

OPTIMISATION ET MODELE DE PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* SUR LACTOSERUM

Reçu le 22/09/2008 – Accepté le 27/04/2009

Résumé

Streptococcus thermophilus S13 est une souche de bactéries lactiques thermophiles et homolactique qui produit uniquement l'acide L (+) lactique. L'objectif de cette étude consiste en une optimisation des paramètres physicochimiques (température et pH) ainsi que le milieu de culture pour produire l'acide lactique par cette bactérie sur lactosérum doux déprotéiné et stérilisé. Les analyses physicochimiques de lactosérum ont montré que ce dernier présente une qualité adéquat. La température 42°C, pH=6.42, l'adjonction de 1% d'extrait de levure ont amélioré la croissance cellulaire ainsi que la production d'acide lactique où le taux de croissance maximal $\mu_m = 0.412 \text{ h}^{-1}$ et la vitesse moyenne d'acidification $v_m = 1.095 \text{ g/l.h}$. Cette fermentation a suivi le modèle de Luediking et Piret : $y = \alpha\mu + \beta$ ($\alpha = 5.1523$, $\beta = 0.0821$, $R^2 = 0.9326$) où elle a mis en évidence un léger découplage entre la croissance et la production d'acide lactique.

Mots clé : *Streptococcus thermophilus* S13, optimisation, production d'acide lactique. Lactosérum doux, modèle.

Abstract

Streptococcus thermophilus S13 is thermophilic and homolactic lactic acid bacteria strain which produces only L(+) lactic acid. The aim of this study consists of the optimization of physicochemical parameters (temperature and pH), and also the culture medium for producing lactic acid by this bacterium on deproteinized and sterilized sweet cheese whey. The physicochemical analysis of cheese whey showed that it presents a suitable quality. The temperature 42°C, pH = 6.42, adding about 1% of yeast extract improved the cell growth and also the lactic acid production where high specific growth rate $\mu_m = 0.412 \text{ h}^{-1}$ and high average rate of acidification $v_m = 1.095 \text{ g/l.h}$. This fermentation followed Luediking and Piret model: $y = \alpha\mu + \beta$ ($\alpha = 5.1523$, $\beta = 0.0821$, $R^2 = 0.9326$) where it showed the light dissociation between growth and lactic acid production.

Key words: *Streptococcus thermophilus* S13, optimization, lactic acid production sweet cheese whey, model.

K. BOUDJEMA¹
F. FAZOUANE-NAIMI¹
A. HELLAL²
A. MECHAKRA³

¹Département de biologie, Faculté des Sciences, Université de M'Hamed Bouguerra, Boumerdes, Algérie.

²Département de génie de l'environnement, Ecole Nationale Polytechnique El Harrach, Algérie.

³Laboratoire de Biologie et Environnement, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

ملخص

Streptococcus (, pH)

thermophilus S13

Streptococcus

= pH °42) %1

thermophilus S13

¹⁻ 0.412

(6.42

Luediking . / 1.095

(0.9326= ²R , 0.0821= β 5.1523= α) $y = \alpha\mu + \beta$: Piret

, *Streptococcus thermophilus* S13: _____

Le monde a connu un développement très important dans le secteur industriel tandis qu'il y a toujours des risques et des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé publique. Pour cela, les écologistes et les biologistes se sont intéressés depuis longtemps aux procédés et techniques qui servent à limiter la pollution engendrée par les industries.

Parmi ces dernières, l'industrie laitière est une des plus polluantes par le rejet de quantités importantes de lactosérum. Du fait de sa richesse en élément nutritif tels que lactose, protéine solubles, vitamines hydrosolubles, matières grasses et les éléments minéraux, le lactosérum constitue un excellent milieu de culture pour les microorganismes, ce qui fait de lui un facteur de pollution redoutable [1]. Il réduit la vie aquatique en captant l'oxygène dissous [2], car un litre de lactosérum présente une demande biochimique en oxygène (DBO) élevée qui varie entre 35 et 60 g/l [3].

Pour diminuer le risque polluant du lactosérum, ce dernier est utilisé dans différents domaines tels que l'alimentation humaine, l'alimentation animale et éventuellement dans le domaine de la biotechnologie afin de produire des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.), enzymes, vitamines, alcool, acides organiques (acide citrique, acide lactique, ... etc).

L'acide lactique ou acide α hydroxy propionique est synthétisé soit par voie chimique soit par voie microbienne, il se présente sous deux formes optiquement actives, la configuration L (+) est lévogyre et la configuration D (-) est dextrogyre. L'isomère acide L lactique est préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de L lactate déshydrogénase dans l'être humain [4] tandis que l'isomère acide D lactique est parfois dangereux au métabolisme humain et peut causer un acidose et décalcification [5]. *Streptococcus thermophilus* est homofermentaire, produit uniquement l'acide L lactique [2].

Dans le but de la valorisation du lactosérum, nous nous sommes intéressés à la production d'acide lactique par fermentation du lactose en utilisant une souche bactérienne sélectionnée pour son pouvoir acidifiant. Notre étude a porté sur :

- Etude de la composition du lactosérum doux qui provient de l'ORLAC de Draa Ben Khedda
- Optimisation des conditions physico-chimiques de l'activité de la bactérie utilisée
- Optimisation du lactosérum en tant que substrat de culture
- Optimiser les paramètres de croissance et d'acidification tels que la vitesse spécifique de croissance (μ) et la vitesse moyenne d'acidification (vm).
- Production d'acide lactique dans les conditions optimales.
- Etablissement d'un modèle mathématique de fermentation.

MATERIELS ET METHODES

Collection et préparation de milieu de culture

Le milieu de culture utilisé au cours de notre fermentation est à base de lactosérum doux issu de la fabrication de fromage à pâte cuite "Camembert" provenant de l'ORLAC de Draa Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Avant son utilisation comme substrat de fermentation, ce lactosérum est déprotéiné selon le protocole proposé par Moulin et *al* [6].

Le pH de lactosérum est ajusté à une valeur de 4,6 (point isoélectrique des caséines) par addition d'acide sulfurique (1N), puis autoclavé pendant 5 minutes à 102°C. Après refroidissement, il est filtré sur un filtre (type Wattman). L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sérum limpide, le filtrat recueilli est réajusté à pH=7 par NaOH (1N), puis stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

Préparation de l'inoculum

La souche utilisée dans notre étude est *Streptococcus thermophilus* S13, souche homolactique. C'est une souche de la collection du laboratoire de sciences et techniques de l'environnement de l'ENP, Alger. Elle est revivifiée par deux repiquages sur milieu M₁₇ liquide, puis elle est conservée à une température de 4°C dans des tubes dits tubes de conservation contenant de la gélose M₁₇ incliné.

A partir de la culture sur gélose M₁₇ inclinée, on prélève quelques colonies qui seront transférées dans un tube de 10 ml de milieu M₁₇ liquide, puis on l'incube à 42°C pendant 24 heures. Cette étape permet la réactivation de la souche "*Streptococcus thermophilus* S13".

Après 24 heures d'incubation, on introduit aseptiquement 1ml de cette préculture dans un erlenmeyer d'une capacité de 250 ml qui contient 30ml du milieu M₁₇, puis on l'incube à 42°C pendant 17 heures sans agitation. Lorsque la croissance bactérienne est suffisamment avancée, ce milieu va servir à inoculer le milieu de culture. La fermentation en batch (discontinue) est réalisée dans des erlenmeyers d'une capacité de 1 litre, contenant 300 ml de milieu de culture (lactosérum doux déprotéiné et autoclavé), ces erlenmeyers sont ensemencés stérilement par 30 ml de préculture et incubés à 42°C sans agitation.

Méthodes analytiques

La concentration totale en lactate est mesurée par la méthode préconisée par le manuel suisse des denrées alimentaires [7], qui est fondée sur la mesure de l'absorbance du complexe lactate-Fe³⁺ à 425 nm. La concentration de lactose dans le milieu de culture est déterminée par la méthode de Bradford [8] qui est basée sur une défécation de lactosérum, oxydation de lactose et lavage du précipité de Cu₂O, réoxydation de Cu₂O et dosage de sel ferreux formé puis titration par KMnO₄ (0.1N). La densité optique de biomasse (DO) est déterminée par spectrophotomètre UV-VIS (UV-9200) à une longueur d'onde égale 600 nm sachant que DO₆₀₀ = Y. PS (PS : poids sec. Y : facteur égale 1.01285). Le poids sec de biomasse est obtenu après centrifugation de 20 ml de lactosérum, le culot

ainsi récupéré est lavé avec de l'eau distillée puis séché à 105 °C [9].

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Composition biochimique du lactosérum

L'utilisation de lactosérum doux déprotéiné comme substrat de fermentation lactique nécessite au préalable une étude biochimique détaillée. La connaissance de cette composition est nécessaire pour procéder par la suite à des essais de supplémentation afin d'obtenir un milieu de culture adéquat. D'après le tableau 1 on constate que la composition biochimique moyenne du lactosérum doux (brute et traité) provenant de l'ORLAC de Draa Ben Khedda, n'est pas très différente de celle obtenue par Sottiez [10] dans le tableau 2 dans le cas du lactosérum de fromage à pâte pressée. Toutefois, les valeurs sont légèrement inférieures ce qui s'expliquerait par une différence de la composition initiale de lait utilisé.

Tableau 1 : composition biochimique moyenne du lactosérum doux provenant de L'ORLAC de Draa Ben Khedda.

pH	Lactosérum brut (avant stérilisation et filtration)	Lactosérum traité (filtré et stérilisé)
		6,00- 6,30
Composition en g/l		
- Extrait sec	79	70
- Taux des cendres	7,98	7,96
- Chlorures	1,80	1,75
- Matière grasse	1,00	0
- Teneur en azote total	1,61	1,12
- Teneur en protéines	10,06	7
- Teneur en lactose	61	57,9

Comme montre le tableau 1, le lactose est le constituant le plus important du lactosérum (57.9 g/l), il représente 70 à 72 % de l'extrait sec [11].

Après stérilisation, on remarque une diminution de concentration de lactose de 3.1g/l, cette perte en lactose peut être due à l'hydrolyse thermique (120°C).

Après traitement du lactosérum par chauffage et filtration, on n'observe pas vraiment une grande différence entre les deux types de lactosérum (brute et traité) sauf qu'il y a diminution de taux de protéines de 10,06 g/l à 7 g/l avec un pourcentage de 30,41%.

Enfin, on peut considérer notre lactosérum comme un milieu de culture adéquat à la croissance de *Streptococcus thermophilus* S13.

Optimisation de la fermentation en batch

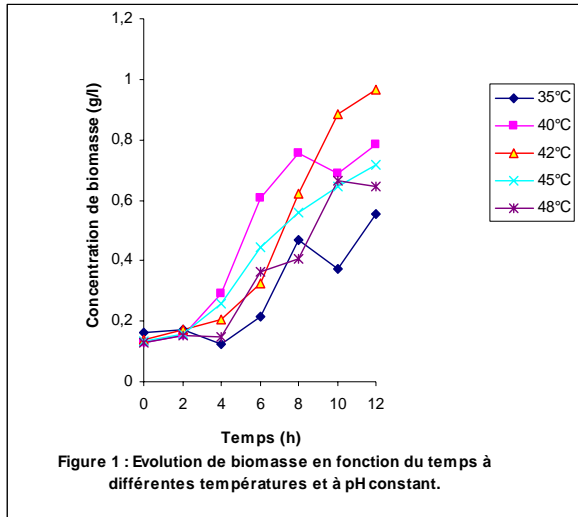
Optimisation des paramètres physicochimiques

- Effet de température

D'après la figure 1, on constate que la croissance est meilleure à 42°C et elle atteint une valeur de 0.9658g de matière sèche / litre de milieu de culture. Cette croissance est abaissée si on augmente ou on diminue la température de T = 42°C. Selon Rosso et al[12], quand la température du milieu se situe en haut ou en bas de température requise pour la croissance optimale, l'activité microbienne est réduite et le microorganisme peut éventuellement se détruire.

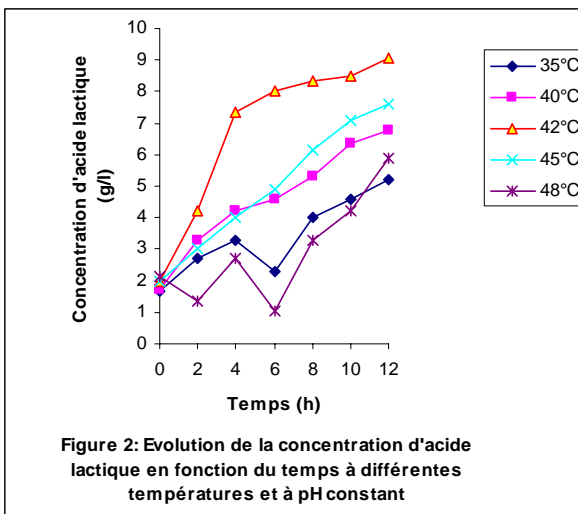
Tableau 2 : composition de différents types de lactosérum [10]

	Lactosérum doux			Lactosérum acide		Lactosérum déprotéiné perméat doux d'ultrafiltration
	Pâte pressée cuite (Emmental)	Pâte pressée non cuite (Edam)	camembert	Pâte fraîche	Caséine	
Liquide (%)	93,5	95	93,5	94	94	-
extrait sec en %	6,5	5,00	6,50	6,00	6,00	4,50
pH	6,70	6,50	6,10	6,00	4,60	6,40
Composition en g/l						
Lactose	76,00	75,00	75,00	65,5	74,00	85,00
Protéines	13,50	13,50	12,00	12,00	12,00	4,00
Cendres	8,00	8,00	8,25	9,00	12,00	9,00
Acide lactique	1,80	2,80	2,20	10,00	1,80	2,00
Matière grasse	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,00
Matière minérale						
Ca en %	0,60	0,65	0,70	1,90	1,80	0,60
P en %	0,60	0,65	0,70	1,50	1,50	0,60
Chlorure (NaCl)	2,50	2,50	2,50	2,50	7,50	2,80



La figure 2 montre clairement que la température de 42°C a une meilleure production d'acide lactique (Pf = 9.06g/l) par rapport aux autres températures 35°C, 40°C, 45°C, 48°C qui ont les concentrations finales en acide lactique respectivement de 5.22g/l, 6.77g/l, 7.59g/l, 5.88g/l.

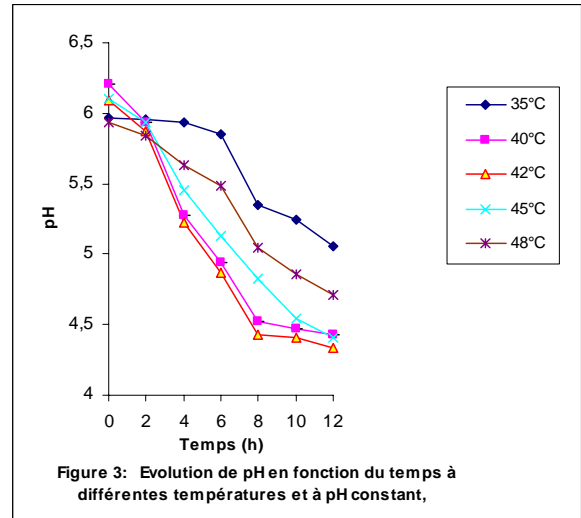
En effet, dans les systèmes biologiques, la température affecte le taux des réactions biochimiques, l'activité des enzymes extracellulaires et le temps de génération [13], ce qui influe significativement sur la production d'acide lactique.



Durant les cinq (5) fermentations, le pH diminue (figure3). Par exemple, à T = 42°C et au bout de quatre heures, il passe de 6.09 à 5.22 et il arrive à 4.33 à la fin de la fermentation. Selon Terre [14], *Streptococcus thermophilus* acidifie le lait plus rapidement. En plus, les résultats de Chamba et Prost [15] et Chamba [16] ont montré qu'une souche n'est acidifiante que si la diminution de pH égale au moins 0.5 unité en quatre heures pour les *Streptococcus thermophilus*. A cet égard, on peut considérer notre souche *Streptococcus thermophilus* S13 comme acidifiante.

La figure 4 a bien illustré la dégradation de lactose par une simple droite décroissante. Cela veut dire que le lactose

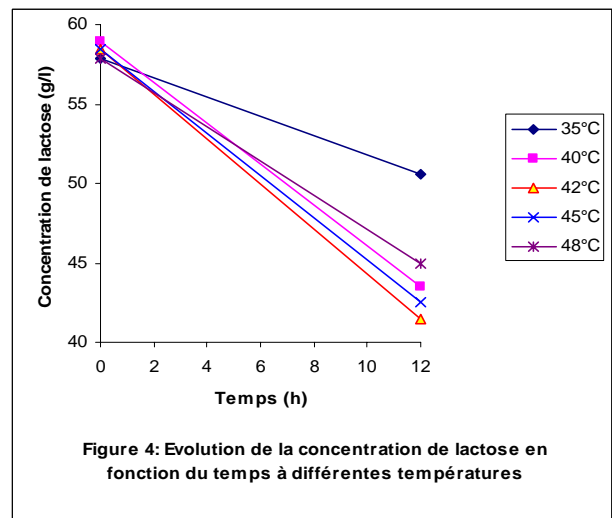
est consommé par la bactérie et converti par la suite en un produit fini (acide lactique). Sa production est représentée par une courbe croissante (figure 2).



A T = 42°C le taux de croissance maximal $\mu_{max} = 0.155h^{-1}$ et la vitesse moyenne d'acidification $V_m = 0.755$ g/l.h, pour cela on peut considérer cette température comme optimale pour la croissance et la production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* S13 cultivée sur lactosérum doux.

Radke-Mitchell et Sandine [17], Bensiamer [18] et Boubechiche [19] ont également signalé que la température de 42°C est optimale pour la souche *Streptococcus thermophilus* CNRZ302.

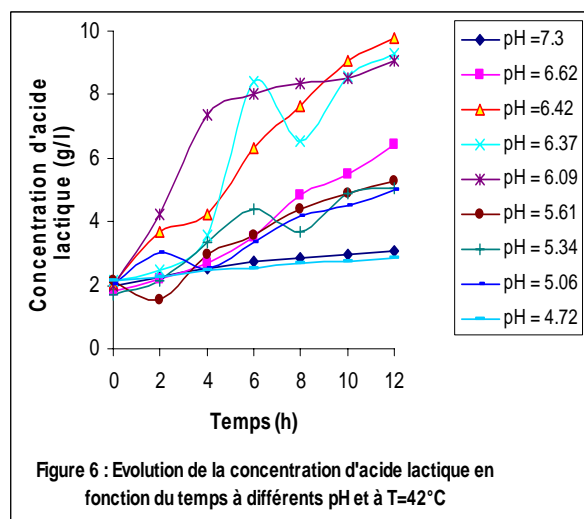
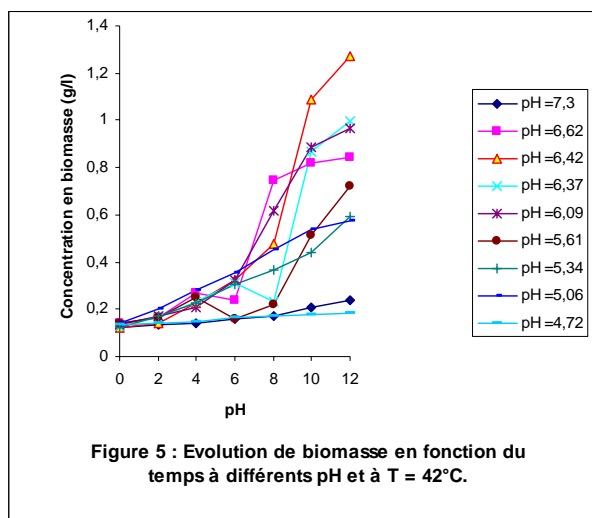
En plus, Robinson [20] a préconisé cette température d'incubation pour les souches de *Streptococcus thermophilus* en suivant comme critère d'acidification l'acidité titrable. Selon Bourgeois et Larpent [21], *Streptococcus thermophilus* se distingue essentiellement des autres streptococcus lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42°C – 43°C. De même, Gyosheva et al. [22] ont travaillé sur 75 souches de *Streptococcus thermophilus* et ont trouvé la température 42°C comme température d'incubation pour ces dernières.



- Effet de pH

Après déprotéinisation, filtration, ajustement de pH à 7 à l'aide de NaOH (1N), on stérilise le milieu de culture dans un autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Cette stérilisation provoque la précipitation d'une partie des protéines limitant ainsi la quantité d'azote disponible dans le milieu [23].

Les figures 5 et 6 montrent que la croissance ainsi que la production d'acide lactique sont inhibées à pH = 4.72, tandis qu'il y a augmentation de la biomasse et la teneur en acide lactique avec l'élévation de pH jusqu'à pH = 6.42 où la concentration finale de biomasse $X_f = 1.30$ g/l et la concentration finale d'acide lactique $P_f = 9.90$ g/l.h. Au-delà de ce pH, la croissance et la production d'acide lactique diminuent.



Il est connu qu'à des pH bas, l'acide lactique provoque une pression dans les cellules microbiennes [24] puis les bactéries perdent leurs activités physiologiques entraînant ainsi une inhibition de β galactosidase et d'autres enzymes de glycolyse.

De façon générale, le lactose est converti en acide lactique par la voie d'EMBDEN MEYERHOF qui forme deux molécules de lactate par molécule de lactose consommé [25]. A l'aide de β -galactosidase, le lactose est scindé en galactose et glucose pour donner par la suite le pyruvate, ce dernier est transformé en acide lactique et énergie sous forme d'ATP. Durant la phase exponentielle où la croissance et la production sont assez importantes, la bactérie exige beaucoup d'ATP pour assurer la synthèse et la production. Par contre, cette exigence diminue dans la phase stationnaire.

Aux pH = 4.62 et 7.3, *Streptococcus thermophilus* S13 nécessite l'ATP beaucoup plus dans la maintenance que dans la croissance et la production, ce qui explique l'inhibition à des pH bas ou élevés. A pH = 6.42, le taux de croissance maximal μ atteint une valeur maximale égale 0.283 h^{-1} et la vitesse moyenne d'acidification V prend une valeur maximale égale 0.816 g/l.h . on peut conclure que ce pH est pris comme optimum pour notre souche *Streptococcus thermophilus* S13 afin qu'elle puisse donner une bonne croissance et production d'acide lactique.

McBean et al. [26] ont proposé un pH de 6 pour *Streptococcus thermophilus*. Par contre Tayeb et al. [27] ont adapté un pH de 6.5 pour la même souche. Les résultats des travaux de Hutkins et Nannen [28] ont montré que le pH externe optimum pour les bactéries lactiques thermophiles et plus précisément *Streptococcus thermophilus* est de 6 à 7,5.

D'une manière générale, la production d'acide lactique a un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques et plus particulièrement *Streptococcus thermophilus*. Les travaux de Konings et Otto [29] et Amrane [30], ont montré que lorsque le pH du milieu extérieur diminue, par l'accumulation des acides organiques (acide lactique), la bactérie lactique maintient son pH intracellulaire plus alcalin (pH = 6.6) que le milieu extracellulaire, car les cellules excrètent rapidement l'acide lactique dissocié dans le milieu extracellulaire, en plus la membrane cellulaire est imperméable pour les protons extracellulaires (molécule de lactate) [23].

La différence de pH entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire forme un gradient de pH (ΔpH). Pour excréter les protons à l'extérieur, la bactérie consomme l'ATP en activant l'enzyme H^+ , ATPase [31], mais en fin de phase exponentielle de croissance, la quantité d'ATP disponible ne suffit plus, le gradient de pH disparaît, les activités hexokinases baissent et entraînent l'inhibition de la croissance et l'activité des enzymes intracellulaires telle que le β galactosidase car le pH optimal de la β -D-galactosidase provenant de *Streptococcus thermophilus* est proche de neutralité [23].

Optimisation des paramètres liés au milieu de culture

Effet de l'extrait de levure

Pour augmenter le rendement de croissance et de production d'acide lactique, on essaiera de compléter le lactosérum par extrait de levure car cette source azotée

constitue une source de vitamines et de facteurs de croissance [32].

D'après la figure 7, on voit que le temps de latence pour une concentration d'extrait de levure EL = 0 % est relativement long (environ 3 à 4 heures) tandis qu'il est réduit pour des concentrations d'extrait de levure 1 %, 5 %, 10 %. Ce temps de latence est suivi par une phase d'accélération, il dépend généralement de plusieurs facteurs : taille de l'inoculum, l'état physiologique de la bactérie et la préculture.

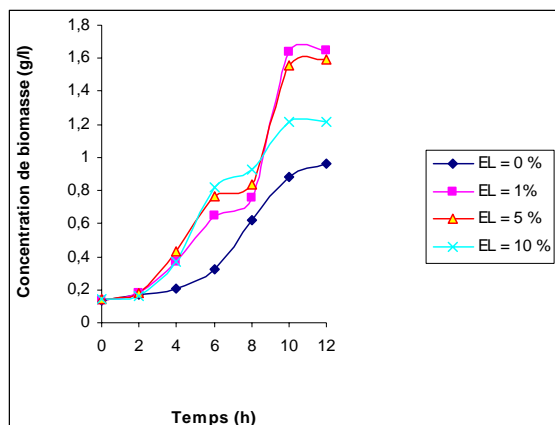


Figure 7 : Evolution de biomasse en fonction du temps à différentes concentrations en extrait de levure et à T = 42°C.

Ce temps de latence réduit correspond à une adaptation de *Streptococcus thermophilus* S13 à l'extrait de levure additionné. L'adjonction d'extrait de levure au lactosérum provoque une amélioration de la croissance où les concentrations finales de biomasse Xf égal 1.65 g/l, 1.59 g/l, 1.218 g/l pour des concentrations d'extrait de levure respectivement de 1 %, 5 %, 10 %. Selon Bury et al. [33], l'addition d'extrait de levure au lactosérum déprotéiné peut considérablement augmenter non seulement le taux d'acidification par *Lactobacillus bulgaricus* 11842 mais aussi l'activité de β -galactosidase. Cette activation entraîne la dégradation de lactose et une bonne assimilation de glucose qui se traduit par une bonne croissance. Cette amélioration a été attribuée à la disponibilité d'acides aminés libres, de peptides, purines de pyrimidine et de cofacteurs...etc [5].

En plus, la figure 8 a montré une amélioration marquée concernant la production d'acide lactique où la concentration finale d'acide lactique Pf prend les valeurs de 8.16 g/l, 9.71 g/l, 8.33 g/l, 7.35 g/l pour des concentrations d'extrait de levure suivantes : 0 %, 1 %, 5 %, 10 %.

En effet, durant la phase exponentielle la bactérie nécessite beaucoup d'énergie pour croître et pour produire l'acide lactique, l'amélioration observée dans la croissance peut être expliquée par la grande exigence de bactérie à l'énergie pour la croissance et la maintenance. En revanche, une petite quantité d'énergie va être destinée à la production d'acide lactique.

Les deux figures 7 et 8 présentent une meilleure croissance et production d'acide lactique à une concentration d'extrait de levure égale 1 % tandis qu'il y a une diminution de croissance et de production aux concentrations 5 %, 10 %. Ce ralentissement du taux de croissance ainsi que le taux de production peut être attribué à une inhibition par un excès de supplément (extrait de levure). Levander et Radström [34] ont attribué l'inhibition de la croissance et la production d'acide lactique à des concentrations d'extrait de levure au-dessus de 10g/L. Amran [35] a travaillé sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus helveticus* cultivée sur lactosérum supplémenté par extrait de levure et il a conclu que les concentrations d'extrait de levure (EL) supérieures à 20 g/l deviennent toxiques pour le microorganisme. En plus, Ghaly et al. [36] ont signalé qu'à des concentrations élevées en extrait de levure, la concentration cellulaire diminue sous l'effet de forte toxicité.

Avec une concentration finale de biomasse Xf = 1.65 g/l et une concentration d'acide lactique Pf = 9.71 g/l, nous retiendrons la concentration d'extrait de levure EL = 1% (10g/l) comme concentration optimale à la croissance et la production d'acide lactique.

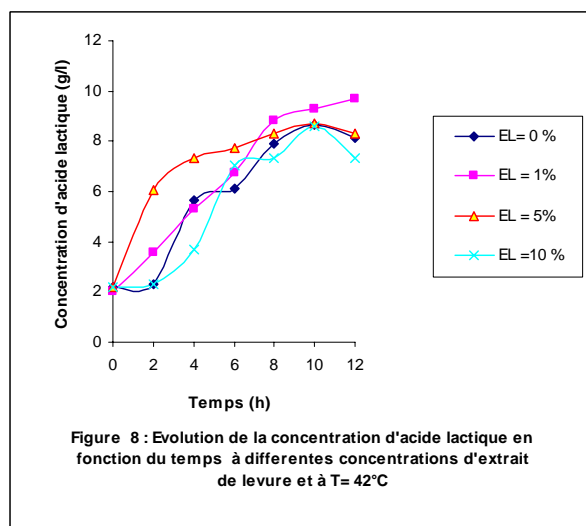


Figure 8 : Evolution de la concentration d'acide lactique en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure et à T = 42°C.

En effet, des résultats similaires ont été trouvés par Kulozik et Wilde [37], Bouguettoucha et al. [38], qui ont travaillé sur une autre bactérie lactique thermophile libre *Lactobacillus helveticus*. En revanche, Schepers et al. [39], Sirisaneeyakul et al. [40] ont travaillé respectivement sur des bactéries lactiques thermophiles immobilisées *Lactobacillus lactisIO1*, *Lactobacillus helveticus* et ont jugé que 10 g/l d'extrait de levure (EL) est la concentration optimale pour ces deux souches afin qu'elles puissent donner une bonne croissance et production d'acide lactique.

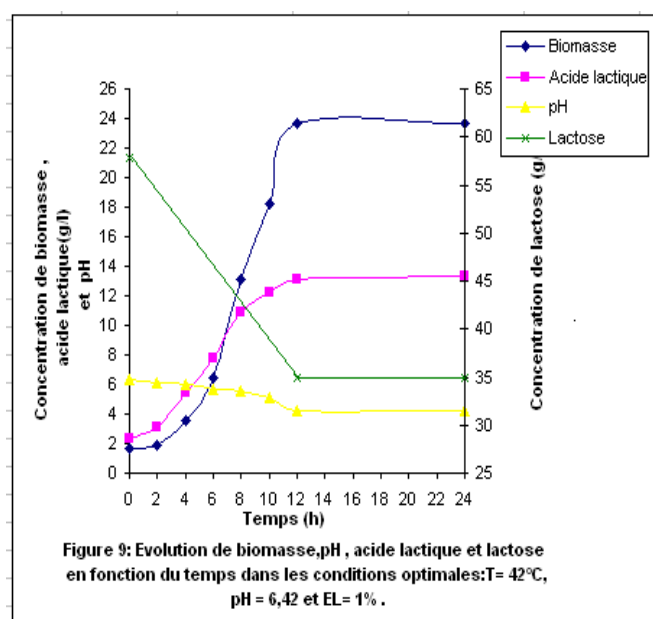
- Production d'acide lactique dans les conditions optimales

Pour étudier l'effet des paramètres physicochimiques (T, pH) et les paramètres liés au milieu de culture (Extrait de levure). On essaiera de regrouper les 03 facteurs dans une même fermentation sous les conditions citées dans le tableau 3. La figure 9 représente l'évolution de biomasse,

pH, acide lactique et lactose en fonction du temps .Elle nous a permet de voir que la biomasse passe de 0.165g/l à 2.368 g/l, l'acide lactique passe de 2.28 g/l à 13.31 g/l, diminution de pH jusqu'à 4.23 et dégradation de lactose de 57.9 g/l à 35 g/l.

Tableau 3 : Conditions optimales

Paramètres optimaux	Paramètres fixes
<ul style="list-style-type: none"> • T : 42°C • pH : 6,42 • EL: 1 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Inoculum : 10 % (v/v) de préculture • Absence d'agitation et d'aération • Durée de fermentation : 24 h • Milieu de culture : 300 ml de lactosérum déprotéiné et autoclavé



Il apparaît que la croissance et la production d'acide lactique sont inhibées lorsque le pH chute à 4.23. Cela est dû à la forte acidité (pH bas) qui résulte de l'accumulation de l'acide lactique. Amrane [30] a conclu que l'inhibition peut être due à l'épuisement de source carbonée. Mais dans notre travail, ce n'est pas le cas, car la concentration de lactose passe de 57.9 g/l à 35 g/l avec un rendement de bioconversion de lactose en acide lactique $Y_{p/s} = 48.16\%$, donc il reste dans le lactosérum 51.84 % de lactose non consommé par la bactérie.

D'autres chercheurs tels que Somkuti et Steinberg [41] ont montré que le galactose est un facteur responsable de l'inhibition de croissance du *Streptococcus thermophilus*. Ces travaux sont confirmés par Levander et Radstrom[34] qui ont montré que les souches de *Streptococcus thermophilus* sont considérées galactose (-) et elles ne peuvent fermenter le galactose malgré qu'elles possèdent le gène nécessaire pour le catabolisme de galactose.

- *Modèle de croissance et de production d'acide lactique*

Pour comprendre les phénomènes biologiques et plus précisément les cinétiques de croissance et de production d'acide lactique, on essaiera de traduire les résultats expérimentaux par un modèle mathématique en utilisant un logiciel "ORIGIN" qui est basé sur la méthode des moindres carrées.

De façon générale, le choix de modèle mathématique est fait selon deux critères :

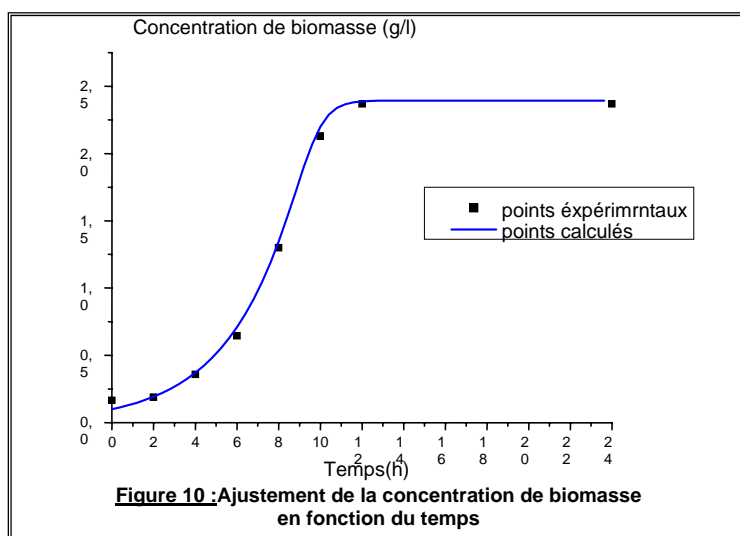
- Il doit avoir une meilleure corrélation (R^2 plus élevé (proche de 1)) ;

- Il doit avoir aussi une excellente représentation du processus étudié.

Avant la modélisation des cinétiques de croissance bactérienne et de production d'acide lactique, il est nécessaire de passer par la dérivation par rapport au temps de la grandeur mesurée.

- *Modèle de croissance bactérienne*

La figure 10 donne la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* S13 dans les conditions optimales : T= 42°C, pH= 6.42 et une concentration d'extrait de levure EL = 1% sachant que les points correspondent aux valeurs de X expérimentales et la courbe correspond aux X numériques.



La fonction qui nous a permis d'avoir un meilleur ajustement c'est la fonction de Richards qui a la forme suivante :

$$Y = a [1 + (d-1) e^{-k(x-x_c)}]^{1/(1-d)} (*)$$

Avec a, x_c , d, k sont des constants sans signification biologique et ils prennent les valeurs suivantes : a = 2.37165, $x_c = 8.96709$, d = 6.83021, k = 1.8555.

Selon cette figure, on remarque que l'ajustement est excellent pour toutes les phases de croissance où le coefficient de corrélation R^2 est très élevé ($R^2 = 0.99913$), c'est-à-dire les points expérimentaux sont en très bon accord avec ceux calculée et cela veut dire qu'il y a peu

d'erreurs entre la réalité et l'expérimentation. Donc on peut exprimer la biomasse par l'équation ci-après :

$$X = 2.37165 [1 + 5.83021 \cdot e^{-1.8555(t - 8.96709)}]^{1/(-5.83021)}$$

La figure 10 est de forme sigmoïde a été mise en œuvre pour la première fois par Richards en 1961 en suivant l'équation : $Y = [a(1 + b \cdot e^{c \cdot (d-t)})^{-1/b}]$ [42]. Selon Beal et al [43]; Boudrant et al [44], ce modèle appelé descriptif (ou purement mathématique) permet d'exprimer les variables de croissance ou d'acidification par des équations dépendant du temps et comportant un nombre variable de paramètres n'ayant pas de signification biologique.

- **Modèle de production d'acide lactique**

La figure 11 donne la cinétique de production de *Streptococcus thermophilus* S13 dans les conditions optimales : T= 42°C, pH = 6.42, une concentration d'extrait de levure EL = 1%. Cette courbe porte les points expérimentaux ainsi que la courbe ajustée. L'ajustement se fait par la même équation utilisée dans l'ajustement de la cinétique de croissance sachant que a = 13.35087, xc = 6.41061, d = 4.16642, k = 0.72952.

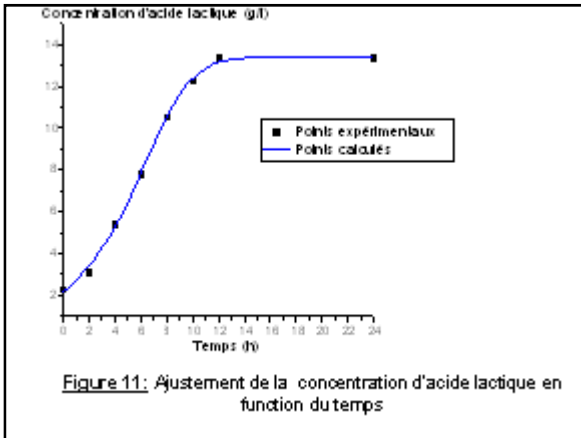


Figure 11: Ajustement de la concentration d'acide lactique en fonction du temps

D'après la figure 11, on note que l'écart est réduit entre les points expérimentaux et les points calculés où le coefficient de corrélation $R^2 = 0.99816$, donc on peut exprimer la production par l'équation suivante :

$$P = 13.35087 [1 + 3.16642 \cdot e^{-0.72952(t - 6.41061)}]^{1/(-3.16642)}$$

- **Relation entre la croissance et la production d'acide lactique**

En ce qui concerne la production des métabolites, Gaden [45] a décrit trois types de cinétiques:

- formation de produit directement lié au métabolisme du substrat (production couplée de la croissance).

$$qp = \alpha \cdot \mu \quad (1)$$

- formation de produit non lié au métabolisme du substrat (production dissociée de la croissance).

$$qp = \beta \quad (3)$$

Dans le cas de notre travail, la représentation de qp en fonction de μ est illustrée sur la figure 12, cette courbe ne passe pas par l'origine et elle prend l'équation suivante :

$y = \alpha\mu + \beta$ ((Type 2 de la classification de Gaden) où α et β sont des coefficients liés à la croissance et à la production.

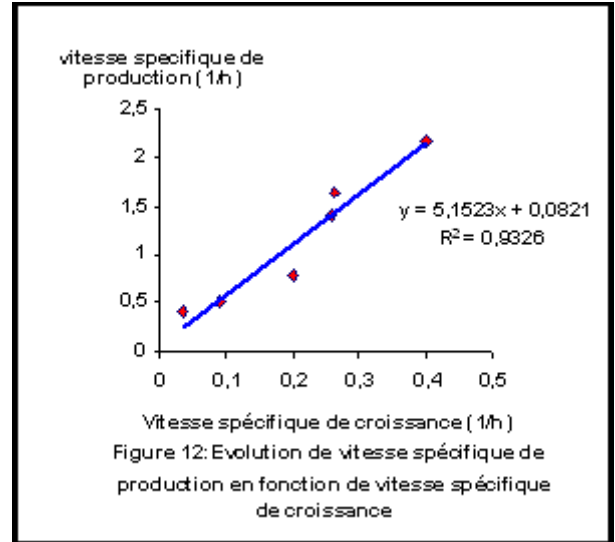


Figure 12: Evolution de vitesse spécifique de production en fonction de vitesse spécifique de croissance

D'après la courbe (figure 12), on fait sortir α qui représente la pente de la courbe et β correspond au point d'intersection de notre courbe avec l'axe des coordonnées (y).

Il apparaît clairement que la production d'acide lactique est légèrement découplée de la croissance avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.9326$, $\alpha = 5.1523$ et $\beta = 0.0821$. Donc on peut écrire $qp = 5.1523 \mu + 0.0821$.

Selon Scriban [45], les cinétiques de croissance et de production sont étroitement découplées lors de la production de composés intermédiaires du métabolisme appelés métabolites primaires. Il s'agit de molécules telles que les acides aminés et les vitamines nécessaires aux synthèses cellulaires.

Ce découplage partiel entre la production d'acide lactique et la croissance a été trouvé par Amrane et Prigent [46] ; Kulozik et Wilde [37] qui ont travaillé sur une bactérie lactique thermophile *Lactobacillus bulgaricus* cultivée sur lactosérum enrichi.

Le tableau 4 résume les paramètres de croissance et de production d'acide lactique dans les conditions optimales, il fait apparaître que la croissance présente un maximum $X_f = 2.368$ g/l et une taux de croissance maximal $\mu_{max} = 0.412$ h⁻¹ avec un rendement de bioconversion de lactose en biomasse $Y_{x/s} = 9.68$ %.

En plus, la production atteint une valeur $P_f = 13.31$ g/l, vitesse moyenne d'acidification maximale $V_m = 1.095$ g/l.h avec un rendement de bioconversion de lactose en acide lactique $Y_{p/s} = 48.16$ %.

Tableau 4: les paramètres de croissance et de production d'acide lactique dans les conditions optimales.

Pf (g/l)	Vm (g/l.h)	Qp (h ⁻¹)	Xf (g/l)	μ _{max} (h ⁻¹)	Y _{p/s} (%)	Y _{x/s} (%)	α	β
13.31	1.095	2.17	2.368	0.412	48.16	9.68	5.1523	0.0821

CONCLUSION

La valorisation de lactosérum doux provenant de l'ORLAC de Draa Ben Khedda par fermentation lactique sert, d'une part, à limiter la pollution engendrée par ce sous-produit, d'autre part, à synthétiser un nouveau produit "Acide lactique" qui trouve une grande gamme d'application dans les domaines : alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, textile....

D'après les résultats de l'analyse physicochimique du lactosérum doux issu de la fabrication du camembert, on a conclu que ce milieu de culture présente une qualité adéquat vu sa richesse en matières nutritifs : 57.9 g/l de lactose, 1.12 g/l de matière azotée, 7 g/l de protéines, 1.75 g/l de chlorure et 0 g/l de matière grasse.

En général, les protéines solubles du lactosérum sont moins assimilables par les bactéries lactiques et plus particulièrement *Streptococcus thermophilus*, c'est pourquoi lors d'enrichissement de notre lactosérum par l'extrait de levure, la croissance et la production d'acide lactique sont bien améliorées.

En effet, la production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* S13 en batch et à pH non contrôlé (pH libre) sous les conditions optimales :

T = 42°C, pH = 6,42, Extrait de Levure = 1 % (10g/l), présente une amélioration marquée de la croissance et de la production d'acide lactique où la concentration finale de biomasse Xf = 2.368 g/l, le taux de croissance maximal μ_{max} = 0.412h⁻¹, la concentration finale d'acide lactique Pf = 13.31g/l et la vitesse moyenne d'acidification vm = 1.095g/l.h.

Pour comprendre les phénomènes biologiques et plus précisément les cinétiques de croissance et de production d'acide lactique, on essaiera de traduire les résultats expérimentaux par un modèle mathématique en utilisant un logiciel "ORIGIN" qui est basé sur la méthode des moindres carrés. La cinétique de croissance ainsi que la cinétique de production d'acide lactique présentent un meilleur ajustement par une même fonction qui s'appelle fonction de Richard où le coefficient de corrélation R² ≥ 0.99. Cette valeur exprime un peu d'erreur entre la réalité et l'expérimentation. D'après les résultats obtenus on a conclu que la fermentation lactique par *Streptococcus thermophilus* S13 sur lactosérum doux déprotéiné et stérilisé à pH libre a suivi le modèle de Luediking et Piret : $y = \alpha\mu + \beta$ (α = 5.1523, β = 0.0821, R² = 0.9326) ce qui exprime que la croissance et la production d'acide lactique sont étroitement découplées.

Dans le but d'améliorer la performance de notre souche *Streptococcus thermophilus* S13:

- Il faut que la fermentation se déroule à pH contrôlé en utilisant comme agents de neutralisation, hydroxyde de calcium, hydroxyde de sodium...ect. Cette opération permet d'éviter l'inhibition par le pH.
- Il faut travailler dans des conditions en continu pour empêcher l'inhibition provoquée par l'accumulation de produit fini "Acide lactique".
- Il faut travailler dans des cultures mixtes, en utilisant par exemple : *Lactobacillus bulgaricus* ou *Lactobacillus helveticus* qui stimulent l'activité de *Streptococcus thermophilus*.
- Il faut travailler avec des souches immobilisées de *Streptococcus thermophilus* car plusieurs recherches ont montré que la bactérie immobilisée est plus performante qu'une bactérie libre.

REFERENCES

- [1]-Michel A., Production des protéines de levure à partir de lactosérum brut. Thèse de 3^{ème} cycle, université de Lyon 1, France. (1986).133p.
- [2]-Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi DN and Bunko K., Bioutilization of whey for lactic acid production. *Div. Dairy. Microbiol.* N°3. (2007).pp.1-14.
- [3]-Goursaud J., Lait et produits laitiers T2 ; les produits laitiers, transformation et technologie. Ed Technique et Documentation, Paris, (1985).396p.
- [4]-Narayanan N., Roychoudhury P and Srivastava A.,L (+) lactic acid fermentation and its product polymerisation. *Elec. J. Biotechnol*, Vol 7. N° 2. (2004).pp.167-179.
- [5]-Zhang Z.Y., Jin B and Kelly J.M., Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochem. Eng. J.*, N° 35. (2007).pp. 251-263.
- [6]-Moulin G., Galzy P., Ratamahemina R., Sélection des levures en vue de la culture sur lactosérum. *Lait*, Vol 59. N° 588. (1979).pp.489-496.
- [7]-Manuel suisse des denrées alimentaires, Méthodes d'analyse et d'appréciation des denrées alimentaires et des objets usuels, second volume. Partie spéciale. Ouvrage élaborée sur le mandat du conseil fédéral par la commission fédérale du Manuel suisse des denrées alimentaires et le fédéral de l'hygiène publique 5^{ème} édition. (1973).
- [8]-AFNOR., Méthode d'analyse du lait et ses produits laitiers, recueil de normalisation française, 2^{ème} édition, (1980).580 p.

- [9]-Amrane A., Optimisation de la productivité d'un fermenteur effectuant la conversion en acide lactique de permeat de lactosérum supplémenté. Thèse de doctorat, Université de Rennes I –France, (1991).152p.
- [10]-Sottiez P., Produits dérivés des fabrications fromagères *in*: lait et produits laitiers; vache, brebis, chèvre, Ed Lavoisier, Paris, (1990).633p.
- [11]-Britten M., Le lait source d'ingrédients performants et versatiles. *J . Agricul . Agri-food* , Canada, (2003).pp.1233-1246.
- [12]-Rosso L., Lobry J.R., Bajards and Flandrois J.P., Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth . *Appl . Environ . Microbiol* , N° 61. (1995).pp. 610-6.
- [13]-Tchobanoglous G., Waste water engineering: Treatment, disposal, Reuse, 2nd Ed, New York: Mc Graw-hill. (1979).
- [14]-Terre S., Propriétés technologiques, nutritionnelles et physiologiques de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Technique laitière et marketing, N° 1008. (1986).pp.26-36.
- [15]-Chamba J.F et Prost F., Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles pour la fabrication des fromages à pâtes cuites.Lait, N° 69. (1989).pp.417-431.
- [16]-Chamba J.F ., Pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles.Revue laitière française, N° 492. (1990).pp.47-50.
- [17]-Radke Mitchell C and Sandine W.E., 1986.Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *lactobacillus bulgaricus*. *J . Dairy . Sci* , N° 69. (1986).pp.2558-2568.
- [18]-Bensiameur K.,Lyophilisation de *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*, détermination des conditions optimales .Thèse de magistère, I.N.A, El Harrach, (1996). 126p.
- [19]-Boubechiche Z.,Optimisation des paramètres de fermentation de *Streptococcus thermophilus*: étude de l'activité acidifiante et l'activité aromatique.Thèse de magistère. INA, El Harrach, (1999).68p.
- [20]-Robinson R.K., Cultures for yoghurt-their selection and use.*J.Dairy.Indus*, N° 53. (1988).pp.15-17.
- [21]-Bourgeois C.M et Larpent J.P ., Microbiologie alimentaire T2 ; aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed Technique et documentation, (1996). 523p.
- [22]-Gyosheva B., Petrova L and Mutafchieva M., Preservation of *Streptococcus thermophilus* strains after long term storage in lyophilized state. *J . Cult . Collections*, N° 1. (1995).pp .34-37.
- [23]-Racine M ., Dumoht J et Morin, Production de polysaccharides microbiens sur des milieux glucidiques en surplus au Québec. Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en agriculture. N° 302.(1991).pp.1-27.
- [24]-Vali M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D and Mattanovich D.,Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cervisia* by cell sorting for height intracellular pH. *Appl . Environ . Microbiol* , Vol 72. N° 8. (2006).pp.5492-5499.
- [25]-Luquet M et Corrieu G ., Bactéries lactiques et probiotiques, Lavoisier, Paris,(2005). 307p.
- [26]-Mc Bean R.D., Hall R.J et Linklater P.M., Modélisation et fermentation lactique *in*: Les bactéries lactiques T2 ; Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica, Lavoisier. (1979).614p.
- [27]-Tayeb J., Bouilliance C and Desmazeaud M.J.,Computerized control of lactic acid bacteria . *J . Ferment . Tech* , N° 62.(1984).pp.5461- 5470.
- [28]-Hutkins R.W and Nannen N.L.,pH homostasis in lactic acid bacteria. *J . Dairy . Sci* , N° 76. (1993).pp.2354-2365.
- [29]-Koning W.N et Otto.,Mécanismes de transport des nutriments dans les bactéries lactiques *in* : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica, Lavoisier , (1983).604p.
- [30]-Amrane A., Lactic acid production during the associated and the deceleration growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated in various conditions and media. Physiology, metabolism.Lait, N° 81. (2001).pp91-103.
- [31]-Nannen N.L and Hutkins R.W.,Proton –translocating Adenosine Triphosphatase Activity in lactic acid bacteria. *J . Dairy . Sci* , N° 74 .(1991).pp.747-751.
- [32]-Adamberg Y.K., Kask S., Laht T.M and Paalme T., The effect of temperature and pH on the growth of lactic bacteria: a pH-auxostat study. *Int . J . Food . Microbiol* , N° 85.(2003).pp.171-183.
- [33]-Bury D., Geciova J and Jelln P.,Effect of yeast extract supplementation on β galactosidase activity of *Lactobacillus delbruekii* subsp *bulgaricus* 11842grown in whey. *J . Food . Sci* , N° 5. (2001).pp.166-170.
- [34]-Levander F and Radstron P.,Requirement for phosphoglucosyltransferase in exopolysaccharid biosynthesis on glucose and lactose using *Streptococcus thermophilus*. *Appl . Environ . Microbiol* , N° 6. (2001).pp.2734-2738.
- [35]-Amrane A., Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *J . Chem . Tech . Biotechnol* , N° 75.(2000).pp.223-228.
- [36]-Ghaly A.E., Tango M.S.A and Dams M.A.A.,Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. Agricultural Engineering international. The CIGR *J . Scientific research and developpement*.Vol 5. N° 37. (2003).pp.364-369.

- [37]-Kulozik N and Wilde J., Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme . Microbiol . Tech* ,N° 24.(1999).pp. 297-302.
- [38]-Bougettoucha A., Balannec B., Nacef S and Amrane A., A generalized unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme . Microbiol . Tech* , N°41 ,(2007).pp.377-382.
- [39]-Schepers A.W., Thibault J and Lacroix C., Continuous lactic acid productions in whey permeate /yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two stage process: model and experiments. *Enzyme . Microbiol . Tech* .Vol38. N° 4. (2004).pp.324-337.
- [40]-Sirisaneeyakul S., Luangpipat T., Vanichsriratana W., Srinophakun T., Chen H.H and Chisti Y.,Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO1. *J . Indus . Microbiol . Biotechnol* , N° 34. (2007).pp.381-391.
- [41]-Somkuti G.A et Steinderg D.H ., Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques in : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica, Lavoisier, (1979).604p.
- [42]-Bratchell N., Gibson A.M., Truman M., Kelly T.M et Robert T.A., Modélisation et fermentation lactique in : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica, Lavoisier ,(1989).604p.
- [43]-Beal C .,Deschamps N., Juillard V., De Roissart H., Richard J et Saraux B.,Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques in : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica, Lavoisier, (1994).604p.
- [44]-Boudrant J., Engasser J.M et Pons M.N ., Modélisation et fermentation lactique in : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica, Lavoisier , ,(1994).604p.
- [45]-Scriban R., Biotechnologie ,5^{ème} édition. Ed technique et documentation, Paris, (1999).1042p.
- [46]-Amrane A and Prigent Y., Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency. *J . biotechnol* , N° 55. (1997).pp.1-8.