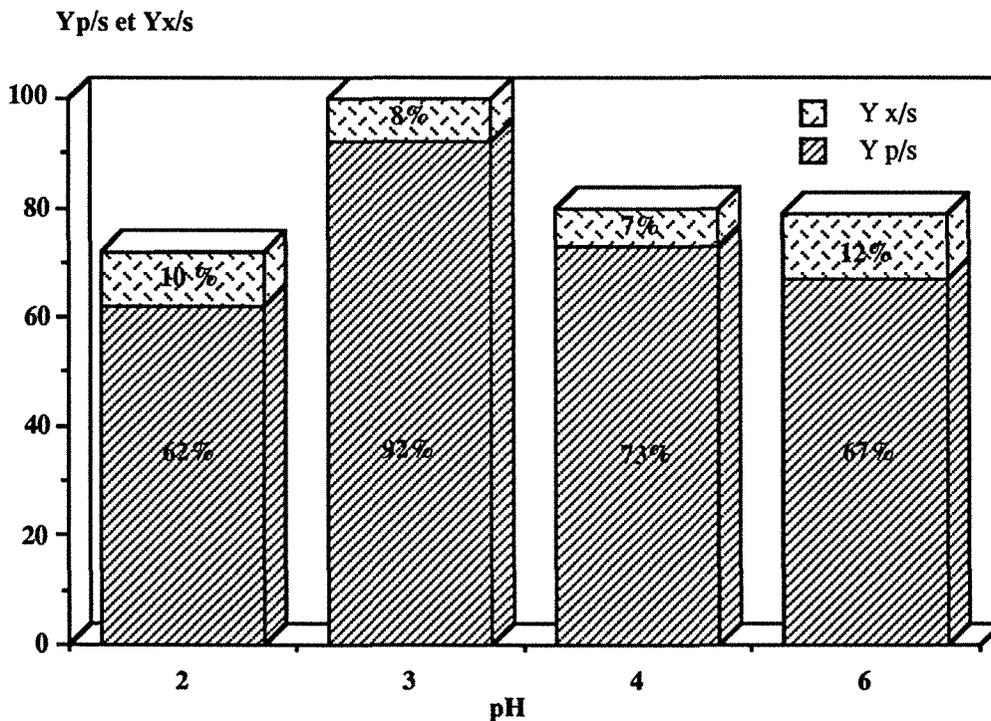


Tableau III.3 : Evolution des rendements lactose en biomasse ($Y_{x/s}$) et lactose en acide lactique ($Y_{p/s}$) en fonction du pH de prétraitement

Une culture discontinue est alors effectuée selon le protocole établi au cours du **chapitre II.4.1.**

Le suivi des évolutions des concentrations des principales variables du système permet d'établir une comparaison en terme de vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}), de vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique (π_{max}) et de rendements ($Y_{x/s}$ et $Y_{p/s}$).

Les **figures III.18 et 19** présentent les résultats obtenus de croissance, de consommation et de production lors d'un prétraitement 20 mn à 100°C et à pH2.

Le **tableau III.2** regroupe l'évolution des vitesses spécifiques maximales de croissance et de production d'acide lactique pour les quatre pH étudiés et une durée de prétraitement fixée à 20mn.

Les observations montrent que lors des prétraitements à pH2 et à pH3, la souche *L. casei* dirige son métabolisme vers la production d'acide lactique au détriment de la croissance; les vitesses spécifiques maximales de production d'acide lactique sont élevées ($> 1h^{-1}$), les vitesses spécifiques maximales de croissance sont situées entre 0,26 et 0,28h⁻¹.

Le prétraitement à pH4 provoque une croissance rapide de la souche ($\mu_{max} = 0,5h^{-1}$) alors que π_{max} est à une valeur inférieure à 50% des valeurs maximales obtenues à pH2 et pH3.

Par contre, le prétraitement à pH 6 donne de meilleurs résultats de production d'acide lactique qu'à pH4 mais sensiblement inférieurs à ceux obtenus à pH2 et pH3.

Le **tableau III.3** montre l'évolution des rendements lactose en biomasse ($Y_{x/s}$) et lactose en acide lactique ($Y_{p/s}$) pour une durée de 20mn de prétraitement.

Le rendement $Y_{x/s}$ varie entre 7 et 12% ; ces valeurs sont relativement communes en fermentation lactique.

Les prétraitements à pH2, pH4 et pH6 mènent à un rendement $Y_{p/s}$ relativement faible (<75%) indiquant une possible fuite du lactose vers une production de métabolites autres que l'acide lactique.

Le prétraitement à pH3 offre un rendement de 92% qui indique un métabolisme homofermentaire de la part de la souche *L. casei*.

Ce rendement est à comparer à celui obtenu durant la phase de sélection de souche en fermenteur. Une fermentation à partir de 250 g/l de poudre de perméat de lactosérum a abouti à un rendement proche de 40% dans ces mêmes conditions de prétraitement.

Le prétraitement a donc permis une amélioration des performances de la souche *L. casei*.

Parmi les différents pH étudiés, un pH3 lors du prétraitement thermique à 100°C pendant 20 mn est optimal, car il aboutit à une vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique élevée, une vitesse spécifique de croissance faible et un rendement lactose en acide lactique élevé.

Influence de la durée de chauffage

La série d'expérimentations précédente ayant permis de fixer le pH à 3, il reste la durée de prétraitement à optimiser. L'objectif premier de ce prétraitement est de limiter la quantité de cellules contaminantes durant la fermentation ; aussi, la durée minimum de traitement est fixée à 20 mn afin d'assurer une valeur pasteurisatrice suffisante.

Seul un essai a été effectué en fixant une durée de prétraitement de 35 mn à 100°C.

Les paramètres cinétiques calculés à partir des cultures issues des prétraitements de durée 20mn et 35 mn sont comparés dans les tableaux III.4. et 5.

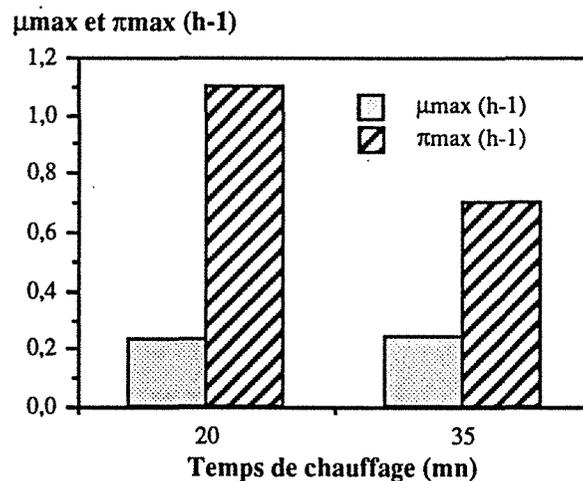


Tableau III.4 : Evolution des vitesses spécifiques maximales de croissance (μ_{\max}) et de production d'acide lactique (π_{\max}) en fonction de la durée de prétraitement du milieu de culture.

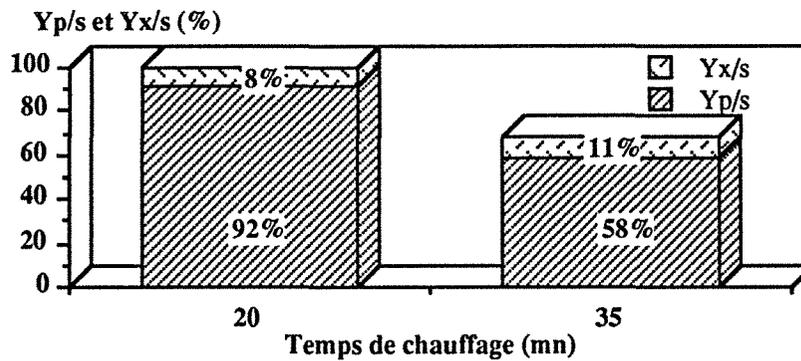


Tableau III.5 : Evolution des rendements lactose en biomasse ($Y_{x/s}$) et lactose en acide lactique ($Y_{p/s}$) en fonction de la durée de prétraitement

Les vitesses spécifiques maximales de croissance sont comparables dans les deux cas ; par contre, la vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique est plus faible lors d'une durée de prétraitement de 35 mn.

L'analyse des rendements montre qu'une durée de prétraitement de 35 mn nuit au caractère homofermentaire du métabolisme de la souche *L. casei*.

Les valeurs optimales du prétraitement thermique du milieu de culture sont : 20mn à 100°C et à pH3.

6.2. Explication de l'action du prétraitement sur les performances des fermentations

Nous avons observé durant le traitement physicochimique, que le milieu de culture subissait deux changements : une précipitation et un changement de couleur. Nous allons, dans cette partie, essayer de comprendre ce qui se passe lors du prétraitement par le suivi de la précipitation des protéines et la libération de composés de la réaction de Maillard (mélanoidines).

Suivi de la précipitation des protéines

Le chapitre III.6.1. a mis en évidence l'intérêt du prétraitement proposé par rapport à une stérilisation classique. Le rendement de transformation du lactose en acide lactique est nettement plus avantageux lors d'un prétraitement physicochimique (pH3, 100°C, 20mn).

Lors de la réalisation des prétraitements, il est observable que, en fonction des conditions de pH ou de durée, le milieu traité précipite en partie et/ou prend une coloration brune.

Ces deux phénomènes sont identifiés comme étant une coagulation des protéines présentes dans le milieu dans le premier cas et un brunissement non enzymatique de type Maillard dans le second cas.

Par ailleurs, durant les temps d'exposition à 100°C et à des pH faibles, une certaine fraction des protéines présentes dans le milieu est hydrolysée, libérant des peptides. Or selon DESMAZEAUD (1983), la fraction protéique qui stimule le mieux *L. casei* contient en moyenne 5 acides aminés par peptides.

Il apparaît donc deux effets antagonistes du prétraitement proposé. Premièrement, un accroissement de l'activité de *L. casei* grâce à la formation de peptides dans le milieu de culture.

Mais également, une diminution de cette activité du fait de la précipitation de certaines protéines et de l'apparition de composés de type mélanoidine qui peuvent revêtir un aspect toxique.

Afin de quantifier l'apparition de mélanoidines et de précipités protéiques, une étude a été mise en place consistant à estimer ces deux paramètres. D'une part, la quantité de protéines précipitées par mesure directe de la densité optique à 570nm. D'autre part, la formation de mélanoidines par la détermination de l'intensité de la coloration brune ($\lambda = 470$) après séparation des protéines précipitées par centrifugation.

Ainsi différentes fractions de milieux de culture subissent un prétraitement à 100°C, à pH 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 et 6 durant des temps de chauffage compris entre 0 et 40 mn.

La **figure III.20** montre l'évolution de la valeur de la densité optique à 570nm obtenue après dilution multipliée par le coefficient de dilution en fonction de la durée du prétraitement et ce, pour l'ensemble des pH étudiés.

Les résultats montrent qu'entre les pH 1,5 et 2,5, la variation de la quantité de protéines précipitées est faible.

Lorsque le pH est supérieur ou égal à 3, la quantité de protéines précipitées augmente d'autant plus rapidement au cours du temps que le pH est élevé.

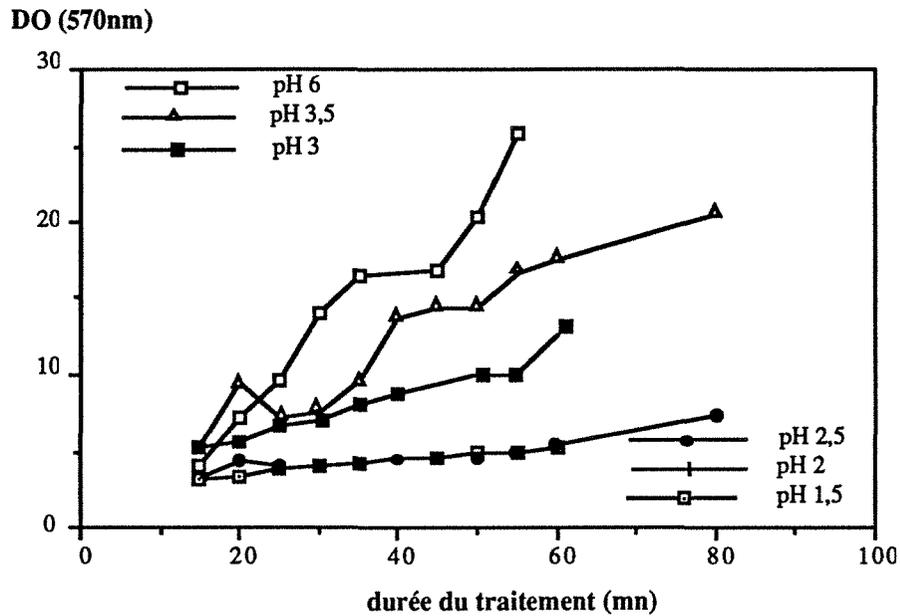


Figure III.20 : Evolution du produit DO 570nm x facteur de dilution en fonction de la durée de chauffage à 100°C à différents pH

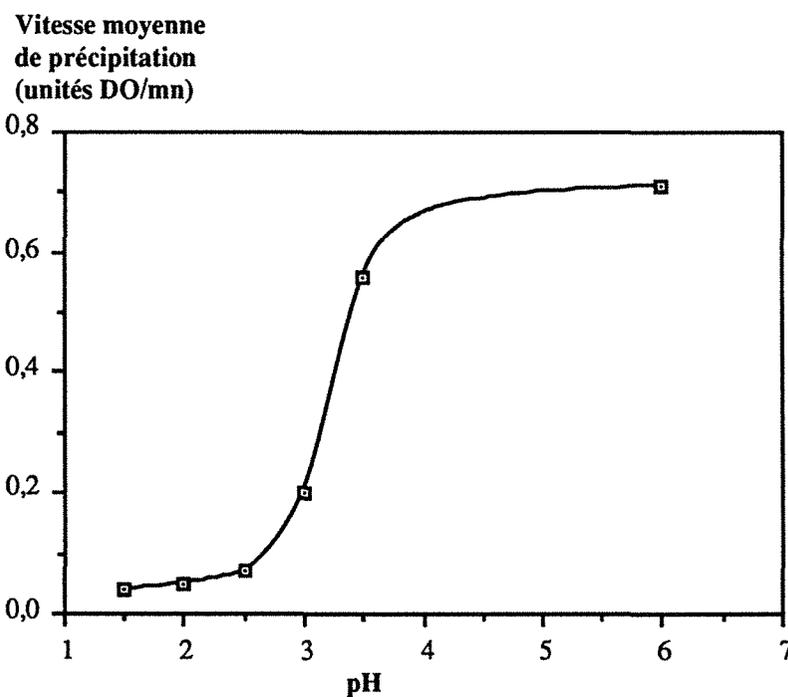


Figure III.21 : Evolution des vitesses globales de précipitation des protéines en fonction du pH de prétraitement

Intensité de coloration
(Unités arbitraires)

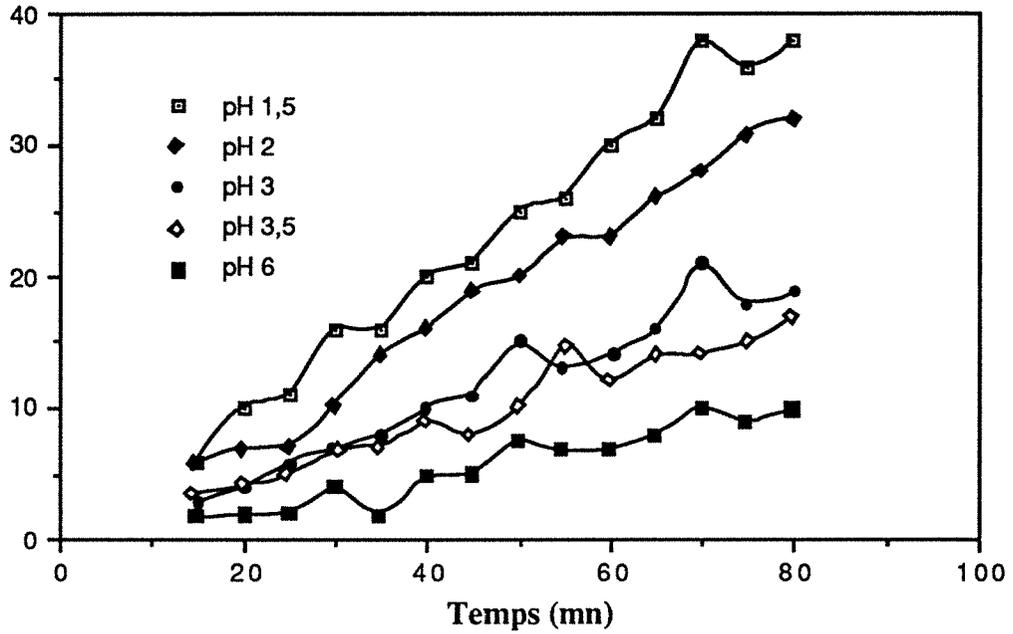


Figure III.22 : Evolution des intensités de coloration en fonction du temps à différents pH

Vitesse moyenne de
brunissement(UA/mn)

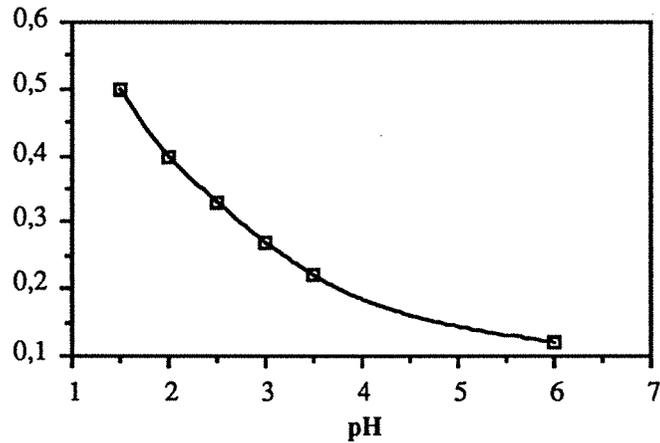


Figure III.23 : Evolution de la vitesse moyenne de brunissement en fonction du pH

Pour quantifier ces différences de comportement, il est proposé de considérer les courbes de la **figure III.20** équivalentes à des droites. La pente de ces droites correspond à une vitesse globale de précipitation des protéines.

La **figure III.21** montre l'évolution de cette vitesse en fonction du pH du prétraitement.

Il se dessine nettement deux zones délimitées par pH3 en deçà duquel peu de protéines précipitent et au-delà duquel la vitesse de précipitation est importante.

En accord avec les travaux de GALESLOOT et TIMBERGEN (1884) et GAULT et FAUQUANT (1992), il semble que nous favorisons la formation de gel quand le pH se situe au dessus de 3. Les ponts dissulfures des protéines (β globulines et dérivés de la caseines) se forment plus facilement et nous avons l'apparition d'un précipité.

Suivi de la réaction de Maillard

La **figure III.22** montre l'évolution avec le temps de l'intensité de la coloration brune (reliée à la cinétique d'apparition des mélanoidines). Comme dans le cas des protéines précipitées, les résultats sont donnés pour 5 valeurs de pH variant de 1,5 à 6. A partir des résultats obtenus, il est possible de déterminer une vitesse globale d'apparition de la coloration brune pour chacun des pH étudiés.

La **figure III.23** montre l'évolution de cette vitesse en fonction du pH. Plus le pH de traitement est faible, plus la coloration brune apparaît rapidement dans le milieu. Un pH acide favorise cette fois la libération de mélanoidines.

L'estimation des vitesses de précipitation des protéines et d'apparition des mélanoidines permet d'apprécier les conditions optimales de prétraitement déterminées au cours du chapitre précédent.

A pH3, peu de protéines précipitent. Les conditions de température et de pH favorisent une hydrolyse de ces protéines ; les peptides qui en résultent sont des facteurs de croissance de la souche.

6.3. Conclusions

Quand le prétraitement se réalise en dessous de pH 3, nous favorisons la libération de mélanoidines réduisant ainsi la vitesse spécifique de croissance et le rendement de transformation du lactose en acide lactique.

Par contre au dessus du pH3, nous augmentons la précipitation des protéines, ce qui diminue la vitesse spécifique de production, mais augmente celle de la croissance.

Pour favoriser la production et le rendement de transformation du lactose en acide lactique, le prétraitement doit se réaliser à pH 3. Ce point se situe à la "frontière" entre la précipitation des protéines et la libération de mélanoidines.

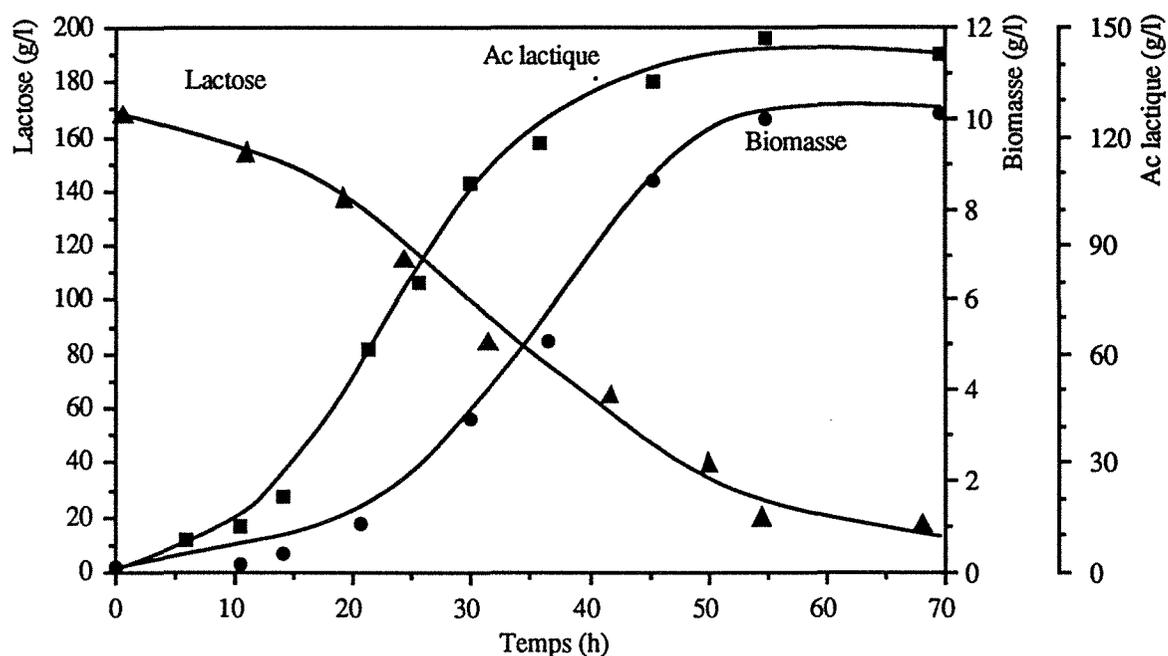


Figure III.24a : Evolution de la production de biomasse et d'acide lactique et consommation du lactose lors d'une fermentation régulée avec de l'ammoniaque (6N)

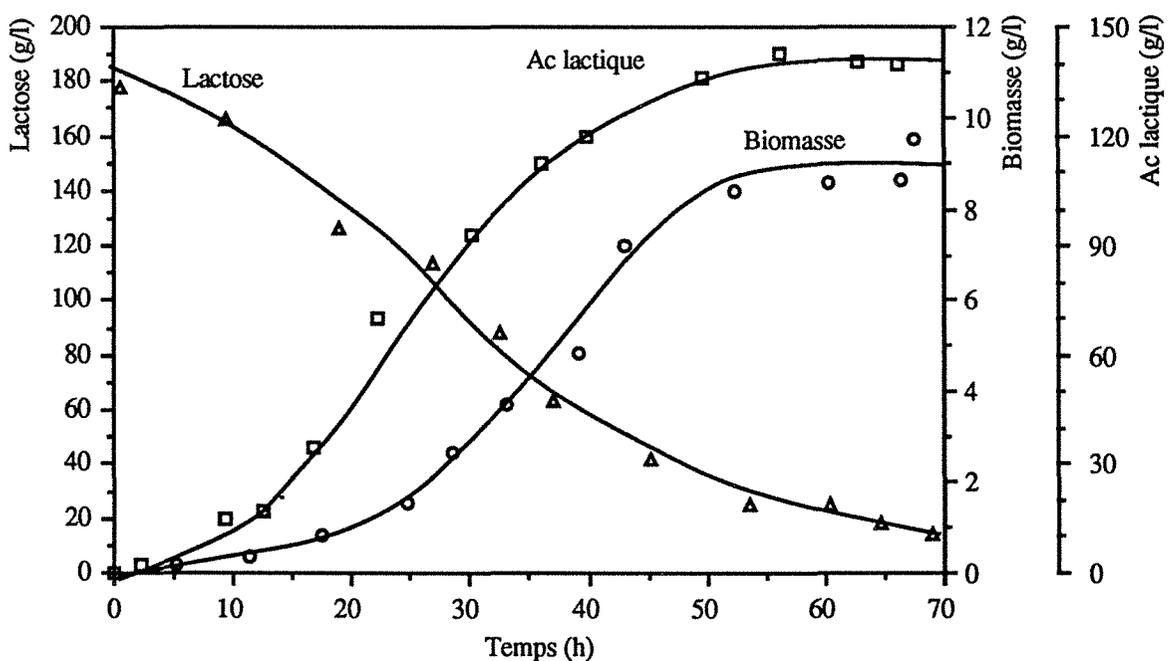


Figure III.24b : Evolution de la production de biomasse et d'acide lactique et consommation du lactose lors d'une fermentation régulée avec de la chaux (200g/l)

7. INFLUENCE DE LA BASE REGULATRICE

La plupart des fermentations lactiques sont régulées avec de l'ammoniac ou de la soude. Rares sont les cultures réalisées avec de la chaux comme base régulatrice, alors que le producteur Purac CCA utilise principalement ce produit. Nous pouvons nous poser la question suivante : Quelle est l'influence de la chaux sur la cinétique de production d'acide lactique et la croissance de la bactérie ?

C'est à cette question que nous allons apporter une réponse en faisant une étude comparée de cultures discontinues avec de la chaux éteinte (200g/l) et de l'ammoniaque (6N). Les conditions de fermentation sont définies dans le **chapitre II.4.1.**

Les résultats (**figures III.24 a et b**) montrent que la production d'acide, la croissance et la consommation du lactose ne sont pas influencées par la chaux. La production maximale d'acide lactique est de 131g/l et 133g/l, la vitesse spécifique maximale de production est de $0,75h^{-1}$ et $0,74h^{-1}$, avec un rendement de transformation de 79% et 81% respectivement pour une fermentation régulée avec de l'ammoniac ou de la chaux.

La consommation de la source de carbone n'est pas totale après 55h et environ 14g/l de lactose restent à la fin de deux fermentations.

La production maximale de biomasse est de 10g/l avec une régulation à la chaux contre 8,9g/l avec de l'ammoniaque.

L'utilisation de la chaux, comme base régulatrice, sur la production d'acide lactique et sur le développement bactérien.

Les études menées sur la régulation du pH de la préculture montrent que *L. casei* est plus adapté pour croître et produire de l'acide lactique. Nous diminuons ainsi le temps de latence de la culture en discontinu. Comme la croissance et la production d'acide lactique sont rapides, la fermentation est écourtée de près de 8 heures.

L'action du prétraitement sur le milieu a causé la précipitation et la libération de mélanoidines. Un juste équilibre doit se réaliser entre le pH et la durée de chauffage. Les conditions idéales étaient pH3, 100°C pendant 20mn.

L'utilisation d'ammoniaque ou de la chaux, pour la régulation du pH, ne modifie pas la cinétique de croissance, de consommation et de production d'acide lactique.

De plus, la chaux permet d'obtenir du lactate de calcium. Le sel produit durant la fermentation est très peu soluble aux faibles températures. Cette caractéristique physique est très intéressante, car nous pouvons éliminer le lactate de calcium par simple filtration du milieu de culture.

CONCLUSIONS

A l'issue de ces premiers travaux, il a été montré que les cinétiques de croissance, de production et de consommation sont influencées par de nombreux facteurs.

La souche sélectionnée, *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus*, possède de nombreux avantages. Cette bactérie consomme le lactose à forte concentration, ne rejette et n'accumule pas le glucose ni galactose. De plus, ce microorganisme produit principalement, à très forte concentration, la forme isomérique L(+) de l'acide lactique. Suivant les conditions du milieu (température, taux de dilution), le métabolisme homofermentaire peut changer et devenir hétérofermentaire.

La présence dans le milieu de sels minéraux (Mn et Mg), surfactant (Tween 80) et d'EL influence directement la croissance, la consommation et la production d'acide lactique. L'EL, composé très complexe, contient de nombreux éléments : sels, vitamines, protéines, acides aminés, bases puriques et pyrimidiques. Son remplacement par un lysat de *L. casei* supplémenté par des vitamines ne suffit pas, et il semble que d'autres éléments favorise la croissance et la production d'acide lactique.

L'étude sur l'origine des lactosérums apporte des précisions quant à l'importance de la composition du lactosérum. Un sérum doux favorise la production d'acide lactique, la consommation et la production d'acide lactique contrairement à un sérum acide. La présence d'acide lactique et de sels minéraux dans le milieu ont un effet inhibiteur sur la croissance, la consommation de lactose et la production d'acide lactique.

Les conditions de déroulement d'une préculture influence le déroulement d'une culture discontinue. Pour favoriser la croissance et la production rapide, le préculture doit

être sous régulation de température et de pH. Ces conditions optimisent de nombreux paramètres de la fermentation : diminution du temps de latence et de fermentation, et en plus totale consommation du lactose aux concentrations de lactosérum étudié.

Le prétraitement du milieu avait quant à lui des effets antagonistes sur la cinétique de croissance et de production d'acide lactique. Suivant les conditions physicochimiques (pH, température et durée de chauffage), la fermentation passe de l'homofémentation vers l'hétérofémentation. A faible pH, les réactions de Maillards libèrent des mélanoidines limitant la production d'acide lactique et diminuant la vitesse de croissance. Par contre pour un pH de prétraitement supérieur à 3 la précipitation des protéines est très importante et cela a pour effet de diminuer les vitesses spécifiques de production et d'augmenter la vitesse spécifique de croissance. Un pH 3 limite l'apparition de mélanoidines et de précipitation des protéines. L'hydrolyse des protéines présente un net avantage pour la bactérie, car elle a à sa disposition des peptides et acides aminés facilement assimilables.

La dernière étude réalisée sur la base régulant le pH pour la fermentation montre que l'ammoniaque peut être remplacé par de la chaux. Ces deux bases ne modifient pas la cinétique de croissance et de production. L'utilisation de la chaux produit du lactate de calcium dont le caractère physicochimique est intéressant. Ce sel est très peu soluble est facilement séparé du jus de fermentation par simple filtration.

***IV. ETUDE CINETIQUE DE CULTURES
DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES***

Console-toi, tu ne me
chercheras pas si tu ne
m'avais trouvé

Blaise PASCAL

IV. ETUDE CINETIQUE DE CULTURE EN MODE DISCONTINU ET SEMI-CONTINU

1. ETUDE CINETIQUE DE FERMENTATION DISCONTINUE.....	119
1.1. Cinétiques.....	119
1.2. Croissance et Mortalité.....	121
1.3. Vitesses spécifiques.....	123
1.4. Conclusions.....	125
2. ETUDE CINETIQUE DES FERMENTATIONS SEMI-CONTINUES.....	127
2.1. Influence de la concentration de lactosérum du milieu d'alimentation.....	127
2.2. Influence du débit du milieu d'alimentation.....	134
2.3. Influence de la variation concentration en alimentation à faible débit.....	138
2.4. Vitesses.....	139
CONCLUSIONS.....	143

L'étude cinétique de *L. casei* doit nous permettre de déterminer d'une part les lois cinétiques de croissance, de consommation du lactose et de production d'acide lactique et d'autre part de calculer les paramètres cinétiques caractérisant cette fermentation.

Dans un premier temps, une étude cinétique en culture discontinue sur lactosérum est entreprise. Puis nous développerons l'étude de la culture semi-continue en fonction de débits et de concentrations d'alimentation variables avec comparaison des résultats des deux cinétiques.

Pour l'ensemble des études cinétiques, les milieux de cultures sont préparés de façon suivante : 200g/l de lactosérum, 2g/l d'extrait de levure liquide, 0,3g/l de MnSO_4 , H_2O , 0,5ml/l de Tween 80. La régulation du pH est réalisée avec de la chaux à 200g/l et le prétraitement appliqué est pH3, 20mn à 100°C. La préculture est sous régulation de pH.

L'étude cinétique réalisée dans cette partie a fait appel à une méthode de lissage des données expérimentales développée au sein du laboratoire sur la technique de la "moyenne glissante". Cette méthode consiste à faire un double lissage par le glissement d'une fenêtre de 5 points autour de chaque point expérimental à lisser et de calculer pour chaque fenêtre les coefficients d'un polynôme de degré 2. Chacun des polynômes (P) est ensuite utilisé pour avoir une estimation de l'ordonnée du point, dont la valeur sera la moyenne des 5 valeurs (yf), on a donc :

$$y_f = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 P_i(x)$$

Comme le montre la figure IV.1, le polynôme 1 est établi à partir des 5 points de la fenêtre 1 ; ce polynôme de degré 2 donne une valeur estimée du point à lisser (en gras sur la figure); le polynôme est établi à l'aide des 5 points de la deuxième fenêtre etc. La fenêtre contenant 5 points "glisse" donc d'un point vers la droite pour calculer à chaque fois un polynôme de degré 2 et la valeur de l'ordonnée du point à lisser. Ce processus se déroule jusqu'à ce que tous les points expérimentaux soient lissés.

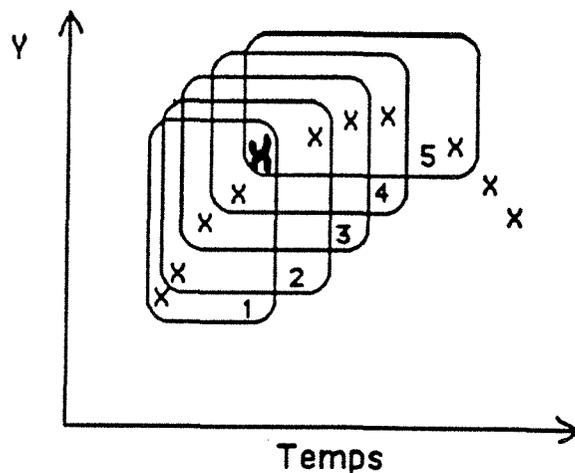


Figure IV.1 :Méthode de lissage des points expérimentaux par la technique des moyennes glissantes.(Le point lissé est en lettre grasse)

Les calculs des vitesses spécifiques sont automatiquement réalisés d'après les valeurs lissées des concentrations en biomasse, en lactose et en acide lactique par la méthode de GARRIDO-SANCHEZ (1993).

1. ETUDE CINETIQUE DE FERMENTATION DISCONTINUE

La culture discontinue constitue la plus simple des fermentations mises en œuvre d'un microorganisme. Une fois le milieuensemencé, la fermentation évolue sans aucune intervention extérieure, régulations mises à part. Les conditions initiales sont donc de première importance. En culture discontinue, la composition du milieu change à chaque instant. Il est donc important de suivre l'évolution des concentrations en nutriments au cours du temps. A partir des profils cinétiques seront ensuite calculées les vitesses spécifiques.

1.1. Cinétiques

La figure 2a montre l'évolution du volume du jus de fermentation lors d'une fermentation discontinue. Le volume de chaux (200g/l) ajouté pour neutraliser la production d'acide lactique représente, dans notre cas, plus de 24% du volume de départ .

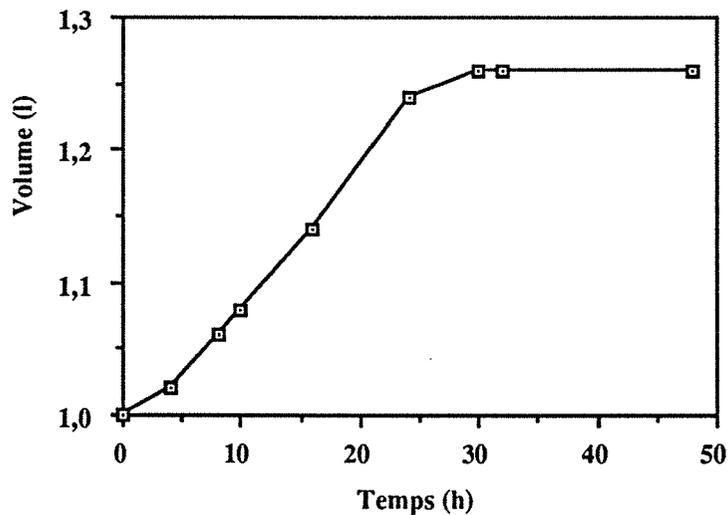


Figure IV.2 a : Evolution du volume de fermentation en culture discontinue

Pour l'étude cinétique en mode discontinu, les résultats des concentrations de la fermentation sont rapportés à la quantité par volume de départ.

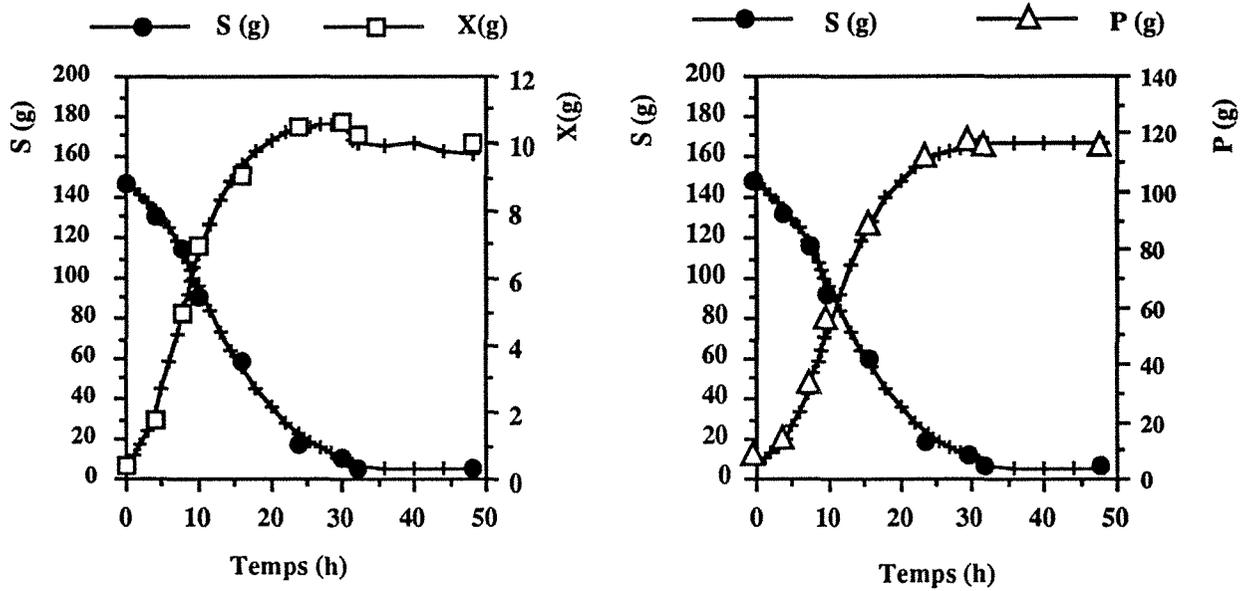


Figure IV.2 b : Evolution de la concentration de la biomasse, du lactose et de l'acide lactique avant et après lissage (+) des points expérimentaux en culture discontinue

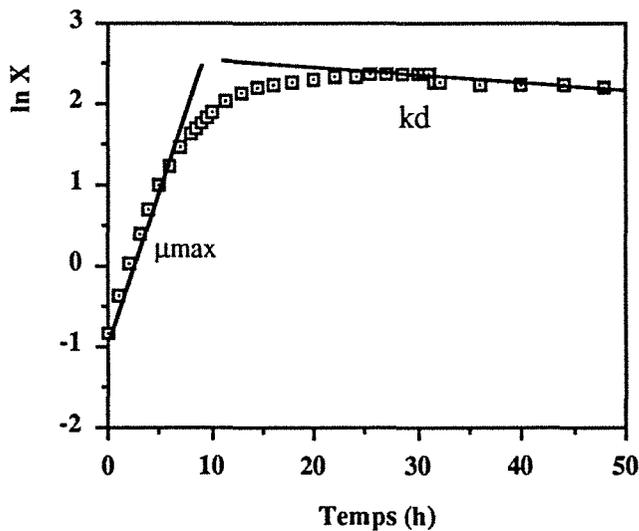


Figure IV 3 : Evolution du logarithme népérien de la concentration en biomasse au cours de la fermentation discontinue

La figure IV.2 montre l'évolution du volume, de la concentration de lactose, de la biomasse et de l'acide lactique en culture discontinue. La méthode de lissage montre une parfaite cohérence des résultats expérimentaux et lissés.

Le lactose est consommé durant les 30 premières heures de la fermentation. Nous distinguons une phase exponentielle de consommation de 0 à 18 heures suivie d'un ralentissement de la consommation jusqu'à 5g.

La croissance est caractérisée par 5 phases : une phase de latence d'environ de 2 à 3 heures, une phase exponentielle de croissance de 2 à 3 heures, une phase de ralentissement de la croissance de 5 heures au bout de laquelle la biomasse atteint 9g, une phase stationnaire de 10 heures et enfin une phase de déclin très lente.

La concentration en acide lactique varie de façon inversement proportionnelle à la concentration de lactose. Nous distinguons dans un premier temps, une phase de forte production d'acide lactique qui correspond à la fin de la phase de latence jusqu'au début de la phase de ralentissement. Puis dans un deuxième temps, la production est ralentie et reste stable jusqu'à la fin de la fermentation .

Les rendements globaux sont égaux à 80 et 9 % respectivement pour l'acide lactique et la biomasse. L'analyse des autres composés (comme l'acide pyruvique, succinique et acétique) montre que nous avons produit des acides organiques et ils représentent 8 à 10% du lactose consommé.

1.2. Croissance et Mortalité

La représentation du logarithme népérien de la concentration en biomasse en fonction du temps (figure IV.3) fait apparaître deux phases correspondant aux phases de croissance exponentielle et de déclin. Sur cette représentation les phases de latence, de ralentissement et stationnaire de croissance sont très importantes.

Les phases exponentielles de croissance et de déclin, se traduisent par des lois de type exponentiel suivantes :

$$X = X_0 \cdot e^{(\mu_{\max} \cdot t)} \quad \text{de 2 à 3 heures}$$

et
$$X = X_0' \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \quad \text{de la 22ème heure à la fin de la fermentation}$$

avec X_0 et X_0' : concentrations en biomasse (g/l) respectivement au moment de l'ensemencement et à la 22ème heure.

μ_{\max} : taux de croissance maximum de la souche (h^{-1})

k_d : taux de mortalité de la souche (h^{-1})

En calculant les pentes des droites tracées sur la figure IV.3, nous déterminons les valeurs de μ_{\max} et de k_d , qui sont respectivement égales à $0,38h^{-1}$ et $0,015h^{-1}$.

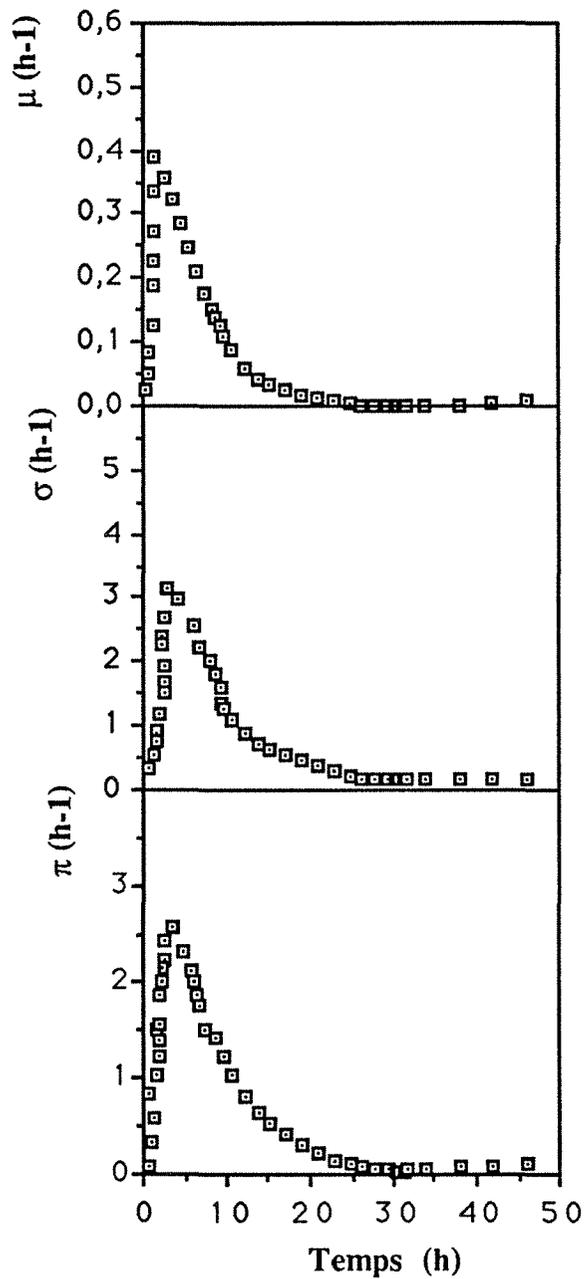


Figure IV.4 : Evolution des vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation (σ) et de production (π)

1.3. Vitesses spécifiques

L'évolution des vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation (σ) et de production (π) au cours du temps est reportée dans la **figure IV.4**. Nous constatons que toutes les trois courbes suivent la même évolution : une rapide augmentation de 0 à 5 heures, puis une chute jusqu'à la fin de la fermentation. Une différence existe entre les profils ; la chute de vitesse spécifique de croissance est presque linéaire alors que la consommation et la production diminuent lentement.

Il apparaît donc que l'activité de *L. casei* varie au cours d'une culture discontinue. Cette constatation est sans doute à mettre en relation avec la modification de la composition du milieu de culture au cours du temps. Il serait vraisemblable que l'apparition de l'acide lactique en soit la cause principale.

La **figure IV.5** montre l'influence de l'acide lactique sur le taux de croissance et sur la vitesse spécifique de production d'acide lactique. La forme des courbes n'est pas tout à fait linéaire et les vitesses spécifiques diminuent avec l'augmentation de la concentration d'acide lactique. Pour une concentration réelle dans le fermenteur de 90g/l, les vitesses spécifiques de croissance et de production sont nulles.

A partir de la **figure IV.5**, en supposant une loi d'inhibition de type $K_i/(K_i+P)$, nous pouvons déterminer une valeur de K_i , constante d'inhibition, définie comme étant la valeur de la concentration en inhibiteur pour laquelle μ est égal à $\mu_{max}/2$. Nous trouvons la valeur de K_i égale à 30g/l.

La similitude des profils d'évolution de μ , σ et π au cours du temps suggère l'existence d'une relation entre les vitesses spécifiques de consommation et de production d'une part et la vitesse spécifique de croissance d'autre part. La **figure IV.6** représente l'évolution de la vitesse spécifique de production et de consommation en fonction du taux de croissance. Une relation linéaire existe entre ces deux vitesses spécifiques et le taux de croissance. La droite obtenue possède une ordonnée non nulle à l'origine. Nous trouvons donc une relation du type :

$$\sigma = a\mu + m$$

Il apparaît donc que la consommation de lactose est proportionnelle à la croissance et à la concentration en biomasse. Le facteur de proportionnalité a correspond à l'inverse du rendement théorique maximum $Y_{x/s}$ tandis que la constante m correspond à la consommation de lactose lorsque la croissance est nulle. En effet, en absence de croissance la cellule a tout de même besoin, pour son activité de base, d'un certain apport de carbone et d'énergie. Les valeurs de $Y_{x/s}$ et de m sont respectivement égales à 0,19 et $0,2h^{-1}$.

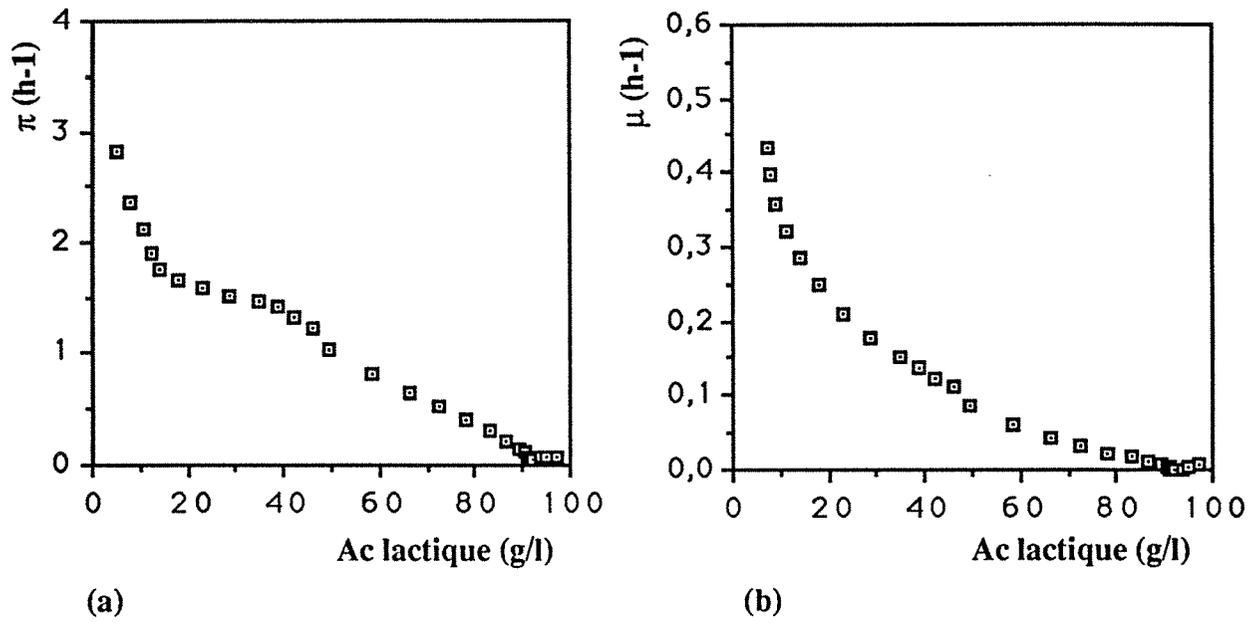


Figure IV.5 : Evolution du taux de croissance (a) et de la vitesse spécifique (b) de production d'acide lactique en fonction de la concentration d'acide lactique

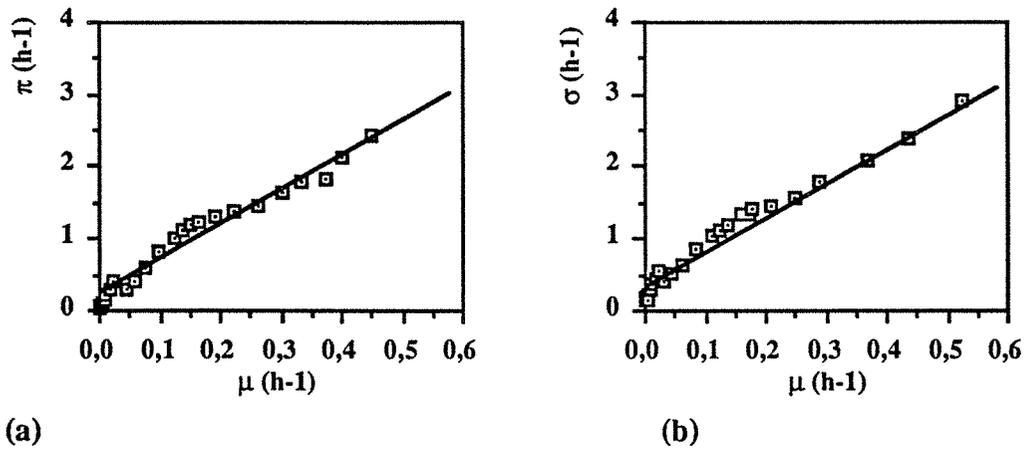


Figure IV.6 : Evolution de la vitesse spécifique de production (a) et de consommation (b) en fonction du taux de croissance

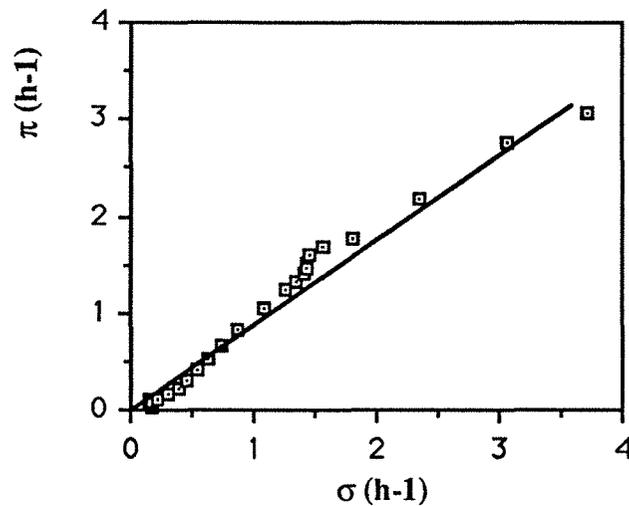


Figure IV.7 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide lactique en fonction de la vitesse de consommation

La figure IV.7 représente la vitesse spécifique de production d'acide lactique en fonction de la vitesse de consommation de lactose. Cette dernière représentation montre l'existence d'une relation linéaire entre la vitesse spécifique de consommation et de production d'acide lactique. La droite obtenue passe par l'origine et correspond au rendement théorique $Y_{p/s}$ dont la valeur est 0,88.

1.4. Conclusions

La consommation du lactose en culture discontinue est réalisée pour produire de l'acide lactique et de la biomasse. A partir de 150g/l de lactose, nous avons une production de 120g/l d'acide lactique et de 10g/l de biomasse.

La croissance bactérienne suit une loi exponentielle de constante μ_{max} dans les premières heures et k_d après la 22^{ème} heure.

Lorsque la concentration en acide lactique atteint 90g/l, la croissance cellulaire et la production d'acide lactique sont stoppées. L'acide lactique inhibe la croissance et la production d'acide lactique.

La vitesse de consommation de lactose est à la fois proportionnelle à la vitesse de croissance et à la concentration en biomasse. Enfin, la production d'acide lactique est proportionnelle à la consommation de lactose.

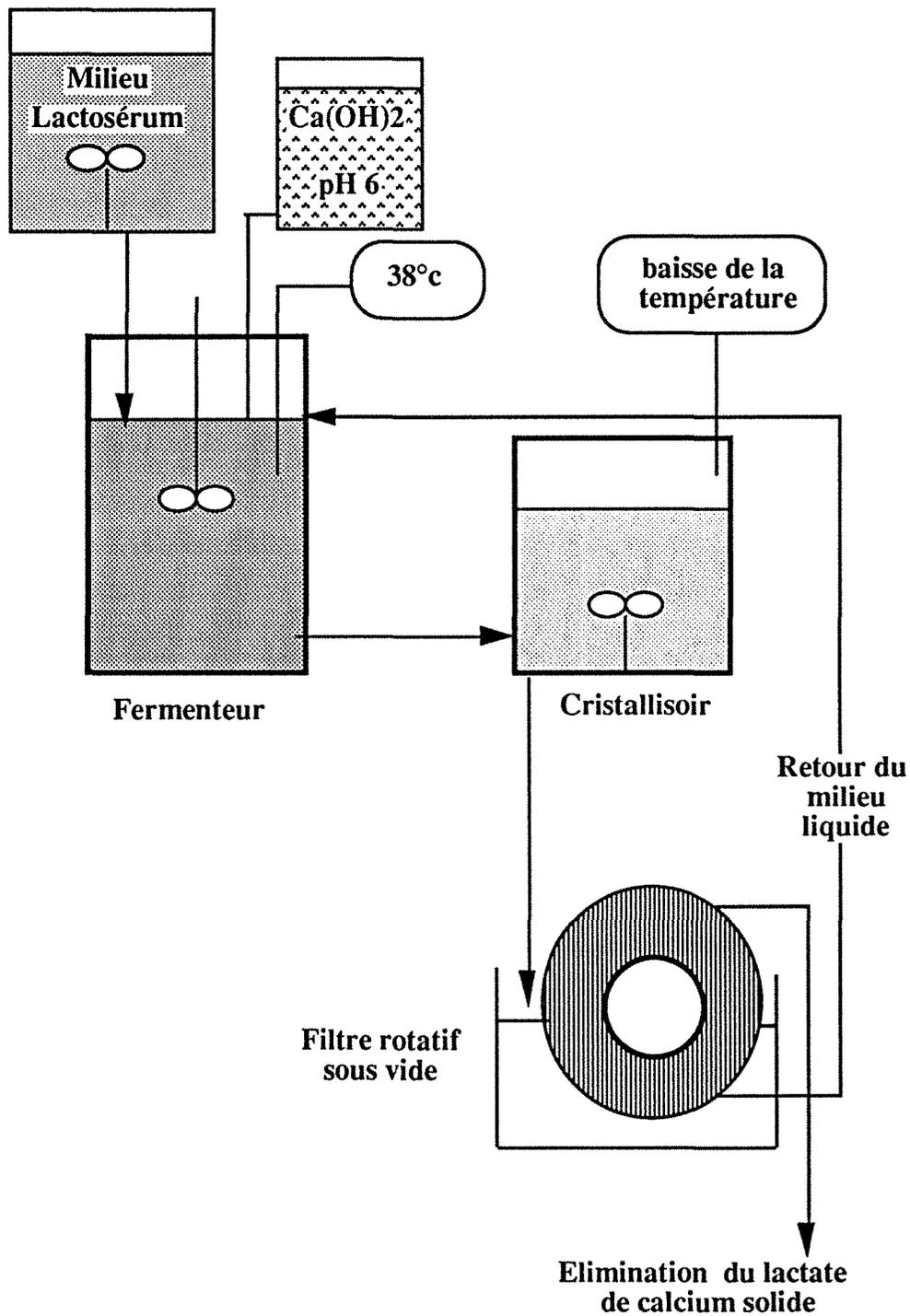


Figure IV.8 : Schéma du projet du procédé de fermentation, cristallisation et filtration du lactate de calcium.

2. ETUDE CINETIQUE DES FERMENTATIONS SEMI-CONTINUES

Dans ce chapitre, nous allons axer notre travail sur l'influence du flux de carbone (débit et concentration en lactosérum), en culture semi-continue, sur la productivité spécifique et le rendement. Le but de ce travail va être de déterminer les effets produits par le débit et la concentration du milieu sur la production d'acide lactique, la consommation de lactose et la croissance bactérienne.

La fermentation semi-continue est une culture peu rencontrée pour la production d'acide lactique et présente des avantages sur la culture discontinue classique : maîtrise de la source de carbone apportée pour la production d'acide lactique et diminution du stress de la bactérie en présence de fortes concentrations de lactose.

Le but final est d'obtenir un système alliant la fermentation en semi-continu avec une cristallisation et une filtration en continu du lactate de calcium produit (**figure IV.8**). Arrivée à un moment précis de la fermentation, qui est à définir, la concentration en lactate de calcium devient optimale pour sa cristallisation. Le milieu de fermentation est alors envoyé dans le cristalliseur (mode continu), les cristaux formés sont ensuite séparés par une filtration grossière et le reste du milieu (lactosérum non transformé, bactéries,...) est dirigé vers le fermenteur.

Pour suivre l'influence de flux de lactose entrant dans le fermenteur, nous allons fixer un des deux paramètres et faire varier le second. L'étude sur les fermentations semi-continues est réalisée en fonction du débit et la concentration du milieu d'alimentation.

Tout d'abord, les effets de la concentration du milieu nutritif sont suivis en fixant le débit et en faisant varier la concentration d'alimentation. Puis dans un deuxième temps, l'influence du débit d'alimentation est suivie en fixant la concentration et en faisant varier le débit. La dernière partie est une synthèse des résultats des deux premières parties quant au choix de la concentration et du débit idéaux.

2.1. Influence de la concentration de lactosérum du milieu d'alimentation

Pour cette étude de culture en semi-continu, la concentration maximale de lactosérum est fixée (400g/l) ce qui avoisine les limites de la solubilité du lactose (solubilité maximale du lactose 450 à 500g/l). Le minimum est défini en fonction du volume du fermenteur. La concentration minimale du lactosérum est de 200g/l, ce qui limite les effets de dilution. Le débit d'alimentation est fixé à 100ml/h afin d'éviter la l'accumulation de lactose dans le fermenteur.

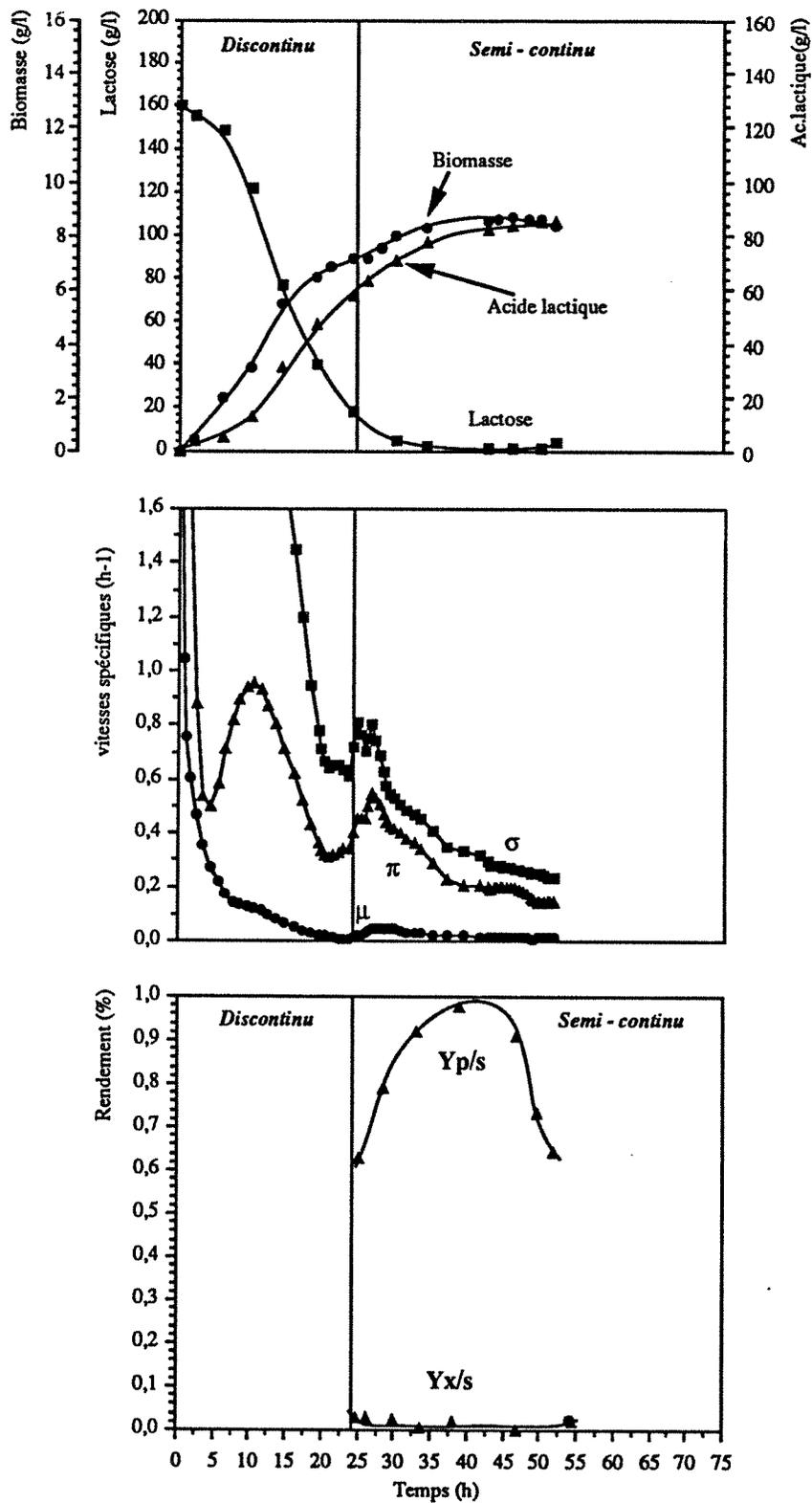


Figure IV.9a: Evolution des concentrations de biomasse, lactose et acide lactique, de la vitesse spécifique de production (π), de consommation (σ) et de croissance (μ) du rendement de production ($Y_{p/s}$) et de croissance ($Y_{x/s}$) pour une concentration de milieu d'alimentation à 200g/l.

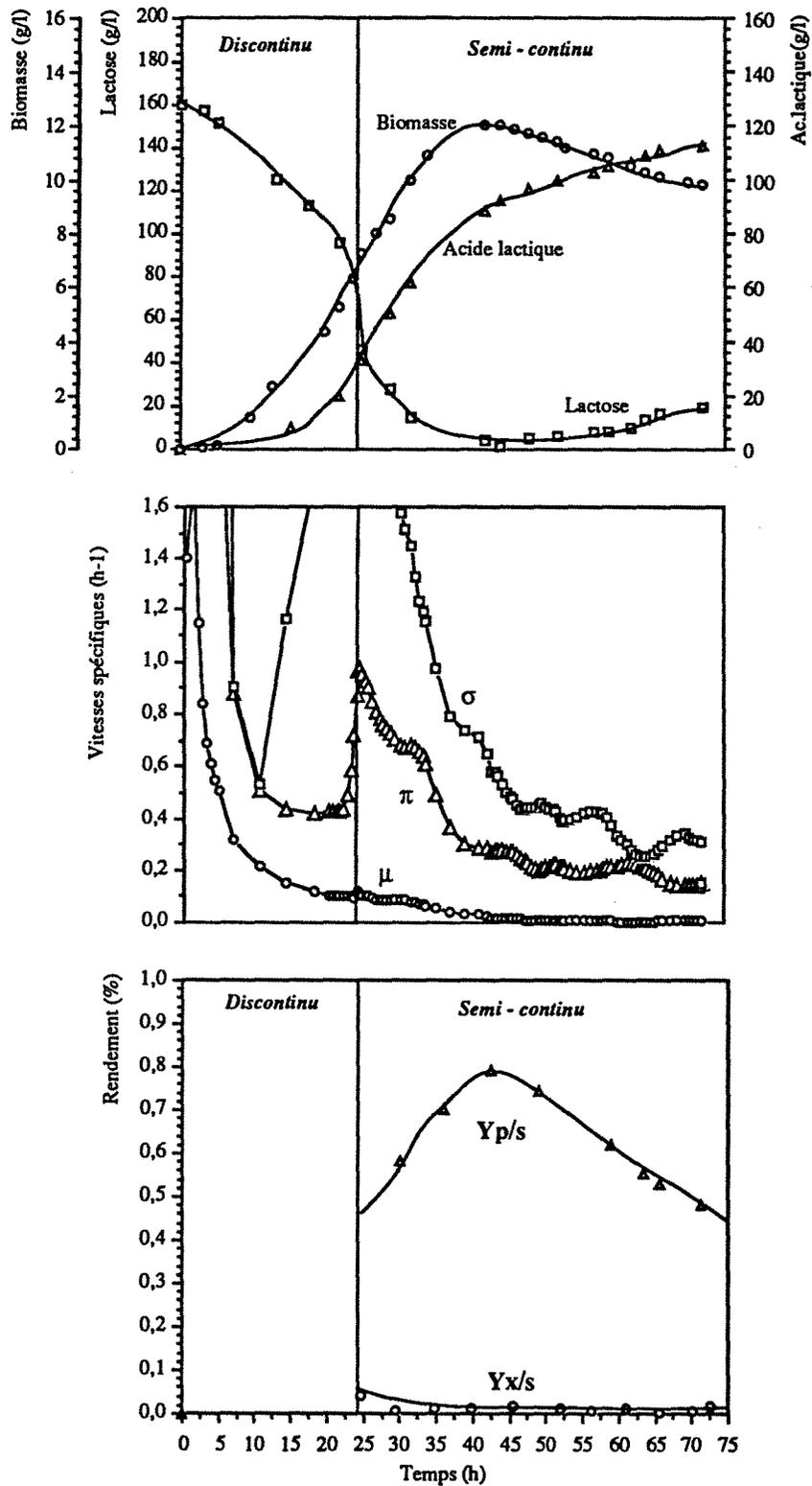


Figure IV.9b : Evolution des concentrations de biomasse, lactose et acide lactique, de la vitesse spécifique de production (π), de consommation (σ) et de croissance (μ) du rendement de production ($Y_{p/s}$) et de croissance ($Y_{x/s}$) pour une concentration de milieu d'alimentation à 400g/l

Les conditions de fermentation sont :

- déroulement de la fermentation discontinue : milieu à 200 g/l de lactosérum
- déroulement de la fermentation semi-continue : milieu à 200 et 400 g/l de lactosérum
débit de l'alimentation 100 ml/h
- conditions générales: pH 6,0 et T° 38°C

Les figures IV.9 a et b montrent l'évolution des concentrations, des vitesses spécifiques et des rendements pour deux concentrations de milieu d'alimentation différentes.

Pour une concentration de 200g/l de lactosérum, le lactose est rapidement consommé durant la fermentation discontinue, puis en semi-continu la concentration est stabilisée entre 1 et 5g/l.

La biomasse augmente rapidement (pas de phase de latence) jusqu'à 7g/l au moment du passage en semi-continu, puis se stabilise vers 9g/l pour ensuite décroître du fait de l'inhibition par le produit et la dilution due à l'augmentation du volume.

La concentration en acide lactique est déjà élevée à la fin du discontinu (60g/l), elle continue à augmenter plus lentement ensuite jusqu'à 90g/l.

Il est à noter le décalage entre le moment où l'on déclenche l'alimentation et les effets qui en découlent.

Avec une concentration de 400g/l de lactosérum dans le milieu d'alimentation, l'évolution générale est la même que précédemment.

Mais la croissance et la décroissance de la biomasse est beaucoup plus importante. A la 45^{ème} heure, la forte concentration d'acide lactique (120g/l) limite le développement bactérien, ce qui provoque une diminution de la consommation du lactose et donc une augmentation de la concentration de substrat dans le milieu.

La vitesse spécifique de production d'acide et de consommation de lactose diminuent fortement dans les premières heures du semi-continu, là où la concentration d'acide augmente rapidement. Les productivités spécifiques maximales dans les deux conditions sont identiques et sont égales à $0,87h^{-1}$. La vitesse maximale spécifique de consommation est de $0,05$ et $0,1h^{-1}$ et de production de biomasse est de $0,8$ et $1,2h^{-1}$ respectivement pour une concentration d'alimentation de 200 et de 400g/l de lactosérum.

L'activité de la bactérie se réduit considérablement. Pour la concentration la plus basse en lactosérum dans le milieu nutritif, le rendement de bioconversion paraît faible au

début du semi-continu. Mais il faut remarquer que la biomasse continue à se développer et la concentration d'acide lactique est déjà forte. Il y a ensuite un pic vers 45h qui correspond à l'arrêt de la croissance de la biomasse, où tout le lactose est utilisé pour l'acide lactique. Puis le rendement baisse rapidement quand la concentration d'acide lactique est forte.

Durant le semi-continu, nous observons une forte inhibition qui provoque une diminution de la production d'acide et de biomasse. A ce moment précis de la fermentation, la bactérie change sa voie métabolique homofermentaire pour produire autre chose que du lactate. Cette hypothèse est confirmée par le rendement carboné de la fermentation qui passe de 100% à 88%.

Pour la concentration de 400g/l, le rendement est beaucoup plus faible que pour la fermentation précédente, mais elle a cependant la même évolution. Le rendement maximal est de 80% à 40h, c'est-à-dire quand la concentration en lactose est minimale. Le rendement carboné de la fermentation est très faible (moins de 70%). Le métabolisme homolactique est vite remplacé par un métabolisme hétérolactique, passage dû à la trop forte inhibition du produit. Les analyses confirment l'apparition rapide d'autres produits. Le rendement de bioconversion en acide lactique total et de biomasse sont respectivement de 60% et 5%.

La concentration de 200g/l dans l'alimentation semble peu adaptée pour ce type de culture, car la production d'acide lactique est rapidement inhibée (baisse de la productivité et du rendement). De plus, les concentrations obtenues en acide ne dépassent pas les 100g/l comparées à celles obtenues durant les cultures discontinues (140g/l).

Le rendement (Y_p/s) en produit est de 80% et le rendement global en biomasse (Y_x/s) est de 4,5%. Le point le plus intéressant est que le lactose est totalement consommé.

Le rendement de production de biomasse est faible et ne dépasse pas 5% pour les deux conditions de culture.

La forte concentration du lactosérum durant la phase discontinue est inadaptée car nous favorisons la production d'acide lactique et les effets inhibiteurs sont augmentés. La concentration en acide lactique est déjà trop forte quand on passe en mode semi-continu, rapidement le métabolisme est dévié vers l'hétérofermentation. Le seuil de toxicité maximale se situe vers 100g/l d'acide lactique. Il faut donc diminuer la concentration en lactosérum de départ et limiter l'apport de sucre dans l'alimentation pour que tout soit consommé et que le lactate n'augmente que très progressivement et ainsi limiter l'effet inhibiteur.

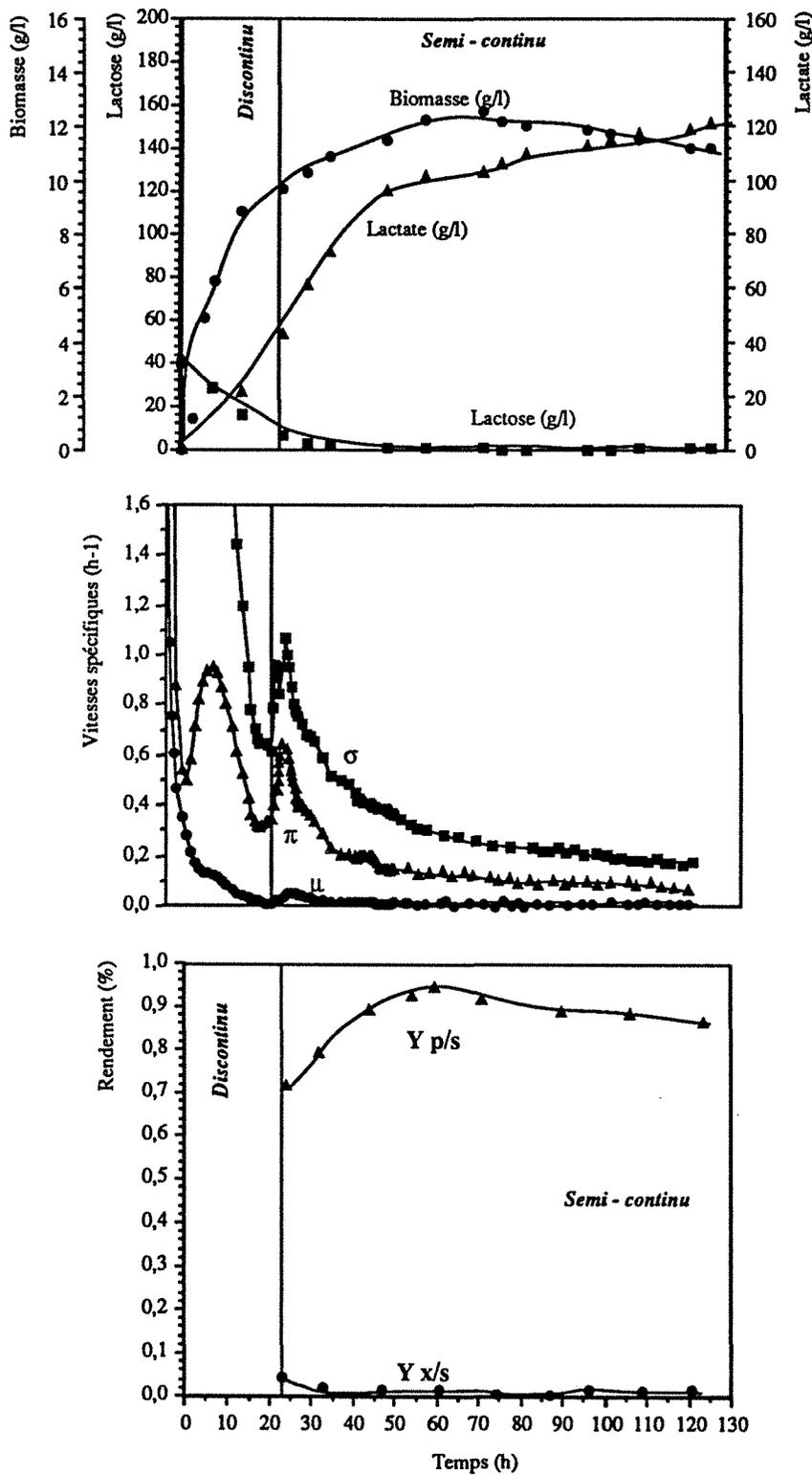


Figure IV.10 a: Evolution des concentrations de biomasse, lactose et acide lactique, de la vitesse spécifique de production (π), de consommation (σ) et de croissance (μ), du rendement de production ($Y_{p/s}$) et de croissance ($Y_{x/s}$), pour un débit du milieu d'alimentation de 30ml/h.

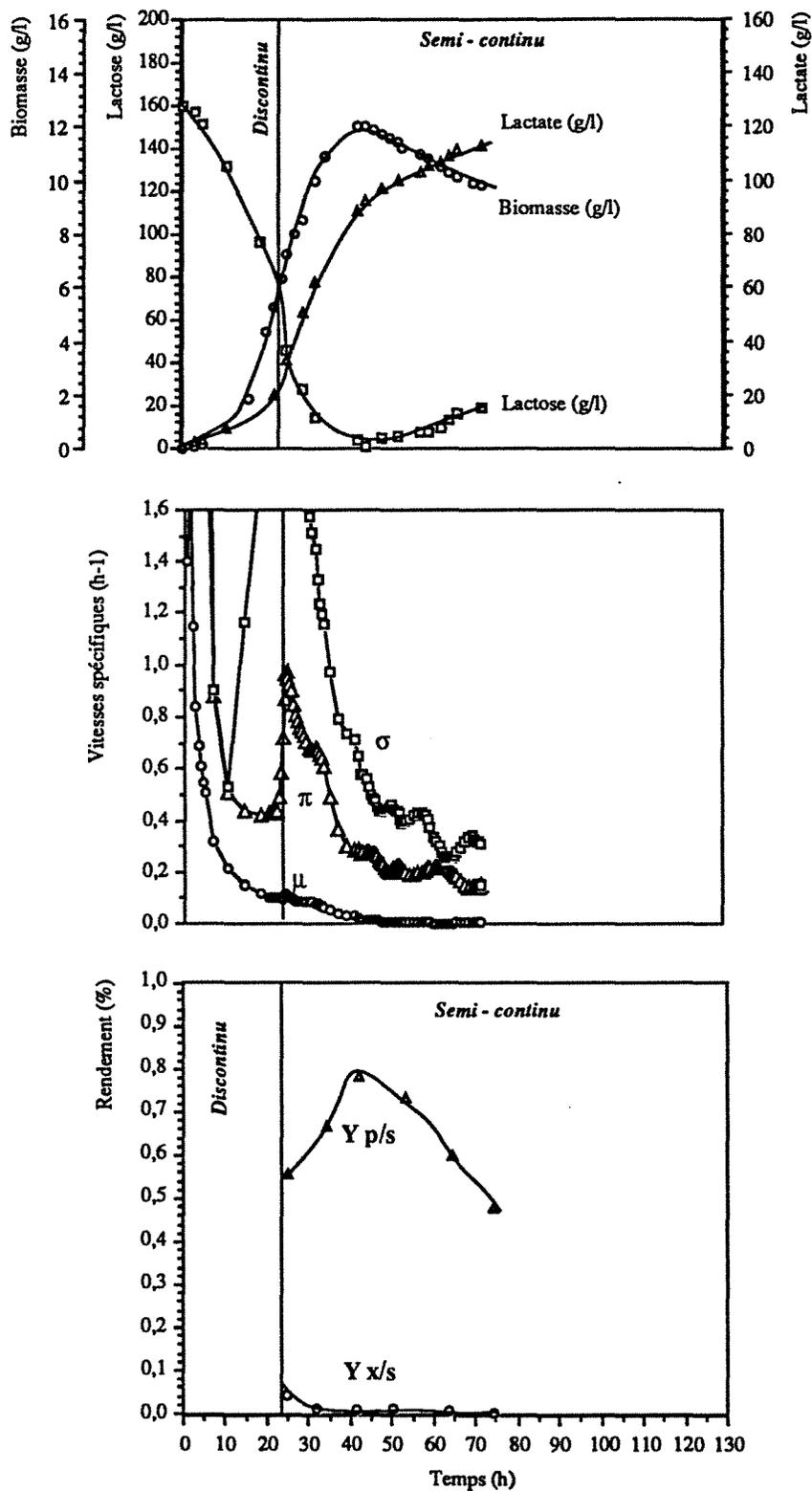


Figure IV.10 b: Evolution des concentrations de biomasse, lactose et acide lactique, de la vitesse spécifique de production (π), de consommation (σ) et de croissance (μ), du rendement de production ($Y_{p/s}$) et de croissance ($Y_{x/s}$), pour un débit du milieu d'alimentation de 100ml/h.

2.2. Influence du débit du milieu d'alimentation

Un débit d'alimentation faible (30ml/h) est fixé afin de favoriser une homofermentation. L'évolution des concentrations (biomasse, acide lactique et lactose) et des vitesses spécifiques de production et de productivités sont comparées avec un débit en alimentation élevé (100ml/h).

Les conditions de fermentation sont :

- déroulement de la fermentation discontinue : milieu à 50 et 200g/l de lactosérum
- déroulement de la fermentation semi-continue : milieu à 400g/l de lactosérum
débit de l'alimentation 30 et 100ml/h
- conditions générales: pH 6,0 et T° 38°C

Remarque : Une diminution de la concentration (4 fois) en lactosérum est réalisée dans la culture discontinue afin de favoriser la production de biomasse par rapport à la production d'acide lactique. Dans le milieu, l'alimentation en lactosérum est concentré à 400 g/l.

Les figures IV.10 a et b montrent l'évolution des concentrations, des vitesses spécifiques et des rendements pour deux débits de milieu d'alimentation différents.

Pour le cas d'une fermentation discontinue, à 50g/l, l'alimentation du discontinu a été démarrée un peu trop tardivement, après la phase exponentielle de croissance. Pourtant, l'évolution des différentes concentrations est proche de l'alimentation à 100ml/h. La biomasse semble être favorisée par la limitation en lactose de départ (maximum 12g/l), la concentration en acide lactique augmente plus lentement (durée de fermentation 130h), mais les concentrations finales sont élevées (près de 120g/l).

L'évolution de la vitesse spécifique est toujours la même, quand l'acide lactique augmente rapidement ces vitesses diminuent de la même façon. Ceci se réalise de façon plus prononcée quand le débit est élevé (100ml/h). La vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique est de $0,64h^{-1}$ à 30ml/h contre $0,87h^{-1}$ à 100ml/h. La vitesse spécifique de consommation de lactose est plus forte et baisse plus rapidement avec 100ml/h. Les vitesses spécifiques de production de biomasse sont très faibles et ne dépassent pas $0,1h^{-1}$ pour les deux débits.

Le point le plus essentiel est l'évolution du rendement de production d'acide lactique, qui est beaucoup plus élevé quand le débit est à 30ml/h que lorsque que le débit est de 100ml/h. De plus, ce rendement se maintient sur une plus longue période de temps quand le débit d'alimentation est plus faible.

Le rendement carboné, très proche de 100%, montre que la souche reste homofermentaire avec un débit de 30ml/h. L'analyse de l'acide pyruvique, succinique, acétique et de l'éthanol révèle leur absence dans le milieu. Par contre à 100ml/h, le rendement maximum atteint est seulement de 80%.. Les rendements globaux en acide lactique et en biomasse sont respectivement de 93% et 4,5% à 30ml/h et de 80% et 5% à 100ml/h. La présence d'autres composés (acide pyruvique, succinique et acétique) est détectée dans le milieu (soit 10% de la concentration totale du lactose) quand le débit est de 100ml/h.

Une limitation en sucre (60g/l) au démarrage du discontinu semble être une bonne solution, la biomasse est favorisée par rapport à la production d'acide lactique. Le débit d'alimentation de 30ml/h est mieux adapté pour limiter l'accumulation d'une trop forte quantité d'acide lactique. La souche semble s'adapter plus facilement à ces fortes concentrations d'acide lactique et ne change pas de voie métabolique. Quand le débit est plus faible, le milieu ne contient pratiquement plus de lactose. Selon les conditions opératoires le microorganisme dirige son métabolisme vers l'homofermentation ou l'hétérofermentation. La principale cause semble être la concentration en acide lactique qui au delà de 100g/l provoque le passage de l'homofermentation vers l'hétérofermentation.

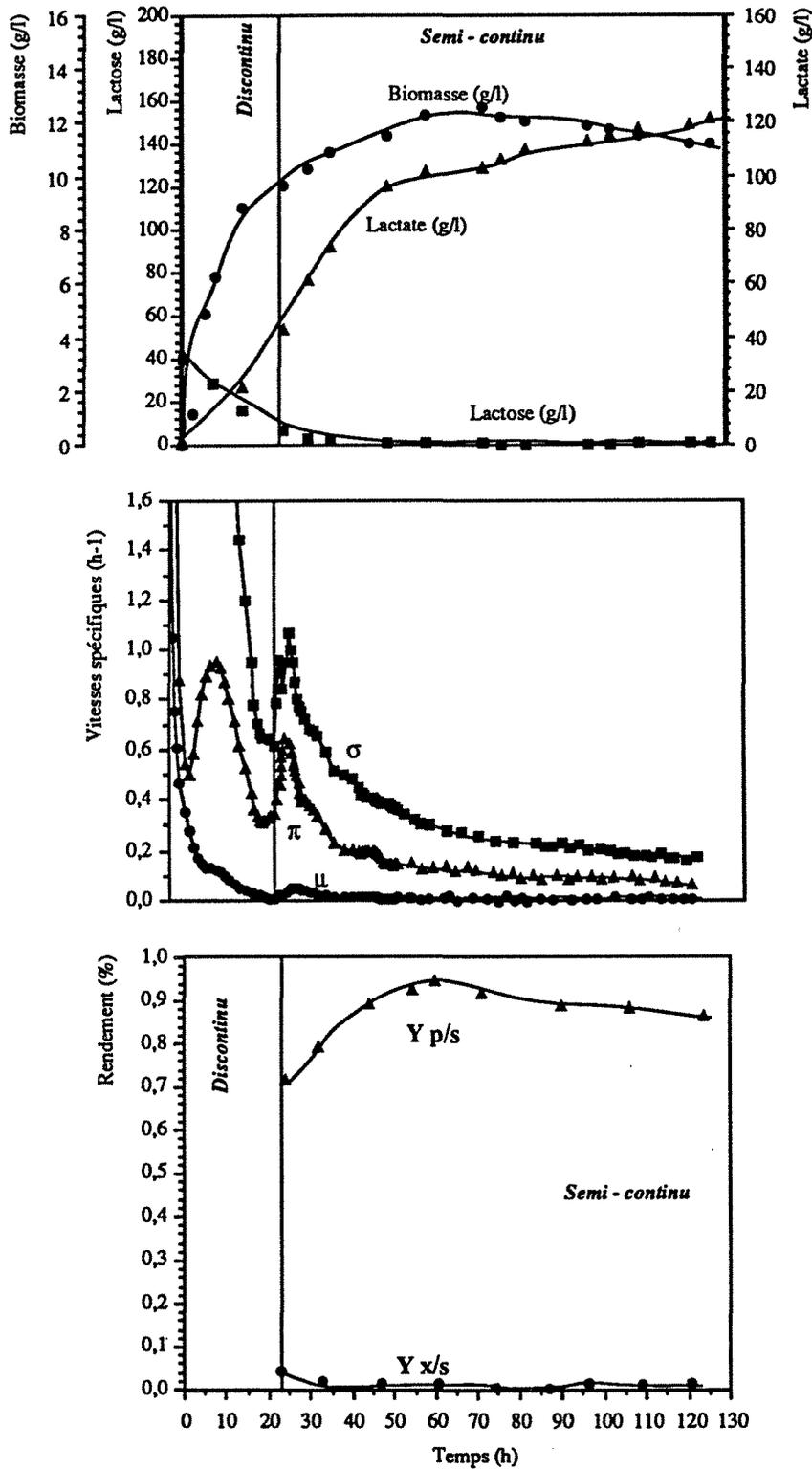


Figure IV.11 a : Evolution des concentrations de biomasse, lactose et acide lactique, de la vitesse spécifique de production (π), de consommation (σ) et de croissance (μ), du rendement de production ($Y_{p/s}$) et de croissance ($Y_{x/s}$), avec une alimentation à 30ml/h et 400g/l

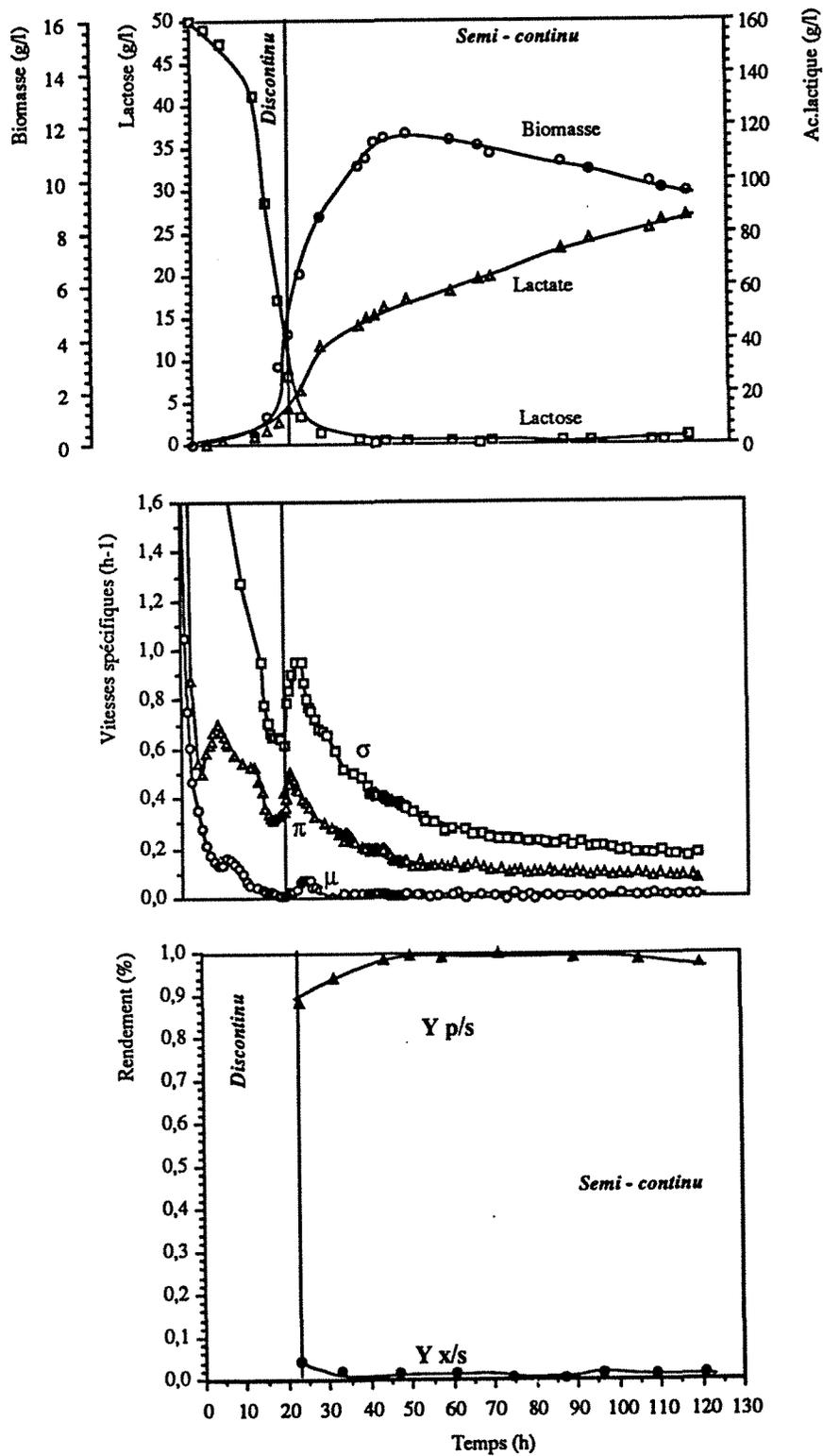


Figure IV.11b : Evolution des concentrations de biomasse, lactose et acide lactique, de la vitesse spécifique de production (π), de consommation (σ) et de croissance (μ), du rendement de production ($Y_{p/s}$) et de croissance ($Y_{x/s}$), avec une alimentation à 30ml/h et 300g/l

2.3. Influence de la variation concentration en alimentation à faible débit

Les conditions de fermentation sont :

- déroulement de la fermentation discontinue : milieu à 50 et 60g/l de lactosérum
- déroulement de la fermentation semi-continue : milieu à 400 et 300 g/l de lactosérum
débit de l'alimentation 30 ml/h
- conditions générales: pH 6,0 et T° 38°C

Remarque : La concentration en lactosérum de départ a été légèrement modifiée à 60g/l, afin de travailler dans des concentrations de lactosérum couramment rencontrées en industries fromagères (6% d'extrait sec).

Les figures IV.11 a et b montrent l'évolution des concentrations, des vitesses spécifiques et des rendements pour deux concentrations de milieu d'alimentation élevées à faibles débits.

La concentration dans l'alimentation est ramenée à 300g/l de lactosérum (soit environ 245g/l de lactose), dans le but de limiter l'accumulation rapide d'acide lactique et éviter une dérive vers un métabolisme hétérofermentaire.

Le temps de latence de 10h se retrouve quelque soit le cas d'une culture discontinue de 50g/l ou 60g/l de lactosérum. L'évolution générale (biomasse et lactose) est identique dans les deux cas. La concentration finale en acide lactique est plus faible pour une concentration en alimentation de 300g/l (95g/l) par rapport à 400g/l (118g/l). La biomasse se maintient autour de 12g/l à 400g/l alors que celle à 300g/l ne fait que baisser (ce qui est dû à l'augmentation de volume). Dans les deux cas, le lactose reste à de très faibles concentrations (< 5 g/l) tout au long du semi-continu.

Les productivités évoluent de la même façon quelque soit la concentration du milieu d'alimentation. Malgré tout, les vitesses spécifiques de production d'acide lactique sont très élevées $0,55h^{-1}$ et $0,64h^{-1}$ respectivement pour 300 et 400g/l. Cela s'explique par les faibles concentrations de biomasse observées.

Les vitesses spécifiques de production de biomasse et de consommation de lactose ne changent pas quand la concentration en lactosérum est de 300 ou 400g/l. Les vitesses spécifiques maximales de consommation et de production de biomasse sont égales à $1,0$ et $0,09h^{-1}$ pour les concentrations d'alimentation respectives de 400 et 300g/l.

Les rendements de production d'acide lactique sont très élevés et se maintiennent plus durablement avec une concentration de 300g/l dans l'alimentation (>95% pendant 80h). Pratiquement tout le lactose est converti en acide lactique. Le rendement global de bioconversion pour la culture semi-continue est toujours de 95%. Aucun composé, autre que l'acide lactique, n'est produit au cours de la fermentation semi-continue.

Le rendement de production de biomasse ne dépasse pas les 5% pour les cultures discontinues.

Les résultats obtenus sont très proches pour des concentrations de 300 et 400g/l avec un débit de 30ml/h. La vitesse spécifique de production d'acide lactique est plus faible quand le milieu d'alimentation est égale à 300g/l, mais le risque d'une dérive métabolique vers la voie hétérofermentaire est quasiment improbable.

La diminution de la concentration de lactosérum provoque la baisse de la concentration d'acide lactique, d'où une limitation de l'effet inhibiteur par l'acide lactique sur la production.

Une concentration de 60g/l de lactosérum en culture discontinue est bien adaptée car elle limite la production d'acide lactique lors de la culture discontinue et diminue les effets inhibiteurs sur la croissance et la production.

2.4. Vitesses

Le tableau IV.1 résume les principaux résultats obtenus pour les 4 fermentations en semi-continu.

Pour les fermentations 1 et 2, les rendements de bioconversion sont très faibles, le métabolisme de la souche est hétérofermentaire. Plus la concentration en acide lactique est élevée, plus l'inhibition est importante et plus les bactéries délaissent la voie homofermentaire. Ceci se traduit par la production d'autres métabolites, par une baisse significative des rendements de conversion du lactose en lactate et par un faible recouvrement carboné.

En diminuant la quantité de substrat apporté (soit en baissant le débit, fermentation n°3, ou en diminuant la concentration, fermentation n°4), les rendements de bioconversion du lactose en biomasse et en acide lactique sont plus élevés.

Le métabolisme reste exclusivement homofermentaire quand les deux paramètres sont bas (débit et concentration) comme dans la fermentation n°4. Le rendement carboné est recouvert. Plus la concentration en lactose et le débit sont faibles, plus le rendement de bioconversion du substrat reste élevé au cours du temps.

Fermentation n°	1	2	3	4
Concentration <i>en discontinu</i>	200	200	50	60
lactosérum <i>en semi-continu</i>	200	400	400	300
Débit (ml/h)	100	100	30	30
Y p/s	80	60	93	92
Y x/s	8,5	5	7	8
Rendement carboné	90	69	100	99
rp (g/l.h)	1,65	1,6	0,95	0,69
Passage en hétérofermentation	oui	oui	o/n	non

Tableau IV.1 : Tableau regroupant les résultats cinétiques de l'ensemble des fermentations semi-continues

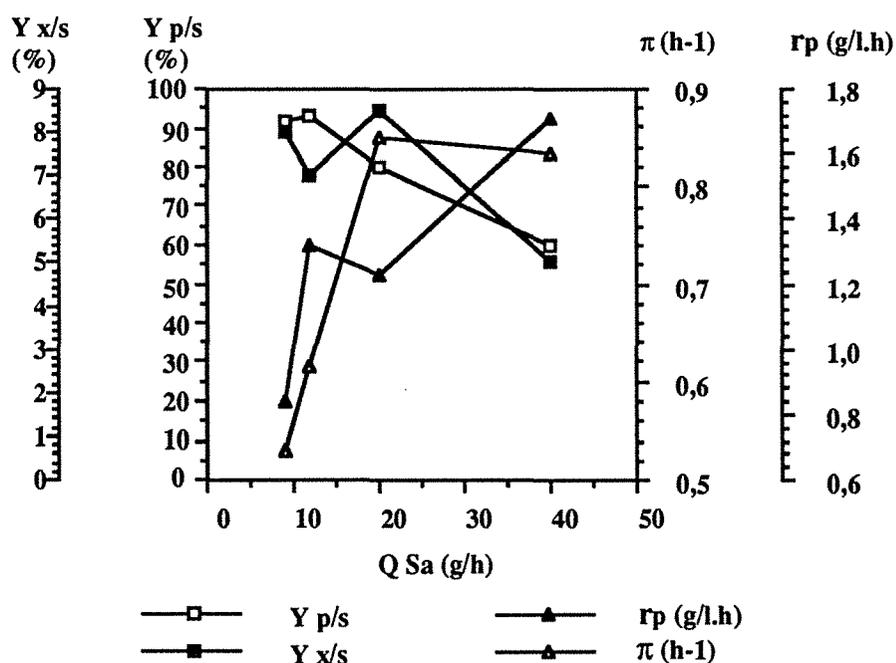


Figure IV.12 : Evolution des rendements (biomasse Yx/s et de production Yp/s), de la productivité (rp) et de la vitesse de spécifique (π) de production maximale en fonction du flux de substrat (Q.Sa)

La figure IV.12 montre l'évolution des rendements de production (biomasse et acide lactique), la vitesse spécifique de production d'acide lactique et la vitesse de production d'acide lactique en fonction du flux de lactose entrant dans le fermenteur.

Pour un flux de substrat faible, les rendements de production et de croissance sont élevés. Au contraire un flux élevé favorise la vitesse spécifique et la productivité de l'acide lactique au détriment des rendements.

Un flux important de lactose favorise la production d'acide lactique qui au delà de 100g/l modifie le métabolisme de la bactérie. Ceci se traduit par la baisse des rendements de production de biomasse et d'acide lactique.

Si nous désirons favoriser la vitesse et le rendement de production d'acide lactique, nous devons avoir un flux de lactose aux alentours de 20g/h.

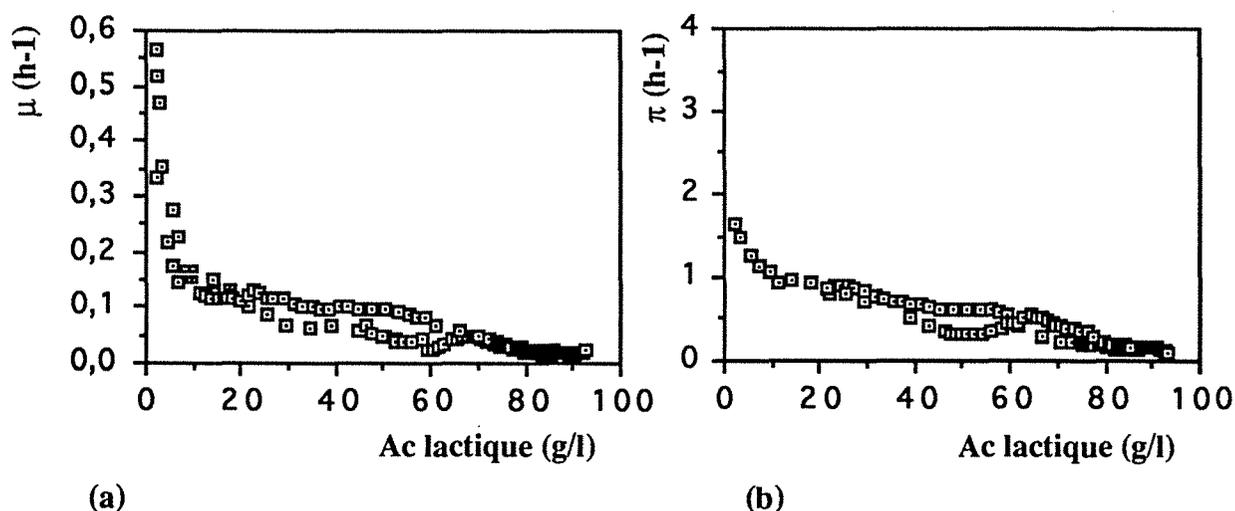


Figure IV.13: Evolution des vitesses spécifiques de croissance (a) et de production d'acide lactique (b) en fonction de la concentration d'acide lactique pour les fermentations 3 et 4

La figure IV.13 montre l'évolution de la vitesse spécifique de croissance et de production d'acide lactique en fonction de la concentration d'acide lactique produit pour les fermentations 3 et 4. Les vitesses spécifiques diminuent moins rapidement et les valeurs sont plus faibles que pour la culture discontinue. Les valeurs des vitesses spécifiques s'annulent avec des concentrations d'acide lactique pouvant atteindre 100g/l. L'effet inhibiteur de croissance et de la production d'acide lactique est dû aux fortes concentrations d'acide lactique produite.

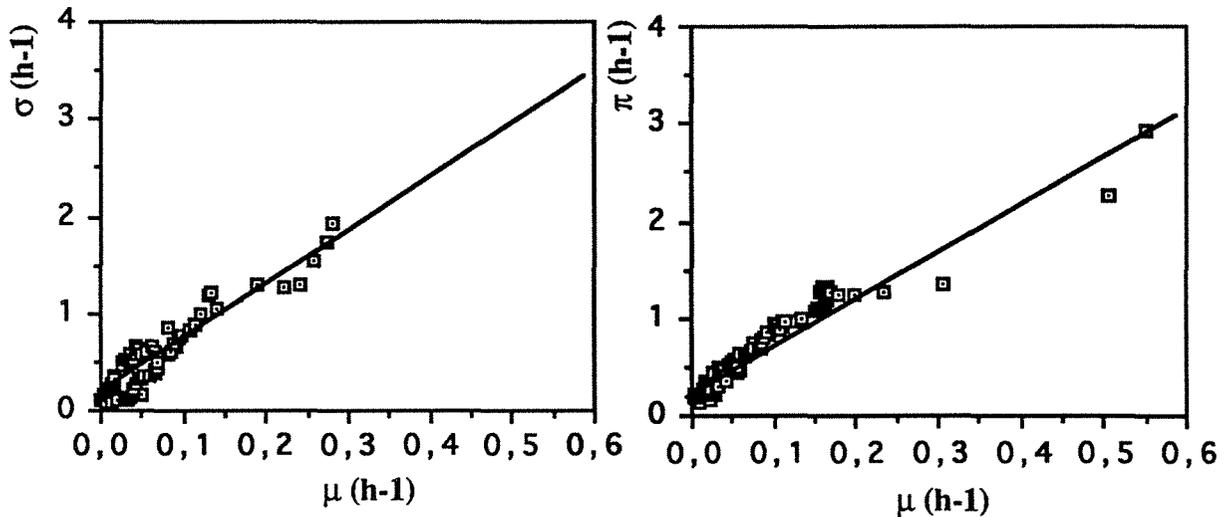


Figure IV.14 : Evolution de la vitesse spécifique de consommation et de production d'acide lactique en fonction du taux de croissance

La **figure IV.14** représente la vitesse spécifique de production d'acide lactique et de consommation en fonction du taux de croissance. Cette représentation permet de déterminer la valeur de la maintenance m et le rendement théorique de production de biomasse $Y_{x/s}$. Les résultats obtenus sont les mêmes que celles des cultures discontinues ; m et $Y_{x/s}$ sont égales à $0,2h^{-1}$ et $0,2$.

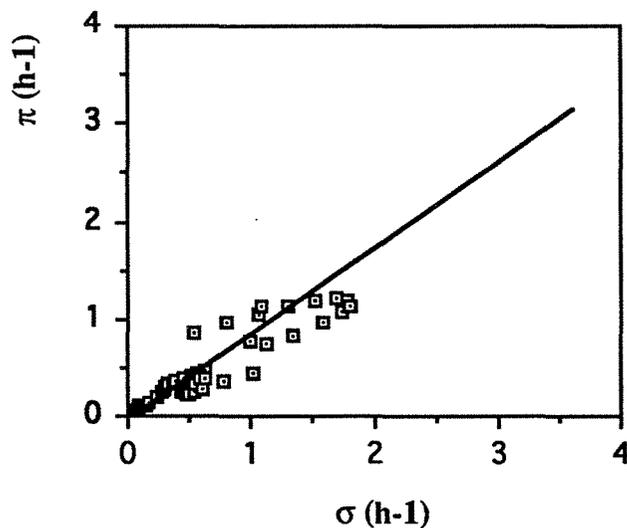


Figure IV.15 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide lactique en fonction de la vitesse spécifique de consommation de lactose

La dernière représentation de la vitesse spécifique de production d'acide lactique en fonction de la vitesse spécifique de consommation montre l'existence d'une relation linéaire (**figure IV.15**). La pente de cette droite correspond au rendement théorique de production d'acide lactique dont la valeur est semblable au mode de culture discontinue ($Y_{p/s}=0,88$).

CONCLUSIONS

L'étude cinétique en culture discontinue montre que *L. casei* consomme le lactose pour produire de la biomasse et de l'acide lactique. La croissance bactérienne a montré un μ_{\max} équivalent à $0,38\text{h}^{-1}$ au début de la fermentation et k_d de $0,015\text{h}^{-1}$ en fin de fermentation.

L'acide lactique inhibe la croissance cellulaire et la production d'acide lactique. La vitesse de consommation de lactose est à la fois proportionnelle à la vitesse de croissance et à la concentration en biomasse. Enfin, la production d'acide lactique est proportionnelle à la consommation de lactose.

Les rendements théoriques de production de biomasse et d'acide lactique sont respectivement égales à 0,19 et 0,88 et la maintenance se situe à $0,2\text{h}^{-1}$.

Pour les cultures semi-continues, les résultats des rendements théoriques et de maintenance sont identiques aux cultures discontinues. L'effet inhibiteur de l'acide lactique sur la croissance et la production apparaît à 100g/l en semi-continu contre 90g/l en mode discontinu.

L'étude de ces cultures a montré qu'il était possible d'augmenter le rendement de production d'acide lactique et d'éviter le passage de la fermentation vers une hétérofermentation. Les deux facteurs influençant le bon fonctionnement sont le débit et la concentration du milieu d'alimentation.

Jouant sur le caractère insoluble du lactate de calcium, notre objectif est d'éliminer en continu l'acide lactique produit au cours de la fermentation. De plus, si nous favorisons l'extraction du lactate de calcium, les effets inhibiteurs de l'acide sur la production et le développement bactérien seraient certainement réduits voire éliminés. Les travaux qui suivent sur la modélisation vont apporter des plus amples résultats sur la cinétique de croissance, de production, de consommation et de cristallisation du lactate de calcium.

Suite à l'étude cinétique en mode discontinu et semi-continu, il semble que les lois qui définissent la croissance de la biomasse, la production d'acide lactique et la consommation de lactose soient identiques. Les valeurs des paramètres cinétiques sont semblables pour les deux types de fermentation. Ainsi, nous pouvons entrevoir un modèle identique pour une culture discontinue et semi-continue sur lactosérum.

**V. MODELISATION ET SIMULATION
DE LA FERMENTATION LACTIQUE**

L'imaginaire est ce qui
tend à devenir réel.

André BRETON

V. MODELISATION ET SIMULATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE

1. MODELISATION DES FERMENTATIONS DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES	145
1.1. Hypothèses et lois cinétiques.....	145
1.1.1. Croissance et décès.....	145
1.1.2. Consommation du substrat.....	146
1.1.3. Production d'acide lactique.....	146
1.2. Equations de bilans de matière	148
1.2.1. En culture discontinue.....	148
1.2.2. En culture semi-continue.....	148
1.3. Estimations des paramètres cinétiques.....	150
1.4. Résultats du modèle	152
1.4.1. En culture discontinue.....	152
1.4.2. En culture semi-continue.....	154
1.4.3. Conclusion	156
2. SIMULATIONS EN CULTURE SEMI-CONTINUE ET EN SYSTEME FCF	158
2.1. Simulations en culture semi-continue.....	158
2.1.1. Influence de la concentration du milieu d'alimentation	158
2.1.2. Influence du débit d'alimentation	160
2.1.3. Conclusion.....	161
2.2. Simulation du procédé FCF.....	162
2.2.1. Etude cinétique de la cristallisation	162
2.2.1.1. Etude de l'évolution de l'acide lactique dans le cristalliseur.....	162
2.2.1.2. Détermination de la vitesse de cristallisation	164
2.2.2. Etude de simulation du procédé FCF.....	166
2.2.2.1. Détermination du débit de cristallisation	168
2.2.2.2. Equations de bilans de matière du procédé FCF.....	169
2.2.2.3. Résultats de la simulation du procédé FCF	172
2.2.3. Conclusion	177
CONCLUSIONS.....	178

Le travail de modélisation que nous allons réaliser doit nous permettre à terme d'optimiser un système alliant une culture semi-continue couplé à une cristallisation et une extraction du lactate de calcium en continu (**figure IV.8, chapitre IV.2**). Pour cela, nous proposons dans un premier temps de construire un modèle cinétique non structuré capable de simuler la fermentation de *L. casei* en culture discontinue, semi-continue puis de l'utiliser afin de simuler l'ensemble du système semi-continu, cristallisateur et extraction du lactate de calcium. Dans la littérature, bien qu'il existe de nombreux modèles de la fermentation lactique, aucun n'a jusqu'à présent intégré l'extraction de l'acide lactique.

Dans ce chapitre, nous proposons dans la première partie de modéliser la fermentation discontinue et semi-continue.

Dans un premier temps, nous avons établi les hypothèses et les lois cinétiques, puis nous définirons les équations de bilans de matière pour des cultures discontinues et semi-continues.

Après estimations des paramètres cinétiques, nous appliquerons le modèle au culture discontinue et semi-continue

La deuxième partie regroupera les simulations des fermentations semi-continues et du système fermentation semi-continue, cristallisation et filtration du lactate de calcium (FCF).

Tout d'abord, la simulation en culture semi-continue montrera l'influence du débit et de la concentration dans l'alimentation sur les variables cinétiques et la productivité.

Puis grâce à une étude cinétique de la cristallisation du lactate de calcium, des simulations seront réalisées pour le procédé FCF afin de suivre l'évolution de la productivité et du rendement.

1. MODELISATION DES FERMENTATIONS DISCONTINUES ET SEMI-CONTINUES

Pour réaliser la modélisation des fermentations discontinues et semi-continues, les hypothèses et lois cinétiques sont établies grâce aux études cinétiques réalisées préalablement, puis les équations de bilans de matières sont définis. Après l'estimation des paramètres, nous montrerons que le modèle défini suit correctement l'évolution des fermentations discontinues et semi-continues.

1.1. Hypothèses et lois cinétiques

L'étude cinétique de *L. casei* réalisée précédemment a montré que les principales lois cinétiques qui régissent le comportement de ce microorganisme sont les mêmes en culture discontinue et semi-continue. Les hypothèses du modèle seront présentées sous la forme d'équations mathématiques pour les cinétiques de consommation du lactose, de production de biomasse et d'acide lactique.

1.1.1. Croissance et décès

La cinétique de développement bactérien suit la loi de MONOD (1942), où la vitesse spécifique de croissance dépend de la source de carbone. Comme la croissance dépend uniquement de la consommation du lactose et qu'aucune forme de diauxie n'est apparente au cours de la croissance, l'expression s'écrit sous la forme suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$$

où S : concentration en lactose dans le milieu (g/l)

K_s : constante d'affinité de *L. casei* pour le lactose (g/l)

Nous avons constaté et les travaux réalisés par ALTABA (1991) montrent également que la croissance est inhibée par la production d'acide lactique totale. Nous introduisons donc le terme d'inhibition par le produit (P) à une puissance α . La vitesse spécifique de croissance s'écrit sous la forme de :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_I} \right)^\alpha}$$

où P : concentration en acide lactique dans le milieu (g/l)
 K_I : constante d'inhibition (g/l)

En plus de l'inhibition, nous avons un décès cellulaire qui apparaît au cours de la fermentation. Nous faisons l'hypothèse que ce taux de décès dépend d'une constante k_d. L'expression s'écrit donc sous la forme de :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_I} \right)^\alpha} - k_d$$

1.1.2. Consommation du substrat

L. casei consomme le lactose sans relarguer le galactose ou le glucose. Nous pouvons considérer que le lactose est l'unique source de carbone pour la bactérie. La vitesse spécifique de consommation du lactose est la somme d'un terme de consommation lié à la croissance et d'un terme non lié à la croissance.

Le rendement théorique (Y_{X/S}) maximum est le rapport de deux termes : vitesse de croissance sur la vitesse de consommation de lactose pour la croissance. D'autre part, nous introduisons un terme de consommation du lactose non lié à la croissance qui correspond à la maintenance qui s'annule lorsque le substrat est nul (m_{max} exprimé en h⁻¹). L'expression de la vitesse spécifique de consommation du lactose s'écrit sous la forme :

$$\sigma = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu + m_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right)$$

1.1.3. Production d'acide lactique

La production d'acide lactique est proportionnelle à la consommation du lactose. Nous définissons un rendement théorique (Y_{P/S}) comme étant le rapport de la vitesse de la production d'acide lactique sur la vitesse de consommation de lactose.

L'expression de la vitesse spécifique de production d'acide lactique s'exprime sous la forme de :

$$\pi = Y_{P/S} \cdot \sigma$$

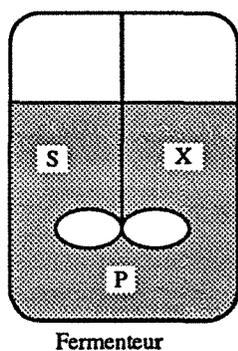


Figure V.1 : Schéma d'une culture discontinue

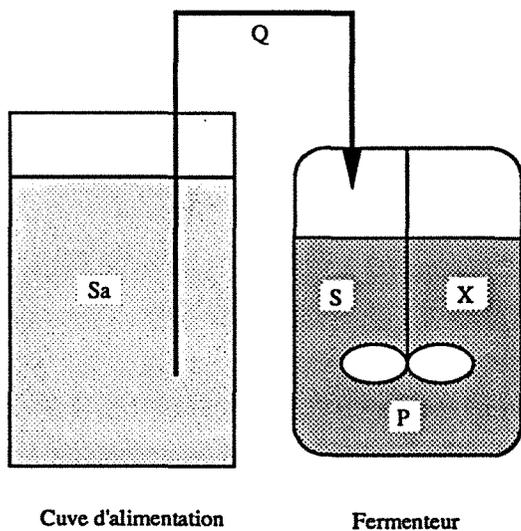


Figure V.2 : Schéma d'une culture semi-continue

1.2. Equations de bilans de matière

Après les premières hypothèses établies sur la croissance, la consommation et la production d'acide lactique, nous allons établir les équations de bilan. Nous procéderons dans un ordre précis : nous étudierons d'abord les fermentations discontinues puis le mode semi-continu.

1.2.1. En culture discontinue

Les équations de bilans pour une culture discontinue (**figure V.1**) sont respectivement pour la croissance, la consommation du lactose, la production d'acide lactique et du volume de chaux ajouté :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt} \quad \frac{dS}{dt} = -\sigma \cdot X - \frac{S}{V} \frac{dV}{dt} \quad \frac{dP}{dt} = \pi \cdot X - \frac{P}{V} \frac{dV}{dt}$$

et

$$\frac{dV}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] \cdot K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V$$

(K_P , coefficient de proportionnalité est expliqué en détail dans le **chapitre suivant V 2.2.**)

1.2.2. En culture semi-continue

En culture semi-continue, une alimentation en milieu nutritif est apportée à un débit Q , avec une concentration en lactose S_a (**figure V.2**).

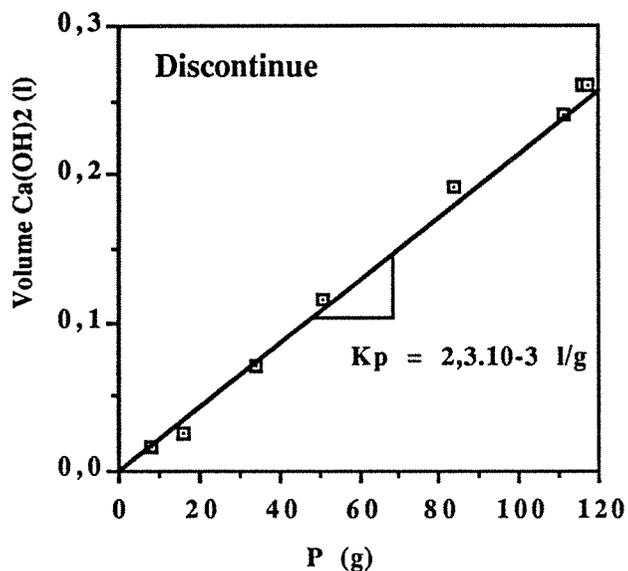
La variation de volume dans le fermenteur dépend à la fois de l'ajout du milieu nutritif, mais également de l'ajout de la chaux qui est proportionnel à la quantité d'acide lactique produit. Comme le volume de la base ajouté est très important, l'expression de variation de volume dépend également d'un terme de coefficient de proportionnalité (K_P) fonction de la quantité d'acide lactique produite. K_P représente donc le rapport du volume de chaux ajouté sur la quantité d'acide lactique produit (soit la pente des droites des **figures V 3a et b**). L'expression du débit total dépend de la somme du débit d'alimentation en substrat et d'ajout de la chaux.

$$\frac{dV}{dt} = Q_{\text{chaux}} + Q_{\text{substrat}} = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] \cdot K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V + Q$$

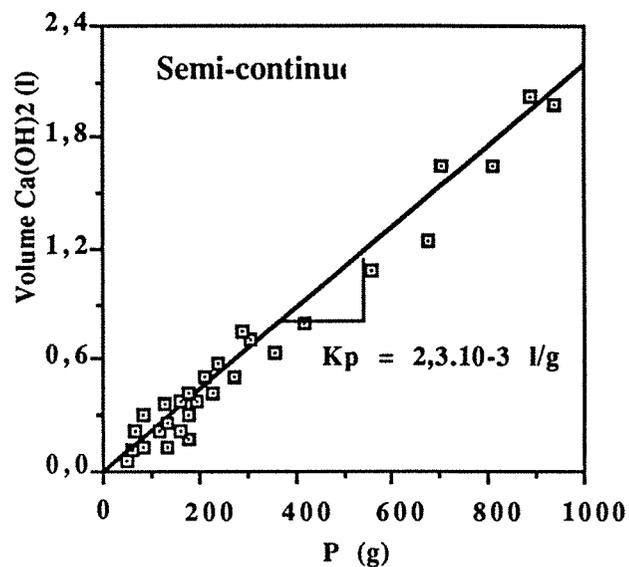
Comme aucune élimination de milieu fermentaire n'est réalisée, le volume du milieu augmente. Les équations de bilans s'écrivent sous la forme suivante :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \left[\frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V} \right] = \mu \cdot X - \left[\left(\left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] \cdot K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V + Q \right) \cdot \frac{X}{V} \right]$$

$$\frac{dS}{dt} = -\sigma \cdot X - \left[\frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} \right] + \left[\frac{Q \cdot S_a}{V} \right] = -\sigma \cdot X - \left[\left(\left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] \cdot K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V + Q \right) \cdot \frac{S}{V} \right] + \left[\frac{Q \cdot S_a}{V} \right]$$



(a)



(b)

Figure V 3 : Evolution du volume de chaux ajouté en fonction de la quantité d'acide lactique ajouté pour une fermentation en discontinu (a) et semi-continu (b)

	Paramètres issus de l'étude cinétique	Paramètres estimés
μ_{\max} (h^{-1})	0,38	-
$Y_{x/s}$ (%)	9,5	-
$Y_{p/s}$ (%)	80,0	-
K_s (g/l)	-	0,5
K_i (g/l)	30	-
k_d (g/l)	$1,5 \cdot 10^{-2}$	-
K_p (l/g)	$2,3 \cdot 10^{-3}$	-
m_{\max} (h^{-1})	0,2	-
α	-	2,4

Tableau V.1. : Résultats des différents paramètres

$$\frac{dP}{dt} = \pi \cdot X - \left[\frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V} \right] = \pi \cdot X - \left[\left(\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right) \cdot K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V + Q \right) \cdot \frac{P}{V} \right]$$

Par rapport aux expressions définies en mode discontinu, la variation de la biomasse et du produit dépend de la variation du volume dans le fermenteur. Par contre, pour le substrat, nous avons en plus un autre terme celui de l'ajout du lactose.

Les équations différentielles se résolvent par la méthode d'intégration RUNGE-KUTTA, qui permettra de déterminer à chaque instant la concentration en biomasse, en acide lactique, en lactose, le volume du fermenteur et l'évolution de la productivité en fonction du temps.

Les paramètres ont été optimisés pour que le modèle soit valable en discontinu et semi-continu.

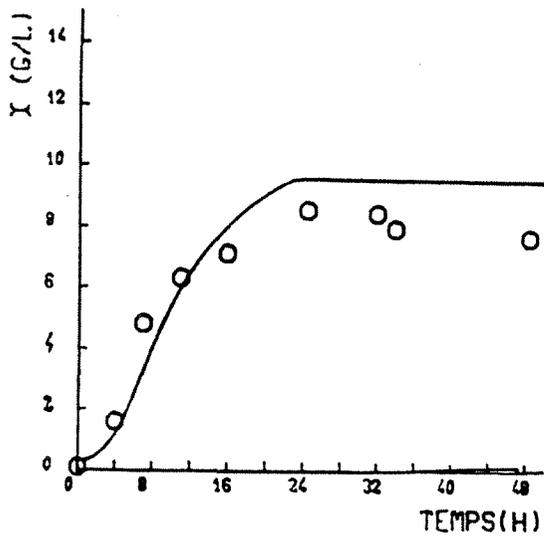
1.3. Estimations des paramètres cinétiques

La détermination des valeurs des paramètres cinétiques (K_S et α) est réalisée par simulation lors de l'ajustement des profils des concentrations théoriques et expérimentaux.

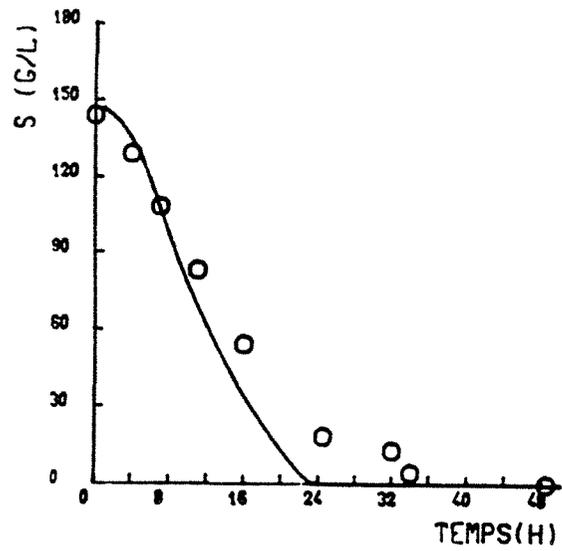
Le résultat des rendements de production d'acide lactique, de biomasse et la vitesse spécifique maximale de croissance, constante de décès sont déterminés à partir des fermentations sur l'étude des procédés de fermentation sur lactosérum. L'ensemble des résultats des fermentations discontinues et semi-continues provient des études cinétiques du **chapitre IV.1.** et **IV.2**

L'étude a été menée sur la comparaison des résultats théoriques et expérimentaux de la concentration en biomasse, en lactose, en acide lactique et du volume dans le fermenteur. Les paramètres de la simulation sont ajustés afin d'avoir des profils théoriques et expérimentaux très proches.

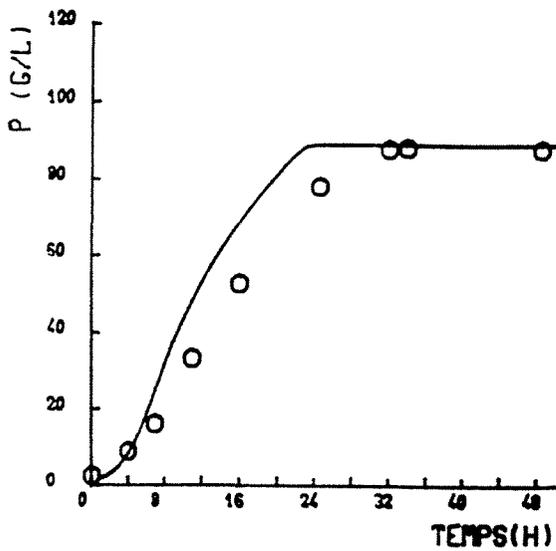
Les principaux paramètres obtenus lors des études cinétiques et de la simulation sont résumés dans le **tableau V.1.**



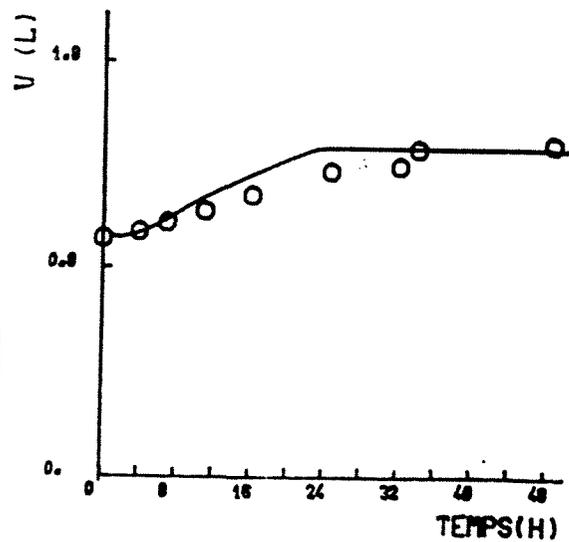
(a)



(b)



(c)



(d)

(—: Modélisation; O : Résultats expérimentaux)

Figure V.3: Simulation d'une fermentation en mode discontinu

(Evolution de la biomasse (a), du lactose (b), de l'acide lactique (c) et du volume (d) au cours du temps)

1.4. Résultats du modèle

Nous allons confronter le modèle aux expériences de fermentations lactiques sur perméat de lactosérum en mode discontinu et semi-continu (débit et concentration d'alimentation variables).

1.4.1. En culture discontinue

La **figure V.3** présente l'évolution de la biomasse, lactose, acide lactique et du volume au cours du temps.

Le modèle défini, pour une culture en discontinu, a été optimisé pour que les courbes théoriques soient en accord avec les résultats expérimentaux d'une fermentation, dans des conditions optimales, étudiée dans le **chapitre IV 1**.

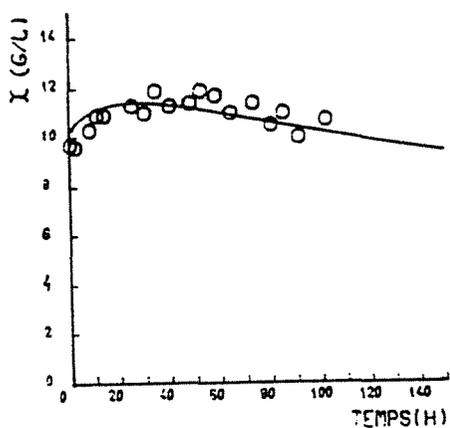
L'évolution de la simulation de la biomasse suit étroitement les résultats expérimentaux sur les 15 premières heures puis un écart entre les résultats expérimentaux et la simulation est observé.

Cette évolution est répétée pour la courbe de la concentration en substrat. Il est constaté que la consommation du lactose est totale au bout de 24h alors qu'en réalité cela ne se réalise qu'après la 35^{ème} heure.

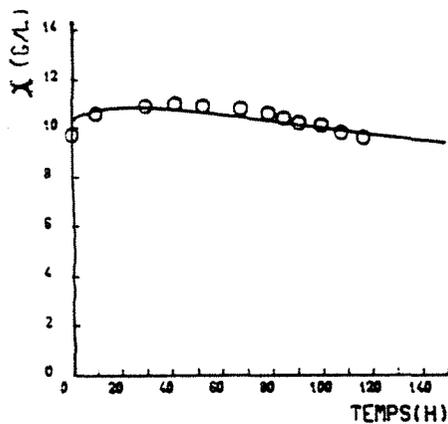
L'ajustement des paramètres a été réalisé pour que l'évolution de l'acide lactique soit concordante avec la fin de fermentation.

L'évolution du volume du milieu de fermentation tient compte de l'ajout de la chaux. La valeur de K_p , coefficient de proportionnalité volumique de la chaux, fonction de la quantité de l'acide lactique dans le milieu, est correcte car le volume simulé suit les résultats expérimentaux.

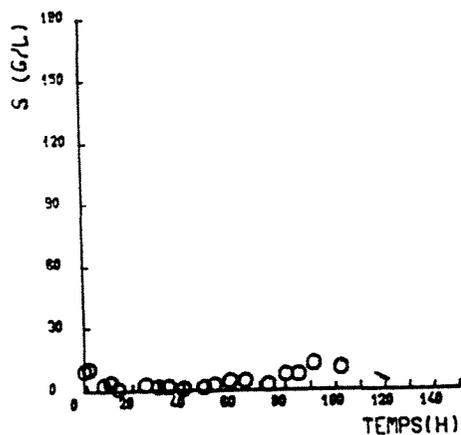
Pour une fermentation discontinue (D), les paramètres de simulation permettent au modèle de suivre correctement les résultats expérimentaux.



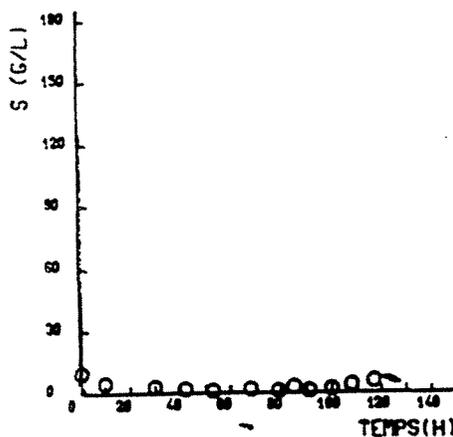
(a')



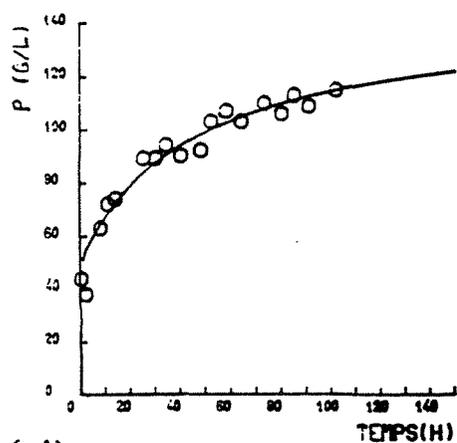
(a'')



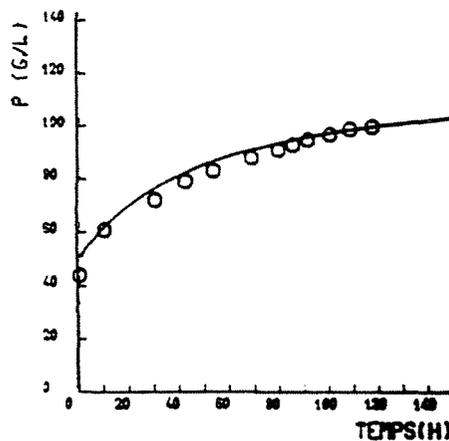
(b')



(b'')



(c')



(c'')

(—: Modélisation; O: Résultats expérimentaux)
 (' : 30ml/h, 400g/l, '' : 30ml/h, 300g/l)

Figure V.4 : Simulation d'une fermentation en mode semi-continu
 (Evolution de la biomasse (a), du lactose (b), de l'acide lactique (c) au cours du temps)

1.4.2. En culture semi-continue

Nous allons comparer les résultats de fermentations semi-continues pour un débit d'alimentation de 30ml/h. Cela regroupe 4 fermentations en mode semi-continu, dont nous mettrons deux exemples représentatifs avec des concentrations de 300 et 400g/l :

La simulation réalisée sur une culture en semi-continu avec un débit de 30ml/h et 400g/l montre que les courbes du modèle simulent de façon satisfaisante la réalité expérimentale (**figures V.4 a', b', c' et figures V.5 a', b'**). L'ensemble des courbes de la biomasse, lactose, acide lactique, volume et productivité sont proches de la réalité.

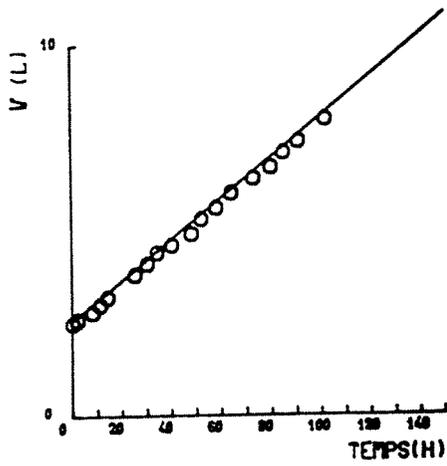
Pour une culture avec un débit équivalent mais une concentration en lactose de 300g/l, le modèle confirme les premiers résultats et son adaptation à de nouvelles conditions (**figures V.4 a'', b'', c'' et figures V.5 a'', b''**). La fermentation est bien simulée pour la biomasse, le lactate et le volume. La constante de décès cellulaire dans l'expérience semble, cependant, plus élevée.

Le changement à la fois du débit (100ml/h) et de la concentration en lactose dans le milieu d'alimentation (200g/l) confirme les résultats précédents.

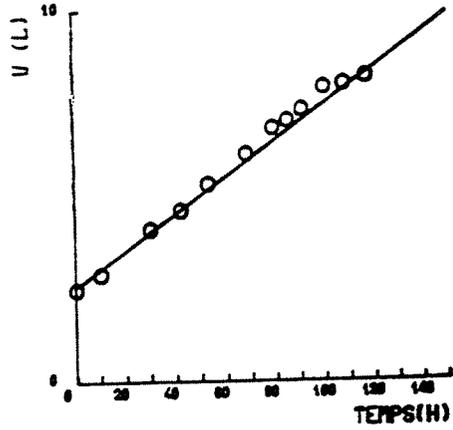
Cette simulation de la fermentation est également satisfaisante. Des faibles écarts entre expérimentation et simulation apparaissent pour la biomasse et la concentration en acide. Il aurait fallu plus de points expérimentaux et plus d'expériences pour conclure définitivement.

Néanmoins, l'évolution de la concentration en lactose dans le fermenteur est bien visible contrairement à la simulation précédente, la concentration baisse rapidement pour se stabiliser à une valeur très faible.

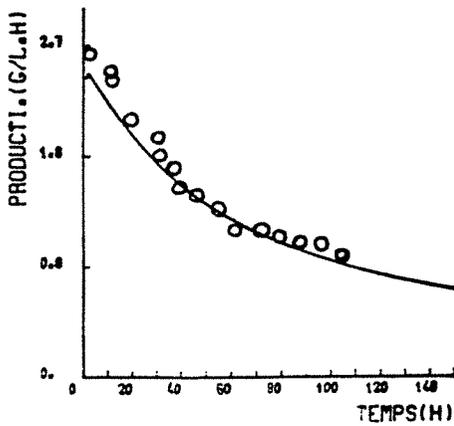
Les paramètres définis pour la culture en discontinu sont également valables pour la culture en semi-continu.



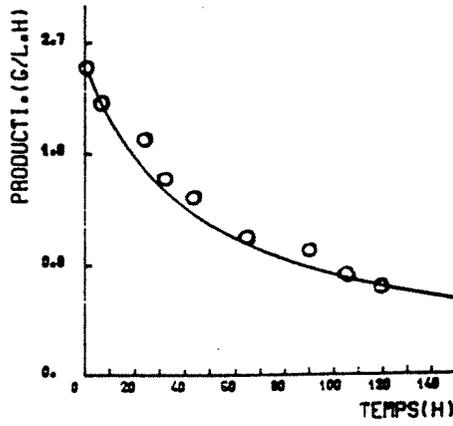
(a')



(a'')



(b')



(b'')

(—: Modélisation; O: Résultats expérimentaux)
 (' : 30ml/h, 400g/l, '' : 30ml/h, 300g/l)

Figure V.5 : Simulation d'une fermentation en mode semi-continu
 (Evolution de la volume (a) et de la productivité volumique (b) au cours du temps)

1.4.3. Conclusion

L'étude en mode discontinu suit convenablement le déroulement de cinétiques de consommation et de production d'acide lactique. La modélisation de la biomasse est moins précise sur la fin de la fermentation.

Par contre, le modèle est plus concordant avec la réalité en mode semi-continu.

De plus, l'ajout important de la chaux est parfaitement suivi par le modèle.

La définition du modèle et des paramètres est adaptée aux fermentations semi-continues du lactosérum par *L. casei* pour produire de l'acide lactique. Ainsi, dans la partie qui suit, une étude sur la simulation des fermentations est réalisée en fonction de débits et de concentrations variables. L'intérêt de ce travail est de suivre les effets de ces deux paramètres opératoires sur la croissance, la consommation, la production et la productivité d'acide lactique.

Le modèle est défini comme valable dans un intervalle de concentration et de débit d'alimentation compris respectivement de 200 à 400g/l et de 0,03 à 0,10l/h.

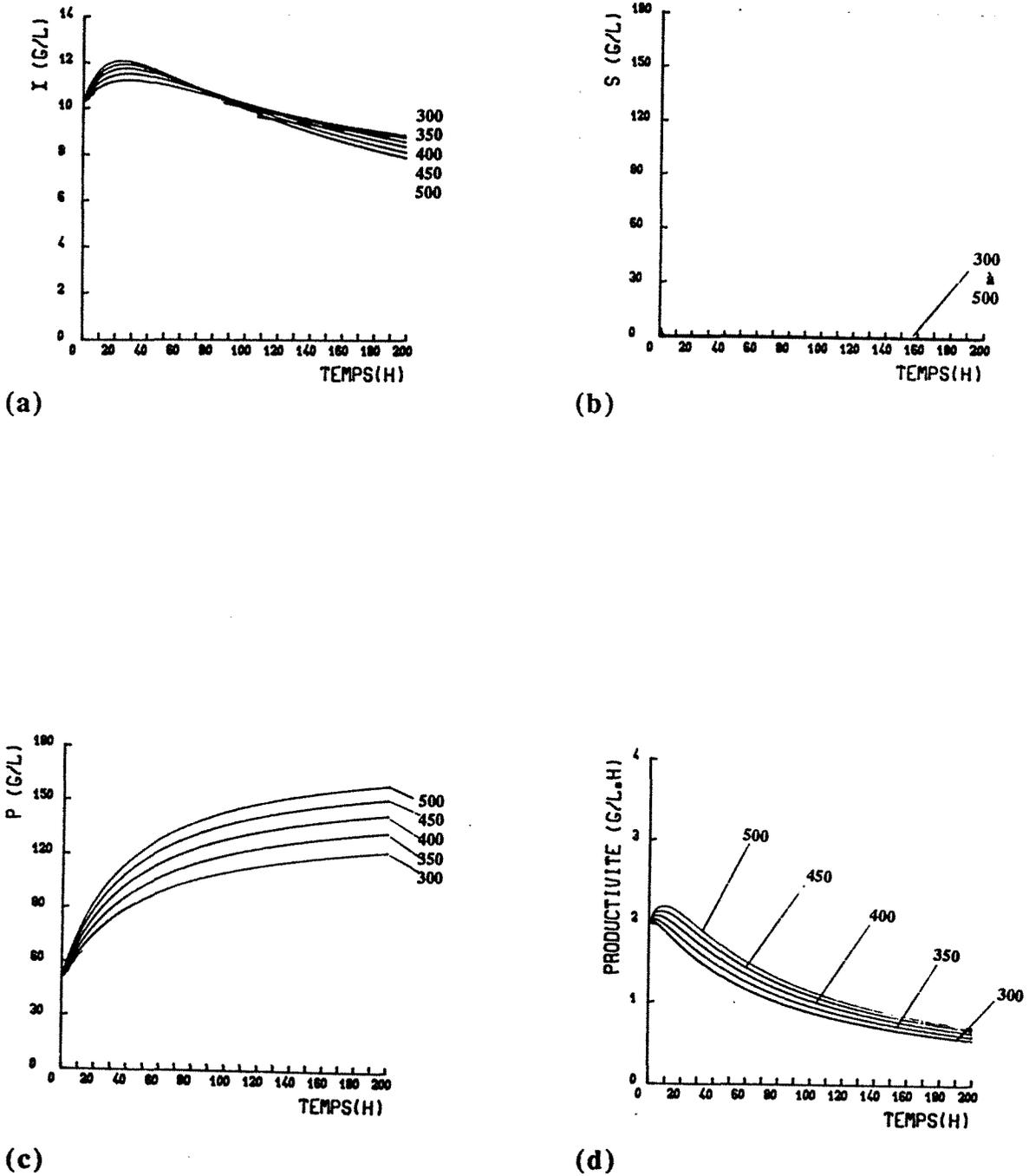


Figure V.6 : Simulation d'une fermentation en mode semi-continu avec un débit de 30ml/h en fonction de diverses concentrations de lactose dans le milieu d'alimentation
(Evolution de la biomasse: a, du lactose : b, de l'acide lactique : c et de la productivité : d)

2. SIMULATIONS EN CULTURE SEMI-CONTINUE ET EN SYSTEME FCF

Grâce à la modélisation, nous allons suivre l'influence sur la productivité et le rendement de certains paramètres en culture semi-continue et en système FCF.

2.1. Simulations en culture semi-continue

A l'issue de ces premiers résultats, nous avons défini un modèle adapté aux fermentations en mode discontinu et semi-continu. Les travaux sur les études cinétiques (**chapitre IV 2**) ont montré que la productivité variait en fonction de la concentration du milieu d'alimentation et du débit en mode semi-continu. Dans cette partie, nous allons suivre l'effet de la variation de ces deux paramètres sur la productivité volumique en culture semi-continue

2.1.1. Influence de la concentration du milieu d'alimentation

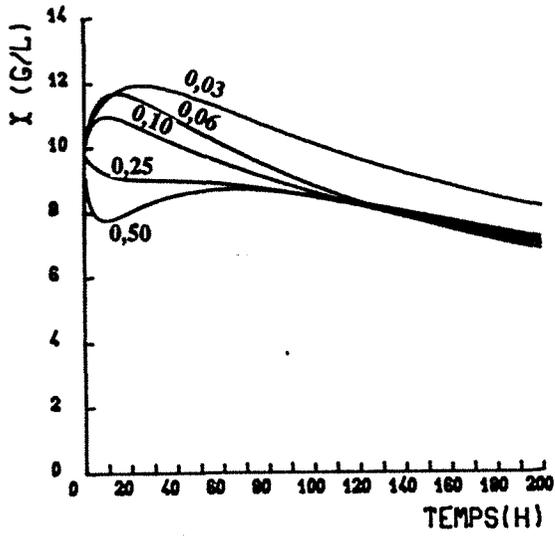
Les paramètres utilisés sont ceux décrits précédemment, le débit d'alimentation est fixé à 0,03 l/h. 5 concentrations de substrat sont testées, ces valeurs sont comprises entre 300g/l (afin d'éviter les effets de dilution pour la valeur minimale) et 500g/l de lactosérum (qui correspond à la limite de solubilité du lactose).

L'évolution de la biomasse varie en fonction de la concentration du substrat d'alimentation. Dans les 120 à 130 premières heures, la biomasse se développe de façon moins importante quand le substrat est moins concentré et elle se maintient autour de 9,5g/l après 200h (**figure V.6 a**). Pour les fortes concentrations de substrat, la bactérie croît rapidement dans les 25 premières heures puis décroît régulièrement jusqu'à 8g/l à la fin de la fermentation semi-continue.

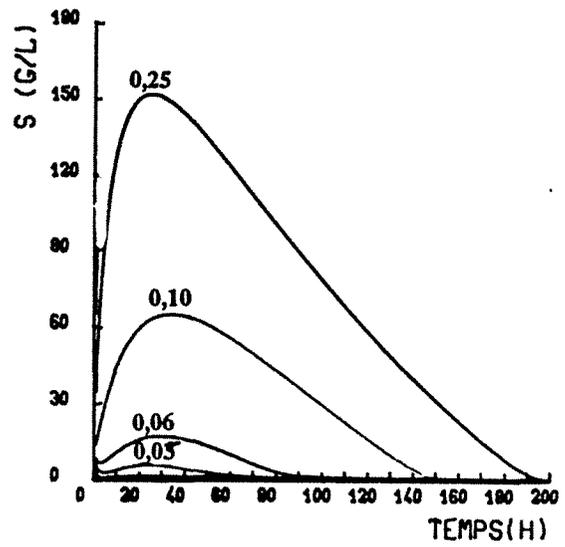
La concentration de substrat est toujours proche de 0 quelque soit le concentration de l'alimentation. L'influence sur la biomasse est faible puisque l'écart le plus important entre les 5 courbes n'est que de 1,8 g/l à 25 h (**figure V.6 b**).

Par contre, l'influence sur la concentration en acide lactique est importante : plus la concentration en lactose dans l'alimentation est élevée, plus la concentration en acide lactique produit est forte (**figure V.6 c**).

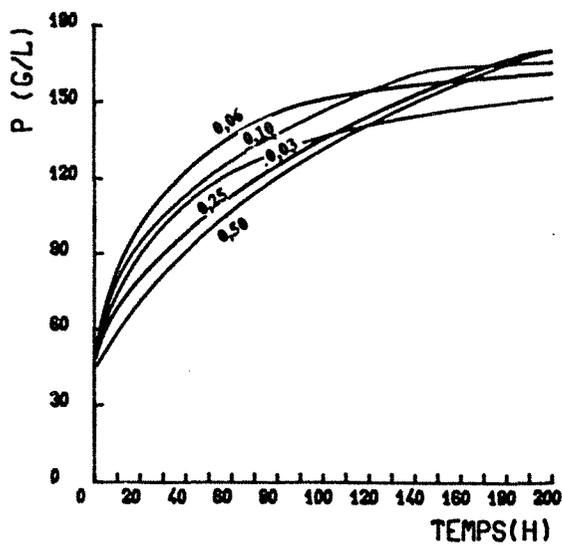
La productivité suit la même évolution que la production d'acide lactique (**figure V.6 d**), plus la concentration de lactose augmente, plus la productivité augmente elle aussi. La productivité est de 0,95g/l.h et 0,45g/l.h après 200h pour des concentrations respectives de substrat de 500 et 300g/l.



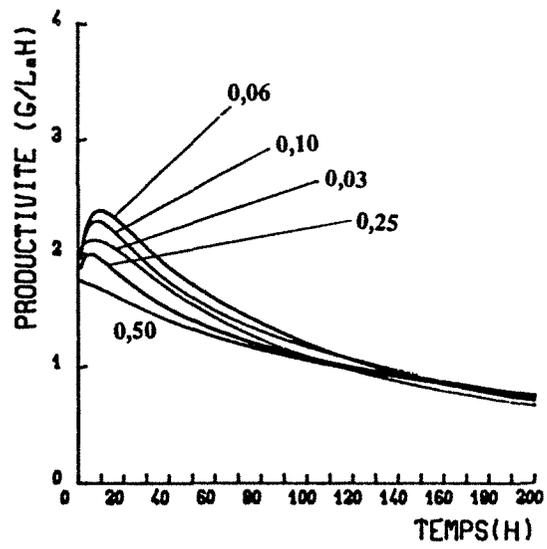
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure V.7 : Simulation d'une fermentation en mode semi-continu avec 450g/l de substrat d'alimentation en fonction de divers débit du milieu d'alimentation

(Evolution de la biomasse: a, du lactose : b, de l'acide lactique : c et de la productivité : d)

La simulation montre que si l'on dépasse les concentrations de 500g/l de lactose, la production peut encore augmenter. Mais en réalité, la solubilité du lactose est déjà à sa limite quand nous sommes à 500g/l, donc nous ne pouvons plus augmenter la productivité, à faible débit.

Pour un faible débit d'alimentation, la productivité est proportionnelle à la concentration en lactose dans le milieu d'alimentation. Pour la suite des travaux sur l'influence du débit d'alimentation, nous fixerons une concentration en lactose de 450g/l.

2.1.2. Influence du débit d'alimentation

La concentration en substrat est fixée à 450 g/l, qui correspond à la limite de la solubilité du lactose dans le lactosérum, et plusieurs débits d'alimentation sont testés (10, 30, 100 et 500 ml/h).

Pour les débits compris entre 30 et 100 ml/h, la production de biomasse augmente dans les 25 premières heures (12g/l pour un débit de 30 ml/h) puis décroît régulièrement jusqu'à 8g/l (**figure V.7 a**). Quand le débit dépasse 200ml/h, la production de biomasse évolue différemment : baisse de la biomasse durant les 20 premières heures (8g/l pour un débit de 500ml/h) puis légère reprise du développement et stabilisation de la concentration (8,7g/l) après la 90^{ème} heure.

Les débits de 100 à 500ml/h provoquent une accumulation de lactose dans les 25 premières heures, puis une baisse régulière de la concentration en substrat jusqu'à atteindre le seuil de 0 g/l. La disparition du lactose dans le milieu se réalise plus tardivement quand le débit est élevé. Par contre, une baisse de débit à 60ml/h et moins ne fait pas ou peu apparaître de lactose dans le milieu (**figure V.7 b**).

La production d'acide lactique est lente quand le débit est très faible (30ml/h) (**figure V.7 c**). Un débit de 60ml/h augmente la production d'acide lactique. A partir de 100ml/h, la production d'acide est moins importante durant les 120 premières heures. Cette baisse, durant cette période, est plus accentuée quand le débit est de 250 ou 500ml/h. C'est seulement à la fin de la simulation que la concentration est plus élevée que pour les faibles débits.

Les courbes de productivité évoluent de la même façon : augmentation de la productivité dans les 15 premières heures suivie d'une baisse jusqu'à stabilisation autour de

0,95g/l.h. Le passage de 30 à 60ml/h montre une augmentation de la productivité. Pour un débit supérieur, allant de 100 à 500ml/h, la productivité est moins importante dans les 100 premières heures. Quelque soit le débit d'alimentation la productivité est identique après 140 heures de simulation.

Le débit 60ml/h montre que la biomasse se développe bien, qu'il n'y a que très peu d'accumulation de lactose et une très bonne production et productivité volumique d'acide lactique. Un dépassement du débit modifie de façon négative l'ensemble de ces trois paramètres.

2.1.3. Conclusion

La concentration idéale du milieu d'alimentation pour des cultures semi-continues est 450g/l. Cette limite de concentration ne peut être dépassée, car nous sommes à la limite de la solubilité du lactose. Par contre, une dilution du milieu d'alimentation ferait augmenter le volume du milieu et diminuer la productivité.

L'augmentation du débit aux fortes concentrations favorise la productivité jusqu'à une certaine limite. Au delà de 60ml/h, nous observons une baisse de la production, une accumulation du lactose et une baisse de la croissance.

Afin de limiter les effets inhibiteurs de l'acide lactique sur la production et la croissance de bactéries, il est souhaitable d'éliminer l'acide au cours de la fermentation. Dans ce cas, il est possible d'augmenter ou de maintenir plus longtemps la productivité.

Le lactate de calcium produit au cours de la fermentation précipite à faible température. Ces cristaux sont donc facilement séparés du jus de fermentation par une simple filtration. C'est dans cette optique que nous essayer de définir un modèle alliant fermentation et élimination du lactate de calcium.

2.2. Simulation du procédé FCF

Afin de pouvoir simuler l'ensemble du procédé fermentation semi-continue, cristallisation et filtration (FCF), il est essentiel de déterminer certains paramètres de la cristallisation.

L'étude des paramètres de la cristallisation, réalisée dans la première partie, va être un outil pour la simulation du système FCF. Nous déterminerons la cinétique de cristallisation dans le cristalliseur, puis nous définirons le débit de cristallisation (Q_c) à appliquer entre le fermenteur et le cristalliseur.

Dans la dernière partie nous établirons l'équation de bilans de matière dans le système FCF afin de suivre l'évolution de la productivité et du rendement lors des simulations du procédé FCF.

2.2.1. Etude cinétique de la cristallisation

Les cristaux de lactate de calcium précipitent en fonction de deux facteurs essentiels : temps de passage du lactate de calcium dans le cristalliseur et concentration d'acide lactique dans le milieu d'alimentation du cristalliseur.

Nous proposons de déterminer la loi cinétique de cristallisation après une première étude sur l'évolution de l'acide lactique dans le cristalliseur.

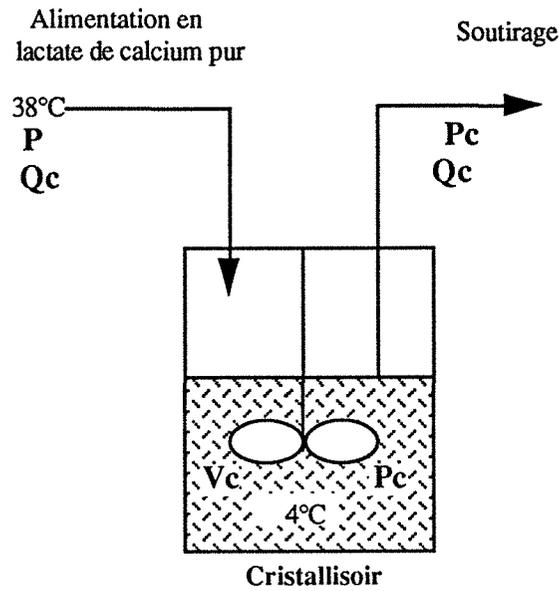
2.2.1.1. Etude de l'évolution de l'acide lactique dans le cristalliseur

Nous procédons de la façon suivante : nous alimentons un cristalliseur à 4°C possédant un système d'agitation (double turbine à 4 pales droites) avec du lactate de calcium, à 38°C et pH 6, représentant le jus de fermentation (**figure V .8**).

La concentration d'acide lactique dans le cristalliseur (P_c) est la somme de l'acide lactique liquide (P_{CL}) et solide (P_{CS}).

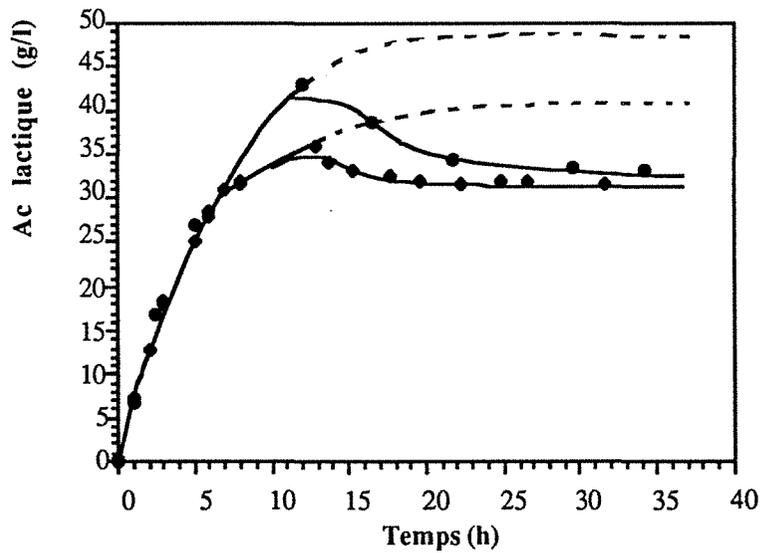
Pour maintenir un volume de cristalliseur constant, nous soutirons le milieu de cristallisation au même débit. Nous faisons varier la concentration du lactate de calcium et les débits d'alimentation et analysons au cours du temps les prélèvements réalisés régulièrement.

Au début, le cristalliseur contient de l'eau, et dans ces conditions, aucun précipité n'est présent. Les conditions expérimentales imposent une concentration minimale (35g/l) afin de se situer au dessus du point de saturation (32g/l à 4°C) et favoriser l'apparition de cristaux.



P : concentration d'acide lactique arrivant dans le cristalliseur
 Pc : concentration d'acide lactique dans le cristalliseur
 Vc : volume du cristalliseur
 Qc : débit de cristallisation

Figure V.8 : Schéma du système de cristallisation



● concentration d'acide dans l'alimentation de 50g/l
 ● concentration d'acide dans l'alimentation de 40g/l
 (- - - : évolution de l'acide lactique sans cristallisation)

Figure V.9: Évolution du lactate de calcium pour un débit de 0,15l/h et une concentration d'alimentation en acide lactique de 40 et 50g/l

La concentration d'acide lactique qui ne subirait pas de cristallisation en système continu est de la forme suivante :

$$[\text{Acide lactique}] = P \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$$

Avec P : concentration d'acide lactique arrivant dans le cristalliseur (g/l)

t : temps (h)

τ : temps de passage (V_c/Q_c) (h)

V_c : volume du cristalliseur (l)

Q_c : débit d'alimentation (l/h)

L'évolution de la concentration d'acide lactique non cristallisé est représentée en ligne discontinue dans **figure V.9** et **10**.

La **figure V.9** montre comment évolue la concentration d'acide lactique non cristallisée et liquide dans le cristalliseur pour deux concentrations différentes.

Il faut noter que la concentration d'acide lactique dosée suit celle non cristallisée jusqu'à un certain temps. A partir du moment où apparaissent les premiers cristaux, la concentration d'acide lactique chute, puis se stabilise.

L'augmentation de la vitesse d'alimentation de 0,12 à 0,50l/h (**figure V.10**) fait avancer le temps d'apparition des premiers cristaux dans le cristallisation et la concentration à l'état stationnaire est plus élevée pour des débits plus forts.

L'évolution de la concentration d'acide lactique liquide dans le cristalliseur est fonction de la concentration d'acide lactique dans l'alimentation (P) et du débit (Q_c).

2.2.1.2. Détermination de la loi cinétique de cristallisation

Comme nous l'avons observé précédemment, la baisse de l'acide lactique liquide est dépendante de la concentration d'acide lactique dans l'alimentation. La concentration d'acide lactique dans l'alimentation est toujours supérieure à la concentration de saturation (32g/l minimum). Dans une première approche, nous pouvons exprimer la vitesse de cristallisation de la manière suivante (MOYERS et ROUSSEAU, 1987):

$$r_c''' = k_c (P_{CL} - P_{ES})^\beta$$

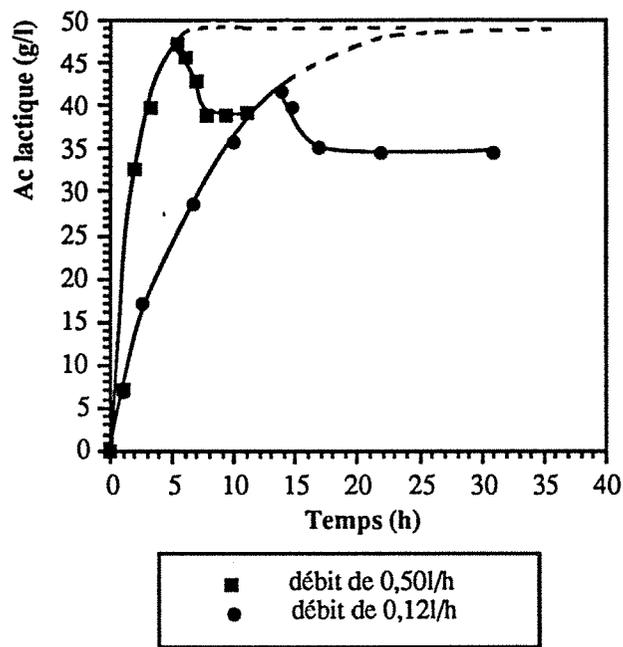
avec : r_c''' : vitesse de cristallisation (g/l.h)

P_{CL} : concentration d'acide lactique soluble dans le cristalliseur (g/l)

P_{ES} : concentration d'acide lactique à l'état de saturation (g/l)

β : ordre de la réaction

k_c : constante de cristallisation (l/g) $^{1-\beta}$.h $^{-1}$



(- - - : évolution de l'acide lactique sans cristallisation)

Figure V.10: Évolution du lactate de calcium pour une concentration d'alimentation en acide lactique de 50g/l et des débits de 0,50l/h et 0,12l/h

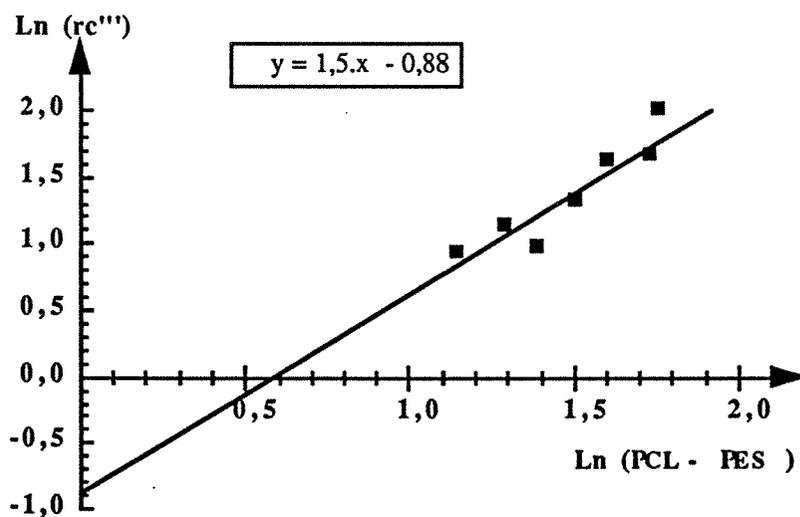


Figure V.11 : Représentation népérienne de la vitesse de cristallisation

Ces expériences sont réalisées pour des concentrations d'acide lactique dans l'alimentation comprise entre 35 et 55g/l et des débits compris entre 150 et 600ml/h.

Le passage par le logarithme népérien de la formule précédente permet de déterminer les deux constantes k_c et β .

$$\ln r_c''' = \ln k_c + \beta \ln(P_{CL} - P_{ES})$$

Les vitesses de cristallisation sont calculées expérimentalement à partir du bilan matière d'acide lactique liquide :

$$Q_c P - r_c''' V_c = Q_c P_{CL} + \frac{d(V_c P_{CL})}{dt}$$

à l'état stationnaire ($dV_c P_{CL}/dt = 0$) :

$$Q_c P - r_c''' V_c = Q_c P_{CL} \quad \text{d'où} \quad r_c''' = Q_c \frac{(P - P_{CL})}{V_c}$$

La figure V.11 donne la représentation népérienne de la vitesse de cristallisation. La pente de la droite correspond à β et le point d'ordonnée à l'origine correspond à $\ln k_c$.

d'où $\beta = 1,5$ et $k_c = 0,44 \text{ l}^{0,5}/\text{g}^{0,5} \cdot \text{h}$

Grâce à l'étude cinétique de cristallisation, nous avons déterminé les deux constantes de la vitesse de cristallisation k_c et β .

Les résultats obtenus sont approximatifs et demandent une étude plus détaillée sur la cristallisation avec l'influence de la température, des concentrations en lactose et biomasse, type de mobile, etc...

2.2.2. Etude de simulation du procédé FCF

Pour simuler le procédé FCF nous allons définir le bilan de matières au niveau du fermenteur, du cristalliseur et du filtre. Puis nous simulerons le procédé fermentation-cristallisation-filtration (FCF) en fonction des paramètres opératoires afin de suivre leur influence sur la productivité et le rendement.

Au préalable, nous fixerons la fonction de débit de cristallisation à partir des données cinétiques du chapitre précédent.

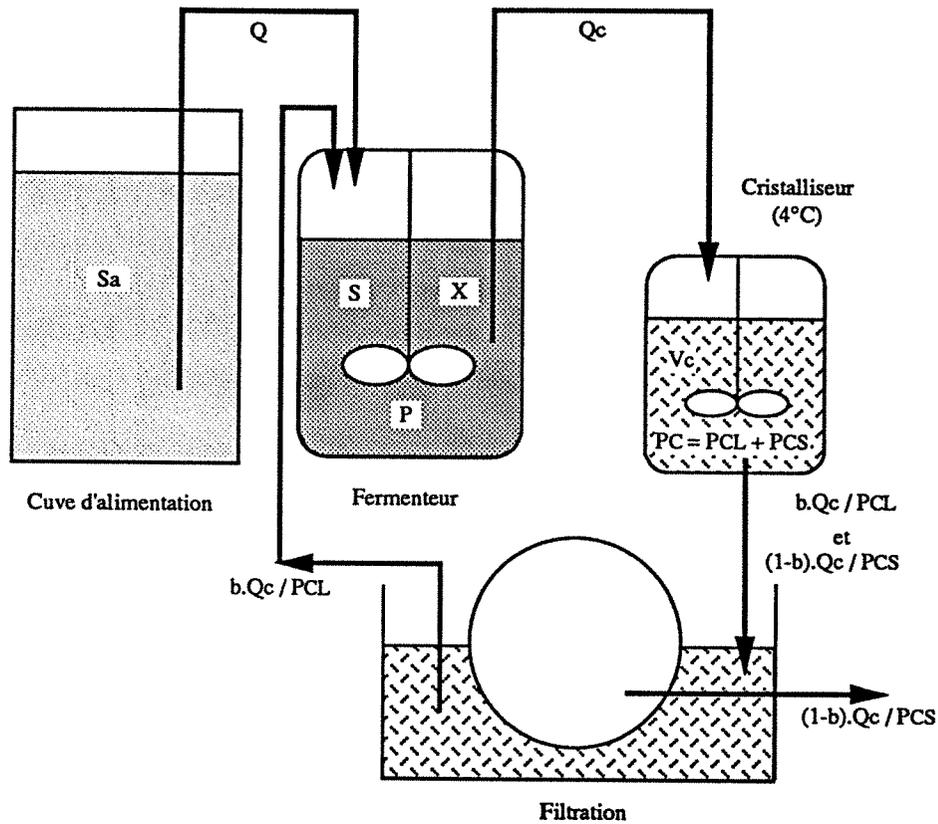


Figure V.12 : Schéma d'une culture en semi-continu avec cristalliseur et système de filtration en continu

- Sa : concentration en lactose dans l'alimentation (g/l)
- S : concentration de lactose dans le fermenteur (g/l)
- X : concentration en biomasse dans le fermenteur (g/l)
- P : concentration en acide lactique dans le fermenteur (g/l)
- Q : débit d'alimentation du milieu nutritif pour le fermenteur (l/h)
- Qc : débit du système de cristallisation (l/h)
- 1-b : fraction de débit solide sortant du cristalliseur ((%)
- b : fraction de débit liquide sortant du cristalliseur (%)
- Pc : concentration d'acide lactique dans le cristalliseur
(Pc = somme d'acide lactique liquide (PCL) et solide (PCS))

2.2.2.1. Détermination du débit de cristallisation

Pour le système FCF (figure V 12), le bilan de matière d'acide lactique liquide dans le cristalliseur est fonction de l'arrivée d'acide lactique (P) à un débit Q_C , la vitesse de cristallisation, de la concentration d'acide lactique liquide (P_{CL}) diminuée du facteur de proportionnalité volumique b , et de la variation d'acide lactique dans le cristalliseur. Cette relation s'écrit sous la forme suivante :

b correspond à la fraction de débit du liquide sortant du cristalliseur par rapport au débit entrant. Ce terme est voisin de 1 dans le cas de l'étude cinétique de cristallisation précédente car les concentrations d'acide lactique étaient inférieures à 50g/l.

Ce bilan de matière aboutit à :

$$Q_C P - r_c''' V_C = b \cdot Q_C P_{CL} + V_C \frac{dP_{CL}}{dt}$$

d'où
$$\frac{dP_{CL}}{dt} = \frac{Q_C}{V_C} (P - b \cdot P_{CL}) - r_c'''$$

A l'état stationnaire, si on désire une concentration d'acide lactique liquide (P_{CLO}) sortant proche de la saturation le débit de cristallisation Q_{CO} nécessaire à l'obtention de P_{CLO} .

$$Q_{CO} = \frac{V_C r_c'''}{(P - b P_{CLO})}$$

Notre expression du débit, fonction de la concentration d'acide lactique, est en régime dynamique car P varie au cours du temps.

Comme nous l'avons remarqué précédemment, la cristallisation est un phénomène complexe et la vitesse de cristallisation peut être accélérée ou freinée en fonction de la nature du milieu ou même du type d'agitation Le débit de cristallisation (Q_{CO}) est considéré comme un ordre de grandeur du débit réel qu'il faut appliquer dans le cristalliseur à une concentration P donnée. De ce fait Q_{CO} sera modulé par un facteur f (facteur de correction) :

donc
$$Q_C = \frac{Q_{CO}}{f}$$

soit
$$Q_C = V_C \cdot \frac{r_c'''}{(P - b \cdot P_{CLO})} \cdot \frac{1}{f} \quad \text{ou} \quad Q_C = V_C \cdot \frac{k_C (P_{CL} - P_{ES})^\beta}{(P - b \cdot P_{CLO})} \cdot \frac{1}{f}$$

Q_C fluctue autour de Q_{CO} , la variation de f permettra d'estimer la sensibilité de Q_C sur les performances du procédé.

2.2.2.2. Equations de bilans de matière du procédé FCF

En plus des conditions précédentes sur la culture en semi-continu, le milieu est soutiré à un débit Q_c inférieur à celui de l'alimentation (**figure V.12**). Ce soutirage passe dans un cristalliseur, dont la température est fixée à 4°C. Le passage d'un milieu de fermentation contenant du lactate de calcium fait précipiter ce dernier, laissant une concentration en solution P_c .

L'ensemble du précipité est récupéré sur le filtre correspondant à un certain pourcentage du volume (1-b), le reste de la solution (b) retourne dans le fermenteur.

Les équations de bilan sur la fermenteur s'écrivent sous la forme suivante :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V} \right) - \left(\frac{(1-b) \cdot Q_c \cdot X}{V} \right)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\sigma \cdot X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} \right) + \left(\frac{Q \cdot S_a}{V} \right) - \left(\frac{(1-b) \cdot Q_c \cdot S}{V} \right)$$

$$\frac{dP}{dt} = \pi \cdot X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V} \right) + \frac{Q_c}{V} (b \cdot P_{CL} - P)$$

avec :

$$\frac{dV}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + m_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V + Q - (1-b) \cdot Q_c$$

La variation de biomasse et de substrat est diminuée par rapport à la fermentation en semi-continu d'un terme dû à l'élimination d'un certain pourcentage (1-b) de biomasse et de lactose retenue à la sortie du filtre. L'acide lactique dépend du pourcentage (b) de la concentration d'acide lactique qui revient du filtre moins ce qui est dirigé vers le cristalliseur.

Le terme de variation de volume, par rapport à la fermentation semi-continue, est diminué par le pourcentage (1-b) de volume retenu sur le filtre. Le facteur de proportionnalité b est déterminé par une expérience qui montre le pourcentage d'occupation volumique de la solution après cristallisation.

De plus Q_c est variable au cours du temps et dépend de la vitesse de cristallisation du lactate de calcium et de la concentration d'acide lactique à la sortie du cristalliseur.

Par rapport au procédé simple de fermentations semi-continues, les équations de bilan tiennent compte maintenant de l'élimination du lactate de calcium récupéré à la sortie du filtre. L'expression des bilans pour une culture en semi-continu avec cristallisation et élimination partielle du lactate de calcium issu de la cristallisation et filtration s'écrit de la manière suivante :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V} \right) - \left(\frac{(1-b) \cdot Q_C \cdot X}{V} \right)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu + m_{\max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] X - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} \right) + \left(\frac{Q \cdot S_a}{V} \right) - \left(\frac{(1-b) \cdot Q_C \cdot S}{V} \right)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{P/S}} \mu + m_{\max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] X \cdot Y_{P/S} - \left(\frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V} \right) + \frac{Q_C}{V} (b \cdot P_{CL} - P)$$

avec
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_I} \right)^\alpha} - k_d$$

$$\frac{dV}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu + m_{\max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \right] X \cdot K_P \cdot Y_{P/S} \cdot V + Q - (1-b) \cdot Q_C$$

et nous avons en plus le bilan d'acide lactique dans le cristallisateur, sachant que la cristallisation se réalise en système continu avec un volume V_c constant :

$$\frac{dP_{CL}}{dt} = \frac{Q_{CO}}{V_C \cdot f} (P - (1-b)P_{CL}) - r_c''' = \frac{Q_{CO}}{V_C \cdot f} (P - (1-b)P_{CL}) - k_C (P_{CL} - P_{ES})^\beta$$

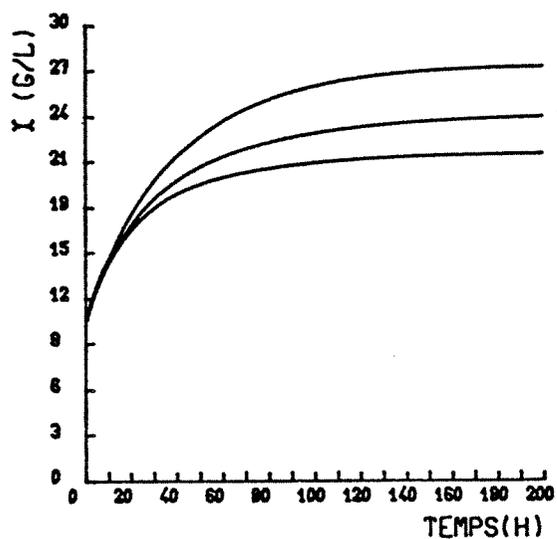
avec :
$$Q_{CO} = \frac{V_c r_c'''}{(P - bP_{CLO})}$$

Les paramètres connus sont au nombre de 10 (μ_{\max} , m_{\max} , K_S , K_I , K_P , k_d , α , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ et S_a) et les variables au nombre de 9 (X , S , P , P_{CL} , Q , f , V_c , Q_C , b). La plupart a été estimée lors de travaux précédents sur un modèle simulant le mode discontinu et sur l'étude de cristallisation. La valeur de b est estimée à 0,85. Q_C est fonction de P . P_{CLO} est fixée à 35g/l.

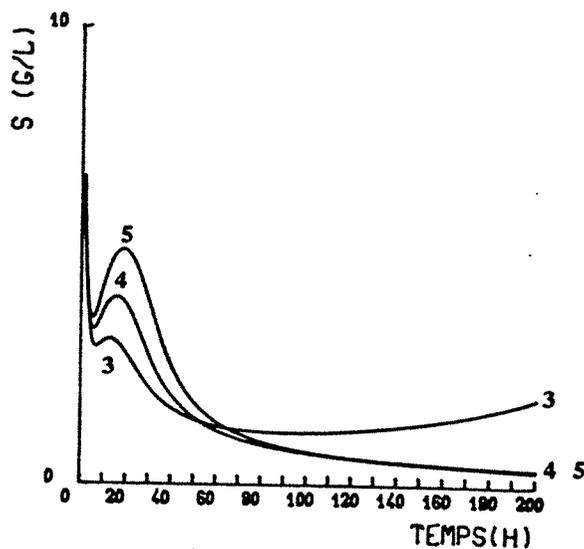
La simulation du procédé FCF est réalisée en faisant varier le débit d'alimentation (Q), le facteur de correction (f) et le volume du cristallisateur (V_c).

Au niveau du filtre l'expression le bilan d'acide lactique solide s'écrit de la forme suivante :

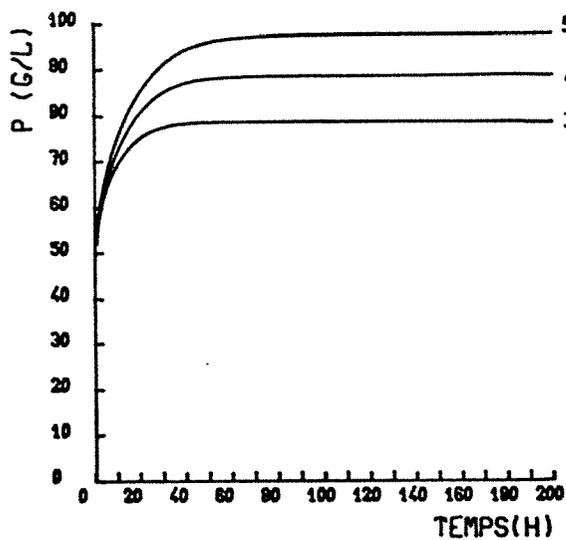
$$\frac{dP_{CS}}{dt} = Q_C (P - bP_{CL})$$



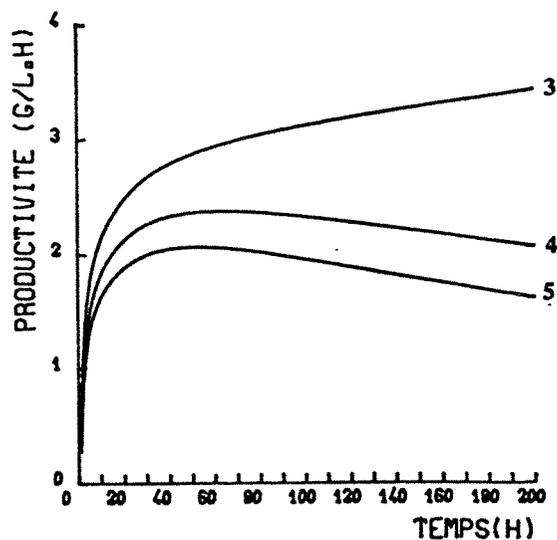
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure V.13 : Evolution de la biomasse (a), du substrat (b), du l'acide lactique (c) et de la productivité (d) dans le fermenteur pour le procédé FCF ($Q=0,05l/h$, $V_c=3l$ et $f= 3, 4$ et 5)

2.2.2.3. Résultats de la simulation du procédé FCF

Le modèle pour les fermentations discontinues (défini dans le **chapitre V 2.2.1**) est complété par la fonction de débit de cristallisation. La simulation sera dépendante de trois variables :

- le débit (Q) d'alimentation du milieu nutritif dont la valeur maximale ne doit pas dépasser 0,06l/h (cf. les conclusions du **chapitre V 2.1.3.**),
- le volume du cristalliseur (V_c),
- et le facteur de correction (f) .

La productivité et le rendement sur le fermenteur et le cristalliseur sont calculés au bout de 200heures de la façon suivante :

$$\text{Productivité} = \frac{\text{quantité d'acide lactique recueilli à 200h}}{(V + V_c).200h}$$

et

$$\text{Rendement} = \frac{\text{quantité d'acide lactique recueilli à 200h}}{S_0 V_0 - S_{200h} V_{200h} + (V_{200h} - V_0).S_a}$$

Nous fixons le débit et nous faisons varier les deux autres paramètres.

Les **figure V.13** montrent les résultats de la croissance, de la consommation du lactose, de la production et de la productivité du fermenteur dans le cas où le débit d'alimentation est de 0,05l/h, le volume du cristalliseur est de 3 litres et le facteur f a comme valeurs 3, 4 et 5. Quand f augmente, nous avons une baisse du débit de cristallisation. Cela se traduit par une diminution d'apparition des cristaux dans le cristalliseur, donc par la baisse de lactate de calcium retenu sur le filtre. Comme la concentration d'acide lactique dans le fermenteur augmente (**figure V.13 a**), l'effet inhibiteur de l'acide est plus important et dans ce cas précis la biomasse se développe moins (**figure V.13 c**) et la productivité baisse (**figure V.13 d**).

Par contre, quand f diminue, l'effet inverse est observé et donc davantage de milieu de fermentation est retenu sur le filtre. Une trop forte élimination de l'acide lactique fait diminuer le volume du milieu dans le fermenteur et augmente la concentration de lactose dû à l'apport du substrat (**figure V.13 b**). Une augmentation du volume du cristalliseur a le même effet que la diminution du facteur f c'est-à-dire celui d'augmenter la valeur du débit d'alimentation du cristalliseur donc l'augmentation de la quantité de cristaux, plus d'acide lactique est retenu sur le filtre, moins d'acide lactique revient vers le fermenteur.

D'autres représentations sont réalisées en trois dimensions en fonction du débit d'alimentation du fermenteur et du facteur f. La première représente la productivité dans le fermenteur, et la deuxième le rendement total de production d'acide lactique pris arbitrairement à la 200^{ème} heure. Cette dernière est calculée en faisant la somme de la

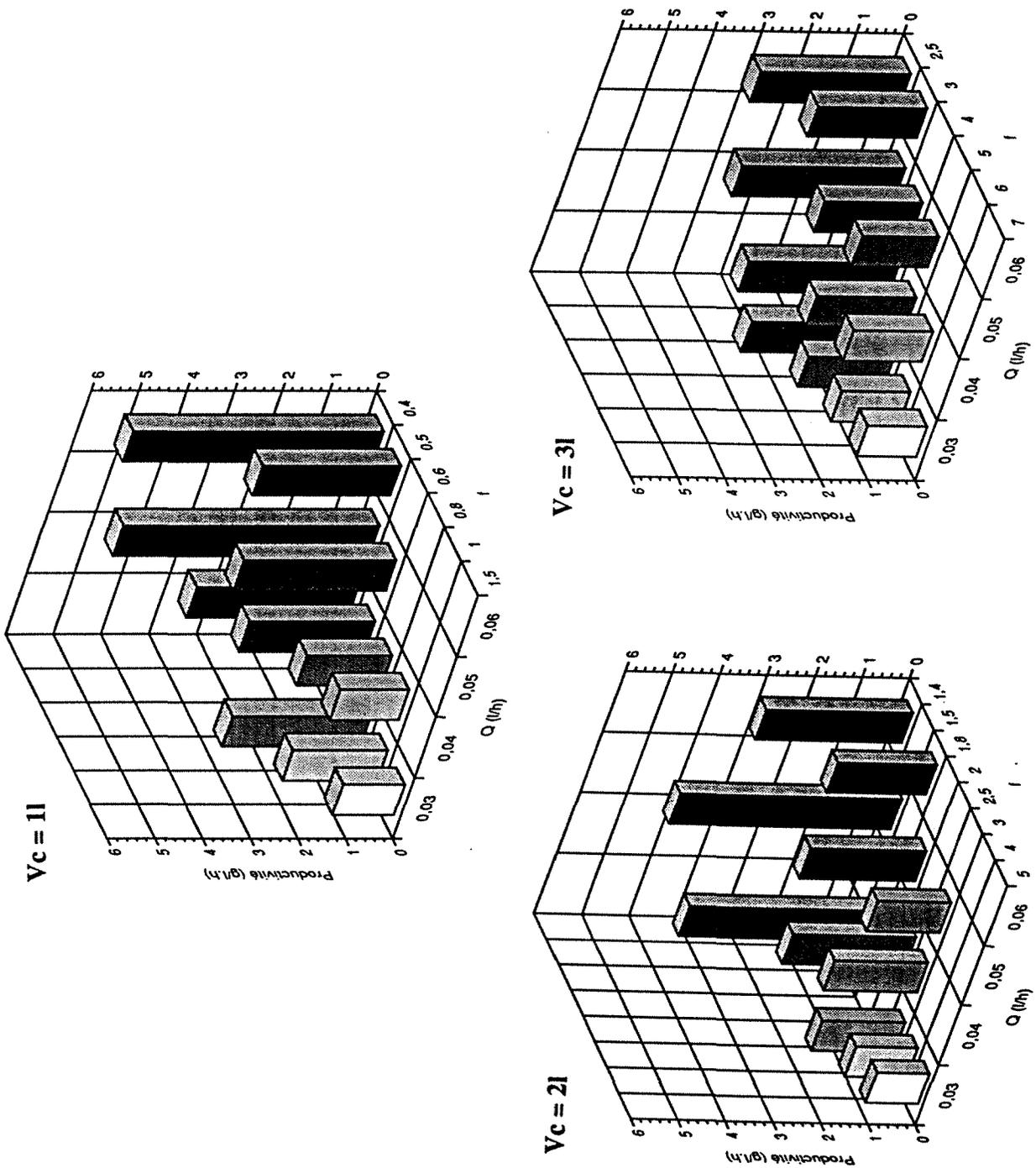


Figure V.14 a: Représentation de la productivité volumique du fermenteur en fonction du débit d'alimentation et du facteur f pour des volumes de cristalliseur de 1, 2 et 3l

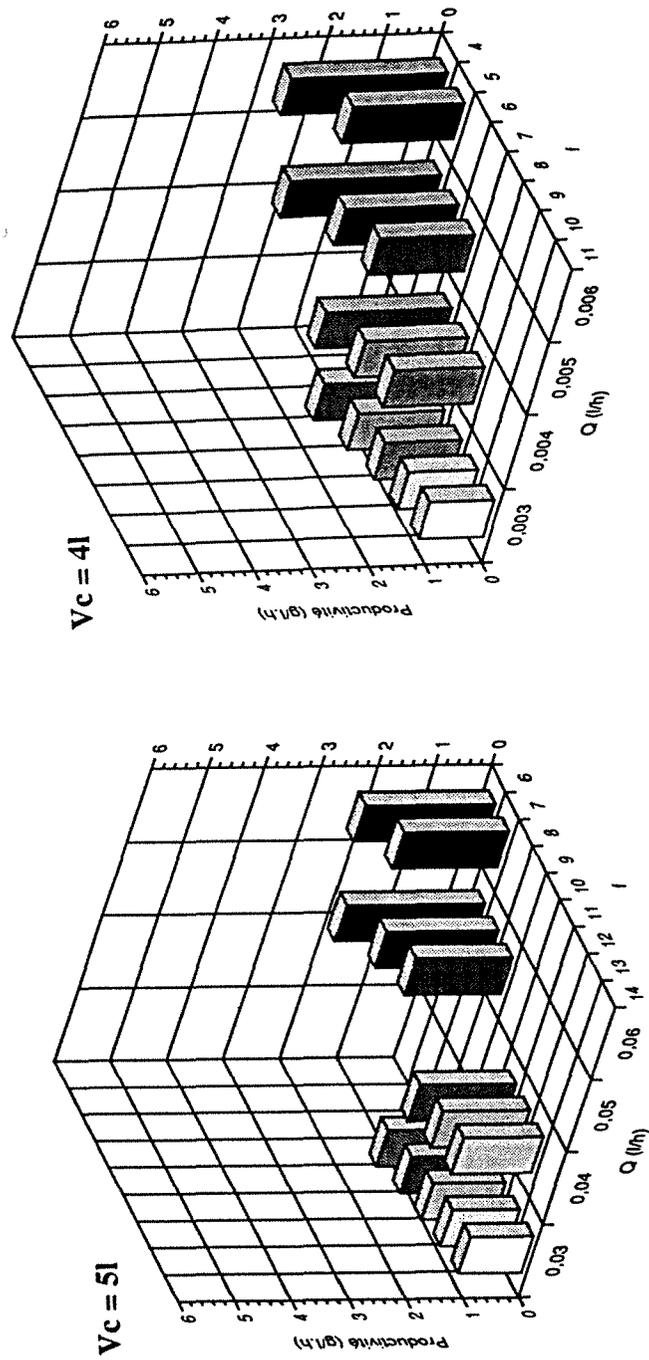


Figure V.14 b: Représentation de la productivité volumique du fermenteur en fonction du débit d'alimentation et du facteur f pour des volumes de cristalliseur de 4 et 5l

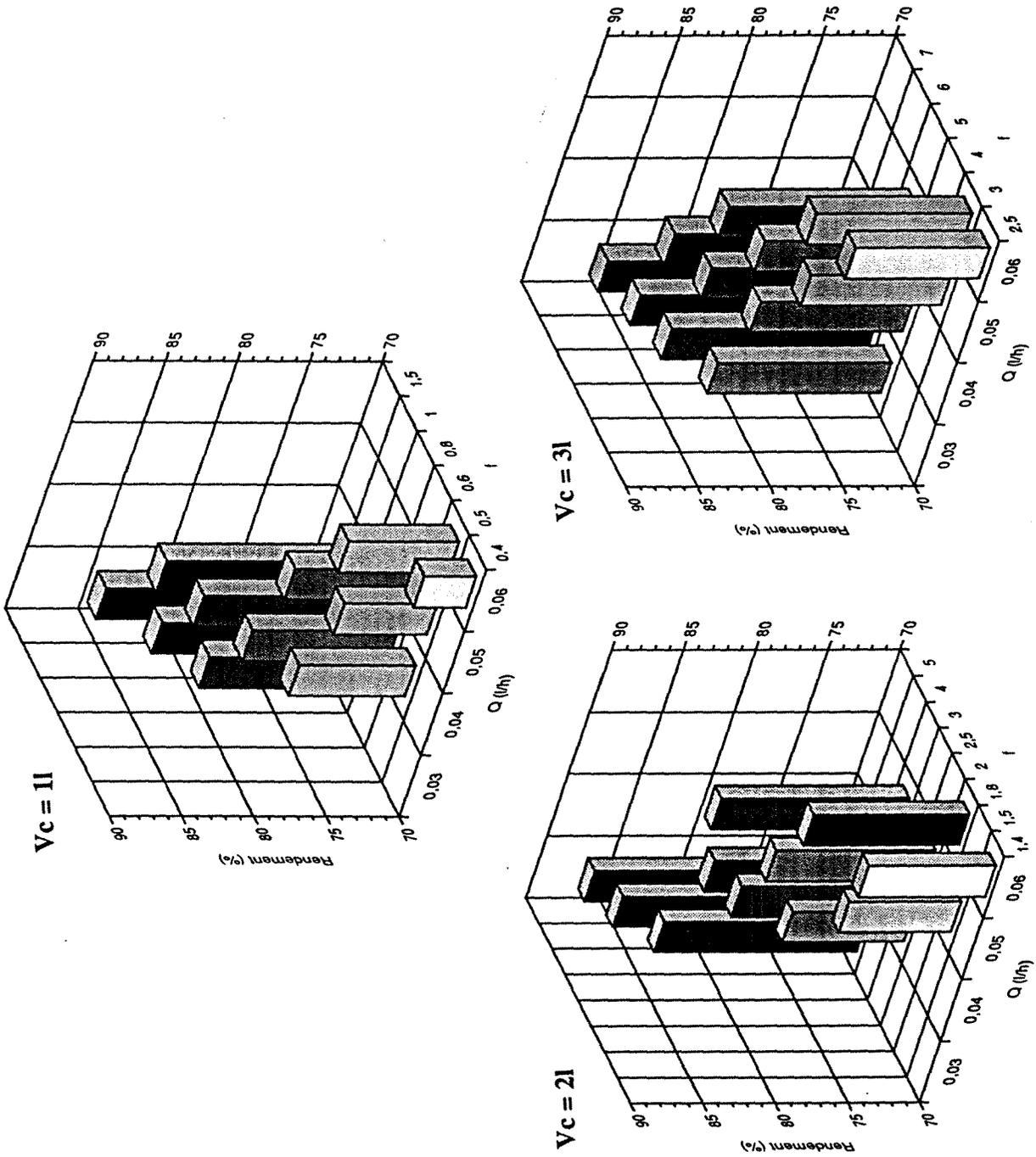


Figure V.15 a : Représentation du rendement total du procédé FCF en fonction du débit d'alimentation et du facteur f pour des volumes de cristalliseur de 1, 2 et 3l.

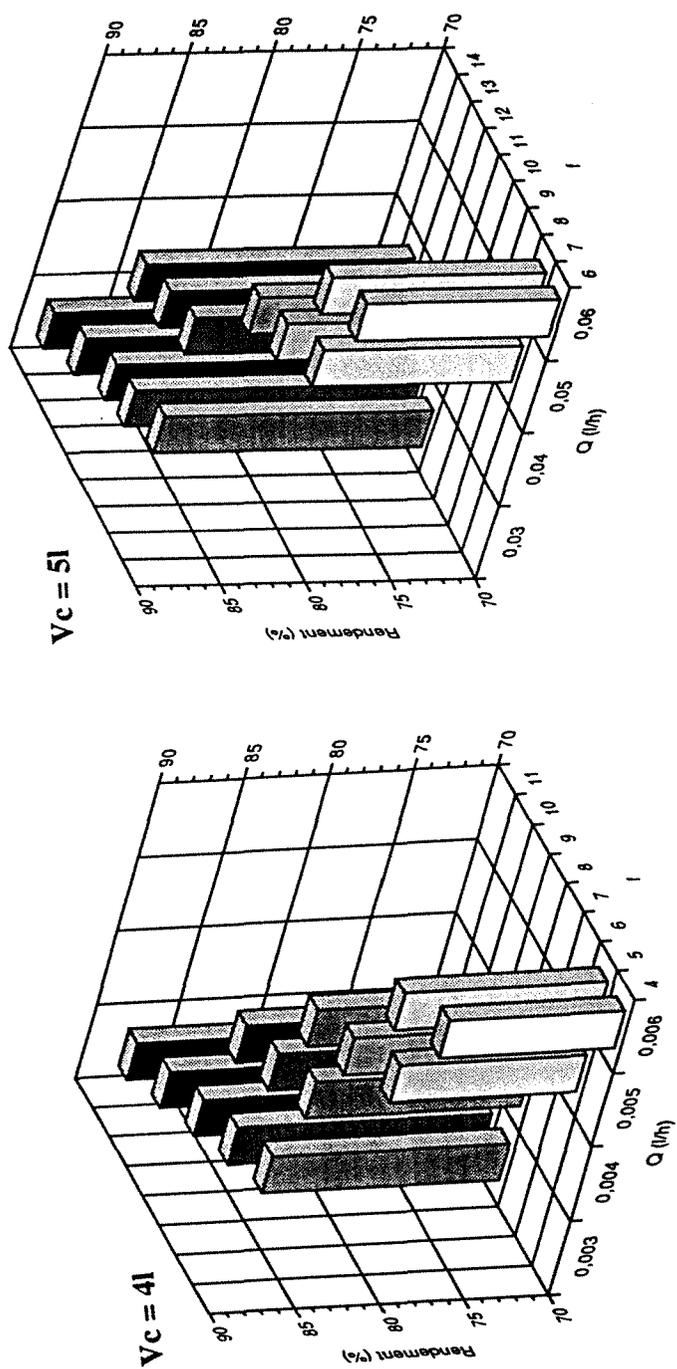


Figure V.15 b : Représentation du rendement total du procédé FCF en fonction du débit d'alimentation et du facteur f pour des volumes de cristalliseur de 4 et 51.

quantité d'acide lactique dans le fermenteur, dans le cristalliseur et à la sortie du filtre et le tout est divisé par la quantité totale de lactose consommé. Ces résultats sont rapportés dans les figures V.14 a et b et 15 a et b.

Les paramètres fixés pour notre modèle sont les mêmes que ceux utilisés pour l'étude en semi-continu (chapitre V.1.4.2.) et pour la vitesse de cristallisation (chapitre V.2.6.2.2.).

La représentation de la productivité (figure V.14 a et b) dans le fermenteur montre que si f diminue, la productivité augmente. La variation du débit entre 0,03 et 0,06l/h a très peu d'influence sur la productivité. Par contre, si le volume du cristalliseur augmente, l'influence de f est moins importante et la productivité baisse de façon plus notable quand V_c dépasse 2l. Les valeurs de productivité sont comprises entre 1,1 et 5,3 g/l.h après 200h de fermentation.

En ce qui concerne la représentation du rendement total FCF (figure V.15 a et b), nous observons, qu'à l'inverse de la productivité, si f augmente le rendement augmente lui aussi. La diminution du débit d'alimentation favorise la production d'acide lactique et augmente légèrement le rendement total. Par contre, si le volume du cristalliseur s'élève le rendement de production total augmente. Les valeurs de rendements totaux sont comprises entre 73 et 88% au bout de 200h de fermentation

2.2.3. Conclusion

Bien que nous n'ayons pas optimisé les conditions de cristallisation, nous favorisons, dans le cas de notre modèle, la productivité d'acide lactique quand le facteur f est faible et le volume de cristalliseur est supérieur ou égal à 3l. A l'inverse, pour favoriser le rendement total FCF de production d'acide lactique f doit être élevé et Q faible. De plus, le volume du cristalliseur ne doit pas dépasser les 2l.

Pour que la productivité et le rendement soient optimaux, nous devons avoir une valeur approximative de débit d'alimentation de 0,03l/h, de facteur f de 4 et de volume de cristalliseur de 3l.

Le rendement et la productivité d'acide lactique est fonction de la vitesse d'alimentation, du rapport de volume entre le fermenteur et le cristalliseur et facteur f qui est l'inverse temps de séjour du lactate de calcium dans le cristalliseur.

Par rapport à la fermentation semi-continue, la productivité au bout de 200heures reste élevée. Pour un débit de 0,03l/h et une concentration d'alimentation de 450g/l, la productivité du semi-continu et du système FCF ($V_c=11$ et $f= 0,8$) au bout de 200heures est respectivement égale à 0,8g/l.h et 3g/l.h et le rendement à 50% et 80%. L'élimination de l'acide lactique, par cristallisation dans le procédé FCF, fait maintenir la productivité et le rendement à des valeurs élevées par rapport à une simple fermentation semi-continue.

CONCLUSIONS

Dans l'optique de mettre en place un procédé de production d'acide lactique en combinant une fermentation semi-continue, une cristallisation et une filtration, l'outil de la modélisation nous a été d'une grande utilité.

Grâce aux études de fermentations discontinues, nous avons déterminé les constantes cinétiques de la vitesse spécifique maximale de croissance et du rendement de production de biomasse et d'acide lactique. Insérées dans le modèle de discontinu, nous avons observé que les hypothèses établies sur les cinétiques de croissance, de consommation et de production ont été vérifiées, à savoir :

- la cinétique de croissance suit la loi de MONOD, elle est inhibée par la production d'acide lactique et elle dépend d'un décès cellulaire,
- la cinétique de consommation du lactose est considérée liée à la croissance et à la maintenance de la bactérie,
- la cinétique de production d'acide lactique est liée et non liée à la croissance et elle est proportionnelle à la consommation de lactose.

L'apparition du terme de coefficient de proportionnalité du volume dû à l'ajout de chaux et parfaitement adapté à nos conditions expérimentales. Il ressort de cette étude les constantes d'affinité du lactose, d'inhibition de l'acide lactique, la puissance d'inhibition et le coefficient de maintenance.

Le modèle établi pour la fermentation discontinue est également adapté pour la culture semi-continue. L'étude de simulation a montré que la production d'acide lactique est liée à la fois à la concentration et au débit du milieu d'alimentation. La concentration maximale du milieu nutritif est limitée par la solubilité du lactose et le débit ne doit pas dépasser une certaine valeur afin d'éviter l'accumulation du lactose dans le fermenteur.

Quant à la partie sur la simulation du système fermentation semi-continue, cristallisation et extraction de l'acide lactique, nous avons dû procéder à une étude de la cinétique de cristallisation du lactate de calcium.

Pour simuler l'extraction de l'acide lactique, nous avons établi un débit de cristallisation qui est fonction à la fois du volume de la vitesse de cristallisation et d'un facteur f . Nous avons remarqué qu'en faisant varier le volume du cristalliseur, le débit d'alimentation et le facteur f nous favorisons dans certain cas la productivité dans le fermenteur ou dans d'autres cas le rendement total de production d'acide lactique pour le système FCF. Il a été noté que quand la concentration d'acide lactique baisse dans le fermenteur, la productivité se maintient à de forte valeur et la concentration de biomasse est importante.

Nous avons démontré que le fait d'ajouter un système d'extraction d'acide lactique par cristallisation et filtration favorise une meilleure productivité et rendement de conversion du lactose en acide lactique.

Cependant une étude approfondie de la cristallisation du lactate de calcium dans des conditions de fermentations est indispensable à la validation complète de notre procédé.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

L'homme est absurbe par
ce qu'il cherche, grand par
ce qu'il trouve.

Paul VALERY

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

L'influence de la cinétique de croissance, de production et de consommation est directement liée à certains paramètres. Ainsi, l'optimisation de la production d'acide lactique, de la croissance et de la consommation de lactose devait répondre à de nombreux objectifs : sélection d'une bactérie adaptée, optimisation des conditions de préculture, de la composition du milieu, traitement à appliquer au milieu, tester les performances des différents sérums, choix d'une base pour la régulation de pH et mode de culture adaptée.

Les premiers travaux ont isolé une bactérie adaptée à la fermentation lactique sur lactosérum. Les lactobacilles produisent de l'acide lactique, mais parmi eux très peu sont capables à la fois de consommer de forte quantité de lactose, de produire uniquement de l'acide L(+) lactique et de résister à de fortes concentrations de celui-ci. Sur l'ensemble de la collection de bactéries mise à notre disposition, une seule souche a été capable de regrouper ces caractères : *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*. Mais le désavantage de ce microorganisme est d'être hétérofermentaire dans certaines conditions physicochimiques (KANDLER et WEISS, 1986).

A la suite de ces travaux, nous avons mis en évidence les exigences nutritionnelles de *L. casei*. La détermination des besoins de la bactérie pour croître et produire sur lactosérum a nécessité l'utilisation de la technique d'impulsion et échelon. Les travaux réalisés par TULI et coll. (1985) et ALTABA (1991) sont en accord avec nos résultats sur la composition du milieu qui a besoin d'être supplémenté en Mn^{2+} , Tween 80 et extrait de levure en poudre. Pour le bon déroulement d'une fermentation lactique sur perméat de lactosérum, *L. casei* exige des sels minéraux, un surfactant et un mélange de vitamines, bases puriques, bases pyrimidiques, peptides, acides aminés et facteurs de croissances.

Des travaux plus approfondis ont montré que l'EL pouvait être remplacé par un extrait liquide. Cette solution présente un autre avantage, celui d'être aussi performant que la poudre mais avec une quantité inférieure (en poids sec).

L'étude qui a consisté à recycler la biomasse dans le but de remplacer l'extrait de levure a donné de moins bons résultats. Même si nous utilisons des techniques diverses pour lyser des bactéries et que nous rajoutons des vitamines, le lysat produit ne remplace pas l'extrait de levure.

L'utilisation d'autres sérums a démontré que les performances de production ne sont pas forcément identiques ; avec un sérum acide la croissance et la production sont inhibées par la présence élevée de sels et d'acide lactique dans le milieu.

Dans un deuxième temps, notre objectif a été de diminuer le temps de la fermentation et augmenter la productivité. Ainsi, la régulation de pH au cours de la préculture diminue les stress métaboliques de la bactérie et favorise la production d'acide lactique. Le temps de latence et de fermentation sont diminués et de plus, la consommation de lactose est totale à la fin de la fermentation pour nos conditions opératoires.

En ce qui concerne les conditions de préparation du milieu, il a été montré que le prétraitement subi par le milieu a des effets négatifs ou positifs sur la production d'acide lactique. Le traitement physicochimique (pH et température) favorise, dans certains cas (pH 3, 100°C pendant 20mn), la libération de peptides ou acides aminés essentiels à la croissance et à la production d'acide lactique, comme l'avait démontré auparavant LEH et CHARLES (1989 a et b). Si le traitement n'est pas contrôlé, la précipitation des protéines (pH supérieur à 3) ou la libération de produits de la réaction de Maillard (ou mélanoidines avec un pH inférieur à 3) sont développés (STECCHINI et coll., 1991). L'un comme l'autre ont des effets inhibiteurs sur la production et la croissance de la bactérie.

L'utilisation d'une base comme la chaux à la place de l'ammoniaque donne des résultats identiques de production et de productivité. L'utilisation de ce produit présente un grand intérêt, car il produit des cristaux de lactate de calcium à une certaine concentration et à basse température. Ce caractère physique permet de le séparer facilement du jus de fermentation. Si l'élimination de l'acide lactique est envisagée en cours de fermentation, les effets inhibiteurs sur la croissance et la production seront diminués.

C'est dans cette optique que nous avons axé la suite de nos recherches en faisant des études sur les cinétiques de fermentations discontinues et semi-continues. Il a été démontré, pour les deux types de cultures, que l'acide lactique inhibe la croissance cellulaire et la production d'acide lactique et que la vitesse de consommation de lactose est proportionnelle à la vitesse de croissance. De plus en mode semi-continu, nous favorisons l'homofémentation en limitant le flux d'entrée de lactose dans le fermenteur.

L'ensemble des résultats de cinétiques sur les fermentations a permis de mettre au point un modèle regroupant les procédés de fermentations discontinues et semi-continues.

Il a été vérifié que la souche suivait une cinétique de croissance de la forme loi de MONOD. Le développement bactérien est inhibé par la production d'acide lactique et dépend d'un décès cellulaire (RAUCOURT et coll., 1989). En ce qui concerne la cinétique de consommation du lactose, elle est liée à la croissance et à la maintenance de la bactérie (TANIGUCHI et coll., 1987). La cinétique de production d'acide lactique est liée et non liée à la croissance et elle est proportionnelle à la consommation de lactose (TANIGUCHI et coll., 1987).

Après les travaux réalisés sur la cinétique de cristallisation, le modèle a été étendu à un système tout à fait innovant qui allie la fermentation semi-continue, la cristallisation et la filtration en continu. La simulation a montré que la productivité et le rendement pouvait être augmentés en fin de fermentation en faisant varier le volume du cristalliseur, le débit de cristallisation. et le facteur de correction du débit de cristallisation

Ainsi l'ensemble de ces études a permis d'ouvrir de nombreux axes de recherche sur des objectifs bien précis.

Pour augmenter les performances de productivité, des mutations génétiques de *L. casei* permettraient d'avoir une voie métabolique homofermentaire stricte et de faire résister la bactérie à de plus fortes concentrations d'acide lactique (DEMIRCI et POMETTO, 1992).

Pour favoriser la production d'acide lactique, il est souhaitable d'optimiser la composition du milieu de culture sur lactosérum avec la technique de plan d'expérience. Ainsi, le milieu serait supplémenté correctement en sels minéraux vitamines, bases, peptides et autres facteurs de croissance.

La maîtrise de la production d'acide lactique par *L. casei* dépend de la libération des peptides réalisée lors du prétraitement du milieu. Ainsi, il serait intéressant d'identifier les peptides et de déterminer la composition en acides aminés essentiels afin de supplémenter correctement le milieu de culture.

L'analyse ionique des lactosérums est une solution pour définir les "stress salins" causés sur la croissance et la production d'acide lactique (ROY, 1991). De cette façon, un

milieu standard de lactosérum peut être défini pour la production d'acide lactique à partir de *L. casei*.

Les études sur des lactosérums d'origine différentes doivent se poursuivre afin d'obtenir de plus amples informations et comprendre pour quelles raisons certains sérums sont plus performants que d'autres. L'optimisation du milieu de culture sur lactosérum doit passer par la mise au point d'un lactosérum standard; pour cela des techniques de déminéralisation , d'extraction, de séparation ou même de supplémentsations sont à envisager.

La cinétique de cristallisation du lactate de calcium en cours de fermentation doit être développée afin de comprendre les effets produits par la présence de la biomasse et du lactosérum. Les résultats exploités dans la partie modélisation sont uniquement le fruit d'expériences avec du lactate de calcium pur.

Afin de comprendre quelles sont les contraintes techniques de l'étape de purification de l'acide lactique dans un jus de lactosérum, une recherche plus approfondie doit être menée sur l'acidification et la filtration du sulfate de calcium.

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

AL	: acide lactique	PEP	: phosphoénolpyruvate
ATP	: adénosine triphosphates	Pf	: concentration d'acide lactique arrivant dans le cristalliseur (g/l)
β	: ordre de la réaction de cristallisation	Pi	: phosphate inorganique
b	: pourcentage en volume de lactate de calcium sortant du filtre (b=1-a; %)	Pr	: concentration d'acide lactique réelle (g/l)
β gal	: β galactosidase	Ps	: concentration d'acide lactique minimum (g/l)
D	: procédé discontinue		soluble dans le cristalliseur (32g/l)
D	: taux de dilution (h^{-1})	PTS	: phosphotransférase
D(-)	: forme isomérique D de l'acide lactique	Q	: débit d'alimentation (l/h)
DO	: densité optique	Qc	: débit de cristallisation (l/h)
E	: essentiel	r_p'''	: vitesse production d'acide lactique (g/l.h)
EL	: extrait de levure	r_s'''	: vitesse consommation de lactose (g/l.h)
f	: constante du débit de cristallisation	r_x'''	: vitesse de formation de biomasse (g/l.h)
F-1,6diP	: fructose 1-6, diphosphate	RAS	: rien à signaler
FCF	: procédé fermentation semi-continue, cristallisation et filtration	r_c'''	: vitesse de cristallisation (g/l.h)
k_c	: constante de cristallisation (h^{-1})	S	: concentration de lactose dans l'alimentation (g/l)
k_d	: constante de décès (h^{-1})	s	: stimulateur
K_I	: constante d'inhibition (g/l)	<i>S</i>	: <i>Streptococcus</i>
K_p	: coefficient de proportionnalité volumique de la chaux (l/g)	σ	: vitesse spécifique de consommation de lactose (h^{-1})
K_s	: concentration pour laquelle $\mu=\mu_{max}/2$ (g/l)	Sa	: concentration en substrat dans l'alimentation (g/l)
K_s	: contante d'affinité pour le lactose (g/l)	τ	: temps de passage (V_c/Q_c) (h)
L	: <i>Lactobacillus</i>	V	: volume du fermenteur (l)
L(+)	: forme isomérique L de l'acide lactique	V_c	: volume du cristalliseur (l)
LDH	: lactate déshydrogénase	X	: concentration en biomasse (g/l)
m_{max}	: coefficient de maintenance (h^{-1})	Y _{P/S}	: rendement de production d'acide lactique (% oug/g)
μ_{max}	: taux de croissance maximum (h^{-1})	Y _{X/S}	: rendement de production de biomasse (% ou g/g)
MRS	: milieu de référence des lactobacilles		
N	: non essentiel		
nd	: non déterminé		
P	: concentration en produit dans le milieu (acide lactique) (g/l)		
π	: vitesse spécifique de production d'acide lactique (h^{-1})		
Pe	: concentration d'acide lactique estimée (g/l)		

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABORHEY, S. et WILLIAMSON, D., 1977, Modelling of lactic acid by *Streptococcus cremoris* HP, Journal of General of Applied Microbiology, 23, 7-21
- ABRAMS, A. et SMITH, J. A., 1974, Enzymes, 3^{ème} édition, vol. 10, Ed. BOYER, P. D., Academic Press New York, 395-429
- AESCHILMANN, A. et VON STOCKAR, U. L., 1989, The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*, Biotechnology Letters, 11, 3, 195-200
- AKSU, Z. et KUTSAL, T., 1986, Lactic acid production from melasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together, Biotechnology Letters, 8, 3, 157-160
- ALTABA, S., 1991, Production d'acide lactique en culture continue à haute densité cellulaire dans un bioréacteur à membrane : cinétique, modélisation et analyse économique, Thèse INPL Biotechnologies et Industries Alimentaires
- ANDREWS, G. F. et FONTA, J. P., 1989, A fluidized-bed continuous bioreactor for lactic acid production, Applied Biochemistry and Biotechnology, 20, 21, 375-390
- BAILEY, R. B., JOSHI, D. K., MICHAELS, S. L. et WISDOM, R. A., 1987, Production of lactic acid by continuous fermentation using an inexpensive raw material and simplified method of lactic acid purification, Engics INC, USP 4 698 303
- BALOO, S. et RAMKRISHNA, D., 1991, Metabolic regulation in bacterial continuous cultures : I, Biotechnology and Bioengineering, 38, 1337-1352
- BIBAL, B., GOMA, G., VAYSSIER, Y. et PAREILLEUX, A., 1988, Influence of pH, lactose and acid lactic on the growth of *Streptococcus cremoris* : a kinetic study, Applied Microbiology and Biotechnology, 28, 340-344
- BIKETOV, S. F., KASHO, V. N., KOZLOV, I. A., MILEYKOVSKAYA, Y. I., OSTROVSKY, D. N., SKULACHEV, V. P., TIKHONOVA, G. V. et TSUPRUN, V. L., 1982, F1-like ATPase from anaerobic bacterium *Lactobacillus casei* contains six similar subunits, European Journal of Biochemistry, 129, 241-250
- BOOTH, I.R., 1985, Regulation of cytoplasmic pH in bacteria, Microbiology Reviews, 49, 4, 359-378
- BOYAVAL, P. et CORRE, C., 1987, Continuous fermentation of sweet permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle, Biotechnology Letters, 9, 11, 801-806
- BOYAVAL, P., CORRE, C. et TERRE, S., 1987, Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electro dialysis, Biotechnology Letters, 9, 3, 207-212
- BRADFORD, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254
- CHAUDHURI, J. B. et PYLE, D. L., 1993, Emulsion liquid membrane extraction of lactic acid from aqueous solutions and fermentation broth, Biotechnology and Bioengineering, 42, 1, 50-58

- CHENG, P., MUELLER, R. E., JAEGER, S., BOJPAI, R. et IANNOTTI, E. L., 1991, Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*, *Journal of Industrial Microbiology*, 7, 27-34
- COMMEYRAS, A., ARNAUD, A., GALZY, P. et JALLAGEAS, J. C., 1973, Procédé de préparation d'acides organiques par hydrolyse biologique des nitriles correspondants, BF 2 245 585
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B. M. et MARTEGNANI, E., 1993, Bioconversion of lactose/whey to fructose diphosphate with *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 398-400
- COOPER, B., KUESTERS, W., MARTIN, C. et SIEGEL, H., 1982, Procédé de préparation d'acide lactique-D ou -L optiquement pur, BASF, EP 0 069 291
- COX, G. C. et MAC BEAN, R. D., 1977, Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate, *The Australian Journal of Dairy Technology*, 32, 19-22
- CROCIANI, J., 1991, Valorisation du lactosérum : production d'acide lactique par Lactobacilles, DEA Enzymologie, Microbiologie et Nutrition, Faculté des Sciences de Nancy I
- CROCKREM, M. C. M. et JOHNSON, P. D., 1993, Recovery of lactate esters and lactic acid from fermentation broth, Du Pont de Nemours and Company, WO 93/00440
- CZYTKO, M., ISHII, K. et KAWAI, K., 1987, Continuous glucose fermentation for lactic acid production : recovery of acid by electro dialysis, *Chemie Ingenieur Technik*, 59, 952-954
- DAMERVAL, T., 1992, L'industrialisation des procédés de séparation, *Biofutur*, 12, 77-82
- DE MOSS, R. D., BARD, R.C. et GUNSALUS, I. C., 1951, The mechanism of the heterolactic fermentation : a new route of ethanol formation, *Journal of Bacteriology*, 62, 499-511
- DE RAUCOURT, A., GIRARD, D., PRINGENT, Y. et BOYAVAL, P., 1989, Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 521-527
- DE VRIES, W., KAPTEIJN, W. M. C, VAN DER REEK, E. G. et TOUTHAMER, A. H., 1970, Molar growth yields and fermentations balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous, *Journal of General Microbiology*, 63, 333-345
- DEMIRCI, A. et POMETTO, A. L., 1992, Enhanced production of D(-) lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649, *Journal of Industrial Microbiology*, 11, 23-28
- DESMAZEAUD, M., 1991, L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques, *Le Lait*, 63, 267-316
- DIAMANO, D., SHIN, C.S., JU, N.H. et WANG, S. S., 1985, Performance, kinetics, and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membrane, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21, 69-77

- EL SODA, M. et DESMAZEAUD, M. J., 1981, General properties of new ribosomal aryl-peptidyl amidase in *Lactobacillus casei*, Agricultural and Biological Chemistry, 45, 1693-1700
- FERNANDES, C. F., SHAHANI, K. M. et AMER, M. A., 1987, Therapeutic role of dietary lactobacilli fermented dairy products, FEMS Microbiology Reviews, 46, 343-356
- FRIEDMAN, M. R. et GADEN, E. L., 1970, Growth and acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in dialysis culture system, Biotechnology and Bioengineering, 12, 961-974
- FRIELING, P. V., DEGENER, W. et SCHUEGERL, K., 1989, Selective extraction of lactic acid, Biotechnology Conference, 3, Pt B, 1085-1088
- GÄETJE, G. et GOTTSCHALK, G., 1991, Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*, Applied Microbiology and Biotechnology, 34, 4, 446-449
- GAILLARD, I., 1988, Production d'acide lactique par *L. casei*, D.E.A. de Biotechnologie de l'I.N.P.L.
- GALESLOOT, T.E. et TIMBERGEN, B.J., 1984, Structure-fonction relation of whey proteins, International Congress on Luxembourg of Mik protein's 84, 192-195
- GARRIDO-SANCHEZ, L.E., 1993, Conception et mise en œuvre d'un système d'aide à la modélisation de procédés de fermentation utilisant un système expert et des réseaux de neurones, Thèse INPL Biotechnologies et Industries Alimentaires
- GARVIE, E. I., 1980, Bacterial lactate deshydrogenases, Microbiology Reviews, 44, 1, 106-139
- GAULT, P. et FAUQUANT, J., 1992, Aptitude à la gélification thermique de la β -globuline : influence du pH, de l'environnement ionique et de la présence des autres protéines du lactosérum, Le lait, 72, 491-510
- GERSON, D.F., 1988, Liquid-liquid separation in biotechnology-purification by extraction, A review, Biotechnol. Res. Appl., 104-109
- GIRAUD, E., BELOG, B. et RAIMBAULT, M., 1991, Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*, Applied of Microbiology and Biotechnology, 36, 96-99
- GLASSNER, D. A. et DATTA, R., 1990, Process for production and purification of lactic acid, Michigan Biotechnology Institut, EP 0 393 818 A1
- GONCALVES, L. M. D. , XAVIER, A. M. R. B., ALMEIDA, J. S. et CARRONDO, M. J. T., 1991, Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production, Enzyme Microbiology and Technology, 13, 314-319
- HANSON, T. P. et TSAO, G. T., 1972, Kinetic studies of lactic acid fermetation in batch and continuous cultures, Biotechnology and Bioengineering, 14, 233-252

- HAROLD, F.M. et LEVIN, E., 1974, Lactic acid translocation : terminal step in glycolysis by *Streptococcus faecalis*, Journal of Bacteriology, 117, 3, 1141-1148
- HENSEL, R., MAYR, U., STETTER, K. O. et KANDLER, O., 1977, Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I purification and kinetics of allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*, Archives of Microbiology, 112, 81-93
- HERRFURTH, S., HARTMEIER, W., 1991, Extractive lactic acid fermentation with a flocculent *Lactobacillus* strain , Conference paper, Biochemical Engineering of Stuttgart, 242-245
- HICKEY, M. W., HILLIER, A. J. et JAGO, R., 1986, Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentation lactobacilli, Applied and Environmental Microbiology, 51, 4, 825-831
- HJÖRLEIFSDOTTIR, S., SEEVAROTNAM, S., HOLST, O. et MATTIASSON, B., 1990, Effects of complete cell recycling on product formation by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in continuous cultures, Current Microbiology, 20, 287-292
- HOBMAN, P. G., 1984, Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum, Journal of Dairy Science, 67, 2630-2653
- HOFMAN, M., 1987, Procédé de préparation d'acide lactique par fermentation de lactosérum, CNRS, EP 0 265 409
- HONGO, M., NOMURA, Y. et IWAHARA, M., 1986, Novel method of lactic acid production by electro dialysis fermentation, Applied and Environmental Microbiology, 52, 2, 314-319
- IERUSALIM, N.D., 1967, Microbial physiology in continuous, Ed. Powell, E. O., EVANS, C. G. T., STRANGE, R. E. et TEMPEST, T. W., H.M.S.O. Londres
- INSKEEP, G. C., TAYLOR, G. C. et BREITZKE, W. C., 1952, Lactic acid from corn sugar, Industrial Engineering Chemistry, 44, 9, 1955-1966
- ISHIZAKI, A. et OHTA, T., 1989, Batch culture kinetics of L-lactate fermentation employing *Streptococcus* ssp. IO-1, Journal of Fermentation and Bioengineering, 67, 1, 46-51
- JORGENSEN, M. H. et NIKOLAISEN, K., 1987, Mathematic model for lactic acid formation with *Streptococcus cremoris* from glucose, Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 313-316
- KANDLER, O. et WEISS, N., 1986, Regular, nonsporing gram-positive rods section 14, Ed. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, PETER, H. et SNEARH, A., vol. 2, 1208-1234
- KASHKET, E. R., 1987, Bioenergetics of lactic acid bacteria : cytoplasmic pH and osmotolerance, FEMS Microbiology Reviews, 46, 233-244
- KATZBAUER, B., MOSER, A. et NARODOSLAWSKY, M., 1992, Lactic acid production in aqueous two-phase systems. *Lactobacillus casei* fermentation in a two phase systems coupled with conventional solvent extraction, Biotechnology Conference, 5, PtB, 711-713

- KELLER, A. K. et GERHARDT, P., 1975, Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein, *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 997-1018
- KEMPE, L. L. et WEST, R. E., 1959, The effect of agitation on the rate of acid formation by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1, 393
- KENICHIRO, T. et ISUMI, M., 1983, Microorganisms of the species *Lactobacillus italicus*, process for their preparation and their use in the production of lactic acid, Kyowa Hakko Kabushiki Kaisha, EP 0 113 215 A2
- KING, M.B., BOTT, T. R. et CHAMI, J. H., 1987, Extraction of bio-materials with compressed carbon dioxide and other solvents under near critical conditions purification, a review, *Separ. Biotechnol., Ellis Horwood Biol. Sci. Ser.*, 293-319
- KIRKOVITS, A. E. et EDLAUER, H., 1990, Micro-organisme de l'espèce *Bacillus coagulans* et procédé utilisant ce micro-organisme pour produire de l'acide L(+) lactique optiquement pur, FR 2 644 178 A1
- KONINGS, W. N. et OTTO, R., 1983, The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*, *FEMS Microbiology Letters*, 16, 69-74
- KONINGS, W. N., 1985, Generation of metabolic energy by end-product efflux, *Trends in Biochemistry Sciences*, 10, 317-319
- KOSAKI, M. et KAWAI, K., 1986, Fermentation to D-lactic acid, Daicel Chemical Industries LTD, EP 0 458 370 A1
- KOSER, S. A. et THOMAS, J. L., 1955, Amino acid requirements of oral lactobacilli, *The Journal of Infectious Diseases*, 97, 287-298
- KOSSEN, N. W. F. et OOSTERHUIS, N. M. G., 1985, Modelling and scaling-up of bioreactors, *Biotechnology*, vol. 2, Chap. 24, Ed. REHM, U. J. et REED, G., VCH, 571-605
- KRAVCHENKO, E. F., 1989, Whey beverages, *Bulletin of IDF*, 233, 6, 61-67
- LEDESMA, O. V., DE RUIZ HOLGADO, A. P., OLIVIER, G., DE GIORI, G. S., RAIBAUD, P. et GALPIN, J. V., 1977, A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli, *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 123-133
- LEH, M. B. et CHARLES, M., 1989a, The effect of whey protein hydrolysate average molecular weight on the lactic acid fermentation, *Journal of Industrial Microbiology*, 4, 77-80
- LEH, M. B. et CHARLES, M., 1989b, The effect of whey hydrolysates on the lactic acid fermentation, *Journal of Industrial Microbiology*, 4, 71-75
- LEROI, F. et PIDOUX, M., 1993, Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugar kefir grains, *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 48-53
- LEWIS, V. P. et YANG, S. T., 1992, A novel extrative fermentation process for propionic acid production from whey lactose, *Biotechnology Progress*, 8, 104-110

- LI-HONG, P., BAJPAI, R. K. et IANNOTTI, E. L., 1991, An improved kinetic model for lactic acid fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, 1, 75-77
- LUEDEKING, R. et PIRET, E. L., 1959 a, A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH, *Journal of Biochemistry and Microbiology Technology Engineering*, 1, 4, 393-412
- LUEDEKING, R. et PIRET, E. L., 1959 b, Transient and steady states in continuous fermentation. Theory and experiment, *Journal of Biochemistry and Microbiology Technology Engineering*, 1, 4, 431-459
- MAJOR, N. C. et BULL, A. T., 1989, The physiology of lactate production by *Lactobacillus delbrueckii* in a chemostat with cell recycle, *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 592-599
- MAN, J. C., ROGOSA, M. et SHARPE, M. E., 1960, A medium for the cultivation of lactobacilli, *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135
- MEHAIA, M. A. et CHERYAN, M., 1987 a, Immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* in a hollow-fiber bioreactor for production of acid lactic from acid whey permeate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 14, 21-27
- MEHAIA, M. A. et CHERYAN, M., 1987 b, Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates, *Process in Biochemistry*, 22, 6, 185-188
- MICHELS, P. A. M. , MICHELS, J. P. P. , BOONSTRA, J. et KONINGS, W. N., 1979, Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products, *FEMS Microbiology Letters*, 5, 357-364
- MOAT, G., 1985, Biology of the lactic, acetic and propionic acid bacteria, Ed. by DEMAIN, A. L., SOLORON, N. A., in Board London Amsterdam, *Biology of Industrial Microorganism*, 160-188
- MONOD, J., 1942, Recherche sur la croissance des cultures bactériennes, Herman et Cie, Paris
- MONTGOMERY, R., 1952, Sugar Research Foudation, The chemical production of lactic acid from sugars, Projet n°60, Member of report n°31
- MORABITO, D. et FICK, M., 1992, Valorisation du lactosérum, un co-produit des industries laitières et fromagères, Ecole de Printemps, Génie des procédés et protection de l'environnement Nancy, Thème de la Valorisation
- MORABITO, D. et FICK, M., 1993, Optimization of medium culture by pulse and shift technic for the homofermentation of lactic acid by *Lactobacillus casei* on whey permeate concentrate, 6th European Congress on Biotechnology, Vol I, MO232
- MORRIS, J. G., 1985, *Comprehensive Biotechnology*, vol.1, Ed. MOO YOUNG, M., 357-378
- MOSER, A., 1984, Kinetics of batch fermentation, *Biotechnology*, Vol. 2, Chap. 14, Ed. BROUER, H., Verlog, 243-284

- MOTOSUGI, N., ESAKI, N. et SODA, K., 1984, Enzymatic preparation of D- and L-lactic acid from racemic 2-chloropropionic acid, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 805-806
- MOULIN, G. et GOLZY, P., 1984, Whey, a potentiel substrat for biotechnology, Ed. RUSSELL, G. E., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 1, 347-374
- MOYERS, C.G.J. et ROUSSEAU, R.W., 1987, Crystallization operations, Chap. 11, Ed. by ROUSSEAU, R.W. in "Handbook of Separation Process Technology", Willey-Interscience Publication, New-York
- MULLIGAN C. N., SAFI, B. F. et GROLEAU, D., 1991, Continuous production of ammonium lactate by *Streptococcus cremoris* in a three-state reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1173-1181
- NIELSEN, J., NIKOLAJSSEN, K. et VILLADSEN, J., 1990 a, Structure modeling of microbial system : I. A theoretical study of lactic acid fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1-10
- NIELSEN, J., NIKOLAJSSEN, K. et VILLADSEN, J., 1990 b, Structure modeling of microbial system : II. Experimental verification of structured lactic acid fermentation model, *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 11-23
- NIKOLAJSSEN, K., NIELSEN, J. et VILLADSEN, J., 1990, Structure modeling of microbial system : III. Growth on mixed substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 24-29
- NOMURA, Y., YAMAMOTO, K. et ISHIZAKI, A., 1991, Factors affecting lactic acid production rate in the built-in electrodialysis fermentation, an approach to high speed batch culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, 6, 450-452
- OHLEYER, E., BLANCH, H. W. et WILKE, C. R., 1985 a, Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11, 317-332
- OHLEYER, E., WILKE, C. R. et BLANCH, H. W., 1985 b, Continuous production of lactic acid from glucose and lactose in cell-recycle reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11, 457-463
- OTTO, R., BRINK, B. T., VELDKAMP, H. et KONINGS, W. N., 1983, The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*, *FEMS Microbiology Letters*, 16, 69-74
- POOLMAN, B., 1993, Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria, *Le Lait*, 73, 87-96
- PRIGENT, Y. et FRANCO, A., 1984, Etude d'un fermenteur lactique à membrane, *Le Lait*, 64, 217-238
- PRINGENT, Y., 1983, Procédé de préparation d'acide lactique par fermentation du lactosérum et installation pour la mise en œuvre en continu de ce procédé, CNRS, BF 2 555 200 A1
- RHEE, S. K. et PACK, M. Y., 1980, Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*, *Journal of Bacteriology*, 144, 1, 217-227

- ROGERS, P. L., BRAMALL, L. et MAC DONALD, I. L., 1978, Kinetic analysis of batch and continuous culture of *Streptococcus cremoris* HP, Canadian Journal of Microbiology, 24, 372-380
- ROGOSA, M., FRANKLIN, J. G. et PERRY, K. D., 1961, Correlation of vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* spp., The Journal of General Microbiology, 25, 473-482
- ROISSART, H., 1986, Laits et produits laitiers (Tome III), Ed. LUQUET F., Lavoisier Scientifique
- ROMANO, A. H., TRIFONE, J. D. et BUSTON, M., 1979, Distribution of phosphoenolpyruvate : glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria, Journal of Bacteriology, 139, 93-97
- ROY, D., 1991, Salt stress on growth and acid production of *Lactobacillus helveticus* strain milano, Letters in Applied Microbiology, 12, 207-211
- ROY, D. et GOULET, J., 1987, Continuous production of lactic acid from whey permeate free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*, Journal of Dairy Science, 70, 506-513
- ROY, D., GAULET, G. et LE DUY, A., 1986, Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production, Applied Microbiology and Biotechnology, 24, 206-213
- SATTIEZ, P. et LUQUET, F. M., 1972, Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Vol. 2, Ed. by KON, S. K., Tec & Doc, 10-24
- SCHLICHER, L. R. et CHERYAN, M., 1990, Reverse osmosis of lactic acid fermentation broths, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 49, 2, 129-140
- SCHNEIDER, D. et LAMONERIE, H., 1989, Procédé de production d'acide lactique par fermentation, Rhône-Poulenc Chimie, EP 0 354 828
- SCHÖLLER, C., CHAUDHURI, J. B. et PYLE, D. L., 1993, Emulsion liquid membrane extractions of lactic acid from aqueous solutions and fermentation broth, Biotechnology and Bioengineering, 42, 50-58
- SCHOPMEYER, H. H., 1954, Industrial fermentations, Ed. UNDERKOFER L. A. et HICKEY R.J., Chemical Publishing, New York, 391-419
- SEEVARATNAM, S., HOLST, J. O., HJOLEIFSDOTTIR, S. et MATTIASON, B., 1991, Extractive bioconversion for lactic acid production using solid sorbent, Bioprocess Engineering, 6, 1-2, 35-41
- SHAFIEZADEH, M., 1993, Etude de faisabilité d'un projet de production d'acide lactique par fermentation batch du perméat de lactosérum, Mémoire de fin d'étude, IESIEL Paris-Grignon
- SIMON, E. W. et BEEVERS, H., 1952, The effect of pH on the biological activities of weak acids and bases. I The most usual relationship between pH and activity, New Phytologist, 51, 163-190
- SIRMAN, T., PYLE, L. et GRANDISON, A. S., 1991, Extraction of organic acids using a supported liquid membrane, Biochemical Society Transactions, 19, 3, 274S

- SNELL, L. R. et LOWERY, C. E., 1962, Calcium L(+) lactate and lactic acid production, USP 3 125 494
- SRIVASTAVA, A., ROYCHOUDHURY, P. K. et SAHAI, V., 1992, Extractive lactic acid fermentation using ion exchange resin, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 6, 607-613
- STECCHINI, M. L., GIAVEDONI, P., SARAIS, I. et LERICI, C. R., 1991, Effect of Maillard reaction products on the growth of selected food-poisoning micro-organisms, *Letters in Applied Microbiology*, 13, 93-96
- STENROOS, S. L., LINKO, Y. Y. et LINKO, P., 1982, Production of L-lactic acid immobilized *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnology Letters*, 4, 159-164
- STIEBER, R. W. et GERHARDT, P., 1981, Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 535-549
- STIEBER, R. W., COULMAN, G. A. et GERHARDT, P., 1977, Dialysis continuous process for ammonium-lactate fermentation whey : experimental tests, *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 6, 733-739
- SYLACT, 1991, Les lactosérums : Produits du lait aux utilisations multiples, Sylact, Paris
- TACHIKAWA, S., INABA, H., SEIKE, Y., NAGAMUNE, T. et ENDO, I., 17-22 juillet 1988, Process 8th Biotechnology Symposium Paris
- TANIGUCHI, M., KOTANI, N. et KOBAYASHI, T., 1987, High-concentration of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration, *Journal of Fermentation Technology*, 65, 179-184
- THOMAS, T. D., ELLWOOD, D. C. et LONYEARV. M. C., 1979, Change from homo to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures, *Journal of Bacteriology*, 138, 1, 109-117
- THOMPSON, J., 1987, Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 221-231
- TULI, A., SETHI, R. P., KHANNA, P. K. et MARWAHA, S. S., 1985, Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*, *Enzyme Microbiology and Technology*, 7, 164-168
- UPRETI, G. C. et HINS DILL, R. D., 1973, Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4, 4, 487-494
- URIBELARREA, J.L., WINTER, J., GOMA, G. et PAREILLEUX, A., 1990, Determination of maintenance coefficients *Saccharomyces cerevisiae* cultures with cell recycle by cross-flow membrane filtration, *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 201-206
- VAN NESS, J. H., 1981, *Encyclopedia of chemical technology*, Ed; MARK, H. F., OTHMER, D. E., OVERBERGER, C. G. et SEABOR, G. T., 3rd edn., Wiley, New York, 13, 80-103
- VAN NIPSEN, J. G. M. et JONKER, R., 1989, A process for the fermentation preparation of organics acids, EP 0 346 983 A2

- VEISSEYRE, R., 1975, Technologie du lait, Ed. La Maison Rustique, 250-275
- VENKATESH, K. V., OKOS, M. R. et WANKAT, P. C., 1993, Kinectic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*, Process in Biochemistry, 28, 231-241
- VERINGA, H. A., 1986, Procedure for the preparation of D(-) lactic acid, EP 0 232 556 A1
- VICK ROY, T.B., 1985, Lactic acid, Ed. in Comprehensive Biotechnology, vol. 38, by MOO YOUNG M., 761-775
- VINIEGRA, G. G. et GOMEZ, J., 1984, Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures, Ed. Bioconversion systems, CRC Press, D. WISE, chap. 2, 17-39
- VOELSKOW, H. et SUKATSCH, D., 1982, Procédé de préparation d'acide-D-lactique par utilisation de *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129, Hoechst Aktiengesellschaft, EP 0 072 010 A3
- WALKUP, P., ROHRMANN, C., HALLEN, R. et EAKIN, D., 1991, Production of esters of lactic acid, ester of acrylic acid, lactic acid and acrylic acid, WO91/11527
- WOLIN, M. J., 1964, Fructose 1,6-diphosphate requirement of streptococcal lactic deshydrogenase, Sciences, 146, 775-777
- YABANNAVAR, V. M. et WANG, D. I. C., 1991, Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation, Biotechnology and Bioengineering, 37, 6, 544-550
- YAO, P. X. et TODA, K., 1990, Lactic acid production in electro dialysis culture, Journal of General Applied Microbiology, 36, 111-125
- YEH, P. L. H., BAJPAI, R. K. et IANNOTTI, R. L., 1989, An improved model for lactic acid fermentation, Journal of Fermentation and Bioengineering, 71, 1, 153-64
- YONDEM, F., OZILGEN, M. et BOZOGLU, T. F., 1992, Kinectic aspects leaving with mixed cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, Food Science and Biotechnology, 25, 2, 162-167
- ZADOW, J. G., 1989, Fermentation of whey and permeate, Bulletin of the IDF, 233, 5, 53-60

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDŒUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur THONART, Professeur, Centre Wallon Biologie
Industrielle LIEGE (Belgique),
Monsieur GOMA, Professeur, INSA Toulouse.**



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur MORABITO Daniel

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'acide lactique par *Lactobacillus casei*" sur lactosérum
: études cinétiques, modélisation et simulation de procédé intégré"**

en vue de l'obtention du titre de :

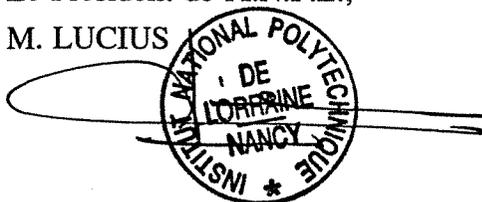
**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, **31 Janvier 1994**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS



RESUME :

La production d'acide lactique par voie microbienne a été longuement étudiée sous différents aspects : microbiologique (sélection, optimisation de milieu..) et génie des procédés (mise en œuvre intégrant fermentation et séparation).

L'objectif de cette étude est de développer un procédé performant de production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sur lactosérum.

La première partie montre l'influence de paramètres opératoires sur la fermentation lactique. Des expériences ont porté sur l'influence de l'ajout dans le milieu de culture de certains composés (sels minéraux, tween 80 et extrait de levure) par la technique d'impulsion et échelon, du prétraitement appliqué au milieu, des conditions de précultures, du choix de la base régulatrice sur la cinétique microbienne.

Dans une deuxième partie, une étude cinétique a été développée en réacteurs discontinus et semi-continus.

Dans une troisième partie, un modèle cinétique a été élaboré et testé sur ces modes de cultures. Après une étude cinétique de la cristallisation du lactate de calcium, le modèle est adapté à la simulation d'un procédé intégrant la fermentation et la séparation du lactate de calcium en continue.

SUMMARY :

Microbiological lactic acid production has been studied for a long time under different aspects : microbiological (screening, media optimization) and process engineering (setting process integrating fermentation and separation).

The aim of this study is to develop an efficient process of lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* on whey.

The first part deals with operating parameters influence on lactic fermentation. Experiments have carried on importance of element addition by pulse and shift technic in culture media, of applied pretreatment, of preculture condition, of the regulating base upon the microbial kinetic.

In a second part, a kinetic study has been developed in batch and fed batch reactor.

In a third part, a kinetic model has been elaborated and tested on these culture methods. After a kinetic study of calcium lactate cristallization, the model has been adapted to the simulation of process integrating fermentation and continuous calcium lactate separation.

Mots clés : *Lactobacillus casei*, lactosérum, acide lactique, cinétique, séparation, cristallisation, modélisation.
