

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
**Ministère de l'enseignement supérieur
Et de la recherche scientifique**

جامعة حسيبة بن بوعلي الشلف
**Université Hassiba Ben Bouali
Chlef**

**Faculté des Sciences
Agronomiques et Sciences Biologiques**

MEMOIRE
Pour l'obtention du diplôme de
MAGISTER
Option : Sciences Alimentaires

Présenté par :
M^{elle} : MEZIANE Malika

THEME

**Production en continu de l'acide lactique et du diacétyle
par *Lactococcus lactis* ssp immobilisée sur pouzzolane
dans un bioréacteur à lit fixe**

Devant le jury :

M ^r LABBACI A.	Maître de conférences	Président
M ^r DILMI BOURAS A.E.K	Professeur	Encadreur
M ^r EL HAMEUR H.	Chargé de cours	Co-encadreur
M ^m ALLAM R.	Maître de conférences	Examinatrice
M ^r BENSALD A.	Maître de conférences	Examineur

2007/2008

Dédicace

*J*e dédie cette thèse à ma Mère qui aurait été comblé de bonheur, si elle était de ce monde que dieu ait son âme et l'héberge dans son vaste paradis.

" J'aurais tant aimé que tu sois là pour voir ce que tu as réussi,"

A mon père que dieu lui donne la force pour qu'il continu à couronner notre vie.

A tous les membres de la famille Meziane : frères, sœurs, belles sœurs, beaux frères, neveux et nièces. A cette occasion, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à mon frère Nasreddine qui m'a soutenu, aidé et encouragé tout au long de ce travail.

*J*e clos ces remerciements en dédiant ce travail au peu d'amies que j'ai eus la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenu tout au long de ces années.

Malika Meziane

Remerciements

Je rends grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis. Amen.

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon promoteur **Mr Dilmi Bouras A.E.K** Professeur et doyen de la faculté des sciences agronomiques et biologiques à l'université de Chlef pour avoir accepté d'encadrer ce travail, il est toujours prêt à ouvrir un environnement de travail positif, dynamique et chaleureux. Son enthousiasme et son infaillible confiance m'ont été d'une grande aide.*

*Toute ma reconnaissance s'adresse à **Mr El Hameur H.** mon co-encadreur, pour m'avoir confié ce sujet, ses précieux conseils et sa responsabilité scientifique tout au long de ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité et son savoir qui m'ont permis de connaître les potentialités des microorganismes dans le monde industriel.*

*Je remercie vivement et sincèrement **Mr Labaci A.** Maître de conférence et chef de département de génie des procédés pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury.*

*J'exprime ma gratitude à **Mm Allem R.** maître de conférence d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*J'exprime ma gratitude à **Mr Bensaid A.** maître de conférence d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier **Mr Mahmoudi M.** chargé de cours en génie des procédés pour ses précieux conseils et les innombrables connaissances en bioprocédés qu'il a apporté à ce travail.*

*Tout particulièrement, j'adresse mes remerciements à **Mr Bouguerra F.** chargé de cours pour son aide dans la correction de ce manuscrit et ses précieux conseils.*

*Parmi tous les membres du laboratoire que j'ai pu rencontrer, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Mr Benyamina H.** ainsi que sa collaboratrice **El batoul** pour leur aide. À tous, aux chefs des laboratoires de la faculté et de la répression des fraudes, responsables de matériels et produits chimiques et à mes étudiants, je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir contribué à l'exécution de ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à **Mr Tehari M.** qui m'a fourni le substrat lactosérum en poudre nécessaire à l'exécution de cette étude.*

*Aussi, je voudrais montrer toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, qui m'ont côtoyé et surtout supporté durant la période du travail en particulier mes collègues de travail et le directeur du commerce de la wilaya de Chlef **Mr Ketita F.***

Très nombreux sont les gens qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail. Tout en m'excusant auprès d'eux de ne pas les citer, je leur exprime ma vive reconnaissance.

Liste des figures

Figure 1 : Formes optiques de l'acide lactique.....	5
Figure 2 : Synthèse chimique de l'acide lactique.....	7
Figure 3 : Production par fermentation de l'acide lactique.....	7
Figure 4 : Aperçu historique de la taxonomie de <i>L. lactis</i>	18
Figure 5 : Glycolyse (voie de Embden-Meyerhof-Parnas).	24
Figure 6 : Voie de 6-PG/PK (6-phosphogluconate/ phos- phoketolase).....	24
Figure 7 : Métabolisme du citrate chez <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	25
Figure 8 : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide décrites par Buchanan (1918).....	33
Figure 9 : Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur construit par l'homme ou d'un bioréacteur naturel (lac).....	36
Figure 10 : Diagramme de déprotéinisation du lactosérum.....	54
Figure 11 : Relance de l'activité de l'activité des lactocoques.....	57
Figure 12 : Préparation des pré-cultures des souches utilisées.....	58
Figure 13 : Préparation des cultures mères par la méthode de repiquage par division	59
Figure 14 : Culture des souches utilisées libres en batch.....	62
Figure 15 : Culture en batch des cellules utilisées immobilisées sur le support pouzzolane.....	62
Figure 16 : Culture en continu des souches utilisées immobilisées sur le support pouzzolane.....	63
Figure 18 : L'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance chez <i>Lc.l9</i> en culture pure à taux d'inoculation de 10 % de 24 h sur le milieu M17 à 30 °C.....	72
Figure 19 : L'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance chez <i>Lc.d4</i> à taux d'inoculation de 10 % de 24 h en culture pure sur le milieu M17 à 30 °C.....	73
Figure 19 : L'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance chez <i>Lc.l9</i> et <i>Lc.d4</i> à taux d'inoculation de 10 % de 24 h en culture pure sur le milieu M17 à 30 °C.....	73
Figure 20 : Evolution de la production de l'acide lactique au cours de la croissance des souches utilisées sur le milieu LDNS à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.....	74
Figure 21 : Evolution de la biomasse au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M1, M2, M3 et M4 à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.....	75
Figure 22 : Evolution de la conversion du lactose au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M1, M2, M3 et M4 à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.....	77

Figure 23 : Evolution de la production de l'acide lactique au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M1, M2, M3 et M4 à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.....	77
Figure 24 : Evolution des biomasses fraîche et sèche au cours de l'immobilisation des souches utilisées en culture pure et mixte sur pouzzolane de granulométrie 6,25 mm, 4 mm et 1,25 mm dans le milieu M3 en fonction des différents temps de rétention.....	77
Figure 25 : L'évolution de la densité optique de la biomasse des différentes cultures dans le surnageant récupéré, les solutions du 1er lavage et celles du 2 eme lavage, de granulométrie 6,25 mm, TI 10 % de 24 h à 30 °C.....	78
Figure 26 : Evolution de la production de l'acide lactique au cours de la croissance des souches utilisées sur le milieu LDNS à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.....	81
Figure 27: Evolution de la biomasse au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M1, M2, M3 et M4 à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.....	84
Figure 28 : Suivi en batch du pH des souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn.....	87
Figure 29 : Suivi en batch de la production de l'acide lactique par les souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn.....	87
Figure 30 : Suivi en batch de la croissance des souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn.....	87
Figure 31 : Suivi en batch de la production de diacétyl par les souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn.....	87
Figure 32 : Suivi en batch de la conversion du lactose par les souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100	87
Figure 33 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.19 en batch à cellules libres (à taux d'inoculation 10 %, âge de l'inoculum 24 h dans le milieu M3 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	88
Figure 34 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.d4 en batch à cellules libres (à taux d'inoculation 10 %, âge de l'inoculum 24 h dans le milieu M4 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	89
Figure 35 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.19 et Lc.d4 en batch à cellules libres (à taux d'inoculation 10 %, âge de l'inoculum 24 h dans le milieu M3 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	89
Figure 36 : Suivi en batch de la croissance des souches utilisées dans le milieu M17 modifié, M3 et M4 à 30 °C et 100 trs/mn.....	90

Figure 37 : Suivi en batch de la production de l'acide lactique par les souches utilisées dans le milieu M17 modifié, M3 et M4 à 30 °C et 100 trs/mn.....	90
Figure 38 : Suivi en batch de la production de diacétyle par les souches utilisées dans le milieu M17 modifié, M3 et M4 à 30 °C et 100 trs/mn.....	91
Figure 39 : Suivi en batch de la conversion du lactose dans le milieu M17 modifié et milieu M3 et M4 à 30 °C et 100 trs/mn.....	91
Figure 40 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique, diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.19 immobilisée sur pouzzolane en batch (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M3 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	93
Figure 41 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.d4 immobilisée sur pouzzolane en batch (taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M4 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	94
Figure 42 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.19 et Lc.d4 immobilisées sur pouzzolane en batch (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M3 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	95
Figure 43 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.19 et Lc.d4 immobilisées sur pouzzolane en batch (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M3 à 30 °C et à 100 trs/mn).....	98
Figure 44 : Production de l'acide lactique, du diacétyle et de la conversion du lactose au cours de la croissance de Lc.19 et Lc.d4 batch à cellules libres à différents taux d'inoculation et âges de l'inoculum dans les milieux M17 et LDS à 30 °C et à 100 trs/mn.....	99
Figure 45 : L'évolution du pH en culture en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).....	105
Figure 46 : L'évolution de la biomasse en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).....	106
Figure 47 : L'évolution de la conversion du lactose en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).....	107
Figure 48 : L'évolution de la production de l'acide lactique en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).....	108
Figure 49 : L'évolution de la production du diacétyle en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).....	109

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physiques de l'acide lactique	5
Tableau 2 : Propriétés physiques du diacétyle.....	13
Tableau 3 : Exigences de croissance de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> et ssp. <i>cremoris</i>	20
Tableau 4 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactocoques	21
Tableau 4 : Production de l'acide lactique par les différentes souches.	42
Tableau 5 : Production de diacétyle et acétaldéhyde par les <i>Lactocoques</i>	43
Tableau 7 : Souches utilisées pour les essais de fermentation.....	44
Tableau 8 : La composition moyenne des lactosérums (en % d'extrait sec).	45
Tableau 9 : Caractéristique physico- mécanique de la pouzzolane.....	48
Tableau 10 : Composition chimique de la pouzzolane.....	48
Tableau 11 : Les différents extraits secs sélectionnés en vue d'optimisation un milieu de culture à base de lactosérum (en % d'extrait sec).	55
Tableau 12 : Les différents ingrédients ajoutés au lactosérum déprotéiné (en % d'extrait sec).....	56
Tableau 13 : Réactifs et matériels pour préparer les milieux de fermentation.....	60
Tableau 14 : Les différents taux d'inoculation et âge testés pour optimiser la fermentation.....	60
Tableau 15 : Réactifs et matériels pour préparer le support pouzzolane.....	61
Tableau 16 : Caractères morphologiques et cultureux.....	69
Tableau 17 : Caractères physiologiques et biochimiques.....	69
Tableau 18 : Composition générale de la poudre de lactosérum.....	70
Tableau 19 : Composition générale de lactosérum liquide avant et après autoclavage.....	71
Tableau 20 : Meilleurs taux de croissance des souches utilisées en fonction du taux et âge de l'inoculum en culture pure et mixte sur le milieu M17 à 30 °C.	72
Tableau 21 : Rendements des différentes productions en batch cellules libres dans les milieux M17 et LDS.....	100
Tableau 22 : Rendements des différentes productions en batch cellules immobilisées dans le milieu LDS.....	100

Tableau 23 : Conditions de la fermentation en continu des souches utilisées immobilisées sur pouzzolane à 30 °C, TI: 10 % de 24 h.....	104
Tableau 24 : Production moyenne de l'acide lactique et diacétyl en continu.....	110
Tableau 25 : Rendements et productivités en acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> en différents modes à cellules libres ou immobilisées à pH contrôle ou non.....	114
Tableau 26 :: Rendements en diacétyl par <i>Lactococcus lactis</i> en différents modes à cellules libres ou immobilisées à pH contrôle ou non.....	115

Liste des photos

Photo 1 : La pouzzolane (vue loupe binoculaire).....	48
Photo 2 : Les différentes granulométries utilisées de la pouzzolane.....	50
Photo 3 : Dispositif de fermentation en continu sur support pouzzolane.....	64
Photos 4, 5, 6 : Observation des colonies sous une loupe binoculaire.....	68
Photos 7, 8 : Observation microscopique de <i>Lc.l9</i> et <i>Lc.d4</i> en culture mixte à l'état frais (7) et coloration de Gram (8) (grossissement optique x 100).....	68
Photos 9 : Formation des biofilms par les souches utilisées en cultures pures et mixte sur les différentes granulométries de pouzzolane.....	82
Photo 10 : Evolution du biofilm de <i>Lc.l9</i> sur pouzzolane de granulométrie 6,25 mm dans le milieu M ₃ en fonction des différents temps de rétention (Observation sous une loupe binoculaire).....	83

Sommaire

Résumé

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Acide lactique et diacétyle

I.1 Acide lactique.....	4
I.1.1 Propriétés optiques et physicochimiques	4
I.1.2 Procédés de fabrication de l'acide lactique.....	6
I.1.2.1 Par voie chimique.....	6
I.1.2.2 Par voie biologique.....	7
I.1.3 Purification de l'acide lactique	8
I.1.4 Différentes utilisations de l'acide lactique	9
I.2 Diacétyle.....	12
I.2.1 Propriétés physicochimiques de diacétyle.....	12
I.2.2 Procédés de fabrication de diacétyle.....	14
I.2.2.1 Par voie chimique.....	14
I.2.2.2 Par voie biologique.....	14
I.2.3 Extraction et purification du diacétyle.....	16
I.2.4 Différentes utilisation de diacétyle	16

Chapitre II : *Lactococcus lactis* ssp

II.1 Aperçu historique de la taxonomie de <i>Lactococcus lactis</i> ssp.....	18
II.2 Caractéristiques générales.....	19
II.2.1 Caractères microscopiques.....	19
II.2.2 Caractères macroscopiques, biochimiques et de culture	19
II.3 Métabolisme de <i>Lactococcus lactis</i> ssp.....	22
II.3.1 Métabolisme carboné chez <i>Lactococcus lactis</i> ssp	22
II.3.1.1 Métabolisme du glucose.....	23
II.3.1.2 Métabolisme du lactose.....	23
II.3.2 Métabolisme du citrate.....	24
II.3.3 Métabolisme azoté chez <i>Lactococcus lactis</i> ssp	26
II.3.3.1 Protéolyse et croissance sur lait	26
II.3.3.2 Catabolisme des peptides	26
II.3.3.3 Catabolisme des acides aminés.....	27
II.3.4 Métabolisme des minéraux chez <i>Lactococcus lactis</i> ssp.....	28
II.4 Génétique des lactocoques	28
II.5 Les bactériophages lactiques	29

Chapitre III : Cinétique de la production de l'acide lactique et diacétyle

III.1 Principes généraux de la croissance microbienne.....	30
III.1.1 Notions générales sur la physiologie des microorganismes	30
III.1.1.1 Les besoins nutritifs des micro-organismes.....	30
III.1.1.2 La croissance bactérienne	30

III.1.1.2.1	Définition.....	30
III.1.1.2.2	Facteurs influençant la croissance bactérienne.....	31
III.1.1.2.3	Cinétiques de la croissance bactérienne.....	31
III.1.1.3	Principaux modes de conduite des cultures microbiennes (bioprocédés).....	34
III.1.1.3.1	Le bioréacteur.....	34
III.1.2	Biofilm et immobilisation.....	37
III.1.2.1	Définitions	37
III.1.2.2	Etapes de formation de biofilm.....	37
III.1.2.3	Techniques d'immobilisation.....	39
III.1.2.3.1	Immobilisation dans des réacteurs à membrane.....	39
III.1.2.3.2	Adsorption à un support préformé.....	39
III.1.2.3.3	Immobilisation dans des matrices poreuses.....	40
III.2	Production microbienne.....	40
III.2.1	Les lactocoques, l'acide lactique et diacétyle.....	41
III.2.1.1	L'acide lactique.....	41
III.2.1.2	Le diacétyle.....	42

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1	Matériels.....	44
I.1.1	Souches.....	44
I.1.2	Substrat : Le lactosérum.....	44
I.1.2.1	Types de lactosérum.....	44
I.1.2.2	Procédé de fabrication de lactosérum en poudre.....	45
I.1.2.3	Identification du lactosérum en poudre utilisé.....	46
I.1.3	Milieux biologiques	47
I.1.3.1	Milieu de dénombrement	47
I.1.3.2	Milieux de conservation	47
I.1.3.3	Milieu de culture.....	47
I.1.4	Support utilisé « la pouzzolane »	47
I.1.4.1	Origine.....	48
I.1.4.2	Porosité de garnissages utilisés	49
I.1.4.3	Densité et masse volumique	49
I.1.4.4	Aire spécifique.....	49
I.1.4.5	Diamètre des grains.....	50
I.1.5	Diluant, réactifs et autres matériels.....	50
I.2	Méthodes.....	51
I.2.1	Repiquage et revivification des souches utilisées	51
I.2.2	Contrôle de la pureté des souches bactériennes (Purification)	51
I.2.2.1	Examen morphologique.....	52
I.2.2.2	Test physiologique : Recherche de la catalase.....	52
I.2.3	Conservation des souches	53
I.2.4	Préparation des milieux à base de lactosérum	53
I.2.4.1	Traitement du lactosérum.....	53
I.2.4.2	Optimisation de l'extrait sec du lactosérum.....	55
I.2.4.3	Supplémentations du lactosérum déprotéiné	55
I.2.4.4	Ajustement du pH	56
I.2.4.5	Stérilisation.....	56
I.2.5	Essais de Fermentation.....	56
I.2.6	Traitement du support « pouzzolane».....	61
I.2.7	Mises en œuvre des bioréacteurs.....	61
I.2.7.1	Dispositifs de fermentation en culture discontinue « batch ».....	61

I.2.7.2 Dispositifs de fermentation en culture continue	63
I.2.8 Stérilisation des matériels utilisés dans les essais de fermentation.....	64
I.2.10 Immobilisation.....	65
I.2.11 Paramètres d'étude	65
I.2.11.1 Evolution du pH.....	65
I.2.11.2 Assimilation des sucres.....	65
I.2.11.3 Etude du pouvoir acidifiant	65
I.2.11.4 Evolution de la biomasse.....	66
I.2.11.5 Dosage des substances aromatiques: dosage du diacétyle.....	66
I.2.12 Autres méthodes.....	66
I.2.12.1 Détermination de la teneur en matière sèche.....	67
I.2.12.2 Détermination de la teneur en protéine.....	67
I.2.12.3 Détermination de la teneur en matière grasse.....	67

Chapitre II : Résultats et discussions

II.1 Essais préliminaires.....	68
II.1.1 Vérification de la pureté des souches.....	68
II.1.1.1 Caractères morphologiques et culturels.....	68
II.1.1.2 Caractères physiologiques et biochimiques.....	69
II.1.2 Optimisation du milieu de culture à base de lactosérum déprotéiné.....	70
II.1.2.1 Analyse de la composition du lactosérum.....	70
II.1.2.1.1 Caractérisation du lactosérum doux natif.....	70
II.1.2.1.2 Caractérisation du lactosérum après l'autoclavage.....	70
II.1.2.2 Cinétique de croissance et de production sur le milieu M17.....	71
II.1.2.2.1 Détermination de la courbe de croissance bactérienne.....	72
II.1.2.2.2 Evolution de l'acidité Dornic en fonction du taux de croissance.....	72
II.1.2.3 Cinétique de croissance et production sur LDS à différents extraits secs	74
II.1.3 Enrichissement du milieu LDNS.....	75
II.1.3.1 Effet de l'extrait de levure.....	78
II.1.3.2 Effet des sels de magnésium.....	79
II.1.3.3 Effet des autres ingrédients	79
II.2 Fermentation en discontinue « batch ».....	80
II.2.1 Cinétique d'adhésion	80
II.2.2 Fermentation en discontinue « batch » à cellules libres.....	86
II.2.2.1 Sur milieu M17 modifié.....	87
II.2.2.2 Sur milieux M ₁ et M ₂	88
II.2.2.2.1 Evolution de la production de la biomasse.....	90
II.2.2.2.2 Evolution de la production de l'acide lactique.....	90
II.2.2.2.3 Evolution de la production du diacétyle.....	91
II.2.2.2.3 Evolution de la conversion du lactose.....	91
II.2.3 Fermentation en discontinue « batch » à cellules immobilisées sur pouzzolane	92
II.3 Fermentation en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane.....	103
II.3.1 Evolution de la production de l'acide lactique, du diacétyle et de la conversion du lactose...	110
II.3.2 Evolution de la production de la biomasse.....	112
II.4 Rendements et productivités.....	114

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

De nombreux sous-produits de l'industrie alimentaire sont rejetés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution de part leur grande quantité. En Algérie, pour la production fromagère, l'industrie laitière rejette quotidiennement 6000 litres/jour de lactosérum (cas de l'unité de Boudouaou), soit pour chaque kilogramme de fromage produit, un résidu de 4 à 12 kg de lactosérum est rejeté (Gana et Touzi, 2001). Par sa composition biochimique (lactose, protéines, vitamines), le lactosérum est un excellent milieu de culture pour les micro-organismes et devient un facteur de pollution redoutable (Dolle, 2003). Pour valoriser ces tonnages élevés de lactosérum, la production de l'acide lactique et du diacétyle par fermentation constitue une des voies les plus attractives.

Actuellement, l'acide lactique et le diacétyle sont principalement utilisés dans l'alimentation ou dans des applications liées à l'alimentation. L'acide lactique est également utilisé pour des applications non alimentaires: les industries textiles, cosmétiques, pharmaceutiques. Il est employé dans les industries chimiques ou pour être polymérisés en acide polylactique biodégradable (Wee et al., 2006). Le diacétyle participe à l'arôme de très nombreux produits laitiers. Sa présence dans le beurre, les laits et les crèmes fermentés, dans certains fromages ainsi que dans les margarines est désirable et même indispensable à la saveur caractéristique de ces produits.

Plusieurs études ont été consacrées à la recherche de nouvelles souches lactiques plus performantes pour transformer le lactose, principal sucre présent dans le lactosérum en métabolites les plus importants tels que l'acide lactique et le diacétyle. Ces métabolites sont traditionnellement produits par fermentation discontinue appelée également fermentation «batch» (Gilliland, 1985). L'accumulation de produits toxiques est un facteur important limitant la production de levains lactiques par cette technologie. Les cultures en continu permettent d'éviter ce problème. D'autre part, en culture mixte, les interactions entre les souches peuvent conduire à l'élimination des risques importants de contamination d'une ou plusieurs souches dans le bioréacteur par l'emploi de taux de dilution adéquats (Hugenholtz et al., 1993).

Pour éviter les principaux obstacles au développement de procédés biologiques et diminuer les différents coûts (extraction, purification,...), une possibilité d'immobiliser les souches sur un support par adsorption ou inclusion s'offre pour atteindre ces buts.

Le mode d'immobilisation des souches sur un support solide tel que la pouzzolane n'a pas fait l'objet de travaux en vue de produire ces métabolites, de ce fait, il nous est apparu intéressant d'envisager une étude sur la production en continu de l'acide lactique et diacétyle par les souches locales de *Lactococcus lactis* immobilisées sur pouzzolane en bioréacteur à lit fixe. L'objectif de cette étude est :

- Valoriser le lactosérum jugé sans intérêt et sans valeur par les industriels.
- Apprécier les potentialités de la roche pouzzolane abondante dans l'Ouest de l'Algérie.
- Améliorer les performances des souches locales capables de convertir le lactose en acide lactique et en diacétyle avec de meilleurs rendements dans un système continu à cellules fixées et d'arriver à une meilleure épuration de l'effluent et par conséquent de réduire potentiellement la pollution provoquée par le rejet du lactosérum dans les eaux résiduaires

Pour cela, la production d'acide lactique et du diacétyle en continu à partir de lactosérum déprotéiné supplémenté en extrait de levure et sulfate de magnésium sera mise en oeuvre, dans un procédé continu comprenant essentiellement une colonne garnie d'un support inerte appelé pouzzolane sur lequel sont immobilisées *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 9 et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacétylactis* 4 individuellement et associées. Le dispositif sera testé avec 3 granulométries 1.25, 4 et 6.25 mm avec un taux de dilution de 0.36 à 0.46 h⁻¹ et des hauteurs issus de 2 poids de 150 et 100 g du garnissage en pouzzolane. Le comportement de ces deux souches en culture pure et mixte avec cellules libres pour des fermentations en batch sera également étudié en fonction des différents âges et taux d'inoculation à une température d'incubation de 30°C à pH non contrôlé. Nous présentons ici les principaux chapitres issus de la littérature et une partie expérimentale.

Nous commencerons dans le Chapitre I par un état des lieux des connaissances sur les deux produits qui nous amènera plus précisément à traiter différents points concernant l'acide lactique et le diacétyle, tels que leur utilisation, les différents procédés de production et leur extraction et purification.

Ensuite, nous développerons une partie sur la souche modèle dont les besoins nutritionnels et son métabolisme sont traités, dans une dernière partie nous démontrons le recours aux biotechnologies et la possibilité de produire des deux métabolites.

Le matériel et les méthodes de ce mémoire seront décrits dans le Chapitre I de la partie expérimentale. Dans le Chapitre II, nous réaliserons un bilan des différentes expérimentations menées durant ce travail et nous discuterons les résultats obtenus.

Pour terminer, les conclusions les plus importantes de cette étude et les perspectives pour des travaux futurs seront présentées.

Partie bibliographique

Chapitre I : Acide lactique et diacétyl

L'acide lactique et le diacétyl sont catalogués comme GRAS. Dans le but d'améliorer la qualité sanitaire et organoleptique, ils sont des ingrédients utilisés directement dans les denrées alimentaires (Narayanan et *al.*, 2004).

En réalité, l'acide lactique ne présente aucune caractéristique qui en fait un produit exceptionnel, mais il possède un ensemble de propriétés qui le rendent difficilement remplaçable dans de nombreuses fabrications. Par contre la présence de diacétyl (2,3-butanedione) dans les beurres, les margarines et les crèmes fermentées, joue un rôle déterminant dans l'équilibre aromatique (Renouf, 2006).

I.1 Acide lactique

Est un acide d'origine naturelle obtenu par la fermentation lactique des sucres ou élaboré par voie de synthèse; il peut contenir des produits de condensation tels que le lactate de l'acide lactique et le dilactide (Givry, 2006).

L'acide lactique est un intermédiaire métabolique retrouvé dans de nombreux organismes vivants allant des procaryotes anaérobies à l'homme et représente l'un des acides organiques les plus importants (Mirdamadi, 2002).

I.1.1 Propriétés optiques et physicochimiques

L'acide lactique connu aussi sous le nom d'acide du lait, est un acide organique qui joue un rôle important dans divers processus biochimiques. Sa formule chimique est $C_3H_6O_3$ et sa structure se reflète dans son nom systématique, l'acide 2-hydroxy-propanoïque. Comme il possède un carbone asymétrique, il existe 2 énantiomères de l'acide lactique (Figure 1). Le premier est connu sous le nom L (+) acide lactique ou (S) acide lactique, son image dans un miroir, est la forme D (-) acide lactique ou (R) acide lactique. C'est la forme L (+) qui est la plus importante au niveau biologique (Bouraqadi Idrissi, 2006).

Le pouvoir rotatoire $[\alpha_{21-22}^D]$ pour l'acide L - lactique en solution aqueuse à 2,5 g pour 100 ml est de $2,6^\circ$ et pour l'acide D - lactique en solution aqueuse à 8 g pour 100 ml est de $-2,6^\circ$.

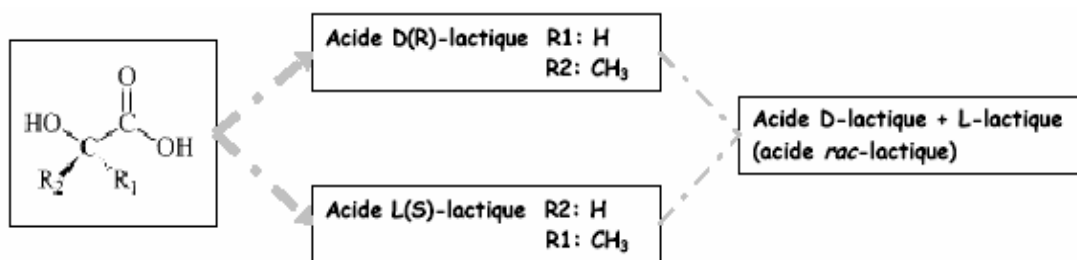


Figure 1 : Formes optiques de l'acide lactique (Givry, 2006).

A l'état pur, il se présente sous la forme de cristaux sirupeux, hygroscopiques, extrêmement solubles dans l'eau à température ambiante en toutes proportions, il est aussi soluble dans certains solvants organiques tels que l'alcool à 95 % vol., les esters, les cétones et l'éther et insoluble dans le chloroforme (Narayanan et *al.*, 2004).

Il a une saveur acide, mais cette saveur est plus douce que celle de certains autres acides alimentaires. Il est inodore, non volatil et par conséquent il ne masque pas certains goûts ou certaines odeurs provenant d'autres constituants des produits alimentaires. Il peut être facilement utilisé sous la forme liquide qui est sans couleur ou légèrement jaunâtre, sirupeux et sous cette forme, il conserve toutes ses qualités, même après un magasinage prolongé (F.D.A., 1982).

Tableau 1: Propriétés physiques de l'acide lactique
(Narayanan et *al.*, 2004 et Bouraqadi Idrissi, 2006).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire (g/mol)	90,08
pK	3,8
Point de fusion (°C)	25 - 28
Point d'ébullition (°C)	122
Masse volumique (g/cm ³)	1,21 à 20 °C
Indice de réfraction (n _{20D})	1,4392
Constante de dissociation, K _a à 25 °C	1,37 x 10 ⁴
Température de combustion, ΔH _c	1361 KJ/mole
Température spécifique, C _p à 20 °C	190 J / mol / °C

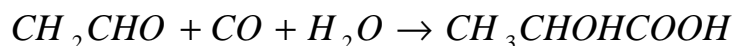
I.1.2 Procédés de fabrication de l'acide lactique

L'acide lactique possède un potentiel chimique important, c'est pourquoi, il est largement utilisé en industrie. Il apparaît également comme un très bon conservateur naturel au niveau alimentaire (Givry, 2006).

La production d'acide lactique découvert en 1780, se fait actuellement selon deux procédés distincts soit par synthèse chimique (hydrolyse de lactonitrile), soit par fermentation qui représente annuellement à l'échelle mondiale 90 % de la production totale (Rojan et *al.*, 2007).

I.1.2.1 Par voie chimique

L'acide lactique est obtenu par un procédé de synthèse qui repose sur le traitement de l'acétaldéhyde par un mélange d'oxyde de carbone et de l'eau, en présence d'acide sulfurique à température et à pression élevées (Narayanan et *al.*, 2004).



Cette synthèse de l'acide lactique est la plus utilisée, elle s'effectue à partir du lactonitrile (figure 2), co-produit issu de la synthèse de l'acrylonitrile. La formation de ce précurseur est réalisée par une catalyse de base en ajoutant du cyanure d'hydrogène à de l'acétaldéhyde. Cette réaction est effectuée en phase liquide sous pression atmosphérique (Bicker et *al.*, 2005).

Le lactonitrile brut, issu de cette réaction, est récupéré et purifié par distillation. Il est ensuite dégradé en acide lactique à l'aide d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique, produisant des quantités correspondantes de sels d'ammonium (Givry, 2006).

Afin d'être purifié, l'acide lactique produit lors de cette hydrolyse est estérifié avec du méthanol, permettant ainsi la formation de lactate de méthyle qui sera à son tour récupéré et purifié par distillation, puis hydrolysé dans de l'eau en condition acide. Au final, l'acide lactique sera purifié et concentré, tandis que le méthanol sera recyclé (Givry, 2006).

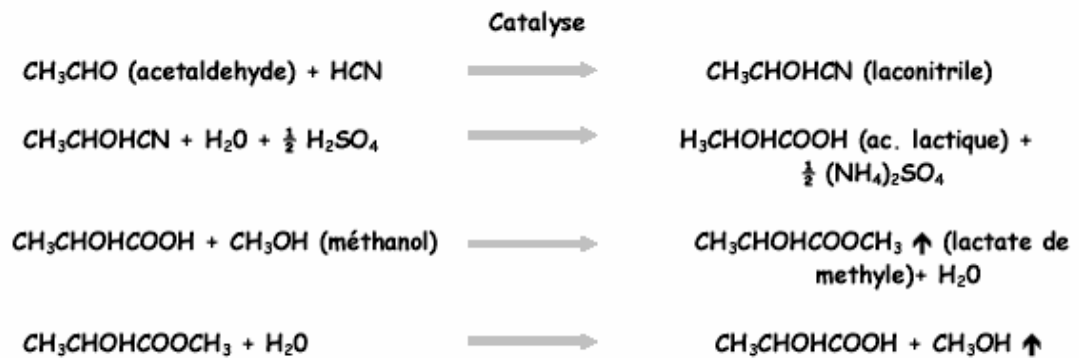


Figure 2 : Synthèse chimique de l'acide lactique
(Givry, 2006 et Narayanan et *al.*, 2004).

I.1.2.2 Par voie biologique

Elle permet de produire le stéréo-isomère d'acide lactique désiré grâce à l'utilisation de bactéries lactiques homofermentaires (de Roissart et Luquet, 1994).

Lors des fermentations, réalisées en mode batch pendant 4 à 6 jours, du carbonate de calcium est ajouté afin de neutraliser l'acide produit. Cet apport entraîne la formation de sels de calcium de l'acide, permettant une séparation plus facile par filtration puis par évaporation. Ces sels seront ensuite acidifiés avec de l'acide sulfurique afin de les convertir en acide lactique et en sulfate de calcium insoluble qui sera enlevé par filtration (Li et *al.*, 2004). Une purification par des colonnes échangeuses d'ions est enfin réalisée sur ce filtrat, suivie d'une évaporation afin de produire l'acide lactique alimentaire, lequel s'avère peu stable à la chaleur (Givry, 2006).

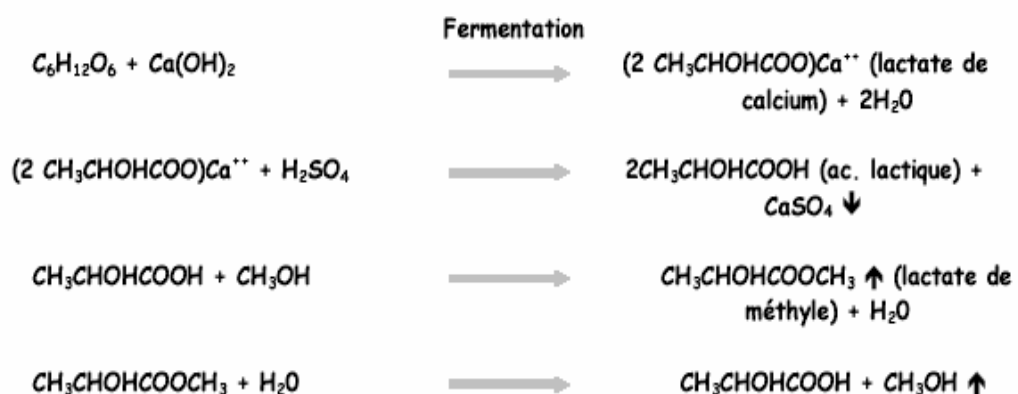


Figure 3 : Production par fermentation de l'acide lactique
(Givry, 2006 ; Narayanan et *al.*, 2004).

Techniquement, ce procédé est complexe et des étapes de purifications additionnelles sont nécessaires pour produire de l'acide lactique de pureté commerciale (Li et *al.*, 2004).. Les inconvénients majeurs de ce procédé sont la forte solubilité du lactate de calcium (5 % en masse dans la liqueur mère à 20 °C) et la formation du CaSO₄ qui doit être récupéré (Givry, 2006).

Au final, les différences entre ces deux modes de production résident dans l'obtention d'un acide lactique pur optiquement. La synthèse chimique ne peut produire que des racémiques contrairement à la synthèse biologique qui permet d'obtenir une pureté optique, grâce au choix d'une souche ne produisant que l'acide D- ou L- lactique (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000).

I.1.3 Purification de l'acide lactique

La principale difficulté économique de la fermentation réside dans les étapes de séparation et de purification de l'acide lactique. En effet, la fermentation microbienne exige l'utilisation d'un processus d'extraction efficace et économique pour purifier et récupérer l'acide lactique présent dans le milieu de fermentation. Le rétablissement de l'acide lactique est complexe en raison de son comportement chimique, car il montre une forte affinité avec l'eau et possède une basse volatilité (122 °C à 1661,73 Pa). Par conséquent, sa purification est l'étape de transformation qui représente le coût le plus élevé (Givry, 2006).

De plus, la fermentation conventionnelle produit des sels de lactate. Différents auteurs ont investi la voie de la récupération de l'acide lactique à partir des jus de fermentation par extraction liquide - liquide (Bouraqadi Idrissi, 2006).

Le développement et le déploiement de nouvelles technologies de séparation permettent une production à faible coût, à l'aide de procédés continus dans des applications à grande échelle.

Pour réaliser cette séparation et selon Gonzalez et *al.* (2007), différentes techniques sont couramment utilisées:

- Les membranes de filtration ;
- La distillation ;
- L'extraction à l'aide de solvants ;
- Les résines échangeuses d'ions ;
- L'électrodialyse.

Les résines échangeuses d'ions sont très employées pour la séparation de produits biologiques. De nombreuses études ont ainsi été menées à partir de cette technique afin de séparer tous les anions du milieu de culture à partir de différentes résines anioniques pour obtenir le meilleur rendement en acide lactique et la meilleure pureté (Nolasco-Hipolito et *al.*, 2002).

L'électrodialyse est un procédé de séparation par membrane utilisant un champ électrique pour déplacer des espèces ionisées en solution à travers des membranes denses, porteuses elles-mêmes de charges électriques (Prigent et Franco, 1984). C'est la combinaison des propriétés des membranes et du transport électrophorétique qui permet d'en faire un procédé de déminéralisation ou de concentration d'espèces ioniques, ou encore un procédé de conversion électrochimique (Yao et Toda, 1990).

I.1.4 Les différentes utilisations de l'acide lactique

Actuellement, l'acide lactique est principalement utilisé dans l'alimentation ou dans des applications liées à l'alimentation (Wee et *al.*, 2006). D'autres utilisations sont marquées par des applications non alimentaires dont 20 à 30 % de 120.000 tonnes de la production globale en 2005 ont été orienté vers des utilisations nouvelles telles que dans les industries textiles, cosmétiques, pharmaceutiques, celles du cuir, herbicide, production de produits chimiques de base comme l'ester de lactate, l'acétaldéhyde, l'acide acrylique, l'acide propanoïque, dans les industries chimiques ou pour être polymérisés en acide polylactique biodégradable (Zhang et *al.*, 2007).

I.1.4.1 Utilisation en alimentation

Une large partie de l'acide lactique est utilisée pour produire des agents émulsifiants utilisés en alimentation, particulièrement en boulangerie. Il est également utilisé comme acidulant, agent de saveur, maintenant le pH ou inhibant le développement bactérien dans un grand nombre de produits alimentaires (Wee et *al.*, 2006).

I.1.4.1.1 L'emploi de l'acide lactique comme acidulant

Il existe de nombreux exemples où la préparation d'un aliment ou d'une boisson peut nécessiter l'addition d'un acide, soit pour obtenir un produit ayant un goût acidulé, par exemple dans le cas de boissons gazeuses, de conserves de cornichons ou dans la préparation de bonbons acidulés, soit pour, par un réglage du pH, modifier la saveur de produits naturellement acides : confitures.

Dans certains cas, l'acide incorporé peut même devenir un constituant essentiel de certaines préparations telles que potages, conserves d'olives, sauces, poisson mariné, etc. (Wee et *al.*, 2006).

I.1.4.1.2 L'emploi de l'acide lactique comme plastifiant

Les lactates et l'acide lactique exercent en général une importante action plastifiante sur les protéines, cette action se manifestant par un ramollissement, un gonflement et une augmentation de l'extensibilité du produit.

Le lactate de calcium est, de son côté, utilisé pour plastifier les produits à base d'albumine, de gélatine, de caséine, par exemple dans la préparation des meringues, du nougat et de produits moussés. L'addition de 1 % de lactate de calcium produit un effet sensible et permet, soit d'améliorer les propriétés mécaniques de la mousse, soit d'augmenter le volume de mousse pour un volume donné de protéine (G.A.I.N., 2005).

I.1.4.1.3 L'emploi du lactate de sodium comme humectant

Les principaux avantages du lactate de sodium dans ce domaine sont la sécurité absolue de son emploi, sa grande efficacité et la saveur saline très légère qu'il confère aux produits traités. Cette dernière propriété, jointe à son action plastifiante sur les protéines, permet d'envisager son emploi comme condiment dans la préparation de saucisses, de pâtés de viande et de poisson, de jambon, de galantine, de purée de tomates (Wee et *al.*, 2006).

Le goût légèrement salé du lactate de sodium est très apprécié en biscuiterie. Cependant, dans la préparation des mets sucrés, il est possible que cette application soit limitée, car dans les produits qui ne sont pas consommés frais et qui tendent à sécher au cours de leur magasinage, la présence du sucre maintient le taux d'humidité désiré (Wee et *al.*, 2006).

I.1.4.1.4 L'emploi du lactate de calcium comme source de calcium

Les propriétés rhéologiques d'un grand nombre de produits contenant des polymères polaires sont sensibles à l'action des ions polyvalents, comme les ions calcium. Il est indiqué qu'un traitement préalable des pommes avec des sels de calcium peut souvent éviter l'affaissement qui se produit naturellement au moment de leur cuisson, la structure labile de la pectine étant transformée en une solution moins soluble de pectate de calcium (G.A.I.N., 2005).

Pour les produits utilisés à l'état sec, l'absence d'hygroscopicité du lactate de calcium est un avantage additionnel. Le lactate de calcium est également un important constituant des médicaments utilisés dans la thérapeutique par le calcium, les avis des médecins étant que l'emploi d'un sel organique de calcium est nécessaire dans le traitement de la déficience en calcium (Petrov et *al.*, 2008).

Le lactate de calcium constitue certainement une source de calcium assimilable, probablement parce que le cation existe sous une forme chélatée non ionisable et ce sel constitue un produit de choix pour la thérapeutique par voie buccale et pour la préparation de tous les produits de régime à base de calcium et ces mélanges ont été employés avec succès dans l'alimentation des animaux (Wee et *al.*, 2006)

I.1.4.1.5 L'emploi de l'acide lactique comme agent de conservation

Il a été indiqué parfois que l'acide lactique peut être utilisé comme agent de préservation d'aliments ou d'autres produits (F.D.A., 1982). Cependant, il ne semble pas posséder d'action bactériostatique ou fongistatique en dehors de son acidité. A ce point de vue, il est nettement moins efficace que l'acide acétique, ce qui laisse supposer que l'action bactériostatique, comme le goût acide dépend plus de l'acidité titrable que du pH (Wee et *al.*, 2006).

I.1.4.2 Autres utilisation

I.1.4.2.1 L'emploi de l'acide lactique comme désinfectants et détergents

La désinfection des carcasses, de la volaille et des poissons par l'acide lactique et de ses sels est une nouvelle application (Marques et *al.*, 2008).

I.1.4.2.2 L'emploi de l'acide lactique en industrie de textile et cuir

Il a longtemps été utilisé dans l'industrie du cuir comme acidulant pour le chaulage et le tannage. Il a aussi été utilisé dans les étapes de finition du textile (Marques et *al.*, 2008).

I.1.4.2.3 L'emploi de l'acide lactique comme ingrédient pharmaceutique et cosmétique

L'acide lactique et lactate d'éthyle ont longtemps été utilisés dans des applications et des formulations pharmaceutiques ou cosmétiques, particulièrement dans les onguents, les lotions, les solutions parentérales et des polymères biodégradables pour des applications médicales (comme les sutures chirurgicales, les prothèses, les dialyses et les drogues) (Zhang et *al.*, 2007). Le sel d'acide lactique, réalisé avec le calcium, est employé dans la thérapie des insuffisances en calcium et comme agent contre les caries (Datta et *al.*, 1995).

En cosmétique, le lactate d'éthyle est la substance active dans les solutions anti-acné et est employé comme agent hydratant. Il s'avère souvent meilleur que les produits naturels (Datta et *al.*, 1995).

I.1.4.2.4 L'emploi de l'acide lactique comme polymères biodégradables : acide poly-lactique (PLA)

La demande actuelle en acide lactique a considérablement augmenté en raison de son utilisation comme monomère dans la production de polymères biodégradables d'acide polylactique (PLA) très prometteurs, et de son coût peu élevé comme matière première ou comme un intermédiaire de synthèse dans la fabrication de produits chimiques (Givry, 2006).

Les isomères L-lactate ou D-lactate ou un racémique peuvent être utilisés lors de cette polymérisation. Cependant les propriétés du polymère varieront en fonction de la pureté de l'acide lactique employé. En effet, une haute pureté optique est nécessaire afin d'obtenir une bonne cristallinité de l'acide polylactique suffisante, permettant une forte résistance aux forces mécaniques, chimiques et à la chaleur de ce polymère (Givry, 2006).

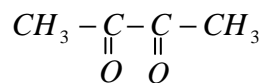
I.2 Le diacétyl

Le diacétyl est l'élément dominant de l'arôme de beurre mais est aussi présent dans bien d'autres produits laitiers tels que les laits et crèmes fermentés et divers fromages (Rondags et *al.*, 1998).

I.2.1 Propriétés physicochimiques

Le diacétyl est une cétone liquide, il est également désigné sous le nom de biacétyl, diméthylidicétone, dicétobutane, butanedione, diméthylglyoxal (Ott, 1999; Sergent, 1998).

Sa formule de constitution est la suivante:



Le diacétyl est un liquide huileux de coloration jaune très légèrement verdâtre, coloration due à la présence des deux groupements carbonyle C = O en position α qui jouent le rôle de chromophores (F.E.M.A., 2006).

Sous l'influence de l'excitation par la lumière de WOOD, les solutions de diacétyl, même diluées à 1 p. 1.000, présentent une belle fluorescence jaune verdâtre. Sa vapeur présente la couleur du chlore et possède une odeur désagréable prononcée, rappelant celle de la quinone (F.E.M.A., 2006).

Le diacétyl à l'état de traces se caractérise au contraire par une odeur agréable rappelant l'odeur de la crème fermentée ou du beurre frais (Oscar et *al.*, 2001).

Il bout sans décomposition. Il est un peu plus léger que l'eau. Il est soluble à la température ordinaire dans un peu moins de quatre fois son poids d'eau; il est miscible à l'alcool et à l'éther. Il est très soluble dans les corps gras (tableau 2) (F.E.M.A., 2006).

Tableau 2 : Propriétés physiques du diacétyl.

Propriétés	Valeurs
Masse molaire (g / mol)	86,09
Point de fusion (°C)	-2 à -4 sous 1 bar
Point d'ébullition (°C)	88 sous 1 bar
Densité (g / cm ³)	0,990 à 15 °C
Solubilité	Eau : 1:4

Source : F.E.M.A., (2006).

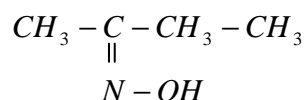
Il s'oxyde facilement, notamment sous l'influence de l'eau oxygénée, pour donner de l'acide acétique.

I.2.2 Procédés de fabrication de diacétyle

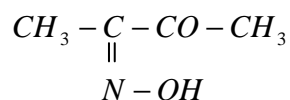
I.2.2.1 Par voie chimique

Le diacétyle est obtenu à partir de l'homologue supérieur de l'acétone qui est la méthylacétone ou méthyléthylcétone de formule $CH_3 - CO - CH_2 - CH_3$ (Oscar et *al.*, 2001).

Cette dernière subit une nitrosation à l'aide du nitrite d'amyle pour bloquer d'abord le CO déjà existant, il se forme de ce fait un composé qui est la nitrosométhyléthylcétone (où le groupement cétonique est bloqué) de formule :



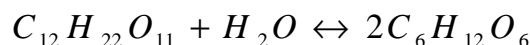
La transformation du CH_2 en CO débute par action de la soude sur la nitrosométhyléthylcétone, il se forme de l'isonitrosométhyléthylcétone ou monoxime du diacétyle (le CH_2 se trouve remplacé par un CO) de formule :



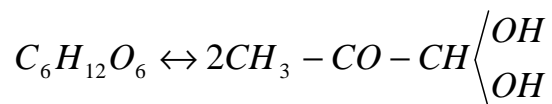
Enfin, par ébullition avec l'acide sulfurique étendu, la monoxime libère le diacétyle par régénération du premier CO : $CH_3 - CO - CO - CH_3$ (Oscar et *al.*, 2001).

I.2.2.2 Par voie biologique

Selon Pack et *al.* (1968), la synthèse de diacétyle par voie biologique débute par la transformation du lactose en deux molécules d'hexose sous l'influence de la lactase:



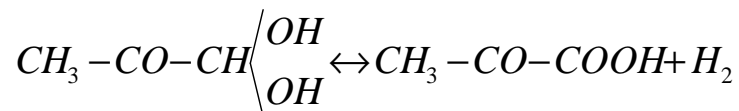
Puis, chaque molécule d'hexose est rompue en deux tronçons avec formation de méthylglyoxal sous sa forme hydratée :



La formation d'acide lactique se produit alors aisément par oxydoréduction intramoléculaire à partir du méthylglyoxal (Cachon et *al.*, 2002) :

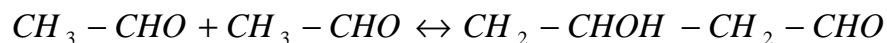


Cette réaction a pu, du reste, être obtenue dès 1913, in Vitro, par voie diastasique et constitue une véritable stabilisation du méthylglyoxal. Cette spécificité lactique réside dans le fait que les ferments lactiques, après avoir réalisé la formation du méthylglyoxal, sont incapables de désintégrer ce terme de passage autrement que par sa stabilisation à l'état d'acide lactique (Speckman et Collins, 1968). Cette incapacité caractérise les ferments lactiques purs. Mais à côté de ceux-ci, il en est d'autres qui sont capables d'agir sur le méthylglyoxal et qui par oxydation donnent naissance à de l'acide pyruvique:

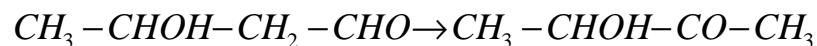


lequel peut être extrait, dans des conditions particulières, des produits de la fermentation des sucres.

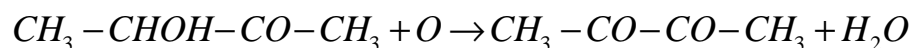
Celui-ci perd facilement CO_2 pour donner naissance à l'éthanal $CH_3 - CHO$, qui peut se transformer, soit en alcool, soit en acide acétique ou en aldol. Cette dernière réaction, ou aldolisation, est particulièrement intéressante (Cachon et *al.*, 2002):



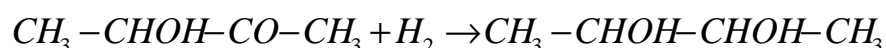
Selon Tapernoux (1932), par simple isomérisation, l'aldol se transforme en acétoïne appelé autrement acétylméthylcarbinol :



et ce dernier oxydé donne naissance au diacétyle :



alors que par réduction, il donne au contraire le butylène-glycol :



I.2.3 Extraction et purification du diacétyl

De nombreuses techniques d'extraction reposent sur la volatilité des composés d'arôme. L'odeur et l'arôme résultent d'un subtil équilibre entre les divers composés volatils et les autres constituants d'une matrice (Chavanne et *al.*, 1985).

L'extraction de ce composé comporte deux difficultés principales qui correspondent d'une part à la nécessité d'extraire intégralement tout le diacétyl, d'autre part à la nécessité de ne pas le perdre pendant cette extraction (Lee et Drucker, 1975).

L'extraction du diacétyl par la vapeur d'eau n'est pas à proprement parler un « entraînement », ce terme devant être réservé à l'extraction de substances à point d'ébullition élevé ou non miscibles à l'eau. Dans ce cas, la substance est plus volatile que l'eau (point d'ébullition du diacétyl : 88°) et soluble dans l'eau. Il s'agit de réaliser une *distillation fractionnée* exactement comme dans le cas de solutions d'alcool dans l'eau (Chavanne et *al.*, 1985).

La véritable solution de la rectification est fournie par des appareils du type « colonnes à plateaux ». Une condensation partielle de la vapeur se fait dans ces derniers; une grande partie de cette vapeur se rend directement au réfrigérant et son enrichissement en substance volatile est faible (Lee et Drucker, 1975).

Dans les colonnes du type « à plateaux », le trajet des vapeurs est ménagé par un barbotage dans de l'eau condensée chaude. Toute la vapeur doit entrer en contact avec ce liquide. Il en résulte d'une part une « condensation provoquée » plus importante et, d'autre part, un retard au départ de la substance volatile qui, au lieu de rester très diluée dans la vapeur, se concentre dans l'eau condensée. Le liquide ainsi formé s'enrichit sans cesse et cède au réfrigérant une vapeur riche qui fournit un distillat à haut titre (Chavanne et *al.*, 1985).

I.2.4 Différentes utilisations du diacétyl

I.2.4.1 L'emploi du diacétyl comme améliorant de la qualité organoleptique

Les bactéries lactiques contribuent à développer les qualités organoleptiques par la formation d'acide lactique, d'acétoïne, d'acétaldéhyde, diacétyl, de peptides et d'acides aminés, qui sont des précurseurs d'arômes, lesquels se développent lors des étapes ultérieures des procédés de fabrication des produits fermentés (Gasson et *al.*, 1996).

Le diacétyl (2,3-butanedione) est un important aromate, de nature oxydative, il joue un rôle prédominant dans la saveur des produits laitiers et fromages frais notamment de type cheddar (Bassit et *al.*, 1994).

L'addition de faibles doses de diacétyl donne à la margarine une odeur agréable, sans aucun inconvénient pour la santé du consommateur (Rondags et *al.*, 1998).

I.2.4.2 L'emploi du diacétyl comme conservateur

La bio-préservation utilise des microorganismes antagonistes ainsi que leurs métabolites pour inhiber ou détruire les microorganismes indésirables dans les aliments (Rodgers, 2001). Les aliments fermentés sont un bon exemple de produits faisant appel à la bio-préservation.

En effet, le diacétyl est une substance antimicrobienne dont les propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens (Yang, 2000).

Chapitre II : *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis est un micro-organisme d'intérêt, très important dans l'industrie agro-alimentaire, et également organisme modèle des bactéries lactiques (Liu et al., 2005).

II.1 Aperçu historique de la taxonomie de *Lactococcus lactis* ssp

Le genre *Lactococcus* correspond au groupe des streptocoques lactiques de Sherman (1937) dont la principale espèce est *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis* ssp) (Hylckama et al., 2006). *Lc. lactis* ssp est surtout connue pour son rôle dans la fermentation des produits laitiers, ce qui a influencé l'histoire de sa taxonomie (figure 4).

La taxonomie de *Lc. lactis* sp est représentée dans une perspective historique à partir de la description de la bactérie *lactis* par Lister en 1878. Au cours du siècle suivant la bactérie *lactis* a été reclassée comme *Streptococcus lactis* et *Lactobacillus xylosus*. En 1985, un reclassement a été publié par Schleifer et al., qui a introduit l'espèce *Lactococcus lactis* en une combinaison de souches plus tôt défini comme *Streptocoques* et *Lactobacillus*. Dans *Lc. lactis* sp, la sous-espèce *lactis* est une discrimination de *cremoris* par phénotype grâce à sa capacité de produire de l'ammoniac et de l'arginine, sa tolérance à des températures et les concentrations de NaCl élevées et la fermentation du maltose. La souche *L. lactis* ssp *lactis* biovar. *diacetylactis* est reconnue par sa capacité à fermenter le citrate (Delgado et Mayo, 2004).

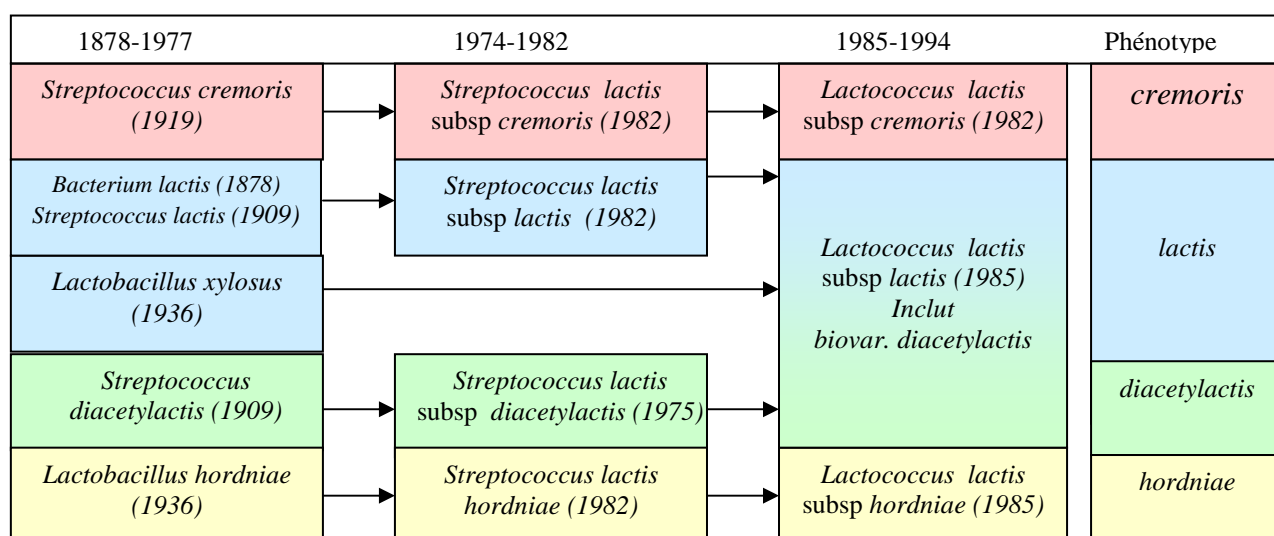


Figure 4 : Aperçu historique de la taxonomie de *L. lactis* (Hylckama et al., 2006).

II.2 Caractéristiques générales

II.2.1 Caractères microscopiques

Par définition, le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées ou non par paires ou en chaînettes de longueur variable. Les bactéries du genre *Lactococcus* sont de taille variant de 0,5 à 1,5 nm, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés (Novel, 1993).

II.2.2 Caractères macroscopiques, biochimiques et de culture

Selon l'espèce, le genre *Lactococcus* possède une température optimale de croissance variant de 21 °C à 30 °C, et un pH optimal de 5,6-6,5. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C. La thermo-résistance de ces bactéries est faible alors que leur mobilité est perdue après 30 minutes d'exposition à 63 °C (Novel, 1993).

Ce sont des bactéries nutritionnellement exigeantes (Guiraud, 1998); elles sont auxotrophes pour un certain nombre d'acides aminés et certaines vitamines et requièrent des nucléotides et une source exogène d'hydrates de carbone pour assurer leur croissance (Dellagio *et al.*, 1994).

de Roissart (1986) considère qu'ils requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments qui jouent le rôle de co-enzymes (tableau 3). Elles se caractérisent par l'absence de catalase et l'utilisation de la voie fermentaire pour la dégradation de glucides sans production de gaz. Elles présentent un métabolisme homolactique, aucune activité β -hémolytique. Elles sont caractérisées par ailleurs par leur non pathogénicité ainsi que par la présence de l'antigène de groupe N (Novel, 1993).

Le genre *Lactococcus* inclut différentes espèces, *garviae*, *lactis*, *piscium*, *plantarum* et *raffinolactis*. L'espèce *lactis* regroupe elle-même trois sous-espèces, *cremoris*, *hordniae* et *lactis* qui elle-même comprend le biovar *diacetylactis*, capable de surproduire le diacétyl. Les différentes sous-espèces de *Lactococcus lactis* peuvent être différenciées entre autre par leur

résistance aux stress. Ainsi, la sous-espèce *lactis* est plus robuste que la *cremoris* puisqu'elle est capable de croître à 40°C, ou en présence de 4 % de NaCl (tableau 4) (Gagnon, 2006).

De plus, la sous-espèce *lactis* est capable de produire de l'ammoniac à partir d'arginine grâce à la voie de l'arginine déiminase (ADI) qui est très rare chez *cremoris*. Les bactéries du genre *lactis* sont les bactéries lactiques les plus importantes d'un point de vue commercial.

Les habitats les plus importants du genre *Lactococcus* demeurent le lait ou les végétaux qui sont probablement leur réservoir naturel, les laits fermentés ainsi que les fromages où ils constituent la flore dominante. Cependant, il peut être également isolé des plantes (Sandine., 1985) ainsi que de la peau de certains animaux, et il semble que la contamination qui a lieu au cours de la traite ait pour origine principale le fourrage.

Tableau 3 : Exigences de croissance de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et ssp *cremoris* (Barrette, 1998).

Métabolites	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Acides aminés :		
Lysine	-	-
Leucine	+	+
Histidine	+	+
Valine	+	+
Cystéine	S	+
Acide aspartique	-	-
Acide glutamique	+	+
Isoleucine	+	+
Tyrosine	-	±
Méthionine	+	+
Thréonine	-	-
Sérine	-	-
Proline	-	±
Glycine	-	±
Alanine	-	±
Phénylalanine	±	+
Tryptophane	-	±
Arginine	±	±
Vitamines :		
Vit B12	+	+
Biotine	+	+
Niacine	+	+
Pantothécate	+	+
Riboflavine	+	+
Thiamine	+	+
Pyridaxol	+	+
Acide folique	+	+
Acides nucléiques :		
Hypoxanthine	S	-
Adénine	S	S
Guanine	S	-
Thymine	S	-
Thymidine	S	-
Uracil	S	-

(+) : essentiel à la croissance ; (-) : non requis pour la croissance ; (Nd) : Non déterminé ; (S) : Stimulant

Tableau 4: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactococques (Champagne et al., 1994).

	Croissance à						Cultures en lait de SHERMAN
	10.°C	40.°C	45.°C	pH 9.2	pH 9.6	+ NaCl 6.5 %	
				+ NaCl 2 %	+ NaCl 4 %		
* <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	+	.	+	.	.	+
- <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bivar. <i>diacetylactis</i>	+	+	.	+	.	.	+
* <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> * <i>L. raffinolactis</i>	+	+
	+	.	.	?	?	.	+
Fermentation							
+ Bile 40 %	Hydrolyse L-arginine	Culture Sur lait toumesolé	Glucose	Lactose	Galactose	Saccharose	Maltose
* <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	ARC	+	+	+	V	+
- <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bivar. <i>diacetylactis</i>	+	ARC	+	+	+	V	+
* <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> * <i>L. raffinolactis</i>	.	ARC	+	+	+	.	.
	.	ARC	+	+	+	.	+

+): réaction positive ; (-): réaction négative ; (?): inconnu ; (V): entre 10 et 90 % des souches ; (A): Acidification ; (R): Réduction ; (C) : Coagulation

II.3 Métabolisme de *Lactococcus lactis* ssp

Lactococcus lactis est l'une des bactéries lactiques les plus étudiées. Son importance cruciale dans les procédés de fermentations alimentaires, ainsi que la disponibilité de ses séquences génomique et plasmidique fait de ce micro-organisme un modèle pour l'étude du métabolisme des bactéries lactiques ainsi que de leur comportement face à différents stress (Grattepanche, 2005)

II.3.1 Métabolisme carboné chez *Lactococcus lactis* ssp

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait, disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5 % (Gagnon, 2006).

L. lactis est une bactérie mésophile et homofermentaire. Son utilisation dans l'industrie alimentaire et plus particulièrement dans la fabrication du fromage la confronte à différentes sources de carbone. Les voies cataboliques du lactose et du citrate sont les plus impliquées car ils sont respectivement la source de carbone principale du lait, et également présent en milieu laitier (Christensen et al., 1999).

Chez les lactocoques, le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoenol pyruvate dépendant (système PEP-PTS). Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée. Suite à leur transport dans la cellule, les composés glucidiques libres ou modifiés sont catabolisés selon 3 voies: la voie glycolytique principale de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du D-tagatose-6-phosphate ou la voie de Leloir (Desmazeaud, 1983).

Les lactocoques utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse et convertissent le pyruvate en acide lactique. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétro inhibition. Le co-métabolisme du citrate peut être observé chez certaines espèces lors de la fermentation des sucres (Christensen et al., 1999).

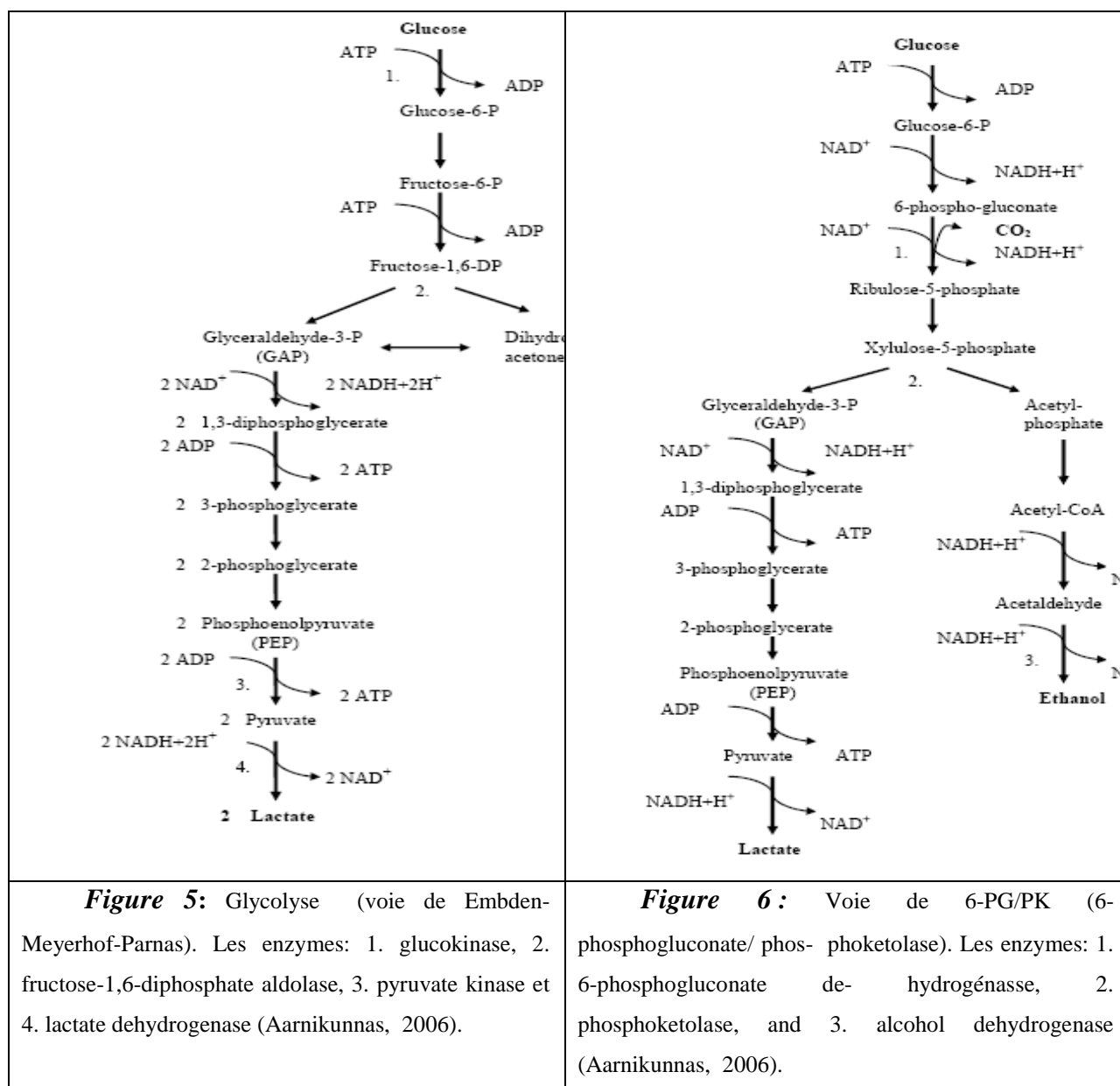
II.3.1.1 Métabolisme du glucose

Une fois transporté à l'intérieur de la cellule, le glucose rejoint la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate (G6P), soit directement s'il entre grâce au PTS, soit après phosphorylation par la glucokinase (GLK), s'il a emprunté une perméase. Le sucre ainsi phosphorylé suit la glycolyse jusqu'au phosphoénolpyruvate (PEP) lui-même transformé en pyruvate par le biais de la pyruvate kinase (PK) ou du système PTS (Hugenholtz, 1993).

II.3.1.2 Métabolisme du lactose

Le lactose-6-phosphate intracellulaire issu du transport du lactose par le système PTS_{lac} est clivé en galactose-6-phosphate et glucose par la phospho- β -galactosidase. Le glucose, après phosphorylation par le PTS_{man} ou la GLK, emprunte la glycolyse tandis que le galactose-6-phosphate suit la voie du Tagatose qui elle-même rejoint la glycolyse au niveau des trioses-phosphate (Figure 5) (Dellaglio et al., 1994).

Les souches de *Lc. lactis* qui fermentent lentement le lactose produisent généralement de nombreux produits finaux: acétate, formiate, éthanol et lactate. Il a été montré que la souche NCDO2054, qui métabolise très lentement ce sucre le transporte via un système perméase. Le lactose est ensuite clivé en glucose et en galactose par la β -galactosidase, le glucose emprunte la glycolyse, tandis que le galactose est dirigé vers la voie de Leloir qui rejoint la glycolyse au niveau du G6P (Figure 6) (Christensen et al., 1999).



II.3.2 Métabolisme du citrate

Malgré sa concentration relativement faible dans le lait (~ 8-9 mM), le citrate est un constituant clef pour la formation du diacétyl, un composé volatil à l'arôme de beurre important dans les laits fermentés et les fromages frais. Environ 90% du citrate du lait est soluble et majoritairement perdu dans le lactosérum. Toutefois, la concentration de citrate dans la phase aqueuse du fromage serait environ 3 fois celle du lactosérum, reflétant les concentrations de citrate colloïdal (Aarnikunnas, 2006).

De nombreux auteurs ont montré la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique de différents milieux par des espèces appartenant notamment au genre *Lactococcus*. Kempler et Mc Kay (1979) ont montré que la capacité de transport du citrate est liée à la présence d'un plasmide de 7,9 Kb chez toutes les souches analysées fermentant le citrate, qui appartiennent donc au biovar *diacetylactis* (Boumerdassi et al., 1997). Le métabolisme du citrate est, chez *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc*, une voie secondaire de production (Marty-Teyssset *et al.*, 1996).

Une fois dans la cellule, le citrate est scindé en acétate et oxaloacétate par la citrate lyase. L'oxaloacétate va ensuite être décarboxylé en pyruvate par l'oxaloacétate synthase (Figure 7). Les deux enzymes impliquées dans cette voie métabolique sont codées par des gènes chromosomiques, et leur activité bien que constitutive chez les souches appartenant au biovar *diacetylactis*, augmente en condition de stress acide (Hugenholtz *et al.*, 2000).

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car, dans ces bactéries, le co-métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyle, d'acétoïne et de CO₂ participant aux qualités aromatiques et texturales des produits.

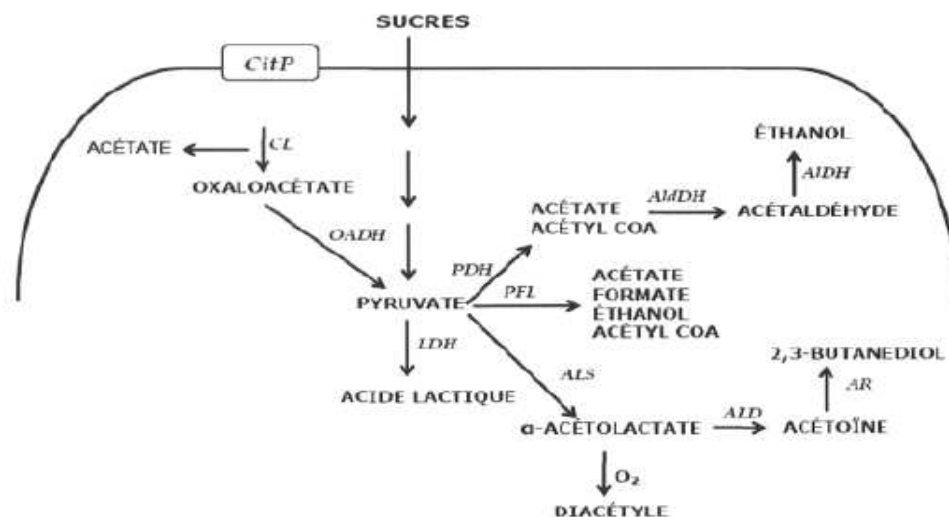


Figure 7: Métabolisme du citrate chez *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Description des enzymes ou étapes : CitP, citrate perméase; CL, Citrate lyase; OADH, oxaloacétate déshydrogénase; LDH, lactate déshydrogénase; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFL, pyruvate formate lyase; ALS, α -acétolactate synthase; ALD, α -acétolactate décarboxylase; AIDH, alcool déshydrogénase; AldDH, aldéhyde déshydrogénase; DR, diacétyle réductase; AR, acétoïne réductase; O₂, décarboxylation oxydative du diacétyle (réaction non enzymatique) (Swindell *et al.*, 1996).

II.3.3 Métabolisme azoté chez *Lactococcus lactis* ssp

Les besoins nutritionnels varient beaucoup d'un groupe bactérien à l'autre. Les bactéries lactiques sont hétérotrophes et nécessitent donc pour leur croissance l'apport de certaines substances organiques exogènes (Doleyres, 2003). Elles se caractérisent par des besoins nutritionnels particulièrement complexes car en plus d'un sucre fermentescible, elles nécessitent la présence de plusieurs acides aminés essentiels qu'elles ne peuvent synthétiser à partir d'une source azotée plus simple.

Les *lactococci* ont généralement besoin d'un apport d'acide glutamique, d'histidine, d'isoleucine, de leucine, de méthionine et de valine pour se développer, et plus rarement d'arginine, de thréonine et de tryptophane (Monnet et Gripon, 1994; Cocaign-Bousquet et al., 1995). Dans le lait, les concentrations de certains acides aminés essentiels comme l'isoleucine, la leucine et la méthionine sont très faibles (moins de 1mg.L^{-1}) ce qui en fait des acides aminés potentiellement limitant pour la croissance.

II.3.3.1 Protéolyse et croissance sur lait

Dans le lait, la croissance des *lactococci* est fortement dépendante de l'hydrolyse des caséines qui constituent la principale source d'azote (Juillard et al., 1995).

Chez *Lactococcus lactis* comme chez *Streptococcus thermophilus* la croissance en lait est diauxique, elle est scindée en deux phases exponentielles successives séparées par une phase au cours de laquelle la synthèse des protéases de paroi est réalisée (Juillard et al., 1995). Au cours de la première phase les bactéries consomment les acides aminés et peptides libres du milieu, tandis qu'au cours de la seconde elles utilisent les caséines comme source d'acides aminés. Chez les deux espèces bactériennes, c'est la capacité à utiliser les caséines pour la croissance qui va limiter le taux de croissance des bactéries.

II.3.3.2 Catabolisme des peptides

L'utilisation de peptides, initialement présents dans le lait ou dérivés de l'hydrolyse des caséines, est indispensable à la croissance des lactocoques dans le lait. Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Ayad et al., 1999).

Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (Dellaglio et *al.*, 1994).

Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (Lynch et *al.*, 1997).

Les acides aminés libres contribuent directement ou comme composés précurseurs d'arômes. Le facteur limitant la production de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés, caractéristique variable selon les souches. Les voies cataboliques responsables de cette conversion sont principalement les voies initiées par les réactions d'élimination et de transamination impliquant une quantité variable d'enzymes : lyases, décarboxylases, désaminases et transaminases (Yvon et Rijnen, 2001).

II.3.3.3 Catabolisme des acides aminés

Pour les lactocoques le transport des acides aminés est considérablement augmenté en présence de glucose ou de lactose et stoppé par les inhibiteurs de la glycolyse ou les enzymes hydrolysant l'ATP (Desmazeaud , 1994).

Les acides aminés à chaîne ramifiée, la leucine, l'isoleucine et la valine, sont tous trois essentiels à *Lactococcus lactis*.

Il semble que la lysine puisse également être utilisée pour l'accumulation d'arginine. La proline est un acide aminé essentiel pour certaines souches de lactocoques. Cependant ni pour ces souches ni pour celles qui sont autotrophes pour cet acide aminé, il n'a pu être détecté de système de transport spécifique de la proline. La proline est également un soluté impliqué dans la résistance contre le stress osmotique et des transporteurs spécifiques osmorégulés ont été mis en évidence chez *Lactococcus lactis*.

L'activité lipolytique des bactéries lactiques dans le lait serait faible mais pourrait contribuer à la flaveur des fromages affinés. Cependant ces bactéries hydrolyseraient plus facilement les mono et diglycérides que les triglycérides du lait (Desmazeaud, 1983).

Chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et son biovar. *diacetylactis*, l'activité lipolytique et l'activité estearique serait à la fois cytoplasmique et membranaires. Ces activités augmentent, mais faiblement en milieu lait et en phase exponentielle de croissance (Sanders et al., 1999).

II.3.4 Le métabolisme des minéraux chez *Lactococcus lactis* ssp

Les exigences nutritionnelles des ces bactéries en minéraux sont mal connues. Ledesma et al. (1977) soulignent la nécessité du Mn^{+2} et/ou Fe^{+2} pour un bon milieu de croissance. La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (Novel, 1993).

Le magnésium est indispensable pour de nombreuses enzymes nécessaires à la croissance cellulaire ou à la production d'arômes. Il serait important pour la survie des *Lactococcus lactis* (Thomas et al., 1979).

Le calcium est souvent cité pour son rôle dans la paroi cellulaire en particulier pour l'activité des protéases de paroi. Cette propriété est attribuée par les auteurs soit à la fixation de l'enzyme sur la paroi, soit à la stabilisation de son activité, soit à la modification de la structure de la paroi (Novel, 1993)

Le potassium est nécessaire pour la régulation du pH intracellulaire. Il est accumulé par *Lactococcus lactis* et cette accumulation est enregistrée par la présence de glucose ou d'arginine (Kashke et al., 1973).

Le cuivre augmente la production de diacétyle (Kaneko et al, 1987).

II.4 Génétique des lactocoques

Au cours de ces dernières années, ce sont surtout les nombreux plasmides des lactocoques qui ont retenu l'attention des généticiens. Les lactocoques possèdent un nombre important de plasmides qui codent pour plusieurs caractéristiques fonctionnelles importantes pour la qualité des levains aromatiques : fermentation du lactose, production de protéases, l'utilisation du citrate et la résistance bactériophagique (Gagnon, 2006).

Un recensement de connaissances génétiques chez les lactocoques montre que seulement 6 % des informations ont été décryptées. Ces données concernent des gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés et de bases (33 %), dans la dégradation des peptides (17 %), dans le catabolisme du carbone (16 %), dans la réponse à des stress (13 %), et le reste dans les fonctions cellulaires de base (ribosomes, réplication, sécrétion ...). Les potentialités réelles de ces bactéries restent donc à être estimées et exploitées (Renault, 1990).

Les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et subsp. *cremoris* portent au moins deux (2) plasmides ; généralement, chaque souche possède de 4 à 7 vers 11 à 14 plasmides (Davies et Gasson, 1984 ; Ramos et al., 1983) rares souches de *Lactococcus lactis* en portent qu'un seul plasmide (Ramos et al., 1983).

Les cinétiques de réassociation ADN-ADN ont permis d'estimer la taille du chromosome des lactocoques entre 2,5 et 2,9 Mb (Jarvis et Jarvis, 1981), par contre l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) a estimé la taille de différentes souches de *Lactococcus lactis* qui se situe entre 2,3 et 2,6 Mb en se basant sur l'évaluation de la taille des fragments de restriction chromosomiques (Bourgeois et al., 1989). La composition globale en bases de ce chromosome était aussi connue, avec un pourcentage en G+C situé autour de 34-38 % (Sandine, 1985).

II.5 Les bactériophages lactiques

Les bactériophages (ou phages) sont des virus qui s'attaquent aux bactéries avec une certaine spécificité et provoquent leur lyse, c'est-à-dire leur destruction. Selon la part jouée dans la fermentation lactique par la souche bactérienne attaquée, il en résulte un défaut d'acidification plus ou moins important. L'action inhibitrice des phages est d'autant plus perçue que de grandes quantités de lait sont mise en oeuvre, que les fabrications sont mécanisées et qu'une cinétique précise et intense d'acidification est recherchée. Les perturbations provoquées par les phages ont des causes complexes et des conséquences économiques importantes (de Roissart, 1986).

Chapitre III : Production biotechnologique de l'acide lactique et du diacétyl

Les biotechnologies regroupent l'ensemble des techniques permettant le contrôle des bioconversions (transformation des molécules organiques en d'autres substances par des micro-organismes). Elles sont fondées sur une meilleure connaissance des phénomènes biologiques naturels comme les *fermentations* (Sergent, 1998).

Ainsi, tout procédé biotechnologique passe par la mise en contact d'un substrat plus ou moins complexe avec le matériel biologique, pendant un temps donné, dans une cuve de taille et de forme appropriées, appelé un *bioréacteur* (Coutouly, 2001).

III.1 Principes généraux de la croissance microbienne

III.1.1 Notions générales sur la physiologie des microorganismes

III.1.1.1 les besoins nutritifs des micro-organismes

Certains éléments sont nécessaires à la croissance des micro-organismes :

- Le carbone qui peut être d'origine organique.
- L'azote peut être variée. Une bactérie est constituée en moyenne de 12 % d'azote.
- Le phosphate et le soufre nécessaires aux bactéries pour synthétiser respectivement les acides nucléiques et les acides aminés soufrés sont principalement d'origine inorganique.
- Les facteurs de croissance (des composés organiques que les bactéries ne sont pas capables de synthétiser mais qui sont indispensables pour certaines souches bactériennes) : les acides aminés, les bases et les vitamines (Savoie et *al.*, 2001).

III.1.1.2 La croissance bactérienne

III.1.1.2.1 Définition

Au sens biologique du terme, la croissance d'une cellule vivante est un accroissement ordonné de tous ses constituants (de Roissart, 1986). Ainsi la bactérie se multiplie par fusion binaire, la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres

constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire. Cette division donnant ainsi naissance à deux bactéries filles héritières de la même structure et de la même activité que la bactérie mère. Ce cycle se produit de génération pour former une lignée de cellules identiques, sauf en cas de mutation (de Roissart, 1986).

III.1.1.2.2 Facteurs influençant la croissance bactérienne

L'effet de la concentration en substrat est plus complexe. Si l'on cultive une bactérie dans un milieu synthétique contenant en excès tous les éléments nutritifs indisponibles sauf un, la croissance ne peut avoir lieu. Lorsqu'on lui fournit progressivement l'élément nutritif manquant, le taux de croissance demeure inférieur au taux de croissance maximale (μ_{\max}) tant que la concentration n'est pas suffisante et augmente avec elle (Leveau et Bouix, 1993).

Additionnelement aux facteurs nutritionnels, Certains facteurs physiques sont nécessaires à la croissance des micro-organismes tels que la température, le pH, potentiel d'oxydo-réduction, la pression osmotique, etc (Cachon et *al.*, 2002) .

III.1.1.2.3 Cinétiques de la croissance bactérienne

Il existe plusieurs méthodes expérimentales permettant de mesurer l'évolution des populations de micro-organismes (détermination du taux de croissance maximum μ_{\max}). Ces différentes techniques reposent sur deux grands types de mesures :

➤ Les mesures directes du nombre de micro-organismes : Elles sont fondées sur les dénombrements sur boîtes de Petri ou la cytométrie en flux ou sur filtre (par analyse d'image) .

➤ Les mesures indirectes du nombre de micro-organismes : Elles consistent à évaluer les variations de la densité bactérienne par le dosage de certains composés dont la synthèse est due au métabolisme bactérien (ATPmétrie, dosage du glucose, du CO₂, etc.), ou par la mesure des variations d'une grandeur physique du milieu comme la densité optique (turbidimétrie) ou la mesure de la conductance ou de la capacitance (l'impédancemétrie) (Dalgaard, 1994).

Le schéma classique de la *croissance d'une population bactérienne* en milieu non renouvelé a été établi par Buchanan (1918) (Figure 8). Il décompose la cinétique de croissance en sept phases distinctes :

1- **la phase de latence**, qui correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler (phase d'adaptation au nouvel environnement), et qui suit immédiatement l'ensemencement du milieu par l'inoculum bactérien. (de Roissart, 1986). Ainsi, elle correspond essentiellement à la synthèse des enzymes nécessaires pour métaboliser les nutriments. La durée de cette phase dépend de l'espèce bactérienne, des exigences nutritionnelles, de l'âge des bactéries et la composition du milieu (Augustin, 2005).

2- **la phase d'accélération** ou la phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale.

3- **la phase de croissance quasi-exponentielle**, dite aussi phase de croissance maximale : cette phase de croissance est considérée en première approximation comme purement exponentielle. La pente de la droite (lorsque la concentration bactérienne est exprimée en coordonnées semi-logarithmiques) correspond à la vitesse (ou taux) de croissance maximale, μ_{\max} (h^{-1}) :

$$\mu_{\max} = \frac{y_2 - y_1}{t_3 - t_2}$$

4- **la phase de décélération** ou phase de freinage, qui semble intervenir au fur et à mesure que le substrat (sucre, acide aminés) s'épuise ou que des produits toxiques (acide lactique, acide acétique, peroxyde, ...) s'accumulent ou simplement elle est due à l'abaissement du pH (μ diminue) (de Roissart, 1986). Il existe un débit d'autolyse des bactéries.

5- **la phase stationnaire maximale** : durant laquelle la croissance s'arrête ($\mu = 0$) (de Roissart, 1986). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

6- **la phase d'accélération de la décroissance**.

7- **la phase de décroissance exponentielle**, qui apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des cellules bactériennes. Il y a accumulation de métabolites toxiques, il se produit une diminution d'organisme viables (la mort des bactéries et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes).

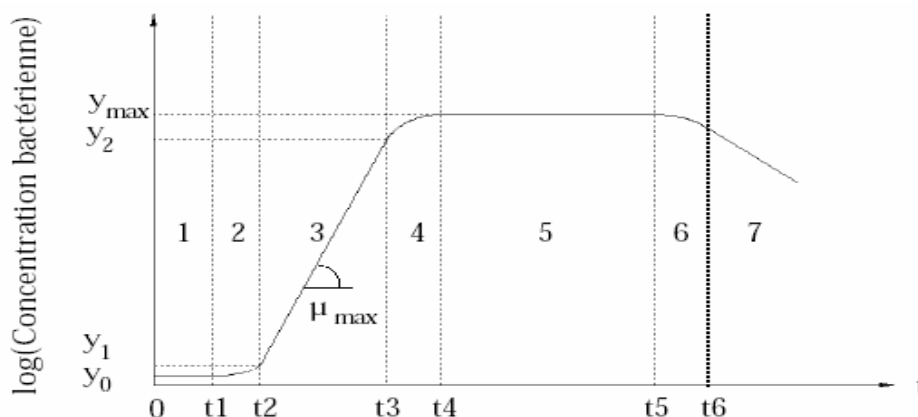


Figure 8 : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide décrites par Buchanan (1918).

La croissance bactérienne étant généralement considérée comme purement exponentielle dans le début de la phase de croissance, elle est théoriquement représentée par une droite, après passage en coordonnées semi-logarithmiques, dans cette partie de la cinétique. Une analyse par régression linéaire a été utilisée pour estimer le taux de croissance maximum et son intervalle de confiance à 95 %.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\max} \times t$$

où X : représente la concentration bactérienne au temps t

X_0 : la concentration bactérienne initiale à t = 0.

L'estimation de μ_{\max} est obtenue par la pente de la droite de régression et son intervalle de confiance à partir de la variance de cette pente.

Monod a montré que le taux de croissance est une fonction de la concentration des substrats obéissant à l'équation de Michaelis-Menten établie pour les réactions enzymatiques (de Roissart, 1986 ; Leveau et Bouix., 1993).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

μ_{\max} : est le taux de croissance maximum.

S : est la concentration limitée du substrat considéré (sucre, acide aminé,...)

K_s : la concentration pour laquelle $\mu = \mu_{\max}/2$ (varie selon la souche et le substrat).

III.1.1.3 Principaux modes de conduite des cultures microbiennes (bioprocédés)

La fermentation peut se faire selon trois modes principaux : en lot (batch), en continu ou en lot réalimenté (fed-batch) avec ou sans re-circulation. Le choix du mode est guidé en partie par le type de produit recherché. La croissance exponentielle d'une culture peut être prolongée par l'addition continue de milieu frais au réacteur et il est possible d'ajuster le taux de dilution à un rythme qui maintient la concentration de produit au maximum (Bertrand, 2001)

III.1.1.3.1 Le bioréacteur

Le bioréacteur ou fermenteur est généralement constitué d'une cuve fermée, étanche à l'air et de préférence isolée thermiquement de l'extérieur dans laquelle différents microorganismes se côtoient pour dégrader chimiquement et biologiquement les déchets et effluents organiques et produire des métabolites (acides organiques, substances volatiles aromatiques, biogaz) (Li et al., 2004).

➤ Types de réacteurs

Les réacteurs peuvent être plus ou moins élaborés dans leur conception et disposer de plus ou moins de matériel annexe. La plupart des réacteurs sont cylindriques ou parallélépipédiques mais ils peuvent aussi être cylindroconiques pour permettre de travailler sur des petits volumes en conférant une meilleure récupération.

La température est régulée soit par le biais d'une double enveloppe à circulation continue, soit par l'ajout d'un thermoplongeur directement dans le système. Les réacteurs disposent généralement de plusieurs entrées pour permettre d'ajouter des accessoires ou pour pouvoir intervenir sur le milieu réactionnel. Par ces entrées peuvent ainsi être introduits dans le système des capteurs de mesure physique (sonde de température, électrode de pH, sonde de pression...), des sondes de distribution (liquide, gaz...), etc (Sodini et al., 1998).

➤ Classement des bioréacteurs

Les bioréacteurs peuvent être classés selon :

- le mode d'alimentation : batch, continu ou semi-continu ;
- le type de substrats : solide, semi-solide ou liquide ;
- le nombre d'étages : mono-, bi- ou poly-étage.

a/ Réacteurs en « batch »

La réaction est conduite de façon discontinue. Ce mode de réaction est préconisé dans le cas de faibles volumes. Le système est clos durant le temps de réaction. Une pointe d'addition peut être ajoutée au système en cas de régulation de pH, mais aucun substrat ou enzyme n'est ajouté au système. Le volume réactionnel est le même et l'agitation peut être conduite de façon homogène tout le temps de la réaction (figure 9) (Sodini et *al.*, 1998).

b/ Réacteurs en « fed batch »

La réaction dans ce cas est conduite différemment. La réaction commence avec un petit volume de substrat. La quantité du matériel biologique présente est en plus forte concentration que lors d'un système en batch et la réaction démarre plus vite. La matrice à transformer est ensuite introduite en continu dans le réacteur. Le volume total est en augmentation constante. Cette technique, beaucoup utilisée dans le cas de fermentation microbienne (figure 9) (Sodini et *al.*, 1998).

c/ Réacteurs continus

Dans ce type de réacteur, la cuve est alimentée et soutirée en continu. Pour réaliser la transformation, l'enceinte de la cuve est différente des deux autres précédemment citées puisque une évacuation sélective est réalisée de façon à ce que uniquement le produit sorte de l'enceinte (figure 9) (Sodini et *al.*, 1998).

Un des problèmes majeur de ce type de procédé est l'encrassement des membranes par les différentes substances colmatantes résultant de l'opération de transformation. En effet, ce type de système nécessite un milieu réactionnel peu colmatant, sinon la mise en place de systèmes de pré-filtration (tamis, filtre...)

Afin d'augmenter l'activité spécifique de la biomasse, la formation d'un biofilm à l'intérieur du réacteur est apparue comme une solution intéressante. Le biofilm constitue un ensemble de microorganismes inclus dans une matrice poreuse de polymères biologiques. Il est fixé ou non à un support.

Parmi les réacteurs à biomasse fixée, Les réacteurs à lit fixe sont des réacteurs les plus utilisés, ils se composent d'un milieu réactionnel rempli d'un solide sur lequel vont se fixer les bactéries. Le garnissage est un support inerte de nature variée (roche, verre, plastique) et de forme diverse (sphères, cubes, grillage, lamelles). Ces réacteurs fonctionnent avec un flux ascendant ou descendant. Les principaux avantages de ce type de procédés sont leur facilité de fabrication et l'absence de mélange mécanique. Ils présentent également une robustesse et une bonne stabilité vis à vis des chocs organiques, ainsi qu'un recouvrement rapide d'activité après une longue période d'arrêt (Rajeshwari et *al.*, 2000).

Cependant, il a été prouvé qu'une grande partie de la biomasse retenue dans le réacteur n'est pas attachée et reste dans les interstices du support. Ceci engendre le colmatage de certaines zones du réacteur et réduit ses performances jusqu'à un dysfonctionnement complet. L'application d'un flux descendant a permis de réduire le problème majeur du colmatage (van den Berg, 1986).

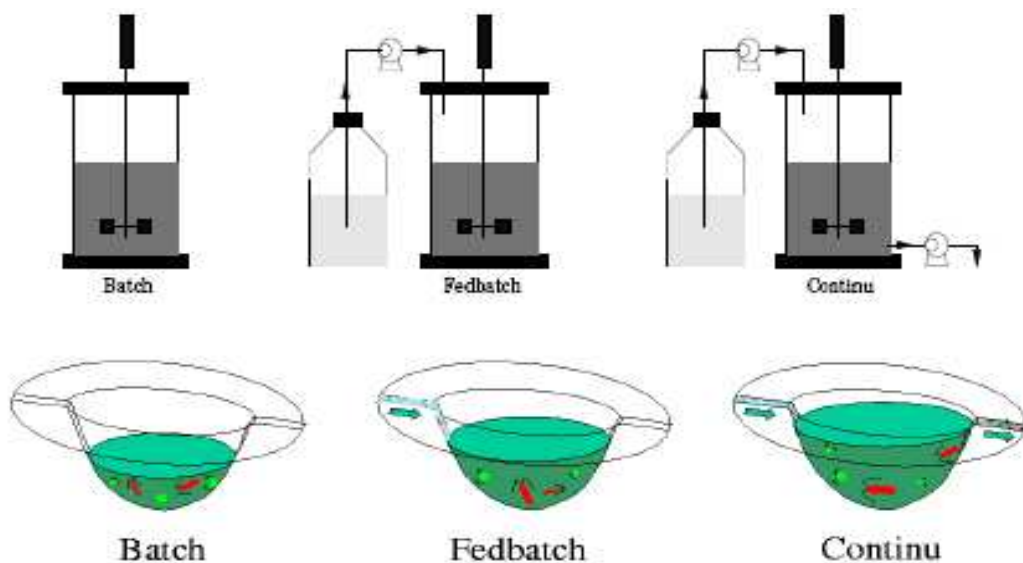


Figure 9 : Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur construit par l'homme ou d'un bioréacteur naturel (lac) (Bernard, 2004).

III.1.2 Biofilm et immobilisation

III.1.2.1 Définitions

Les cellules microbiennes s'attachent fermement à toute surface immergée dans un environnement aqueux. La croissance de cellules immobilisées comprend la multiplication des cellules et la production de polymères exo-cellulaires. Ces derniers s'étendent à partir de la cellule et forment une matrice enchevêtrée de fibres organiques (Tapia et Yee, 2006).

L'assemblage des cellules et des polymères attachés s'appelle le *biofilm*. C'est une surface d'accumulation qui n'est pas nécessairement uniforme dans le temps ou dans l'espace. Sa structure est généralement adsorbante et poreuse. Il en résulte un dépôt constitué de matériaux adsorbés et piégés, tels que des solutés et des particules inorganiques, dans une matrice biotique (Characklis, 1989).

L'*immobilisation* cellulaire consiste à retenir et localiser des cellules microbiennes dans un espace précis du système de fermentation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active (Karel et *al.*, 1985).

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

III.1.2.2 Etapes de formation de biofilm

La dynamique de formation du biofilm présente un comportement décrit par une courbe sigmoïde qui peut se diviser en trois grandes étapes (Trulear et Characklis, 1982) :

- Une phase de latence appelée également lag-phase
- Une phase de croissance caractérisée par la production de biofilm
- Une phase de stabilisation ou "d'équilibre"

Le processus de formation du biofilm est identique quelle que soit la nature de l'effluent traité (Gorris et *al.*, 1988). Par contre, la durée de chaque étape de formation du biofilm dépend du type de matériel utilisé comme support (Apilanez et *al.*, 1998) et des conditions opératoires.

1. La phase de latence

Cette période correspond au temps nécessaire pour la formation de la première couche de cellules fixées. C'est la succession de deux étapes :

- Conditionnement organique de la surface du solide.
- Adhésion des cellules sur le support (Singh et *al.*, 2006).

2. La croissance du biofilm

Une fois fixées, les cellules se développent en microcolonies et colonisent rapidement la surface du support en produisant des polymères responsables du maintien de l'intégrité structurale du biofilm (Apilanez et *al.*, 1998), particulièrement importants dans les liaisons inter-cellules (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992). L'adhésion de nouvelles bactéries et des particules du liquide dans la matrice du biofilm peuvent contribuer au développement du biofilm.

3. La phase d'équilibre

La couverture biologique sur un support est intégrale dans le cas des supports poreux ou rugueux et reste partielle, limitée aux anfractuosités, pour des supports relativement lisses (Fox et *al.*, 1990). Le biofilm atteint son épaisseur maximum avec une stabilisation de la biomasse fixée lorsque la production de biomasse est compensée par le détachement du biofilm à la surface du fluide (van Loodsrecht, 1996). Cette couche biologique est donc un système dynamique en équilibre entre la production des nouvelles cellules, liée à la croissance, et le détachement (Heijnen et *al.*, 1989).

4. Le détachement

Le détachement est le résultat de plusieurs phénomènes (van Loodsrecht et Heijnen, 1996; Nicoletta et *al.*, 2000) :

- La consommation et la lyse par d'autres microorganismes.
- L'érosion, la perte permanente de biofilm due aux conditions hydrodynamiques du fluide.
- L'abrasion, la perte de biomasse attachée lors des collisions entre les particules.
- La desquamation, la perte rapide, massive et stochastique de biofilm. Elle a lieu surtout avec des biofilms épais lors de changements environnementaux brutaux comme une forte diminution de la charge par exemple, où la mort cellulaire dans les parties internes conduisent à une rupture de la liaison solide-biofilm (Horn et Morgenroth, 2006)

III.1.2.3 Techniques d'immobilisation

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

III.1.2.3.1 Immobilisation dans des réacteurs à membrane

La technologie des réacteurs à membrane consiste à coupler un fermenteur à une unité d'ultrafiltration ou de microfiltration. Les cellules ne sont alors pas immobilisées dans une matrice mais retenues dans le système de fermentation permettant la diffusion de composés solubles de petite taille, selon la porosité de la membrane choisie. Le renouvellement continu du milieu de culture fermenté par addition de milieu frais dans le système permet de diminuer l'inhibition par les produits du métabolisme bactérien. Des densités cellulaires 10 fois plus élevées qu'en fermentation batch classique peuvent alors être obtenues (Prigent et *al.*, 1988)

III.1.2.3.2 Adsorption à un support préformé

L'immobilisation cellulaire par adsorption à une matrice préformée ou support solide est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces. Cette technique imite l'environnement naturel des bactéries presque toujours associées à des surfaces et se développant en biofilms (Dunne, 2002). L'adsorption est obtenue par la mise en contact du support et des cellules actives pendant une période définie dans le bioréacteur. Un choix judicieux de support inerte ne nécessitant pas d'agent chimique pour l'adsorption permet une immobilisation dans des conditions douces résultant en une viabilité élevée des cellules immobilisées (Groboillot et *al.*, 1994).

III.1.2.3.3 Immobilisation dans des matrices poreuses

Le procédé d'immobilisation cellulaire le plus répandu consiste à inclure une culture bactérienne dans une matrice poreuse par la gélification d'une solution de polymère (κ -carraghénane, gomme de gellan, agarose, gélatine, alginate, chitosane). Ces polymères sont facilement disponibles et largement acceptés comme additifs alimentaires dans l'industrie. Comme les matrices d'immobilisation résultent en des limitations de transfert de masse, les billes de gel sont en général préférées aux films grâce à leur géométrie sphérique augmentant la surface (Groboillot et *al.*, 1994).

III.2 Production microbienne

La biotechnologie utilise les systèmes biologiques pour produire des produits chimiques utiles à travers la biocatalyse (utilisation d'enzymes) et la biosynthèse à partir de ressources renouvelables (Coutouly, 2001).

Les micro-organismes sont employés pour produire une grande variété de composés. Ces composés peuvent être subdivisés en deux groupes, ceux dont la production est associée à la croissance (métabolites primaires) et ceux dont la synthèse se produit après la croissance cellulaire (les métabolites secondaires).

Les métabolites primaires peuvent être encore subdivisés en vitamines et en acides aminés, qui normalement sont produits dans les quantités suffisantes pour la croissance cellulaire, et ceux tels que l'éthanol et l'acide lactique, qui sont produits en plus grande quantité parce qu'ils sont les produits métaboliques retrouvés au final (Coutouly, 2001).

Le diacétyl est un des produits traditionnels de l'industrie de fermentation du beurre et produits fermentés et est un composé non désiré car il est éliminé par un traitement d'autant plus coûteux que la concentration en fin de fermentation est élevée (Novel, 1993).

La production fermentaire de ces produits métaboliques finaux est exploitée commercialement quand les approches chimiques conventionnelles ne sont pas faisables ou trop coûteuses (Sergent, 1998).

III.2.1 Les lactocoques, l'acide lactique et le diacétyle

L'importance des ferments lactiques est grande dans l'industrie agroalimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière (Thunell, 1988).

Les *Lactocoques* ont leur importance dans ces industries, ils sont classés en souches acidifiantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *cremoris* et en souches aromatisantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* et *Leuconostoc* (Novel, 1993). Ces souches sont utilisés en particulier pour la fabrication de fromage frais: Quarg, Féta, Cottage cheese, de fromages à pâte moelle: Camembert, Gouda, Edam ou des fromages à pâte persillée: Roquefort et autres bleus (Devoyod et Poullain, 1988).

Elles sont utilisées encore pour la préparation du kéfir, du beurre et de certains laits fermentés tel que le vili Finlandais (Tamine, 1988; Novel, 1993) .

En pratique, il convient de prendre en considération deux aspects de la production d'acide lactique ; la vitesse et le niveau maximal de production, car il existe des différences importants entre les genres, les espèces et même entre les souches d'une même espèce de bactéries lactiques . Ainsi la quantité d'acide lactique produite par les espèces du genre *Lactobacillus* est en général supérieur à celle formée par les autres genres utilisés industriellement : *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc*. Avec les lactocoques, l'acidité maximale correspond à un pH de 4,3 à 4,5 (Schmidt et al., 1994).

La vitesse d'acidification sur lait dépend de la composition du milieu ,plus ou moins adapté à la croissance des bactéries lactiques ; elle dépend aussi de la température d'incubation ; mais à leur température optimale de croissance (Schmidt et al.,1994).

III.2.1.1 L'acide lactique

La très grande majorité des études sur les fermentations lactiques ont porté et portent encore sur les bactéries lactiques en raison des applications industrielles dans le domaine alimentaire pour la fabrication de fromages et de yoghourt.

Les bactéries lactiques constituent un ensemble de micro-organismes capables de transformer des sucres simples comme le lactose ou le glucose en acide lactique (tableau 5). De nombreuses bactéries lactiques sont capables de découpler leur croissance cellulaire de la transformation des sucres en lactate, et de poursuivre cette bioconversion bien au delà de la phase de multiplication cellulaire.

C'est un point important à souligner, car cela explique que même dans des milieux non optimisés, ces bactéries exigeantes en acides aminés et source azotée organique, peuvent réaliser des bioconversions pondéralement importantes. Des procédés industriels de production d'acide lactique, de forme D ou L en différents modes, ont été développés à partir de lactosérum et autres sous-produits agro-industriels.

C'est ainsi que des concentrations relativement élevées d'acide lactique peuvent être observées. Dans des conditions contrôlées, des bioconversions totales ont été réalisées facilement, non seulement des sucres simples comme le glucose ou le lactose, mais également de polymères tel que l'amidon.

Tableau 5 : Production de l'acide lactique par les différentes souches.

Microorganisme	Production g/l	Rendement g/g	Productivité g/L/h	Référence
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC	83,0	0,88	2,6	Zhou et al. (1999)
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL	104,6	0,87	1,8	Park et al. (1998)
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	144,0	0,96	5,1	Yun et al. (2003)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC	67,0	0,84	2,5	Berry et al. (1999)
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC	65,5	0,66	2,7	Schepers et al. (2002)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRRL	38,7	0,90	3,5	Burgos-Rubio et al. (2000)
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	82,0	0,91	5,6	Hujanen et al. (1996)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC	41,0	0,97	1,0	Fu et al. (1999)
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC	21,8	0,77	0,8	Bustos et al (2004)
<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	76,2	0,70	0,8	Vishnu et al. (2000)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCIMB	90,0	0,97	3,8	Kotzanmanidis et al.(2002)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IFO	90,0	0,76	1,6	Roble et al. (2003)

III.2.1.2 Le diacétyle

Les bactéries lactiques aromatisantes comme *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, produisent des composés aromatiques principalement le diacétyle qui produit au goût des produits frais (Doleyres, 2003).

Sa synthèse est relativement simple et se fait en deux étapes à partir du pyruvate : la première est enzymatique (grâce à l'enzyme α -acétolactate synthase), la seconde est chimique (décarboxylation non enzymatique).

Le tableau 6 montre le niveau de production de diacétyle et d'acétaldéhyde chez les lactocoques.

Tableau 6 : Production de diacétyle et acétaldéhyde par les *Lactocoques*
(Novel et Lequerler, 1995).

Espèce et souche	Diacétyle ($\mu\text{g/ml}$)	Acétaldéhyde ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .	0,05 - 0,10	0,7 - 2,3
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> .	0,05 - 2,3	0,3 - 3,7
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> .	0,6 - 55,0	2,2 - 11,3

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1 Matériels**I.1.1 Souches**

Les souches utilisées pour les essais de fermentation de lactosérum déprotéiné supplémenté ou non sont des lactocoques isolées par Nahal (2006) (tableau 7).

Tableau 7 : Souches utilisées pour les essais de fermentation.

Souches	Nom des espèces	Origine	Saison de l'isolement	lieu
<i>Lc.19</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	Lait de chèvre	Printemps	Moyen Cheliff
<i>Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Lait de chèvre	Printemps	Moyen Cheliff
<i>Lc.19 et Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis et Lactococcus diacetylactis</i>	Lait de chèvre	Printemps	Moyen Cheliff

I.1.2 Substrat : Le lactosérum

Le lactosérum, sous-produit de la fabrication du fromage ou de la caséine, peut être défini comme étant un lait privé de caséine. L'intérêt porté à ce produit dépend essentiellement de la fraction protéique, du lactose et des vitamines hydrosolubles qu'il renferme (tableau 8). Les autres constituants (sels minéraux et acide lactique) sont considérés très souvent comme des facteurs limitant de l'utilisation (Imbert-Pundaven, 1977).

A chaque type de fromage correspond un lactosérum particulier. Il est donc impossible, du fait de la grande variété des fromages d'admettre une composition standard (Bertrand, 2002).

I.1.2.1 Types de lactosérum

Le lactosérum est un produit de grande valeur nutritionnelle, il se présente sous deux grandes catégories (Kosseva et al., 2007).

- Le lactosérum doux qui est également appelé lactosérum de fromagerie : Il résulte de la coagulation du lait par la présure (Boudier et Luquet, 1981). Son pH peut varier de 5,2 à 6,7 (Kosseva et *al.*, 2007).
- Le lactosérum acide : Il s'agit de sous produits de l'élaboration de caséine, de fromage frais, la fermentation naturelle produit de l'acide lactique qui donne une acidité élevée au lactosérum. Son pH varie de 3,8 à 4,6 (Kosseva et *al.*, 2007).

Tableau 8 : La composition moyenne des lactosérums (en % d'extrait sec).

	Lait %	Lactosérum %	
		Doux	Acide
Eau	87,6	93,5	93,5
Matière sèche (ES)	12,4	06,4	06,5
Matière grasse	03,4	0,05	0,04
Protéine soluble	0,70	0,55	0,55
Azote non protéique	0,50	0,18	0,18
Lactose	04,7	04,8	04,9
Sels (cendre)	00,9	00,5	00,8
Acide lactique	01,5	0,05	00,4

Source : Lupien, (1995); FAO., (2002).

I.1.2.2 Procédé de fabrication de lactosérum en poudre

Du fait que sa température et sa composition favorisent la croissance bactérienne, le lactosérum est soit soumis aux procédés industriels tout de suite après sa collecte, soit il est rapidement refroidit à 5°C pour arrêter temporairement la croissance bactérienne. Les caséines résiduelles et le gras sont éliminés en premier. Des techniques de précipitation variables ont été utilisées à l'origine pour isoler les protéines du lactosérum, mais de nos jours la séparation par membrane (fractionnement) et les techniques chromatographiques sont les plus utilisées en plus de la précipitation (Imbert-Pundaven, 1977)

Tous les types de lactosérum peuvent être séchés par atomisation mais chaque type exige une température spécifique. Le lactosérum doux est très facile à traiter que le lactosérum acide (Imbert-Pundaven, 1977)

I.1.2.2 Identification du lactosérum en poudre utilisé

La poudre de lactosérum utilisée dans nos expérimentations est de type doux dont les mentions d'étiquetage sont les suivantes :

- Marque : *Eminfood*.
- Dénomination commerciale : *Lactosérum doux*.
- Pays d'origine : *Espagne*.
- Composition :
 - *Humidité : maximum 5,0 %*.
 - *Protéines brutes : 12,0 %*.
 - *Cendre : minimum 11,0 %*.
 - *Lactose : minimum 65,0 %*.
 - *Chlorure NaCl : maximum 4,9 %*.

- Lot de fabrication : 186-7.
- Date de fabrication : 05/07/2007.
- Date de péremption : 05/07/2008.
- Poids net : 25 kg.
- Précautions d'emploi :
 - Fabriqué dans l'union européenne pour usage industriel
 - Conserver dans un endroit frais et sec
- Emballage : des sacs de 25 kg en papier double kraft (emballage extérieur) et en plastique (emballage intérieur : en contact direct avec la matière).
- Fabricant : la société EMINPACK, S.A, sise Avenida de Esplugues, 77-080034 Barcelone, Espagne.
- Exportateur : PMS INTERNATIONAL, S.L.
- Importateurs :
 - DISTRIM SPA, sise Zone industrielle de Réghaia ; 16113 Alger ; Algérie (Tel 021 84 71 16/17/18, info@distrimspa.com).
 - DISTRIM ORAN, sise Zone industrielle de Nedjema ; 7 lot. N°. 04, Sidi Chami Es Senia, 31000 Oran, Algérie (Tel 00 213 41 59 71 28, Fax 00 213 41 59 70 75).

I.1.3 Milieux biologiques

I.1.3.1 Milieu de dénombrement

Pour cultiver et dénombrer les streptocoques lactiques mésophiles Petransxienne et Hapied (1981) recommandent l'utilisation du milieu M17 bouillon et agar qui favorise leur croissance.

I.1.3.2 Milieux de conservation

Les milieux utilisés sont :

- Gélose M17 pour une conservation à courte durée.
- Milieu LTSG pour une conservation à longue durée.

I.1.3.3 Milieu de culture

- Milieu M17 gélose.
- Milieux préparés à base de lactosérum déprotéiné supplémenté ou non dont les ingrédients utilisés sont :
 - Extrait de levures.
 - Mg SO₄.
 - Acétate de sodium.
 - Acide citrique.

I.1.4 Support utilisé « la pouzzolane »

Le support utilisé est du pouzzolane, une roche correspondant à des projections volcaniques, scoriacées, essentiellement stromboliennes et basiques, de composition basaltique, de couleur noire au rouge selon le degré d'oxydation du fer présent (magnétite ou d'hématite).

Cette roche siliceuse éruptive dans la partie cristalline représente selon le gisement d'où elle est extraite entre 80 et 100 % du volume de solide (photo 1). Disponible en Algérie est présentant des caractéristiques intéressantes pour la fixation des cellules par adsorption (Menoret, 2001).



Photo 1 : La pouzzolane (vue sous une loupe binoculaire).

I.1.4.1 Origine

Ce matériau est originaire d'El Kelkoul (Bouhamidi) qui se situe à 25 Km de Béni-Saf, à l'Ouest de l'Algérie. Selon Minoret (2001), il présente les caractéristiques physico- mécanique et composition chimique suivantes (tableaux 9 et 10)

Tableau 9 : Caractéristique physico- mécanique de la pouzzolane.

Densité	pH	Rétention en eau %	Asphyxie	Pouzzolanicité %	Résistance Mécanique Granulat (Kg/m ²)
0,8 – 1,13	6,5 - 7	19 -33	faible	85	33,2

Source : Minoret (2001).

Tableau 10 : Composition chimique de la pouzzolane.

SiO ₂ %	Al ₂ O ₃ %	Fe ₂ O ₃ %	CaO %	MgO %	Na ₂ O %	K ₂ O %	SO ₃ %
46,10	17,5	10,5	10,5	3,8	3,4	1,50	0,4

Source : Minoret (2001),

I.1.4.2 Porosité de garnissages utilisés

Un milieu poreux est un matériau constitué des particules solides cimentées entre elles et formant un squelette autour du quels subsistent des espaces vides. L'autre phase qui est fluide, occupe le volume poreux constitué par les espaces vides de la phase solide. La porosité (degré de vide) c'est la fraction volumique occupée par le fluide entre les grains (Menoret, 2001).

$$\Phi = \frac{\text{Volume d'eau nécessaire à la saturation}}{\text{Volume du matériau saturé}}$$

Φ : Porosité totale du matériau.

I.1.4.3 Densité et masse volumique

La masse volumique apparente d'un matériau est mesurée en effectuant le rapport masse sèche sur volume. Cette mesure prend en compte dans l'estimation du volume, les vides ménagés par la porosité du matériau. La masse volumique s'exprime en Kg.m^{-3} .

L'augmentation de volume et de masse provoquée par l'introduction du matériau dans une éprouvette d'eau permet d'estimer sa masse volumique réelle, c'est à dire le rapport entre masse de matériau sec et le volume qu'il occupe sans prise en compte des vides. La densité s'obtient en faisant le rapport entre la masse volumique réelle du matériau et celle de l'eau (Menoret, 2001).

$$\rho_{\text{matériau}} = \frac{\Delta m_{\text{matériau}}}{\Delta v_{\text{matériau}}}$$

$\rho_{\text{matériau}}$: la masse volumique du matériau (Kg.m^{-3}).

$$d = \frac{\rho_{\text{matériau}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

d : Densité de matériau , le cas de pouzzolane la densité est égale à 1,02 (Menoret, 2001).

I.1.4.4 Aire spécifique

L'aire spécifique A_s d'un matériau correspond à la surface totale des particules par unité de volume. L'hypothèse de la sphéricité des particules est couramment admise pour estimer A_s .

Le cas de pouzzolane, la surface spécifique est estimée à $> 5900 \text{ cm}^2 / \text{g}$ (Menoret, 2001).

I.1.4.5 Diamètre des grains

Les diamètres des grains utilisés sont 1,25 mm, 04 mm et 6,25 mm. Ces trois (03) diamètres ont été choisis selon la disponibilité des tamis par contre la sélection des valeurs des diamètres des différents tamis a été effectuée pour les raisons suivantes :

- 1,25 mm : pour diminuer les angles très aigus qui présentent des taux d'abrasion trop élevés et qui sont défavorables à la colonisation bactérienne, tout en tenant compte du volume du vide qui doit être supérieur à 40 %. Murray et Van Den Berg (1981) rapportent la détermination d'une taille optimale du pore pour l'immobilisation des cellules, elle est de 1 à 5 fois celle de la cellule.
- 6,25 mm : pour éviter le colmatage du bioréacteur et favoriser la fixation des cellules.
- 04 mm : il était le seul disponible entre les deux diamètres choisis (photo 2).

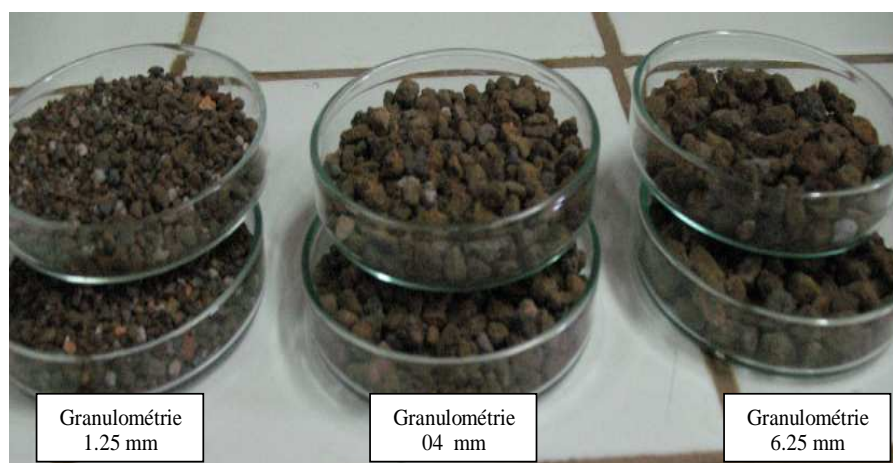


Photo 2: les différentes granulométries utilisées de la pouzzolane.

I.1.5 Diluant, réactifs et autres matériels

L'eau physiologique est un diluant préparé selon Larpent (1997) par dissolution de 9 gr de NaCl dans un litre d'eau distillée suivi d'un autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

De nombreux réactifs ont été utilisés dans nos expérimentations et qui seront cités dans les méthodes utilisées.

Par contre les autres matériels utilisés seront cités dans les essais de fermentation.

I.2 Méthodes

I.2.1 Repiquage et revivification des souches utilisées

Les souches utilisées sont sous forme congelées en cultures pures. Elles sont activées et maintenues par repiquage de la façon suivante :

- Prendre 1ml d'inoculum dans 9 ml de milieu de croissance (le plus souvent M17 bouillon pour les lactocoques).
- Incuber à 30°C pour les ferments mésophiles pendant 72 heures ensuite stocker à 4°C (Guiraud ,1998).

I.2.2 Contrôle de la pureté des souches bactériennes (Purification)

Cette technique consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon M17 jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de stries (Guiraud ,1998).

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram avec une recherche de la catalase après chaque repiquage (Annexe). Les bactéries à Gram positif (+) et catalase négatif (-) sont retenues.

I.2.2.1 Examen morphologique

a. Colonies

Les caractéristiques (la forme, l'aspect, la consistance, l'opacité, et la couleur) des colonies développées sur milieu gélose M17 sont examinées par observation directe (Guiraud ,1998).

b. Cellules

Cet examen consiste à observer, à l'aide d'un microscope, la morphologie des cellules, leur taille, leur mode de regroupement (Guiraud ,1998).

D'après Guiraud (1998), des caractères structuraux peuvent éventuellement être mis en évidence par le biais de la coloration de Gram (annexe) qui est effectuée sur frottis. Cette dernière permet une distinction des bactéries en deux grands groupes, en fonction des colorations finales des cellules. Les bactéries à Gram positif sont de coloration violette et celles à Gram négative sont de coloration rose. Ces différences sont dues aux structures de la paroi bactérienne.

I.2.2.2 Test physiologique : Recherche de la catalase

Cette enzyme empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H_2O_2) dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne. Elle catalyse la réaction suivante :

- L'eau oxygénée est issue de la voie respiratoire oxydative chez les bactéries ;
- L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse.

Pour la mise en évidence de cette enzyme, on prélève une colonie jeune développée sur un milieu gélosé, et on la dépose sur une lame contenant deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. On réalise alors une suspension en étalant soigneusement la préparation bactérienne. Si la souche examinée possède une catalase, elle est catalase positive et on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses. Dans le cas contraire, il n'y a pas de dégagement de gaz (Guiraud, 1998).

I.2.3 Conservation des souches

Pour assurer une bonne continuité du travail, deux techniques sont utilisées pour conserver les souches et qui sont :

- Conservation à + 4°C : Elle est utilisée pour une conservation des souches à courte durée, cultivées sur gélose à 4°C pour les réutiliser.
- Conservation à - 20°C : Elle est employée pour une conservation des souches d'un à plusieurs mois. Elle s'effectue en congelant des cultures jeunes, non incubées ensemencées massivement (5 %) sur milieu LTSG dont le glycérol (25 à 30 %) joue le rôle d'un cryoprotecteur (Choisy, 1997; Aubert, 1998).

I.2.4 Préparation des milieux à base de lactosérum

Actuellement, les protéines et le lactose du lactosérum sont les deux types de substances qui suscitent le plus d'intérêt pour la valorisation et la bio – transformation (Dlamini Abednego et al. , 2007). Le lactosérum déprotéiné représente le résidu de l'opération de concentration des protéines ainsi un produit valorisé constituant une avenue de recherche intéressante et la fermentation en offre la possibilité (Jacques, 1993).

En effet, le milieu d'isolement des lactocoques proposé souvent par plusieurs auteurs est le lactosérum enrichi (Kosseva et al., 2007).

I.2.4.1 Traitement du lactosérum

Le principe consiste à solubiliser la poudre de lactosérum à raison de X % (P/V) d'extrait sec puis le traiter comme suit :

- Séparation des protéines qui se fait par action conjuguée d'une acidification du milieu à un pH de 4,6 à l'aide d'acide fort (acide sulfurique 0,1N ou HCl concentré). Ce pH représente le point isoélectrique de floculation des protéines.
- Chauffage dans un bain-marie réglé à une température de 90 °C à 95 °C pendant 20 minutes.
- Filtration du sérum après décantation qui est effectuée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sérum limpide, le pH du filtrat est ensuite ajusté à 5,6 par une solution de NaOH (1N). C'est le pH optimal pour les lactocoques (Guerra et Pastrana, 2007).
- Le sérum déprotéiné ainsi obtenu, est autoclavé à 110 °C pendant 10 minutes (Guerra et Pastrana, 2007).

Ce traitement est appelé déprotéinisation du lactosérum (figure10).

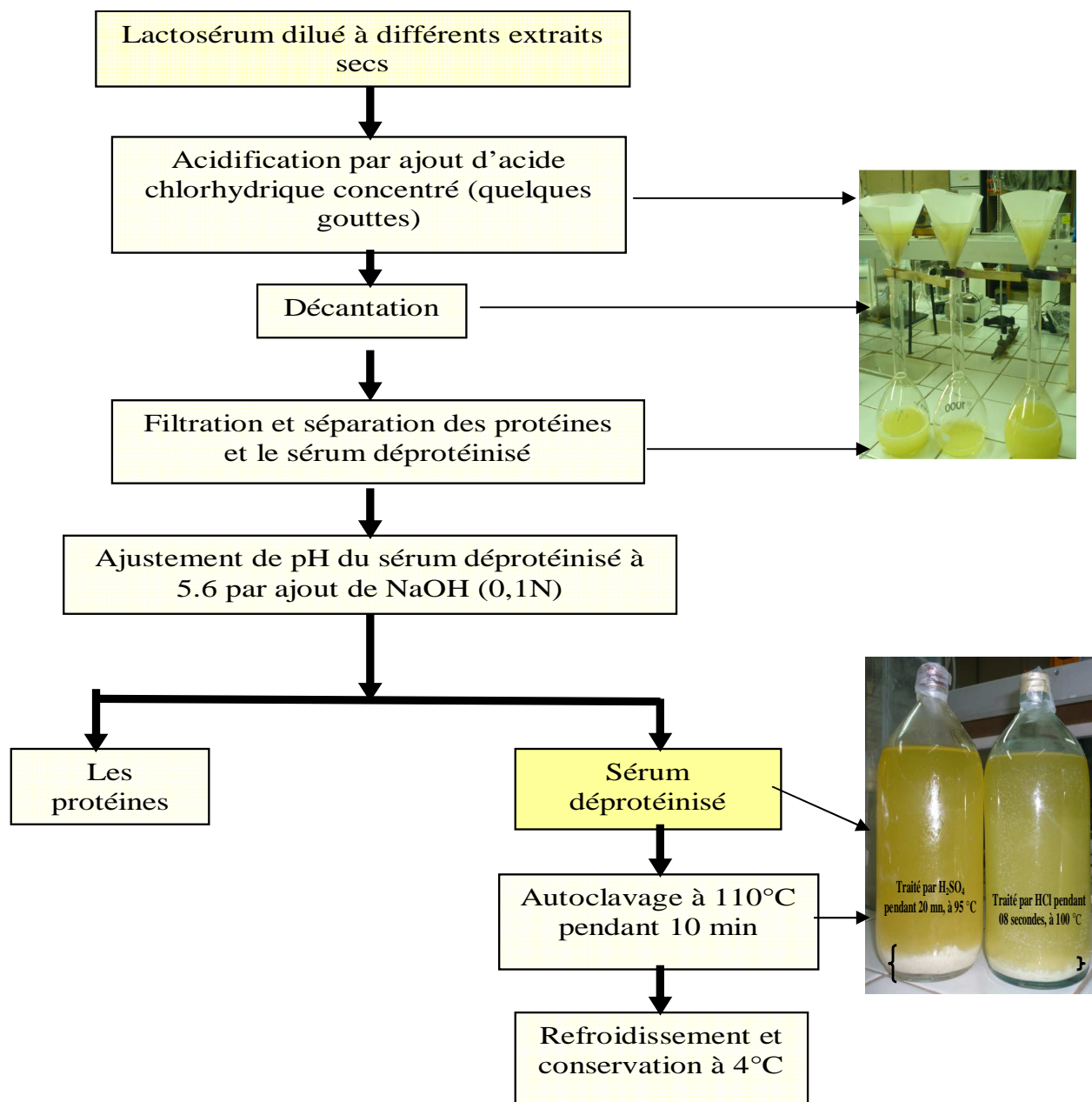


Figure 10 : Diagramme de déprotéinisation du lactosérum (Guerra et Pastrana, 2007).

I.2.4.2 Optimisation de l'extrait sec du lactosérum

Cette étape a été basée sur le suivi du pH et l'acidité Dornic qui est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique.

Les courbes d'acidification et de biomasse en fonction du temps peuvent être tracées (Bradly et *al.*, 1992) et l'extrait sec optimal sera utilisé dans les essais de fermentation.

Les différents extraits secs (tableau 11) ont été sélectionnés à partir de différentes évolutions du pH et de l'acidité Dornic (exprimée en acide lactique) pour les extraits secs de 2 à 50 %.

Tableau 11 : Les différents extraits secs sélectionnés pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de lactosérum (en % d'extrait sec).

Souches pures et mixtes	Extrait sec du lactosérum destiné à la déprotéinisation (%)				
	05	06	06,5	07	08
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	05	06	06,5	07	08
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	05	06	06,5	07	08
Culture mixte des deux souches de taux (1.1)	05	06	06,5	07	08

I.2.4.3 Supplémentations du lactosérum déprotéiné

Nous ajoutons au milieu de lactosérum déprotéiné les ingrédients suivants avec différentes concentrations (tableau 12) :

- Extrait de levure ;
- Mg SO₄ ;

Par contre, les ingrédients acétate de sodium et l'acide citrique sont ajoutés respectivement à des taux 0,25 % et 0,4 %.

Tableau 12 : Les différents ingrédients ajoutés au lactosérum déprotéiné (en % d'extrait sec).

Les ingrédients	lactosérum déprotéiné supplémenté ou non (%)				
Aucun ingrédient	M ₀₀	-	-	-	-
Extrait de levure	M _{00 / 0,1}	M _{00 / 0,3}	M _{00 / 0,5}	M _{00 / 0,7}	M _{00 / 1}
Mg SO ₄	M _{00 / 0,5 / 0,15}	M _{00 / 0,5 / 0,2}	M _{00 / 0,5 / 0,25}	M _{00 / 0,5 / 0,3}	-
Acétate de sodium	M _{00 / 0,5 / 0,3 / 0,25}	-	-	-	-
Acide citrique	M _{00 / 0,5 / 0,3 / 0,4}	-	-	-	-

M₀₀ : Milieu à base de lactosérum déprotéiné non supplémenté ; M_{00 / 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, et 1} : Milieu à base de lactosérum déprotéiné + les différentes concentrations de l'extrait de levure ; M_{00 / 0,5 / 0,15, 0,20, 0,25 et 0,30} : Milieu à base de lactosérum déprotéiné + 0,5 % l'extrait de levure + les différentes concentrations de Mg SO₄ ; M_{00 / 0,5 / 0,3 / 0,25} : Milieu à base de lactosérum déprotéiné + 0,5 % l'extrait de levure + 0,3 de Mg SO₄ + 0,25 % d'acétate de sodium et M_{00 / 0,5 / 0,3, 0,4} : Milieu à base de lactosérum déprotéiné + 0,5 % l'extrait de levure + 0,3 de Mg SO₄ + 0,4 % de acide citrique.

I.2.4.4 Ajustement du pH

Le lactosérum doux à un pH égale à 6,2, il est ajusté à 5,6. Ce dernier est un pH optimal pour la croissance des lactocoques (de Roissart, 1986).

I.2.4.5 Stérilisation

Les milieux ainsi préparés subissent un autoclavage à 110 °C pendant 10 mn afin d'éliminer toute charge microbienne contaminante.

I.2.5 Essais de Fermentation

Après refroidissement à 30 °C, on procède à un ensemencement à 3 %, 5 % et 10 % par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc.19), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Lc.d4) et la culture mixte des deux souches avec un ration de (1.1) de 18 h et 24 h d'incubation.

I.2.5.1 Réactivation des souches et préparation de la pré-culture

I.2.5.1.1 Préparation des inoculums

Avant chaque préparation, un aliquote de chaque souche est repiqué sur une boîte de gélose M17 et incubé à 30 °C, 24 h à 48 h (figure 11). Après croissance, une colonie est prélevée stérilement à l'aide d'une öse et mise en suspension dans un flacon de 100 ml contenant 20 ml de bouillon stérile adapté à chaque micro-organisme (figure 12), à savoir le milieu M17 bouillon

et le milieu à base de lactosérum déprotéiné supplémenté ou non par les ingrédients. Cette première pré-culture est conduite à 30 °C, sous une agitation de 150 trs/mn, durant 72 h. Afin de s'assurer que toutes les cellules sont dans le même état physiologique, une deuxième pré-culture est réalisée. Des flacons de 150 ml contenant 40 ml de bouillon sont alors inoculés avec 1% de suspension cellulaire issue de pré-culture précédente, et incubés pendant 48 h à 30 °C et 150 trs/mn.

Cinq millilitres de chaque culture sont ensuite centrifugés à 2000 g pendant 10 min à température ambiante. Les culots sont homogénéisés dans un volume d'eau physiologique stérile (9‰ de NaCl) de manière à obtenir une concentration équivalente à 10^6 UFC/ml. L'équivalent de 10^6 UFC de suspension bactérienne (selon le milieu de culture), est mélangé et ajusté dans un volume final de 10 ml d'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl).

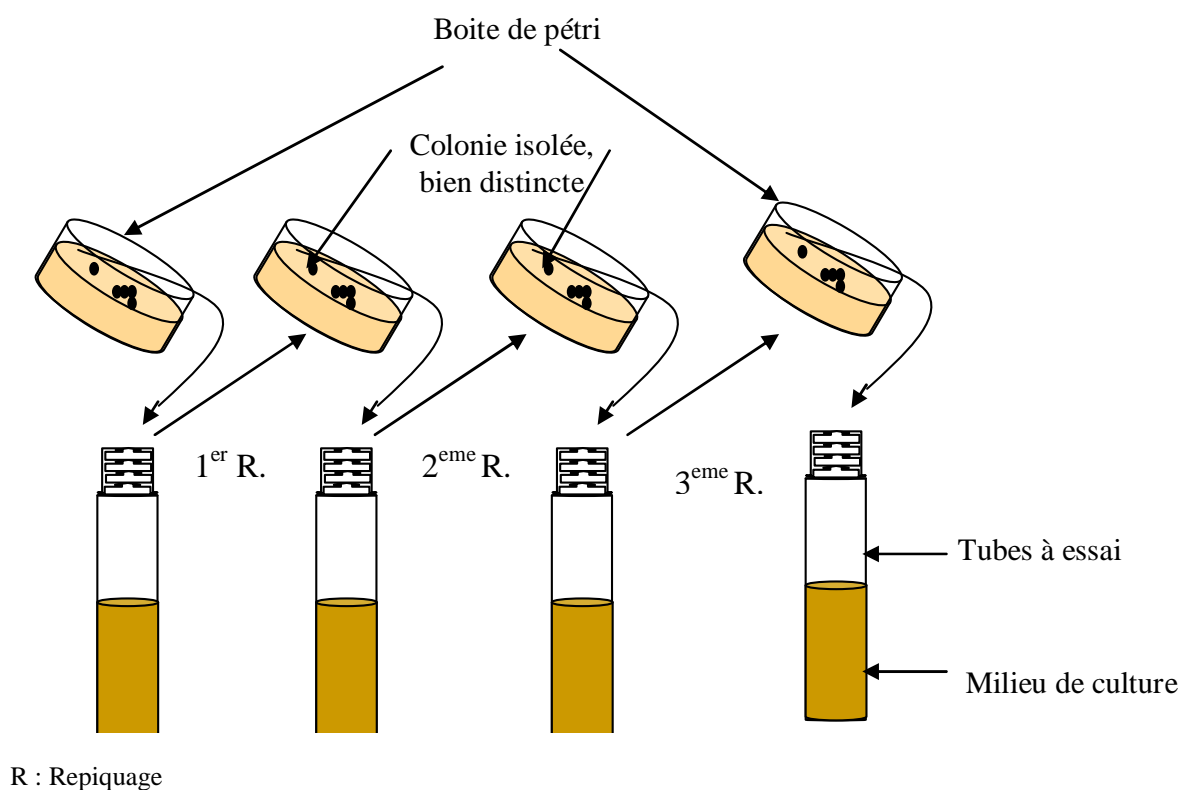


Figure 11 : Relance de l'activité des lactocoques.

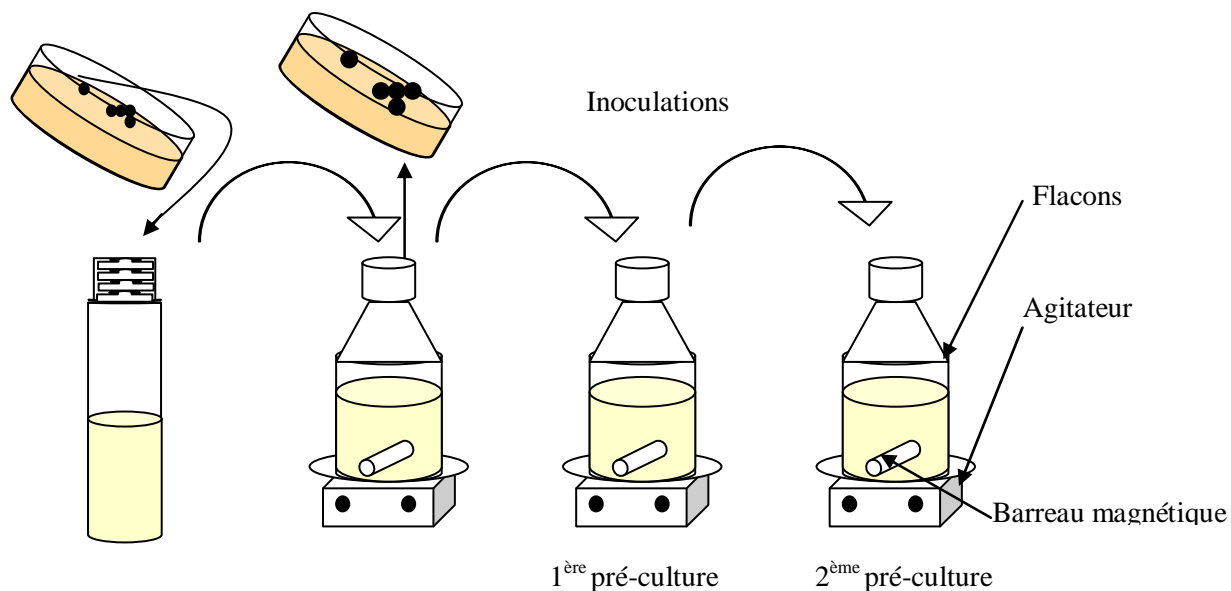


Figure 12 : Préparation des pré-cultures des souches utilisées.

I.2.5.1.2 Préparation des cultures mères « Cultures Stocks »

La préparation de la culture mère comprend une série de repiquages avec augmentation des volumesensemencés. Il existe de nombreux schémas de fabrication de ces cultures. Tous dérivent de techniques de repiquage par division ou par multiplication (Erk, 1987).

Dans notre cas, la préparation des cultures mères utilisées dans les différentes fermentations a été fait par division car selon Erk, (1987), cette méthode présente plus de sécurité sur le plan bactériologique. Cependant la conservation prolongée des souches à 4 °C peut entraîner une perte d'activité (figure 13).

Par contre la méthode par multiplication, bien qu'elle assure une activité optimale des souches, augmente les risques de contamination et de déséquilibre des cultures.

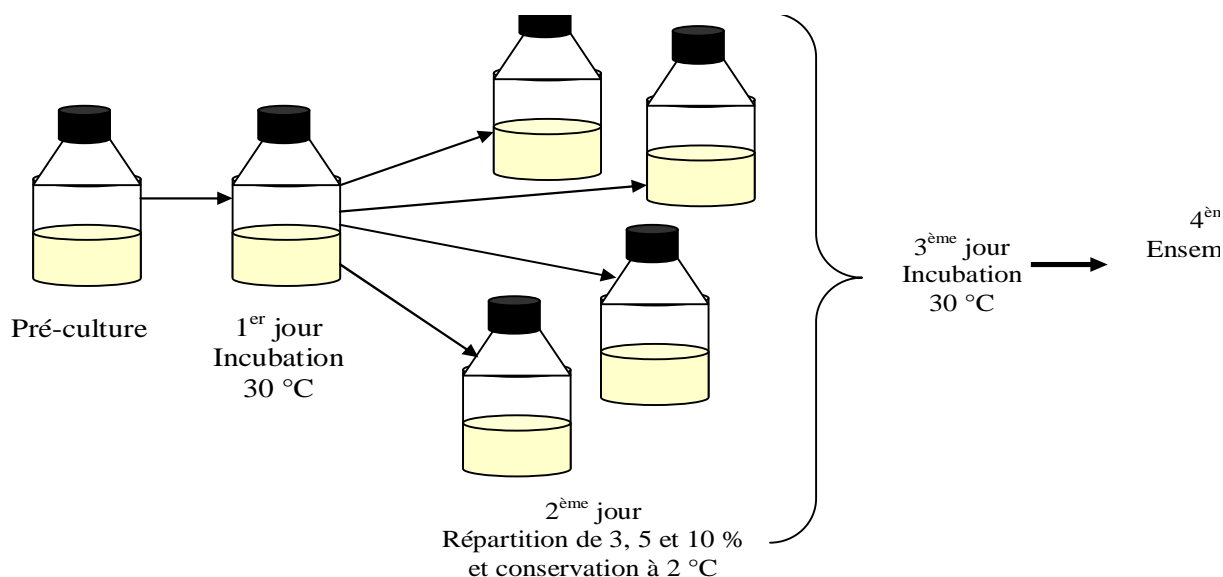


Figure 13 : Préparation des cultures mères par la méthode de repiquage par division (Erk, 1987).

a/ Influence de l'extrait sec et les ingrédients sur la production de l'acide lactique

Les réactifs et matériels nécessaires pour préparer les milieux de fermentation sont décrits dans le tableau 13. L'objectif est de sélectionner le milieu dont l'extrait sec optimal permettra une production optimale et rapide de l'acide lactique par les souches. Pour cela, une poudre de lactosérum est diluée à des différents taux (p/v) (tableau 11) dans 100 ml d'eau déminéralisée. Le mélange est déprotéiné puis autoclavé à 110 °C pendant 10 minutes. Une solution est préparée pour 2 essais avec chacune des souches et avec un mélange des 2 souches. Les essais de fermentation réalisés ont été conduits en conditions d'anaérobiose à 30 °C. Le bouillon M17, autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes et maintenu en surfusion (45 °C) jusqu'à son utilisation, sert de témoin pour vérifier la bonne croissance des souches dans les conditions choisies de fermentation. Le pH, l'acidité et la biomasse de chaque culture sont contrôlés à t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48, 72 heures d'incubation.

Tableau 13: Réactifs et matériels pour préparer les milieux de fermentation

Réactifs	Matériel
Bouillon et gélose M17 Lactosérum déprotéiné à un extrait sec optimal Eau déminéralisée	Agitateur mécanique Matériel courant de laboratoire (bain marie, étuve, balance, etc)

b/ Influence du taux et l'age de l'inoculum sur la production de l'acide lactique

Les réactifs et matériels nécessaires pour préparer les milieux de fermentation sont les mêmes décrits dans le tableau 13.

Le second paramètre à déterminer est le taux et l'age d'inoculum optimaux permettant des productions optimales et rapides de l'acide lactique et du diacétyle par les souches. Pour cela, une solution de lactosérum dilué à 6,5 % (p/v) dans de l'eau déminéralisée est déprotéiné puis autoclavé à 110 °C pendant 10 minutes. Cette solution est répartie dans des flacons de 500 ml en aliquotes de 100 ml. Les souches sont inoculées à différentes concentrations (3, 5 et 10 %) de 18 et 24 heures (tableau 14). Un suivi de l'acidification et production d'arôme de chaque milieu est réalisé en mesurant régulièrement le pH, acidité Dornic exprimée en acide lactique, la biomasse et le diacétyle pendant 72 h.

Le bouillon M17 additionné à 38 g/l du lactose et les solutions de lactosérum déprotéiné et autoclavé (100 ml) sontensemencés avec chaque ferment (taux d'inoculation 3, 5 et 10 % de 18 et 14 h). Les cultures, réalisées dans des flacons de 500 ml, sont incubées à 30 °C sous faible agitation (100 trs/mn).

Tableau 14 : Les différents taux et ages d'inoculum testés.

Age (heure)	T.I. (%)	Souche	
18	03	<i>Lc.l9</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Lc.d4</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
		<i>Lc.l9 + Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis + Lactococcus diacetylactis</i>
	05	<i>Lc.l9</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Lc.d4</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
		<i>Lc.l9 + Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis + Lactococcus diacetylactis</i>
	10	<i>Lc.l9</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Lc.d4</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
		<i>Lc.l9 + Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis + Lactococcus diacetylactis</i>
24	03	<i>Lc.l9</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Lc.d4</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
		<i>Lc.l9 + Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis + Lactococcus diacetylactis</i>
	05	<i>Lc.l9</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Lc D4</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
		<i>Lc.l9 + Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis + Lactococcus diacetylactis</i>
	10	<i>Lc.l9</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Lc.d4</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
		<i>Lc.l9 + Lc.d4</i>	<i>Lactococcus lactis + Lactococcus diacetylactis</i>

T.I. : Taux d'Inoculation.

I.2.6 Traitement du support « pouzzolane »

Afin d'éliminer toute substance contenue dans la pouzzolane susceptible de se solubiliser dans le milieu réactionnel, la pouzzolane est traitée par rinçage à l'eau distillée, puis immergée dans l'alcool 96 % pendant 24 heures. Ensuite, elle est rincée à l'eau oxygénée afin d'éliminer toute trace restante. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, le support est séché à 102°C dans une étuve pendant toute une nuit, jusqu'à poids constant. Enfin, la pouzzolane est stérilisée à 150°C pendant 30 minutes.

Les réactifs et matériels nécessaires pour préparer le support pouzzolane sont décrits dans le tableau 15.

Tableau 15 : Réactifs et matériels pour préparer le support pouzzolane.

Réactifs	Matériel
Eau déminéralisée Alcool à 96 % Eau oxygénée à 30 V	Pouzzolane Matériel courant de laboratoire (étuve, balance, four à moufle, etc)

I.2.7 Mises en œuvre des bioréacteurs

I.2.7.1 Dispositifs de fermentation en culture discontinue « batch »

Dans notre protocole expérimental, nous avons mené en première étape des fermentations en discontinue « batch » à cellules libres et immobilisées sur le support inerte appelé pouzzolane dans des fermenteurs composants du montage expérimental tel qu'il est schématisé dans les figures 14 et 15.

La fermentation est faite dans des récipients de forme parallélépipédique en verre de volume de 1,5 L. Ce réacteur est mis dans un bain en verre à une température de 30°C maintenue à l'aide d'un thermoplongeur de type Heidolph.

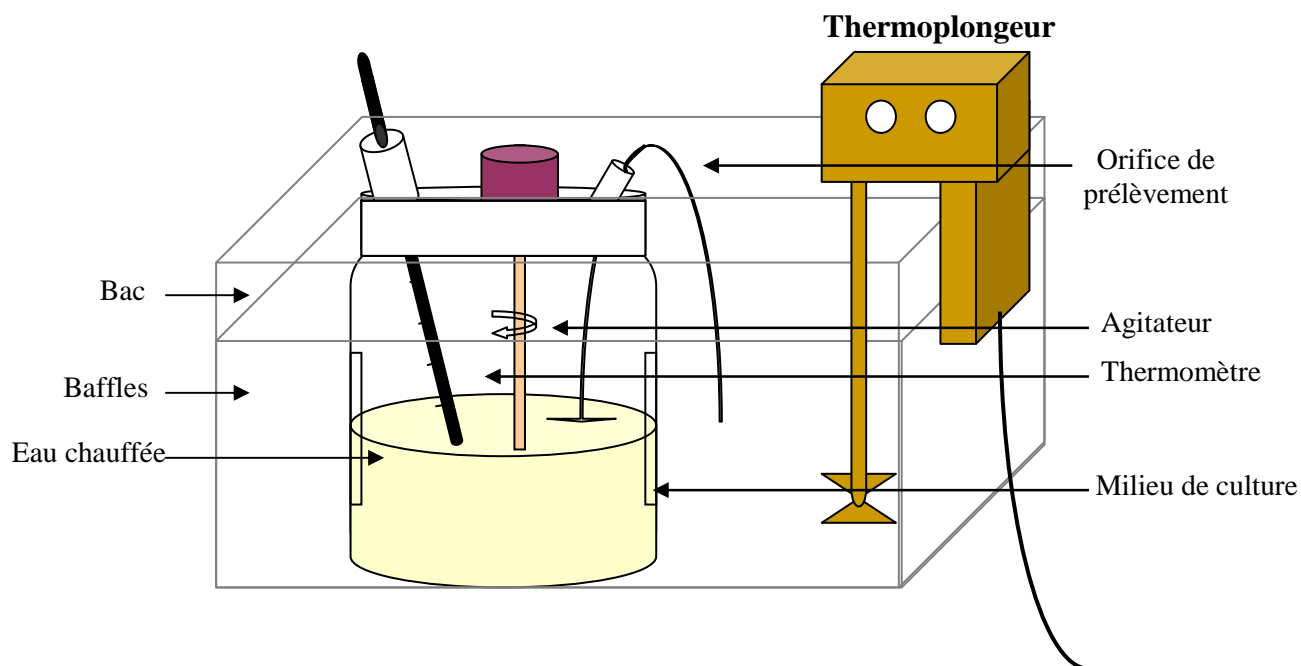


Figure 14 : Culture en batch à cellules libres.

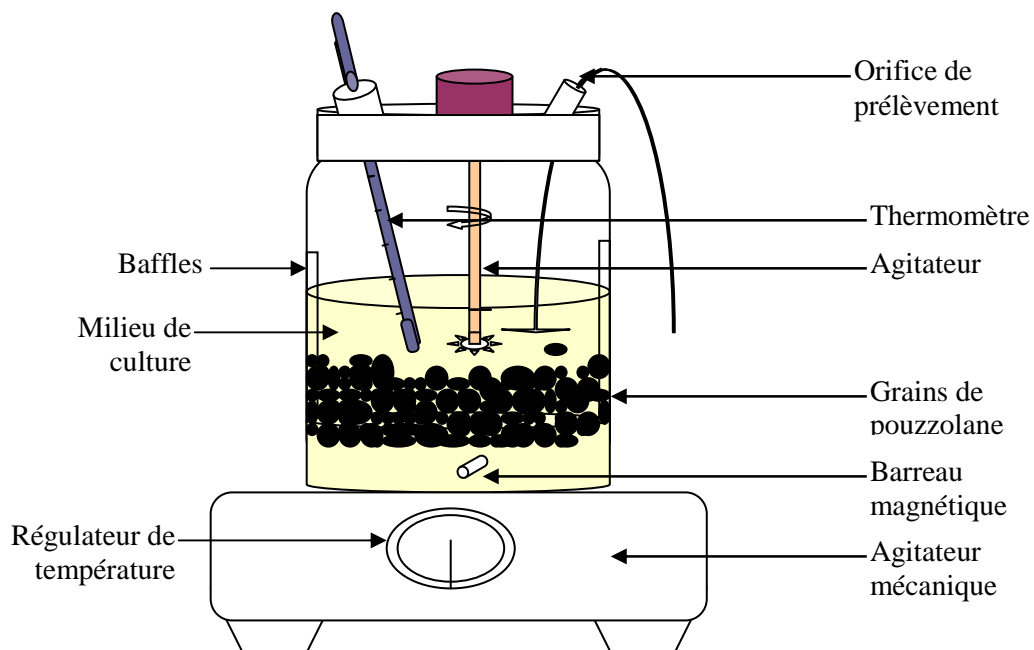


Figure 15 : Culture en batch à cellules immobilisées sur le support pouzzolane.

I.2.7.2 En culture continue

Dans notre protocole expérimental, nous avons mené en deuxième étape des fermentations en continue dans un bioréacteur composant d'un montage expérimental tel qu'il est schématisé dans la figure 16 et photo 3.

Le dispositif est constitué d'une colonne fabriquée à base d'un polymère alimentaire de 15 cm de hauteur, 5 cm de diamètre et de 300 ml de volume garnie par la pouzzolane. Cette colonne est stérilisable par un autoclavage de 121 °C pendant 20 mn. En fond de la colonne, est disposée une grille qui empêche le support d'obstruer l'orifice d'alimentation ascendante. Elle est équipée par un moteur d'agitation permettant d'homogénéiser le milieu de culture avant son envoi grâce à une pompe doseuse (de marque Prominent CFG) et ainsi d'éviter qu'une fraction décantable ne se dépose.

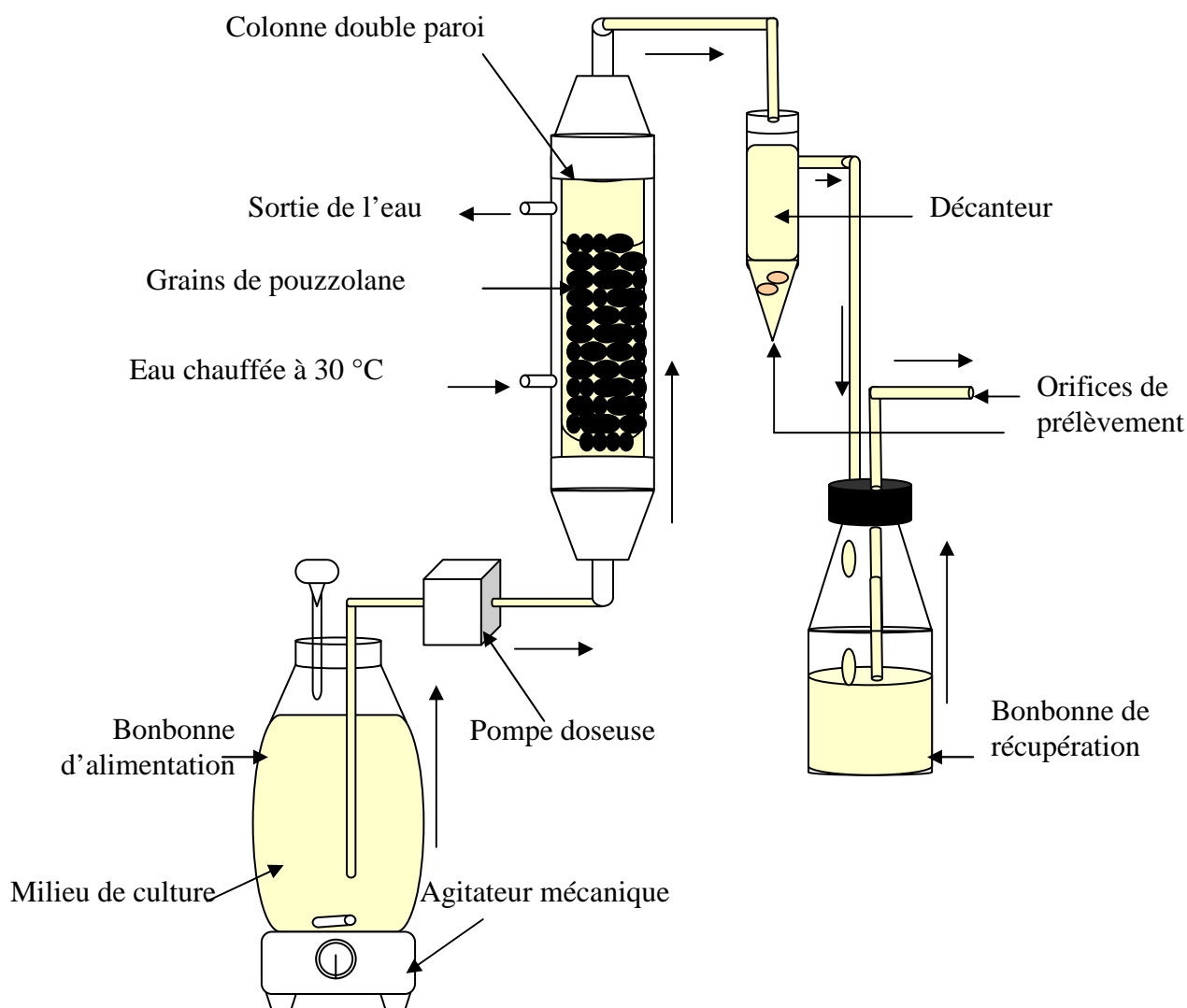


Figure 16 : Culture en continu à cellules immobilisées sur le support pouzzolane.



Photo 3 : dispositif de fermentation en continu sur support pouzzolane.

I.2.8 Stérilisation des matériels utilisés dans les essais de fermentation

Pour éviter toute contamination, un autoclavage a été effectué à une température de 120 °C pendant 15 à 20 min des colonnes munies de garnissage et fermenteurs ainsi que leurs accessoires exception faite de certaines parties dont la stérilisation est effectuée par l'eau oxygénée pour des raisons pratiques (agitateur mécanique, pompe doseuse, etc).

I.2.9 Immobilisation

Un volume de culture « stock » pris à la phase stationnaire est introduit dans les colonnes et fermenteurs de la culture en discontinu de telle sorte que le lit de garnissage soit complètement immergé.

Pour apprécier le temps de la phase d'immobilisation sur les trois granulométries, un suivi a été effectué sur l'évolution de la biomasse des souches utilisées après un temps de séjour de 18, 24, 48 et 72 h en fonction :

- la différence des poids de la pouzzolane avant l'immobilisation et celui d'après à l'état frais et sec (PI-PF et PI-PS).
- l'évolution de la D.O. dans le surnageant (récupérât à t=18, 24, 48, 72), dans la solution du premier lavage (à t=18, 24, 48, 72) et dans la solution du deuxième lavage (à t=18, 24, 48, 72). Dans ce cas, le lavage est effectué pour récupérer les cellules fixées et éventuellement pour apprécier les étapes de la fixation (King et Zall, 1983; Buccarello, 2005).

Des observations obtenues en parallèle par photographie seront illustrées dans la partie résultats et discussion.

I.2.10 Paramètres d'étude

I.2.10.1 Evolution du pH

Le suivi de l'acidité est effectué par la mesure du pH des échantillons dont la sonde du pH-mètre de type Hanna est mise directement dans l'échantillon.

I.2.10.2 Assimilation des sucres

Selon Gautier et *al.* (1954), le lactosérum est déféqué par le réactif de Patein. La quantité du lactose est évaluée en déterminant le pouvoir rotatoire. Pour tenir compte du volume de précipitations opéré suivant le procédé dit « double dilution », deux prélèvements identiques du lactosérum sont amenés après défécation à des volumes différentes ayant entre eux le rapport 1/2

I.2.10.3 Etude du pouvoir acidifiant

L'acidité Dornic est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique. 1 °D = 0,1 g d'acide lactique/ L de l'échantillon.

Il s'agit d'ajouter à l'échantillon le volume nécessaire d'une solution alcaline (soude 0,1N) pour atteindre le point de virage d'un indicateur coloré (Phénophtaléine à 1 % qui passe de l'incolore au rose). Le pouvoir acidifiant des souches est suivi dans des intervalles de temps déterminé par la durée de l'essai. La courbe d'acidification en fonction du temps peut alors être tracée (Bradly *et al.*, 1992).

L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic ($^{\circ}\text{D}$), dans ces conditions 1 $^{\circ}\text{D}$ correspond à 0,1 ml de soude de 0,1 N.

I.2.10.4 Evolution de la biomasse

L'évolution de la biomasse en fonction du temps a été déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm (Pierre *et al.*, 1992). En parallèle, pour estimer le développement des bactéries au cours de l'incubation des cultures pures, nous avons employé la méthode des dénombrements sur gélose M17.

I.2.10.5 Dosage des substances aromatiques: dosage du diacétyle

1 ml de culture est prélevé dans un tube à essai à qui on ajoute 1 ml de solution de CARREZ 1, 1 ml de CARREZ 2 et 2 ml d'eau distillée ; le mélange subit en suite une filtration. On ajoute à 0,4 ml de filtrat obtenu, 1 ml d'une solution d' α - naphтол à 0,5 %, 1 ml d'une solution de créatine à 5 % dans NaOH 1N et 2,6 ml d'eau distillée. Après agitation, on laisse le mélange réactionnel pendant 30 minutes.

L'absorption de la coloration développée est mesurée dans un spectrophotomètre à 420 nm. La concentration en diacétyle est déterminée par comparaison avec une courbe étalon (annexe) en utilisant le diacétyle pure dans l'intervalle de 0 à 3 ppm de concentration (Westerfeld, 1945).

I.2.11 Autres méthodes

Des déterminations physicochimiques ont été effectuées sur le lactosérum déprotéiné pour estimer la composition quantitative des ingrédients à intérêt.

I.2.11.1 Détermination de la teneur en matière sèche

Le dosage se fait par pesée du résidu sec total obtenu après dessiccation du produit dans l'étuve à 103°C pendant 3h.

$$\text{MST (\%)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1} \times 100$$

Avec

M_0 : masse de la capsule et de ses accessoires

M_1 : masse de la prise d'essai

M_2 : masse de la capsule avec la prise d'essai après dessiccation.

I.2.11.2 Détermination de la teneur en protéine

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Kjeldahl qui correspond à la méthode de référence. Cette méthode permet de doser l'azote organique contenu dans les protéines (matières azotées totales) et la correspondance avec les protéines totales est donnée par un coefficient spécifique à chaque produit. Pour le lait le coefficient est $k= 6,38$ (Annexe)

I.2.11.3 Détermination de la teneur en matière grasse

Il existe une méthode précise et rapide pour doser la matière grasse du lait. La méthode utilisée est la méthode de Gerber. C'est une méthode volumétrique. Cette méthode consiste à séparer la matière grasse des protéines. La matière grasse est extraite par un solvant, puis grâce à une centrifugation il y a séparation de 2 phases. Le butyromètre de Gerber est gradué et la lecture est directe en g MG/100g (Gautier et Renault, 1961).

Chapitre II : Résultats et discussion

Les données présentées sur les figures proviennent d'un seul échantillon. Dans la majorité des cas, les analyses ont été répétées deux à trois fois pour s'assurer de l'exactitude des résultats.

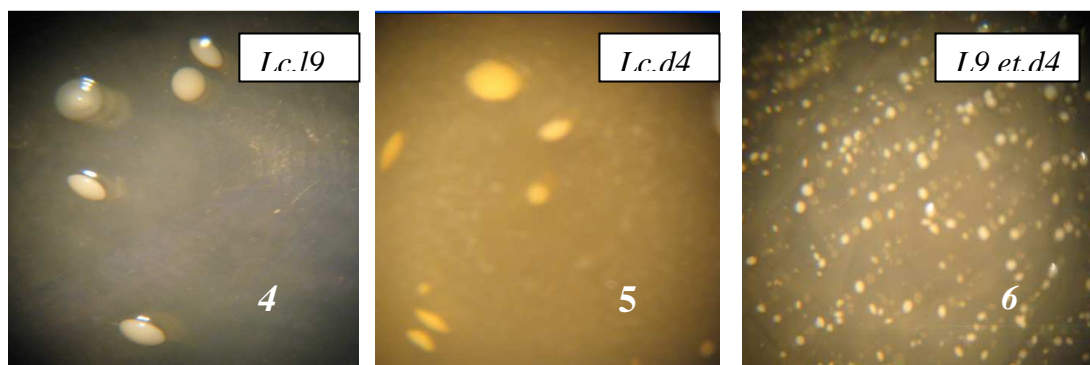
II.1 Essais préliminaires

II.1.1 Vérification de la pureté des souches

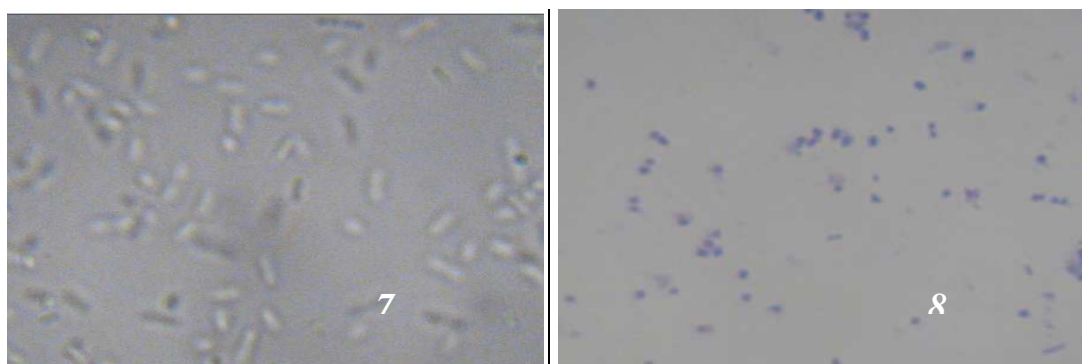
Dans un premier temps, des tests sur les caractères morphologiques, cultureux, physiologiques et biochimiques des souches utilisées ont été effectués.

II.1.1.1 Caractères morphologique et cultureux

Les résultats obtenus sont reportés respectivement sur les photos 4, 5, 6, 7 et 8 ainsi que dans le tableau 16.



Photos 4, 5, 6 : Observation des colonies sous une loupe binoculaire.



Photos 7, 8 : Observation microscopique de *Lc.19* et *Lc.d4* en culture mixte à l'état frais (7) et coloration de Gram (8) (grossissement optique x 100).

Selon Petranxscienne et Lapied (1981), toutes les colonies prélevées à partir du milieu M17 et qui sont rondes ou lenticulaires, à contour régulier, d'un blanc opaque peuvent être des lactocoques. Par contre, la coloration de Gram montre la présence d'une seule forme des bactéries avec une couleur bleue violette d'où les lactocoques sont des Gram positive (+).

Tableau 16: Caractères morphologiques et culturaux.

	Aspect des colonies	Aspect des colonies	Mode de regroupement	Type de paroi
<i>Lc.19</i>	-Blanches -Rondes ou lenticulaires -A contours réguliers.	Coques ou en chaînettes	- Coques isolées - Diplocoques - Chaînettes	+
<i>Lc.d4</i>	-Blanches -Rondes ou lenticulaires -A contours réguliers.	Coques ou en chaînettes	- Coques isolées - Diplocoques - Chaînettes	+
<i>Culture mixte (Lc.19 et Lc.d4)</i>	-Blanches -Rondes ou lenticulaires -A contours réguliers	Coques ou en chaînettes	- Coques isolées - Diplocoques - Chaînettes	+

(+) : Gram +

II.1.1.2 Caractères physiologiques et biochimiques

Les résultats de cette vérification sont mentionnés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Caractères physiologiques et biochimiques.

Souches	Catalase	Croissance				
		T°C			pH 9,6	NaCL 6,5 %
		10	40	45		
<i>Lc.19</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Lc.d4</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Culture mixte (Lc.19+ Lc.d4)</i>	-	+	+	-	-	-

Ces bactéries ont été partiellement caractérisées par la présence ou non de catalase et leur croissance à différentes températures.

Conformément aux données de la littérature, les souches utilisées sont des lactocoques. Ce sont des bactéries à Gram positif, en forme de coques, associées par paires ou en chaînettes de longueur variable, dépourvues de catalase, mésophiles (température de croissance optimale est de 30°C) et microaérophiles, elles ne peuvent croître en présence de 6,5 % de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9,6 (Doleys, 2003).

II.1.2 Optimisation du milieu de culture à base de lactosérum déprotéiné

II.1.2.1 Analyse de la composition du lactosérum

Les résultats d'analyses physicochimiques effectuées sur la poudre de lactosérum (matière première) et sur le lactosérum traité sont mentionnés dans les tableaux 18 et 19.

II.1.2.1.1 Caractérisation du lactosérum doux natif

Les teneurs de la poudre de lactosérum doux en composants principaux sont indiquées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Composition générale de la poudre de lactosérum.

Caractéristique	Teneur
Humidité (%)	7,0
Protéine (g/Kg)	15,94
Lactose (g/Kg)	68,56
Matière grasse (g/Kg)	0,03
Carbone total (%)	46,92
Azote total (%)	2,5

Les résultats du tableau 18 montrent que la teneur en lactose est plus élevée par rapport au reste des composants du substrat. Cette poudre est riche en matières azotées totales qui représentent ~ 16 % mais très pauvre en matières grasses. Ces résultats sont semblables à ceux du Codex Alimentarius (C.S.A., 2006).

Pour un usage fermentaire, notre lactosérum peut être utilisé comme milieu de base car il est riche particulièrement en lactose et en protéine.

L'assimilation difficile de la matière protéique par les bactéries et la floculation des cultures par des protéines micellaires implique la nécessité de déprotéiner le lactosérum (Bourgois et Larpent, 1989).

II.1.2.1.2 Caractérisation du lactosérum après autoclavage

Le tableau 19 montre les pertes enregistrées après la déprotéinisation par HCl concentré densité 1.19 à 100°C et l'autoclavage à 110 °C pendant 10 mn.

Tableau 19 : Composition générale de lactosérum liquide avant et après autoclavage.

Caractéristique	Teneur	
	Lactosérum avant autoclavage	Lactosérum après autoclavage
Protéine (%)	7,28	6,28
Lactose (%)	67,27	66,55
Matière grasse (g/l)	00	00
Carbone total (%)	44,13	41,13
Azote total (%)	1,14	0,98
Rapport C/N	38,71	41,97

Comparativement aux résultats reportés dans le tableau 18, nous avons noté sur l'ensemble des composants des pertes en teneur (tableau 19). Ces dernières ont eu une influence sur la balance C/N où elle est évaluée à ~ 41:1. Ce ration reste supérieur à celui de 20 :1 à 30:1 dont il présente une efficacité maximale lors de la digestion du lactosérum (De Haast et *al.*, 1985). Les sources de carbone et d'azote doivent être suffisantes pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance des bactéries et synthétiser des protéines et des acides nucléiques (ADN et ARN) (Belouadi, 1989).

II.1.2.2 Cinétiques de croissance et de production en milieu M17

L'inoculation du milieu M17 a été effectuée à un taux de 10 % par une culture pure de chaque souche et une culture mixte des deux souches de ratio (1:1). L'objectif visé était l'appréciation de la croissance des souches *Lc.19* et *Lc.d4* et de la production dans un milieu complet (milieu tampon).

II.1.2.2.1 Détermination de la courbe de croissance bactérienne

D'après de Roissart (1986), le taux de croissance (μ) se définit comme la vitesse spécifique de croissance (en h^{-1}), c'est à dire la vitesse de croissance (dx/dt) rapportée à l'unité de biomasse (X).

Il existe également une relation simple entre le taux de croissance (μ) et le temps de génération (g), qui peut être définie comme suit : $\mu = \ln 2/g$. Ces variables sont caractéristiques des souches mais dépendent aussi des conditions de cultures comme le milieu, le pH, la température, les concentrations en substrats et en produits et de l'aptitude des souches à la croissance (souches rapides ou souches lentes) (Béai et *al.*, 1994).

Dans le milieu M17, les meilleurs taux de croissance sont indiqués dans le tableau 20.

Tableau 20 : Meilleurs taux de croissance des souches utilisées en fonction du taux et âge de l'inoculum en culture pure et mixte sur le milieu M17 à 30 °C.

A.I (h)	T.I %	<i>Lc.l9</i>			<i>Lc.d4</i>			<i>Lc.l9 et Lc.d4</i>		
		$\mu_{\max (h-1)}$	g (h)	t (h) de $\mu_{\max (h-1)}$	$\mu_{\max (h-1)}$	g (h)	t (h) de $\mu_{\max (h-1)}$	$\mu_{\max (h-1)}$	g (h)	t (h) de $\mu_{\max (h-1)}$
18	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	0.42	2.5	12
	10	0.57	1.21	6	-	-	-	-	-	-
24	3	-	-	-	0.24	3.28	6	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nous avons constaté que la croissance a atteint son maximum après 6 h de fermentation pour les cultures pures et après 12 h pour la culture mixte à différents taux de l'inoculum de 18 h et 24 h (tableau 20).

II.1.2.2 Evolution de l'acidité Dornic en fonction du taux de croissance

Les figures 17,18 et 19 représentent les meilleurs niveaux de l'acidité Dornic (exprimée en acide lactique) en fonction du temps et des taux de croissance.

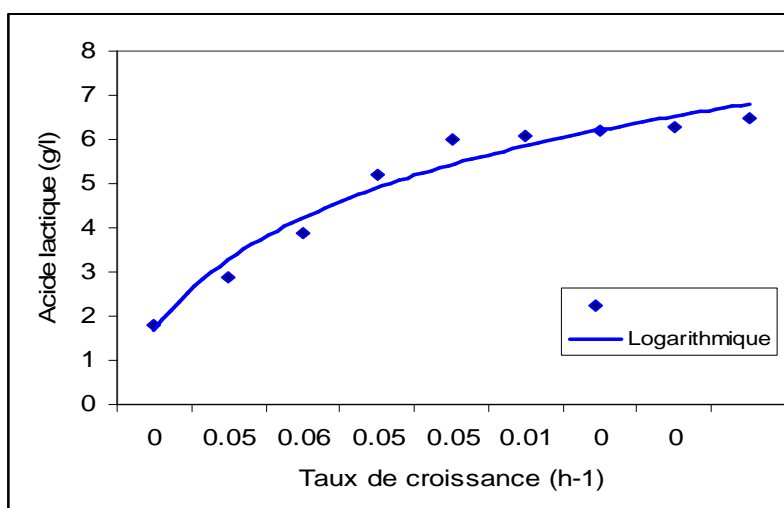


Figure 17 : l'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance chez *Lc.l9* en culture pure à taux d'inoculation de 10 % de 24 h sur le milieu M17 à 30 °C.

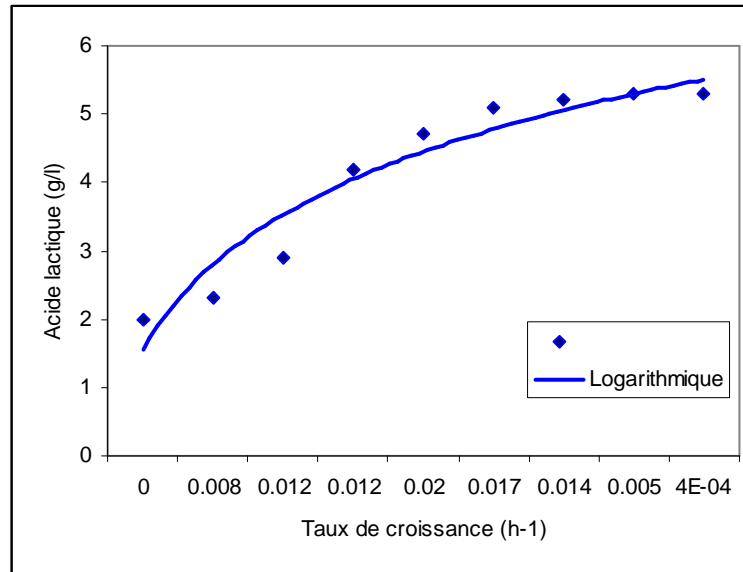


Figure 18 : l'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance chez *Lc.d4* à taux d'inoculation de 10 % de 24 h en culture pure sur le milieu M17 à 30 °C.

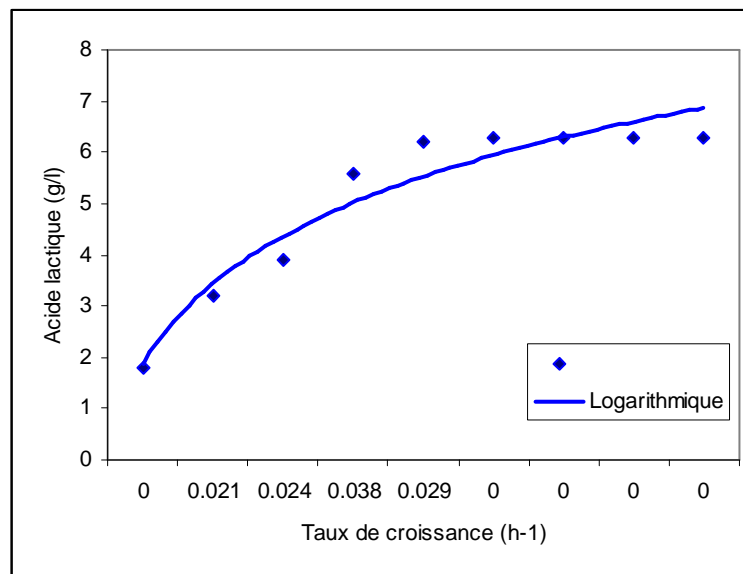


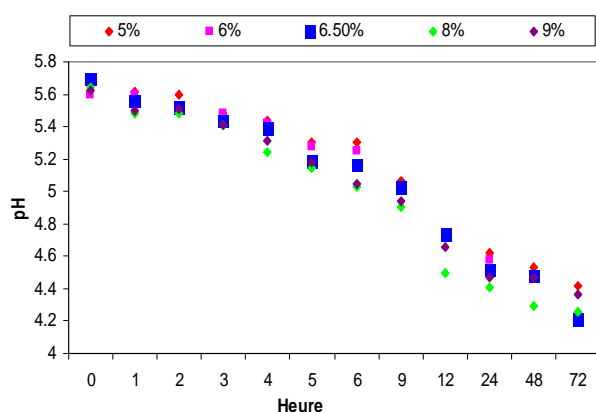
Figure 19 : l'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du taux de croissance chez *Lc.19* et *Lc.d4* à taux d'inoculation de 10 % de 24 h en culture pure sur le milieu M17 à 30 °C

L'allure globale des courbes d'évolution est similaire pour l'ensemble des souches. Le maximum moyen de 5 g/l est atteint après 9 h de fermentation pour toutes les cultures. En effet Les résultats obtenus rejoignent ceux de l'étude menée par Liu et *al.* (2005) pour un taux de croissance maximal de 0,54 h⁻¹ à pH 5,3.

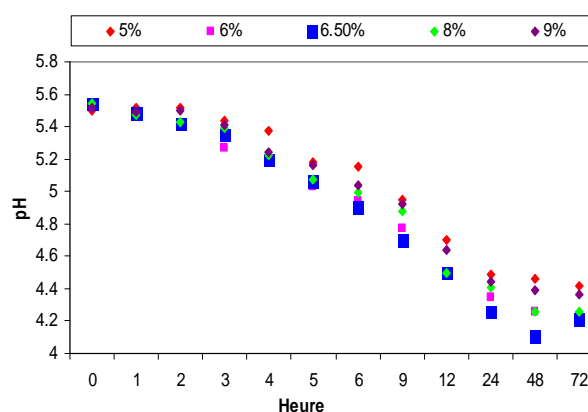
II.1.2.3 Cinétiques de croissance et de production sur le milieu LDNS à différents extraits secs

Pour évaluer l'influence des extraits secs du lactosérum déprotéiné non supplémenté sur le développement des souches utilisées, nous avons testé différentes concentrations en lactosérum. La production de l'acide lactique a été nettement importante pour 5, 6, 6.5, 7, 8 et 9 % d'extrait sec. A 7 %, les résultats étaient très proches de ceux de 6,5 % d'extrait sec.

Les figures 20, 21 et 22 présentent respectivement l'ensemble des résultats de l'évolution du pH, de l'acidité (exprimée en acide lactique) et de la biomasse en fonction du temps (durée de 24 h), pour les deux types de cultures pour un taux d'inoculation de 10%.

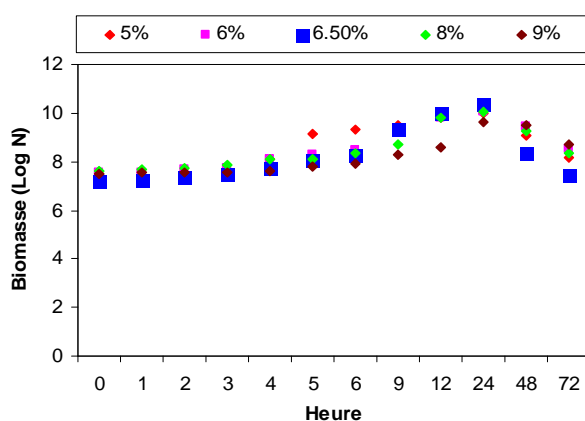


L.c 19

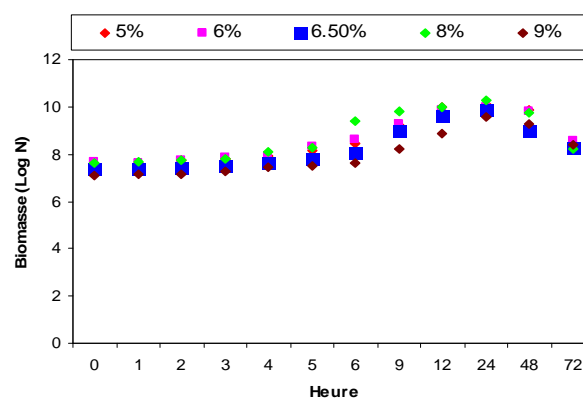


L.c d4

Figure 20 : Evolution du pH au cours de la croissance des souches utilisées sur le milieu LDNS à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.

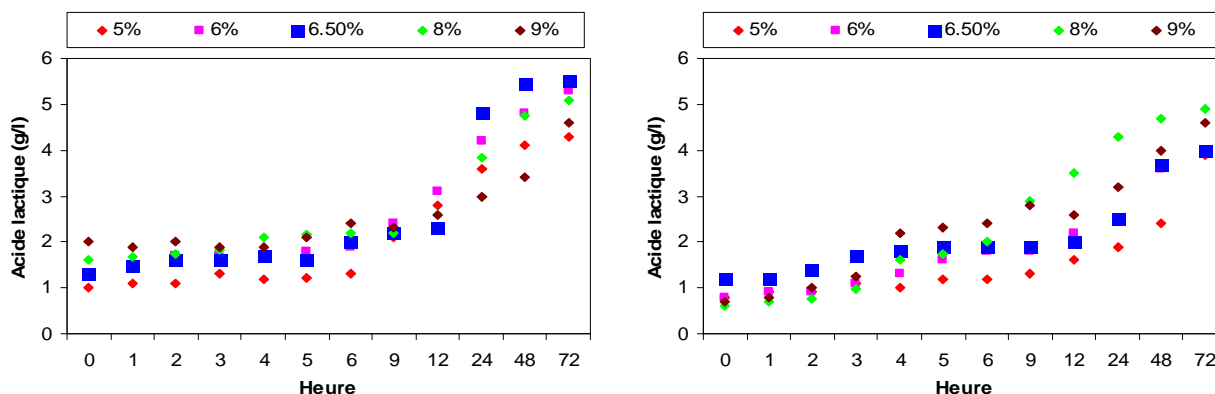


L.c 19



L.c d4

Figure 21 : Evolution de la biomasse au cours de la croissance des souches utilisées sur le milieu LDNS à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.



L.c 19

L.c d4

Figure 22 : Evolution de la production de l'acide lactique au cours de la croissance des souches utilisées sur le milieu LDNS à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.

Nous remarquons pour les 2 souches mises en culture sur milieu LDNS ont sensiblement la même évolution du pH, acidité et biomasse pour l'ensemble des extraits secs.

A l'instar des résultats obtenus, une différence notable de comportement des souches est relevée sur le milieu LDNS à 6,5 g/l d'extrait sec. En effet, l'évolution de la croissance et de la quantité d'acide lactique produite sont nettement meilleures sur ce milieu que sur les autres. Les niveaux de croissance et de production pour les extraits secs supérieurs à 9 % et inférieurs à 5 %, sont faibles. Ceci peut être expliqué respectivement par l'effet conjugué de l'osmolarité (probablement élevée, l'optimal étant de 4.9 % de NaCl) et/ou à l'accumulation du lactate dans le milieu externe au compartiment cellulaire des *Lactococcus*.

Ces observations ont été soulevées par Romeo et *al.* (2001) qui ont noté que la croissance de *Lc. lactis* dans un milieu à 2,5 % de NaCl (concentration proche de celle rencontrée dans certains fromages) est réduite de 25 % à 50 % par rapport à une croissance à pression osmotique normale. Par contre Champagne et *al.* (1994) et Champagne (1998) ont observé des phénomènes de découplage chez les bactéries lactiques entre la croissance bactérienne et l'acidification qui sont liés à la température, à la baisse du pH ou à l'accumulation des lactates.

II.1.3 Enrichissement du milieu LDNS

L'amélioration des performances des souches *Lc.19* et *Lc.d4* en vue de produire de l'acide lactiques et du diacétyle et de convertir le lactose nécessite des suppléments en différents ingrédients tels que l'extrait de levure, MgSO₄, acétate de sodium et acide citrique sur LDNS.

Après inoculation du lactosérum supplémenté ou non par chaque souche individuellement ou associée entre elles, un suivi a été réalisé pendant 72 h sur les différentes cinétiques. Les conditions de fermentation ont été fixées comme suit :

- Taux d'extrait sec du lactosérum : 6,5 %
- Taux d'inoculation : 10 %.
- Age d'inoculum : 24 h.
- Température d'incubation : 30 °C.
- Milieux d'essais :
 - Milieu M17
 - Milieu à base de lactosérum déprotéiné non supplémenté (LDNS).
 - Milieu à base de lactosérum déprotéiné supplémenté à l'extrait de levure (M_1) de 0,1 % ($M_1/0,1$); 0,3 % ($M_1/0,3$); 0,5 % ($M_1/0,5$); 0,7 % ($M_1/0,7$) et 1 % ($M_1/1$).
 - Milieu à base de lactosérum déprotéiné supplémenté à l'extrait de levure et $MgSO_4$ (M_2) de 0,1 % ($M_2/0,1$); 0,2 % ($M_2/0,3$) et 0,3 % ($M_2/0,3$).
 - Milieu à base de lactosérum déprotéiné supplémenté à l'extrait de levure, $MgSO_4$ ($M_2/0,3$) et acétate de sodium (M_3).
 - Milieu à base de lactosérum déprotéiné supplémenté à l'extrait de levure, $MgSO_4$ et acide citrique (M_4).
- Taux d'acétate de sodium : 0,25 %.
- Acide citrique : 0,4 %.
- pH non contrôlé.
- Durée de la fermentation : 72 h.

Les résultats obtenus sont graphiquement représentés dans les figures 23, 24 et 25.

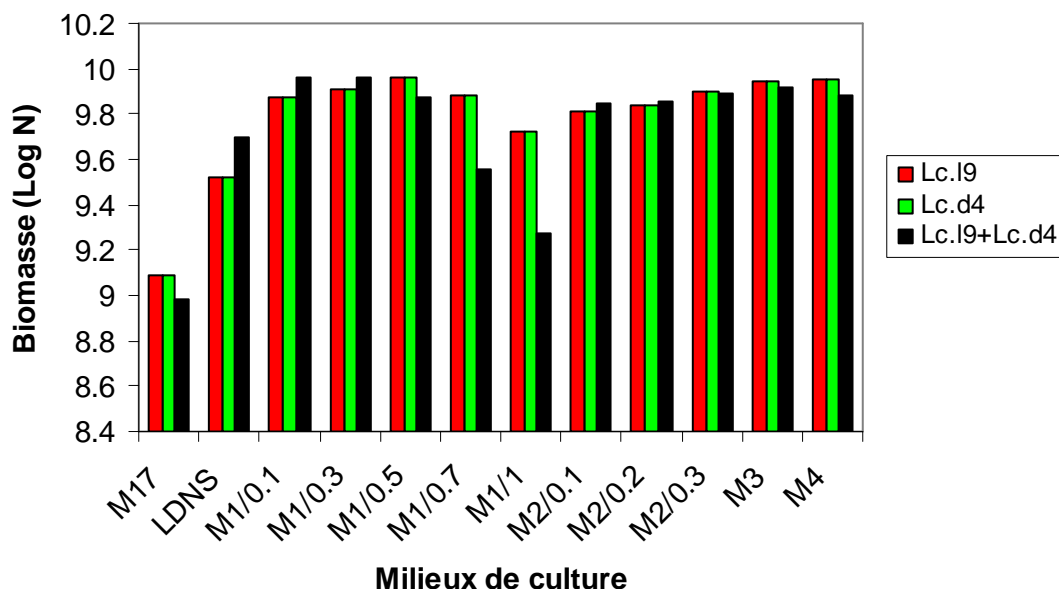


Figure 23 : Evolution de la biomasse au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M₁, M₂, M₃ et M₄ à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.

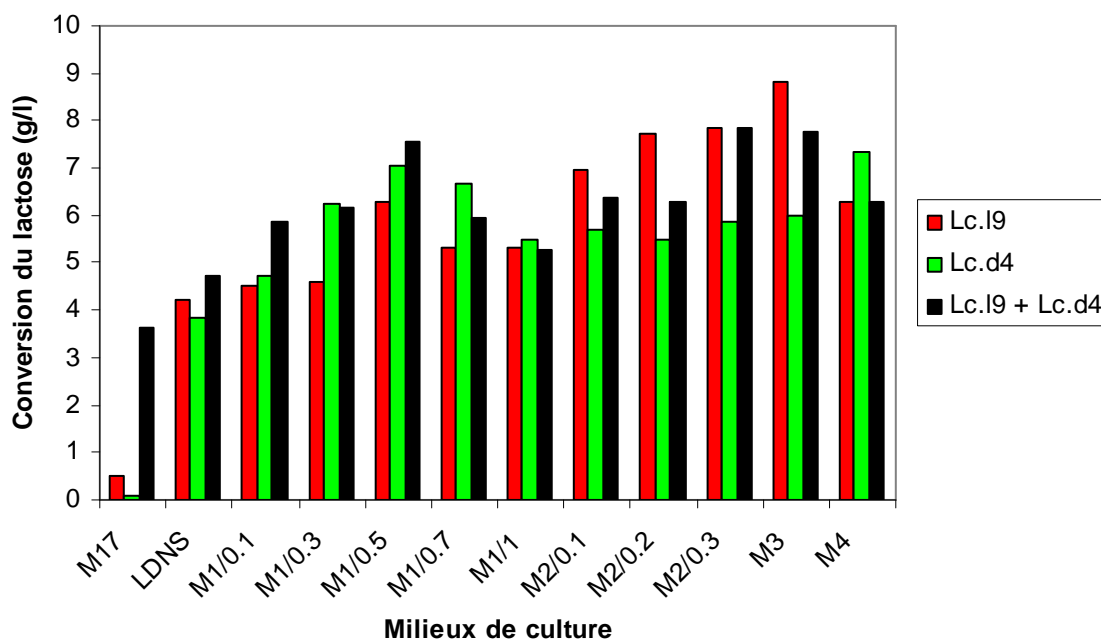


Figure 24 : Evolution de la conversion du lactose au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M₁, M₂, M₃ et M₄ à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.

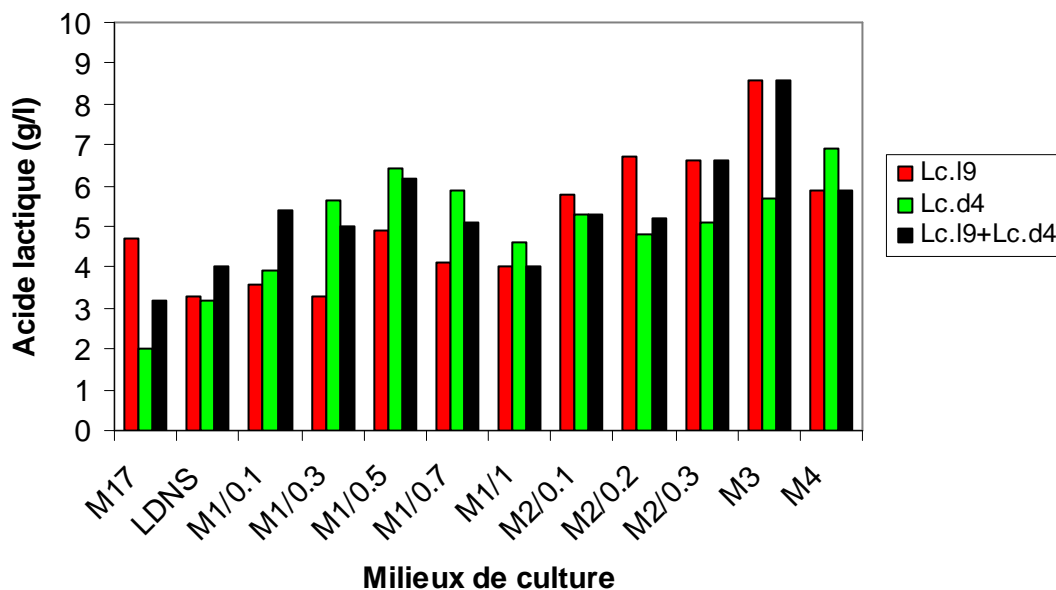


Figure 25 : Evolution de la production de l'acide lactique au cours de la croissance des souches utilisées en cultures pures et mixte sur les milieux de culture M17, LDNS, M₁, M₂, M₃ et M₄ à différents extraits secs avec un taux d'inoculation de 10 % de 24 h à 30°C.

D'après les figures 23, 24 et 25, nous avons noté ce qui suit:

- La culture mixte des deux souches a donné les plus importantes biomasses pendant 72 h d'incubation sur le milieu LDNS supplémenté à 0,1 et 0,3 % d'extrait de levure (figure 23).
- Les cultures pures des deux souches ont donné des fortes biomasses avec le milieu LDNS supplémenté à 0,5 % d'extrait de levure (figure 23).
- La conversion du lactose est importante sur le milieu M₃ par *Lc.19*, dans les milieux M₄ et M₁/0,5 pour *Lc.d4* et dans les milieux M₁/0,5, M₂/0,3 et M₃ pour la culture mixte (figure 24).
- La production de l'acide lactique est importante sur le milieu M₃ par *Lc.19* et la culture mixte. Par contre pour *Lc.d4*, le milieu M₄ est favorable pour une production meilleure (figure 25).

II.1.3.1 Effet de la concentration en extrait de levure

L'utilisation des concentrations en extrait de levure de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 et 1 % a abouti aux résultats illustrés par les figures 23, 24 et 25. La production maximale en acide lactique est atteinte à 0,5 % d'extrait de levure pour les souches utilisées (en culture pure et mixte).

Les extraits de levure permettent d'apporter une source additionnelle de peptides et d'acides aminés. Ils sont également des sources importantes de vitamines essentielles à la croissance des bactéries lactiques (Doleyres et Lacroix, 2005).

II.1.3.2 Effet des sels de magnésium

Les figures 23, 24 et 25 nous montre que :

- La conversion du lactose et la production de l'acide lactique par *Lc.l9* sont considérablement stimulées en présence de $MgSO_4$.
- Une concentration de 0,3 g/l de $MgSO_4$ a eu un effet positif sur l'augmentation de l'activité de la culture mixte.
- Une diminution de la production de l'acide lactique et la conversion du lactose a été enregistrée quand la souche *Lc.d4* a été cultivée dans le milieu M_2 .

Des sels de magnésium et de manganèse sont habituellement additionnés aux milieux, ces cations interviennent à plusieurs niveaux dans le métabolisme des bactéries lactiques. Beaucoup de micro-organismes exigent les ions bivalents comme cofacteurs tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} et Co^{2+} (Bellengier et al., 1997).

Selon Givry (2006), les voies métaboliques des souches, et plus particulièrement les enzymes, nécessitent en général la présence de cofacteurs tels que les ions. Cependant, les besoins en ions de ces bactéries lactiques diffèrent selon l'espèce.

Les éléments minéraux présents dans la composition du lactosérum supplémenté à l'extrait de levure semblent suffire aux besoins de *Lc.d4*. Plusieurs travaux, notamment ceux de Majorella et al. (1983) montrent que la présence d'éléments minéraux en excès inhibe la croissance du microorganisme.

II.1.3.3 Effet des autres ingrédients

Une addition supplémentaire de citrate et d'acétate respectivement sous forme acide citrique (4 g/l) et acétate de sodium (2,5 g/l) au milieu a été effectuée afin d'améliorer la production de l'acide lactique et évaluer l'impact de ces concentrations sur les cinétiques de production et de conversion par les souches utilisées.

Nous avons noté une amélioration de la production de l'acide lactique par *Lc.l9* et la culture mixte sur le milieu M_3 et par *Lc.d4* sur le milieu M_4 (figures 23, 24 et 25). Ces résultats ont été observés par Haddad et al. (1997) ainsi que Starrenburg et Hugenholtz (1991) chez *Lactococcus*.

Plusieurs auteurs ont démontré que la présence du citrate dans un milieu de propagation contenant une source d'hydrate de carbone fermentescible pouvait stimuler la croissance de certaines bactéries lactiques. Gagnon (2006) a démontré que les traitements effectués en zone de pH plus acide, la présence de 0,4 % de citrate a permis une utilisation plus importante du lactose et l'acétate de sodium est employé pour avoir un effet tampon sur le milieu. Le pouvoir tampon du milieu assure une baisse de pH plus lente que celle obtenue dans le lait, ce qui permet de prolonger la durée de la croissance bactérienne.

Chez les bactéries lactiques, la détection d'acétate dans le milieu de propagation est généralement associée à l'utilisation du citrate (Hugenholtz, 1993), la première étape de conversion du citrate est effectuée par l'enzyme citrate lyase, chez les bactéries utilisatrices du citrate, qui catalyse la réaction de clivage du citrate en acétate et en oxaloacétate (Harvey et Collins, 1962).

Après avoir procédé à la détermination du meilleur extrait sec et des meilleurs taux de suppléments en différents ingrédients, les milieux M₃ et M₄ adaptés à la production de l'acide lactique par les souches *Lc.l9* et *Lc.d4*, ont été utilisés pendant les fermentations en batch et continu

II.2 Fermentation en discontinue « batch »

Les fermentations lactiques par *Lc.l9* et *Lc.d4* en culture pure et mixte en vue d'améliorer les productions en acide lactique et du diacétyle ont été réalisées en batch à cellules libres et fixées sur support pouzzolane sous agitation de 100 trs/min à 30°C en milieux M17 supplémenté à 38 g/l de lactose, M₃ et M₄.

Pour cela, nous avons testé l'effet de l'âge et le taux de l'inoculum ainsi que les différentes granulométries du support sur les différentes évolutions. Par contre, des essais ont été effectués pour permettre de mettre en évidence le temps de séjour nécessaire pour une immobilisation efficace des souches sur pouzzolane.

II.2.1 Cinétique d'adhésion

Les caractéristiques physiques des grains de pouzzolane sont très différentes de celles des supports déjà utilisés en immobilisation des lactocoques tels que κ carraghénane, gomme gellan, agarose, gélatine, alginate, chitosane. La pouzzolane est une roche volcanique extraite de carrières. Elle est de couleur marron à grise. Elle apporte quelques minéraux, poreuse et abrasive, elle possède une surface de contact très importante, ce qui permet de favoriser la croissance des micro-organismes à l'interface solide/liquide (pouzzolane/milieu minéral liquide (Longieras, 2005)).

Selon Lazarova et Manem (1995), la durée de la phase de l'immobilisation est déterminée en fonction de la quantité de la matière organique totale fixée dans un intervalle de temps et en fonction de l'évolution de la densité cellulaire dans le surnageant et celle fixée sur le support.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 27. Celle-ci montre l'évolution des biomasses fraîche et sèche des différentes cultures à 30 °C en fonction du temps de rétention cellulaire fixé à 18 h, 24 h, 48 h et 72 h sur les différentes granulométries dans le milieu M₃. Le taux d'inoculation est fixé à 10 %. Des prises photographiques (photos 9 et 10) ont été effectuées en parallèle.

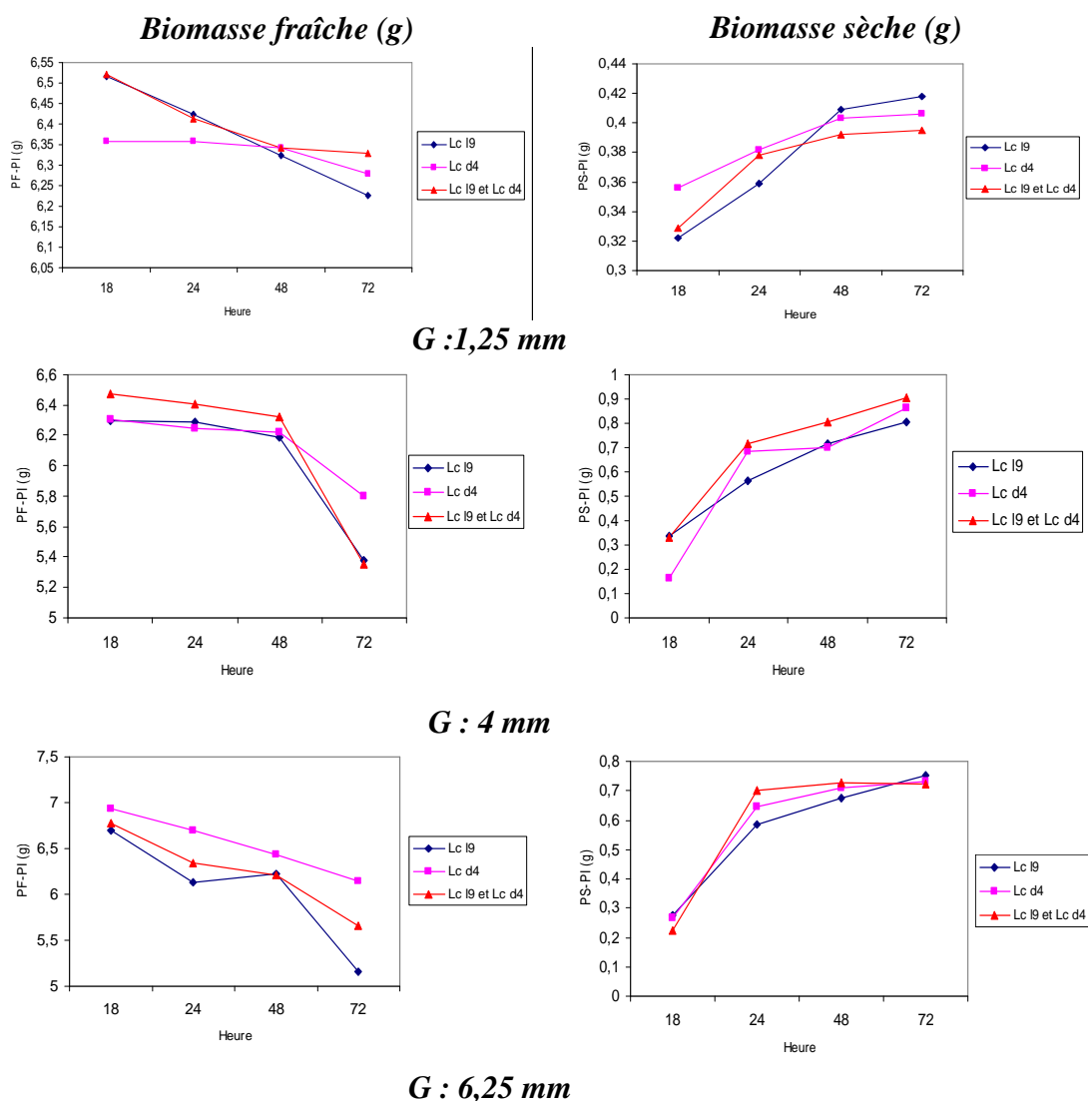
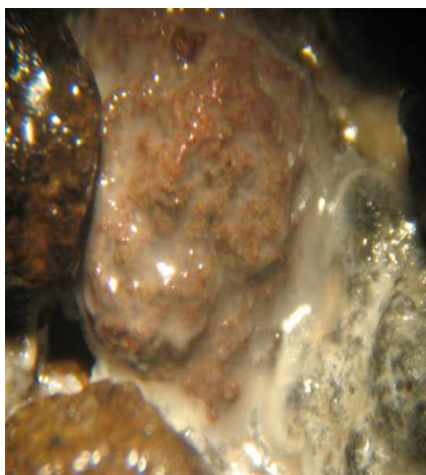


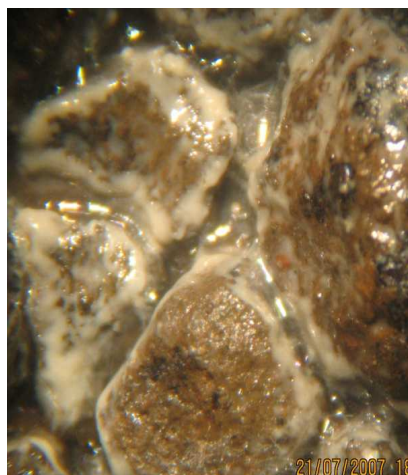
Figure 26 : Evolution des biomasses fraîche et sèche au cours de l'immobilisation des souches utilisées en culture pure et mixte sur pouzzolane de granulométrie 6,25 mm, 4 mm et 1,25 mm dans le milieu M₃ en fonction des différents temps de rétention.



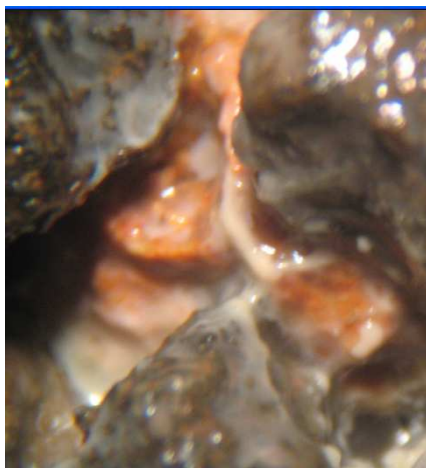
a/*Lc.19* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **6.25 mm**



b/*Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **6.25 mm**



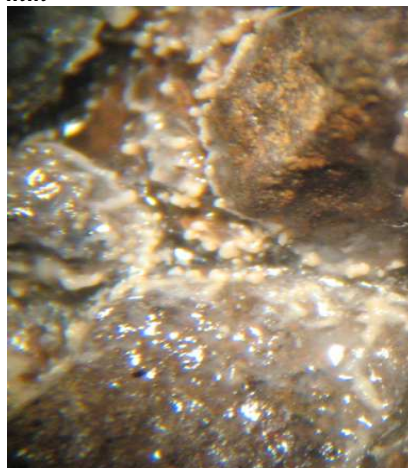
c/*Lc.19 et Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **6.25 mm**



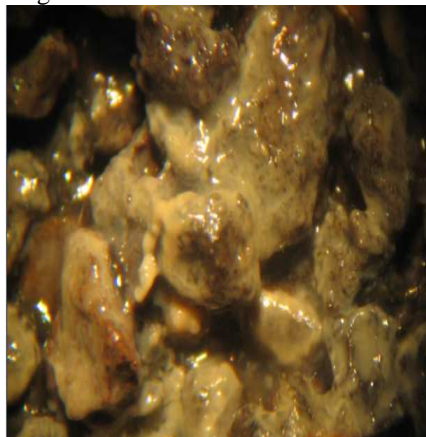
d/*Lc.19* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **4 mm**



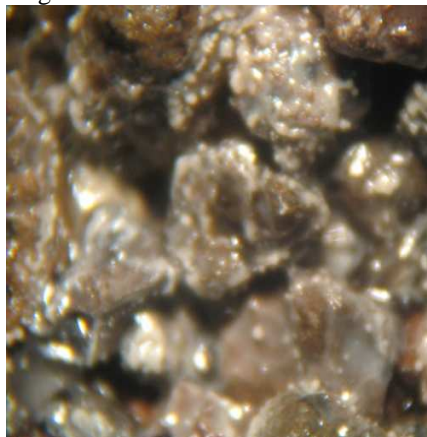
e/*Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **4 mm**



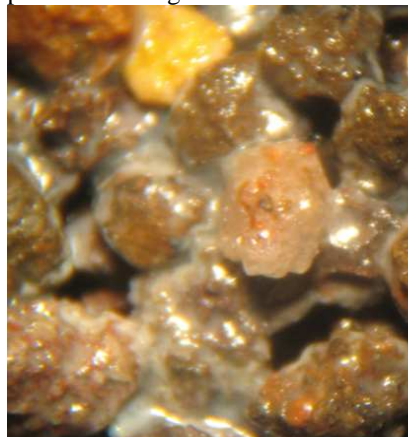
f/*Lc.19 et Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **4 mm**



g/*Lc.19* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **1.25 mm**

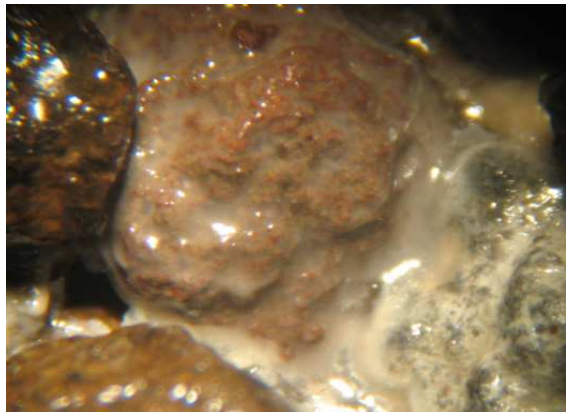


h/*Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **1.25 mm**

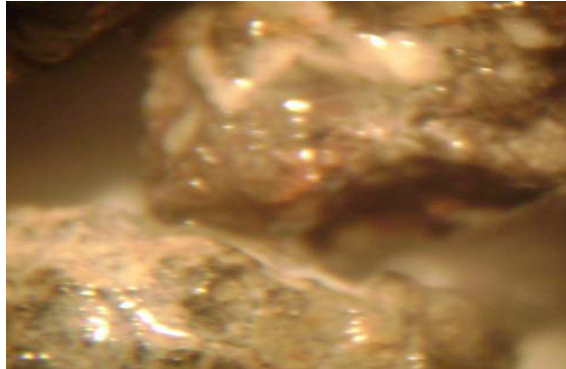


i/*Lc.19 et Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane de granulométrie de **1.25 mm**

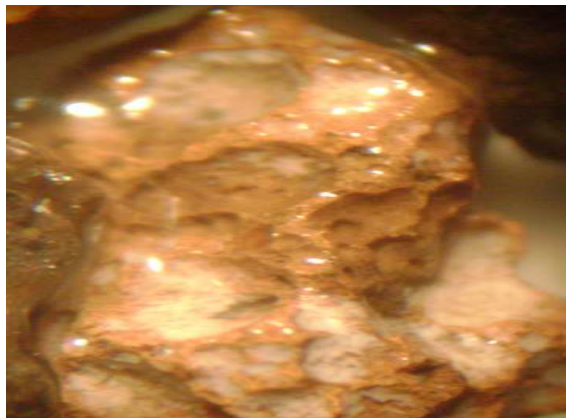
Photo 9 : Formation des biofilms par les souches utilisées en cultures pures et mixte sur les différentes granulométries de pouzzolane (Observation sous une loupe binoculaire).



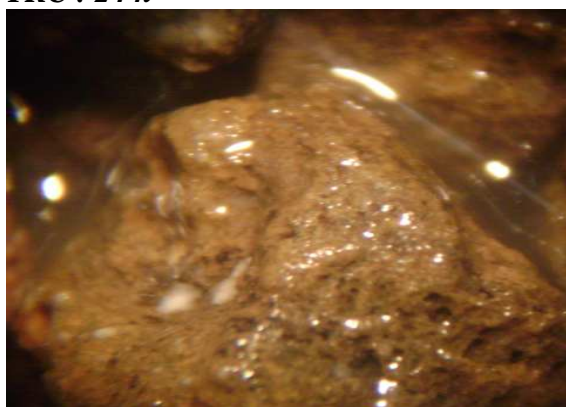
TRC : 72 h



TRC : 48 h



TRC : 24 h



TRC : 18 h

Photo 10 : Evolution du biofilm de *Lc.19* sur pouzzolane de granulométrie 6,25 mm dans le milieu M₃ en fonction des différents temps de rétention (Observation sous une loupe binoculaire).

Nous remarquons d'après la figure 26 que la culture pure de *Lc.l9* et la culture mixte se comportent d'une façon similaire. Les courbes montrent une allure rapide pour les deux types de biomasse. Par contre, la culture pure de *Lc.d4* présente une allure lente dans tous les cas, excepté pour la granulométrie de 6,25 mm.

Il ressort de ces constatations qu'une augmentation de la biomasse attachée n'est réellement importante qu'en fin de l'expérience où elle atteint son maximum en moyenne de 0,8 g pour 100 ml de milieu immergeant 14 g de pouzzolane pour les culture pures. Par contre, pour la culture mixte, nous avons enregistré une moyenne de 0,9 g dans les mêmes conditions précédentes.

Les récupérations des surnageants ont été procédées à 18 h, 24 h, 48 h et 72 h. Après chaque récupération, deux lavages successifs par une solution de corsodyl ou digluconate de chlohexidine 0,20 % sous une agitation modérée sont effectués. Corsodyl est une solution utilisée pour bain de bouche, elle a un effet bactériostatique, utilisée pour son pouvoir de détacher le biofilm avant le détartrage (Buccarello, 2005).

Les densités optiques de la biomasse dans le surnageant, des solutions du premier et deuxième lavage ont été déterminées par spectrophotométrie (figures 27).

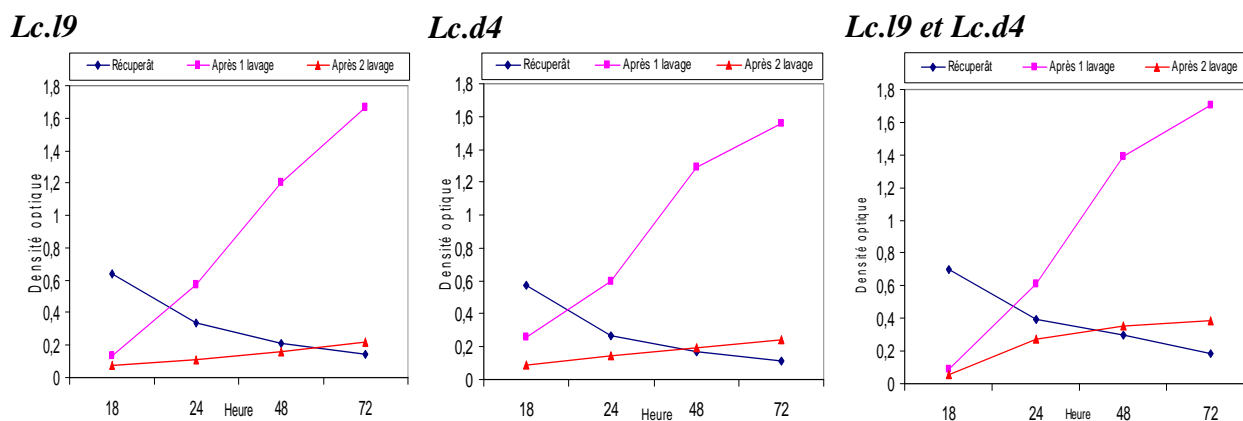


Figure 28 : L'évolution de la densité optique de la biomasse des différentes cultures dans le surnageant récupéré, les solutions du 1^{er} lavage et celles du 2^{eme} lavage, de granulométrie 6,25 mm, TI 10 % de 24 h à 30 °C.

D'après les résultats obtenus et durant les 72 h, nous avons noté une diminution, une augmentation et une augmentation moins sensible, de concentration en biomasse respectivement dans les surnageants, les solutions du 1^{er} lavage et les solutions du 2^{eme} lavage pour les trois cultures (figure 27).

A l'instar de ces notations, nous avons remarqué ce qui suit :

- L'adhésion est importante à partir de 48 h.
- Un temps de séjour inférieur à 24 h correspond à une adhésion très faible. La densité optique est maximale, elle représente les cellules qui n'ont pas été fixées sur le support.
- La période de 24 à 48 h correspond à une adhésion des souches par des interactions électrostatiques car le détachement est élevé ce qui explique l'élévation de la densité optique de la biomasse dans les solutions du premier lavage.
- Un temps de séjour supérieur à 48 h correspond à un attachement des cellules au support grâce aux liaisons covalentes, ce qui explique l'évolution moins progressive de la densité optique de la biomasse des solutions du deuxième lavage. Les cellules sont alors fortement liées au support mais ceci peut endommager la membrane cellulaire (Ramakrishna et Prakasham, 1999).

Selon Singh et *al.* (2006), l'attachement initial dure quelques secondes à quelques minutes. Après, il y a une formation de la double couche électrique diffuse qui est une source potentielle de nutriments pouvant induire une activité significative à l'interface solide – liquide, cette phase dure quelques minutes à quelques heures (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992). Le biofilm devient actif et mature après des heures à quelques jours.

Borja et *al.* (1994) ont arrêté les conditions du choix du support qui est lié à la nature du milieu utilisé en particulier sa composition et à l'état de surface du support, sa nature chimique et la taille (aire de surface) de la particule.

La rugosité est désignée par tous les auteurs comme le point le plus favorable à un support pour la rétention de biomasse (Fox et *al.*, 1990 ; Kida et *al.*, 1990 ; Lauwers et *al.*, 1990 ; Heijnen et *al.*, 1992 ; van Loodsrecht et Heijnen, 1993 ; Gjaltema et *al.*, 1997).

Une immobilisation efficace permet d'améliorer la résistance de la souche aux conditions qui lui sont normalement néfastes. Pour atteindre ce but, nous avons retenu pour tous les essais d'immobilisation un temps de séjours égal à plus de 72 h.

II.2.2 Fermentation en batch à cellules libres

Le milieu M17 a été préparé et supplémenté à 38 g / l de lactose pour les essais en batch. Cette supplémentation a été procédée pour :

- Comparer la conversion du lactose de notre milieu optimisé avec celle effectuée dans le milieu M17 modifié (milieu de référence).
- Eviter l'épuisement de la source carbonée dans les premières heures de fermentation.

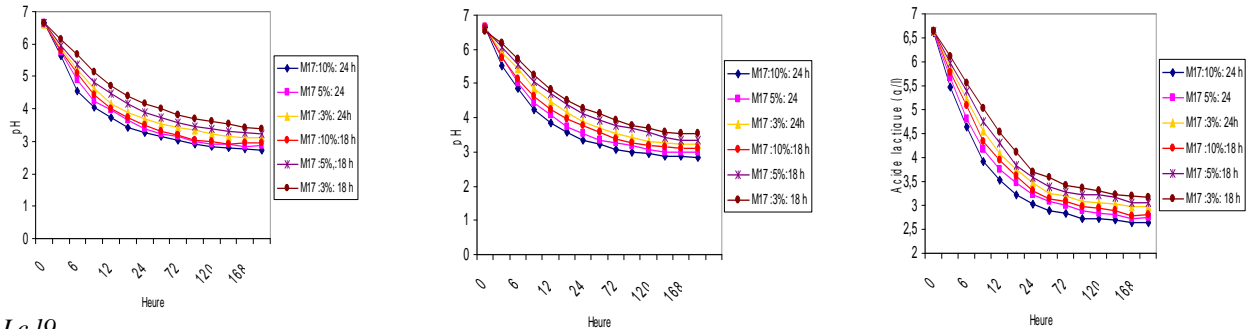
Les vitesses spécifiques de croissance, de conversion du lactose et de la production de l'acide lactique et du diacétyle en discontinue « batch » ont été déterminées au cours de la phase exponentielle de croissance dans le milieu M17 supplémenté au lactose et le milieu lactosérum déprotéiné supplémenté ou non.

Les conditions de fermentation sont fixées comme suit :

- Taux d'inoculation : 3 %, 5 % et 10 %.
- Age d'inoculum : 18 h et 24 h.
- Température d'incubation : 30 °C.
- Milieux d'essais : M17 modifié (03 cultures), LDNS (03 cultures), M₃ (culture pure de *Lc.l9* et culture mixte *Lc.l9* et *Lc.d4*) et M₄ (culture pure de *Lc.d4*).
- Agitation : 100 trs/min
- pH non contrôlé.
- Durée de la fermentation : 192 h.

Les résultats indiqués sur les figures 28 à 39 montrent les évolutions du pH, de la biomasse, des productions de l'acide lactique et diacétyle ainsi que la conversion du lactose dans les milieux d'essais.

II.2.2.1 Sur milieu M17 supplémenté

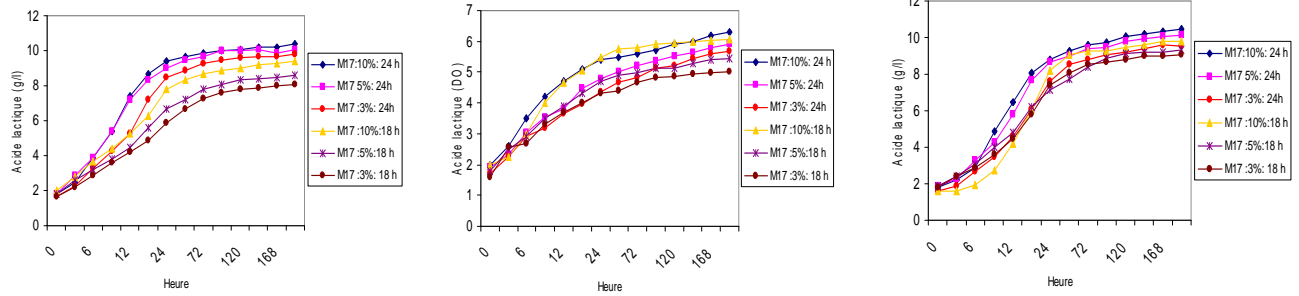


Lc.19

Lc.d4

Lc.19 et Lc.d4

Figure 28 : Suivi en batch du pH des souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn..

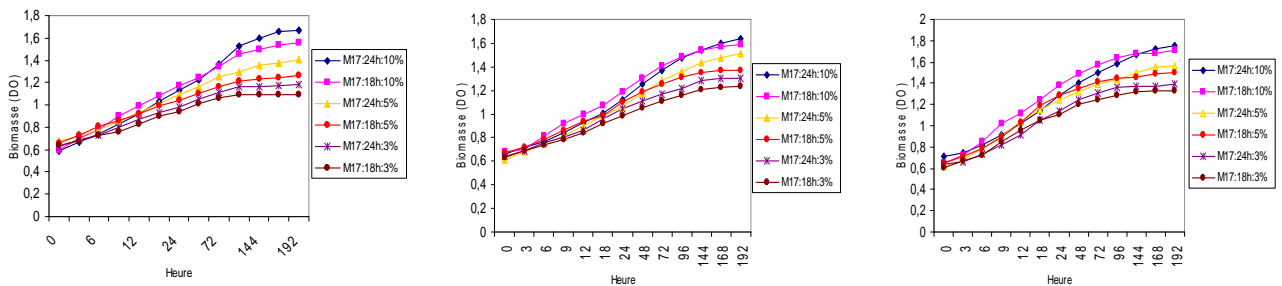


Lc.19

Lc.d4

Lc.19 et Lc.d4

Figure 29 : Suivi en batch de la production de l'acide lactique par les souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn..

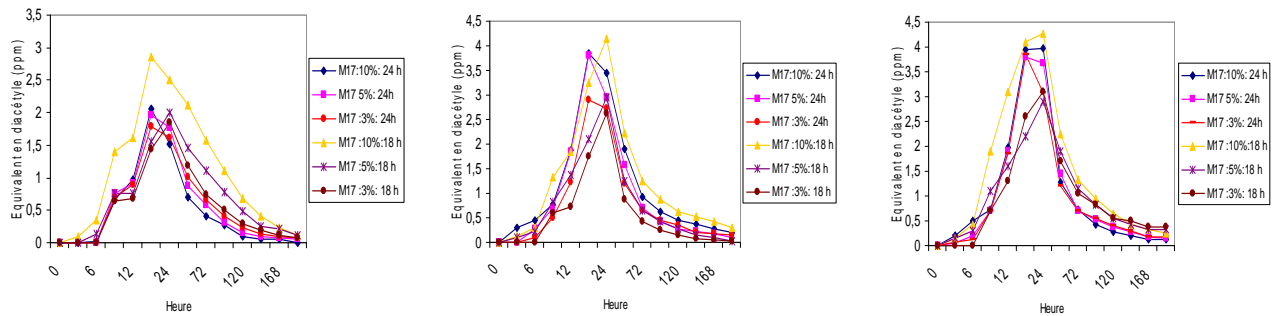


Lc.19

Lc.d4

Lc.19 et Lc.d4

Figure 30 : Suivi en batch de la biomasse dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn..

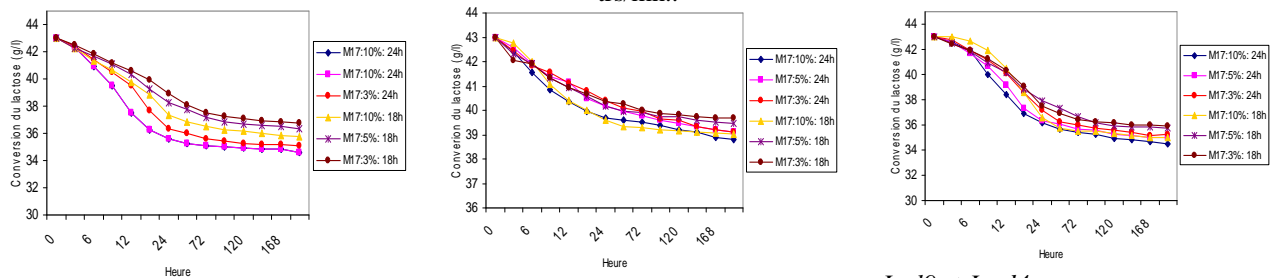


Lc.19

Lc.d4

Lc.19 et Lc.d4

Figure 31 : Suivi en batch de la production de diacétyle par les souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn..



Lc.19

Lc.d4

Lc.19 et Lc.d4

Figure 32 : Suivi en batch de la conversion du lactose par les souches utilisées dans le milieu M17 à 30 °C et 100 trs/mn...

Les figures 28 au 32 indiquent que les temps de latence ne varient pas considérablement avec les différents taux d'inoculation. Par contre, nous avons remarqué que les profils des courbes de croissance et de productions obtenues pour les trois taux étaient lents en culture pure des deux souches par rapport à la culture mixte.

II.2.2.2 Sur milieux M₃ et M₄

Les résultats obtenus durant la fermentation discontinue à cellules libres en fonction du taux et âge de l'inoculum pour les cultures pures et mixte montrent que les productions de la biomasse, l'acide lactique et le diacétyle ainsi que la conversion du lactose ont été maximales avec un taux et l'âge de l'inoculum respectivement de 10 % et 24 h pour *Lc.19* et la culture mixte sur le milieu M₂ et *Lc.d4* sur le milieu M₄.

Les courbes montrant les meilleures évolutions sur les milieux M₃ et M₄ sont indiquées dans les figures 33, 34 et 35.

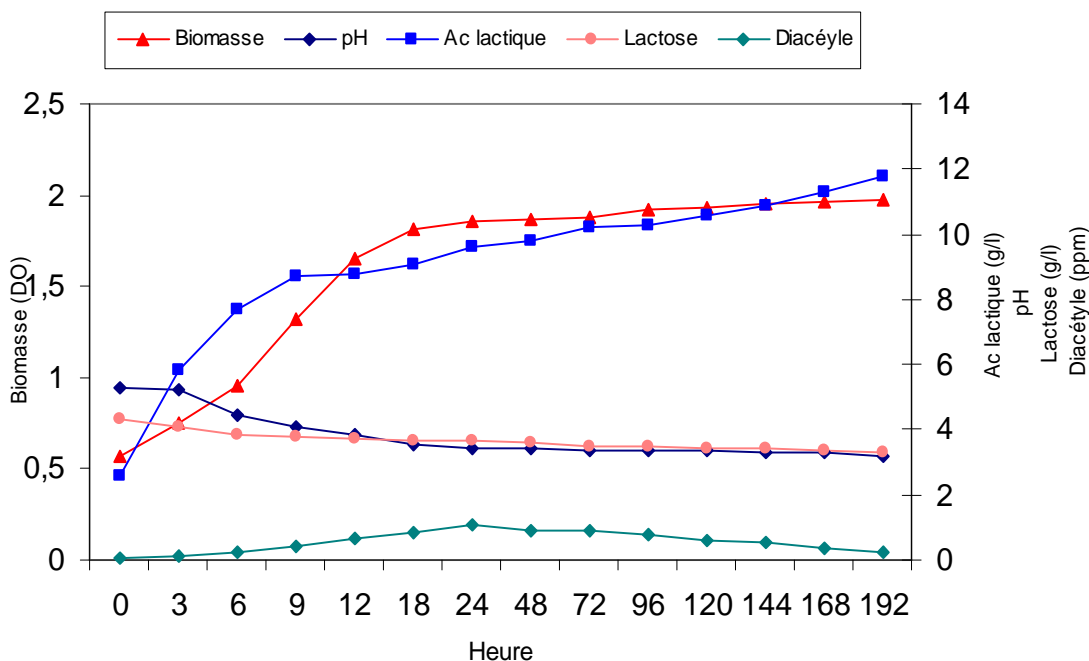


Figure 33: L'évolution du pH, biomasse, acide lactique et conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.19* en batch à cellules libres (à taux d'inoculation 10 %, âge de l'inoculum 24 h dans le milieu M₃ à 30 °C et à 100 trs/mn).

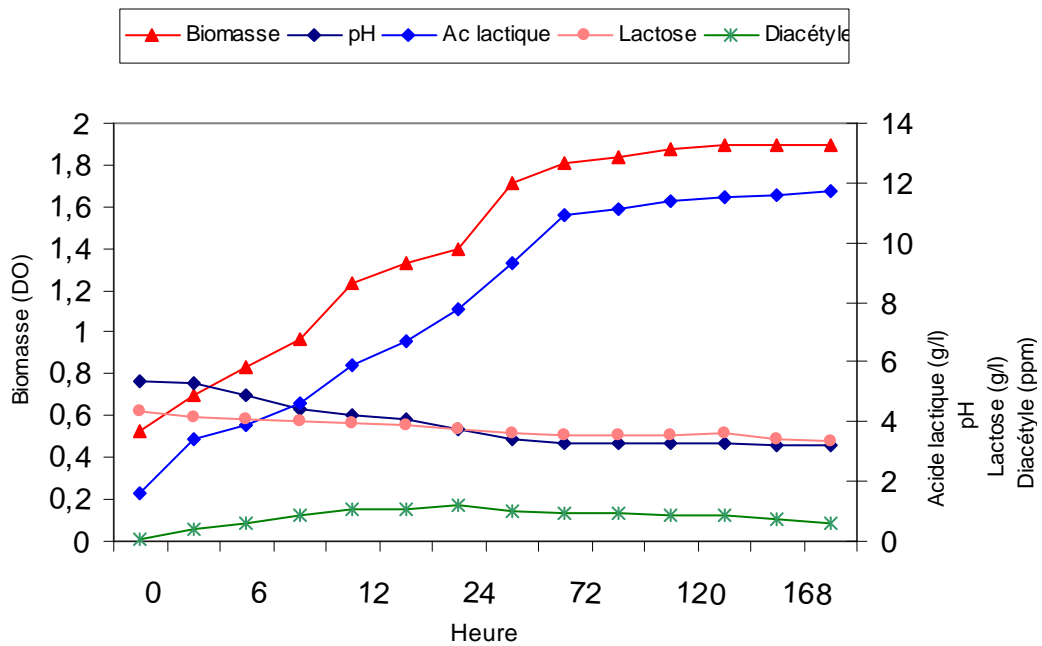


Figure 34: L'évolution du pH, biomasse, acide lactique et conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.d4* en batch à cellules libres (à taux d'inoculation 10 %, âge de l'inoculum 24 h dans le milieu M₄ à 30 °C et à 100 trs/mn).

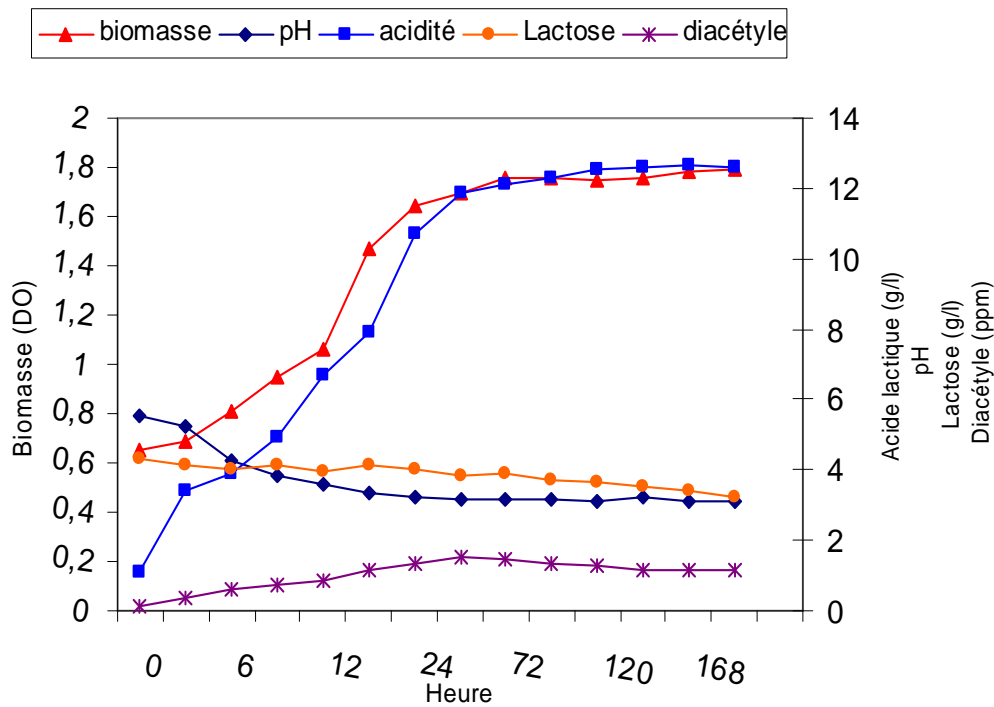


Figure 35 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique et conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.19* et *Lc.d4* en batch à cellules libres (à taux d'inoculation 10 %, âge de l'inoculum 24 h dans le milieu M₃ à 30 °C et à 100 trs/mn).

En comparant les résultats avec ceux trouvés avec le milieu de référence M17 supplémenté au lactose, nous avons obtenus les figures 36, 37 et 38 qui suivent :

II.2.2.2.1 Evolution de la production de la biomasse

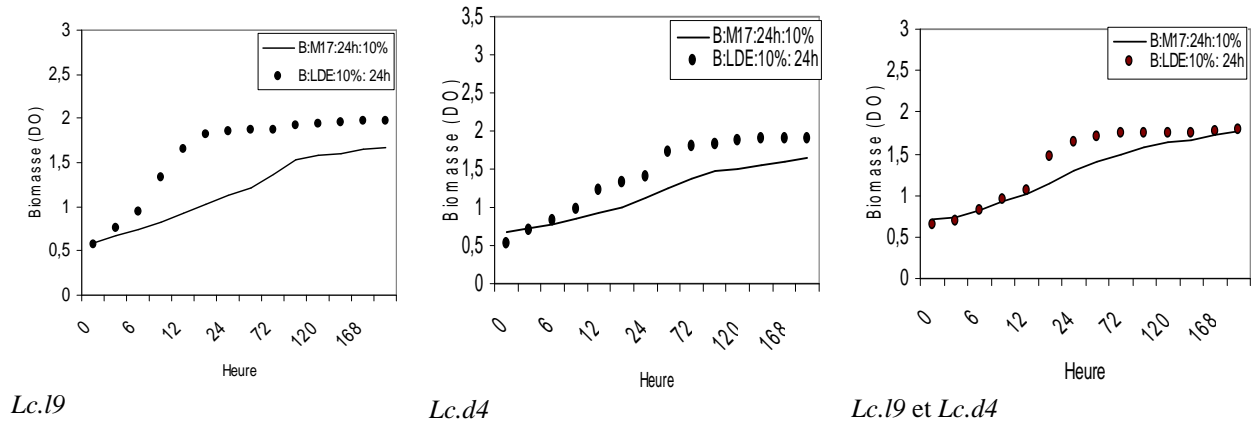


Figure 36 : Suivi en batch de la croissance des souches utilisées dans le milieu M17 modifié, M₃ et M₄ à 30 °C et 100 trs/mn.

Nous constatons sur les graphiques de la figure 36 que la courbe de la croissance de la souche *Lc.19* a un profil rapide par rapport à celle de la croissance sur le milieu M17 modifié.

II.2.2.2.2 Production de la production de l'acide lactique

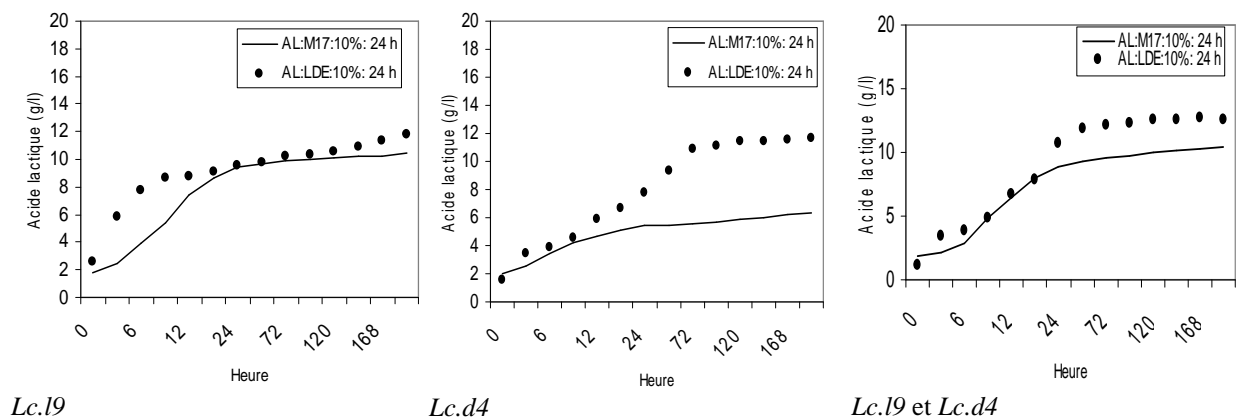


Figure 37 : Suivi en batch de la production de l'acide lactique par les souches utilisées dans le milieu M17 modifié, M₃ et M₄ à 30 °C et 100 trs/mn.

La concentration maximale en acide lactique a été atteinte à 9,2 g/L pour la souche *Lc.19*, à 10,1 g/l pour la souche *Lc.d4* et à 11,5 g/l pour la culture mixte en milieux M₃ et M₄. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues en milieu M17 (figure 37).

II.2.2.2.3 Production de la production du diacétyle

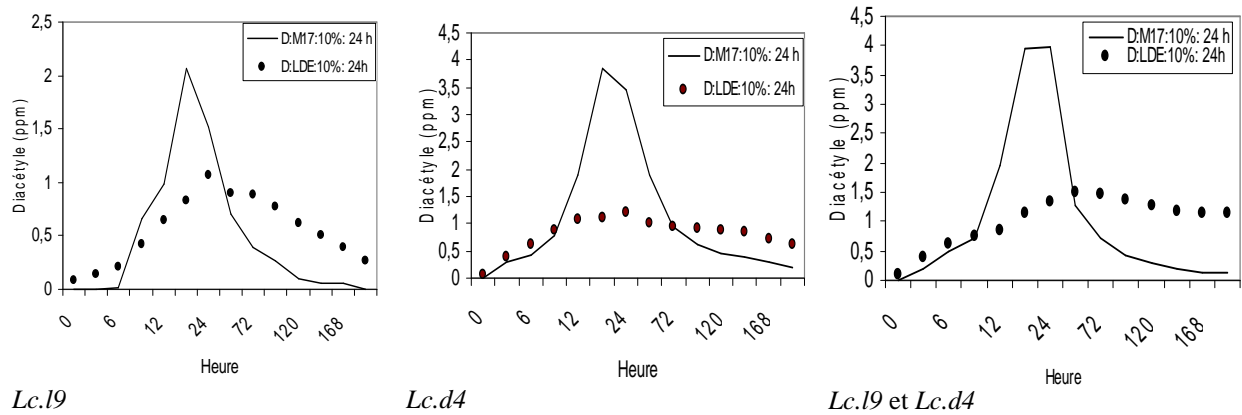


Figure 38: Suivi en batch de la production de diacétyle par les souches utilisées dans le milieu M17 modifié, M₃ et M₄ à 30 °C et 100 trs/mn.

L'examen de la figure 38 montre que la production du diacétyle est meilleure pour toutes les cultures sur M17 modifié que sur M₃ et M₄. La production élevée de diacétyle sur le milieu M17 peut s'expliquer que, les substances tampons contenues dans ce dernier permettent à la souche sur M17 de rester active plus longtemps possible dans la zone de pH favorable (4,7 – 5) ce qui permet de transformer les citrates en diacétyle et empêcher la réduction de ce dernier en acétoïne et butylène glycol (Walsh et Cogan, 1973).

II.2.2.2.4 Evolution de la conversion du lactose

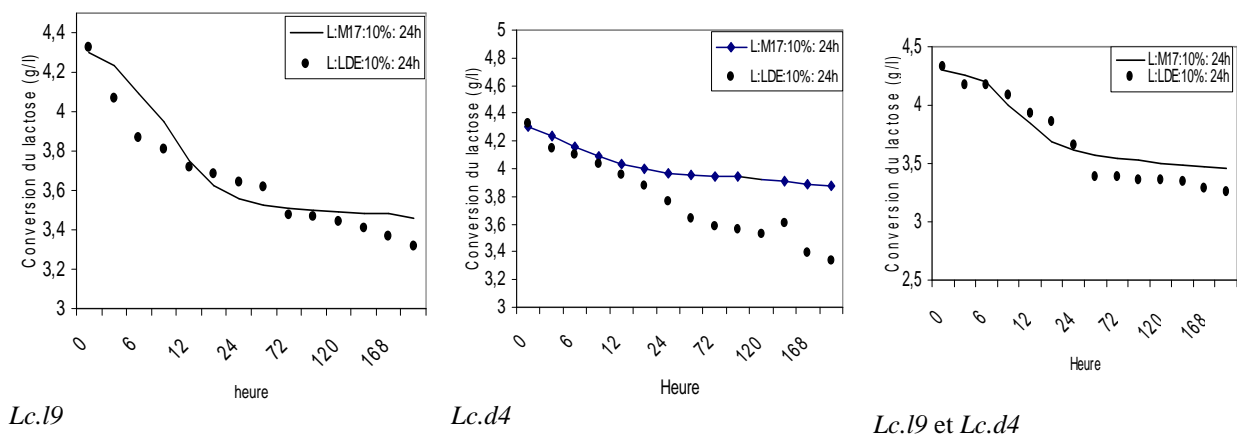


Figure 39 : Suivi en batch de la conversion du lactose dans le milieu M17 modifié et milieu M₃ et M₄ à 30 °C et 100 trs/mn.

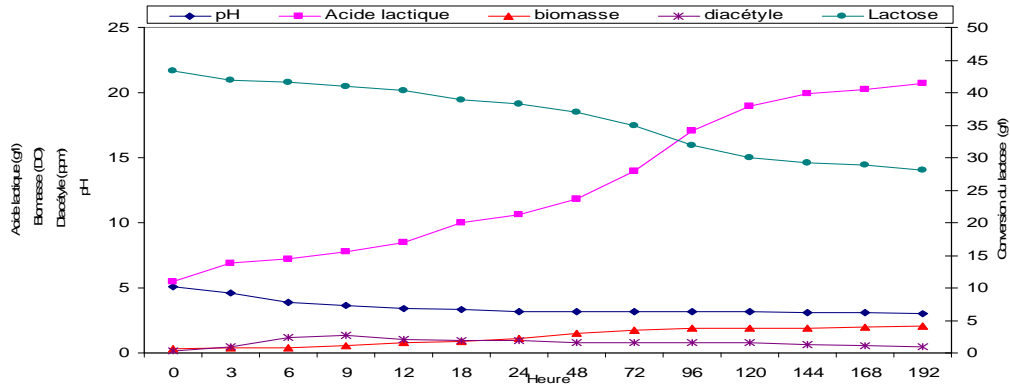
La conversion du lactose dans les 3 milieux est maximale en fin des fermentations (Figure 39). Une conversion rapide et importante est enregistrée par la souche *Lc.d4* sur les 3 milieux comparativement à celle cultivée dans le M17 modifié.

II.2.3 Fermentation en discontinue « batch » à cellules immobilisées sur milieux M₃ et M₄

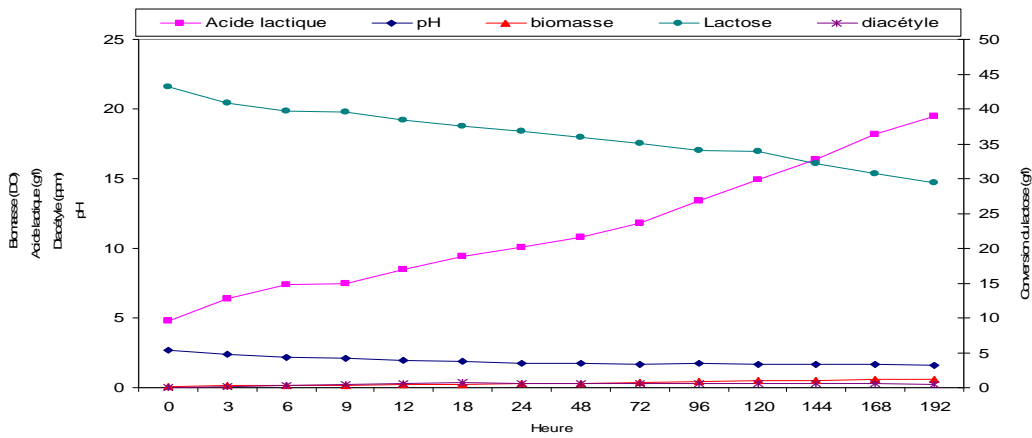
En cellules immobilisées sur support pouzzolane, les conditions de fermentation sont fixées comme suit :

- Taux d'inoculation : 10 %.
- Age d'inoculum : 18 h et 24 h.
- Granulométrie : 1,25 mm, 4 mm et 6,25 mm
- Température d'incubation : 30 °C.
- Milieux d'essais : LDNS (03 cultures), M₃ (culture pure de *Lc.l9* et culture mixte *Lc.l9* et *Lc.d4*) et M₄ (culture pure de *Lc.d4*).
- Agitation : 100 trs/min
- pH non contrôlé.
- Durée de la fermentation : 192 h.

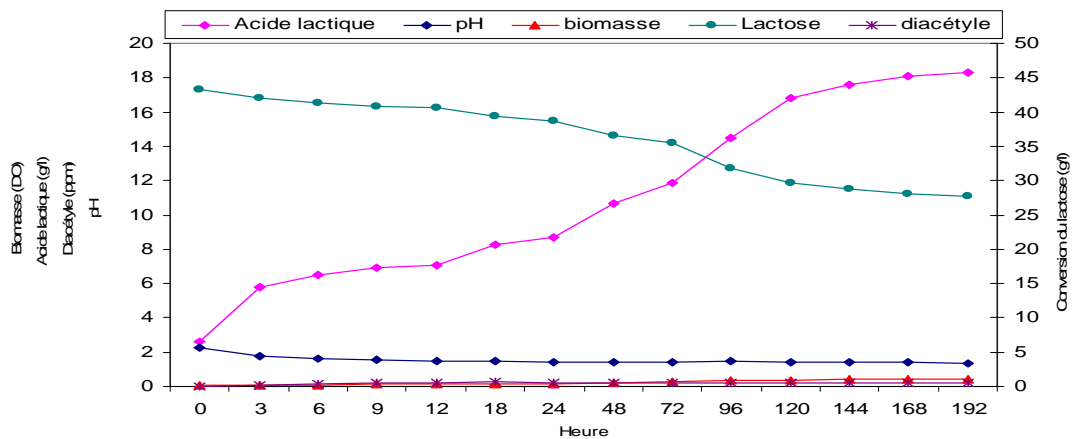
Les résultats indiqués sur les figures 40, 41 et 42 montrent les évolutions du pH, de la biomasse, des productions de l'acide lactique et diacétyle ainsi que la conversion du lactose par les souches fixées sur les 3 granulométries.



6.25 mm

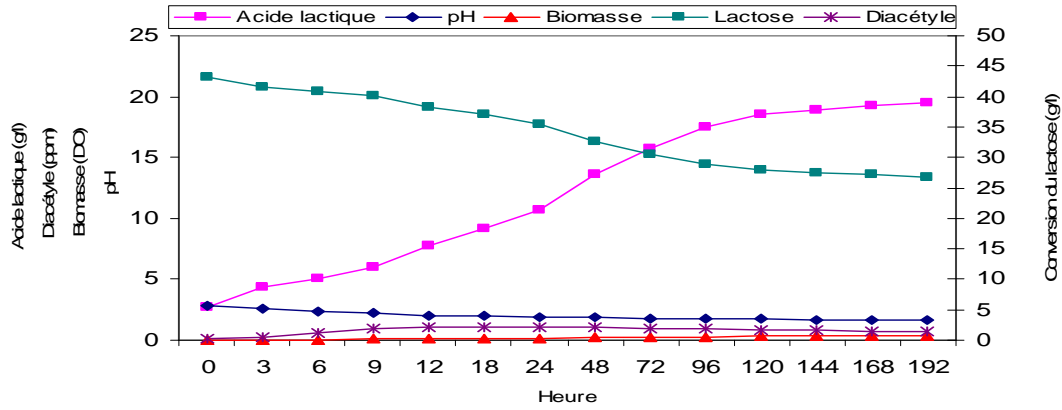


de 4 mm

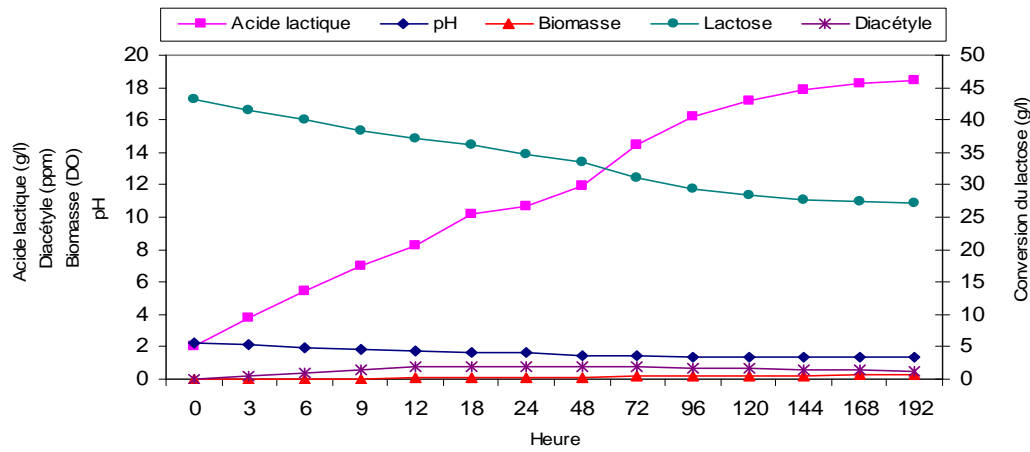


1.25 mm

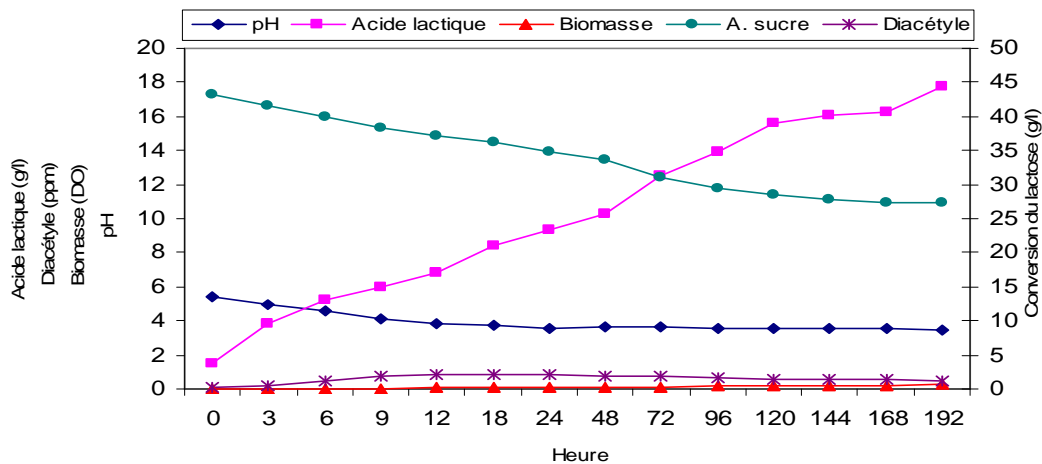
Figure 40 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique, diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.19* immobilisée sur pouzzolane en batch (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M₃ à 30 °C et à 100 trs/mn).



6.25 mm



de 4 mm



1.25 mm

Figure 41 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.d4* immobilisée sur pouzzolane en batch (taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M₄ à 30 °C et à 100 trs/mn).

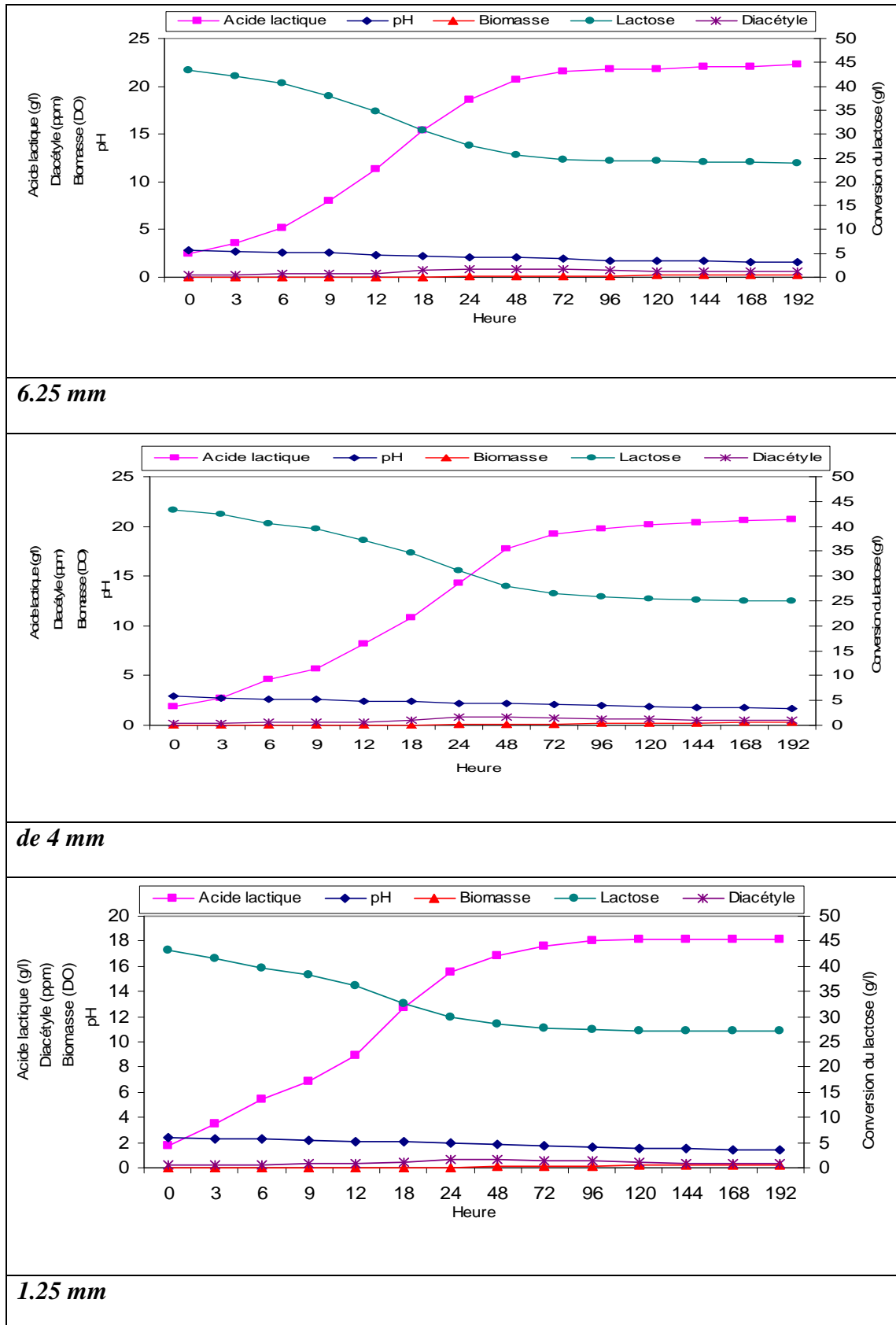


Figure 42 : L'évolution du pH, biomasse, acide lactique diacétyle et conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.19* et *Lc.d4* immobilisées sur pouzzolane en batch (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu M₃ à 30 °C et à 100 trs/mn).

D'après les figures 40, 41 et 42, les souches présentent des comportements similaires qu'elles soient en culture pure ou mixte. Pour la culture mixte, les courbes de la figure 42 présentent des allures rapides pour toutes les évolutions en fonction des 3 granulométries. Ces mêmes figures montrent des cinétiques de la production du diacétyle très faibles.

Les figures 43 et 44 nous montrent les productions et la conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.19* et *Lc.d4* libres et immobilisées dans le temps en fonction de l'âge et taux d'inoculum ainsi la granulométrie, par contre les taux sont rapportés en valeurs dans les tableaux 21 et 22. A l'instar des résultats reportés sur les figures et tableau, il a été enregistré globalement:

- Meilleures croissance, production du diacétyle et conversion du lactose dans le milieu M17 que dans le milieu LDS.
- Meilleures productions d'acide lactique dans le milieu M17 par *Lc.19* (quelque soit le taux et l'âge de l'inoculum) et la culture mixte (taux jeunes), dans le milieu LDS, par *Lc.d4* (quelque soit le taux et l'âge de l'inoculum) et la culture mixte (taux âgés).

L'âge de l'inoculum et son taux apparaissent avoir un effet déterminant lors de la production d'acide lactique et du diacétyle ainsi que la conversion du lactose dans les milieux M17, M₃ et M₄. Les différentes fermentations effectuées nous permettent d'avancer que :

- Une souche trop jeune ne favorise pas un bon rendement (M₃ et M₄).
- Une meilleure production est obtenue par une souche vieille de 24 h à cellules libres et de 48 h à 72 h à cellules fixées sur pouzzolane (figures 43 et 44).

Des essais ont été réalisés à partir d'un inoculum plus âgé de 24 h, 48 h et 72 h, puisque nous avons démontré précédemment que cela permettait d'augmenter le rendement de production et de conversion. Cependant, il a été noté que :

- Pour des concentrations plus élevées, les souches présentaient une phase de latence d'environ 4 h à 6 h sauf pour le cas de *Lc.19*, ce qui est trop long pour présenter un intérêt dans le cas de cellules libres (figures 43).
- Avec les cellules fixées, la production en acide lactique et du diacétyle a débuté par une meilleure valeur qu'en cas de cellules libres (figures 43 et 44).

- Les souches testées individuellement présentent un niveau final d'acidification exprimée en acide lactique compris entre 7,40 g/l sur LDS et 10,4 g/l sur M17 cas de cellules libres contre 15,7 g/l cas de cellules fixées pour *Lc.l9*, entre 10,1 g/l dans LDS et 6,30 g/l dans M17 en cellules libres contre 16,8 g/l en cellules fixées pour *Lc.d4* (tableaux 21 et 22).
- En culture mixte, le taux d'inoculation 10 % de 24 h est plus efficace et la durée de fermentation est courte. Avec ce dernier, la production de l'acide lactique a atteint 11,5 g/l dans LDS et 10,5 g/l dans M17 en cellules libres contre 19,8 g/l en cellules fixées (tableaux 22 et 23).
- L'agitation qui est liée à l'accessibilité des souches au substrat a amélioré la production de l'acide lactique et du diacétyle.

Pour le mode batch à cellules immobilisées, l'acide lactique présente les meilleures valeurs en culture mixte, son taux maximal a atteint 19,8 g/l pour la granulométrie de 6,25 mm. La culture pure de *Lc.d4* a montré une production meilleure en diacétyle pour les trois (3) granulométries, cette production est évaluée entre 1,95 et 2,03 ppm (tableaux 22).

Les concentrations finales du lactose diffèrent entre la culture mixte et la culture pure ainsi que le diamètre des grains de pouzzolane d'où nous avons évalué la conversion importante avec la culture mixte des deux souches utilisées immobilisées sur la pouzzolane de granulométrie de 6,25 mm qui est de 46,81 % suivi par celle de la culture mixte sur la pouzzolane de granulométrie de 4 mm (tableaux 22).

Selon les résultats du tableau 21 et 22, les rendements globaux de la production de l'acide lactique calculés par rapport au substrat sont similaires dans tous les cas avec une moyenne de 98 % à cellules immobilisées, et entre 63 et 98 % à cellules libres. Par contre le rendement en diacétyle est très faible dans les deux cas (cellules libres et fixées).

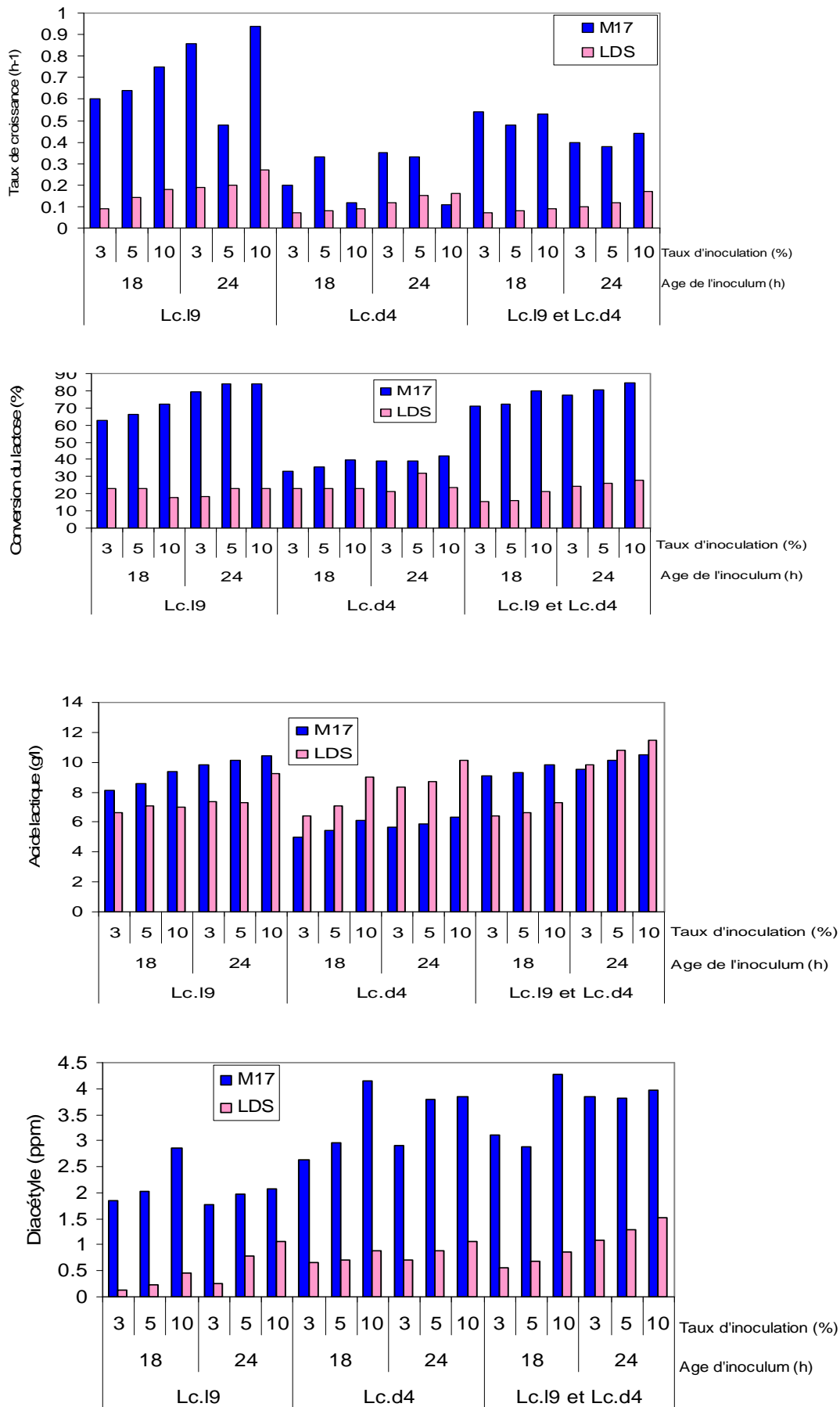


Figure 43 : Production de l'acide lactique, du diacétyle et de la conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.I9* et *Lc.d4* batch à cellules libres à différents taux d'inoculation et âges de l'inoculum dans les milieux M17 et LDS à 30 °C et à 100 trs/mn

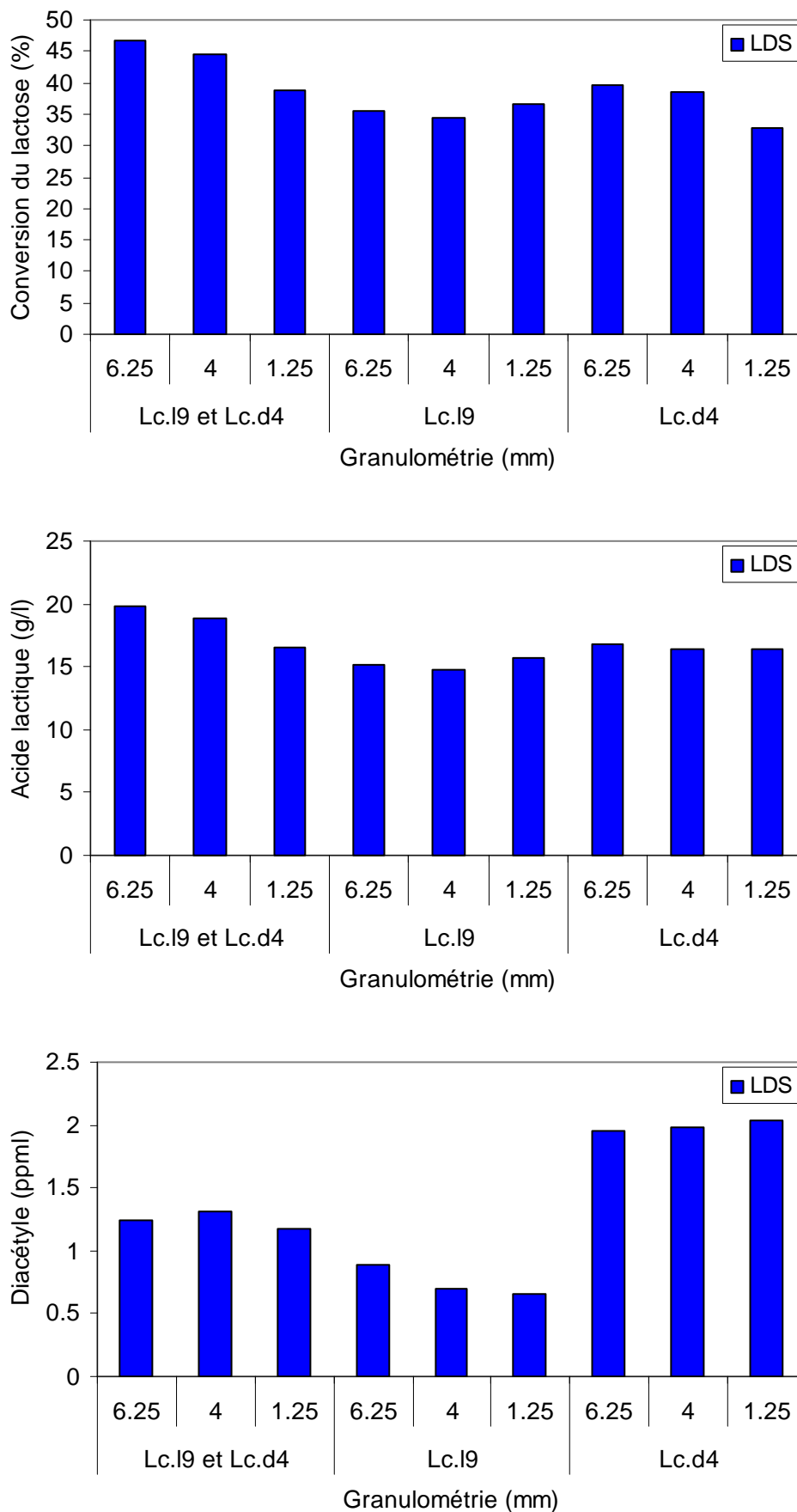


Figure 44 : Production de l'acide lactique, du diacétyle et de la conversion du lactose au cours de la croissance de *Lc.19* et *Lc.d4* en batch immobilisées sur différentes granulométries de pouzzolane en culture pures et mixte en discontinu dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn

Tableau 21: Rendements des différentes productions en batch à cellules libres dans les milieux M17 et LDS.

Souches	Age h	T.I. %	Rend. (g acide lactique/ g sucre)		Rend. g dia./ g suc.)	
			M17	LDS	M17	LDS
<i>Lc.19</i>	18	3	0,3	0,66	6,14	0,01
		5	0,3	0,71	6,67	0,02
		10	0,3	0,92	9,45	0,06
	24	3	0,29	0,94	6,18	0,03
		5	0,28	0,73	7,05	0,08
		10	0,29	0,92	7,19	0,11
<i>Lc.d4</i>	18	3	0,35	0,64	7,48	0,07
		5	0,36	0,71	8,31	0,07
		10	0,36	0,89	11,6	0,09
	24	3	0,34	0,91	8,57	0,08
		5	0,35	0,63	10,8	0,06
		10	0,35	0,98	11	0,1
<i>Lc.19 et Lc.d4 (v/v)</i>	18	3	0,3	0,98	10,4	0,09
		5	0,3	0,96	9,66	0,1
		10	0,28	0,79	15	0,09
	24	3	0,29	0,93	13,4	0,1
		5	0,29	0,96	13	0,11
		10	0,29	0,95	13,8	0,13

Tableau 22: Rendements des différentes productions en batch à cellules immobilisées dans le milieu LDS.

Culture	Granulom.	Rend. (g acide lactique/ g sucres)	Rend. (g diacétyl/g sucres) $\cdot 10^{-6}$
<i>Lc.19 et Lc.d4</i>	6,25	0.98	19,8
	4	0.98	18,8
	1,25	0.98	16,5
<i>Lc.19</i>	6,25	0.99	15,2
	4	0.99	14,7
	1,25	0.99	15,7
<i>Lc.d4</i>	6,25	0.98	16,8
	4	0.98	16,4
	1,25	0.99	16,4

Ces constatations sont discutées comme suit :

Gagnon (2006) a indiqué que la croissance des bactéries lactiques est liée à la production d'acide lactique. Dans des conditions de cultures données, chaque souche possède un taux de croissance et une vitesse spécifique d'acidification caractéristiques des conditions de culture utilisées; pH, température et concentration des substrats. Selon Givry (2006), la phase de latence est augmentée sensiblement et l'activité maximale est obtenue pour un temps plus long d'incubation. De plus, une culture âgée de plus de 48 h utilisée comme inoculum, provoque une augmentation de la phase de latence, mais sans diminuer l'activité finale.

Il a été noté qu'un taux d'inoculation supérieur entraîne une forte production et conversion importante. Chez les *Lactococcus*, Li et al. (2001) ont mis en évidence que la densité cellulaire peut affecter la résistance des cellules à l'acidité. En effet, des cellules planctoniques à forte densité résistent significativement mieux à un stress acide que des cellules à faible concentration.

L'amélioration en production et en conversion a été enregistrée avec l'agitation en mode batch que ce soit en cellules libres ou fixées. Petrov et al. (2008), ont démontré que l'agitation à 100 trs / mn correspond à une production de l'acide lactique maximale pour la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. Une agitation modérée est idéale pour la production puisqu'elle permettrait à la fois d'obtenir une production d'acide lactique intéressante avec des rendements plus importants (Givry, 2006). L'agitation favorise les phénomènes de diffusion vers le biofilm mais, par son effet mécanique trop fort, affecte négativement la productivité volumétrique du système en réduisant l'épaisseur de la couche périphérique contenant la biomasse active (Sodini-Gallot et al., 1995 ; Arnaud et al., 1993).

Selon Divies et al. (1994), la biosynthèse des composés aromatiques est généralement améliorée en culture mixte comprenant les espèces acidifiantes telles que *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* associées aux espèces aromatisantes telles que *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Plusieurs auteurs ont démontré que l'utilisation du citrate par *L. diacetylactis* était plus élevée à pH acide, du à l'activité supérieure de l'enzyme catalysant le transport du citrate à l'intérieur de la cellule, la citrate perméase ou CitP (Garcia-Quintâns et al, 1998; Cachon et Diviès, 1995; Hugenholtz et al, 1993). Cachon et Diviès (1994) ont démontré que le taux spécifique d'utilisation du citrate était accru lorsque le pH du milieu diminuait de 6,5 à 4,5.

En fermentation discontinue à cellules fixées sur pouzzolane, nous avons enregistré l'évolution de la densité optique du bouillon de culture pendant 192 h. Cette observation est justifiée par Senthuran et *al.* (1999) qui montrent que la multiplication des bactéries au sein de la matrice mène à la libération d'une partie des cellules qui vont donc se retrouver dans le bouillon de culture.

En comparant entre le mode batch à cellules libres et à cellules fixées, l'immobilisation a permis d'améliorer le rendement en acide lactique et en diacétyle comparativement avec les cellules libres. Selon Doleyres et *al.* (2004) et Gilbert et *al.* (2002), les bactéries présentes dans les biofilms sont plus résistantes aux limitations en nutriments, aux changements de pH et aux substances antimicrobiennes comparativement aux bactéries planctoniques. Aussi ces différences sont dues à la structure et à l'organisation cellulaire dans le biofilm qui va permettre de modérer les effets des changements environnementaux. Les bactéries placées plus en profondeur dans le biofilm seront moins exposées à ces changements que les bactéries de surface et les bactéries planctoniques (Doleyres et *al.*, 2004; Gilbert et *al.*, 2002).

Les cultures mixtes ont donné un rendement supérieur que les cultures pures et en cellules immobilisées qu'en cellules libres. Selon Jefferson (2004), les différentes populations bactériennes composant un biofilm possèdent des besoins et des fonctionnements métaboliques différents. Elles vivent cependant en synergie, l'activité métabolique d'une population pouvant être complémentaire et bénéfique pour une autre, formant ainsi un ensemble métaboliquement plus efficace comparativement aux bactéries planctoniques.

Ce comportement de coopération permet même aux bactéries présentes en faible nombre de survivre (Jefferson 2004). En effet, les cellules immobilisées semblent plus tolérantes envers les composés toxiques (eg. alcools, phénols, antibiotiques) et les produits d'inhibition (Doleyres et *al.*, 2004; Gilbert et *al.*, 2002). Les cellules immobilisées sont aussi moins sensibles aux variations de pH qui peuvent intervenir au cours d'une fermentation (Junter et *al.*, 2002).

II.3 Fermentation en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane

Le bioréacteur a été alimenté au taux de 82,42 ml.h⁻¹. Cette vitesse a été augmentée quand la matière particulaire est accumulée dans la canalisation.

- Le temps de résidence ou de séjour a été calculé à partir du volume du bioréacteur et du débit d'alimentation selon l'équation suivante (Bertrand, 2002) :

$$t_s = \frac{V_t}{D_a}$$

où:

t_s = temps de résidence

V_t = volume total du réacteur incluant le décanteur

D_a = débit de l'alimentation

- Par contre le temps de contact est calculé en fonction des hauteurs du garnissage de chaque granulométrie, d'où il est calculé comme suit (Bertrand, 2002) :

$$t_c = \frac{V_{lit}}{D_a}$$

où:

t_c = temps de contact.

V_{lit} = volume du garnissage.

D_a = débit de l'alimentation

- Le taux de dilution hydraulique D (h⁻¹) est le rapport du débit d'alimentation Q (L.h⁻¹) sur le volume utile du réacteur (V) (Bertrand, 2002).

$$D = \frac{Q}{V}$$

Les cultures sont réalisées dans des colonnes de 300 ml dont les conditions sont citées dans le tableau avec un pH non contrôlé, à une température 30 °C. Le schéma du montage expérimental et le protocole du travail sont présentés dans le chapitre matériel et méthodes.

La concentration initiale du lactose est de 43,26 g/l. Durant la fermentation en continue à cellules immobilisées sur les trois granulométries de pouzzolane, en fonction des différentes hauteurs correspondantes aux deux poids 100 g et 150 g de garnissage et aux différents taux de dilutions à des temps de contact et de séjours différents.

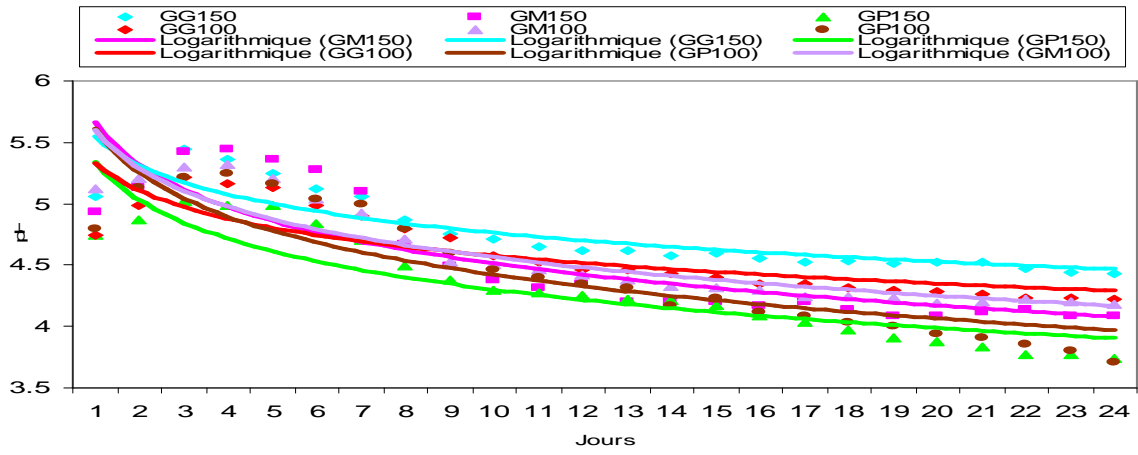
Le tableau 23 présente les conditions de la fermentation en continu des souches immobilisées sur pouzzolane.

Tableau 23: Conditions de la fermentation en continu des souches utilisées immobilisées sur pouzzolane à 30 °C, TI: 10 % de 24 h.

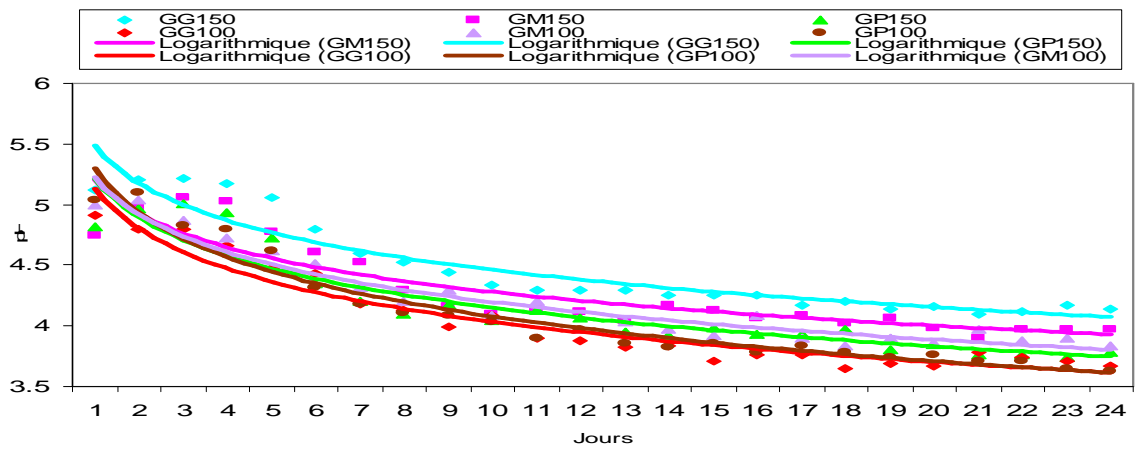
S.	Gr. mm	P.G. g	V.T.G. ml	H cm	V.V. ml	P. %	T.S. mn	V.U.B. ml	T.C. mn	T.D. h ⁻¹	D.O Ino.	D.O Réc.	D. I. h
Lc.19 et Lc.d4	6.25	150.33	158,96	8,1	103	0,64	35,44	177.29	22,72	0.46	0,789	0,302	72
Lc.19 et Lc.d4	4	150.07	149,73	7,63	87	0,58	37,16	186.71	20,98	0.44	0,789	0,247	72
Lc.19 et Lc.d4	1.25	150.18	127,56	6,5	75	0,58	41,26	203.34	17,9	0.41	0,789	0,121	72
Lc.19	6.25	150.11	153,07	7,8	97	0,63	36,53	182.45	21,77	0.45	0,659	0,247	72
Lc.19	4	150.07	150,13	7,65	87	0,57	37,09	186.45	21,03	0.44	0,659	0,311	72
Lc.19	1.25	150.03	126,77	6,46	73	0,57	41,41	204.18	17,74	0.4	0,659	0,134	72
Lc.d4	6.25	150.16	155,03	7,9	101	0,65	36,16	180.16	22,19	0.46	0,741	0,202	72
Lc.d4	4	150.05	150,32	7,66	86	0,57	37,05	186.47	21.02	0.44	0,741	0,209	72
Lc.d4	1.25	150.02	128,74	6,56	72	0,55	41,05	202.99	17,96	0.41	0,741	0,117	72
Lc.19 et Lc.d4	6.25	100.08	109,11	5,56	68	0,62	44,67	216.50	15.46	0.38	0,789	0,216	72
Lc.19 et Lc.d4	4	100.03	102,83	5,24	59	0,57	45,85	222.31	14,39	0.37	0,789	0,229	72
Lc.19 et Lc.d4	1.25	100.13	92,23	4,7	53	0,57	47,81	230.30	12,91	0.36	0,789	0,147	72
Lc.19	6.25	100.23	111,86	5,7	71	0,63	44,16	214.07	15,91	0.39	0,659	0,276	72
Lc.19	4	100.00	102,05	5,2	56	0,54	46	223.21	14,82	0.37	0,659	0,187	72
Lc.19	1.25	100.13	92,23	4,7	54	0,58	47,81	230.14	12,94	0.36	0,659	0,11	72
Lc.d4	6.25	100.02	105,97	5,4	69	0,65	45,25	218.09	15,17	0.38	0,741	0,334	72
Lc.d4	4	100.01	103,03	5,25	58	0,56	45,81	222.31	14,39	0.37	0,741	0,198	72
Lc.d4	1.25	100.11	90,27	4,6	52	0,57	48,17	231.77	12,63	0.36	0,741	0,132	72

S : Souche, Gr. : Granulométrie, P.G. : Poids du garnissage, V.T.G. : Volume total du garnissage, H : hauteur, V.V. : Volume du vide, P. : Porosité, T.S. : Temps de séjour, V.U.B. : Volume utile du bioréacteur, T.C. : Temps de contact, T.D. : Taux de dilution, Ino. : Inoculum, Réc. : Récupérât, D. I. : Durée de la phase d'immobilisation, C.L. : Conversion du lactose, A.L : Acide lactique, D : Diacétyle.

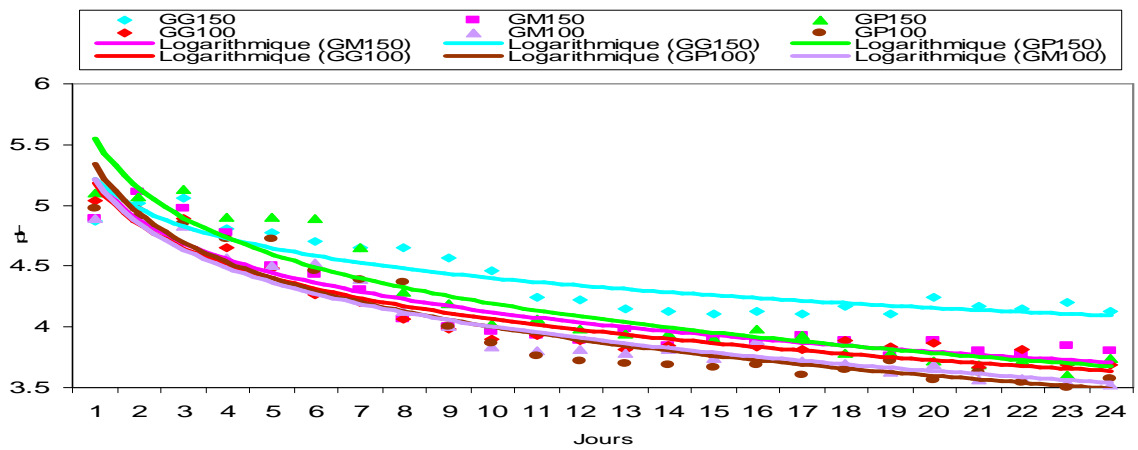
Les figures 45, 46, 47, 48 et 49 présentent les différentes évolutions de productions et de la conversion par les souches immobilisées durant 24 jours en continu sur les 3 granulométries de la pouzzolane.



Lc.19

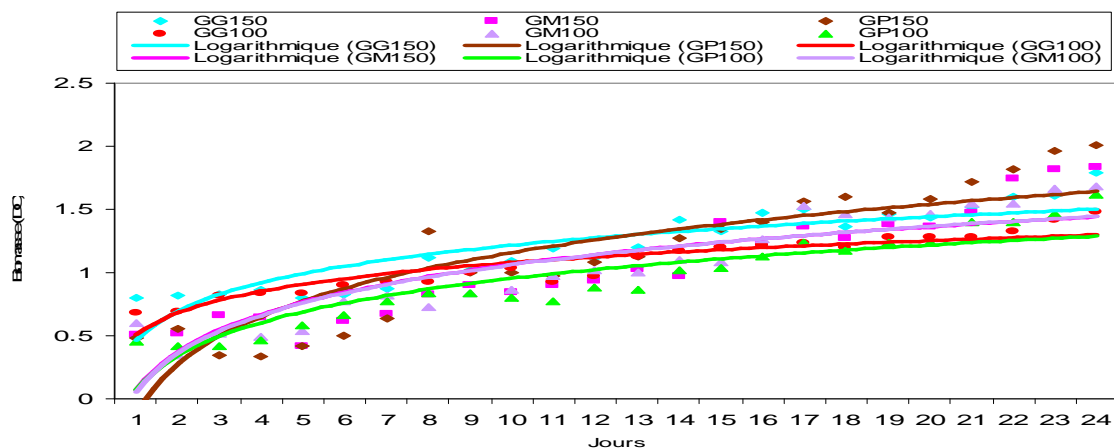


Lc.d4

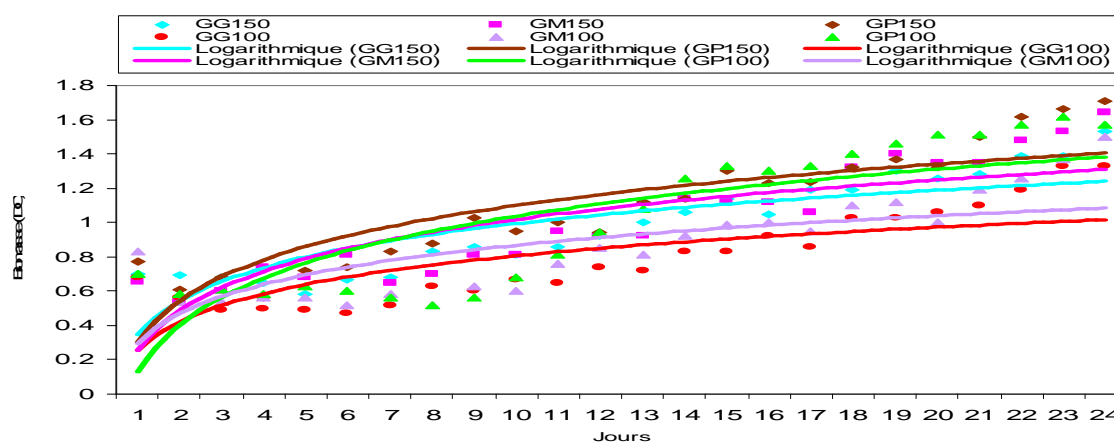


Lc.19 et Lc.d4

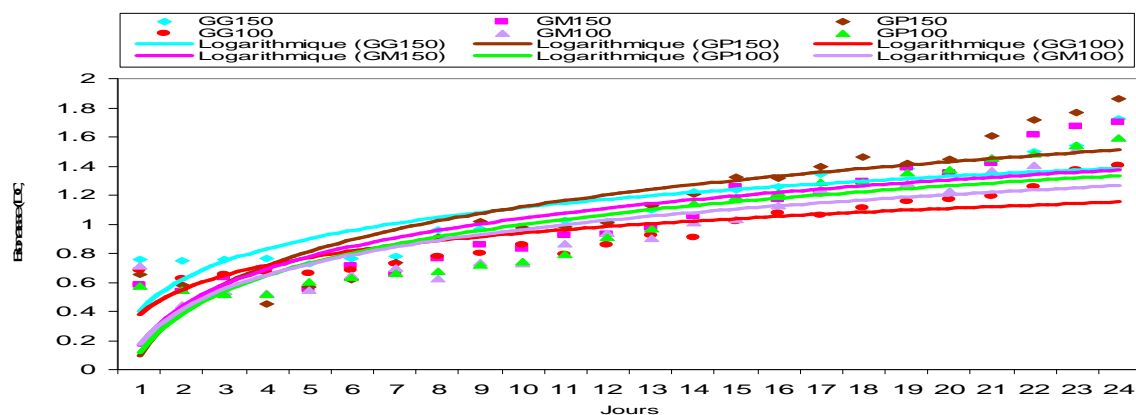
Figure 45 : L'évolution du pH en culture en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).



Lc.l9

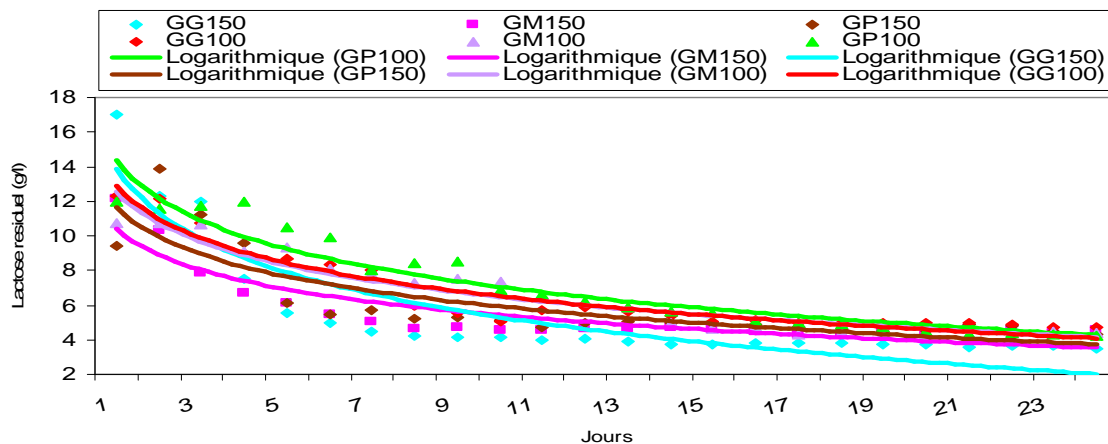


Lc.d4

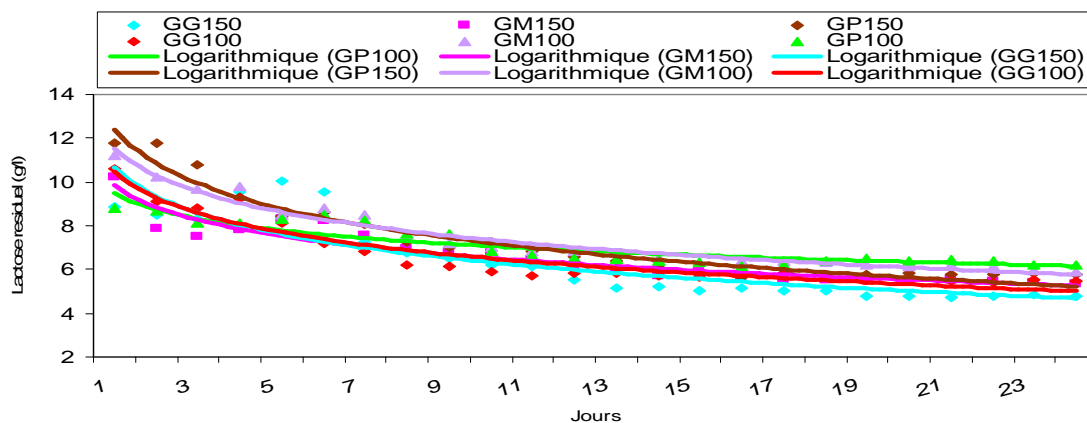


Lc.l9 et Lc.d4

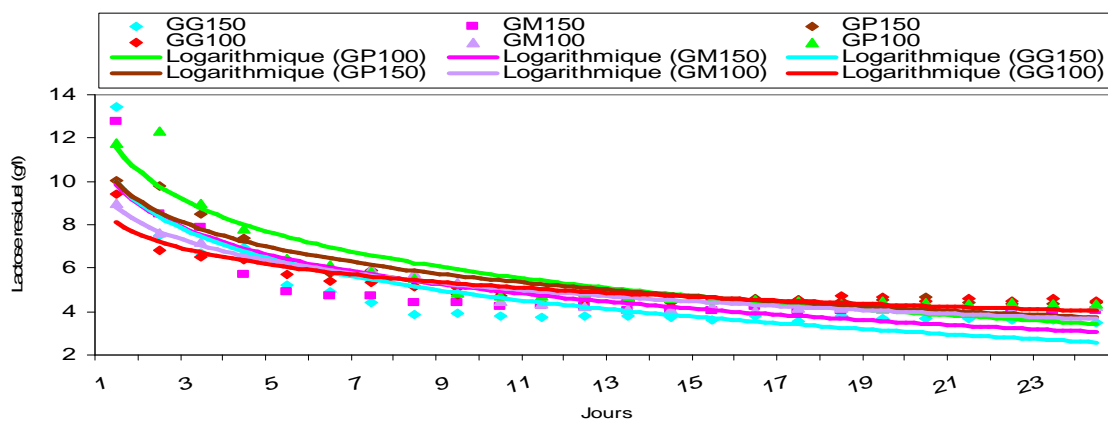
Figure 46: L'évolution de la biomasse en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).



Lc.19

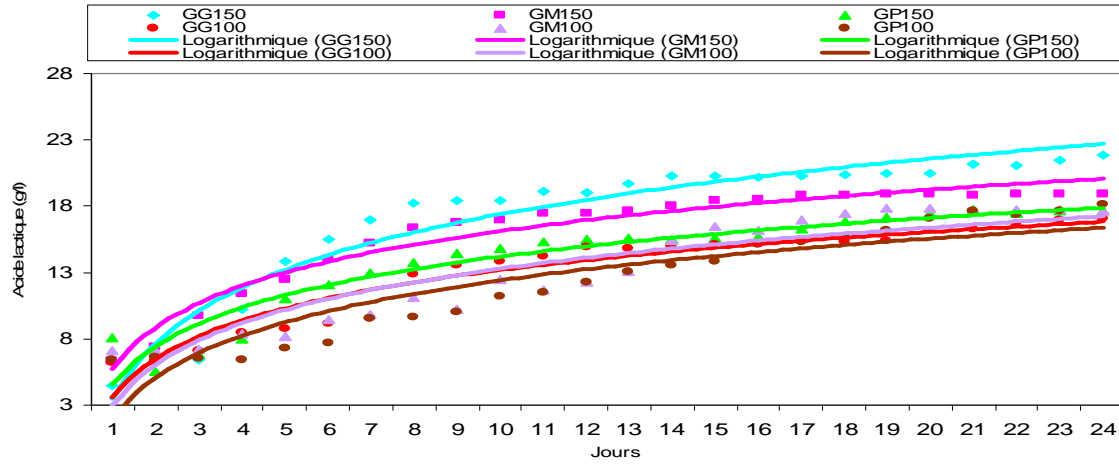


Lc.d4

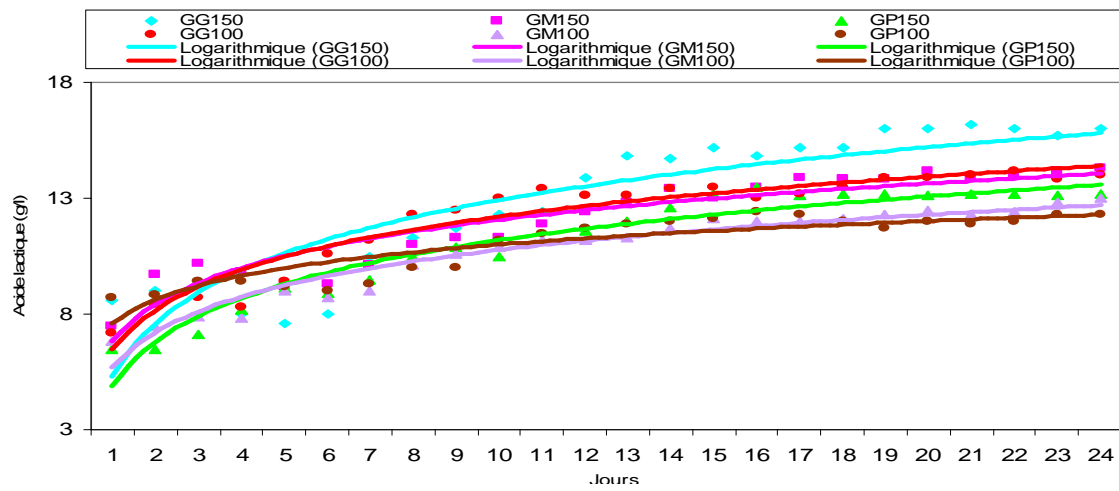


Lc.19 et Lc.d4

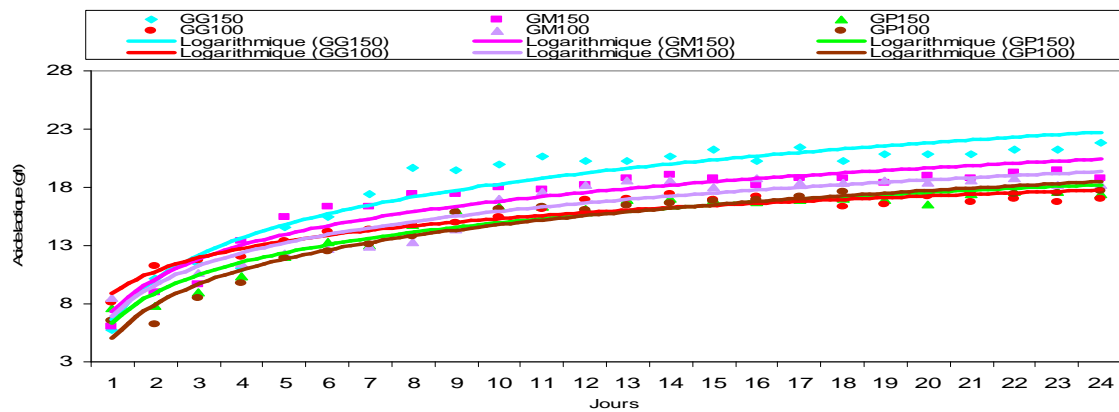
Figure 47: L'évolution de la conversion du lactose en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).



Lc.l9

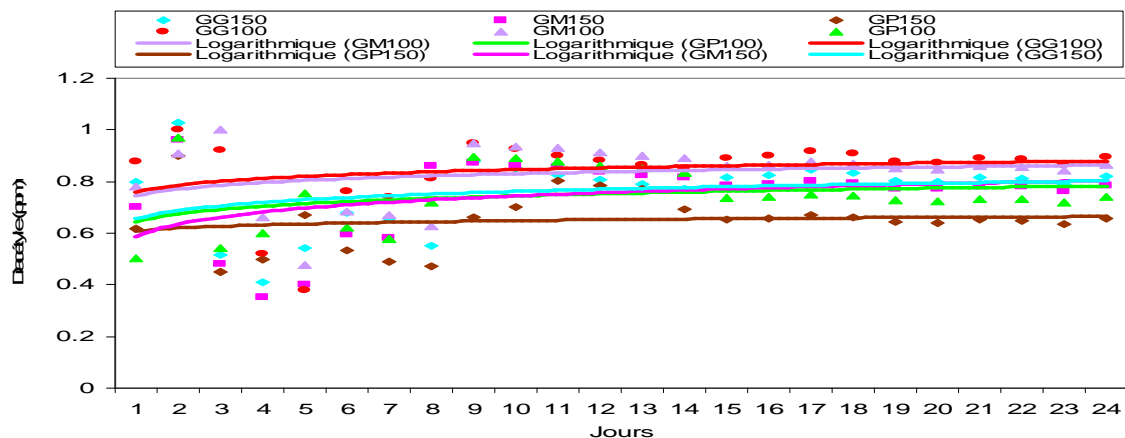


Lc.d4

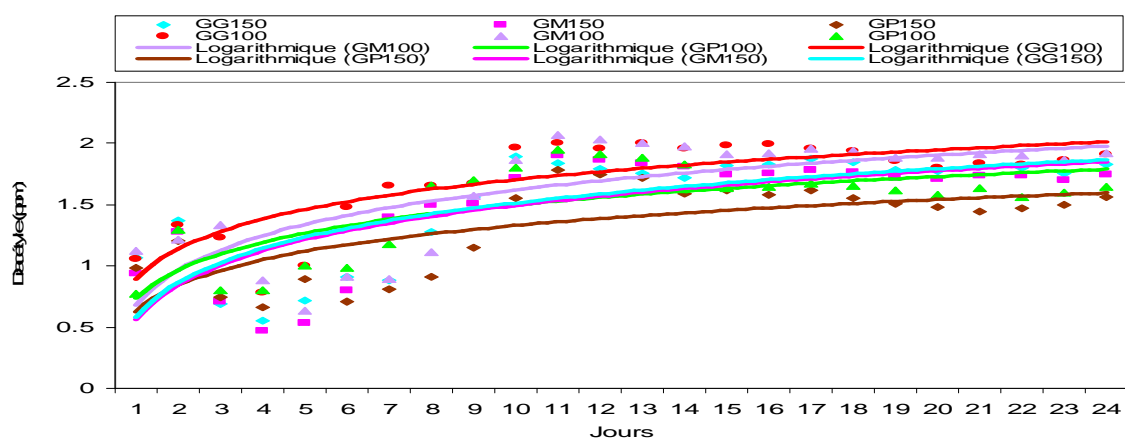


Lc.l9 et Lc.d4

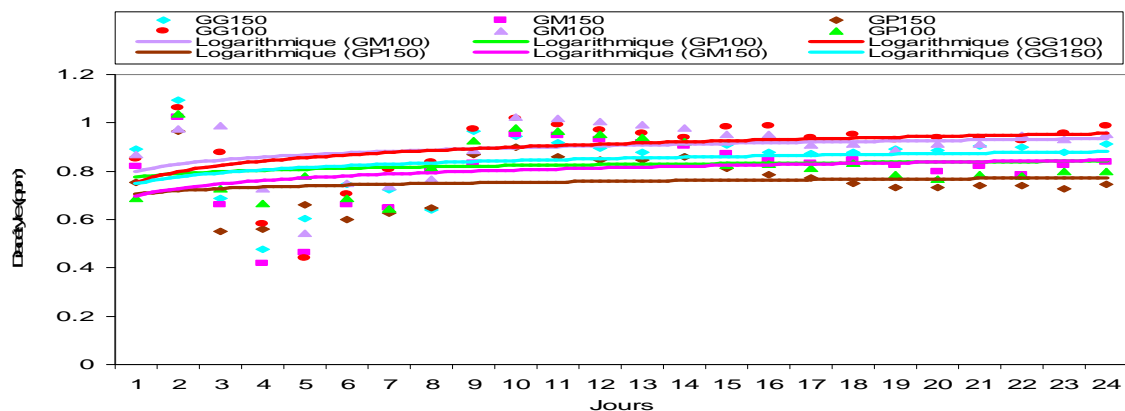
Figure 48: L'évolution de la production de l'acide lactique en continue à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).



Lc.19



Lc.d4



Lc.19 et Lc.d4

Figure 49: L'évolution de la production du diacétyle en continu à cellules immobilisées sur pouzzolane de 03 granulométries et de 2 hauteurs garnies à 100 et 150 g (à taux d'inoculation 10 %, age de l'inoculum 24 h dans le milieu LDS à 30 °C et à 100 trs/mn).

II.3.1 Evolution de la production de l'acide lactique, du diacétyle et de la conversion du lactose

Suite aux figures 45, 46, 47, 48 et 49, nous avons enregistré une phase de 3 jours où les courbes des évolutions de production et de consommation présentent une allure rapide. Ces figures montrent aussi une phase de décélération rapide et importante de 3 à 7 jours suivie d'une phase stationnaire qui débute à partir de 7^{ème} à 8^{ème} jours dans la plupart des cas.

Suites aux résultats tirés des figures, nous avons noté ce qui suit :

À $t = 0$, c'est-à-dire au premier jour de fonctionnement, la quantité d'acide lactique est entre 4-8 g/l pour *Lc.l9* et de 6 - 8 g/l pour *Lc.d4* en culture pure et de 6 -8 g/l pour la culture mixte. Par contre la production du diacétyle a été évaluée entre 6 et 8 ppm pour la culture mixte, entre 0,7 et 1 ppm pour *Lc.d4* et entre 0,5 et 0,8 ppm pour *Lc.l9* en culture pure.

Ces observations sont dues à un entraînement des composés de la phase aqueuse (récupérât) utilisée initialement pour l'immobilisation, elles correspondent à un enrichissement du milieu de culture et elles sont dues à l'âge et la quantité de l'inoculum introduit pour une meilleure immobilisation donc le milieu de culture a joué un rôle de liquide de lavage.

Puis, en $t = 2$ à 3 jours, les taux des deux métabolites diminuent fortement pour atteindre des valeurs inférieures à celles en $t=0$. Cette forte diminution peut s'expliquer par le fait que la biomasse n'est pas encore adaptée à la nature du support et aux conditions environnementales, et par conséquent le milieu de culture n'est que partiellement utilisé par le biofilm des souches utilisées chacune individuellement ou mixte. L'entraînement de l'acide lactique et du diacétyle est limité.

De $t=3$ jours au $t=7$ jours, nous avons enregistré une augmentation de la valeur de l'acide lactique et du diacétyle dans le récupérât, les souches sont en pleine activité.

À partir de $t = 7$ jours jusqu'à $t = 24$ jours, pour les 2 hauteurs et différents taux de dilution entre 0,36 – 0,46 h⁻¹, les valeurs de l'acide lactique et du diacétyle tendent à se stabiliser autour des valeurs qui sont citées dans les tableaux 24.

Tableau 24 : Production moyenne de l'acide lactique et diacétyle en mode continu à cellules immobilisées sur pouzzolane.

	<i>Lc.l9</i>		<i>Lc.d4</i>		Culture mixte	
	AL (g/l)	Dia. (ppm)	AL (g/l)	Dia. (ppm)	AL (g/l)	Dia. (ppm)
6,25 mm	14 à 19	0,80 à 0,89	13 à 14	1,76 à 1,92	16 à 20	0,89 à 0,94
4 mm	15 à 16	0,80 à 0,88	11 à 12 g	1,76 à 1,93	18 à 18,5	0,85 à 0,94
1,25 mm	15	0,65 à 0,78	11 à 12	1,58 à 1,70	16,8 à 16,9	0,79 à 0,85

Il est à signaler qu'au démarrage du bioréacteur et durant les 24 jours, les valeurs de la production et de la consommation sont élevées pour la granulométrie de 6,25 mm. Elles sont meilleures avec la même granulométrie en culture mixte qu'en cultures pures.

La quantité du lactose résiduel a été mesurée tout au long du fonctionnement du bioréacteur. Son évolution sur les 24 jours de mise en oeuvre est illustrée par la figure 47.

De $t = 0$ à $t = 9$ à 10 jours, les taux du lactose résiduel diminuent dont le taux de sa consommation du lactose est entre 7 à 10 g/l en moyenne pour *Lc.l9*, entre 7 à 9 g/l pour *Lc.d4* et entre 6 à 7 g/l pour la culture mixte sur les 3 granulométries.

De $t = 11$ au 24 jours, il a donc été enregistré, un taux de 3 à 5 g/l en moyenne pour *Lc.l9*, entre 5 à 6 g/l pour *Lc.d4* et entre 3 à 4 g/l pour la culture mixte sur les 3 granulométries.

Nous avons enregistré en moyenne un taux de conversions du lactose entre 88-93 % pour la granulométrie 6,25 et 1,25 mm, et 88 % pour la granulométrie 4 mm pour la souche *Lc.l9*.

Pour *Lc.d4*, nous avons noté en moyenne un taux de 88 % pour la granulométrie 6,25 mm et de 86-88 % pour la granulométrie 4 et 1,25 mm pour la souche *Lc.d4*. Par contre pour la culture mixte, le taux est estimé en moyenne entre 90-93 % pour la granulométrie 6,25 mm et de 91 % pour la granulométrie 4 et 1,25 mm

Nous avons noté que pour les poids qui se rapprochent en valeurs (hauteur), la porosité, le temps de contact et le taux de dilution sont proportionnels à la granulométrie. Par contre, avec la diminution de cette dernière, le temps de séjour augmente.

La production de l'acide lactique et la conversion du lactose sont proportionnelles à la granulométrie quant le garnissage dépasse 6,46 cm de hauteur. Ainsi, nous avons enregistré que la production en diacétyle dans tous les cas a atteint son maximum avec les grains de 4 mm pour les 2 hauteurs.

Pour les hauteurs inférieures à 6,46 cm, nous avons noté une augmentation des productions de métabolites par les cultures pures avec l'augmentation de la granulométrie. Les différentes conversions du lactose et la production de l'acide lactique par la culture mixte ont atteint leur optimum avec la granulométrie de 4 mm.

A partir des différentes figures 45, 46, 47, 48 et 49 ainsi que les observations notées précédemment, les différentes phases sont représentées comme suit :

➤ La phase d'adaptation

Pendant une période de 04 jours pour la culture pure de *Lc.19* et la culture mixte, et la période de 09 jours pour la culture pure de *Lc.d4*, les valeurs de consommation et de production décroissent progressivement. Ce phénomène peut s'expliquer par une période d'adaptation de la biomasse au niveau environnement. Le récupérât s'enrichit en acide lactique et en diacétyle. A t = 3 jours, la concentration en lactose résiduel est de 6,71 à 12 g/l pour *Lc.19*, 7,22 à 9,56 g/l pour *Lc.d4* et 6,7 à 7,8 g/l pour les deux souches en culture mixte.

➤ La phase exponentielle (activité de biofilm)

A partir de t = 4 jours jusqu'à t = 7 jours, la production d'acide lactique et du diacétyle ainsi que la conversion du lactose augmentent. Puis de t = 8 jours à t = 13 jours, la conversion oscille autour d'une moyenne de 5-6 g/l pour toutes les cultures.

➤ La phase stationnaire ou de stabilisation

A partir de t = 14 jours, les productions se stabilisent entre 12,4 et 21.8 g/l d'acide lactique selon les hauteurs et granulométries et entre 0,7 et 2,07 ppm du diacétyle avec une conversion du lactose s'étalant de 85 à 92 %.

II.3.2 Evolution de la production de la biomasse

Le fonctionnement du bioréacteur en continu à cellules immobilisées sur un support poreux " pouzzolane" a montré que la production de la biomasse suit trois phases distinctes :

1/ la première phase est une phase d'adaptation de la biomasse aux différents composés. En effet, pendant cette période, les micro-organismes s'adaptent au milieu de culture et à la nature du support. Cette phase d'adaptation est définie comme le temps nécessaire à la structuration d'un consortium microbien efficace pour la dégradation des nutriments du milieu (Devinny et al., 1999).

Dans le cadre de ce travail, cette phase se caractérise par une forte diminution du pourcentage d'acide lactique et du diacétyle produits. Cette phase d'adaptation a une durée moyenne de 3-4 jours.

Durant cette phase, la baisse progressive de la production des métabolites peut être attribuée en partie au lessivage des bactéries libres. Cependant, elle peut également être liée à des modifications physiologiques causées par les contraintes physiques lors du contact initial entre les bactéries et le solide. L'existence de ce changement d'origine biologique est suggérée par Ehlinger et *al.* (1989) lors du démarrage d'un réacteur anaérobie. De nombreux auteurs ont observé un retard dans la production lors du démarrage de réacteur à biomasse fixée sur un support, bien qu'une conversion de la source organique soit significative (Elmaleh et *al.*, 1984 et Marin et *al.*, 1999). Ce phénomène est dans de nombreux cas attribué à une adaptation physico-chimique de l'écosystème.

2/ La seconde phase se caractérise par une augmentation continue et progressive de la production de métabolites utilisées, Ehlinger et *al.* (1994) ont distingué deux états physiologiques différents pour l'écosystème anaérobie. Le premier comportement physiologique, caractérisé par une production faible, est attribué à la fixation des cellules et la formation du biofilm. La seconde phase, avec une alimentation progressive intense, est stable et accompagnée d'une forte production. Pour Grima et *al.*, 2001, la phase d'activation sur Pouzzolane est fixée à 10 jours.

3/ La troisième phase représente une étape d'obtention d'un biofilm mature complètement développé (Longieras, 2005) d'où la production et la conversion sont constantes.

Les travaux de Show et Tay (1999) en réacteur à lit fixe ont montré que l'augmentation de la charge organique, qui se traduit par une augmentation du débit et de la vitesse ascensionnelle de liquide, provoque une augmentation des contraintes hydrodynamiques d'abrasion liées aux frictions entre les particules qui génère un détachement et un renouvellement de la biomasse fixée plus importants.

II.3.3 Rendement et productivité

Les rendements en production de chaque fermentation ont été calculés à partir de la relation :

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$$

P_f : Quantité de produit à l'état final, P_0 : Quantité de produit à l'état initial, S_f : Quantité du substrat à l'état final, S_0 : Quantité du substrat à l'état initial.

La productivité qui exprime la quantité des métabolites synthétisée par unité de temps et par unité de volume du bioréacteur, est une mesure de la performance globale d'une opération (Wee et al., 2006).

Nous avons obtenu les valeurs suivantes:

Tableau 25: Rendements et productivités en acide lactique par *Lactococcus lactis* en différents modes à cellules libres ou immobilisées à pH contrôle ou non.

	Taux de dilution h ⁻¹	Taux de conversion du lactose %	Production g/l	Acide lactique g/g	Productivité g/l/h	Mode de culture	Référence
<i>Lc,l9</i>	0,36 – 0,46	89,16 -91,89	17,6 – 21,8	0,42 -0,55	22,71-30,57	Continu à cellules immobilisées	-
<i>Lc,d4</i>	0,36 – 0,46	85,74 -89,94	12,4 – 16,2	0,33 – 0,42	15,44-26,88		
<i>Lc,l9</i> et <i>Lc,d4</i>	0,36 – 0,46	89,6 -91,89	17,4 – 21,8	0,45 -0,55	22,31-36,90		
<i>Lc,l9</i>	-	17-23	6,60-9,20	0,66-0,94	0,25-0,35	Batch à cellules libres pH non contrôlé	-
<i>Lc,d4</i>	-	23-31	6,42-10,1	0,63-0,98	0,25-0,39		
<i>Lc,l9</i> et <i>Lc,d4</i>	-	15-27	6,40-11,5	0,93-0,98	0,25-0,44		
<i>Lc,l9</i>	-	34-37	14,7-15,7	0,98-0,99	0,57-0,60	Batch à cellules fixées pH non contrôlé	-
<i>Lc,d4</i>	-	32-40	16,4-16,8	0,96-0,98	0,63-0,65		
<i>Lc,l9</i> et <i>Lc,d4</i>	-	38-47	16,5-19,8	0,97-0,98	0,63-0,76		
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	-	-	90,0	76	1,6	-	Roble et al. (2003)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	-	92,49	10,2	54	1,0	Batch Sur MRS pH contrôlé	Gasson et al. (1996)
	-	73,03	13,7	80	0,29	Batch Sur MRS pH non contrôlé	
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	46	-	-	Fedbatch	Roukas, (1998)
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	50	-	-	-	Akerberg et al. (1998)
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	39	-	0,9	Batch membrane électrodialyse, recyclage	Wee et al. (2006)
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	46	-	10,6	Continu sur membrane	Ohashi et al. (1999)

Comparativement aux rendements et productivités indiqués dans le tableau 26, les souches Lc.19 et Lc.d4 immobilisées sur pouzzolane en culture pure ou mixte à pH non contrôlé ont donné de meilleures productivités en acide lactique.

Tableau 26 : Rendements en diacétyl par *Lactococcus lactis* en différents modes à cellules libres ou immobilisées à pH contrôle ou non.

	Taux de dilution h ⁻¹	Taux de conversion du lactose %	Production ppm/l	Mode de culture	Référence
<i>Lc,19</i>	0,36 – 0,46	89,16 -91,89	0,7 – 0,874	Continu à cellules immobilisées	-
<i>Lc,d4</i>	0,36 – 0,46	85,74 -89,94	1,7 -2,06	Continu à cellules immobilisées	-
<i>Lc,19 et Lc,d4</i>	0,36 – 0,46	89,6 -91,89	0,9 – 1,02	Continu à cellules immobilisées	-
<i>Lactococcus lactis ssp, lactis</i>	-	-	1,25	-	Kar et Misra (2000)
<i>Lactococcus lactis ssp,diacetylactis</i>	-	-	3,32	-	
<i>Culture mixte</i>	-	-	1,25	-	
<i>Lactococcus lactis ssp,diacetylactis</i>	-	-	6,6 – 6,9	-	Speckman et Collins (1973)
<i>Lactococcus lactis ssp,diacetylactis</i>	-	-	1,99	-	Gagnon (2006)
<i>Lactococcus lactis ssp,diacetylactis</i>	-	-	1,16 , 10 ³	-	Bassit et al., (1994)
<i>Lactococcus lactis ssp,diacetylactis</i>	-	-	8 , 10 ³	Cellules libres en batch	Rondags (1998)

Par contre le rendement et la productivité en diacétyl sont très loin de ceux du rendement relatif aux travaux de Rondags et al. (1998). La faiblesse de la production du diacétyl peut s'expliquer par:

- Le pH non contrôlé peut perturber la production des souches.
- La température 30 °C est non adéquate à la production du diacétyl car les cellules cultivées à 30°C atteignent plus rapidement des pH acides et séjournent donc plus longtemps dans cet environnement acide. Lucas et Reyrolle (1989) et Boquien et al. (1988) ont constaté que les souches de *Lactococcus lactis lactis* semblent peu atteintes, par contre la viabilité de *Lactococcus lactis diacetylactis* se voit donc diminuée. Selon Bassit et al. (1994) qui ont étudiée l'effet de la température sur la production du diacétyl, à partir d'une culture pure de *Lc. diacetylactis* CNRZ 483, avaient remarqué que la production de ce métabolite secondaire était plus élevée à la température de 18 et 21 °C que celle de 30 °C.
- La réduction de diacétyl en acétoïne.

Conclusion

A la lumière des résultats obtenus, notre étude a atteint l'objectif principal qui était que l'utilisation de la technologie des cellules immobilisées sur support pouzzolane permet de produire de l'acide lactique et du diacétyle en quantité importante en vue de valoriser le lactosérum. Un milieu de culture plus économique et potentiellement moins favorable pour la croissance des lactocoques nécessite un enrichissement pour qu'il devra remplacer le milieu M17.

Le comportement des souches *Lc.l9* et *Lc.d4* sur les différents milieux à base de lactosérum enrichi en batch et en continu libres ou immobilisées a été étudié. Nous avons noté:

1/ sur le plan des essais préliminaires

- La déprotéinisation par HCl concentré et l'autoclavage du lactosérum ont abouti à une élimination partielle des protéines (50 %).
- L'évolution de l'acidité exprimé en acide lactique avec 6.5 % d'extrait sec de lactosérum a donné de meilleurs résultats comparativement avec les autres concentrations.
- La supplémentation du milieu en magnésium (0,1 à 1%) permet à la fois une stimulation globale de la fermentation lactique, mais également l'obtention d'un meilleur taux de survie des souches utilisées.
- Parmi les différents substituts "bon marché " testés sur lactosérum déprotéiné, l'extrait de levures a permis d'assurer un bon rendement en acide lactique.
- La supplémentation du citrate et acétate de sodium a arrêté la composition optimale du lactosérum pour les souches cultivées individuellement et associées.
- L'adhésion des souches a nécessité quelques jours, après 12 à 23 minutes de contact entre la suspension bactérienne et le substrat pour les différentes hauteurs dans le système continu.

2/ Sur le plan de cinétique de production de l'acide lactique et du diacétyle :

- En fonction du taux d'inoculation, l'âge de l'inoculum et l'agitation, nous avons enregistré des productions maximales en acide lactique sur LDS en cellules libres de 9,20; 10,1 et 11,5 g/l respectivement pour *Lc.l9*, *Lc.d4* et la culture mixte pour un taux de 10 % de 24 h. comparativement avec le milieu de référence M17, la souche *Lc.d4* et la culture mixte ont marqué une augmentation respectivement de 3,8 g/l et de 1 g/l.
- La concentration en diacétyle a été augmentée sur le milieu enrichi en citrate à 0.4 %. Il a été enregistré des productions maximales en diacétyle de 1,063; 1,073 et 1,514 ppm respectivement pour *Lc.l9*, *Lc.d4* et la culture mixte. comparativement avec le milieu de référence M17, toutes les cultures ont connues une production faible en diacétyle.
- A 30°C et à pH non contrôlé durant toutes les fermentations en cellules fixées, nous avons obtenu en mode batch pendant 192 h, une production d'acide lactique de 15,7 g/l pour *Lc.l9*, 16,8 g/l pour *Lc.d4*. Les productions de l'acide lactique et du diacétyle nous montrent que la culture mixte a enregistré les meilleures valeurs pour le mode batch à cellules immobilisées vis-à-vis de l'acide lactique où le taux maximal a atteint 19,8 g/l pour la granulométrie de 6,25 mm suivi par 18,8 g/l pour la granulométrie 4 mm. En ce qui concerne le diacétyle, la culture pure de *Lc.d4* a montré une production meilleure qui est évaluée entre 1,95 et 2,03 ppm pour les trois (3) granulométries. En système continu durant 24 jours, nous avons enregistré une production entre 12,4 et 21,8 g/l d'acide lactique en fonction des différentes hauteurs et granulométries et entre 0,7 et 2,07 ppm du diacétyle, avec une conversion du lactose s'étalant de 85 à 92 %.

En ce qui concerne la productivité en acide lactique en mode batch à cellules libres, il a été noté une valeur entre 0.25 et 0.44 g/l/h. Par contre, elle est estimée à 0.57 et 0.67 g/l/h en discontinu à cellules fixées

La productivité en acide lactique en mode continu est estimée entre 15.44 et 36.90 g/l/h pour un taux de dilution qui varie entre 0.36 et 0.46 h⁻¹. Par contre la productivité en diacétyle dans les cas étudiés est très faible comparativement avec celle de la littérature. Ces résultats sont encourageants, ils méritent une attention particulière en ce qui a trait à la production de l'acide lactique sans souci de produire le diacétyle qui est un composé éliminé par un traitement d'autant plus coûteux que la concentration en fin de fermentation est élevée (Trelea, 1994).

Le choix de la technologie ainsi que la nature de substrat à utiliser permettent de préciser les meilleures conditions opératoires à appliquer. Certains points clés restent cependant décisifs pour la réussite du système en continu par les cellules immobilisées :

- Etude du comportement du biofilm.
- Etude de l'effet choc thermique et osmotique (conditions extrêmes de température) sur les performances des biofilms.
- Production des métabolites à pH contrôlé en mode batch et continu à cellules immobilisées.

Ainsi, il serait important d'étudier la production à l'aide de cellules immobilisées d'une culture mixte plus complexe que la culture modèle utilisée lors de ce travail, avec un intérêt industriel.

L'importance de certains paramètres sur le fonctionnement meilleur du bioréacteur pourra être confirmée au cours des études, notamment :

→ L'effet du temps de séjour sur la vitesse de colonisation et la stabilité de l'activité du consortium bactérien anaérobie,

→ L'importance de la surface disponible pour la colonisation

→ Détermination des conditions décisives pour une phase rapide de démarrage.

Liste des abréviations

GRAS	: Generally Recognized As Safe.
°C	: Degré Celsius.
cm	: centimètre.
mm	: millimètre.
h	: heure.
g	: gramme.
K Da	: Kilo dalton.
LDS	: Lactosérum déprotéiné supplémenté.
LDNS	: Lactosérum déprotéiné non supplémenté.
<i>Lc.19</i>	: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ⁹ .
<i>Lc.d4</i>	: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> biovar. <i>diacétylactis</i> ⁴ .
mg	: milligramme.
ml	: millilitre.
l	: Litre.
mn	: minute.
%	: pourcentage.
T	: temps.
ppm	: particule par millions.
trs	: tours.
TRC	: temps de rétention cellulaire.
G	: granulométrie.

Références bibliographiques

1. Aarnikunnas J. (2006). Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. ACADEMIC DISSERTATION, University of Helsinki.
2. Apilanez I., Gutierrez A. et Diaz M. (1998). Effect of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology*, 66(3), 225-230.
3. Akerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G. et Hahn-Hagerdal B. (1998). Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentration on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 49, n° 6, p. 682-690.
4. Annachhatre, A. et Bhamidimar S. (1992). Microbial attachment and growth in fixed film reactors: process startup considerations. *Biotechnology Advance*. 10, 69-91.
5. Arnaud JP., Lacroix C., Foussereau C., Choplin L. (1993). Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Biotechnol.* 29, p.157-175.
6. Augustin J-C. (2005). Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Mémoire d'habilitation à diriger des recherches. Université Paris XII Val de Marne.
7. Ayad E. H.E., Verheul. A., de Jong C, Wouters J.T.M. et Smit G. (1999). Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal* (9), 725-735.
8. Barrette J. (1998). Production d'extraits de levure biostimulants destinés à la propagation des lactocoques. Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.), UNIVERSITE LAVAL.

9. Bassit N., L. E., Boquien C.Y., Picque D. et Corrieu G. (1994). Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyl et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. *Lait*. 74, p. 115-126.
10. Béai C.D.N., Juillard V., de Roissard H., Richard J. et Saraux B. (1994). Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume 1* Ch.1-12 p. 367-401. éd. de Roissard H. et Luquet F. M. Lorica : Uriage, France.
11. Bellengier P., Richard J. et Foucaud C. (1997). Associative Growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* Strains in Milk. *Dairy Sci* 80:1520–1527
12. Belouadi C. (1989). Traitement anaérobie d'une eau résiduaire synthétique simulant les effluents d'une fabrique de pâte thermodynamique. Thèse pour l'obtention du grade de Maître es Sciences Appliquées (M.Se. A.). L'université du QUEBEC.
13. Bernard O. (2004). La modélisation des systèmes biologiques : Aller-retours le long des fleuves qui circulent entre l'océan du réel et le lac des modèles. Thèse pour l'obtention du grade d'habilitation à diriger des recherches.
14. Berry A.R., Franco C.M.M. et Zhang W., (1999). Middelberg, Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnol. Lett.* 21, p. 163–167.
15. Bertrand N., Fliss I. et Lacroix C. (2001). High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeates using immobilized *Lactococcus lactis* UL719. *In Dairy J.* 11: p. 953-960.
16. Bicker M., Endres S., Ott L. et Vogel H. (2005). Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 239, 151–157, Elsevier B.V.

17. Boquien C.V., Corrieu G. et Desmazeaud M.J. 1988. Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1 09 1 in pure and mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(10); 2527-2531.
18. Borja R., Banks C.J., Maestrojuan G. et Wang Z. (1994). Antagonistic and synergistic effects of two mineral support particles on the hydrolysis and methanation of wastewater in immobilized cell anaerobic digesters. *Biotechnology Letters*, 16(8), p. 859- 864.
19. Boudier J.F et Luquet F.M. (1981). Dictionnaire Laitier, 2^{ème} édition, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris, p. 62-127.
20. Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M., Corrieu G. (1997). Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing par diacetyl and acetoin from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (6): 2293- 2299.
21. Bouraqadi Idrissi Azeddine (2006). Extraction par solvant : Etude et modélisation du système Tributylphosphate – Acides monocarboxyliques. Thèse de doctorat. *Sciences des Agroressources*, 7-238.
22. Bourgeois C.M. et Larpent J.P. (1989). Microbiologie alimentaire. Vol.2, Ed. *Tech. et Doc.* (Lavoisier), Paris 343-408.
23. Bradly R.L., Arnold E. et Barbano D.M. (1992). Chemical and physical methods. In marshall .Ed. *Standard methods for the Examinations of Dairy Products*. p. 433-531.
24. Buccarello F. (2005). Effet de solutions antiseptiques sur la dispersion de particules et de bactéries émises lors de l'utilisation d'un détartreur ultrasonique. Thèse de doctorat en médecine dentaire. Faculté de Médecine de l'Université de Genève.

25. Buchanan R.E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273.
26. Burgos-Rubio C.N, M.R. Okos, P.C. (2000). Wankat, Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*, *Biotechnol. Progr.* 16, p. 305–314.
27. Bustos G., Moldes AB., Cruz JM. et Dominguez JM. (2005). Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus pentosus*. *Biotechnology Prog.* 21, p.793-798.
28. Cachon R., Diviès. C. (1994) Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41:694-699.
29. Cachon R., Jeanson S., Aldarf M. et Diviès C. (2002). Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82, 281-288.
30. Champagne C. P., Gardner N., Piette M., St-Gelais D. (1994) The Use of Petrifilm™ for the Enumeration of *Lactococci*. *International Dairy Journal.* 4, p. 789-795.
31. Champagne, C. P. (1998) Caractéristiques des bactéries lactiques. In : *Production de ferments lactiques*. Chapitre 1 p. 1-10. La fondation des Gouverneurs, Agriculture et Agroalimentaire Canada, CRDA. Edisem. St-Hyacinthe, Québec.
32. Characklis W. (1989). Biofilms processes. In *Biofilms* (Characklis, W. G., Marshall, K. C., eds.), *John Wiley & Sons*, New York, 195-233.
33. Chavanne M., Beaudoin G.J., Jullien A. et Flamand E. (1987). Chimie organique expérimentale. Ed. *Le Griffon d'argile*, p 159-227.

34. Choisy C, Desmazeaud M, Gueguen M, Lenoir J, Schmidt JL, Tourneur C (1997). Les phénomènes microbiens. In : Le fromage, pages 377-446. Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier *Tec & Doc*, Paris, France.
35. Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL, (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, p. de 217-246.
36. Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Novak L., Lindley N.D. et Loubiere P. (1995). Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth de *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 79, p.108-1 16.
37. Codex Alimentarius, (2006). Norme codex pour les lactosérums. Codex STAN. A 15- 1995.
38. Coutouly Gérard (2001). Les biotechnologies : la part industrielle. Revue CRDP d'Alsace.
39. Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K., McMeekin T. A. (1994) Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International journal of Food Microbiology*. 23, p. 391-404
40. D'Angio C., Beal C., Boquien CY. et Corrieu G. (1994). Influence of dilution rate and cell immobilization on plasmid stability during continuous cultures of recombinant strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Biotechnol* 34, p. 87-95.
41. Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K. et McMeekin T. A. (1994) Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International journal of Food Microbiology*. 23, p. 391-404.
42. Datta R., Tsai S.P., Bonsignore P., Moon S.H. et Frank J.R. (1995). Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiol. Rev.* 16, p. 221–231.

43. de Roissard H.B. (1986). Bacteries lactiques. In lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. Tome 3. Ed. *Tec et Doc*. Lavoisier. Apria :191-203.
44. de Roissard H. et Luquet F. M. (1994). Bactéries lactiques.T1, T2, Ed. *Lorica*.
45. De Haast, J., Britz, T.J., Novello, J.C. et Verwey, E.W. (1985). Anaerobic digestion of deproteinated cheese whey. *Journal of Dairy Research*, 52:457-467.
46. Delgado S., Mayo B. (2004) Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus spp.* Strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 90, p. 309-319.
47. Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk MC. et Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques. Edited by Uriage. *DRHeLFeL*. vol 1. p. 25-116.
48. Desmazeaud M. J. (1994). Le lait milieu de culture In : *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. Volume 2 Chapitre IV-1: 25-36. Éd. de Roissard H. et Luquet F. M. *Lorica : Uriage*, France.
49. Desmazeaud M.J. (1983) L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait*. (63), p. 267-316.
50. Divies C. F. L., Hubert J.C. et de Roissard H. (1994). Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. Volume 1 Chapitre 1-7: 2,91-307. Éd. de Roissard H. et Luquet F. M. *Lorica : Uriage*, France.
51. Doleyres Yann (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat. Université de LAVAL QUÉBEC.

52. Doleyres Y., Fliss I. and Lacroix, C. (2004) Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, 97, 527-539.
53. Dolle J.B., 2003. Mise au point de procédé de traitement des lactosérums et effluents de fromageries en production fermière. Compte rendu sur les technique d'elevage et qualité. Institut d'elevage. INRA.
54. Devoyod J.J. et Poullain F. (1988). Les leuconostocs, propriétés : leur rôle en technologie laitières. *Le lait* 68, p. 249-280.
55. Dunne W.M. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15, p. 155-166.
56. Ehlinger F., Audic J.M. et Faup G.M. (1989). Influence of seeding conditions on initial biofilm development during the start-up of anaerobic fluidized bed reactors. *Water Science and Technology*, 21(Brighton), p. 157-165.
57. Ehlinger, F., Escoffier, Y., Couderc, J., Moletta, R. (1994). Development of an automatic control system for monitoring an anaerobic fluidized bed. *Water Science and Technology*, 29, 289-298.
58. Elmaleh, S., Grasmick, A., Guitonas, A. (1984). Epuration par cellules anaerobies immobilisées sur un support fluidisé. In Use of fixed biomass for water and wastewater treatment, *Proc. 37th Int. Conf. Cebedeau Liege*, 23-25 May, 275-290.
59. Erk A. (1987). Le fromage. Ed. *Tech. et Doc.* (Lavoisier) et CNIEL.
60. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): http://www.fao.org/es/ess/sumfas/sumfas_fr_web.pdf 2002
61. Food and Drug Administration (F.D.A). (1982). 184.1061 Lactic acid. *Registre des produits GRAS* Page 184.1063.

62. Food and Drug Administration (F.D.A). (1982). 184.1061 Diacetyl. *Registre des produits GRAS* Page 184.1063.
63. Fox P., Suidan M.T. et Bandy J. (1990). A comparaison of media types in acetate fed expanded bed anaerobic reactors. *Water Research*, 24(7), p. 827-835.
64. Flavor and Extract Manufacturers' Association of the United States, Inc. Fragrance Materials Association of the United States: F.M.A. (2006). Flavor or fragrance egulation data sheet. Diacetyl CAS Registry Number 431-03-8
65. Fu W. et Mathews A.P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, *Biochem. Eng. J.* 3 p. 163-170.
66. Gagnon D. (2006). Formulation et propagation de ferments lactiques mésophiles à haut caractère aromatique. Mémoire pour l'obtention du grade de maître es sciences (M.Sc.), UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC.
67. Gana S. et Touzi A. (2001). Valorisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 5158.
68. Garcia-Quintans N., Magni C., de Mendoza D. et Lopez P. (1998). The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis is induced by acid stress. *Appl Environ Microbiol* 64: 850-857.
69. Gasson M.J., Benson K., Swindell S. et Griffin H. (1996). Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Lait* 76, p. 33-40, Elsevier/INRA.
70. Gilbert, P., Allison, D.G. and McBain, A.J. (2002). Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.*, 92, S98-S110.

71. Gilliland, S. E. (1985) Concentrated starter cultures *In: Bacterial starter cultures for food*. Éd. S. E. Gilliland. CRC Press Inc. p.145-157. Boca Raton, É.U.
72. Givry Sébastien, (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de doctorat. UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE, Laboratoire de Microbiologie Industrielle, UMR FARE 614, INRA, 9-14.
73. Gjaltema, A., Vinke, J.L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1997). Biofilm abrasion by particle collisions in airlift reactors. *Biochemical Engineering*, 36 (1), 221- 228
74. Global Agriculture Information Network (2005). Revue.
75. Gonzalez M.I., Ivarez S. A, Riera F., Alvarez R. (2007). Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering* 80, 553–561. Elsevier B.V.
76. Gorris, L.G.M., van Deursen, J.M.A, van der Drift, C., Vogels, G.D. (1988). Influence of waste water composition on biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 95-102.
77. Grattepanche Franck (2005). Etude d'un système de pré fermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse de Doctorat, Université Laval QUEBEC.
78. King V.A.E. et Zall R.R. (1983). Ethanol fermentation of whey using polyacrylamide and Kappa-Carrageenan entrapped yeasts. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, New York 14853 U.S.A. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29, 379-393.

79. Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D. et Neufeld R.J. (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit Rev Biotechnol* 14: 75-107.
80. Guerra NP, Pastrana L, (2007). Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett Appl Microbiol* 37: 51-55.
81. Guerra NP. et Pastrana L. (2003). Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett Appl Microbiol* 37, 51-55.
82. Guiraud J P., (1998). Microbiologie alimentaire. Edition . *Dunod*, Paris : 54-571.
83. Haddad S., Sodini I., Monnet C, Latrille E. (1997) Effect of citrate on growth of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* in milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 236-241.
84. Harvey R. J., Collins E. B. (1962) Rôle of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Bacteriology*. 82:954-959.
85. Heijnen J.J., Van Loosdrecht M.C.M., Mulder A. et Tjihuis, L. (1992). Formation of biofilms in a biofilm air-lift suspension reactor. *Water Science and Technology*, 26(3-4), p. 647-654.
86. Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W., Hoeks, F. (1989). Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *The Chemical Engineering Journal*, 41, B37-B50.
87. Hofvendahl K., et Hahn-Hagerdal B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1). *Enzyme Microbiology and Technology*, 26, p. 87-107.

88. Horn Harald et Morgenroth Eberhard (2006). Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chemical Engineering Science* 61, 1347 – 1356.
89. Huang J., Lacroix C., Daba H. et Simard RE. (1996). Pediocin 5 production and plasmid stability during continuous free and immobilized cell cultures of *Pediococcus acidilactici* UL5. *J Appl Bacteriol* 80, p. 635-644.
90. Hugenholtz J., Perdon. L., Abee T. (1993) Growth and Energy Génération by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* during Citrate Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 59(12): 4216-4222.
91. Hugenholtz., J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:165-178.
92. Hujanen M., Linko Y.Y. (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 307–313.
93. Hylckama V., Rademaker¹ Jan L.W., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W.J. et Siezen R.J. (2006). Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, p. 183–190.
94. Ibrahim M., BRIANDET R., MISTOU M.Y., CHRÉTIEN A., TREMBLAY J. et KULAKAUSKAS S. (2004). Immobilisation des lactocoques. *Lait* 84, p. 103–114© INRA, EDP Sciences, 2004
95. Imbert-Pundaven A. (1977). Etude de l'évolution de la composition des lactosérums au cours de leur conservation. *Le Lait* 568, p. 522-546.
96. Jacques D. (1993). Valorisation des sous-produits de l'industrie de transformation du lait. Cahier technique réalisé pour le Centre québécois de valorisation de la biomasse, Ste-Foy, Canada.

97. Jarvis AW. et Jarvis BDW. (1981). Deoxyribonucleic acid homology among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 77-83.
98. Jefferson, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, 236, 163-173.
99. Juillard V., Laan H., Kunji E.R.S., Jeronimus-Stratingh C. M., Bruins A. P. et Konings W. N. (1995). The extracellular PI type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* 177, p. 3472–3478.
100. Junter GA. Et Jouenne T. (2004). Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome or the cart before the horse. *Biotechnol Adv* 22: 633-658.
101. Kaneko T., Suzuki H., Takahashi T. (1987) The Effects of calcium ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* 3022. *Agricultural and Biological Chemistry.* 51 (9):2315-2320.
102. Kar T. et Misra A.K. (2000). Enhancement and stabilization of diacetyl produced by cultures grown in whey. *Annals of Microbiology*, 50, 33-41
103. Karel S.F., Libicki S.B., Robertson C.R. (1985) The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem Eng Sci* 40: 1321-1354.
104. Kashke E. R., et Wilson T. H. (1973). Proton-coupled accumulation of galactoside in *Streptococcus lactis* 7962. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 866–2869.
105. Kempler, G. M., and L. L. McKay. 1979. Characterization of plasmid desoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* ssp. *Diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, p. 316.
106. Kida K., Morimura S., Sonoda Y., Obe M. et Kondo T. (1990). Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized bed reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* P. 354-359.

107. Kosseva M.R., Fatmawati A., Palatova M. et Kent C.A. (2007). Modelling hermophilic cheese whey bioremediation in a one-stage process. *Biochemical Engineering Journal* 35, p. 281–288.
108. Kotzanmanidis C., Roukas T. et Skaracis G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, p. 442–448.
109. Lacrosse R. (1969). Production de diacétyle dans les laits et les crèmes soumis à la neutralisation au cours de la fermentation lactique. *Le lait* (Juillet-Aout), p. 487-501.
110. Larpent S. P. (1997). Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Ed. *Tech et Doc, Lavoisier*, Paris.
111. Lauwers, A.M., Heinen, W., Gorris, L.G.M., Van der Drift, C. (1990). Early stage in biofilm development in methanogenic fluidized bed reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 352-358.
112. Lazarova, V., Manen, J. (1995). Review paper. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29, No.10, 2227-2245.
113. Ledsma O. V., De Ruiz Holgado A. (1977). A synthetic \square egula for comparative stades of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* M 42, p. 123-133
114. Lee S. M. et Drucker D. B. (1975). Analysis of Acetoin and Diacetyl in Bacterial Culture Supernatants by Gas-Liquid Chromatography. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 2, N°. 3, p. 162-164.
115. Leveau, J., Bouix, M., (1993). Microbiologie industrielle. Edition : *Tec et Doc*. Apria

116. Li H., Mustacchi R., Knowles C.J., Skibar W., Sunderland G., Dalrymple I., Jackmana S.A. (2004). An electrokinetic bioreactor: using direct electric current for enhanced lactic acid fermentation and product recovery. *Tetrahedron* 60, 655–661. Elsevier B.V.
117. Liu M., van Enckevort FH. Et Siezen RJ. (2005). Genome update: lactic acid bacteria genome sequencing is booming. *Microbiol*, 151, p. 3811-3814.
118. Lucas S. et Reyrolle J. (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles, équilibre de la flore au cours de la première étape de fabrication de levains. *Le lait* 69, p. 121-130.
119. Lupien J. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des Nations pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome. p. 272.
120. Lynch CM., McSweeney P. L. H., Fox P.F., Cogan T.M. Drinan F.D (1997) Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77, p. 441-459.
121. Majorella H.W., Blanch C.R. et Wilke (1983). By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevicea*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 25, p. 103-121.
122. Marin P., Alkalay D., Guerrero L., Chamy R., Schiappacasse M. C. (1999). Design and start-up of an anaerobic fluidized bed reactor. *Water Science and Technology*, 40(8), 63-70.
123. Marques S., Santos J. A. L., Gírio F.M., Roseiro J. C. (2008). Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Manuscript accepted by Biochemical Engineering Journal*.
124. Marty-Teyssset C, Lolkema J.S., Schmitt P., Diviès C. et Konings W.N. (1996) The Citrate Metabolic Pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: Expression, Amino Acid

Synthesis, and α -Ketocarboxylate Transport. *Journal of Bacteriology* 178 (21): 6209-6215.

125. Menoret C. (2001). Traitement d'effluents concentrés par cultures fixées sur gravier ou pouzzolane. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II.
126. Mirdamadi S., Sadeghi H., Sharafi N., Fallahpour M., Mohseni F. A. et Bakhtiari M. R., (2002). Comparison of Lactic Acid Isomers Produced by Fungal and Bacterial Strains. Iranian Research Organization for Science et Technology (IROST), Dept. of Biotechnology, Tehran, Iran, *Iranian Biomedical Journal* 6 (2) et 3): 69-75.
127. Monnet V. et Gripon J.C. (1994). Métabolisme azoté des bactéries lactiques. Dans:
128. Bactéries Lactiques. H. De Roissart et F.M. Luquet. Eds, *Lorica*. Vol.1, p. 331-347.
129. Murray W. et van den Berg L. (1981). Effect of support material on the development of microbial fixed films converting acetic acid to methane. *Journal of Applied Bacteriology*. 51, 257-265.
130. Narayanan N., Roychoudhury P.K., Srivastava A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Journal of Biotechnology* , Vol.7 No.2, 167-179.
131. Nicolella C., van Loodsrecht M. C. M. et Heijnen J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. Review article. *Journal of biotechnology*, 80, p. 1-33.
132. Nolasco-Hipolito C., Matsunaka T., Kobayashi G., Sonomoto K., Ishizaki A. (2002). Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L(+) lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 93, N° 3, 281-287.

133. Novel G. (1993). Les bactéries lactiques In « Microbiologie industrielle», les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. LEVEAU, G. V., BOUIX, M. *Techniques et Documentation* Lavoisier. Paris. p 171-215.
134. Novel G. et Lequeler J.F. (1995). Les bactéries lactiques. Ed. *press universitaire de caen*.
135. Novel, G. (1999). Les biofilms, avant propos. *Bulletin de la société française de microbiologie*, 14 (2), 103-104.
136. Ohashi R., Yamamoto T., et Suzuki T. (1999). Continuous production of lactic acid from molasses by perfusion culture of *Lactococcus lactis* using a stirred ceramic membrane reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 87, p. 647-654.
137. Oscar A., Anunziata, Liliana B., Pierella, Costa M.G., et Beltramone A.R. (2001). Studies on the synthesis of diacetyl over oxidation zeolite catalysts. *Centro de Investigacion y Tecnologia Quimica, Facultad Cordoba, Universidad Tecnologica Nacional, CC36, Suc 16 (5016),Cordoba, Argentina*.
138. Ott A. (1999). Investigation of the aroma compounds in yogurt and their formation. Thèse de doctorat. École polytechnique fédérale de Lausanne. Université de Zurich.
139. Pack M.Y., Vedamuthu E.R., Sandine W.E., Elliker P.R., Leesment H. (1968). Effect of par temperature on growth and diacetyl production by aroma bacteria in single and mixed strain lactic culture. *J. Dairy Sci.*, 51, p. 339-344.
140. Park E.Y., Kosakai Y., Okabe M. (1998), Efficient production of L(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor, *Biotechnol. Progr.* 14, p. 699–704.
141. Petranxscienne D. et Lapied L. (1981). Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. Analyses et tests. *Tech et Doc*. Paris, p. 219.

142. Petrov K., Urshev Z. et Petrova P. (2008). L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology* 25, p_550– 557.
143. Prigent Y. et Franco A. (1984). Etude d'un fermenteur lactique à membranes. Extraction par ultrafiltration et électrodialyse du lactate de sodium contenu dans le jus de fermentation de lactose supplémenté. *Le Lait*, 64, 217-238.
144. Prigent C, Corre C, Boyaval P, (1988). Production of concentrated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. *J Dairy Res* 55, p. 579-577.
145. Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Kusum Lata, Kishore, V.V.N. (2000). State of the art of anaerobic digestion for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 135-156.
146. Ramakrishna S.V., Prakasham R.S. (1999) Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science Bangalore* 77, 87-100.
147. Ramos P., Novel M., Lemosquet M. et Novel (1983). Fragmentation du plasmide lactose-protéase chez les dérivés lactose-négatifs de *streptococcus lactis* et de *S lactis ssp diacetylacis*. *Ann. Microbiol. Ins Pasteur*, 387 – 399
148. Renault P. (1990). Malolactic fermentation: genetics and genetic engineering. *In: 6th international symposium on genetics of industrial microorganisms*.
149. Renouf Vincent, (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du vin. Thèse de doctorat. L'institut National Polytechnique de Toulouse.
150. Roble N.D., Ogbonna J.C. et Tanaka H. (2003) L-lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cell immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*), *Biotechnol* with cell immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*), *Biotechnol. Lett.* 25 1093–1098.

151. Rodgers S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures. *Trends in Foods Science and technology*. 12-276-284.
152. Rojan P. J, Sukumaran R. K., Madhavan Nampoothiri K., Pandey A. (2007). Statistical optimization of simultaneous saccharification and l(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 36, 262–267, Elsevier B.V.
153. Romeo Y., Obis D., Bouvier J., Guillot A., Fourcans A., Bouvier I., Gutierrez C., et Mistou M.Y. (2001) Osmoregulation in *Lactococcus lactis*: BusR, a transcriptional repressor of the glycine betaine uptake system BusA. *Mol Microbiol* 47, 1135-1147.
154. Rondags E., Germain P. et Marc I. (1998). Cinétiques de décarboxylation oxydative extra- et intracellulaire d'oe-acétolactate par un *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*. *Lait* 78, 135-143. © InraElsevier, Paris
155. Roukas T., et Kotzekidou P. (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol.*22:199-204.
156. Sanders J. W., Venma G. et Kok J. (1999). Environmental Stress Responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*. 23 :483-501.
157. Sandine W. E. (1985). The streptococci: milk product. In: Bacterial starter cultures for foods. Éd. S. E. Gilliland. Stillwater, *CRC Press*, p. 5-23.
158. Savoie, S. Chiasson S., Champagne C. P., Audet P. (2001) Effect of type of Media on growth and strain equilibrium of lactic acid starters: a Review. Moncton, N. B., p. 7-30.
159. Schepers A.W., Thibault J. et Lacroix C. (2002). *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey

permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 30, p.176–186.

160. Schmidt J.L., Tourneur C, Lenoir J. (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume 2 Chapitre IV-2 p.37-53. Éd. de Roissard H. et Luquet F. M. Lorica : Uriage, France.
161. Senthuran A, Senthuran V, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. (1999). Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. *Journal of Biotechnology*, 73:61–70.
162. Sergent Nicolas (1998). Parfums et Arômes : Industrie et Synthèse. Rapport de Projet Dunkerque.
163. Show K.Y., Tay J.H. (1999). Influence of support media on biomass growth and retention in anaerobic filters. *Water Research*, 33(6), 1471-1481.
164. Singh SK, Ahmed SU, A. P (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41, p. 991–1000.
165. Sodini I, Lagace L, Lacroix C, Corrieu G, (1998). Effect of continuous prefermentation of milk with an immobilized cell bioreactor on fermentation kinetics and curd properties. *J Dairy Sci* 81, p. 631-638.
166. Sodini-Gallot I, Corrieu G., Boquien CY., Latrille E. et Lacroix C. (1995). Process performance of continuous inoculation and acidification of milk with immobilized lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78, p. 1407-1420.
167. Speckman R.A. et Collins E.B. (1968). Separation of diacetyl, acetoin and 2, 3-butylene glycol by salting-out chromatography. *Anal. Biochem.* 22, p.154-160.
168. Starrenburg M.J., Hugenholtz. J. (1991) Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 57(12): 3535-3540.

169. Swindell S. R., Benson K. H., Griffin H.G., Renauld P., Ehrlich S. D. et Gason M. J. (1996). Genetic manipulation of the Patway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental Microbiology*. 62(7): 2641-2643.
170. Tamine A.Y. (1988). Microbiology of "starter cultures" In : Dairy microbiology. Vol. 2. Ed. *Applied Science oubl*, London et New Jersey.
171. Tapernoux A. (1932). Le diacétyle, parfum du beurre et de la margarine. *Lait (120)*.
172. Tapia Gino and Yee Jerry (2006). Biofilm: Its Relevance In Kidney Disease *Advances in Chronic Kidney Disease*, Vol 13, No 3, p. 215-224
173. Tejayadi S, Cheryan M, (1995). Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 305-311.
174. Thomas T. D., Ellwood D. C, Longyear V. 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), p. 109-117.
175. Thunell, R. K. (1988) pH-controlled starter: A década reviewed. *Cultured Dairy Products Journal*. August: 11-16.
176. Torino M.I., Sesma F., Font de Valdez G. (2000) Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification. *Milchwissen* 35: 314-316.
177. Trelea I.C., Latrille E. et Corrieu G. (2004). Optimisation de la composition aromatique de la bière par essaim de particules. MOSIM 04 – du 1er au 3 septembre 2004 - Nantes (France) INRA, INA P-G, BP 01

178. Trulear, M.G., Characklis, W.G. (1982). Dynamics of biofilm Processes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 54(9), p. 1288-1301.
179. van den Berg, L. (1986). High rate reactors for methane production. In M. Moo-Young (Eds.), *Biotechnology and Renewable Energy*, 268-275. Elsevier Applied Science.
180. van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1993). Biofilm bioreactors for waste-water treatment. *TIBTECH*, 11(April), 117-121.
181. van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996). Biofilm processes. in immobilised living cell systems, R.G. Willaert, G.V. Baron and L. De Backer Eds, Wiley, 255-271.
182. Vishnu, Seenayya G., Reddy G. (2000). Direct conversion of starch to L(+)-lactic acid amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6, *Bioprocess Eng.* 23 p. 155–158.
183. Wee Young-Jung, Kim Jin-Nam et Ryu Hwa-Won, (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Biochem. Biotechnol.*, 1-10.
184. Westerfeld W. W. (1945) A colorimetric détermination of blood acetoin. *Journal of Biol. Chemistry* 161, p. 495-502.
185. Yang Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid : Structures and properties. *Academic Dissertation University of Helsinki*.
186. Yao P.X. et Toda K. (1990). Lactic acid production in electro dialysis culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36, p. 111-125.
187. Yun J.S., Wee Y.J. et Ryu H.W. (2003), Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1, *Enzyme Microb. Technol.* 33, p.416–423.

188. Yvon M. et Rijnen. L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11, p. 185-201.
189. Zhang Z. Y., Jin B. et Kelly J.M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal* 35, p. 251–263. Elsevier B.V.
190. Zhou Y., Domínguez J.M., Cao N., Du J. et Tsao G.T. (1999) Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 78, p. 401–407.

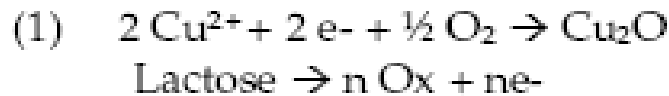
Annexe 1
Méthodes d'analyse physico-chimique

1/ Détermination de la teneur en lactose du lait

Il s'agit d'un dosage indirect du lactose qui utilise les propriétés réductrices de ce sucre : réduction du cuivre par le lactose, dissolution du précipité d'oxyde de cuivre formé à l'aide d'une solution ferrique et dosage des ions ferreux formés par une solution de permanganate de potassium.

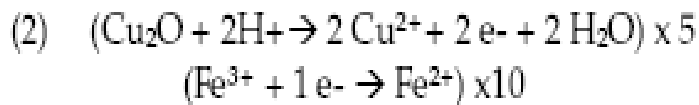
Principe :

Dans la méthode de Gabriel Bertrand, on fait bouillir un volume connu d'une solution de lactose à titrer avec un excès de liqueur de Fehling : ainsi le lactose (sucre réducteur) présent dans l'échantillon réduit partiellement la liqueur de Fehling, il se forme alors un précipité d'oxyde cuivreux Cu_2O (1):

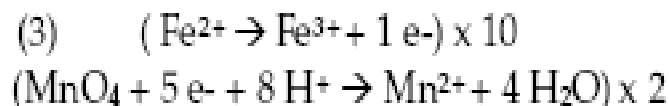


Le précipité de Cu_2O est filtré et oxydées par une solution ferrique (Fe^{3+}) entraînant la formation d'ions ferreux (Fe^{2+}) à caractère réducteur (2) et qui sont alors dosés par manganimétrie par le permanganate de potassium KMnO_4 0,1N jouant le rôle d'oxydant.(3)

Oxydation du Cu_2O par une solution ferrique acide :



Dosage du fer par le permanganate :



Sans lui être proportionnelle, la quantité d'oxydule formée dépend de la quantité de sucre présente et augmente avec elle. Une table donne la correspondance entre la masse de cuivre précipité sous forme de Cu_2O et la masse de lactose en mg contenu dans la prise d'essai.

2/ Détermination de la teneur en protéine

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Kjeldahl qui correspond à la méthode de référence. Cette méthode permet de doser l'azote organique contenu dans les protéines (matières azotées totales) et la correspondance avec les protéines totales est donnée par un coefficient spécifique à chaque produit. Pour le lait le coefficient est $k= 6,38$.

Principe :

Il y a d'abord une minéralisation de la matière organique qui est détruite par l'acide sulfurique. Au cours de la digestion oxydante, elle est transformée en $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ et l'azote se retrouve sous forme de sulfate d'ammoniaque. On utilise un catalyseur de façon à élever le point d'ébullition et accélérer la digestion.

L'ammoniaque est alcalinisé par la soude au cours d'une distillation. Les vapeurs d'ammoniaque sont piégées par l'acide borique et titrées par une solution d'acide fort (HCl).

Cette méthode fonctionne pour des quantités d'azote dans la prise d'essai comprises entre 20 et 50 mg. Pour cela, il faut estimer les teneurs en protéines des produits pour obtenir une prise d'essai significative et titrable.

Résultats:

$$MAT(\text{eng} / 100\text{g}) = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}} \cdot 14 \cdot k \cdot 100}{PE \cdot MS}$$

PE : Prise d'essai en ml.

MS : Matière sèche du produit.

N_{HCl} : Titre de l'acide 0.09 N.

V_{HCl} : Volume titrage en L.

k : Coefficient de conversion et il est égal à 6.38.

Annexe 2

Tests microbiologiques

1/ Etat frais (mobilité)

But : Vérifier la mobilité d'une bactérie.

Technique :

À partir d'un bouillon : On met 2 gouttes de suspension cellulaire sur une lame que l'on recouvre d'une lamelle et lire immédiatement.

À partir d'une gélose : Mettre une goutte d'eau sur la lame avec un fil bouclé puis avec un fil droit toucher une colonie et l'émulsionner dans la goutte d'eau. Recouvrir immédiatement d'une lamelle et lire immédiatement.

Lecture : au microscope

10x lumière au minimum (à droite)

40x lumière à 11h ou 1h.

Attention de ne pas confondre mobilité et mouvement brownien.

Le mouvement brownien de bactéries est caractérisé par un déplacement de masse des bactéries, comme si elles suivaient un courant.

La réelle mobilité est lorsque l'on voit une bactérie partir d'un point A vers un point B indépendamment des autres.

2/ Coloration de Gram

But : Permet de distinguer les bactéries Gram + et Gram – en fonction de la teneur en lipides de la paroi.

Principe : Basé sur la composition chimique de la paroi des bactéries. Le Gram différencie les bactéries selon qu'elles aient conservé le cristal violet après le traitement à l'alcool ou non.

Préparation du frottis :

À partir d'un bouillon : Mettre 2 gouttes de suspension bactérienne préalablement émulsionnée au centre d'une lame. Étaler en couche mince au centre de la lame. Faire sécher complètement sur plaque chauffante et fixer à la flamme 3 fois.

À partir d'une gélose : Mettre une goutte d'eau distillée à l'aide d'un fil bouclé au centre d'une lame. Avec un fil droit prendre une petite partie d'une colonie isolée, la déposer à côté de la goutte pour la visualiser et la mélanger avec l'eau. Faire sécher complètement sur plaque chauffante et fixer à la flamme 3 fois.

Technique de coloration :

1- Colorant : Cristal violet 30 sec et rincer à l'eau

2- Mordant : Iode gram 30 sec et rincer à l'eau

3- Décolorant : Alcool (compter 1-2-3 si fait à partir d'un bouillon et 1-2-3-4-5 si fait à partir d'une gélose) en inclinant la lame et rincer immédiatement
ATTENTION étape importante

4- Contre-colorant : Safranine 30 sec et rincer à l'eau

5- Sécher la lame avec du papier buvard.

Lecture : À l'immersion : 100x

Gram positif (+) : violet

Gram négatif (-) : rose

3/ Production du diacétyle (acétoïne) par VP (Vosges-Proskauer) (bouillon)

But : Mettre en évidence la production d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne) à partir de la dégradation du glucose.

Principe : L'acide pyruvique produit lors de la dégradation du glucose est transformé en acétoïne, une substance neutre. En présence d'O₂ de l'air et d'un alcali (KOH), l'acétoïne est oxydée pour former du diacétyle, impliqué dans la production de couleur. Si la bactérie possède le bagage enzymatique nécessaire (VP+), elle dégrade les acides organiques en substances neutres, principalement en acétyl-méthyl-carbinol

Technique d'ensemencement : On ensemence le bouillon avec une colonie prélevée avec un fil bouclé.

Réactif : A : alpha-naphtol
B : hydroxyde de potassium (KOH) 40%

Incubation : 48 heures à 30°C

Lecture et résultat : ajouter de 6 gouttes de réactif A
2 gouttes de réactif B.
Laisser reposer 15 min.
Lire maximum 1h après l'ajout des réactifs.
Négatif (-) : jaune ou inchangé
Positif (+) : rouge

Si une bactérie est VP+ elle est nécessairement MR- de même qu'une bactérie MR+ est nécessairement VP-.

4/ Dégradation du lactose (bouillons)

But : déterminer si la bactérie est capable de dégrader un sucre.

Principe : Lorsque le sucre est dégradé, il en résulte une acidification du milieu qui se traduit par un changement de couleur de ce dernier grâce à un indicateur de pH.

Technique d'ensemencement : On ensemence le bouillon à l'aide d'un fil bouclé à partir d'une culture pure.

Indicateur de pH :

Glucose : Bromocrésol pourpre (Jaune à 5.2 ↓)

Lactose : Rouge de phénol (Jaune à 6.8 ↓)

Incubation : 24 heures à 30°C

Lecture : milieu jaune ou milieu rouge ou pourpre

Résultat : lactose + (jaune)

lactose – (rouge ou pourpre)

N.B. : les indicateurs peuvent changer.

5/ Citrate de Simmons (gélose inclinée en tube)

But : Déterminer si une bactérie est capable ou non de se développer sur un milieu contenant comme seule source de carbone, le citrate de sodium, un sel inorganique.

Principe : Le milieu utilisé contient un autre sel inorganique : le phosphate d'ammonium. Les bactéries qui sont capables d'utiliser le citrate comme source de carbone sont également capables d'utiliser le phosphate d'ammonium comme source d'azote. Il en résulte la production d'ammoniac (NH_3) qui alcalinise le milieu et le fait changer de couleur.

Technique d'ensemencement : Strie sur la pente de la gélose avec un fil bouclé. Important : dévisser le bouchon d' $\frac{1}{4}$ de tour.

Indicateur de pH : Bleu de bromothymol

Incubation : 24 à 48 heures à 30°C Si douteux, incuber 24 heures supplémentaires.

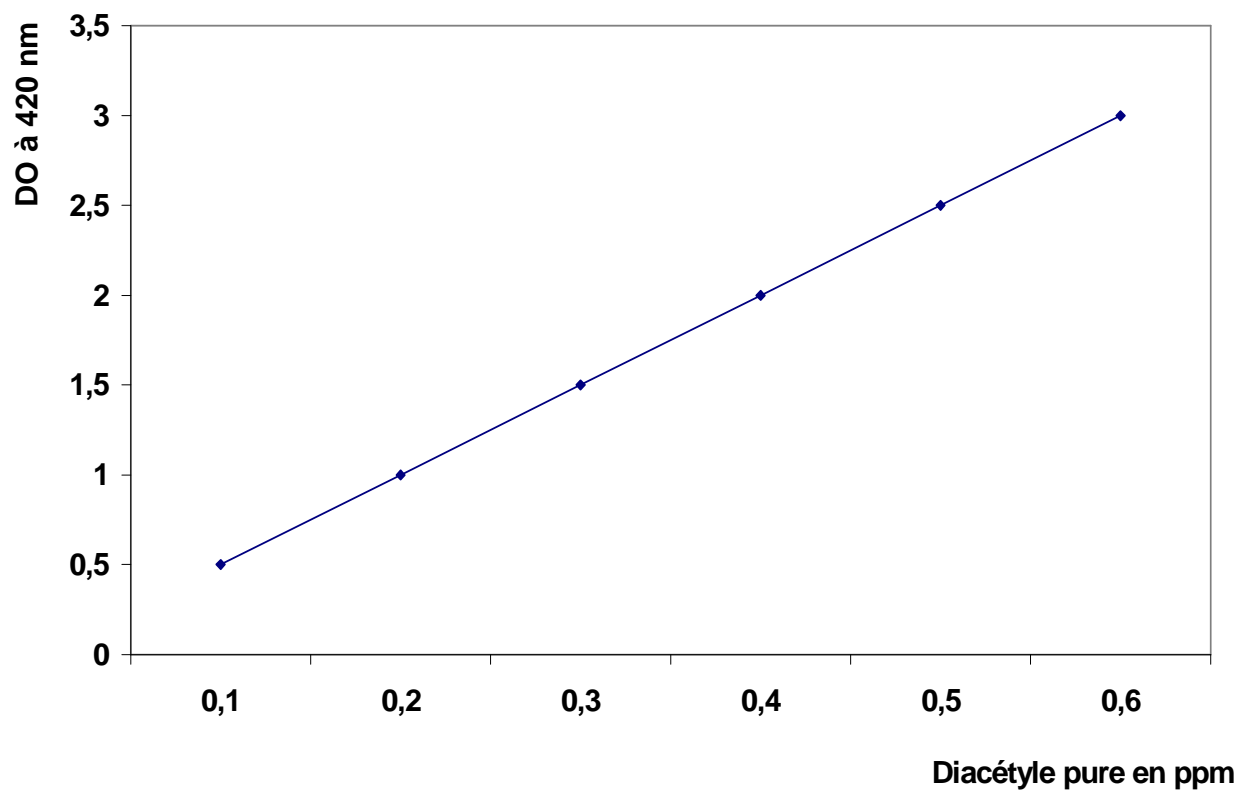
Lecture et résultat :

Positif (+) : bleu

Négatif (-) : Vert

Annexe 3
Courbes d'étalonnage

Droite d'étalonnage (dosage du diacétyle).



Annexe 4
Les milieux de cultures

Tableau 1 : Composition de milieu M17 (bouillon et agar)

Constituants	g/l
Peptone de soja	5
Peptone de viande	2,5
Peptone de caséine	2,5
Extrait de viande	5
Extrait de levure	2,5
Lactose	5
Acide ascorbique	0,5
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0,25

pH : 7,2

La composition du milieu M17 gélose: il s'agit du milieu précédant + 15 g/l d'agar.

Annexe 4

Droite d'étalonnage (dosage du diacétyle).

