

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE



En vue de l'obtention du diplôme de Magister

Option : Sciences Alimentaires

THEME

Optimisation des paramètres de fermentation pour la
production d'acide lactique par *Streptococcus*
thermophilus sur lactosérum : Etablissement d'un
modèle mathématique.

Présenté par : M^{me} ALIANE-OURAHMOUNE NAIMA

JURY:

Président:	M. BITAM A.	Professeur (ENSA)
Directrice :	M ^{me} HELLAL A.	Professeur (ENP)
Examinatrice :	M ^{me} FERHAT Z.	Professeur (ENSA)
Examineur :	M. BOUDJEMA K.	MCA (Université de Boumerdès)

Année universitaire 2017- 2018

Dédicaces

A la mémoire de mes très chers parents qui m'ont aimé, tout donné et qui m'ont toujours encouragé pour finir ce travail.

A la mémoire de mes beaux-parents qui m'ont toujours soutenu

A mon mari

A mes enfants Rayan, Sarah, Malek, Leena et Manal

A mes frères et sœurs

A mes belles-sœurs

A mes cousins et cousines

A mes nièces et neveux

A mes amies

A vous tous, je vous dédie ce mémoire.

NAIMA

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné la persévérance, l'obstination de parcourir mon chemin et de m'avoir donné la chance de soutenir ce mémoire ;

Ce mémoire a été réalisé au laboratoire de microbiologie de l'ENSA sous la direction de Madame **HELLAL A.**, professeur à l'école polytechnique d'EL HARRACH. Je tiens à la remercier pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses conseils et son suivi durant tout le déroulement de ce travail.

Mes vifs remerciements vont aussi à

- Monsieur **BITAM A.**, professeur à l'ENSA pour avoir accepté d'examiner ce travail et de présider le jury.
- Madame **FERHAT Z.** ; professeur à l'ENSA pour avoir accepté d'examiner ce travail.
- Monsieur **BOUDJEMA K.**, maitre de conférences assistant à l'université de Boumerdès pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi :

- Aux techniciens du département de technologie ainsi qu'à la bibliothécaire.
- A tous ceux qui ont, de près ou de loin, aidé à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

A = paramètre associé à la croissance dans la loi de production

ATP = Adénosine -Tri -Phosphate

B = paramètre associé à la maintenance dans la loi de production

E.L = extrait de levures

f = abréviation de final

h = constante d'inhibition proportionnelle (L/g.h)

K_i = constante d'inhibition (g/L)

K_s = constante de saturation du sucre (g/L)

K_p = constante d'inhibition du produit (g/L)

K_{pr} = constante de saturation des protéines utilisables

m = indice désignant le maximum

P = acide lactique (g/L)

P_m = production maximale en acide lactique (g/L)

PEP = phosphoenolpyruvate

P_{mf} = force proton-motrice

PT = phosphotransphérase

q_p = productivité spécifique (h⁻¹)

S = lactose (g/l)

T = température (°C)

t = temps (h)

v_m = dp/ dt : vitesse moyenne d'acidification (g /L.h)

X = biomasse (g/L)

Y_{x/s} = rendement métabolique du substrat en biomasse

Y_{p/s} = rendement de conversion du substrat en produit du métabolite

α = coefficient de production lié à la croissance

β = coefficient de production lié au maintien

μ = vitesse spécifique de croissance (h⁻¹)

μ_m = taux de croissance spécifique maximal

δ = paramètre lié à la consommation de sucre (L/g.h)

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux caractères de *S.thermophilus*.

Tableau II : Les différents types de lactosérum.

Tableau III : Travaux proposant des températures optimales de croissance et d'acidification pour *S.thermophilus*.

Tableau IV : Travaux proposant des pH optimal de croissance et d'acidification pour *S.thermophilus*.

Tableau V : Principaux modèles descriptifs appliqués à la croissance bactérienne.

Tableau VI : Principaux modèles exprimant le taux de croissance (μ) en fonction du pH et de la température.

Tableau VII : Principaux modèles mécanistiques appliqués à la croissance bactérienne.

Tableau VIII : Principaux modèles mécanistiques exprimant la vitesse d'acidification par les bactéries lactiques.

Tableau IX : Composition du lactosérum de l'ORLAC de Boudouaou.

Tableau X : Les différents paramètres dans les conditions optimales.

Tableau A : Dosage du lactose (technique de BERTRAND, en annexe)

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme de transport et voies métaboliques du galactose et du lactose des bactéries lactiques.

Figure 2 : Schéma proposé pour la nutrition azotée. Dégradation de la caséine et utilisation des fractions azotées.

Figure 3 : Phases de croissance d'une culture bactérienne discontinue.

Figure 4 : Evolution des concentrations au cours d'une culture pure de *S.thermophilus* (CNRZ 404) à 40°C et pH=6,5.

Figure 5 : Evolution de la croissance en fonction du temps des différentes cultures à différentes températures sur lactosérum à pH= 6.

Figure 6 : Evolution du pH en fonction du temps des différentes cultures à différentes températures sur lactosérum à pH=6.

Figure 7 : Evolution de la teneur en acide lactique en fonction du temps des différentes cultures à différentes températures sur lactosérum à pH=6

Figure 8 : Evolution de la teneur en lactose en fonction du temps des différentes cultures à différentes températures sur lactosérum à pH=6.

Figure 9 : Evolution du taux de croissance maximal en fonction des différentes températures.

Figure 10 : Evolution de la vitesse moyenne d'acidification en fonction des différentes températures.

Figure 11 : Evolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique et du lactose sur lactosérum à 42°C et à pH=6.

Figure 12 : Evolution de la croissance en fonction du temps à différents pH sur lactosérum à 42°C.

Figure 13 : Evolution du pH en fonction du temps à différents pH à 42°C.

Figure 14 : Evolution de la teneur en acide lactique en fonction du temps à différents pH à 42°C.

Figure 15 : Evolution de la teneur en lactose en fonction du temps à différents pH sur lactosérum à 42°C.

Figure 16 : Evolution du taux de croissance maximal en fonction des différents pH.

Figure 17 : Evolution de la vitesse moyenne d'acidification en fonction des différents pH.

Figure 18 : Evolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique et du lactose sur lactosérum à pH=6,36 et à 42°C.

Figure 19 : Evolution de la croissance en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levures sur lactosérum à pH=6 et à 42°C.

Figure 20 : Evolution du pH en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levures sur lactosérum à pH=6 et à 42°C.

Figure 21 : Evolution de la teneur en acide lactique en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levures sur lactosérum à pH=6 et à 42°C.

Figure 22 : Evolution de la teneur en lactose en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levures sur lactosérum à pH=6 et à 42°C.

Figure 23 : Evolution du taux de croissance maximal en fonction des différentes concentrations d'extrait de levures.

Figure 24 : Evolution de la vitesse moyenne d'acidification en fonction des concentrations d'extrait de levures.

Figure 25 : Evolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique et du lactose sur lactosérum supplémenté avec 10 g/L d'extrait de levures à pH=6 et à 42°C.

Figure 26 : Evolution de la croissance en fonction du temps sur lactosérum supplémenté avec différentes concentrations de lactose à pH=6 et à 42°C.

Figure 27 : Evolution du pH en fonction du temps sur lactosérum supplémenté avec différentes concentrations de lactose à pH=6 et à 42°C.

Figure 28 : Evolution de la teneur en acide lactique en fonction du temps sur lactosérum supplémenté avec différentes concentrations de lactose à pH=6 et à 42°C.

Figure 29 : Evolution de la teneur en lactose en fonction du temps sur lactosérum supplémenté avec différentes concentrations de lactose à pH=6 et à 42°C.

Figure 30 : Evolution du taux de croissance maximal en fonction des différentes concentrations de lactose.

Figure 31 : Evolution de la vitesse moyenne d'acidification en fonction des concentrations de lactose.

Figure 32 : Evolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique et du lactose sur lactosérum supplémenté avec 20 g/L de lactose à pH=6 et à 42°C.

Figure 33 : Evolution du pH, de la biomasse, de la production d'acide lactique et de la consommation du lactose sur lactosérum dans les conditions optimales (pH=6.36, T=42°C, EL=10 g/L, L= 20 g/L)

Figure 34 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps dans les conditions optimales.

Figure 35 : Evolution de la vitesse d'acidification en fonction du temps dans les conditions optimales.

Figure 36 : Ajustement des points expérimentaux de la cinétique de croissance en fonction du temps.

Figure 37: Ajustement des points expérimentaux de la cinétique de production en fonction du temps.

Figure 38 : Ajustement des points expérimentaux de la productivité spécifique (q_p) en fonction de la vitesse spécifique de croissance (μ).

Figure a : Courbe étalon pour la détermination de la biomasse. (En annexe)

Figure b : Courbe étalon pour le dosage de l'acide lactique. (En annexe)

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

<i>Introduction</i>	1
I- RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1- Les bactéries lactiques	3
1-1- Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	3
1-2 Principaux caractères de l'espèce utilisée : <i>Streptococcus thermophilus</i>	4
2-La nutrition des bactéries lactiques.....	6
2-1- La nutrition glucidique.....	6
2-2- La nutrition azotée	8
2-3- Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	10
3- Le lactosérum	12
3-1-Généralités.....	12
3-2-Différents types de lactosérum	12
3-3 – Composition du lactosérum	12
4- L'acide lactique	16
4-1-Historique	16
4-2-Définition et caractéristiques.....	16
4-3- Application de l'acide lactique	17
5- Cinétique de croissance et d'acidification des bactéries lactiques	18
5-1- Généralités sur la croissance bactérienne.....	18
5-3- Cinétique de croissance bactérienne	20
5-4 Cinétique d'acidification:	24
6-Les facteurs influençant les cinétiques des bactéries lactiques	25
6-1- Influence de l'inoculum	25
6-2- Influence de la concentration en substrats	25
6-3- Influence de la concentration en oxygène dissous.....	25
6-4- Influence de l'agitation	25
6-5- Influence de la température	26
6-6- Influence du pH	26
6-7- Influence en produit inhibiteur	28
7- Modélisation des cinétiques de croissance et d'acidification.....	29
7-1- Généralités.....	29
7-2- Les différents modèles appliqués à la fermentation lactique	29
7-3-Analyse de la bibliographie et de quelques modèles déjà proposés en fermentation discontinue (batch)	35
II -MATERIELS ET METHODES	43
1-La bactérie	43
2-Le milieu de culture	43
3-La fermentation.....	43
3-1-préparation de la préculture: *	43
3-2-Préparation et lancement de la fermentation:	44
4- Mesure de la concentration bactérienne:	44
4-1- Mesure optique : turbidimétrie	44
4-2- Mesure du poids sec :.....	44
5-Analyses chimiques	45
5-1-Dosage de l'azote total (Méthode de KJEDAHL).....	45
5-2 Détermination de la teneur en protéines.....	45
5-3 Dosage du lactose (Méthode de BERTRAND)	45
5-4 Dosage de la teneur en matière grasse (Méthode acido-butylrometrique)	45
5-5 Dosage de l'acide lactique.....	46
6 - Détermination de l'influence de certains paramètres sur les cinétiques de croissance et d'acidification	47
III-RESULTATS ET DISCUSSION	48
1-Composition du lactosérum.....	48
2-Optimisation des paramètres de fermentation	48

2-1-Optimisation des paramètres physico-chimiques	49
2-2- Optimisation du milieu de culture	62
3- Production d'acide lactique dans les conditions optimales	74
4- Modélisation de la cinétique de croissance et de production	79
4-1- Cinétique de croissance.....	79
4-2- Cinétique de production d'acide lactique.....	80
4-3- Relation entre la cinétique de croissance et la cinétique de production d'acide lactique	80
<i>Conclusion</i>	84

Annexe

Références bibliographiques

Introduction

Les fabrications fromagères consomment une part de plus en plus importante du lait en Algérie ; cette évolution est bénéfique, car elle correspond probablement à la meilleure valorisation possible du lait.

Malheureusement, on n'a pas encore trouvé un moyen de fabriquer des fromages sans coproduire du lactosérum ; ce sous produit de laiterie est actuellement rejeté dans les eaux résiduaires des usines, or vu sa richesse en matière organique (protéines sériques, vitamines, lactose, sels minéraux) cause un problème de pollution pour l'environnement.

Représentant au moins 85% du lait transformé en fromage ; sa valorisation est un enjeu économique et écologique puisqu'il possède une demande chimique en oxygène (DCO) de 50 à 70 g/L ce qui en fait donc un produit polluant ne pouvant plus être rejeté dans la nature (FICK, 2016)

Selon l'ORLAC de Boudouaou, la production annuelle de lactosérum dépasse 672000 L, uniquement par cette unité. La valorisation de ce sous produit pose un problème crucial, dont les autorités ne sont pas parfaitement conscientes, et elles n'ont montré aucun intérêt pour ce problème. Or il y a un grand intérêt économique d'utilisation de larges quantités de lactosérum de fromage produites par les industries laitières qui est un bon milieu nutritif pour les bactéries lactiques. Vu sa richesse en lactose, ce disaccharide sera fermenté en acide lactique où cette fermentation reste à être un thème d'actualité.

Toutefois cet acide lactique a plusieurs finalités industrielles en agroalimentaire, en pharmacie, en cosmétique et récemment il y a eu de nouvelles applications pour cet acide où il est utilisé comme matière première pour produire du plastique biodégradable (HUJANEN et LINKO, 1996 ; GOKSUNGUR et GUVNENC, 1997 ; HOUICHI, 2016).

L'objectif de notre étude est de transformer le lactose du sérum en acide lactique avec le meilleur rendement de conversion et la meilleure productivité volumique moyenne.

Pour atteindre cet objectif, il nous a semblé nécessaire de développer les axes suivants :

- Il nous a semblé indispensable d'avoir une espèce qui soit acidifiante, thermophile (pour pouvoir travailler à assez haute température ; ce qui permet de diminuer le risque de contamination) et homofermentaire (pour que le rendement de conversion du lactose en acide lactique soit optimal).

L'espèce retenue pour nos expériences est *S.thermophilus* CNRZ 302;

- Etude de la composition du lactosérum doux provenant de l'ORLAC de Boudouaou ;
- Optimisation des conditions physico-chimiques de notre souche (pH et température de croissance et d'acidification);

- Optimisation du milieu de culture (lactosérum) de notre souche par la source azotée et la source carbonée ;
- Production d'acide lactique dans les conditions optimales
- Dans un dernier temps on a élaboré un modèle mathématique rendant compte du processus de la fermentation.

I- RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Les bactéries lactiques

1-1- Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires très répandus dans la nature.

Selon DE ROISSART (1986) ; Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, ne se développent qu'en présence de substances hydrocarbonées telles que les sucres, alcools et les acides organiques.

A quelques exceptions près, les bactéries ont pour principales caractéristiques d'être :

A Gram positif, peuvent avoir des formes en coques ou en bâtonnets généralement Immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes et de ne posséder ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochromeoxydase.

En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine.

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les acides gras et les glucides fermentescibles (DE RESSOIRT, 1990 ; LEVEAU et al., 1991 ; HOGG, 2005).

Elles sont naturellement retrouvées chez l'homme ; les animaux, les aliments fermentés, ils ont été également retrouvés dans le sol, l'eau, les engrais et les eaux d'égout (HOLZAPFEL et al, 2001, PASCUAL et al., 2006, MOTA et al., 2006, CHENOLL et al.,2006)

Les caractéristiques métaboliques principales des bactéries lactiques est la production d'acide lactique : cette capacité est associée à la production majeure d'énergie par fermentation des sucres mais elle confère aussi à ces espèces leur intérêt principal pour la transformation et la conservation des aliments.

D'après DELLAGLIO et al., (1994), Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui en utilisant les glucides peuvent produire :

- L'acide lactique (bactéries homolactiques strictes)
- L'acide lactique et acétique (bactéries hétérolactiques facultatives)
- Acide lactique et acétique ou éthanol et CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes)

1-2 Principaux caractères de l'espèce utilisée : *Streptococcus thermophilus*

Selon le manuel de la systématique bactérienne de BERGEY (1986), le genre *Streptococcus* est classé en (06) catégories :

- Les Streptocoques pyogènes ;
- Les Streptocoques oraux ;
- Les Streptocoques fécaux ;
- Les Streptocoques lactiques ou lactocoques du groupe sérologique N, faiblement hémolytique, mais jamais pathogène ;
- Les streptocoques anareobies stricts ;
- Les autres streptocoques de groupe sérologique inconnu, hétérogène faiblement ou non hémolytique parmi lesquels on trouve l'espèce non pathogène *Streptococcus thermophilus*, seule espèce à intérêt industriel et nutritionnel, elle produit de l'acide lactique L (+) totalement métabolisé par l'homme (TERRE, 1986) dont les principaux caractères se résument dans le tableau I.

Streptococcus thermophilus qui aurait été décrite pour la première fois ORLA JENSEN en 1919 , est la seule espèce des streptocoques utilisée en technologie alimentaire surtout en industrie laitière après *Lactococcus lactis* (HOLS et al. ,2005), c'est une bactérie habituelle du milieu laitier animal ou maternel retrouvée dans le tractus gastro- intestinal très précocement chez les nourrissons et sur les plantes en décomposition (SOLIS et al. ,2010) , cette espèce est généralement reconnue comme sûre pour les produits alimentaires et le statut de présomption d'innocuité reconnue en Europe lui a été accordé (SAVADOGO et TRAORE, 2011)

**Tableau I : Principaux caractères de *Streptococcus thermophilus*
(ACCOLAS, 1982, cité par TERRE, 1986)**

Génotype	Caractères <ul style="list-style-type: none"> - Contenu de l'AND en G+C - Homologie des acides nucléiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Voisin de 40% - <i>S.thermophilus</i> est différent des Streptocoques voisins avec celles de : <i>S.lactis</i> <i>S.cremoris</i> <i>S.diacetylactis</i>
Phénotype	<ul style="list-style-type: none"> - Morphologie - Ecologie - Températures de croissance : Culture a 10°C Culture a 45°C - Thermorésistante à 65°C/30mn - Croissance en présence de NaCl 2% - Groupe sérologique - Hydrolyse de l'arginine - Sucres fermentés: <ul style="list-style-type: none"> • Fructose, glucose, lactose, sucrose • Maltose, pentose (xylose et arabinose) et raffinose. • Tréhalose, insuline, glycérol, mannitol, sorbitol. - Action sur le lait tournesol 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules sphériques ou ovoïdes en paires ou en longues chaînes. Polymorphisme prononcé dans les cellules âgées. - laits, produits laitiers uniquement - + + - Absence d'Antigène de groupe. - + (-) - Acidification rapide A Coagulation C Réduction très lente ou incomplète r

+: Réaction positive pour 90% ou plus des souches.

(-) : Réaction négative pour 90 % ou plus des souches

- : Réaction toujours négative

2-La nutrition des bactéries lactiques

2-1- La nutrition glucidique

Les bactéries lactiques, comprenant l'espèce *S.thermophilus* convertissent le lactose en excès d'acide lactique (90-95 %).

Le lactose est le sucre fermentescible du lactosérum, il sera tout d'abord hydrolysé en glucose et galactose ensuite en acide lactique (BEAL et SODINI, 2003)

Selon THOMPSON et CENTRY-WEEKS (1994), le mécanisme du métabolisme se réalise comme suit:

La perméation du lactose et les enzymes du système lactose à travers la membrane cellulaire s'effectue grâce à une lactose perméase et mettant en jeu aussi un système phosphotransphérase, phosphorylant le lactose, le glucose ou le galactose au dépens du phosphénol pyruvate (PEP).

Ce lactose-phosphate sera hydrolysé par une phospho- β -galactosidase, la fraction glucose subit un transport et une phosphorylation simultanée par l'intermédiaire du système phosphoenolpyruvate-phosphotransphérase (PEP-PT) spécifique du lactose et du glucose-6-phosphate accumulé est ensuite fermenté en acide lactique par la voie glycolytique d'Emden Meyrhopf-Parnas (EMP), pour aboutir à la formation de deux moles d'acides lactiques et deux moles d'ATP (figure 1).

Quant à la fraction galactose, il existe plusieurs mécanismes de son transport pour les bactéries lactiques homofermentaires (figure1). Deux de ces voies nécessitent une translocalisation phosphorylante du sucre par l'intermédiaire des systèmes lactose ou galactose-PT, puis une dégradation du galactose-6phosphate intracellulaire par la voie D-Tagadose-6phosphate.

Le galactose peut être transporté de façon active par une deuxième voie, sous forme de sucre libre, par l'intermédiaire d'un système perméase aux dépens de l'énergie délivrée par l'ATP (figure 1)

Après phosphorylation, par une galactose ATP-dépendante et formation de galactose 1-phosphate, le sucre-phosphate accumulé est métabolisé par la voie de LELOIR, avant d'entrer dans la voie EMP.

S.thermophilus produit de l'acide lactique à partir seulement de quelques sucres à savoir, le fructose, le manose, le lactose et le saccharose (SCHLEIFER et al, 1991 ; PANESAR et al, 2007)

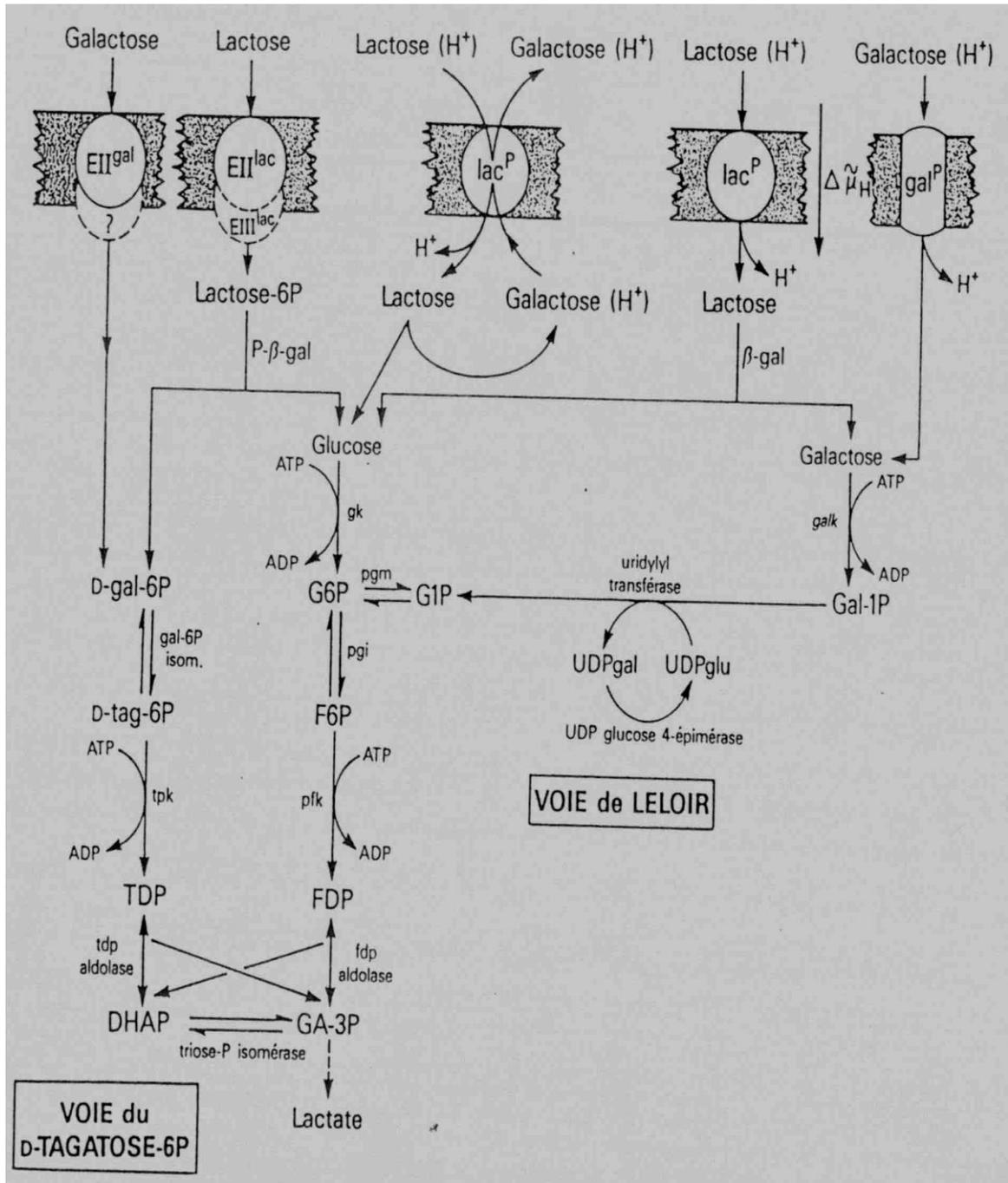


Figure 1: Mécanismes de transport et voies métaboliques du galactose et du lactose des bactéries lactiques. (THOMSON et CENTRY-WEEKS, 1994)

Par ailleurs, les études des mécanismes de transport, aussi que les aspects enzymologiques et génétiques de l'utilisation des glucides par *S.thermophilus* ont montré qu'elle est incapable de croître (ou croissance faible) sur le galactose ; et il semblait initialement que le phénotype galactose négatif pourrait être du une incapacité des cellules à assurer le transport du sucre.

En réalité, la croissance de la plupart des souches sur milieu lactose est accompagnée d'un efflux de galactose des cellules, en proportions stœchiométriques 1/1 avec le lactose consommé.

L'effet inhibiteur du lactose sur la prise du galactose et la similitude de K_t pour les sucres (0,20-0,48mM) ont suggéré à HUTKINS et al., (1985a), qu'il existe un transporteur commun, facilitant le transport du mono, tout comme du disaccharide.

HUTKINS et PONNE, (1991) ont également présenté des résultats tendant à montrer l'existence d'un échange couple galactose/lactose par des mécanismes d'antiport pour des cellules intactes de *S.thermophilus* (figure 1)

Ces données ont pu être confirmées grâce aux analyses cinétiques effectuées par FOUCOUD et POULMAN, (1992).

En fin de croissance dans le lait où les conditions de croissance sont plus difficiles, *S.thermophilus* utilise le galactose dans la mesure où cette voie du métabolisme avait déjà été démontrée chez certaines souches comme induite lors de l'ultime phase de croissance en lait et produits laitiers comme le lactosérum (HERVE-JIMENEZ et al., 2008), l'acide lactique produit à la fin de ces métabolismes est de configuration L (+) qui se trouve être la forme la plus digestible (TERRE, 1986 et LOONES, 1989)

2-2- La nutrition azotée

Comme les bactéries lactiques ne sont pas capables de réaliser la synthèse des acides aminés nécessaires à leur croissance, elles font appel à des sources exogènes.

Dans les milieux naturels, les acides aminés existent surtout sous la forme de macromolécules protéiques ; pour des bactéries cultivées sur le lait, la principale source d'acides aminés est la caséine.

Les caséines se présentent dans le lait sous forme de micelles de structure relâchée et désordonnée, qui les rendent sensibles à la protéolyse sous l'action des protéases.

Les protéases sont principalement liées à la paroi cellulaire et sont d'abord responsables de la dégradation des protéines extracellulaires (figure 2)

Il en résulte, la libération d'une variété de petites fractions peptidiques contenant différents nombres de résidus d'acides aminés.

Dans le cas de *S.thermophilus*, cette fonction est assurée par une protéase 'Prts', qui lorsqu'elle est présente permet à la bactérie de satisfaire à ses exigences nutritionnelles et d'atteindre une population maximale en lait dix fois plus importante que les souches n'en possédant pas (COURTIN et al., 2002)

Par ailleurs, *S.thermophilus* possède une vingtaine de peptidases intracellulaires lui permettant de dégrader ces peptides en acides aminés (GARAUT et al., 2002)

Les fractions peptidiques sont ensuite accumulées dans le cytoplasme par des systèmes de transport Pmf -dépendants, mais certains acides aminés sont prélevés dans le milieu de culture par un système de transport ATP- dépendant.

Arrivées dans l'espace intracellulaire, les fractions peptidiques sont hydrolysées par différentes peptidases selon leur spécificité en substrat et leur mode d'action (amino, di, tri peptidase).

Les acides aminés résultant de cette succession de dégradations servent de précurseurs pour la biosynthèse des constituants cellulaires et plus particulièrement de nombreuses enzymes intervenant à tous les stades du métabolisme bactérien.

L'importance des voies de biosynthèse des acides aminés pour la croissance de *S.thermophilus* est clairement établie, mais plus particulièrement celle concernant les acides aminés branchés et des purines qui constitue un facteur clé permettant la croissance optimale dans le lait et lactosérum (HERVE-JIMENEZ et al., 2008)

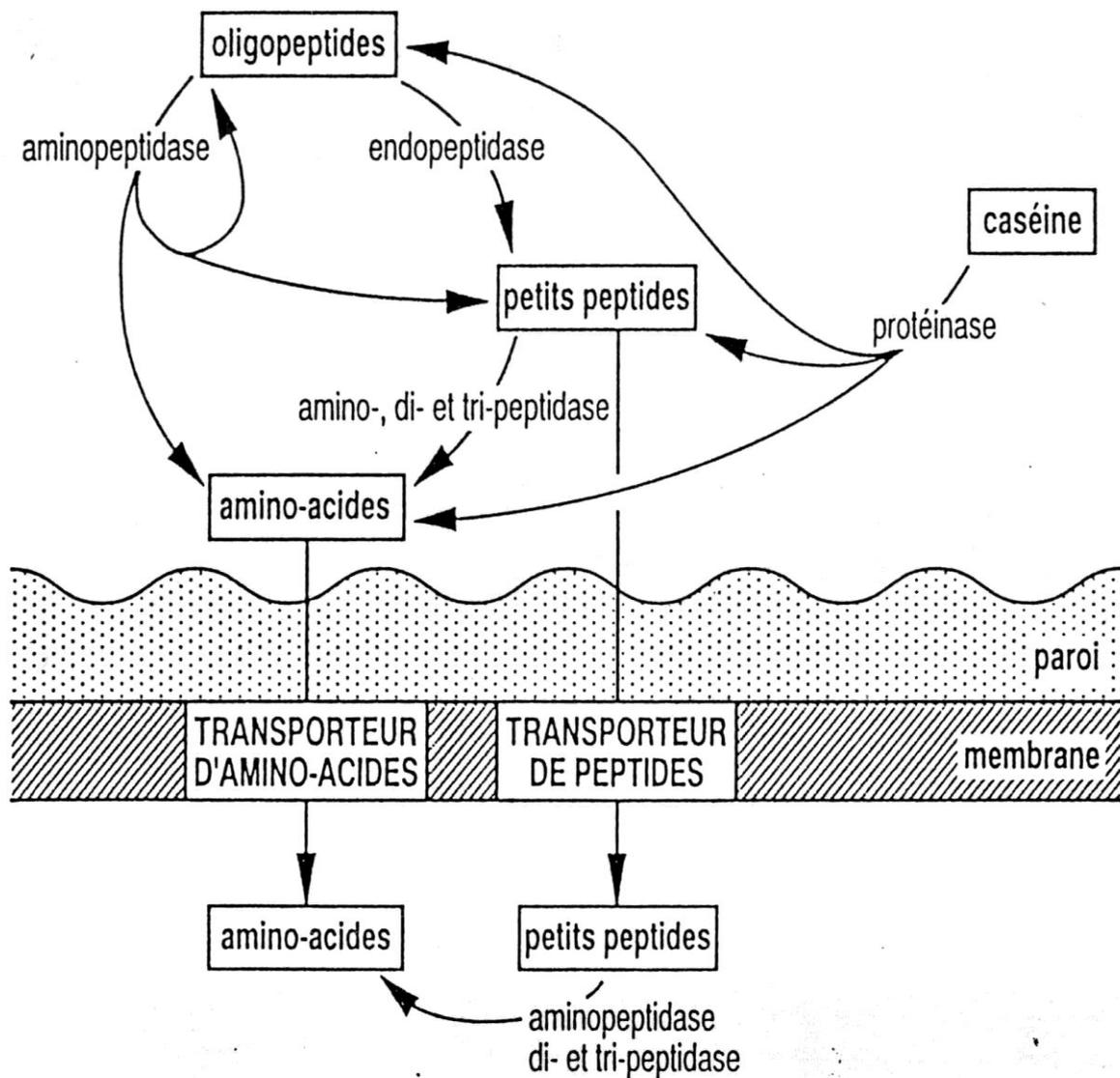


Figure 2 : Schéma proposé pour la nutrition azotée. Dégradation de la caséine et utilisation des fractions azotées par les bactéries cultivées dans le lait. (DELLAGLIO et al., 1994)

2-3- Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe, incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement.

Elles sont considérées comme un groupe bactérien les plus exigeants du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les cations dont le rôle des coenzymes est important.

Chez *S.thermophilus*, la régulation générale au stress fait intervenir des protéines qui contrôlent l'expression des gènes importants permettant la tolérance à l'acidité et à la carence nutritionnelle (ARENA et al., 2006)

2-3-1-Exigences en vitamines

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme et dont les bactéries lactiques sont à quelques exceptions près, incapables de les synthétiser.

S.thermophilus a une exigence absolue en acide pantothénique (B5) et en riboflavine (B2) et à un moindre degré en thiamine (B3) et en biotine (B8). La pyridoxine ou ses dérivés (B6) stimulent fortement sa croissance.

2.3.2-Exigence en bases azotées

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques excepté pour *S.thermophilus*.

2.3.3-Exigences en cations

BOYAVAL, (1989) a montré le rôle précis des cations dans la résistance à l'oxygène, dans les différentes réactions métaboliques et dans la nutrition les bactéries lactiques.

Selon AMOUZOU et al., (1985), le rôle de Mg^{2+} sur *S.thermophilus*. La forme ionisée entraîne une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres plus exactement son métabolisme est homofermentaire, elle possède une B galactosidase active en présence de cations monovalents ou divalents (Mg^{2+}, Mn^{2+}) (LAMOUREUX, 2000)

3- Le lactosérum

3-1-Généralités

3-1-1-Définition du lactosérum

Le lactosérum est la fraction aqueuse qui se sépare des caillés au cours de la fabrication conventionnelle de fromages ou de caséine.

Il représente environ 85 à 90 % du volume du lait employé pour faire du fromage affiné et retient environ 55 % des éléments nutritifs du lait (KOSIKOWSKY, 1979)

3-1-2-Caractéristiques

C'est un liquide surnageant jaune verdâtre, sa couleur est due à la présence de riboflavine (B2), son pH est compris entre 5 à 6,5, c'est un liquide riche en lactose, protéines solubles, sels minéraux et vitamines hydrosolubles (KOSIKWOSKY, 1979)

3-2-Différents types de lactosérum

Selon l'acidité du lactosérum et son mode d'obtention, on distingue deux grandes catégories de ce produit (SOTTIEZ, 1990):

3-2-1- Lactosérum doux

Il a une acidité inférieure à 18°D et un pH supérieur à 6, il provient de la coagulation du lait de la fabrication des fromages à pâtes cuites ou pressées, sous l'action d'une enzyme protéolytique (présure), on obtient alors un sérum doux pauvre en sels minéraux et riche en lactose et en protéines. En plus des protéines solubles du lait, ce type de lactosérum contient une glycoprotéine qui provient de l'hydrolyse de la caséine kappa par la présure après coagulation.

3-2-2- Lactosérum acide

Il a une acidité supérieure à 18° D et un pH inférieur à 6, il résulte de la précipitation de lactosérum par la production d'acide lactique sous l'action de ferments ou d'un acide minéral.

Ce lactosérum provient des caséineries ou des fromageries des pâtes fraîches ou molles (Tableau II).

3-3 – Composition du lactosérum

Qu'il soit doux ou acide, le lactosérum est constitué principalement de lactose, de protéines solubles et d'ions minéraux.

En fonction des différents paramètres de production utilisés dans les industries laitières, la teneur en caséines résiduelles, en matière grasse et en certains ions minéraux peut varier. La composition des différents lactosérums est décrite dans le tableau II cité par SOTTIEZ, (1990).

D'après VRIGNAUD (1983), la composition de l'extrait sec de lactosérum (en g/100g) varie comme suit:

Matières protéiques: 0,5 à 1,2

Matières minérales: 8 à 10,5

Les protéines du lactosérum se répartissent en trois fractions:

- Fraction globuline: 10 %
- Fraction albumine: 80%
 - β. lactoglobuline: 55%
 - α. lactalbumine: 20%
 - Sérum albumine: 5%
- Fraction protéase peptone: 10%

Notons que, le lactosérum contient environ 360 à 970 grammes d'eau pour un extrait sec délipidé de 60 à 67 grammes de matières sèches et que le sérum contient différents éléments minéraux comme il regroupe les vitamines hydrosolubles (ALAIS, 1984)

Selon FICK, (2016) après réalisation du processus de transformation du lait, le lactosérum doux aura une teneur de 2,5 à 4,5g de minéraux par litre de lactosérum et le lactosérum acide en contiendra 4,3 à 7,2g, soit une réduction d'environ de 50% par rapport à la teneur initiale du lait. Comme il contient également des vitamines plus précisément B2, B5, B12, B6 et C.

Tableau II: Les différents types de lactosérum (SOTTIEZ, 1990)

	Lactosérum doux			Lactosérum acide		Lactosérum déprotéiné
	Pâtes pressées cuite (Emmental)	Pâtes pressées cuite (St-Paulin, Edam)	Camembert	Pâtes fraîches	Caséines	Permeat doux d'ultrafiltration
Liquide						
- Extrait sec en%	6,5	5	6,5	6	6	4,5
- pH	6,7	6,5	6,1	4,6	4,6	6,4
Composition en %						
- Lactose	76	75	75	65,5	74	85
- Protéines	13,5	13,5	13	12	12	4
- Cendres	8	8,5	9	12	12	9
- Acide lactique	1,8	2	2,2	10	1,8	2
- M.G.						
- Minéraux	1	1	1	0,5	0,5	0
- Ca en %						
- P en %	0,6	0,65	0,7	1,9	1,8	0,6
- Chlorure (en NaCl)	0,6	0,65	0,7	1,5	1,5	0,6
	2,5	2,5	2,5	2,5	7,5	2,8

L'irrégularité de la composition du lactosérum et sa pauvreté en facteurs de croissance, a fait que plusieurs études ont tenté de corriger sa composition dans le but de l'enrichir en composés stimulant la croissance des bactéries lactiques. (Extrait de levures, bicarbonate de sodium,...)

L'un des grands problèmes de la fermentation lactique est la supplémentation azotée car les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques sont très complexes, comme l'ont observé BELHOCINE, (1987) et AMRANE et PRIGENT; (1997), que la source d'azote devient manifestement limitante avant le lactose, d'autre part les suppléments azotés sont obligatoirement de nature peptidique et sont donc coûteux, si bien qu'ils peuvent constituer une part importante du prix de l'acide lactique produit.

De nombreux auteurs se sont intéressés à cette supplémentation azotée, et tous s'accordent pour dire que l'extrait de levures est le mieux adapté aux bactéries lactiques. COX et MACBEAN, (1977), ROY et al. ; (1986), VAHVASELKA et LINKO, (1987), GOKSUNGUR GUVENC, (1997), et AMRANE et PRIGENT, (1998), BOUDJEMA, (2008), GUHA et al., (2013) et BENAÏSSA et al., (2017) ont constaté que l'extrait de levures donne de meilleurs résultats que d'autres suppléments azotés qui ont été essayés: le sirop de maïs, de l'ultrafiltrat de tryptone, de l'hydrolysât de protéine, de l'hydrolysât de caséine, de l'hydrolysât de protéines de sérum et de l'extrait de germes de malt.

4- L'acide lactique

L'acide lactique est le produit final de la glycolyse par la voie d'Embden-Meyerhof, pour aboutir à la formation de l'énergie nécessaire aux bactéries lactiques homofermentaires (AXELSSON, 1993 et TORRIANI et al., 1994)

4-1-Historique

L'acide lactique est synthétisé par voie chimique ou microbienne et il est le plus simple des hydroxyacides contenant un carbone asymétrique, c'est l'un des plus anciens acides organiques connus, il a été isolé du lait aigre par le chimiste suédois SCHELLE en 1780.

En 1808, Jöns Jacob Berzelius constate que l'acide lactique est également produit dans les muscles pendant l'effort.

Louis Pasteur en 1857 a découvert que le lactobacille et son rôle dans la fabrication de l'acide lactique.

Cette acide a commencé à être produit commercialement par l'entreprise pharmaceutique allemande Boehringer Ingelheim dès 1895.

4-2-Définition et caractéristiques

L'acide lactique est un acide alpha hydroxylé, sa formule chimique est $C_3H_6O_3$, sa structure se reflète dans son nom systématique, l'acide 2-hydroxypropanoïque ; qui n'est pas présent uniquement dans le lait, mais aussi dans le vin, certains fruits et légumes, et dans les muscles.

En effet, cet acide peut être produit soit par voie microbienne ou bien par voie chimique. Cette dernière est moins utilisée à cause de ses effets néfastes sur l'environnement, et même que la demande de source chimique est très limitée (NARAYANA, 2004)

Il existe sous la forme de deux isomères optiques : le L (+) lévogyre et le D (+) dextrogyre.

Le point de fusion des deux isomères est de 52,8 °C, tandis que celui de leur mélange racémique DL, inactif optiquement, est de 16,8 °C (PECKHAM et FILACHIONE, 1967).

L'acide lactique est classé à GRAS (Generally Recognised As Safe) donc il est utilisé comme additif alimentaire par FDA (NARAYANAN et al., 2004)

L'isomère acide L lactique est préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de L-lactate déshydrogénase dans l'organisme de l'être humain, tandis que l'isomère acide D- lactique est parfois dangereux au métabolisme humain et peut causer une acidose et une décalcification (NARAYANAN et al., 2004 ; ZHANG , 2007)

S.thermophilus est une bactérie homofermentaire, produit uniquement l'acide L lactique (PANESAR, 2007).

4-3- Application de l'acide lactique

L'acide lactique étant très stable à la chaleur et liquide à la température normale, selon JARRY, (1994) son utilisation en est grandement facilitée pour plusieurs domaines:

- L'acide lactique est utilisé dans l'industrie alimentaire Comme additif (E270) en tant qu'antioxydant, acidifiant ou exhausteur de gout. (bonbons, saumures, eaux minérales, boissons sans alcools etc...) il se présente aussi sous forme de sels : sel de sodium (E325), de potassium(E326) et calcium(E327). Ces sels sont sous forme de poudre et sont également solubles dans l'eau. Ils agissent comme agent bactériostatique notamment sur des bactéries pathogènes comme salmonelle (ou listeria) et aussi ils ont un effet dépresseur d'activité d'eau.
- Dans le secteur pharmaceutique ou médical lactate de calcium possède une action thérapeutique sous la forme de polymères ou copolymères lactiques glycoliques, il est utilisé pour la libération contrôlée de médicaments dans des fibres creuses.
- En cosmétique, cet acide est parfois utilisé dans le cadre d'un peeling esthétique, notamment pour les peaux colorées.
- L'agriculture en consomme dans le traitement anti brunissement des fruits, dans l'acidification des fourrages ensilés et comme intermédiaire dans la préparation des produits phytosanitaires optiquement actifs.
- Des secteurs industriels aussi divers que le textile, la tannerie, l'utilisent soit comme agent de mordantage soit dans le déchaulage des peaux.
- Cet acide a gagné en importance dans l'industrie des détergents après les années 2000. C'est un bon détartrant, un dissolvant à savant et un agent antibactérien.il est également avantageux sur le plan économique et s'inscrit dans une tendance vers des ingrédients plus surs et naturels pour l'environnement.
- On s'inquiète beaucoup de la quantité de déchets produits par l'utilisation de plastiques dérivés du pétrole. Poly acide lactique (PLA) est un polymère vert obtenu par la polymérisation de l'acide lactique et a été utilise comme source de plastique biodégradable. Certaines utilisations du PLA comprennent l'amélioration des propriétés physiques dans la production de sacs à déchets, de feuilles de plastique agricoles et d'emballage alimentaire (OHARA H., 2003) ; Comme le PLA est biodégradable, il est également utilisé en médecine dans la régénération des tissus, des sutures, des réparations et des implants (BERNADO et al., 2016)

5- Cinétique de croissance et d'acidification des bactéries lactiques

5-1- Généralités sur la croissance bactérienne

Au sens biologique du terme, la croissance d'un organisme vivant se définit comme l'accroissement ordonné de tous ses composants.

Toutefois, pour ces organismes unicellulaires comme les bactéries, le terme croissance s'utilise dans le sens de reproduction et désigne l'accroissement de la population cellulaire d'une culture (BEAL et al., 1994).

5-1-1-Rendement métabolique

La consommation de substrat, provoquée par des milliers de réactions élémentaires du métabolisme, peut être subdivisée en trois grandes fractions (MONOD, 1942):

- 1- La fraction utilisée comme matériau de construction de cellules;
- 2- La fraction qui apporte l'énergie nécessaire aux synthèses;
- 3- La fraction qui apporte l'énergie nécessaire à l'entretien de la vie cellulaire.

En effet, les deux premières fractions (1) et (2) représentent la part de substrat utilisée pour la croissance, la troisième (3) représente le ratio nécessaire au maintien des cellules en vie (maintenance).

$$Y_{x/s} = \Delta \text{Biomasse formée} / \Delta \text{Substrat carboné consommé}$$

$$Y_{p/s} = \Delta \text{Produit formé} / \Delta \text{Substrat carboné consommé}$$

$Y_{x/s}$: Rendement métabolique du substrat (Y) en biomasse

$Y_{p/s}$: Rendement de conversion du substrat (Y) en produit du métabolite

5-1-2- Expression mathématique de la croissance

La croissance bactérienne se caractérise par le temps de génération (g) et son taux de croissance (μ).

Le temps de génération (g) est l'intervalle de temps (en heure) qui s'écoule entre deux divisions cellulaires.

Soit:

$$g = t/n \quad (1)$$

Ou n: Nombre de générations pendant une culture de durée (t).

$$X = X_0 \cdot 2^n \quad (2)$$

Ou X_0 : est la concentration cellulaire initiale (t_0)

X: est la concentration cellulaire au temps ($t = n.g$)

En prenant le logarithme népérien de (2), le nombre de générations devient:

$$n = \frac{\ln X - \ln X_0}{\ln 2} \quad (3)$$

Après conversion en logarithme de base de 10, (3) prend la forme:

$$n = \frac{(\text{Log} X - \text{Log} X_0) \cdot \text{Ln} 10}{\text{Ln} 2} \quad (4)$$

La croissance cellulaire est exprimée le plus souvent sous forme différentielle. La variation de la concentration cellulaire (dx) par unité de temps (dt) traduit la vitesse de croissance (dx/dt), proportionnellement à la concentration cellulaire (X) et le taux de croissance (μ).

Elle s'écrit:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \times X \quad (5)$$

Soit:
$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

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

Par intégration, (5) devient:

$$X = X_0 \cdot \exp \mu \cdot t \quad (7)$$

Soit :
$$\ln X = \mu \cdot t + \ln X_0 \quad (8)$$

D'où:
$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad (9)$$

Après conversion en logarithme de base 10, (9) prend la forme:

$$\mu = \frac{\log X - \log X_0}{t} \cdot \ln 10 \quad (10)$$

En égalisant les équations (9) et (3) et à partir de (1), on peut définir une relation simple entre le taux de croissance (μ) et le temps de génération (g):

$$\mu \cdot t = n \cdot \ln 2 \quad (11)$$

Soit: $\mu = \ln 2 / g \quad (12)$

En pratique, il suffit donc de mesurer la variation de la concentration cellulaire ($X-X_0$) pendant un intervalle de temps ($t-t_0$) pour calculer les valeurs majeures du nombre de générations (n), du temps (g) et du taux de croissance (μ).

5-3- Cinétique de croissance bactérienne

L'étude de la cinétique d'une culture discontinue (en batch) de *S.thermophilus* ou le milieu n'est pas renouvelé, sur un substrat carboné (lactose), avec production d'un métabolite inhibiteur (l'acide lactique), représenté par le logarithme de la population cellulaire ($\log x$) en fonction du temps, permet de distinguer six phases (figures 3 et 4), selon BEAL et al., (1989), l'interprétation des phases peut être la suivante:

- Une phase de latence ($\mu = 0$), qui suit Immédiatement l'ensemencement du milieu par l'inoculum bactérien. Cette phase correspond à la période nécessaire aux bactéries pour s'adapter aux nouvelles conditions de culture. Elle permet la synthèse ou l'activation des enzymes. Pour *S.thermophilus*, elle permettrait d'une part, l'activation de la lactose perméase (HUTKINS et MORRIS, 1987) et d'autre part, l'induction de la synthèse de la β . galactosidase, par le lactose ou le glucose présents dans le milieu.
- Une phase d'accélération du milieu (μ augmente) pendant lequel le métabolisme cellulaire reprend et la croissance démarre.
- Une phase de développement exponentiel ($\mu = \mu_{\max}$ constant) au cours de laquelle toutes les bactéries se trouvent dans leur état physiologique optimal et se multiplient à leur taux de croissance maximum.

$$\mu_m = \ln 10 \cdot tg(a).$$

La représentation graphique de $\log X$ en fonction du temps (figure 3) correspond à une droite de pente constante (a).

- Une phase de ralentissement (μ diminue), qui est due à l'épuisement d'un ou de plusieurs substrats limitant (sucre, acides aminés...) à l'accumulation de produits toxiques (acide lactique)
- Une phase stationnaire ($\mu = 0$), durant laquelle la croissance s'arrête.
Cet arrêt de croissance peut être expliqué par des mécanismes décrits à ce jour par:

a- Limitation nutritionnelle

AMRANE et PRIGENT, (1999) suggèrent que l'arrêt de la croissance de *lactobacillus helveticus* en culture pure serait du à l'épuisement de certains composés azotés.

b- Production d'acide lactique

Produit final du métabolisme carboné, l'acide lactique est la cause principale de l'inhibition de la croissance de *S.thermophilus* (BEAL et al., 1989).

c- Accumulation du galactose

Les systèmes cataboliques d'utilisation du galactose étant inhibés par *S.thermophilus*. Ce sucre est excrété hors de la cellule et s'accumule dans le milieu de culture. Le galactose est inhibiteur compétitif de la β galactosidase et ralentit donc l'hydrolyse du lactose.

- Une phase de déclin (μ , négatif), qui correspond à la mort des bactéries et éventuellement à leur lyse par manque de réserves énergétiques ou par intoxication.

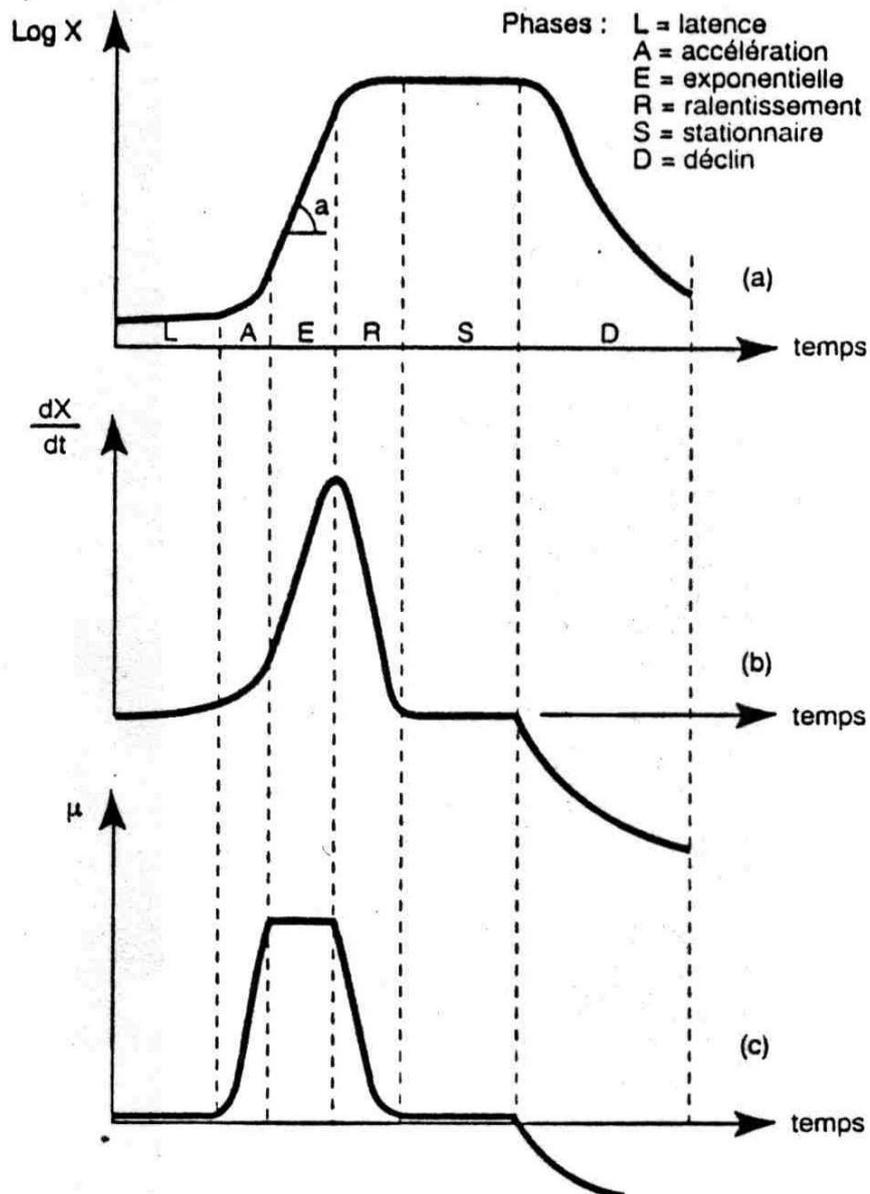


Figure 3 : Phases de croissance d'une culture bactérienne discontinue

- (a) Evolution de la population cellulaire en fonction du temps de culture.
- (b) Evolution de la vitesse d'accroissement de la concentration cellulaire en fonction du temps de culture.
- (c) Evolution du taux de croissance en fonction du temps de culture

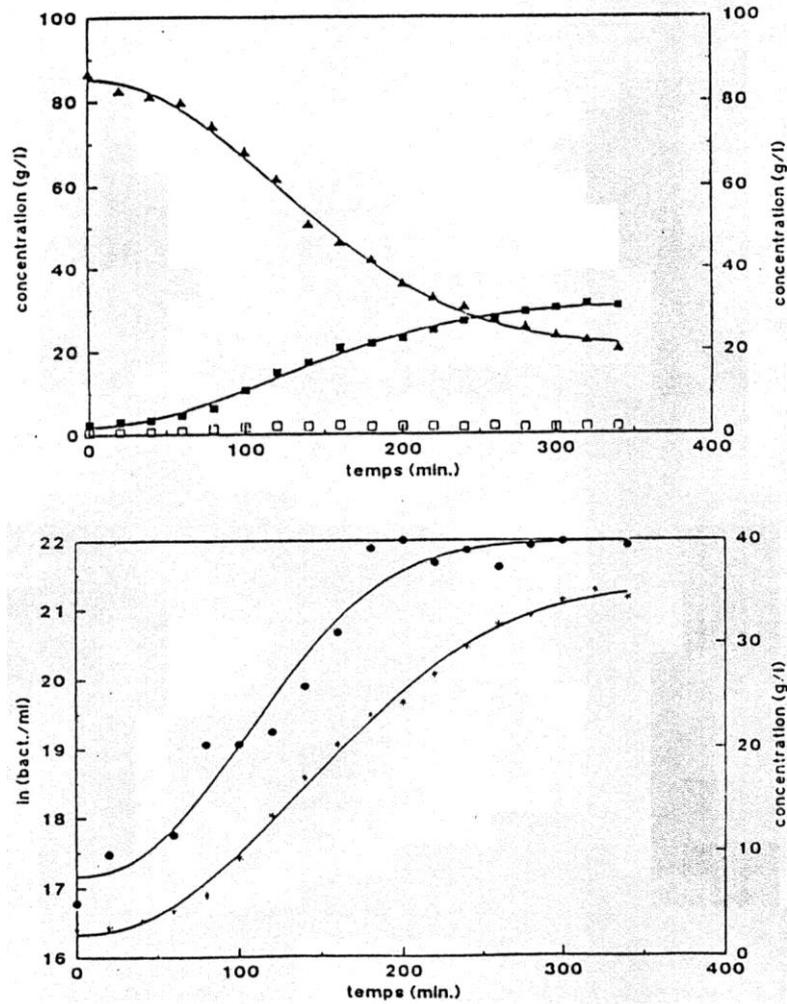


Figure 4 : Evolution des concentrations au cours d'une culture pure de *S. thermophilus* (CNRZ 404) à 40 °C et pH = 6,5 (BEAL et al., 1989)

(▲) Lactose (□) Glucose (●) Galactose (.) Acide lactique (♦) Concentration bactérienne

5-4 Cinétique d'acidification:

La croissance bactérienne est liée à la production d'acide lactique selon des phénomènes qu'il est possible d'exprimer par les relations mathématiques.

Le modèle le plus courant a été proposé par LUEDKING et PIRET (1959):

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \quad (14)$$

Où:

dp/dt : est la variation de la concentration en acide lactique par unité de temps.

dx/dt : est la variation de la concentration bactérienne par unité de temps.

X : est la concentration bactérienne au temps (t)

α : est le facteur de production d'acide lactique lié à la phase exponentielle.

β : est le facteur de production d'acide lactique lié à la phase stationnaire (la maintenance)

La combinaison des relations (5), (7) et (14) donne:

$$\frac{dp}{dt} = (\alpha\mu + \beta)X_0 e^{\mu t} \quad (15)$$

D'où : $\ln dp/dt = \ln [(\alpha.\mu+\beta). X_0] + \mu .t \quad (16)$

Après Intégration (μ constant):

$$P = \frac{\alpha . \mu + \beta}{\mu . X_0} (\exp \mu .t - t) \quad (17)$$

Où p: est la concentration en acide lactique au temps (t).

Par ailleurs la prise en compte des principaux facteurs affectant ces cinétiques conduira à présenter des modèles mathématiques permettant d'exprimer ces cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques.

6-Les facteurs influençant les cinétiques des bactéries lactiques

Généralement, les cinétiques de croissance et d'acidification des cultures pures de *S.thermophilus* sont affectées par les facteurs suivants :

6-1- Influence de l'inoculum

Il est évident que pour bien démarrer une fermentation, il est nécessaire de mettre en œuvre un bon inoculum, c'est à dire des cellules vigoureuses et bien adaptées au milieu de fermentation; on doit pouvoir ainsi réduire le temps de latence.

Les résultats de REDDY et al., (1976), de VAHVASELKA et LINKO, (1987) et AMRANE, (1991), montrent que la phase de latence diminue quand la taille de l'inoculum augmente.

ROY et al., (1986), puis VAHVASELKA et LINKO, (1987), ont constaté que le lait écrémé est le mieux adapté que le sérum ou son permeat, même supplémentés, comme milieu de préculture.

BELHOCINE, (1987) a constaté que le fait d'adapter les ferments lactiques au lactose et à l'acide lactique permet d'améliorer la productivité; les performances de la fermentation s'améliorent lorsqu'on multiplie les repiquages. La même constatation a été faite par cet auteur, pour l'adaptation au milieu de préculture.

Ces résultats montrent que le lait écrémé est un intéressant comme milieu de préculture, qu'il faut plusieurs réensemencements avant l'inoculation.

6-2- Influence de la concentration en substrats

Le lait n'est pas un milieu optimal pour les bactéries lactiques en ce qui concerne la fraction azotée. A fortiori, un milieu à base de lactosérum en est encore plus dépourvu.

Ceci est confirmé par COX et MCBEAN, (1977), BIBAL et al., (1989) et AMRANE et PRIGENT (1999), qui montrent que les vitesses et les rendements de fermentation sont améliorés lorsque le milieu est complété avec des composés facilement assimilables.

6-3- Influence de la concentration en oxygène dissous

S.thermophilus est une bactérie anaérobie aérotoleante, cultivée en anaérobiose partielle, elle est fortement inhibée car elle produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir de l'oxygène et elle est incapable de le décomposer, étant dépourvue de la catalase mais selon JUILLARD,(1987) elle est plus résistante à l'oxygène par rapport aux autres bactéries lactiques et elle ne produira que de petites quantités d' H_2O_2 .

6-4- Influence de l'agitation

Les bactéries lactiques sont des organismes microaerophiles, voire strictement anaérobies pour certaines. Donc tout facteur diminuant la quantité d' O_2 dissous dans le milieu de culture stimule leur croissance et favorise la production d'acide lactique (JUILLARD, 1987).

En effet, l'agitation du milieu de culture des microorganismes incluant les bactéries lactiques productrices d'acide lactique, fait augmenter la teneur en O₂ qui est toxique (formation de quantités toxiques de H₂O₂) d'une part, et d'autre part, elle provoque la diminution de la teneur en CO₂ dans le milieu de fermentation (KEEN, 1972 et GRUFFERY et CONDON, 1983).

Plusieurs études ont été faites sur l'effet du CO₂ sur la croissance des microorganismes et surtout celle de *S.thermophilus*. Elles ont montré que de petites quantités de CO₂ sont essentielles pour leur croissance et leur développement (THOMAS et CROW, 1984).

LOUAILECHE et al., (1993) ayant travaillé sur l'effet de l'agitation sur la croissance de *S.thermophilus*, souche (CNRZ 368), ils ont pu conclure que l'agitation fait éliminer des composés du milieu qui sont essentiels pour la croissance tel que le CO₂ et l'addition de ce dernier au milieu de fermentation a fait augmenter la teneur en acide lactique.

De même, BOUBECHICHE, (1999) a montré que l'agitation a un effet négatif sur la production d'acide lactique chez *S.thermophilus*, souche (CNRZ 302)

6-5- Influence de la température

Plusieurs études ont précisé les températures optimales de croissance, ou d'acidification de *S.thermophilus* en culture pure (tableau III).

Les températures optimales proposées sont comprises entre 35 °C et 46°C. Ces températures correspondent cependant à des gammes très larges que les différences de comportement entre les souches testées ne suffisent toujours pas à expliquer.

6-6- Influence du pH

Lors de culture libre, la diminution du pH se combine à l'accumulation de l'acide lactique et conduit à une forte inhibition de la croissance et du métabolisme bactérien (AMRANE et PRIGENT, 1998).

En revanche, peu d'études ont déterminé des valeurs optimales du pH de croissance de *S.thermophilus*.

Selon MC BEAN et al., (1979), TAYEB et al., (1984) et BEAL et al., (1991), préconisent des pH compris entre 6 et 6,5 pour *S.thermophilus* (tableau IV).

Tableau III: Travaux proposant des températures optimales de croissance et d'acidification pour *S. thermophilus*.

Références	Températures optimales	Critère d'appréciation
ACCOLAS et <u>al.</u> , (1977)	42 à 45°C	Niveau acidification
HEMME et <u>al.</u> , (1980)	37 à 42 °C	Biomasse finale
TAYEB et <u>al.</u> , (1984)	40,5°C	Taux de croissance,
RADKE-MITCHEL et SANDINE, (1986)	35 à 45°C	biomasse finale
AMOROSO et <u>al.</u> , (1988)	40 à 45°C	Taux de croissance
ROBINSON, (1988)	42°C	Biomasse finale
BEAL(1991)	40°C	Acidité titrable, Biomasse finale

Tableau IV: Travaux proposant des pH optimaux de croissance et d' acidification pour *S.thermophilus*.

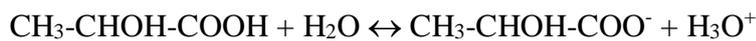
Références	pH optimal	Critères d'appréciation
MC BEAN et <u>al.</u> , (1979)	6	Taux de croissance.
TAYEB et <u>al.</u> , (1984)	6,5	Taux de croissance, biomasse finale.
BEAL (1991)	6,5	Biomasse finale.

6-7- Influence en produit inhibiteur

Les cinétiques de croissance et d'acidification des cultures pures de bactéries lactiques thermophiles présentent des caractères spécifiques, essentiellement liés à la production d'acide lactique, qui est la cause la plus importante de l'inhibition des activités métaboliques.

Cependant, la diversité des résultats cités dans la littérature montre que l'ensemble des mécanismes biochimiques n'est pas encore totalement élucidé.

Toutefois, l'acide lactique produit lors la fermentation se trouve en solution et est sujet à l'équilibre suivant:



D'après DESMAZEAUD et DE ROISSART, (1994):

- En milieu acide, c'est la forme moléculaire qui domine;
- En milieu alcalin ou neutre, c'est la forme ionisée.

Ces deux formes sont à l'origine de deux types d'inhibition dont l'une ou l'autre devient prédominante, suivant le pH.

Par conséquent, la mise en place de modèles mathématiques permettant de traduire la croissance et l'acidification constitue, une alternative intéressante qui permettrait de compléter et d'expliquer les informations acquises.

7- Modélisation des cinétiques de croissance et d'acidification

7-1- Généralités

L'étude des cinétiques caractérisant les procédés de production de ferments lactiques a permis d'établir un certain nombre de modèles déterministes, soit purement mathématiques, soit de connaissance.

Ces modèles sont basés sur les observations suivantes:

- La croissance microbienne est exponentielle et se traduit donc par une fonction sigmoïde dépendant du temps;
- La vitesse de croissance dépend des concentrations en substrats (carboné et azoté), (KELLER et GERHARDT, 1975);
- La croissance est liée aux conditions expérimentales en particulier au pH et la température (BEAL et al., 1989);
- La croissance est soumise aux phénomènes dus à l'accumulation d'acide lactique (ISHIZAKI et al., 1989);
- La production d'acide lactique présente un découplage plus ou moins prononcé par rapport à la croissance (LUEDEKING et PIRET, 1959 a et b)

7-2- Les différents modèles appliqués à la fermentation lactique

Il existe essentiellement deux techniques de modélisation:

-La modélisation cinétique où mathématique qui permet de formuler le comportement global extracellulaire de la fermentation.

- La modélisation physiologique qui tient compte du comportement métabolique des microorganismes.

7-2-1- Les modèles descriptifs (ou purement mathématiques)

Permettent d'exprimer les variables de croissance (où d'acidification) par des équations dépendant du temps et comportant un nombre variable de paramètres n'ayant pas de signification biologique (BEAL et al. 1994, BOUDRANT et al. 1994)

Le Tableau V présente les principales équations utilisées pour décrire une croissance.

Selon ZWIETERING et al., (1990) le choix entre les différentes équations proposées dans la littérature doit être effectué à partir des critères suivants:

- Adéquation du modèle avec les données expérimentales;
- Validité statistique de chaque paramètre de l'équation, elle est obtenue, par exemple, par le calcul d'intervalles de confiance des paramètres ou par la mise en place de tests statistiques;
- Facilité d'utilisation de l'équation: plus le nombre de paramètres est faible, plus le modèle sera simple et facile à identifier.

Enfin, la réduction du nombre de paramètres d'un modèle permet d'accroître le degré de liberté, ce qui est particulièrement intéressant lorsque le nombre de points expérimentaux est faible (BARATCHELL et al. , 1989).

Une deuxième application des modèles descriptifs consiste à représenter les variables étudiées, non plus en fonction du temps mais en certains paramètres d'environnement (pH, température, concentration en oxygène dissous, etc....) (GIBSON et ROBERTS, 1989).

Le tableau VI représente les principaux modèles établis dans ce sens.

Tableau V: Principaux modèles descriptifs appliqués à la croissance bactérienne

Modèles	Equation	Références
GOMPERZ	$Y = a \cdot \exp[-(b-c.t)]$	BRATCHELL et al.,(1989)
LOGISTIQUE	$Y = \frac{a}{1+\exp(b-c.t)}$	BERKMAN et al.,(1990)
RICHARDS	$Y = a \cdot \{1 + b \cdot \exp[c \cdot (d-t)]\}^{-1/b}$	RICHARDS (1961)
SCHNUTE	$Y = \frac{k \cdot (1-b) \cdot [1 - b \cdot \exp(c + 1 - b \cdot a \cdot t)]}{a \cdot (1-b)}$	ZWIETERING et al.,(1990)
SPLINE	$Y = a_0 + a_1 \cdot (t-t_1) + a_2 \cdot (t-t_1)^2 + \dots + a_n \cdot (t-t_n)^n$	ONER et ERICKSON (1986b)
STANNARD	$Y = a \cdot [1 + \exp(-\frac{(b+k.t)}{C})]^{-c}$	STANNARD et al.(1985)
WEIBULL	$Y = a \cdot \{1 - \exp[-b \cdot \exp(c \cdot \ln t)]\}$	BEAL(1991)

a, b, c, d, k et a_i sont des constantes

Y correspond, selon les auteurs, à X, ln X ou (X/X₀)

t_i est la période d'échantillonnage.

Tableau VI : Principaux modèles descriptifs exprimant le taux de croissance (μ) en fonction du pH et de la température.

Références	Equation
TOPIWALA (1973)	$\mu = a \cdot \exp[-(E/RT)] - b$
LALLAI et al.,(1988)	$\mu = a \cdot \text{pH}^2 + b \cdot \text{pH} + c$
CHERUY et DURAND (1979)	$\mu = a \cdot \text{pH}^2 + b \cdot \text{pH} \cdot (d+T) + c$
TAYEB et al., (1984)	$\mu = a + b \cdot (T-T_0) + C \cdot (\text{pH} - \text{pH}_0)$
FAMELART et al.,(1987)	$\mu = a + b \cdot T + c \cdot \text{pH} + d \cdot (\text{pH} \cdot T) + e \cdot T^2$
MACKEY et KERRIDGE (1988)	$\sqrt{\mu} = a \cdot T - b$
BEAL et al.,(1989)	$\mu = K + a_1 \cdot \text{pH} + a_2 \cdot T + a_{11} \cdot \text{pH}^2 + a_{22} \cdot T^2 + a_{12} \cdot \text{pH} \cdot T$

a, b, c et d sont des constantes, E et R sont respectivement l'énergie d'activation et la constante des gaz parfaits définis par similitude avec la loi d'ARRHENIUS, T₀ et pH₀ sont les valeurs optimales de températures et de pH de la souche testée.

7-2-2-Modèles mécanistiques

Contrairement aux modèles purement descriptifs, les modèles mécanistiques (ou modèle de connaissance) permettent de rechercher ou de préciser la signification biologique des paramètres (BEAL et al. , 1994 et BOUDRANT et al., 1994).

Ces modèles dépendent principalement des concentrations en substrats carbonés (S) et azoté (N), faisant intervenir des modèles combinés.

Les principales équations caractérisant le taux de croissance et traduisant les vitesses de l'évolution de la concentration en acide lactique sont présentées dans le tableau VII et VIII.

Tableau VII: Principaux modèles mécanistiques appliqués à la croissance des bactéries lactiques.

Références	Equation
MONOD (1942) KELLER et GERHARDT (1945) JORGENSEN et NIKOLAJSEN (1987)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s+S}$
TAYEB et al.,(1984)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{K_p}{K_p+P}$
HANSON et TSAO (1972)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s-S}$
ABORHEY et WILLIAMSON (1977)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s+S} \cdot \frac{K_p}{K_p+P}$
ROGERS et al.,(1978)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s +S} \cdot \frac{K_p}{K_p+P}$
KISHIMOTO et al.,(1983)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s+S} \cdot \frac{1}{1+P^2}$
TANIGUICHI et al.,(1987)	$\mu = \mu_m \cdot \exp (-a.P+b)$
BIBAL et al.,(1989)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{1-P}{P_c}$
LEH ET CHARLES (1989)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{N}{N+K_N \cdot \left(\frac{P}{K_p}\right)^2}$
ISHIZAKI et al.,(1989)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S + S \cdot P \cdot K_p}$
BEAL (1991)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S + \frac{S \cdot P^2}{K_p}}$
AMRANE et PRIGENT, (1994)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{1}{1 + c \cdot \exp(dt)}$ $\mu_m - c$
PINELLI et al., (1997)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s+S} \cdot \exp\left(-\frac{P}{K_p}\right)$

μ_m est le taux de croissance maximum,

K_p est la constante d'inhibition par le produit P,

K_s et K_N sont des constantes d'affinités des substrats carbonés (S) et azote (N),

P_c est la concentration critique en produit P pour laquelle le taux de croissance s'annule,

a , b, c et d sont des constantes .

Tableau VIII: Principaux modèles mécanistiques exprimant la vitesse d'acidification par les bactéries lactiques.

Références	Equation
LUEDEKING et PIRRET (1959)	$\frac{dp}{dt} = a \cdot \frac{dx}{dt} + b \cdot X$
FRIEDMAN et GADEN (1970)	$[1 - q_p(t)] = f(p) \cdot [1 - \mu(t)]$ $q_{pm} \quad \mu_m$
HANSON et TSAO (1972)	$\frac{dp}{dt} = q_{pm} \cdot S \cdot X$
ROGERS et al., (1978)	$\frac{dp}{dt} = a \cdot \frac{dx}{dt} + b \cdot X \cdot s$
JORGENSEN et NIKOLAJSEN(1987)	$\frac{dp}{dt} = a \cdot \frac{dx}{dt} + b \cdot X - c \cdot X \cdot S$
DESJARDINS et al.,(1990)	$\ln [1 - (q_p(t)q_{pm})] = b \cdot \ln P - b \cdot \ln P_m$
BEAL (1991)	$\frac{dp}{dt} = q_{pm} \cdot \frac{S}{K_s + S + \frac{S \cdot P}{K_p}}$
AMRANE et PRIGENT (1994)	$\frac{dp}{dt} = a + \mu \cdot b [1 - \exp(-f\mu)]$
MONTEAGUDO et al.,(1997)	$\frac{dp}{dt} = (a \cdot \frac{dx}{dt} + bX) (1 - \frac{P}{P_m})$

P est la concentration en acide lactique,

P_m est la concentration critique en produit P a laquelle la vitesse de production s'annule,
a, b et **c**, sont des constantes,

q_p est la vitesse spécifique de production d'acide lactique,

q_{pm} correspond au maximum de **q**,

f(p) est une fonction dépendant de **P**,

K_s est la constante d'affinité du substrat,

K_p est la constante d'inhibition du produit.

7-3-Analyse de la bibliographie et de quelques modèles déjà proposés en fermentation discontinue (batch)

7-3-1-Cinétique de croissance

La croissance bactérienne peut se mettre sous la forme:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Où X: est la concentration cellulaire et μ la vitesse spécifique de croissance.

Pendant la phase exponentielle de croissance, μ est constant et égal à sa valeur maximale μ_m . Pendant cette phase, l'équation précédente s'intègre facilement:

$$X = X_0 \cdot \exp [\mu_m (t - t_0)] \quad (2)$$

S'il y a un substrat limitant et en l'absence d'inhibition par le produit en accord avec MONOD (1942), la vitesse spécifique de croissance peut s'écrire:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{S+K} \quad (3)$$

Où S et K sont respectivement la concentration et la constante du substrat limitant.

PIRT, (1975), a intégré le système formé par les équations (1) et (3), lorsque μ_m , K_s et $Y_{X/S}$ (le rendement de transformation du substrat S en biomasse X) sont constants :

$$\mu_m \cdot t = \left(1 + \frac{K_s \cdot Y_{X/S}}{X_f}\right) \cdot \ln \frac{X}{X_0} + \frac{K_s \cdot Y_{X/S}}{X_f} \cdot \ln \frac{X_f - X_0}{X_f - X} \quad (4)$$

Dans cette relation, X_0 et X_f sont respectivement les concentrations initiale et finale en biomasse.

Beaucoup d'auteurs ont tenu compte, dans leur modélisation, de l'inhibition par le produit formé. Si celle-ci est non compétitive, la vitesse spécifique de croissance devient:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{S+K_s} \cdot \frac{K_p}{p+K_p} \quad (5)$$

Où p et K_p sont respectivement la concentration du produit.

Dans le cas d'une production associée à la croissance, c'est à dire $Y_{p/X}$ constant, POWELL (1984) a intégré le système formé par les équations (1) et (5), pour μ_m , K_s , K_p et

$Y_{x/s}$ constants:

$$\mu_m t = \frac{Y_{p/x} \cdot (X - X_0) + (1 + \frac{K_s \cdot Y_x}{X_f}) \cdot \ln \frac{X}{X_0} + K_s \cdot Y_{x/s} \cdot (1 + \frac{Y_{p/x}}{K_p} \ln \frac{X_f - X_0}{X_f - X})}{K_p} \quad (6)$$

D'autres auteurs ont choisi pour leur modélisation, des lois plus simples. C'est ainsi que TAYEB et al., (1984), ont utilisé une loi d'inhibition non compétitive, mais sans limitation par le substrat:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{K_p}{P + K_p} \quad (7)$$

Dans leur travail de pionniers, (1959 b) ont fait appel à une loi d'inhibition proportionnelle à la concentration de produit:

$$\mu = \mu_m - h \cdot p \quad (8)$$

Cette relation où h est une constante, rend bien compte de leurs résultats obtenus pour *L. Delbrueckii* poussant sur glucose.

Le modèle de LUEDEKING et PIRET a très souvent été repris, ce qui montre qu'il présente un intérêt certain.

Par ailleurs, BELHOCINE (1987) cité par AMRANE (1991) a montré que les résultats obtenus en continu pour *L. helveticus* poussant sur lactose était mieux décrits par une inhibition proportionnelle (8) que par une loi de MONOD (3) ou une inhibition non compétitive par le produit (5) ou (7).

De plus une limitation par le sucre ne peut décrire la cinétique de croissance des bactéries lactiques car les K_s des sucres sont de l'ordre de quelques dizaines de mg/l, ce qui est négligeable devant la concentration en lactose même résiduelle (1 à 2 g/l). Un modèle avec limitation par le sucre (Loi de MONOD) aboutit donc à:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{S + K_s} \cong \mu_m$$

C'est à dire une vitesse spécifique de croissance constante pendant toute la fermentation, or ce n'est le cas que pendant la phase exponentielle.

ROY et al., (1987a) ont utilisé, pour décrire la croissance de *L. delbrueckii* sur glucose, une loi ne dépend ni de la concentration en produit, ni de celle en substrat, mais seulement de la biomasse:

$$\mu = \mu_m \cdot (1 - \frac{X}{X_m}) \quad (9)$$

Où : X_m est la concentration maximale atteinte par la biomasse.

Cette équation décrit bien les résultats obtenus par ROY et al., (1987a), mais elle manque totalement d'intérêt pour le calcul de X (grandeur difficile à mesurer), à partir de la concentration en produit formé (facilement accessible).

Le travail effectué par BELHOCINE (1987) cité par AMRANE (1991), montre aussi que pour la fermentation lactique, la source d'azote est limitante. Mais comme les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, en ce qui concerne l'azote, sont très complexes, il est très difficile de mettre en équation cette limitation azotée.

LEH et CHARLES, (1989a) ont tenté de résoudre cette difficulté; ces auteurs ont considéré dans leur modèle, à la fois une limitation par le sucre et par l'azote.

Pour tenir compte des deux limitations, la modification suivante de la loi de MONOD (3) a été utilisée:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_{pR}}{p_r} + \frac{K_S}{S} + \frac{K_S}{S} \cdot \frac{K_{pR}}{p_r}} \quad (10)$$

Dans cette relation, p_r et K_{pR} sont respectivement la concentration et la constante de saturation des protéines utilisables. Les difficultés rencontrées dans l'utilisation de ce modèle proviennent de la définition et du dosage de cette espèce.

En considérant que pendant la croissance, K_s est négligeable devant S , l'équation précédente peut se simplifier; on retrouve ainsi une loi de MONOD, à un seul substrat limitant, l'azote:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{p_r}{p_r + K_{pR}} \quad (11)$$

En ajoutant dans l'équation précédente, un terme rendant compte de l'inhibition par le produit, l'expression de la vitesse spécifique de croissance devient:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{p_r}{p_r + \left(\frac{p}{K_p}\right)^2 \cdot K_{pR}} \quad (12)$$

LEH et CHARLES (1989 a) prétendent que l'équation (12) décrit bien leurs résultats expérimentaux. Mais aussi bien dans cette publication, on ne voit pas clairement comment ces auteurs passent d'un dosage global en protéines à la concentration en protéines utilisables. On sait pourtant, d'après les travaux de DESMAZEAUD et HERMIER, (1973), que seule une petite partie de l'azote disponible (peptides de 5 à 7chainons environ) est utilisable par les bactéries lactiques.

Les travaux de LEH et CHARLES ont néanmoins le mérite de mettre l'accent sur le problème de la source d'azote, dont l'importance a aussi été signalée par BELHOCINE, (1987) cité par AMRANE (1991).

Le modèle (12) ne sera utilisable que lorsque l'on disposera d'une définition claire et d'une méthode objective de dosage de l'azote réellement utilisable par les bactéries

D'autre part AMRANE, (1991) a pu obtenir un modèle qui a pris comme point de départ les résultats de BELHOCINE, (1987) qui ne décrivait la cinétique de croissance que jusqu'à la fin de la phase exponentielle où:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{1-X}{X_f} \quad (13)$$

Cela est insuffisant, car la production s'arrête en fin de phase stationnaire, il serait donc intéressant d'avoir un modèle qui tient compte de cette phase (surtout pour les systèmes en continu) d'où AMRANE et PRIGENT, (1994) ont proposé le modèle suivant:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{1}{1 + \frac{c \cdot \exp(dt)}{\mu_m - c}} \quad (14)$$

Où c et d sont des paramètres de la loi de croissance (h^{-1}).

7-3-2-Cinétique de production

LUEDEKING et PIRET (1959 a et b) ont effectué un travail de pionniers dans la modélisation de la fermentation lactique, si bien que leur modèle est pris comme base de départ.

Ces auteurs ont montré que la production d'acide lactique est partiellement associée à la croissance, d'où la loi suivante:

$$q_p = \frac{dp}{x dt} = \alpha \mu + \beta \quad (15)$$

Dans cette équation, q_p est la productivité spécifique, α un coefficient de production lié à la croissance et β un coefficient de production lié au maintien.

L'examen des courbes de μ et q_p en fonction du temps (obtenus par ces auteurs à différents pH) montre que cette relation rend bien compte de l'expérience, sauf à pH=5,4. A ce pH, la production est totalement liée à la croissance, car les deux courbes $\mu(t)$ et $q_p(t)$ peuvent se déduire l'une de l'autre par une affinité orthogonale, c'est à dire que: $q_p = \alpha \cdot \mu$

En supposant μ constant et égal μ_m , COGAN, (1978) a résolu le système formé par les équations (1) et (13) et a obtenu, la cinétique de production suivante, décrivant la phase exponentielle de croissanc

$$P = X_0 \cdot \frac{\alpha \cdot \mu + \beta}{\mu_m} \cdot \exp(\mu_m \cdot t_0) - 1 \quad (16)$$

Cette loi ne décrit qu'une petite partie de la production, durant la phase exponentielle de croissance. Son intérêt est qu'elle permet de calculer μ_m (pente de la courbe) $\ln(dp/dt) = f(t)$.

TAYEB et al., (1984) ont suivi la même démarche que COGAN, (1978) mais dans le cas général. Ces auteurs, en supposant que la croissance suivait une loi d'inhibition non compétitive, ont résolu le système constitué par les équations (1), (9) et (17), et ont abouti à l'équation différentielle suivante:

$$\frac{d^2p}{dt^2} + \frac{\alpha \cdot \mu_m \cdot K_p}{(K_p + p)(\alpha \mu_m K_p + \beta K_p + \beta p)} \cdot (dp)^2 - \frac{\mu_m \cdot K_p}{p + K_p} \frac{dp}{dt} = 0 \quad (17)$$

Cette équation a des solutions approchées dans trois zones:

Lorsque $p \ll K_p$, c'est à dire en début de culture, la vitesse spécifique de croissance μ est constante et égale à μ_m , on se ramène donc à l'équation (16)

Lorsque p est peu différent de K_p , μ est toujours constant, mais égal à $\mu_m/2$. La constante d'inhibition K_p est égale à la concentration en produit pour laquelle la pente de la courbe:

$\ln(dp/dt) = f(t)$ est égale à $\mu_m/2$

Enfin, lorsque $p \gg K_p$, μ a alors pour expression:

$\mu = \mu_m \cdot \frac{K_p}{p}$, et l'équation (17) se simplifie pour donner :

$$p \cdot \frac{d^2p}{dt^2} + \frac{\alpha \cdot \mu_m \cdot K_p}{\alpha \mu_m K_p + \beta p} \cdot (dp)^2 - \mu_m \cdot K_p \frac{dp}{dt} = 0 \quad (18)$$

μ_m et K_p ayant été précédemment déterminés, les auteurs proposent d'utiliser une régression non linéaire pour le calcul des paramètres α et β . Or l'examen du terme en $(dp/dt)^2$ de l'équation (18) nous montre que cette équation, on ne peut tirer α et β séparément, mais seulement le rapport α/β .

Dans le cas d'une cinétique de croissance décrite par la loi (11), c'est à dire ne dépendant que de la biomasse, ROY et al., (1987a) ont exprimé à tout instant t , la quantité d'acide lactique synthétisée par le mécanisme non associé à la croissance ($p\beta$), pour une équation de production LUEDEKING-PIRET, sous les formes suivantes:

$$p\alpha = \alpha \frac{dx}{dt} = \alpha X_0 \left[\frac{\exp(\mu_m t)}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - \exp(\mu_m t))} - 1 \right] \quad (19)$$

et

$$p\beta = \beta \cdot X = \beta \cdot \frac{X_m}{X} \cdot \ln \left(\frac{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - \exp(\mu_m t))}{X} \right) \quad (20)$$

la quantité totale de l'acide lactique produit est la somme des deux contributions, c'est à dire:

$$p = p\alpha + p\beta \quad (21)$$

7-3-3-Cinétique de consommation du sucre

Les modèles proposés pour la cinétique de consommation du sucre sont de deux sortes: ceux qui font la différence entre le substrat consommé par la croissance et celui consommé pour la maintenance, et ceux qui envisagent cette consommation de manière globale.

HANSON et TSAO (1972), ont envisagé cette consommation de manière globale. A partir d'une cinétique de croissance par la loi (3), les auteurs ont obtenu le meilleur ajustement avec la loi de consommation suivante:

$$\frac{dp}{dt} = - \delta \cdot S \quad (22)$$

où δ est un paramètre lié à la consommation du substrat.

Dans la plupart des autres modèles cités dans la littérature, la vitesse de consommation du sucre est la somme de deux termes:

$$\frac{(ds)_T}{dt} = \frac{(ds)_G}{dt} + \frac{(ds)_M}{dt} \quad (23)$$

Où $(ds/dt)_G$ est le terme lié à la croissance et $(ds/dt)_M$ celui lié à la maintenance.

Selon PIRT (1975), les termes liés à la croissance et la maintenance sont donnés par:

$$\frac{(ds)_G}{dt} = - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S,G}} = - \frac{1}{Y_{X/S,G}} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (24)$$

et

$$\frac{(ds)_M}{dt} = - m_s \cdot X \quad (25)$$

Dans ces équations, m_s est le coefficient de maintenance et $Y_{x/s}$, G est le rendement de conversion du substrat en biomasse, pour la croissance, c'est donc le rendement vrai. Et il est défini par :

$$Y_{x/s,G} = -\frac{dx}{ds} G \quad (26)$$

En combinant les équations (23), (24) et (25), il est possible d'obtenir la consommation spécifique de substrat :

$$q_s = -\frac{ds}{xdt} = \mu/Y_{x/s,G} + m_s \quad (27)$$

La division des deux membres de l'équation précédente par le taux de conversion μ , permet d'aboutir à la loi de PIRT:

$$\frac{1}{Y_{x/s, \text{obs}}} = -\frac{ds}{dx} = \frac{m_s}{\mu} + \frac{1}{Y_{x/s}} \quad (28)$$

Dans cette relation, $Y_{x/s, \text{obs}}$ est le rendement observé de conversion du substrat en biomasse.

D'autres auteurs ont utilisé pour leur modélisation une loi de consommation du substrat de la même forme que celle de PIRT: citons par exemple la loi utilisée par ROY et al., (1987a)

$$q_s = -\frac{ds}{xdt} = \alpha_s \cdot \mu + \beta_s \quad (29)$$

Ces auteurs ont signalé que l'équation (29) dérive de l'équation de LUEDEKING et PIRET. Cela semble normal, les résultats obtenus par LUEDEKING et PIRET (1959a,b), permettent d'aboutir à une loi analogue à celle de PIRT. Ces auteurs ont observé qu'en fermentation lactique, le rendement de transformation du substrat en produit est constant, ceci a été ensuite confirmé par BELHOCINE (1987); on peut donc écrire:

$$q_s = \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot q_p = \frac{\alpha}{Y_{p/s}} \cdot \mu + \frac{\beta}{Y_{p/s}} \quad (30)$$

Par analogie avec équation (27), on a :

$$\frac{\alpha}{Y_{p/s}} = \frac{1}{Y_{x/s,G}} \quad (31)$$

et

$$\frac{\beta}{Y_{p/s}} = m_s \quad (32)$$

Cette analogie était très visible car quand S_0 est grand, la plus grande partie du sucre consommé sert à fabriquer du produit, alors que quelques g/l de sucre servent à fabriquer de la biomasse.

7-3-4-Cinétique de consommation de l'azote

Compte tenu des exigences nutritionnelles très complexes des bactéries lactiques, peu d'auteurs se sont attaqués à la modélisation de la cinétique de consommation de l'azote pour ces bactéries

Dans le modèle proposé par LEH et CHARLES (1989a), de la même manière que pour le substrat carboné, la vitesse de consommation des substrats azotés est la somme de deux termes, l'un lié à la croissance et l'autre à la maintenance:

$$\frac{(dpr)_T}{dt} = \frac{(dpr)_G}{dt} + \frac{(dpr)_M}{dt} \quad (33)$$

Les deux cinétiques de consommation, pour la croissance et la maintenance, sont respectivement décrites par des lois de la même forme que les relations (11) et (10), mais tenant compte de l'inhibition par le produit :

$$\frac{(dpr)_G}{dt} = -\frac{(\mu_m)}{Y_{X/PR,G}} \frac{(p_r/K_{PR})}{p_r/K_{PR} + \left(\frac{P}{K_{P+1}}\right)^2} \cdot X \quad (34)$$

$$\frac{(dpr)_M}{dt} = -\frac{\mu_m}{Y_{X/PR,M}} \frac{(p_r/K'_{PR}) (S/K'_S)}{P_r/K'_{PR} + S/K'_S + (P_r/K'_{PR}) (S/K'_S) + (pK_{P+1})^2} \cdot X \quad (35)$$

Dans cette relation, K'_S et K'_{pr} sont respectivement les constantes de saturation du substrat carboné et des protéines de carboné et des protéines utilisables; l'utilisation de cette grandeur non mesurable pose les mêmes problèmes que ceux évoqués plus haut a propos de (12).

Comme le taux de protéines consommées pour la maintenance est négligeable devant celui consommé pour la croissance, la vitesse de consommation de protéines devient:

$$\left(\frac{dpr}{dt}\right)_T = -\frac{(\mu_m)}{Y_{X/PR,G}} \frac{(p_r/K_{PR})}{p_r/K_{PR} + \left(\frac{P}{K_{P+1}}\right)^2} \quad (36)$$

L'équation précédente se simplifie, en portant (12) dans (36):

$$\left(\frac{dpr}{dt}\right)_T = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/PR,G}} = -\left(\frac{1}{Y_{X/PR,G}}\right) \left(\frac{dX}{dt}\right) \quad (37)$$

Ce modèle est intéressant dans la mesure où il tient compte de la limitation par l'azote, mais l'approche du problème est trop globale et arbitraire

II -MATERIELS ET METHODES

1-La bactérie

La souche utilisée dans notre étude est: *Streptococcus thermophilus* CNRZ302: souche de référence (centre national de Recherches Zootechniques; Jouy en Josas, France).

La souche lyophilisée est réactivée puis conservée et congelée dans du lait qui est un cryoprotecteur. La réactivation des cultures se fait par repiquage sur du lait écrémé autoclavé, avant l'ensemencement du milieu de préculture, deux repiquages sont effectués de la manière suivante:

Le ferment est décongelé, puis avec une anse en platine, on effectue un prélèvement, qui va servir à ensemer les 10 ml du premier tube de lait, le second repiquage s'effectuera exactement de la même manière. Pour obtenir une bonne croissance, après chaque repiquage, les tubes sont placés dans une étuve à 42 °C pendant 24 heures.

2-Le milieu de culture

Toutes les fermentations seront effectuées sur un milieu à base de lactosérum doux issu de la fabrication des pâtes cuites (Edam) provenant de l'ORLAC (Office Régional du Lait du Centre) de Boudouaou.

Au préalable ce lactosérum doit subir une déprotéinisation.

La déprotéinisation du lactosérum est réalisée selon le protocole proposé par MOULIN et al. , (1976). Cette déprotéinisation est partielle, elle concerne les caséines.

Elle consiste à amener le pH à 4,6 (point isoélectrique des caséines) par addition d'acide sulfurique concentré, ensuite le lactosérum est chauffé à 100°C pendant 5mn à l'autoclave. Après refroidissement, il est filtré sur un filtre simple.

L'opération est effectuée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sérum limpide.

Le lactosérum est stérilisé à 120°C pendant 20mn après ajustement du pH à 7 avec NAOH.

3-La fermentation

3-1-préparation de la préculture

Le milieu de préculture est chargé dans des Erlenmeyers d'une capacité de 500 ml qui contenaient 250ml du milieu, puis le tout est stérilisé à 120°C pendant 20 mn, ensuite thermostaté à 42°C, puis ensemencés par 8 ml de la seconde préculture sur lait.

Lorsque la croissance bactérienne est suffisamment avancée (après 17 heures), ce milieu va servir à inoculer le milieu de culture.

3-2-Préparation et lancement de la fermentation

La fermentation en discontinu (batch) à pH libre est réalisée dans des Erlenmeyers d'une capacité de 2 litres qui contenaient 1400 ml du milieu de culture en absence d'agitation et d'aération.

Après stabilisation de la température à 42°C, le milieu de culture estensemencé par 200 ml du milieu de préculture. Les Erlenmeyers sont ensuite incubés dans une étuve à 42°C pendant 8 heures.

4- Mesure de la concentration bactérienne

La mesure de la concentration bactérienne a été faite en utilisant deux méthodes :

4-1- Mesure optique turbidimétrie

Le suivi de la croissance a été effectué toutes les deux heures par mesure des densités optiques DO à une longueur d'onde de 650 nm, en utilisant un spectrophotomètre de marque Jenway 6105 U.V/ VIS.

Pour les solutions diluées, la turbidité est une fonction linéaire de la concentration bactérienne (MALETTE, 1969). La turbidité est proportionnelle à la biomasse; lorsqu'elle ne dépasse pas la limite 0,5- 0,6 en unité d'absorbance.

L'avantage d'utiliser cette méthode du fait qu'elle est rapide dans l'évaluation de la concentration bactérienne (ONER et ERICKSON, 1986).

4-2- Mesure du poids sec

Selon AMRANE (1991), la mesure du poids sec, se fait, de la manière suivante:

- Un volume connu de jus (20 ml) de fermentation est centrifugé à 3000 trs/mn, pendant le temps nécessaire pour séparer la biomasse (de 20 à 45 mn).
- Le surnageant est séparé de la biomasse, celle-ci est resuspendue dans de l'eau distillée.
- La suspension contenant la biomasse est centrifugée à nouveau.
- Un maximum de surnageant est éliminé, puis la biomasse est resuspendue dans un minimum d'eau distillée.
- la suspension est recueillie dans des cristallisoirs, préalablement séchés et pesés, qui sont mis dans une étuve à 105°C.
- Au bout de 16 heures, les cristallisoirs sont retirés de l'étuve, puis pesés après refroidissement au dessiccateur.

Connaissant le volume initial de jus centrifugé, il est facile de calculer la masse microbienne sèche.

Le poids est déterminé par la formule suivante :

$$P(g/L) = (m - m_0) / v$$

Où m_0 : masse de culot en suspension avant séchage (g)

m : masse de culot en suspension après séchage (g)

v : volume du jus de fermentation en (L)

La mesure du poids sec peut servir à convertir l'enregistrement de la turbidité en fonction du temps en courbe de biomasse en fonction du temps (voir courbe a en annexe).

5-Analyses chimiques

Toutes les analyses ont été effectuées en trois essais.

5-1-Dosage de l'azote total (Méthode de KJEDAHN)

Ce dosage est effectué sur du lactosérum brut (non traité) et du lactosérum déprotéiné selon la méthode préconisée par AFNOR (1980) qui consiste à la minéralisation de 5ml de lactosérum par chauffage, avec 17 ml d'acide sulfurique concentré, en présence d'un catalyseur (mélange d'oxyde de mercure, de sulfate de cuivre et de sulfate d'ammonium)

Après chauffage, nous avons procédé à l'alcalinisation des produits de la réaction et la distillation de l'ammoniac libéré qui est titré par une solution sulfurique diluée, en présence de 10 ml d'acide borique.

Le calcul de la teneur en azote total, exprimée en grammes d'azote par litre de lactosérum, est égal à :

$$V_1 \times 0,0014 \times \frac{1000}{V_0}$$

Où : V_0 est le volume, en millilitres de la prise d'essai,

V_1 est le volume, en millilitres de la solution d'acide sulfurique 0,1 N, utilisé pour la neutralisation de l'ammoniac.

5-2 Détermination de la teneur en protéines

Les protéines contiennent à peu près 16% d'azote donc la concentration en protéines est déterminée par la formule suivante :

Concentration en protéines (g/L) = azote totale (g/l) 100 /16 = azote total (g/L) 6,25

Où :

6,25 : facteur variable selon la nature de protéine à analyser (AUDIGE ET al., 1984)

5-3 Dosage du lactose (Méthode de BERTRAND)

Ce dosage est effectué aussi sur du lactosérum brut (non traité) et lactosérum déprotéiné selon la méthode préconisée par AFNOR (1980) qui consiste à la défécation de 20 ml de lactosérum par 2 ml de la solution l'hexacyanoferrate (II) de potassium et de 2 ml de la solution d'acétate de zinc ; une solution cuproalcaline est réduite à chaud par le filtrat obtenu.

Le précipité d'oxyde cuivreux formé est dissous par 30 ml d'une solution de sulfate ferrique et le sulfate ferreux formé est dosé par manganimétrie en présence d'orthophenantroline ferreuse comme indicateur.

La teneur en lactose, exprimée en grammes de lactose hydraté par litre de lactosérum,

Où : M est la masse, en milligrammes de lactose hydraté, lue sur le tableau A (voir annexe) en fonction du volume V de solution permanganate de potassium nécessaire.

5-4 Dosage de la teneur en matière grasse (Méthode acido-butyrométrique)

Ce dosage est effectué au laboratoire de l'ORLAC de Boudouaou sur du lactosérum non traité et sur lactosérum déprotéiné selon la méthode préconisée par AFNOR (1980).

Après dissolution des protéines par addition de 10 ml d'acide sulfurique à 100 ml de lactosérum introduit dans le butyromètre, il y a séparation de la matière grasse du lactosérum par centrifugation à 3000 trs/mn pendant 4 minutes, qui est favorisée par l'addition d'1 ml d'alcool amylique.

L'obtention de la matière grasse (en gramme pour 100 ml de lactosérum) se fait par la lecture directe sur l'échelle du butyromètre. Le mode de calcul de la teneur en matière grasse en (g/l) est égal à :

$$B - A$$

Où :

A est la lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse,

B est la lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne de matière grasse.

5-5 Dosage de l'acide lactique

Le dosage de l'acide lactique s'effectue selon la méthode préconisée par le manuel suisse des denrées alimentaires, (1973) dont le mode opératoire est le suivant:

5-5-1- Précipitation des substances gênant l'opération

-Introduire 20 ml de jus de fermentation dans un ballon jaugé de 50 ml.

-Ajouter, dans l'ordre, 10 ml de solution de chlorure de baryum, 5 ml de sulfate de zinc et 5 ml d'hydroxyde de sodium 0,66 N, en ayant soin de bien mélanger chaque fois.

-Remplir les traits de jauge avec de l'eau distillée, mélanger, laisser reposer la solution pendant 15 mn et filtrer sur un filtre plissé.

5-5-2- Réaction colorée :

Introduire 10 ml du filtrat clair dans une éprouvette, ajouter 1ml de la solution diluée de chlorure de fer (III).

L'acide lactique donne avec le chlorure de fer (III) une combinaison jaune, de composition inconnue ou l'intensité de la couleur est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde 425nm, elle est proportionnelle à la teneur en acide lactique.

5-5-3- Courbe étalon : (voir courbe b en annexe)

-Mettre 0, 1, 2, 3, 4...jusqu'à 10 ml de solution mère d'acide lactique (1ml de cette solution contient 1g d'acide lactique) dans des ballons jaugés de 50 ml, ajouter 15 à 20 ml d'eau ainsi que les agents de précipitation indiqués sous (5-5-1).

-Remplir jusqu'à la marque, prélever 10 ml du filtrat et exécuter la réaction colorée comme indiqué sous (5-5-2).

-Porter sur un système de coordonnées les valeurs mesurées et les quantités correspondantes d'acide lactique contenues dans 1 ml de la solution colorée.

La teneur en acide lactique en g/l est égal à :

$$\frac{0,5 \times a}{p}$$

Où :

a = teneur en acide lactique indiquée par la courbe étalon en gramme,

p = la prise d'essai exprimée en litre

5-6 Détermination de la matière sèche :

Ce dosage est effectué sur lactosérum brut et déprotéiné à l'ORLAC de Boudouaou.

Le principe est basé sur la dessiccation par élimination d'eau dans un appareil à infrarouge type Sartorium M45 qui affiche directement sur l'écran la teneur en eau ou bien la teneur en extrait sec du produit en g/l.

6 - Détermination de l'influence de certains paramètres sur les cinétiques de croissance et d'acidification

Vu le manque de littérature concernant la production d'acide lactique par *S.thermophilus*, on a essayé de regrouper et d'optimiser le maximum des paramètres de fermentation afin de maximiser la croissance et la production d'acide lactique.

A cet effet, on a étudié:

- Les paramètres physico-chimiques de notre souche qui se limitent à la détermination de l'influence de la température et du pH
- les paramètres liés au milieu de fermentation qui consistent à la détermination de l'influence de l'extrait de levures et du lactose.

Suite à des prélèvements aseptiques après chaque deux heures de fermentation, on faisait la mesure du pH par un pH-mètre, on dosait l'acide lactique, le lactose et le suivi de la croissance par mesure de la densité optique DO et le poids sec.

Toutes les manipulations ont été faites en 3 essais.

III-RESULTATS ET DISCUSSION

1-Composition du lactosérum

La composition biochimique du lactosérum issu de l'ORLAC de Boudouaou est représentée sur le tableau IX. La connaissance de cette composition est nécessaire pour procéder à des essais de supplémentation afin d'obtenir un milieu adéquat à la fermentation.

Tableau IX: Composition moyenne du lactosérum de l'ORLAC de Boudouaou.

	Avant filtration (brut)	Après filtration et stérilisation
pH	6,2 – 6,4	5,7- 6
Extrait sec (g/l)	80	68
Teneur en azote (g/l)	1,33	0,84
Teneur en protéine (g/l)	8,48	5,35
Teneur en lactose (g/l)	54	50-51
Teneur en matière grasse (g/l)	3	Quelques traces

La composition biochimique moyenne du lactosérum doux (brute et traité) provenant de l'ORLAC de Boudouaou semble être inférieure à celle enregistrée par SOTTIEZ, (1990) (voir tableau n°II) ce peut être expliquer par une différence de la composition initiale du lait utilisé.

Comme montre le tableau IX, le lactose est le constituant le plus important du lactosérum, il représente 70 à 72% de l'extrait sec (BRITTEN, 2003)

Lors du traitement du lactosérum, nous avons constaté qu'il y a une variation du pH, il est de 6,3 à l'état brut et il peut atteindre 5,7 après son traitement. Cette acidification est attribuée à une dégradation du lactose qui chute de 54 g/L à 50 g/L.

Selon AMRANE et PRIGENT, (1997) une quantité de 47 g/L de lactose est largement suffisante pour la production d'acide lactique.

En revanche, lors de la déprotéinisation du lactosérum, on a constaté une perte de 3,13 g/L de protéines.

Les protéines que contient le lactosérum filtré sont plus assimilables, elles sont principalement constituées de protéines hydrosolubles (de la β lactoglobuline et l' α lactalbumine) dont le poids moléculaire est inférieur à 20.000 Dalton, les caséines ont été retenues au niveau du filtre, vu leur poids moléculaire élevé.

De manière générale ce lactosérum est jugé un bon milieu pour la fermentation.

2-Optimisation des paramètres de fermentation

Les paramètres pris comme critère d'optimisation en discontinu (batch), à pH libre, sont le taux de croissance spécifique maximal (μ_m) exprimé en (h^{-1}) et la vitesse moyenne acidification $(dp/dt)_m$ ou (v_m) exprimée en (g/Lh) ;

μ_m : est la vitesse de croissance (dx/dt) rapportée à l'unité de biomasse (x) au cours de laquelle toutes les bactéries se retrouvent dans leur état physiologique optimal et se multiplient à leur taux de croissance maximum.

$\mu_m = \ln 10 \cdot \text{tg}(a)$ déduit de la courbe $\log(x)$ en fonction du temps (voir Figure 3).

v_m : cette vitesse est déduite de la courbe de production, c'est le rapport entre la concentration maximale en produit (P_m) et le temps mis pour l'atteindre.

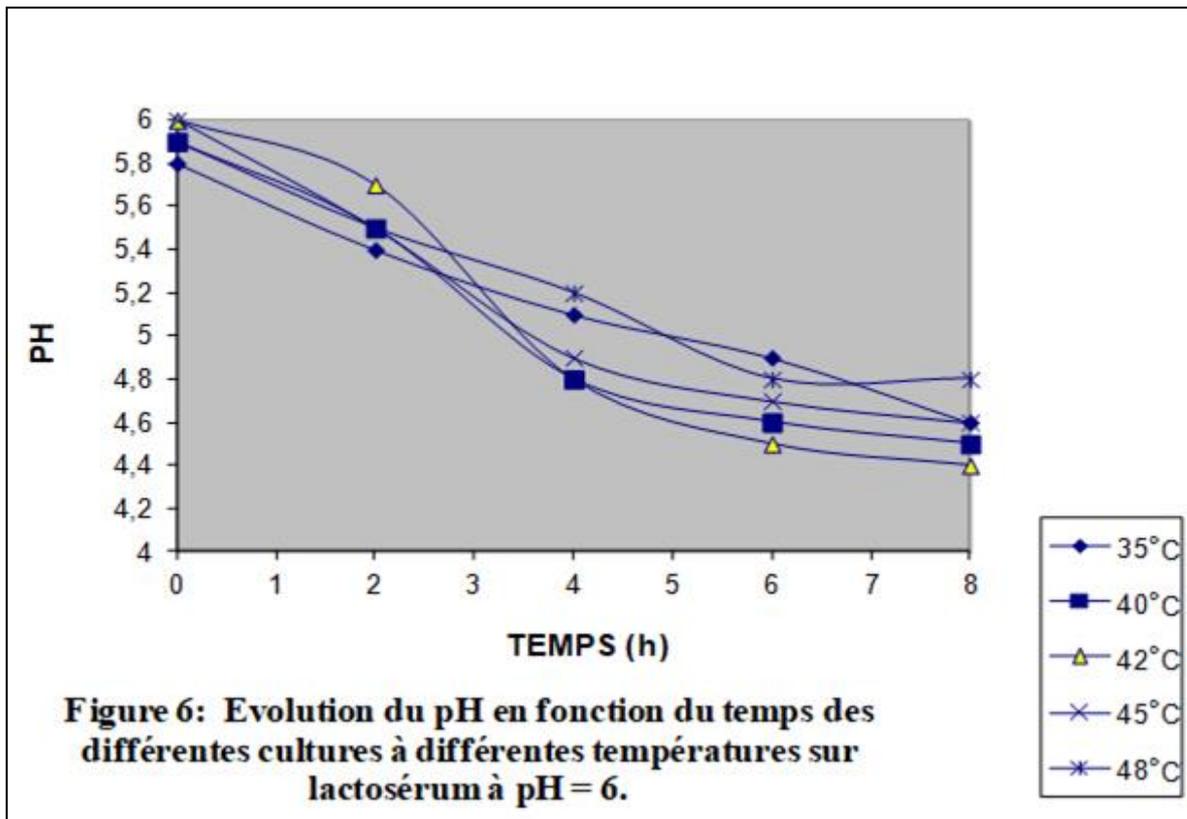
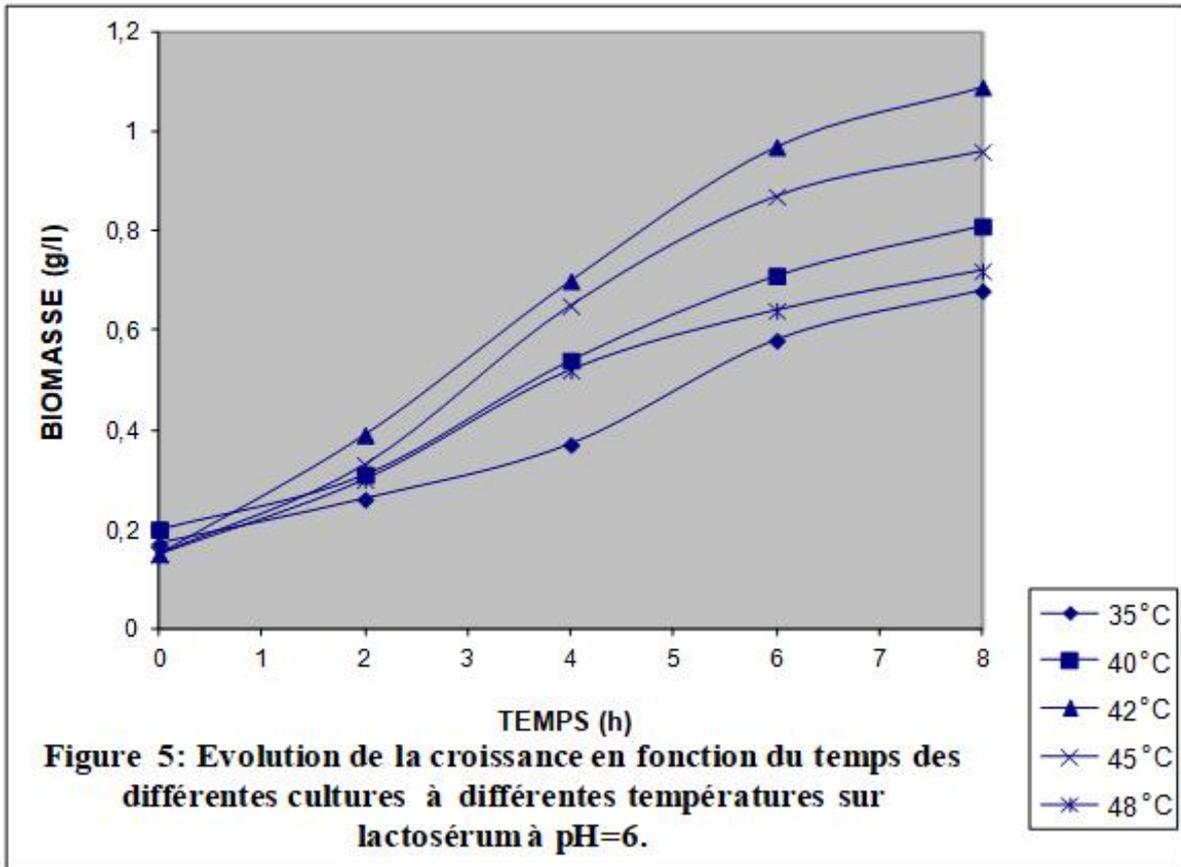
2-1-Optimisation des paramètres physico-chimiques

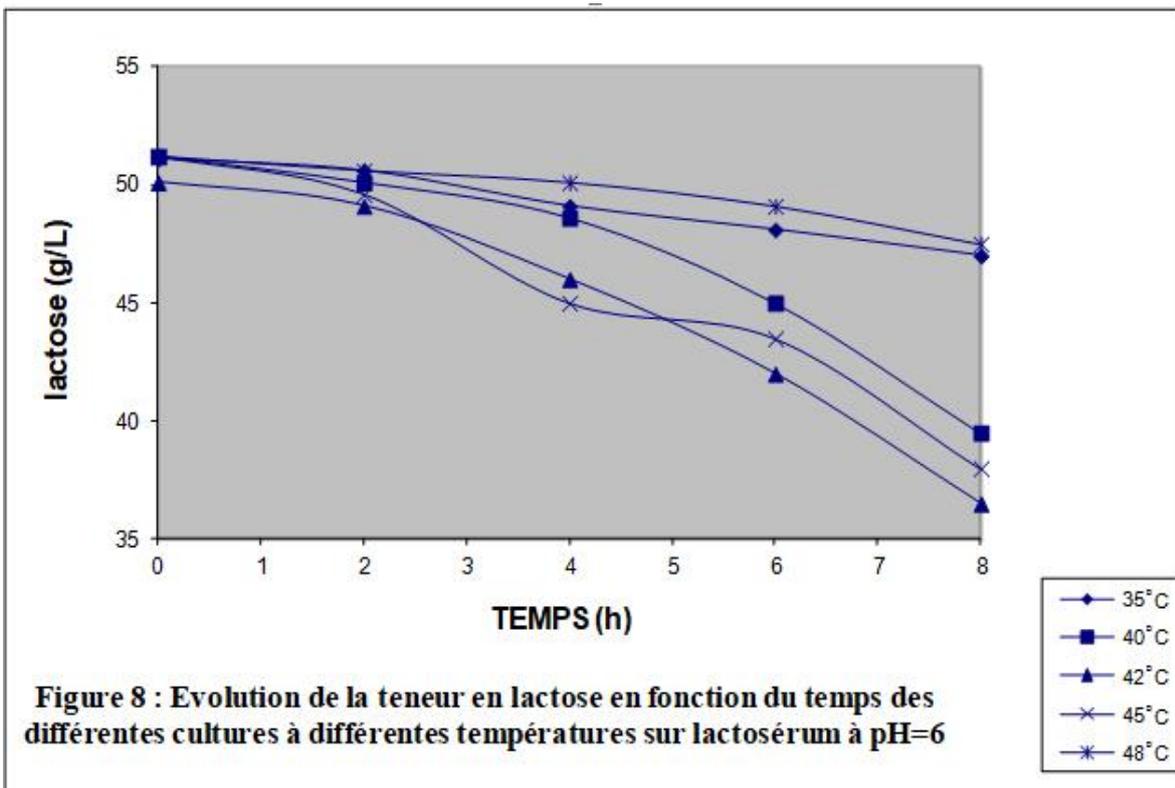
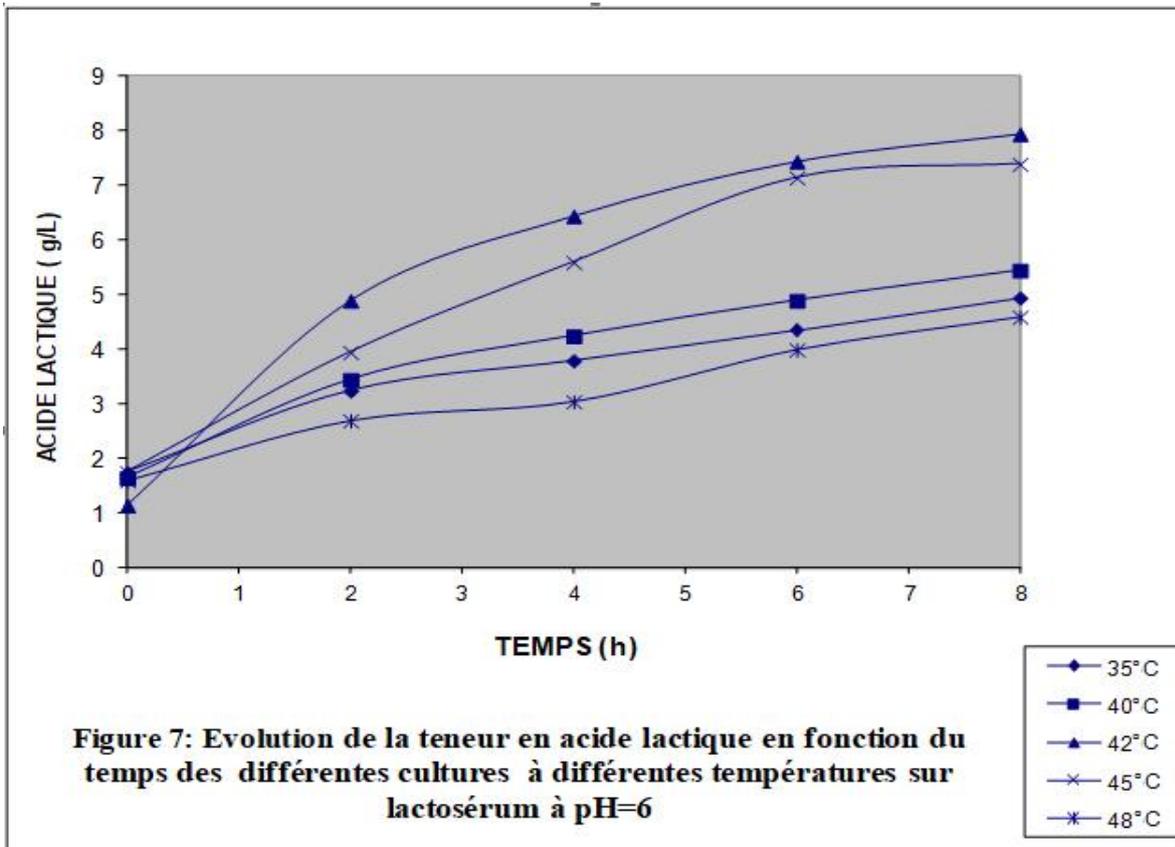
2-1-1-Détermination de la température optimale :

On a comparé la croissance ainsi que la production d'acide lactique de 5 cultures qui étaient incubées parallèlement, pendant 8 heures, à 5 températures différentes.

Sur les figures 5, 6, 7 et 8 on a représenté l'évolution du pH, de la biomasse, de la production d'acide lactique et du lactose consommé ou le pH du milieu de fermentation était ajusté à 7 (avant la stérilisation) et qui était approximativement égal à 6 pour ces cinq différentes températures : 35°C, 40°C, 42°C, 45°C et 48°C en fonction du temps.

On a représenté aussi sur les figures 9 et 10 la variation du taux de croissance maximal (μ_m) et la vitesse moyenne (v_m) en fonction ces différentes températures.





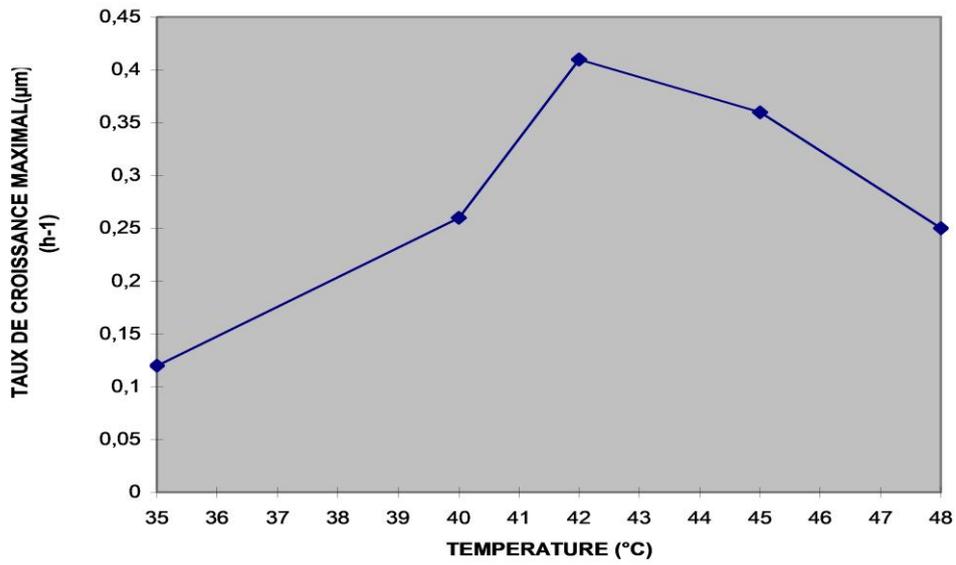


Figure 9 : Evolution du taux de croissance maximal en fonction des différentes températures.

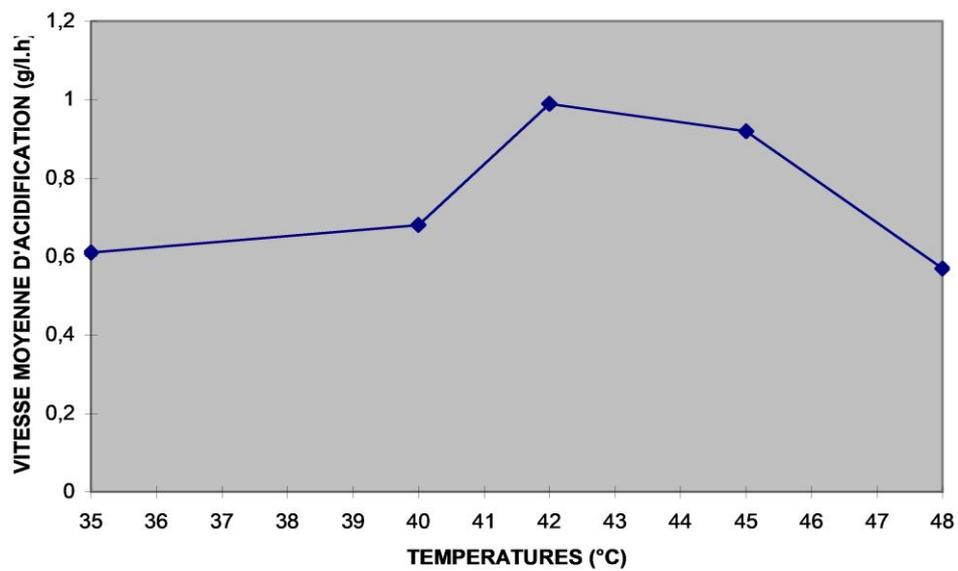


Figure 10: Evolution de la vitesse moyenne d'acidification en fonction des différentes températures

D'après les résultats obtenus, il apparaît que la température optimale de croissance et de production d'acide pour notre souche (CNRZ 302) était au voisinage de 42°C, où le μ_m et v_m atteignaient 0,41 h⁻¹ et 0.68 g/L.h respectivement.

Cette étude, nous a permis de constater qu'il y a eu des variations importantes de la croissance et de l'activité acidifiante, où la production est obtenue plus rapidement à 45°C mais elle est plus stable et maximale à la température 42°C et elle chute à 35°C et 48°C.

ACCOLAS (1977), RADKE-MITCHELL et SANDINE (1986), AMOROZO et al., (1988), MECHACHOU, (2014) et même des travaux ayant été effectués au sein de notre laboratoire tel que ceux de BENSIAMEUR , (1996) et BOUBECHICHE, (1999) ont préconisé cette température d'incubation pour la souche CNRZ 302. De même BOUDJEMA, (2008) ayant travaillé sur la souche S13 a préconisé la même température.

Selon BOURGEOIS et LARPENT, (1996) *S.thermophilus* se distingue essentiellement des autres streptocoques lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour 42°C-43°C, GYOSHEVA et al.,(1995) ont travaillé sur 75 souches de *S.thermophilus* et ont trouvé que la température 42°C est la température optimale pour ces dernières.

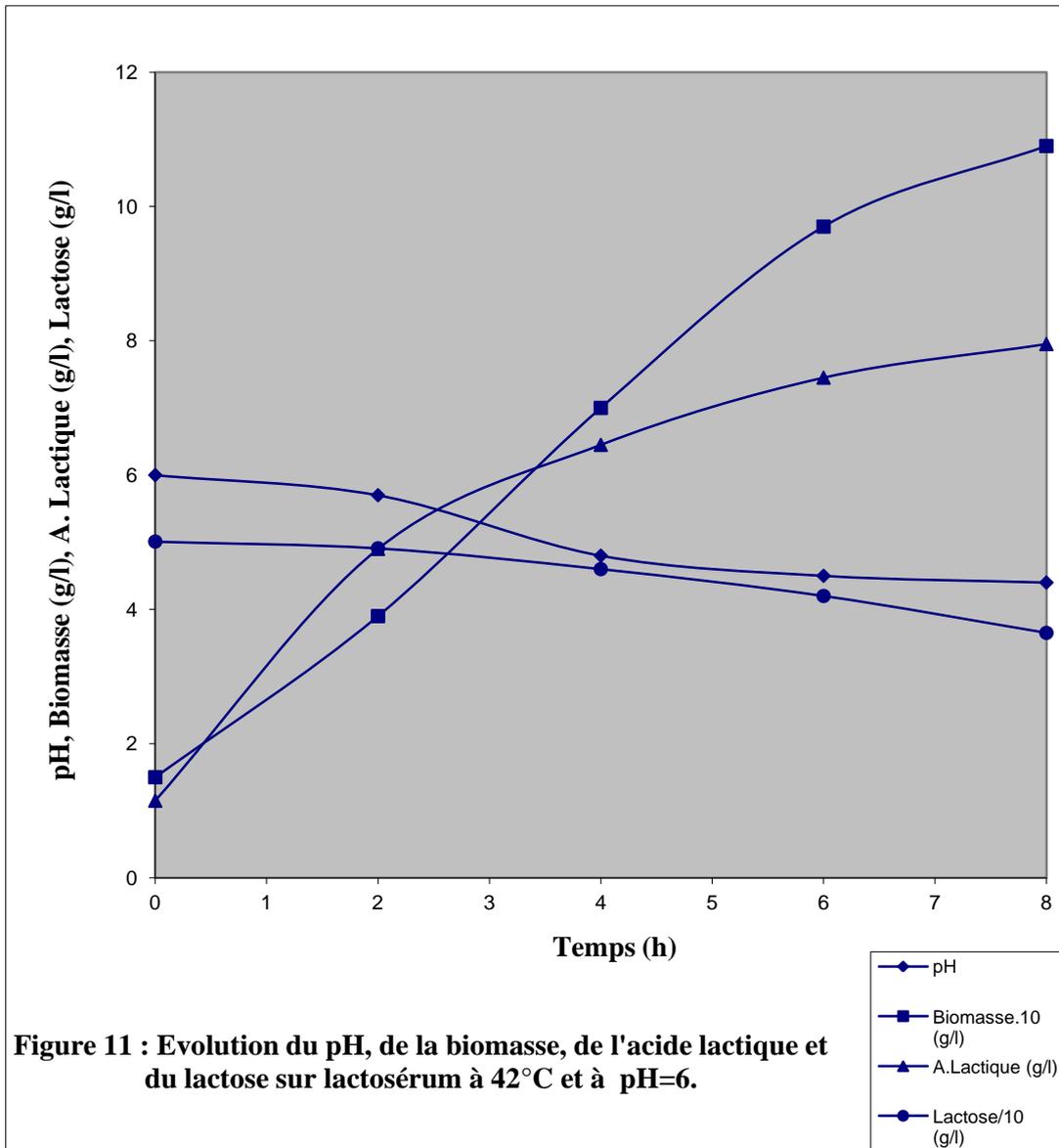
En effet, la figure 11, regroupe l'évolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique produite et du lactose consommé à un pH=6 et à une température de 42°C. A partir de cette figure, il apparaît que le pH durant les 4 premières heures varie de 6 à 4,88 et après 8 heures d'incubation, il est de 4,44.

En se rapportant à ces résultats, nous pouvons considérer que notre souche (CNRZ 302) est une bonne souche acidifiante car d'après CHAMBA et PROST, (1989) et CHAMBA, (1990), une souche n'est acidifiante que si la variation du pH est égale au moins 0,5 unités en 4 heures pour *S.theromphilus*.

Selon BEAL, (2015), cette souche est dite acidifiante si elle atteint un pH= 5 après 270min (4h 30min)

D'autre part, il ressort de cette figure aussi, la croissance qui varie de 0,16 g/L à 1.09 g/L avec une production d'acide lactique qui varie de 1,15 g/L à 7,95g/L et une consommation du lactose qui varie de 50,L g/l à 36,5 g/L.

A cet égard, les courbes de croissance et de production présentent, en effet une certaine similitude, avec cependant, un léger décalage dans le temps pour la production d'acide lactique et un découplage des deux phénomènes au moment de la phase stationnaire, ce résultat paraissant lié à une perturbation dans la croissance (BEAL et al., 1989)



2-1-2-Détermination du pH optimal

Afin de mieux maximiser la production d'acide lactique, nous avons cherché à savoir quel est le pH optimal qui nous permet d'avoir une meilleure croissance ainsi qu'une meilleure vitesse d'acidification pour notre souche (CNRZ 302).

Une fois le traitement du lactosérum effectué (déprotéinisation et filtration), il doit subir une neutralisation, en ajustant le pH à 7. Cependant, nous avons constaté que lors de la stérilisation, le pH du milieu diminue et atteint même 5,7.

En effet, d'après la littérature, ce pH n'est pas le pH optimal de croissance et d'acidification de notre souche (voir tableau IV).

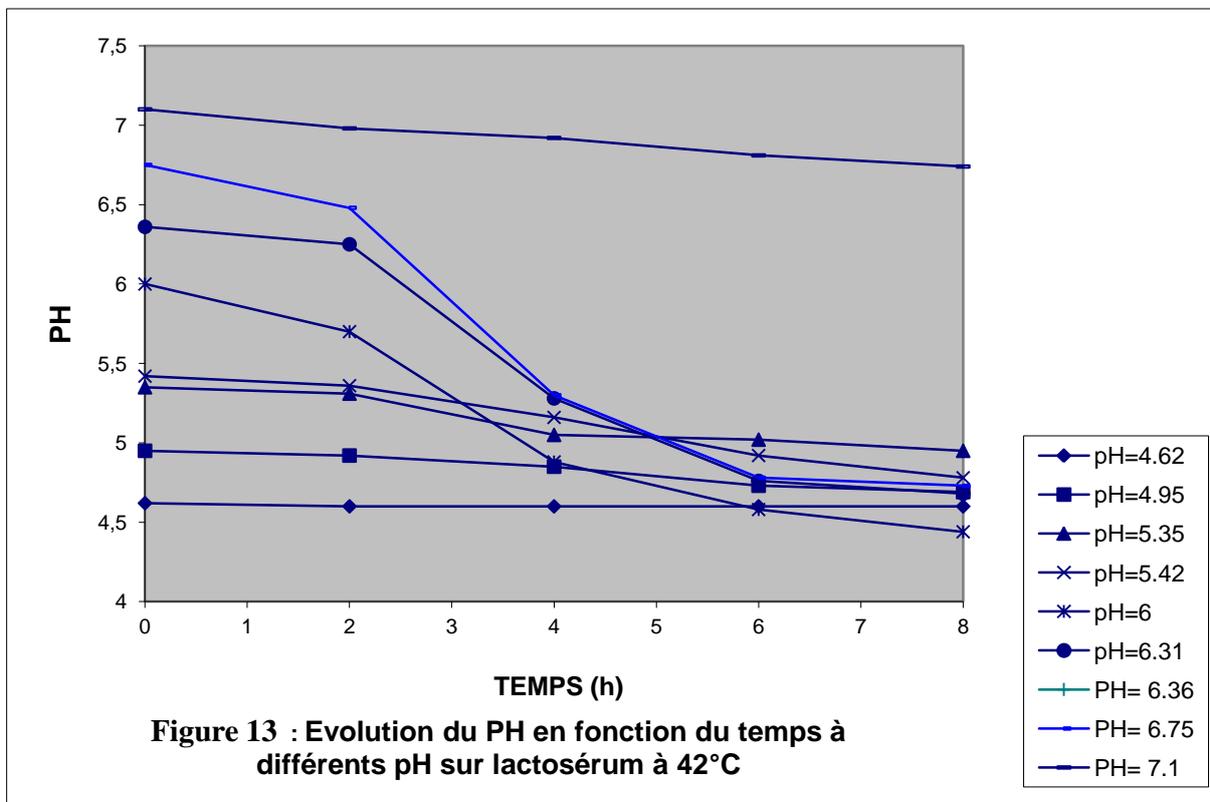
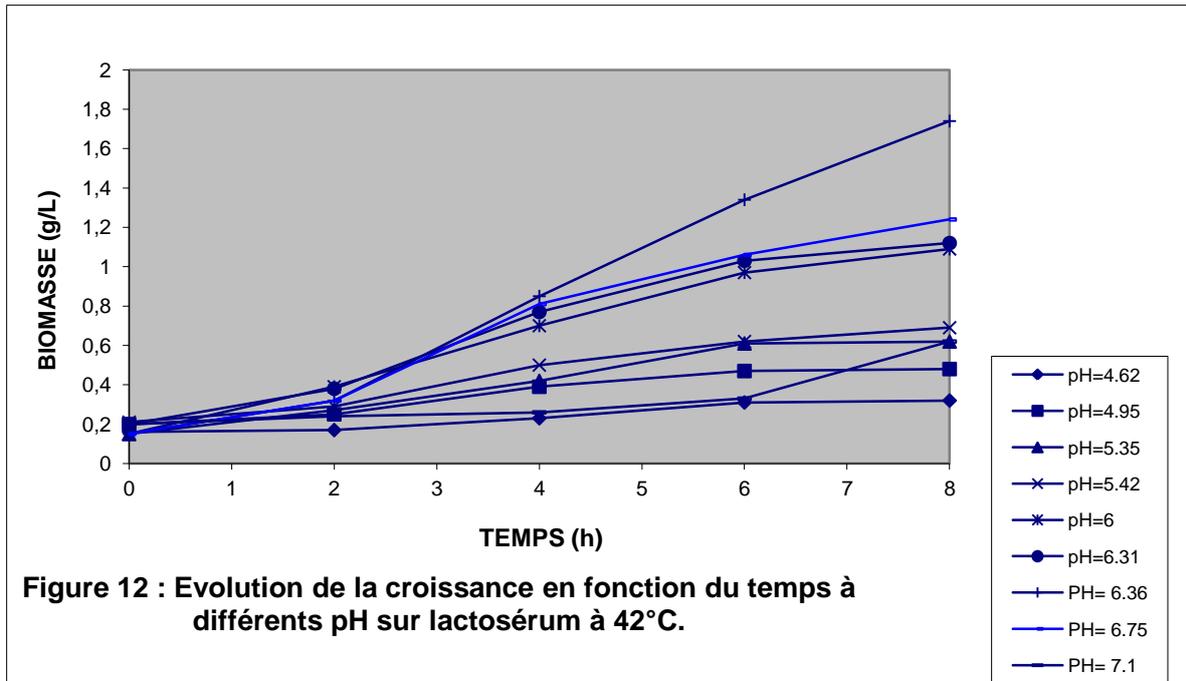
Par ailleurs, nous avons procédé à la variation de l'ajustement du pH de 4,6 à 10 avant la stérilisation avec de l'acide sulfurique concentré pour acidifier et avec de l'hydroxyde de sodium (10M) pour alcaliniser le milieu afin de situer le pH optimal de croissance et d'acidification de notre souche.

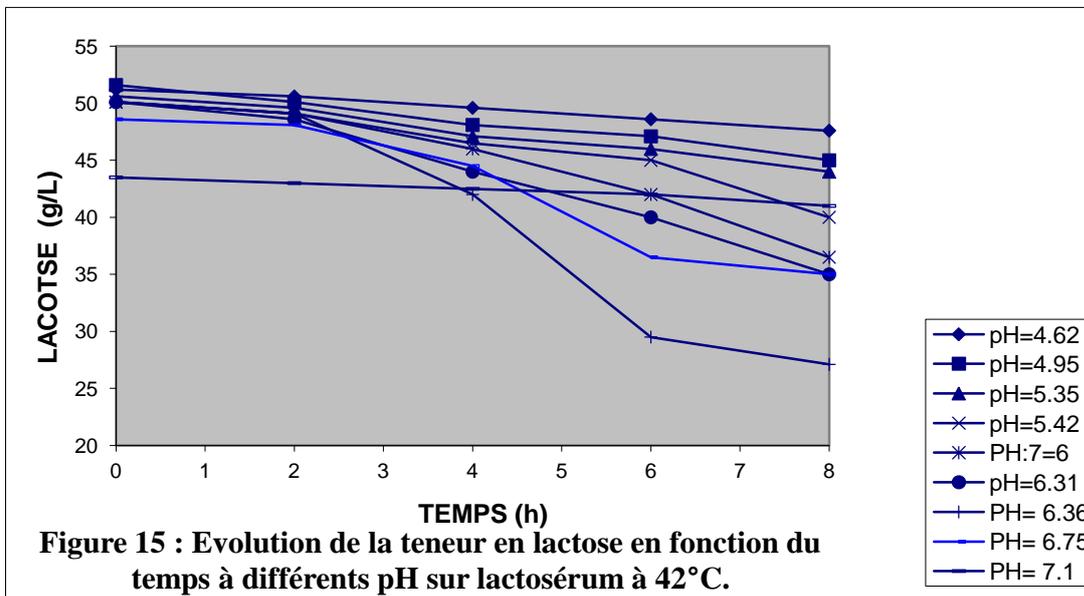
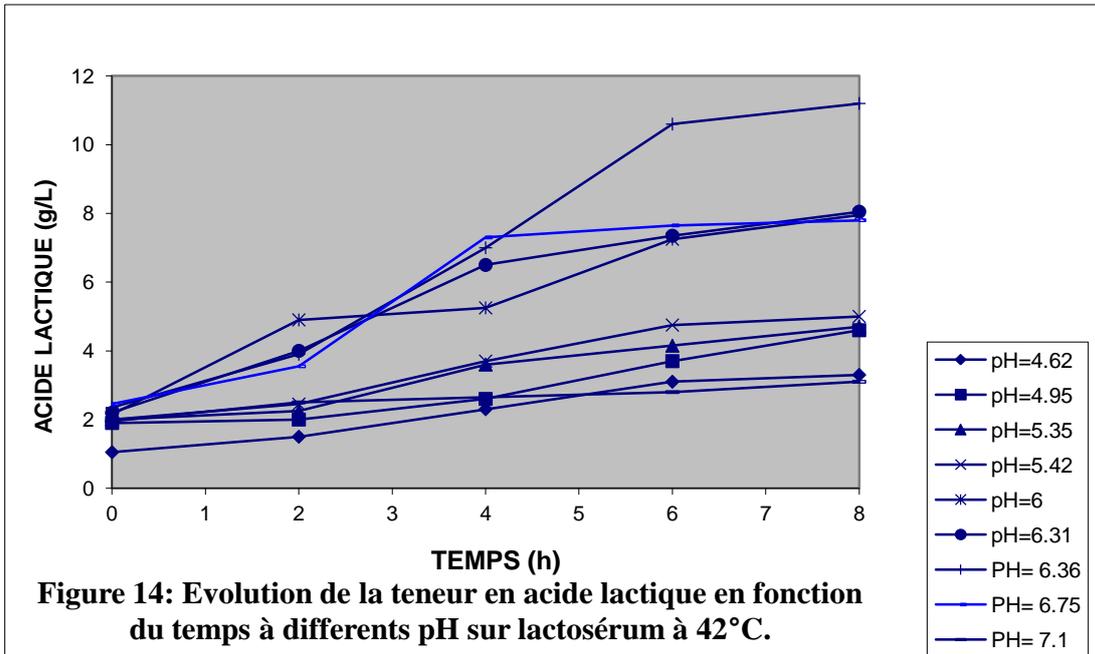
Les figure 12, 13, 14 et 15 représentent l'évolution de la biomasse, du pH, de la production d'acide lactique et du lactose consommé à une température d'incubation de 42°C et à différents pH.

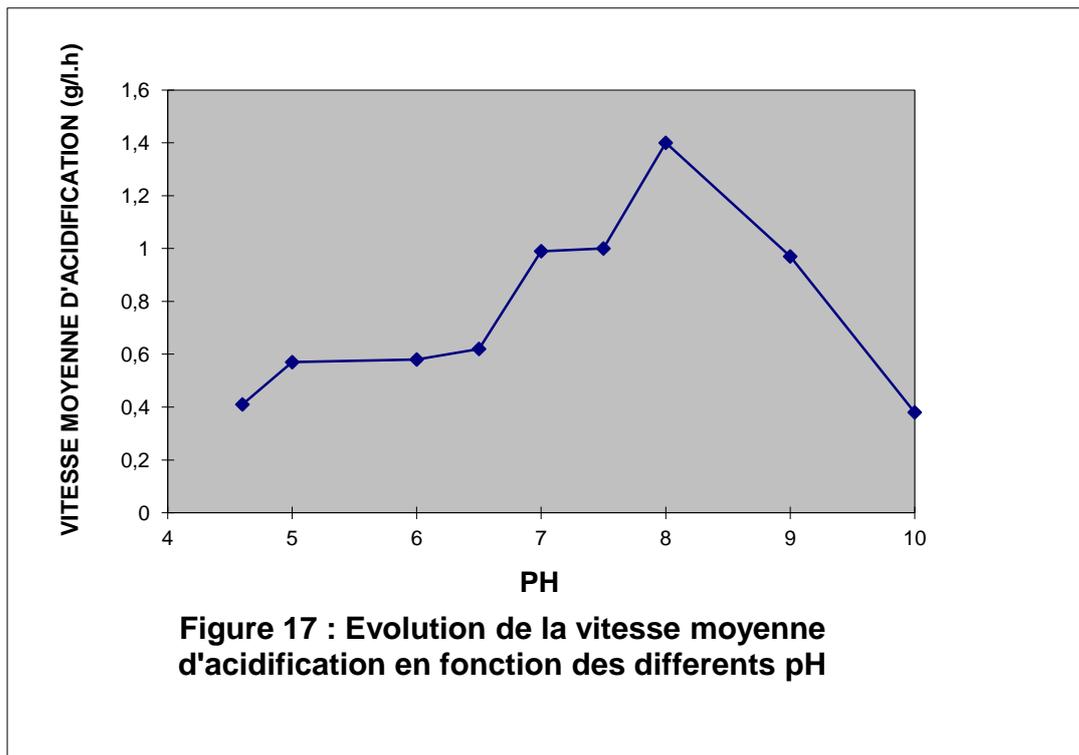
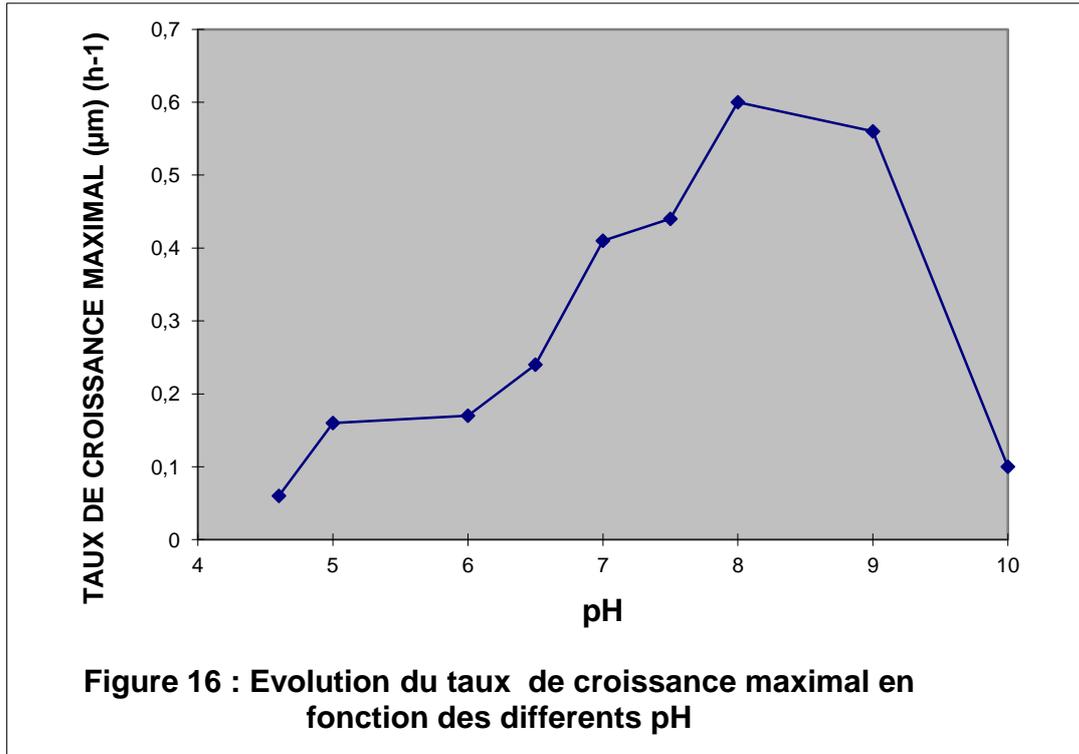
Il est à signaler que la stérilisation entraîne une diminution du pH et cette diminution est plus rapide à pH alcalin. A cet effet, les pH réels que nous avons pris en considération sont ceux après stérilisation.

Sur les figures 16 et 17, nous avons représenté aussi la variation du taux de croissance spécifique maximal (μ_m) et la vitesse spécifique (v_m) en fonction des différents pH.

Il est à noter que le pH optimal de croissance et d'acidification est au voisinage de pH = 6,36 où le taux de croissance μ_m atteint 0.60 h^{-1} et la vitesse moyenne d'acidification v_m est à 1.4 g/h.L .







Les effets du pH sur le taux de croissance maximal (μ_m) et de la vitesse moyenne d'acidification (v_m), se manifestent de façon similaire, ou ils prennent des valeurs maximales dans une zone de pH optimal. De part et d'autre de cette zone, le μ_m et v_m se ralentissent et peuvent s'annuler, la variation de μ_m et v_m en fonction du pH se présente, par conséquent, selon une courbe de cloche au voisinage de l'optimum (pH = 6,36)

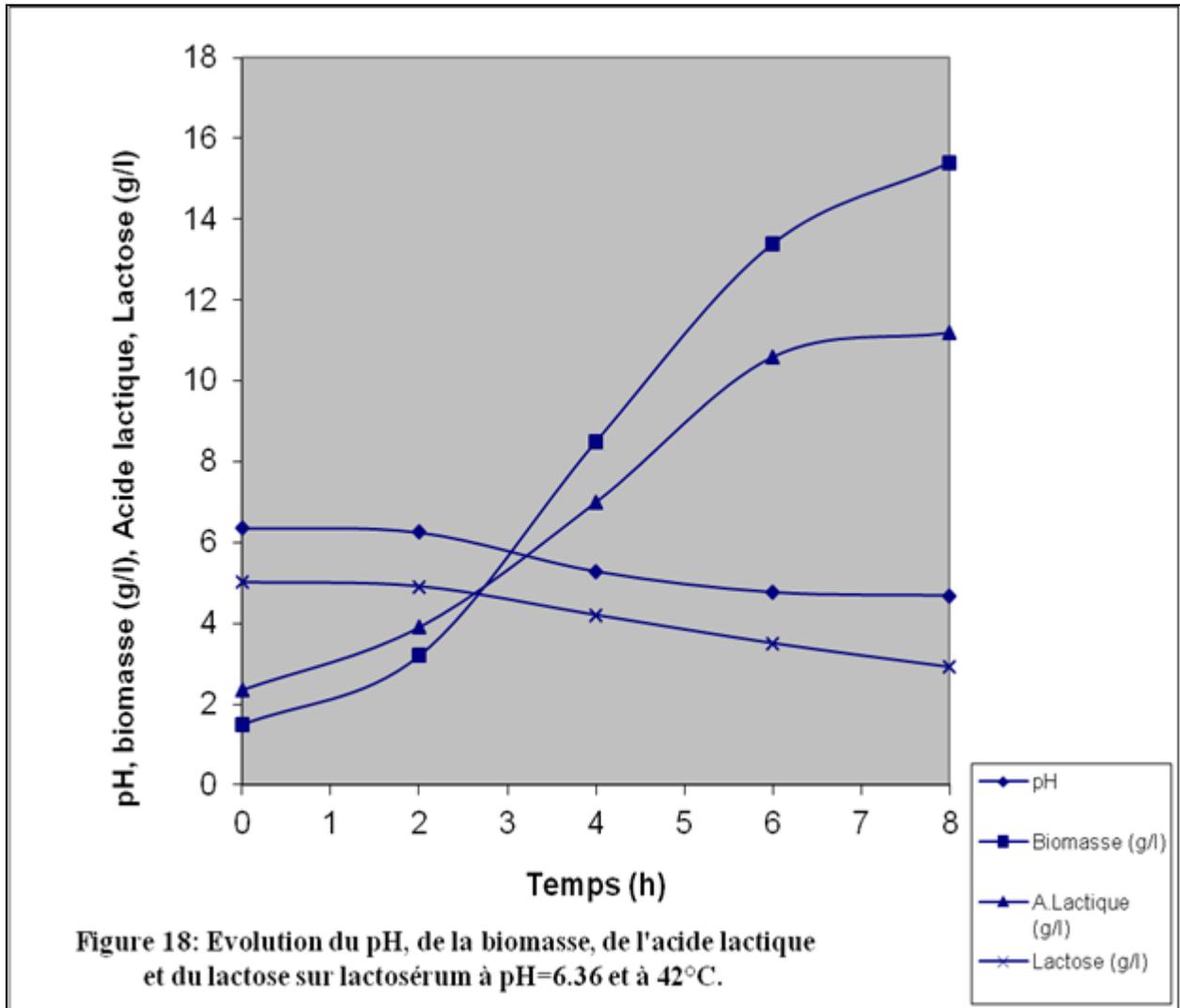
ADAMBERG et al.,(2003) et GUHA et al., (2013) ont expliqué la croissance et la production d'acide lactique à des pH bas ou alcalins par la haute résistance des bactéries lactiques aux conditions défavorables(acide élevé, alcalinité élevée ect).

Selon HUTKINS et NANNEN,(1993) les bactéries lactiques thermophiles notamment *S.thermophilus* poussent et gardent généralement leur viabilité dans des milieux de pH compris entre 4,5 et 7.

MCBEAN et al., (1979), PARENTE et ZOTTOLA, (1991) ont suggéré un pH de 6 pour *S.thermophilus* par contre TAYEB et al.,(1984) et BEAL et CORRIEU, (1991) ont suggéré un pH de 6,5 pour la même espèce , par contre BOUDJEMA, (2008) a suggéré un pH de 6,42 pour la souche S13.

L'ajustement du pH à 8 (au lieu de 7) avant la stérilisation a amélioré significativement sur la croissance et la production d'acide lactique.

La figure 18, met en évidence la relation qui existe entre l'évolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique produit et du lactose consommé, à pH = 6,36, à une température d'incubation de 42°C. Après 8 heures d'incubation, le pH change de 6,36 à 4,68, la croissance augmente de 0,15 à 1,54 g/L avec une production d'acide qui varie de 2.35 g/L à 11,2 g/L et une consommation de lactose qui varie de 50.1 g/L à 29.1g/L.



Suivant les résultats obtenus, précédemment par comparaison entre les courbes de croissance et de pH, on remarque que la biomasse atteint sa phase stationnaire, le pH lui aussi devient stationnaire après 6 heures de fermentation, cela pourrait signifier qu'à pH libre la production est totalement liée à la croissance (car le pH est lié à la concentration en acide lactique produite).

Selon BEAL et SODINI, (2003) le pH est un facteur chimique important pour la croissance des bactéries lactiques, il intervient sur la disponibilité en nutriments du milieu, sur la perméabilité de la membrane cellulaire et sur la vitesse d'activité enzymatique lors de la production d'acide lactique, s'il n'est pas contrôlé, représente un facteur de ralentissement du métabolisme bactérien.

En effet, les bactéries lactiques utilisent la voie EMBDEN-MEYERHOFF PARNAS (EMP) pour la conversion du lactose en pyruvate, le lactose est converti en glucose et galactose par activité de la β galactosidase. L'effet du pH sur cette enzyme a été déterminé, elle a une activité faible à un pH 4 et une activité optimale au voisinage d'un pH égal à 5,5 (SHAH et TELEN, 1990), VALI et al. (2006).

Le glucose et le galactose sont convertis en pyruvate et ATP, à travers la glycolyse, le pyruvate est converti en acide lactique et l'ATP formée, sera utilisée pour la croissance et la maintenance des cellules (LUQUET et CORRIEU, 2005).

A des pH très faibles, le taux spécifique maximal de croissance ($\mu_m = 0,06 \text{ h}^{-1}$) est faible, de très petites quantités d'ATP sont formées et la majorité de celles-ci est utilisée encore plus pour la maintenance que pour la croissance.

De même, VENKATESH, (1993) et CHETAN et al. (1997) ayant étudié la modélisation de la production d'acide lactique sur un seul substrat de fermentation (le lactose) en batch chez *L.bulgaricus*, ils ont mis en évidence l'effet du pH sur l'activité enzymatique de la β galactosidase, facteur clé de la fermentation, et par conséquent le taux de croissance et la vitesse de production d'acide sont dépendants des quantités d'enzymes synthétisées.

Par ailleurs, l'activité enzymatique est dépendante du pH du système ce qui explique qu'à bas pH, elle est inhibée.

2-2- Optimisation du milieu de culture

2-2-1- Détermination de la concentration optimale en extrait de levures :

Dans le but de déterminer l'effet de l'extrait de levures sur la croissance et la production d'acide, de différentes concentrations en extrait de levures ont été testées.

Nous avons représenté sur les figures 19, 20, 21 et 22 l'évolution de la biomasse, du pH, des quantités d'acide lactique produites lors de la fermentation ainsi que le lactose consommé.

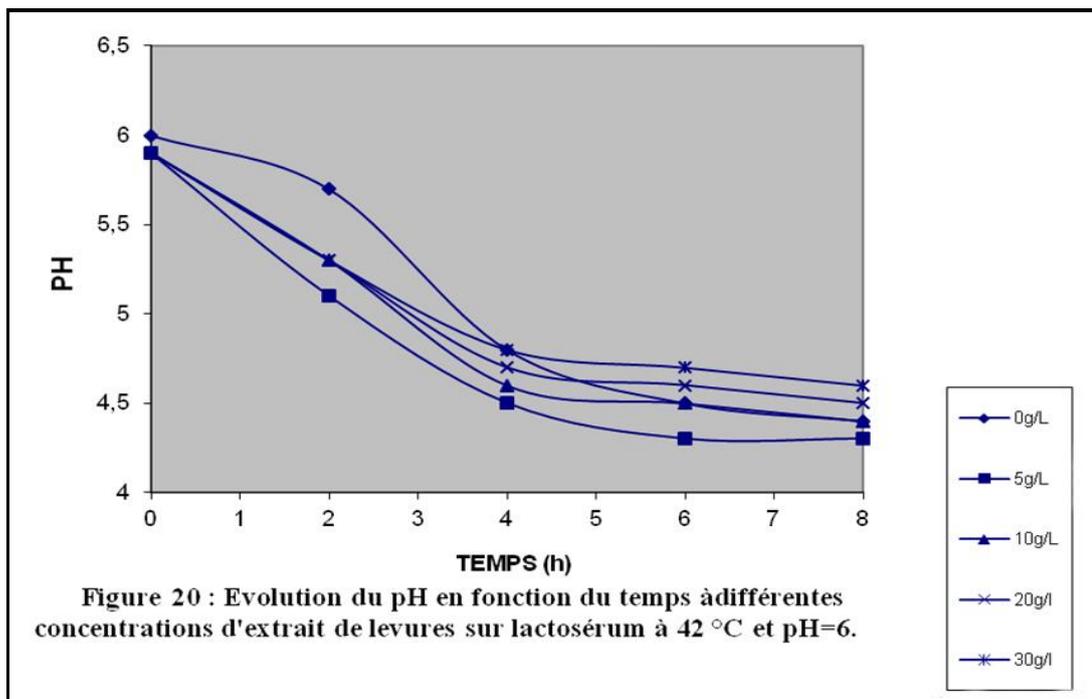
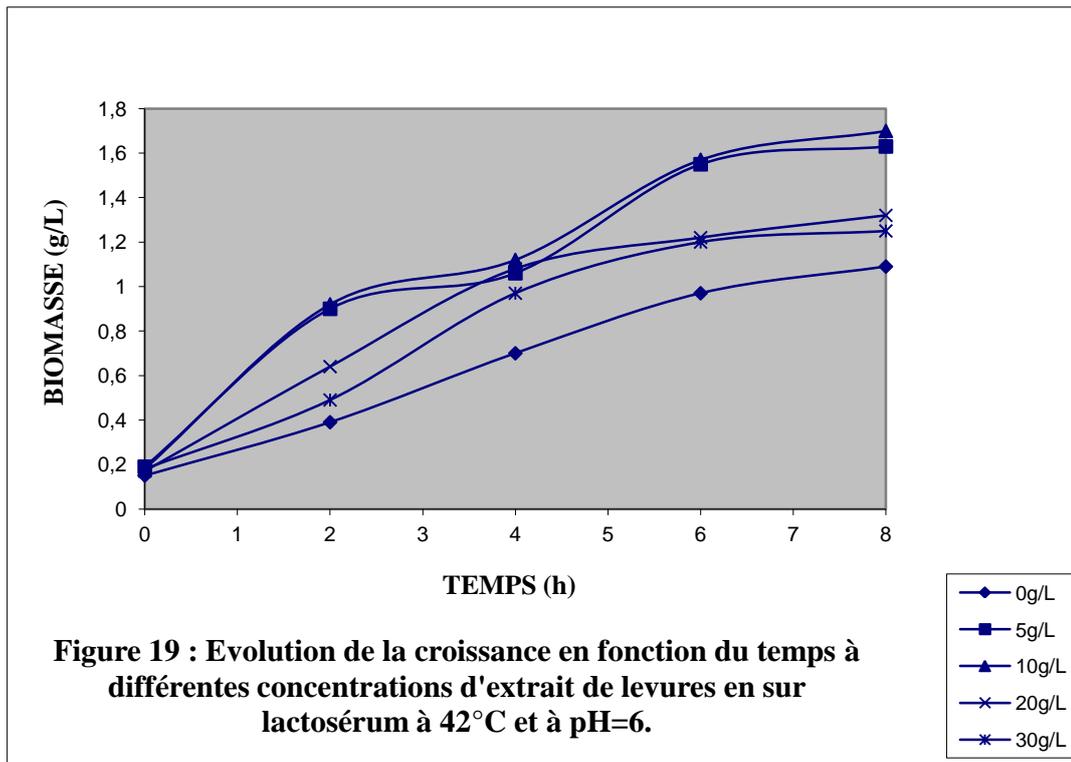
De ces résultats, il apparaît que la concentration de 10 g/L d'extrait de levures est la concentration optimale pour la croissance et pour la production d'acide lactique.

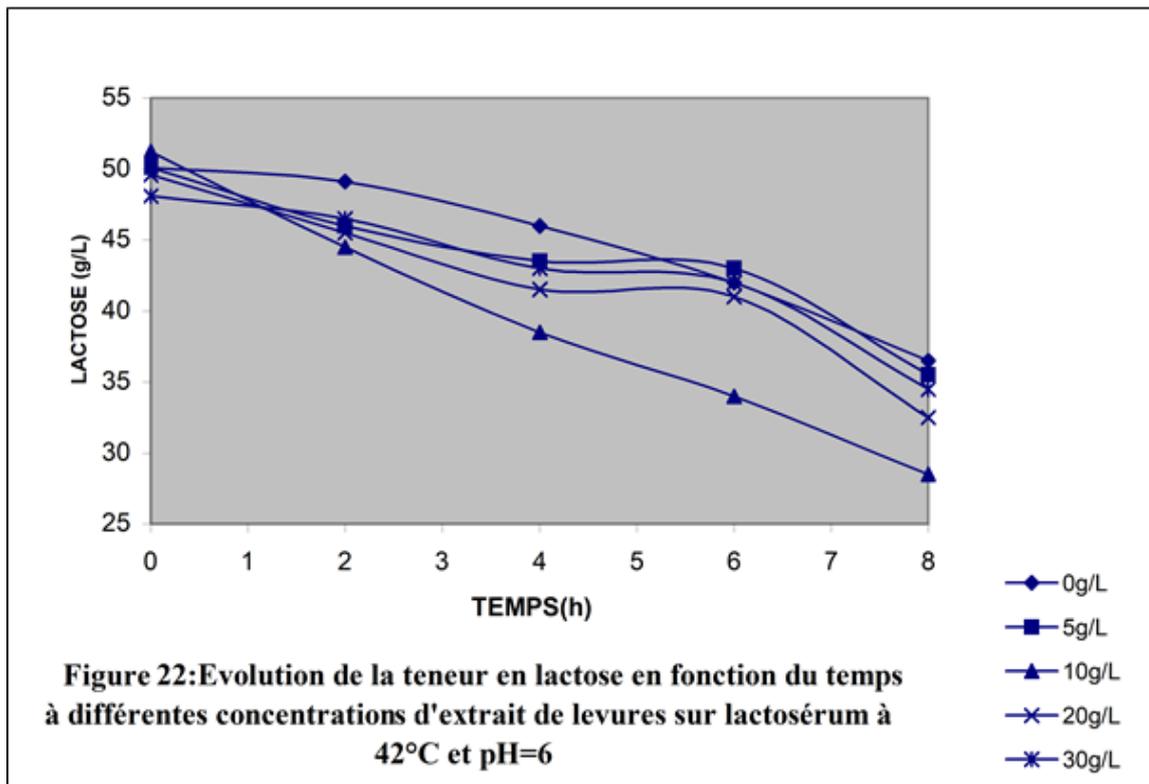
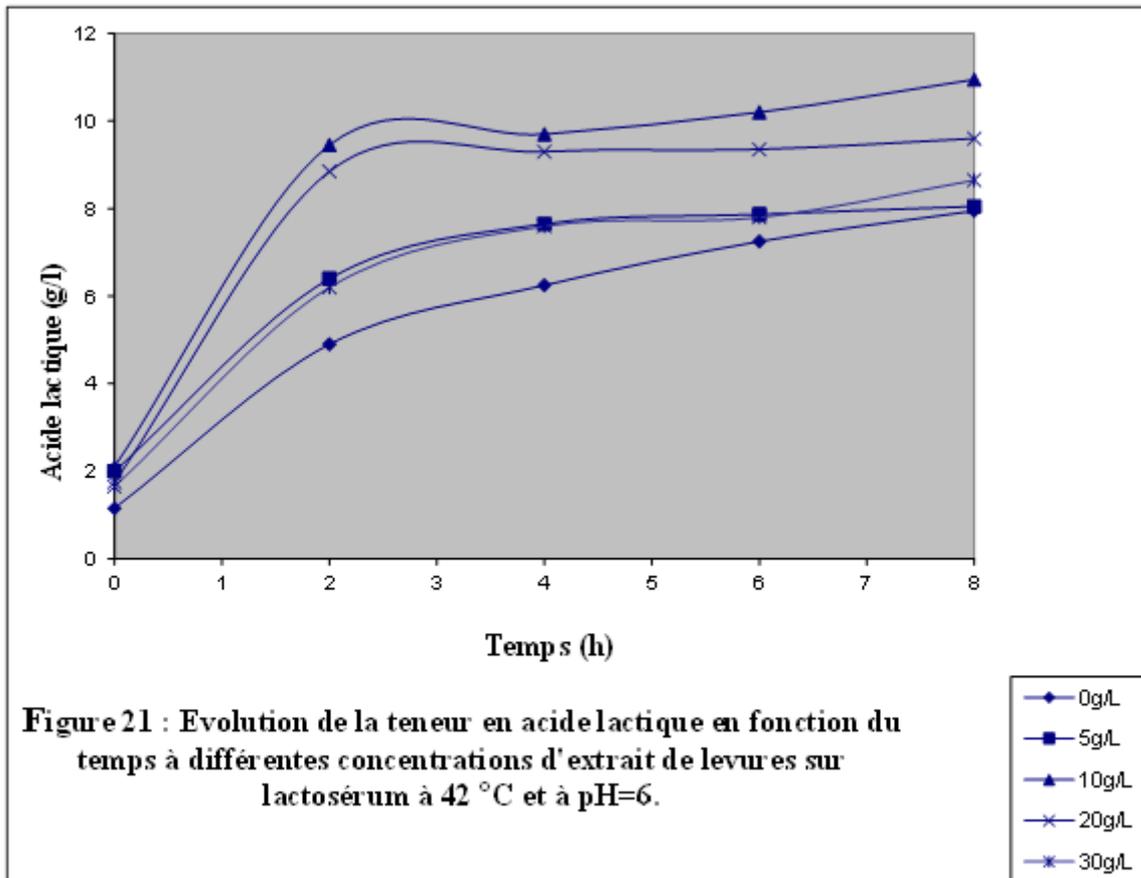
Les figures 23 et 24, illustrent la variation du taux de croissance maximal et la vitesse moyenne d'acidification en fonction des différentes concentrations en extrait de levures où à la concentration de 10 g/L, nous notons le taux de croissance maximal le plus élevé $\mu_m = 0,63 \text{ h}^{-1}$ avec une vitesse moyenne d'acidification $v_m = 1,36 \text{ g/L.h}$.

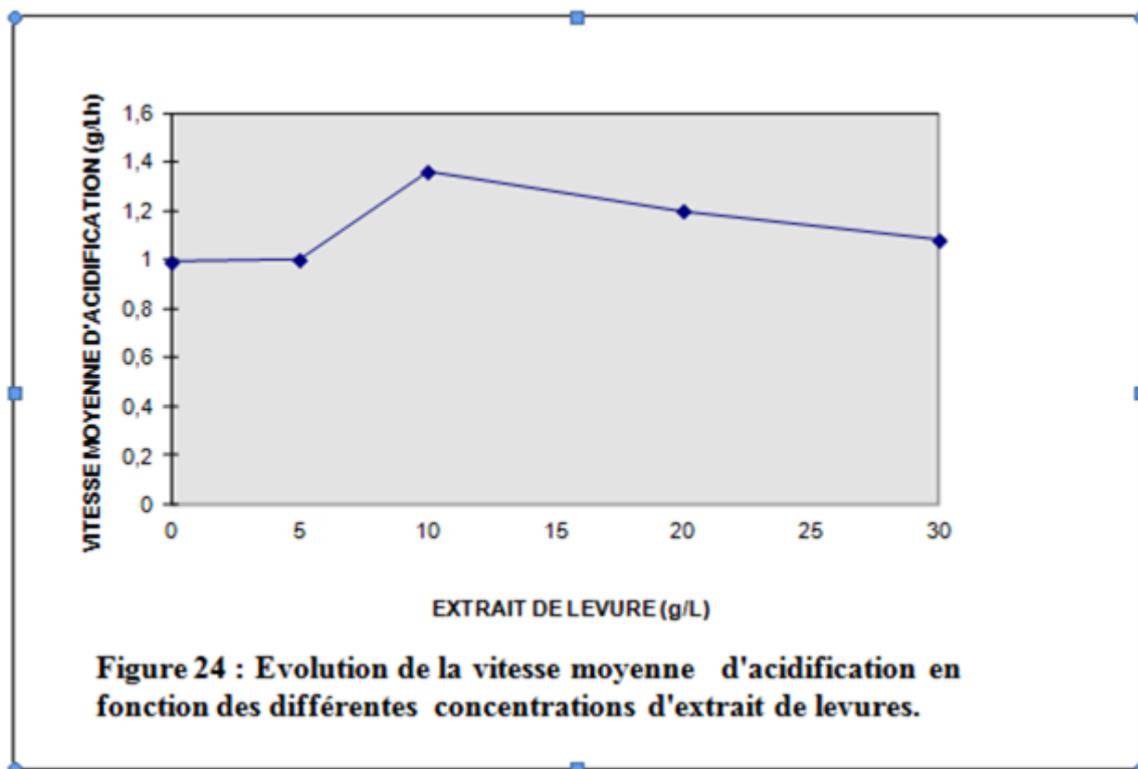
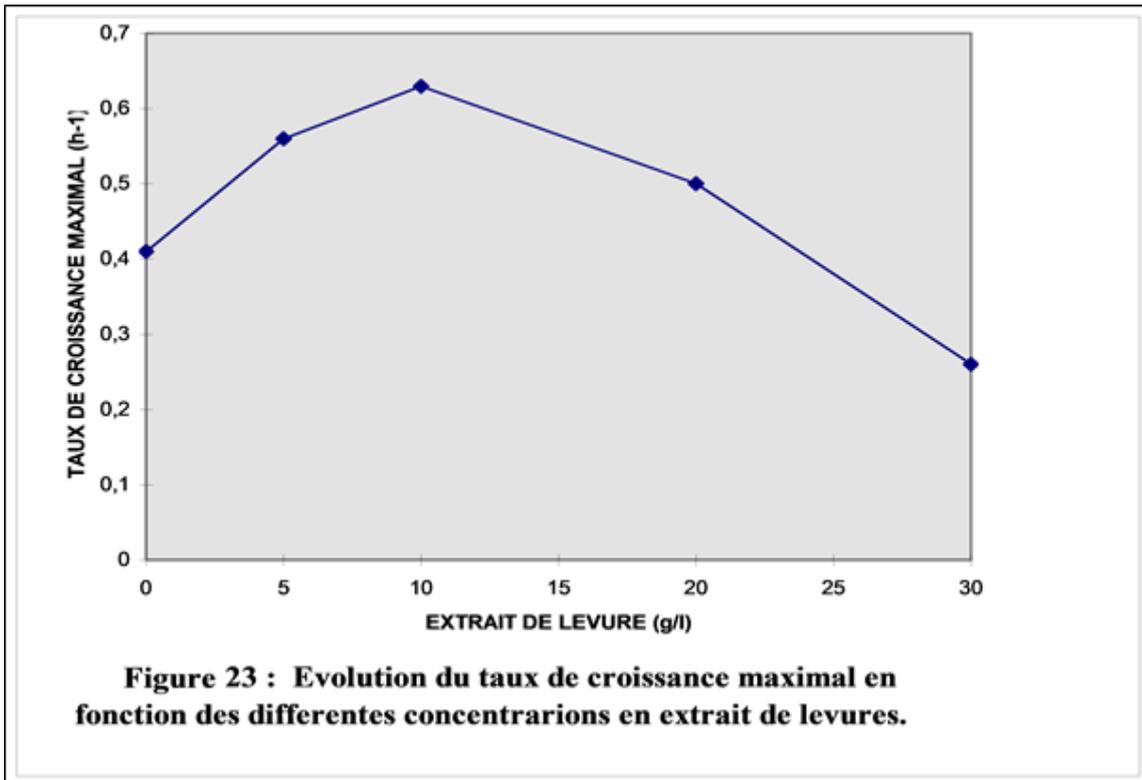
De manière générale, l'adjonction de l'extrait de levures à notre milieu est jugée avoir un effet positif, elle modifie de manière très remarquable la croissance bactérienne ainsi que l'acidification du milieu. Cette activation a été attribuée à la présence d'acides aminés libres, de peptides, de purines et de pyrimidines et de composés inorganiques (LAWRENCE et al.,(1984) et ZHANG et al.,(2007))

AMRANE et PRIGENT (1997, 1998) et GOKSUNGUR et GUVENC (1997), ayant travaillé sur *L. helveticus* et *L. delbruekii* , BENAÏSSA et al. , (2017) ayant travaillé sur *L.plantarum* et *L. casei* et BOUDJEMA, (2008) ayant travaillé *S. thermophilus S13* sur lactosérum déprotéiné ont jugé que la concentration de 10 g/L était la concentration optimale pour la croissance bactérienne ainsi que pour la production d'acide lactique.

D'autre part, nous avons constaté que l'augmentation de l'extrait de levures dans le lactosérum n'affecte pas de la même manière la croissance bactérienne et la production d'acide lactique. Il apparaît clairement que l'augmentation à un certain seuil devient toxique. A 20 g/L et à 30 g/L d'extrait de levures, les taux de croissance maximaux ($0,50 \text{ h}^{-1}$, $0,26 \text{ h}^{-1}$ respectivement) et les vitesses moyennes d'acidification ($1,2 \text{ g/L.h}$, $1,08 \text{ g/L.h}$ respectivement) sont inférieures à ceux de 10 g/L ($0,63 \text{ h}^{-1}$, $1,36 \text{ g/L.h}$).





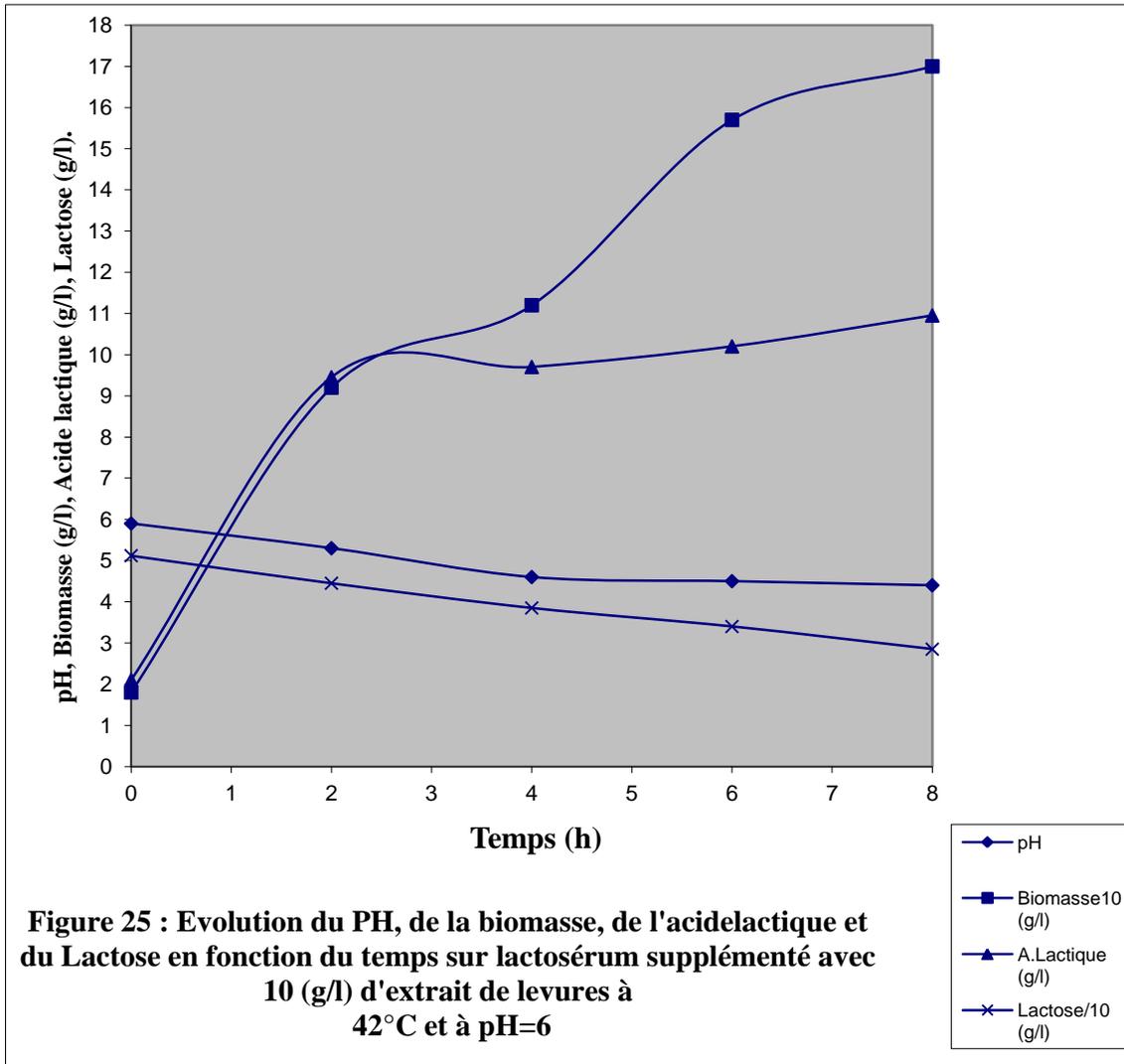


En effet, les résultats obtenus par AESCHLIMAN et VONSTOCKAR (1990), AMRANE et PRIGENT (1997, 1998, 1999, 2000) et BOUGUETTOUCHA et al.,(2007) conduisent à une conclusion identique, ces auteurs ayant travaillé sur *L.helveticus* cultivé sur permeat de lactosérum supplémenté par de l'extrait de levures. Lors de l'optimisation de la concentration en extrait de levures. Ils ont montré que pour une valeur supérieure à 20 g/L, les performances n'augmentent plus, mais au contraire diminuent.

En plus, GHALY et al.,(2003), BOUDJEMA, (2008) ont signalé qu'à des concentrations élevées en extrait de levures, la concentration cellulaire diminue sous l'effet de forte toxicité .

Ce comportement a été expliqué par un manque de la source carbonée, où la phase de croissance est liée à la phase de production d'acide lactique, dans cette courte phase (phase de biosynthèse), nécessite un grand flux d'énergie contrairement à ce qui se passe pour la phase stationnaire, une toute petite quantité d'énergie qui a été consommée, va servir uniquement pour la maintenance des cellules (AMRANE et PRIGENT, 2001).

La figure 25 regroupe l'évolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique produit et du lactose consommé sur lactosérum à une concentration d'extrait de levure de 10 g/L, un pH=6 et à une température d'incubation de 42°C. Nous avons noté une amélioration d'acidification du milieu par rapport aux autres concentrations d'extrait de levures, le pH varie de 6 à 4,40, une croissance bactérienne varie de 0,18 à 1,70 g/L avec une production d'acide lactique varie de 2.1g/L à 10,95 g/L et une consommation de lactose qui varie de 51,2 à 28,5 g/L pendant les 8 heures de fermentation.



2-2-2-Détermination de la concentration optimale en lactose:

Pour déterminer la concentration optimale en lactose, des concentrations qui varient de 0 à 50 g/L ont été testées.

Les figures 26, 27, 28 et 29 représentent l'évolution de la biomasse, du pH, de la production d'acide lactique et du lactose consommé après 8 heures d'incubation à une température de 42°C et un pH = 6.

De manière générale, l'addition de ce sucre a amélioré de façon importante la croissance ainsi que la production d'acide lactique pour notre souche CNRZ 302.

BENATEYA (1987) a signalé que cette souche présente une préférence vis à vis du milieu de culture qui contient du lactose comme seule source d'énergie.

D'après les résultats obtenus la concentration optimale en lactose pour la croissance et la production d'acide lactique est 20 g/L, où nous avons noté un taux de croissance maximal $\mu_m = 0,49 \text{ h}^{-1}$ avec une vitesse moyenne d'acidification $v_m = 1,17 \text{ g/L.h}$ (figures 30 et 31).

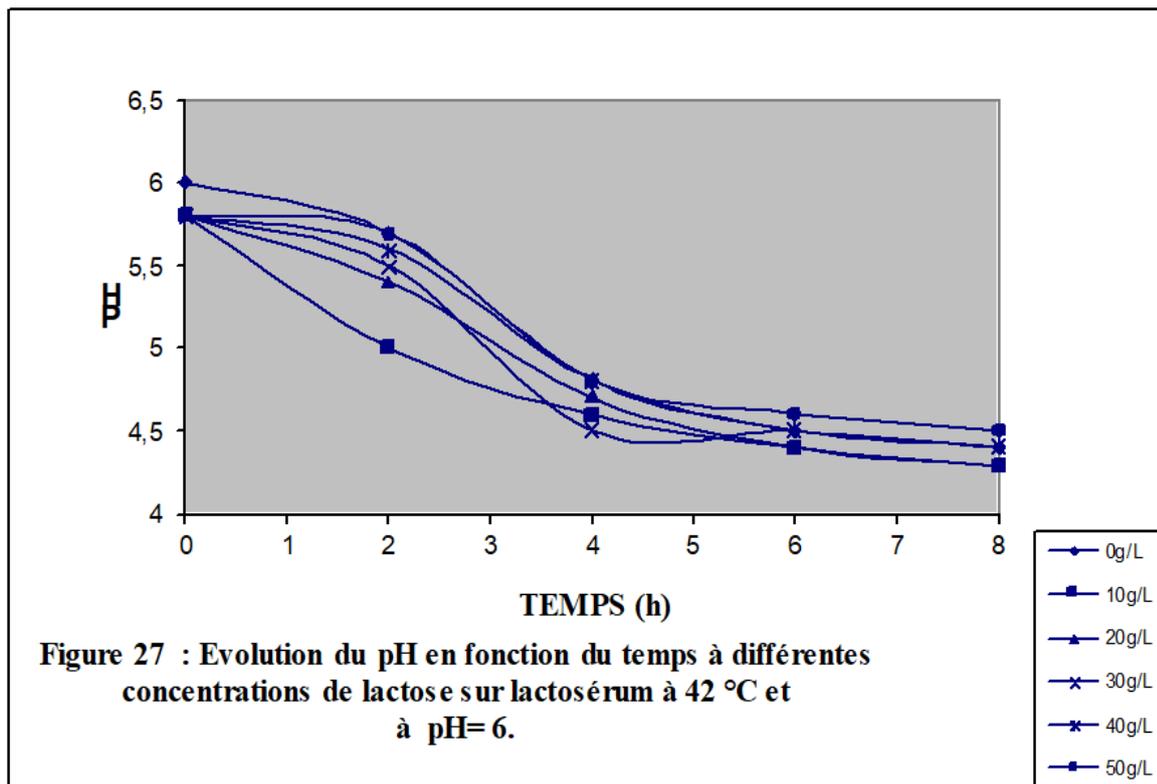
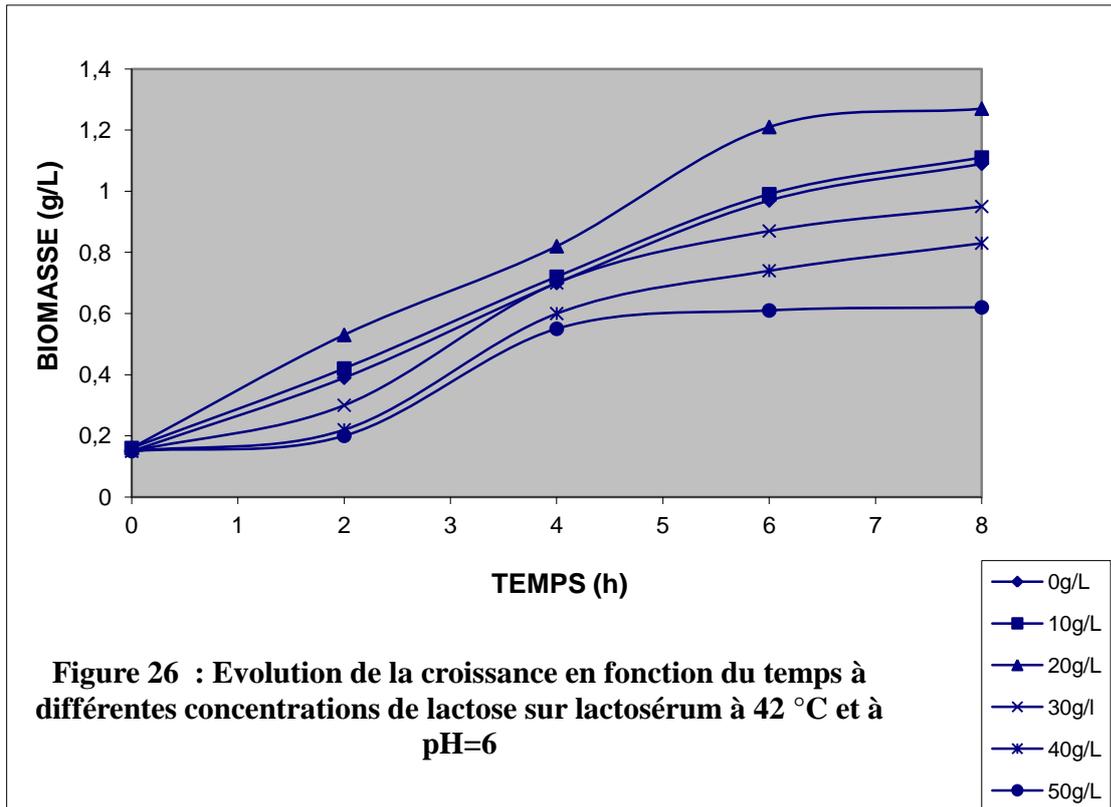
BOUDJEMA, (2008), ayant travaillé sur *S.thermophilus* S13 a préconisé la même concentration en lactose.

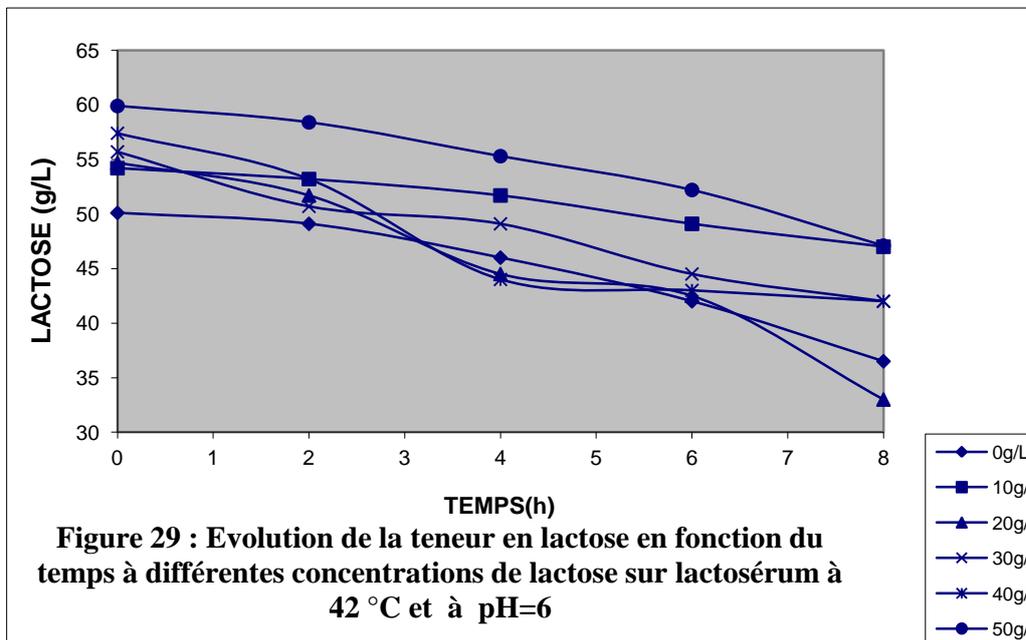
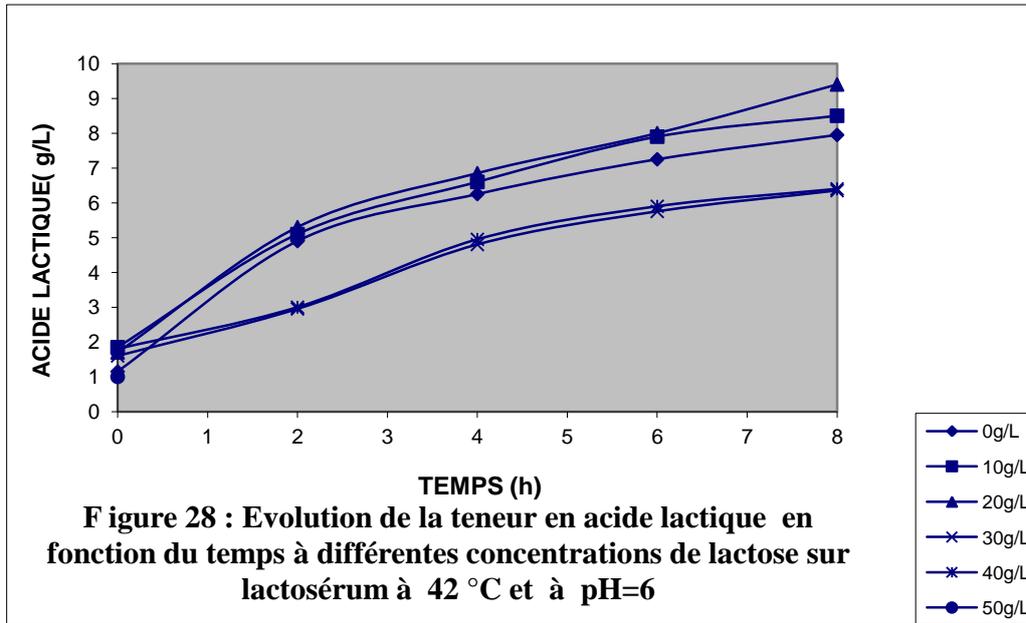
Vu le manque de littérature concernant la production d'acide lactique par *S.thermophilus* sur lactosérum enrichi en lactose, on essaiera de rapporter nos résultats à une autre souche de bactérie lactique thermophile qui est utilisée dans plusieurs travaux en culture mixte avec *S.thermophilus*. Les résultats de FU et MATHEWS, (1999) et d'AMBERGO et al.,(2003) qui ont travaillé sur *L. plantarum* et *L.bulgaricus* respectivement ont trouvé la concentration de 20g/l comme concentration optimale pour la croissance et pour la production d'acide lactique.

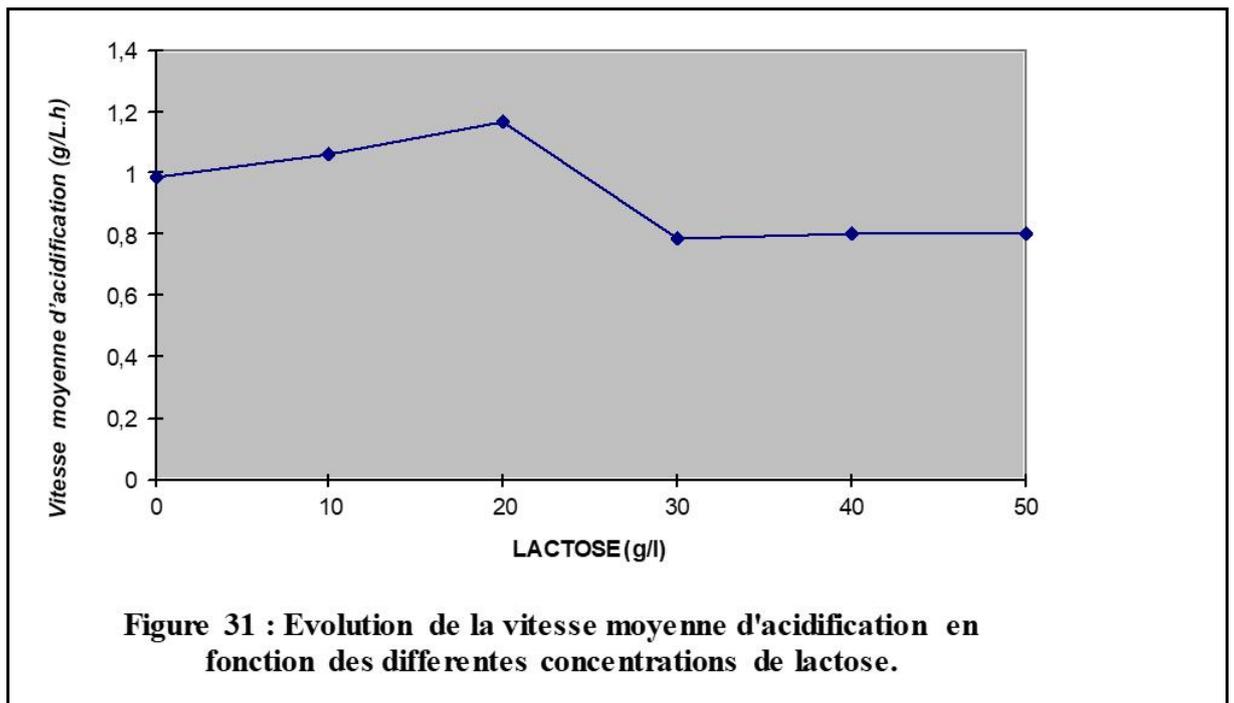
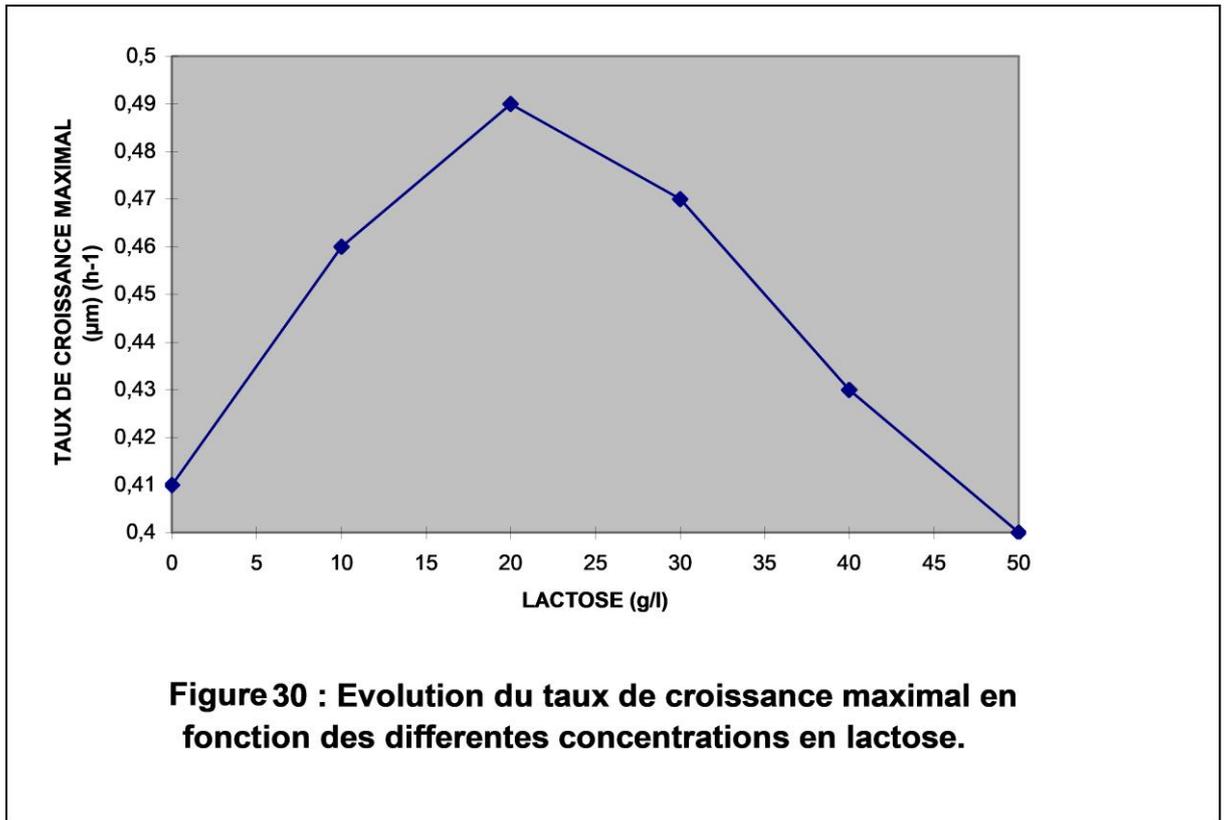
Au-delà de cette concentration, nous avons assisté à une chute de la croissance et de la production d'acide lactique comme nous avons constaté aussi qu'à une concentration de 50 (g/l) la croissance et la production d'acide sont inférieures a celle du témoin (0 g/l) ou $\mu_m = 0,40 \text{ h}^{-1}$ avec $v_m = 0,8 \text{ g/l.h}$ et $\mu_m = 0,41 \text{ h}^{-1}$ et $v_m = 0,99 \text{ g/L.h}$ respectivement.

De manière générale, le ralentissement de croissance et production lactique observé à des concentrations supérieures à 20g/L est du à l'inhibition par l'excès de substrat (lactose) (YUN et al. 2003)

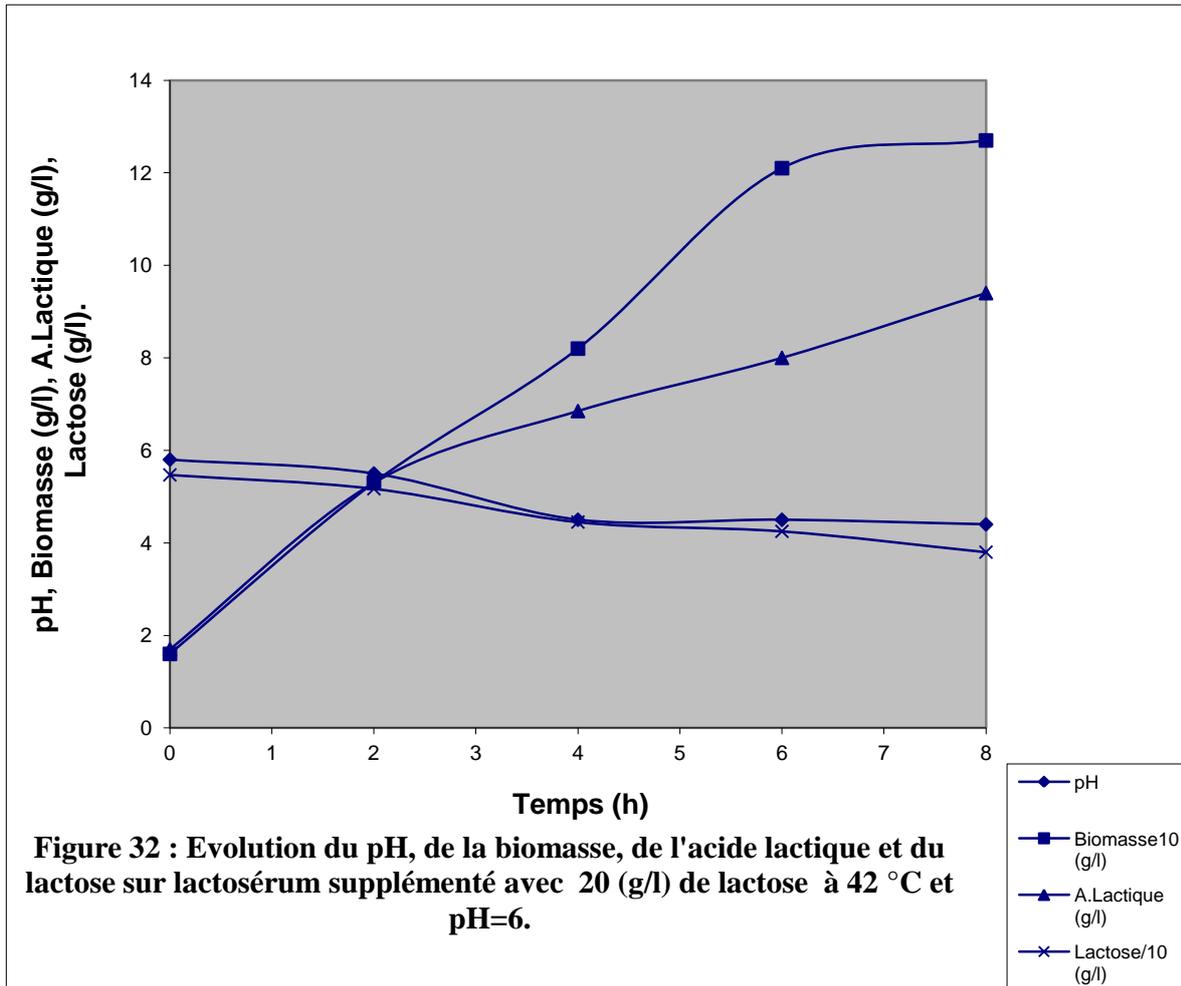
Cette décroissance peut être attribuer à la pression osmotique sous l'effet de fortes concentrations en glucides (BENATEYA, 1987). En plus, les travaux de LARSEN et ANON (1989,1990) ont montré ce ralentissement de croissance et de production et de production d'acide lactique est du à la pression osmotique et la diminution de l'activité de l'eau (A_w). Cette diminution d' A_w résulte du fort pouvoir hygroscopique du lactose (CARRARA et RUBIOLO, 1994)







La figure 32, regroupe évolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique produit et du lactose consommé, de la concentration de 20 g/L après 8 heures d'incubation à une température de 42°C et un pH égal à 6 où le pH varie de 5,87 à 4,35, la croissance varie de 0,16 à 1.27 g/L avec une production d'acide qui varie de 1,7 à 9,4 g/L et une consommation du lactose qui varie de 54,7 g/L à 38 g/L.



3- Production d'acide lactique dans les conditions optimales

L'étude de l'optimisation des paramètres de fermentation c'est à dire des conditions physico-chimiques (pH et température) et l'adjonction de la source azotée et carbonée au milieu de fermentation en discontinu (en batch) à pH libre nous a permis d'obtenir les résultats suivants:

La fermentation a donné son maximum en croissance et en production à une température de 42°C, un pH = 6,36, une concentration en extrait de levures de 10 g /L et une concentration en lactose de 20 g/L.

Après avoir obtenu ces résultats, il nous a semblé nécessaire de regrouper toutes ces conditions en une seule fermentation, afin de voir comment ces paramètres interagissent et quels sont leurs effets sur la fermentation en même temps.

La figure 33 illustre l'évolution du pH, de la biomasse, de l'acide lactique produit et du lactose consommé. Ces courbes vont nous permettre de suivre le progrès réalisé lors de l'optimisation.

Il est à noter que le pH après les quatre premières heures de fermentation varie de 6,36 à 4,4, la croissance varie de 0,45 à 1,65 g/L, la production d'acide varie de 2,95 à 9,3 g /L et la consommation du lactose varie de 55,8 à 37,5 g/L et après 8 heures de fermentation, le pH atteint 4,1, la croissance atteint 2,45 g /L, la production d'acide lactique est de 15,95 g/L et la consommation du lactose est de 21 g/L.

D'après ces résultats, il apparaît qu'il y a eu une nette amélioration de la croissance ainsi que la production où le taux de croissance maximal (μ_m) atteint 0,81(h⁻¹) (figure 34) et la vitesse moyenne de production v_m atteint 2,07(g/L.h) (figure 35).

Notre souche a été fortement stimulée dans ces conditions de fermentation en comparaison avec les résultats obtenus par BOUDJEMA (2008) ayant travaillé sur la souche S13 avec une production d'acide lactique de 13,13g /L avec une consommation de lactose résiduelle de 35g /L.

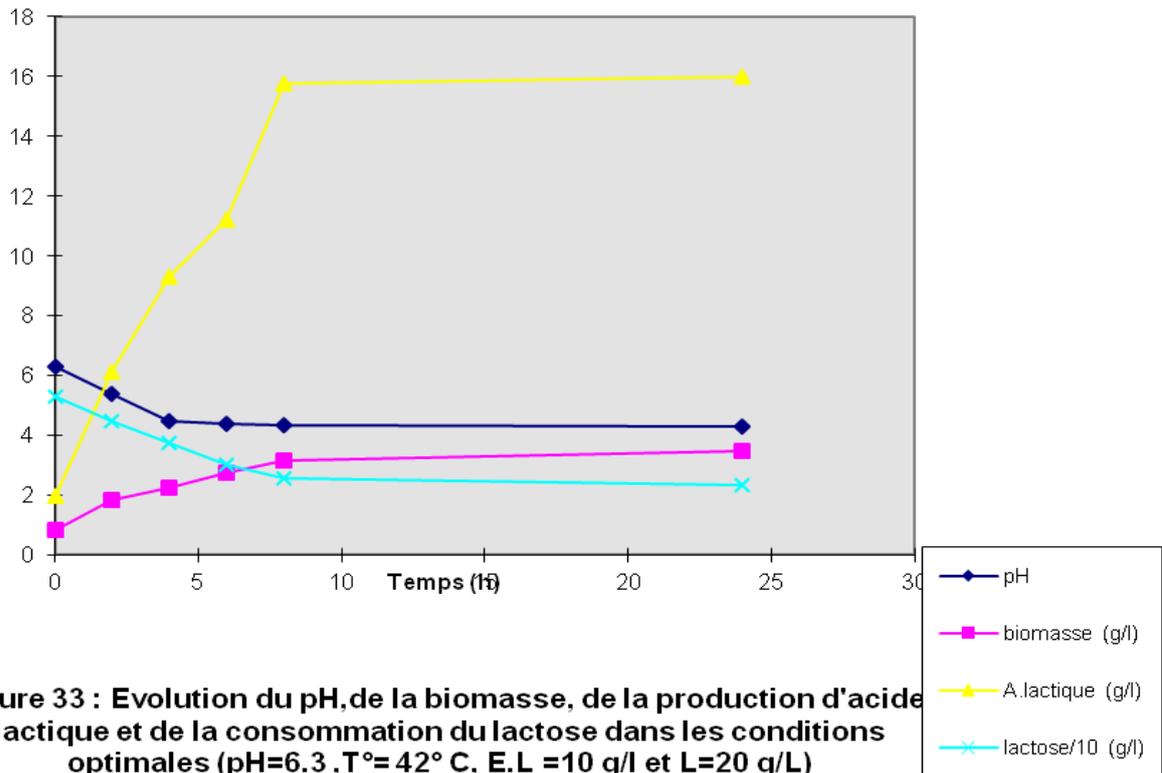
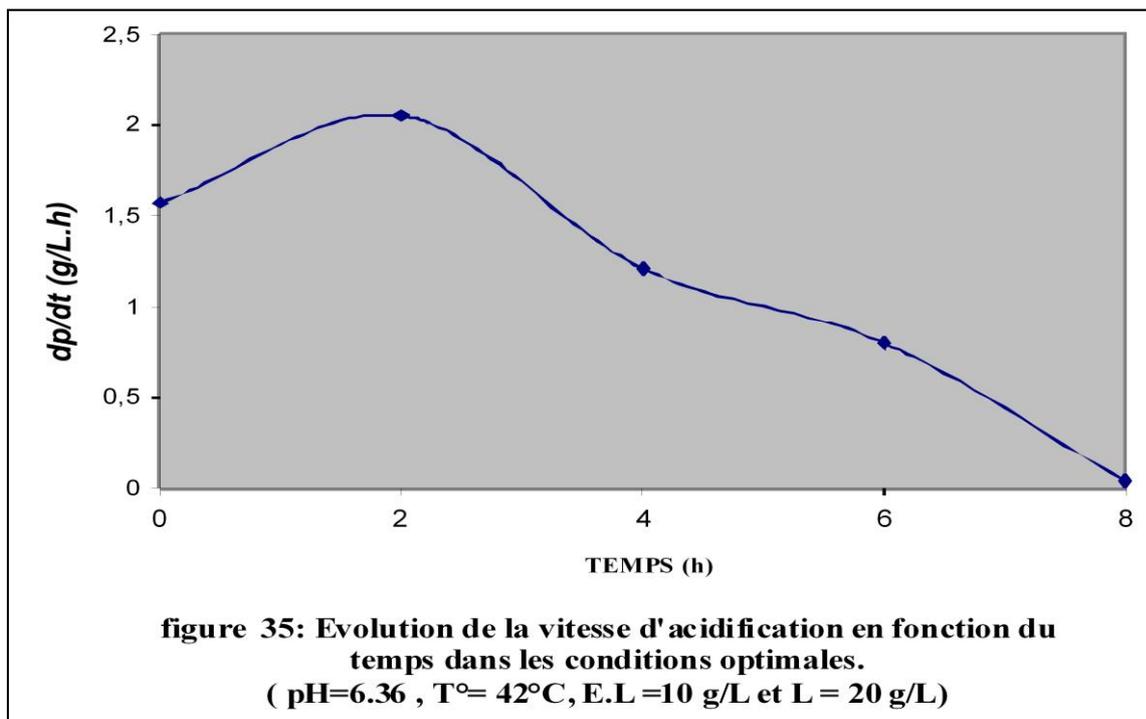
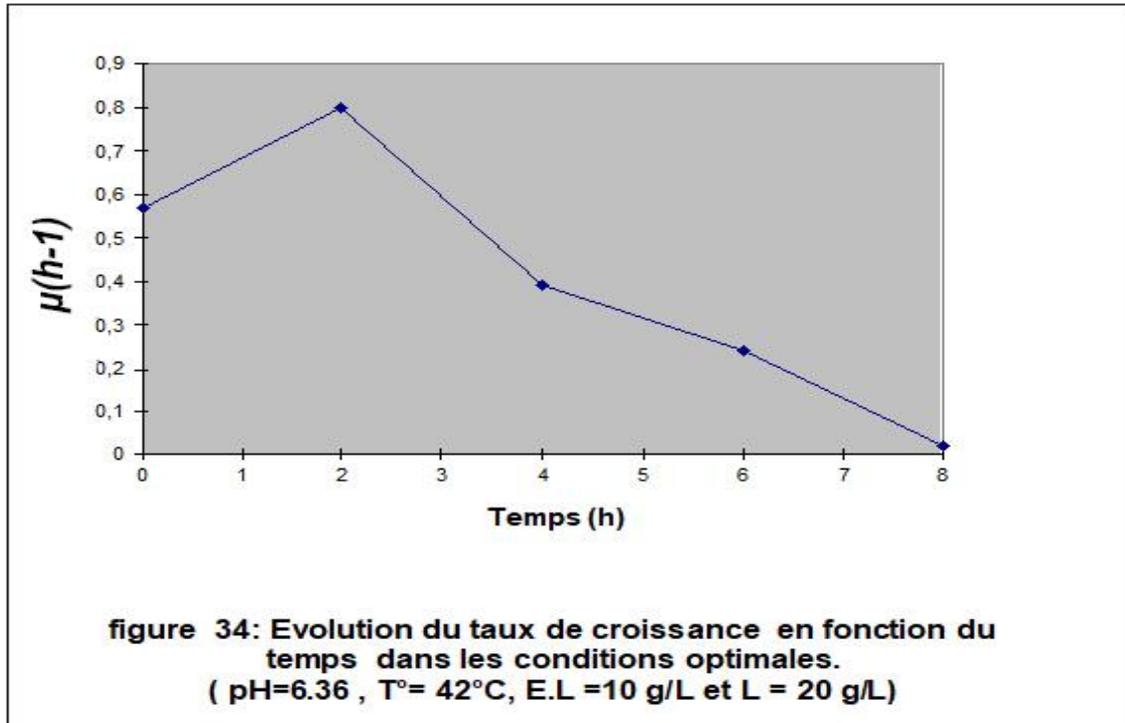


Figure 33 : Evolution du pH, de la biomasse, de la production d'acide lactique et de la consommation du lactose dans les conditions optimales (pH=6.3, T°= 42° C, E.L =10 g/l et L=20 g/L)



En revanche, un découplage est observé entre la courbe de croissance et de celle de production, il est plus ou moins prononcé selon la phase de culture.

En effet, généralement la production d'acide est couplée à la croissance pendant la première phase de croissance, puis se poursuit alors que la croissance s'arrête, ce qui traduit le découplage (BEAL et al., 1991)

Selon JUILIARDS et al., (1987), la principale modification des conditions physico-chimiques du milieu, responsable de phénomènes d'inhibition et très certainement le gradient de protons dû à la production d'acide lactique.

KONINGS et OTTO (1983) et OTTO et al., (1983) ont analysé les conséquences des variations de milieu sur la contribution de l'efflux de lactate à l'énergie métabolique de *S.cremoris* en culture discontinue, par l'étude de la force proton-motrice et du gradient de lactate au cours de la croissance. Le rapport gradient de lactate et la force proton motrice diminue pendant la croissance de la souche. Cette diminution du rapport indique une baisse de la stœchiométrie H^+ / lactate et donc une diminution de la contribution de l'efflux de lactate à l'énergie métabolique.

Ces mêmes auteurs ont montré, que lorsque le pH du milieu diminue, l'organisme en croissance maintient son pH interne à une valeur constante de 6,6. Ce qui explique donc la formation d'un gradient de pH.

Or, à la fin de la phase exponentielle de croissance, le pH ne peut plus être maintenu constant, vraisemblablement par manque d'ATP. Il chute brutalement, le gradient de pH disparaît, les activités enzymatiques diminuent. Dans ces conditions, la forte acidité du milieu de culture influe sur l'activité, entre autre, des enzymes protéolytiques.

ACCOLAS et al., (1980) signalent que l'activité de l'héxokinase, d'une souche de *S.thermophilus* par les bas pH, à la différence d'autres enzymes de la glycolyse. Cette diminution d'activité pourrait freiner la poursuite de la glycolyse et en définitive, affecter la croissance de la souche.

Par ailleurs, AMRANE et PRIGENT, (1999, 2001) ont pu déterminer l'effet du pH et de l'acide lactique sur la croissance et la production d'acide par *L. helveticus* cultivé sur lactosérum supplémenté par de l'extrait de levures et du lactose et ils ont pu avoir les différentes constatations :

-Au début de la croissance, l'acide lactique produite résulte du mécanisme de la croissance – production ou le pH était le principal facteur qui contrôle la croissance et la production ;

-Durant la phase de ralentissement, la croissance atteint son maximum et le taux de production diminue avec la diminution du pH ;

- A la fin de la phase de croissance, celle-ci n'était contrôlée uniquement par les concentrations en acide lactique accumulées dans le milieu et le pH n'a qu'un effet indirect.

Toutefois, AMRANE et PRIGENT, (2001) signalent que l'arrêt de la production coïncide toujours avec le manque de la source carbonée (le lactose) or, ce n'est pas le cas pour notre fermentation où nous avons constaté que presque la moitié du lactose n'a pas été consommé et nous avons noté un rendement de conversion du lactose en acide lactique

$Y_{p/S} = 0,47$ avec un rendement métabolique du lactose en biomasse faible

$Y_{x/s} = 0,07$ (voir tableau X).

Il a été établi que le galactose est responsable d'une inhibition de croissance de souches de *S. thermophilus* (SOMKUTI et STEINBERG, 1979)

Ces travaux sont confirmés par LAVANDER et RADSTROM(2001) qui ont montré que les souches de *S.thermophilus* sont considérées galactose(-) et elles ne peuvent fermenter le galactose malgré qu'elles possèdent le gène nécessaire pour le catabolisme du galactose.

L'étude de l'hydrolyse de l'ortho-nitrophenyl β -galactoside (ONPG), en tampon phosphate de potassium, a permis à GREENBERG et MAHONEY (1982) de montrer que le galactose est un inhibiteur compétitif de la β -galactosidase de *S.thermophilus* de paramètre cinétique $K_i = 60$ mM. Compte tenu du fait que peu de galactose est consommé par *S. thermophilus* à pH constant, cela peut être une explication de l'inhibition de ces bactéries en fin de croissance.

4- Modélisation de la cinétique de croissance et de production

Les courbes de croissance et de production présentent un grand intérêt, car elles permettent de suivre les progrès réalisés lors de l'optimisation des conditions de fermentation (physico-chimique et milieu nutritif).

En effet, ces courbes peuvent indiquer qu'un mode de culture est meilleur ou moins bon qu'un autre mais en absence d'informations chiffrées, il est difficile d'expliquer les raisons et surtout de progresser plus avant dans l'optimisation. C'est pour cela qu'il est important de trouver un modèle qui décrive convenablement le processus et qui permette de traduire par des chiffres les différences observées entre les différentes conditions de fermentation.

Le suivi de la croissance et de la production dans les conditions optimales de la souche étudiée *S.thermophilus* CNRZ 302, a rendu possible la modélisation mathématique grâce au logiciel « TBLCURVE » qui utilise la méthode des moindres carrés, présente 10.000 modèles mathématiques différents pouvant représenter un phénomène biologique donné, avec les coefficients de régression accompagnant chaque modèle et rendant compte de la qualité de représentation du processus étudié.

4-1- Cinétique de croissance

L'examen de la figure 36 montre que l'équation (*) décrit bien la cinétique de croissance jusqu'à la phase stationnaire, il serait intéressant d'avoir un modèle qui rend compte de cette phase car la production s'arrête en fin de cette phase. Pour ce faire, nous avons pris comme modèle :

$$Y = (a + cX + e X^2) / (1 + bX + dX^2) \quad (*)$$

C'est un modèle descriptif (ou purement mathématique) permet d'exprimer les variables de croissance ou d'acidification par des équations dépendant du temps et comportent un nombre variable de paramètres n'ayant pas une signification biologique (BEAL et al., BOUDRANT et al., 1999)

Avec un coefficient de régression le plus élevé $r^2 = 0.9984$;

Où la variable X représente le temps et a, b, c, d et e ce sont des paramètres tels que :

$$a = 0,4459 \quad b = 0,0260 \quad c = 0,1637 \quad d = 0,0312 \quad \text{et} \quad e = 0,0706$$

La croissance bactérienne peut prendre la forme suivante :

$$X = (0,44 + 0,16 t + 0,07 t^2) / (1 + 0,02t + 0,03t^2)$$

4-2- Cinétique de production d'acide lactique

Concernant la cinétique de production semble aussi bien être représentée par la même équation (*), où elle prend la même allure de la croissance et elle obéit au même modèle (figure 37) avec un coefficient de régression au carré le plus élevé $r^2 = 0,9997$ et les paramètres prennent comme valeurs :

$$a = 2,9367 \quad b = 0,0029 \quad c = 1,9039 \quad d = 0,0195 \quad \text{et} \quad e = 0,2581$$

D'où la production d'acide lactique peut s'écrire de la forme suivante :

$$P = (2,93 + 1,90 t + 0,25 t^2) / (1 + 0,002 t + 0,01 t^2)$$

4-3- Relation entre la cinétique de croissance et la cinétique de production d'acide lactique

La figure 38 représente la vitesse spécifique de production (q_p) en fonction de la vitesse spécifique de croissance (μ), elle suit le même modèle proposé par LUEDEKING et PIRET, (1959) qui prend la forme

$$y = a + bx$$

$$\text{Avec } r^2 = 0,9814$$

$$a = 0,0395$$

$$b = 1,0357$$

Où y : est la vitesse de production spécifique q_p

x : est la vitesse de croissance spécifique μ

a et b représentent les coefficients l'un lié au maintien (β) et l'autre lié à la croissance (α) respectivement.

La vitesse de production spécifique peut s'écrire de la forme suivante :

$$q_p = 1,03 \mu + 0,03$$

De cette équation, on peut déduire que la production d'acide lactique à pH libre est presque totalement liée à la croissance.

En revanche, l'accumulation de l'acide lactique, du fait de son action inhibitrice, conditionne directement les caractéristiques cinétiques de la fermentation. *S.thermophilus* étant homofermentaire, l'acide lactique est le principal produit de la fermentation et peut atteindre des concentrations proches de 30 g/L en fin de culture, en batch, à pH régulé (BEAL et al, 1989).

Il est à noter qu'à pH non régulé, on constate que l'inhibition de la croissance due au lactate accumulé s'ajoute aussi l'effet inhibiteur du au pH final qui est très éloigné du pH optimal et ceci est bien confirmé par le paramètre α (β) qui est très petit, ou lorsque μ tend vers 0 ; q_p aussi tend vers 0.

Le tableau X récapitule les différents paramètres dans les conditions optimales de fermentation.

Tableau X : les différents paramètres dans les conditions optimales de fermentation.

X_m (g/l)	P_m (g/l)	μ_m (h ⁻¹)	V_m (g/l.h)	q_p (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	α	β
2,45	15,95	0,81	2,05	0,83	0,07	0,47	1,0357	0,0395

D'après ce tableau, on peut constater que la croissance bactérienne a donné son maximum après les 8 heures de fermentation $X_m = 2,45$ g /L avec un rendement de conversion du substrat en biomasse ($Y_{x/s}$) de 7 % et la production d'acide lactique maximal (P_m) est de 15,95 g/L avec un rendement de conversion du substrat en produit de 47%.

On voit, en effet que le temps mis pour atteindre la phase de maintien n'est pas très significatif. Ce qui nous semble le plus important, c'est le maximum atteint par μ_m et le fait que ce maximum correspond à la cinétique de production la plus significative.

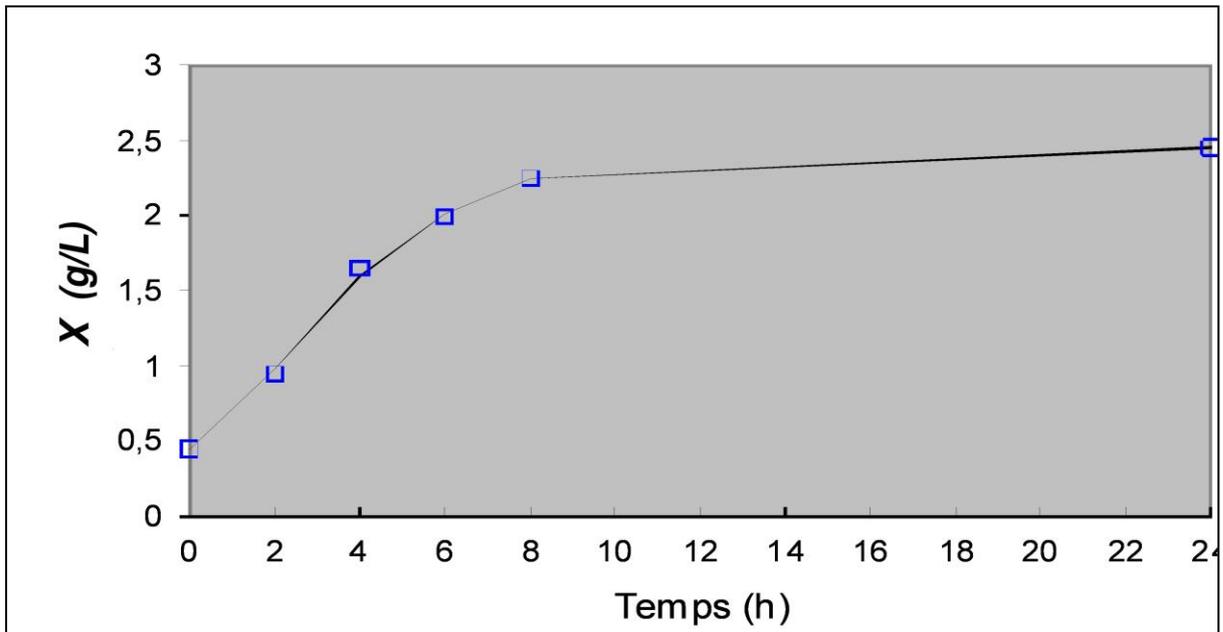


Figure 36 : Ajustement des points expérimentaux de la cinétique de croissance en fonction du temps. □ X expé. - X calc.

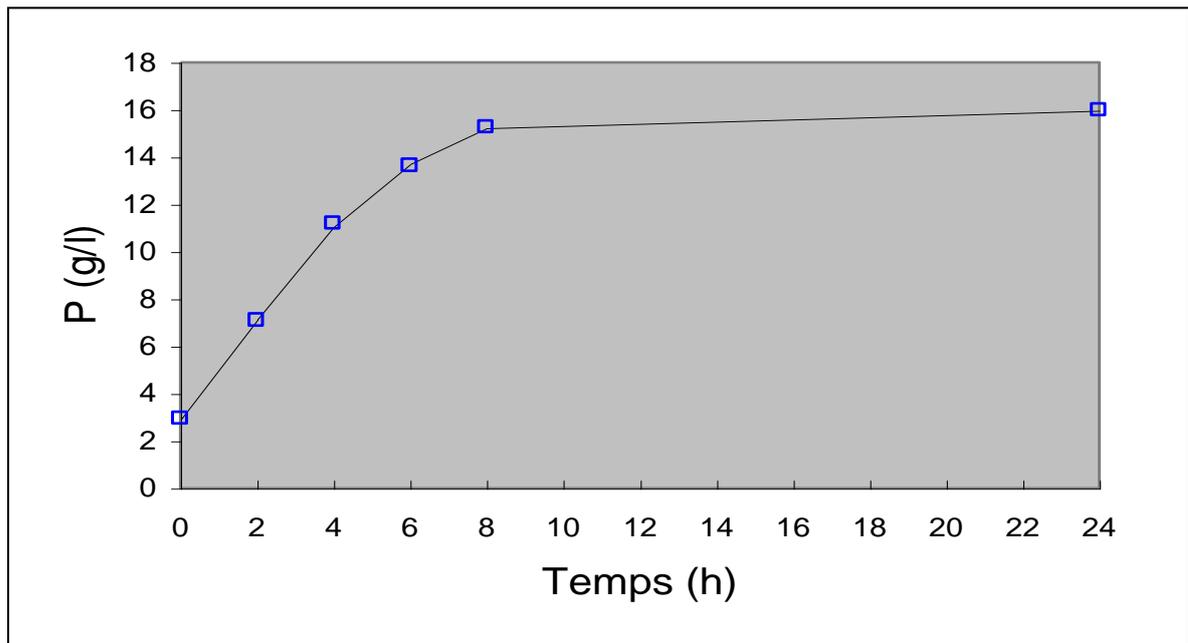


Figure 37 : Ajustement des points expérimentaux de la production d'acide lactique en fonction du temps. □ P expé. - P calc.

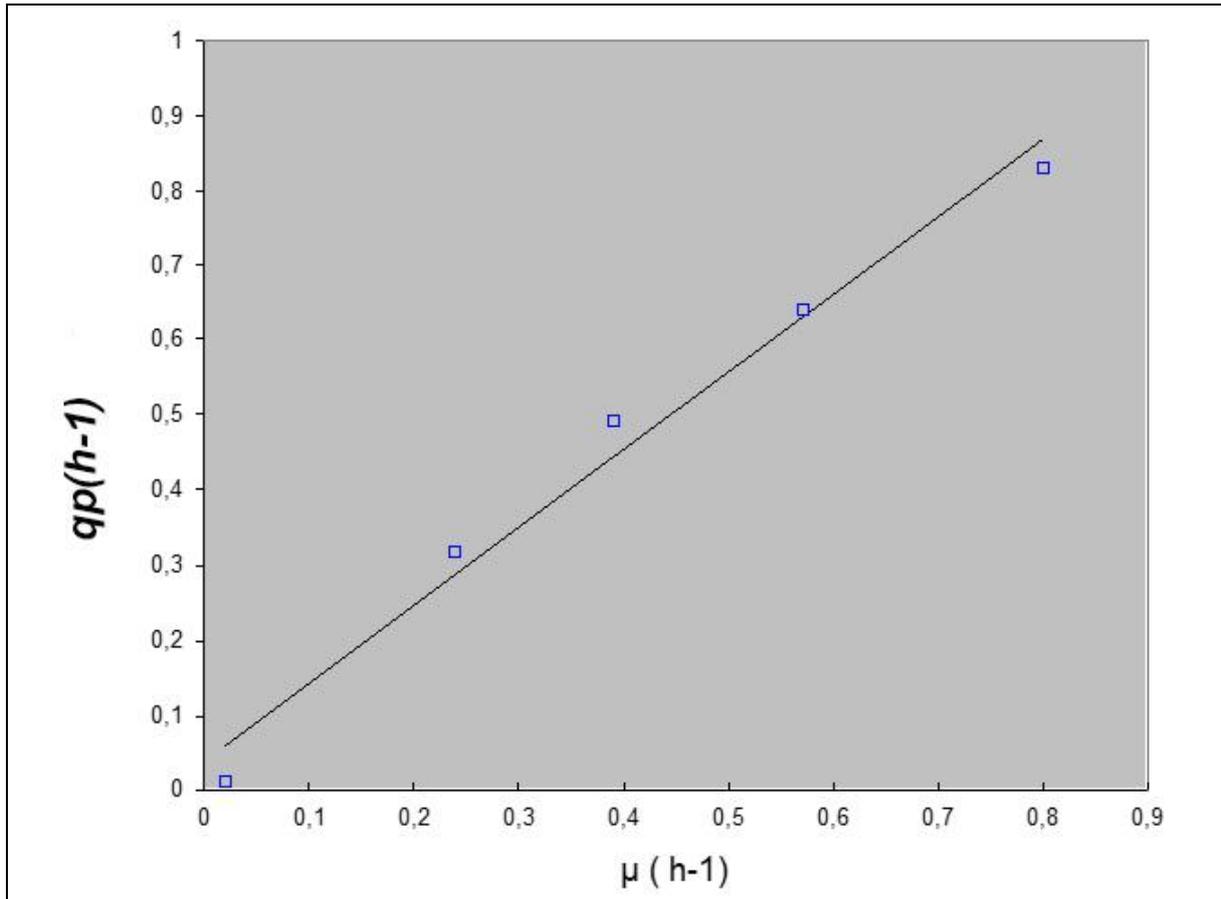


Figure 38 : Ajustement des points expérimentaux de la vitesse spécifique de production en fonction de la vitesse spécifique de croissance. \square q_p expé. - q_p calc.

Conclusion

Les résultats exposés dans cette étude ont permis d'éclaircir un certain nombre de points qui nous paraissent importants.

L'optimisation des paramètres de fermentation en culture pure de notre souche *S.thermophilus* CNRZ302, en batch, à pH libre sur lactosérum supplémenté de 10 g/L d'extrait de levure, 20 g/L de lactose, à un pH initial ajusté à 6,36 et une température d'incubation de 42°C, a nettement amélioré la croissance et la production d'acide lactique (15,75 g/l). Cette espèce est connue peu productrice d'acide en culture pure.

Sur le plan théorique, nous avons élaboré et validé un modèle en deux parties :

- La première décrit la croissance et la production, en fonction du temps, l'ajustement de cette loi à nos points expérimentaux est satisfaisant et ce, depuis l'inoculation jusqu'à la phase de maintien, qui correspond précisément à l'arrêt de la production ; donc toute la zone industrielle est bien décrite.

- La seconde partie de notre modèle décrit la production par le biais d'une relation entre la productivité spécifique q_p des cellules et leur vitesse spécifique de croissance μ . Ce modèle a permis d'améliorer nettement, par rapport à loi linéaire de LUEDEKING et PIRET (1959 a et b), la description de la production s'ajuste beaucoup mieux aux points expérimentaux.

En bref, notre modèle rend compte de la cinétique de production du début à la fin de la fermentation ; il est très utile dans l'évaluation fine des performances de production d'un couple cellule/milieu. La productivité volumique moyenne est un critère global de performance, alors que les paramètres μ_m , α , β tirés des ajustements permettent de chiffrer leur origine.

Signalons enfin que l'élaboration de ce modèle n'a été rendue possible que par l'implantation d'un outil informatique, qui facilite considérablement le traitement des données, la simulation, etc....

Le présent travail, peut être un élément d'un procédé intégré de valorisation du lactosérum pour que les bases de ce procédé soient complètement posées, il faudra encore étudier l'hydrolyse du lactosérum par une protéase, afin de mieux tirer profit des protéines du sérum et les rendre plus assimilables par les cellules et d'éviter la supplémentation par l'extrait de levures commercial, qui donne de bons résultats, mais reste coûteux.

L'expérimentation se heurte aussi à des difficultés analytiques et au manque de matériels performants, dans ce domaine. La mise en œuvre de méthodes plus performantes, devrait ouvrir des perspectives nouvelles.

Le procédé discontinu (en batch) classique de fermentation présente certains inconvénients tels que l'inhibition par le substrat et le produit final. Pour éviter ces problèmes plusieurs études ont été axées sur l'amélioration de la production d'acide lactique à travers différentes stratégies d'alimentation en utilisant du lactosérum, un résidu de l'agroalimentaire, par fermentation en continue et à pH régulé et plusieurs méthodes d'extraction de l'acide lactique tel que l'utilisation de membrane céramique (WANG et al.,2013) ou bien une résine échangeuse d'anions faibles ,au cours du processus de purification , l'utilisation de charbon actif (MARELEA et al. ,2016), des méthodes rentables de production de haute pureté.

Malgré toutes ces carences, on peut d'ores et déjà tirer profit des résultats acquis pour améliorer la qualité et la rentabilité de la production d'acide lactique par voie microbienne.

Annexe

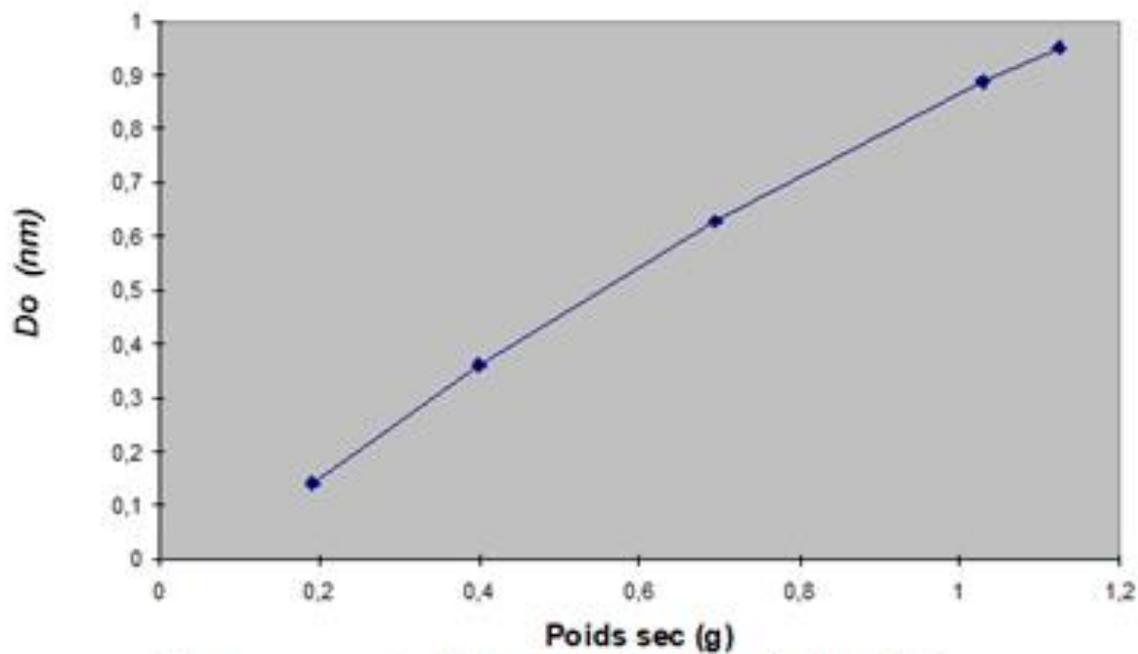


Figure a : courbe étalon pour la détermination de la biomasse.

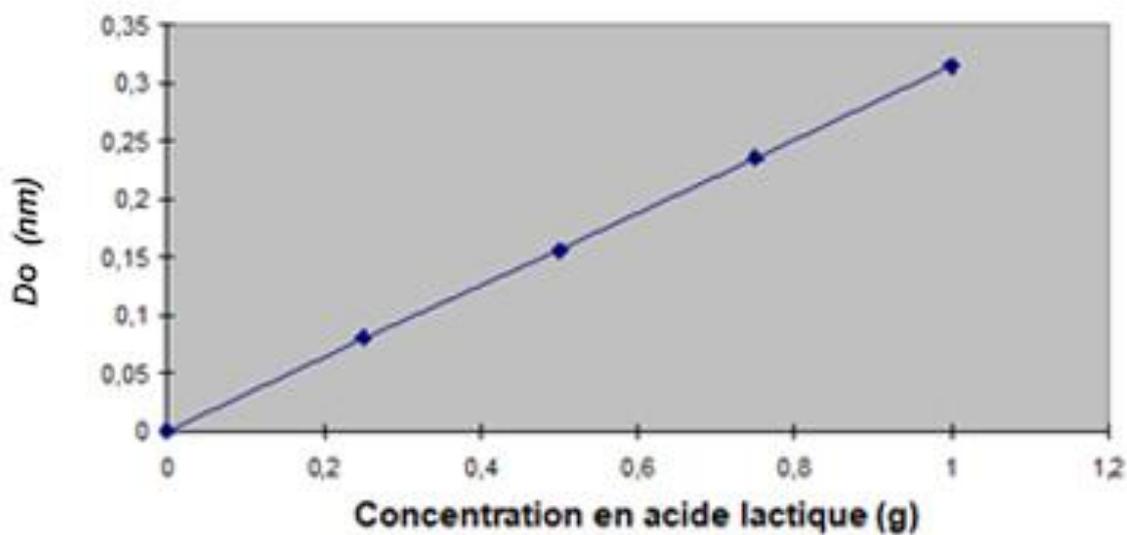


Figure b : courbe étalon pour le dosage de l'acide lactique

Tableau A : Dosage du lactose (Technique de G.BERTRAND)

Le tableau ci-après, donne directement la quantité du lactose hydraté, exprimé en milligrammes, en fonction du volume de la solution 0,1N de permanganate de potassium.

Volume de KMnO_4 0,1 N (ml)	Lactose hydraté (mg)	Volume de KMnO_4 0,1 N (ml)	Lactose hydraté (mg)	Volume de KMnO_4 0,1 N (ml)	Lactose hydraté (mg)	Volume de KMnO_4 0,1 N (ml)	Lactose hydraté (mg)	Volume de KMnO_4 0,1 N (ml)	Lactose hydraté (mg)
3,2	14,9	6,7	32,0	9,3	45,0	11,9	58,4	14,5	72,0
3,4	15,8	6,8	32,5	9,4	45,5	12,0	58,9	14,6	72,6
3,6	16,9	6,9	33,0	9,5	46,0	12,1	59,9	14,7	73,1
3,8	17,8	7,0	33,5	9,6	46,5	12,2	60,0	14,8	73,6
4,0	18,8	7,1	34,0	9,7	47,1	12,3	60,5	14,9	74,1
4,2	19,8	7,2	34,5	9,8	47,6	12,4	61,0	15,0	74,7
4,4	20,7	7,3	35,0	9,9	48,1	12,5	61,5		
4,6	21,7	7,4	35,5	10,0	48,6	12,6	62,1		
4,8	22,7	7,5	36,0	10,1	49,1	12,7	62,6		
5,0	23,6	7,6	36,5	10,2	49,6	12,8	63,1		
5,1	24,1	7,7	37,0	10,3	50,1	12,9	63,6		
5,2	24,6	7,8	37,5	10,4	50,6	13,0	64,1		
5,3	25,1	7,9	38,0	10,5	51,2	13,1	64,7		
5,4	25,6	8,0	38,5	10,6	51,7	13,2	65,2		
5,5	26,1	8,1	39,0	10,7	52,2	13,3	65,7		
5,6	26,6	8,2	39,5	10,8	52,7	13,4	66,2		
5,7	27,1	8,3	40,0	10,9	53,2	13,5	66,8		
5,8	27,6	8,4	40,5	11,0	53,7	13,6	67,3		
5,9	28,0	8,5	41,0	11,1	54,2	13,7	67,8		
6,0	28,5	8,6	41,5	11,2	54,7	13,8	68,4		
6,1	29,0	8,7	42,0	11,3	55,3	13,9	68,9		
6,2	29,5	8,8	42,5	11,4	55,8	14,0	69,4		
6,3	30,0	8,9	43,0	11,5	56,3	14,1	69,9		
6,4	30,3	9,0	43,5	11,6	56,8	14,2	70,5		
6,5	31,0	9,1	44,0	11,7	57,4	14,3	71,0		
6,6	31,5	9,2	44,5	11,8	57,9	14,4	71,5		

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ABORHEY S. et WILLIAMSON D. (1977)

Modeling of lactic acid production by *Streptococcus cremoris*. J. Gen. Appl. Microbiol., 23 : 7-21.

ACCOLAS J.P, BLOQUEL R., DIEDIENNE R., REGNIER J., 1977.

Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt. Lait: 67, 1-23.

ACCOLAS J. P., 1982.

Taxonomic features and identification of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Bulletin IDF/FIL. 145

AESCHLIMAN A. et VON STOCKAR U., 1990.

The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiolol. Biotechnol. , 32,398-402

AFNOR, 1986.

Contrôle microbiologique en agro-alimentaire, recueil de normalisation française.

ALAIS C., 1984.

Science du lait: Principe des techniques laitières. Ed. SEPAIC, Paris.

AMOROZO M.J., MANCA DE NADRA and OLIVER G., 1989.

The growth and sugar utilisation by *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yoghurt. Lait: 69, p.519-528.

AMOUZOU K.S., PREVOST H., DIVIES G. R., 1985.

Effect of magnesium supplementation of milk on lactic fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*. Lait, 65:21-34.

AMRANE A., 1991.

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. 152p.

AMRANE A. et PRIGENT Y., 1994 (a).

Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: model development and simulation. J.Chem.Tech.Biotechnol: 60, 241-246

AMRANE A. et PRIGENT Y., 1994 (b).

Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment. *Appl. Microbiol. biotechnol.*, 40: 644-649.

AMRANE A. et PRIGENT Y., 1997.

Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency. *J. biotechnol.* 55: 1-8

AMRANE A., PRIGENT Y., 1998.

Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. *Process Biochemistry* 34:1-10.

AMRANE A., PRIGENT Y., 1999.

Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14:529-534.

AMRANE A., PRIGENT Y., 2001.

Batch cultures supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme and Microbial. Technology* 28: 827-834.

ARENA S., D'AMBROSIO C., RENZONE G., RULLO R., LEDDA L., VITALE F., MAGLIONE G., VARCAMONTI M., FERRARA L., AND SCALONI A. 2006- A STUDY OF *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics* 6: 181-192.

AXELSSON L., 1993.

Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria*. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Dekker, New York, pp. 1-61.

BARATCHELL N., GIBSON A. M., TRUMAN M., KELLY T. M. et ROBERTS T.A., 1989. Modélisation et fermentation lactique. In: *les bactéries lactiques T2*. Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, p 491-5

BEAL C., LOUVET P. and CORRIEU G., 1989.

Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 148-154.

BEAL C., 1991.

Contribution au suivi et à la maîtrise de cultures mixtes de bactéries lactiques thermophiles. *Res. Eng.* , 5: 255-261.

BEAL C., 2015

La fermentation lactique : des fonctionnalités multiples pour les produits fermentés.
AgroParis Tech. P1-67

BEAL C., CORRIEU G., 1991.

Influence of pH, temperature and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 38, No 1, p90-98.

BEAL C., DESCHAMPS N., JUILLARD V., DE ROISSART H., RICHARD J., SARAUX B., 1994.

Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques.
In: les bactéries lactiques T1. Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, 604p.

BEAL C. et SODINI I, 2003

Fabrication des Yaourts et des laits fermentés .
Technique d'ingénieur , traité agroalimentaire ,F6315.

BELHOCINE D., 1987.

Etude de la valorisation du lactose par fermentation lactique.
Thèse de doctorat, Université de RENNES I, France.

BENATEYA A., 1987.

Métabolisme des glucides chez *Streptococcus thermophilus*. Etude des systèmes de permeation du lactose, glucose et galactose. Thèse de doctorat en microbiologie de l'université Nancy I. 121p.

BENAISSA M. ,ZADI-KARAM H. and KARAM N., 2017

Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*
African journal of biotechnology Vol.16(30), pp. 1630-1637, July 2017

BENSIAMEUR K., 1996.

Lyophilisation de *Streptococcus salivarius* sudsp *thermophilus*, détermination des conditions optimales. Thèse de magistère, I.N.A, El Harrach, 126p.

BERGEY, 1986.

Manuel de la systématique bactérienne.
Ed. R.E. BUCHANAN and N.E. GIBBON

BERNADO, 2016

L(+) production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* B103 à partir de déchets de l'industrie laitière. *Braz. J. Microbiol.* vol 47n°3.

BOUBECHICHE Z, 1999.

Optimisation des paramètres de fermentation de *Streptococcus thermophilus*: Etude de l'activité acidifiante et l'activité aromatique.

Thèse de magistère, INA, El Harrach. 68p.

BOUDJEMA K, 2008.

Essai d'optimisation de la production de lactique par *Streptococcus thermophilus*

Mémoire de magister, université Mohamed Bougara, Boumerdes. 68p.

BOUDRANT J., ENGASSER J.M. et PONS M.N., 1994.

Modélisation et fermentation lactique. In: les bactéries lactiques T2.Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, p 491-503.

BOYAVAL P., TERRE S. et CORRE C., 1988.

Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continue en réacteur à membrane. Lait, 1: 65-84.

CHAMBA J. F. et PROST F., 1989.

Mesure de l'activité acidifiante des bactéries thermophiles pour la fabrication des fromages à pâtes cuites. Lait 69, 417-41-31.

CHAMBA J.F., 1990.

Pas de piston pour les thermophiles. Revue Laitière Française, 492,47-50

CHERUY A. et DURAND A., 1979. Biotechnol. Bioeng. Sump. 9, 303

CHENOLL E., MACIAN M.C, AZNAR R. 2006

Lactobacillus rennini sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage.

International Journal of Systematic Evolution Microbiology, 56:449-452.

COGAN T. M., 1978.

Determination of growth rates of lactic starter cultures. Irish J.Food Sci. Technol., 2 (1), 105-106

COURTIN P., MONNET V., AND RUL F., 2002

Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology-Sgm* 148: 3413-3421.

COX G.C. et MACBEAN R. D. , 1977.

Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate. Austr.J. Dairy Technol., 32, 19-22.

DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURCK M.C. et JANSSENS D., 1994.

Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: les bactéries lactiques. T1.Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, 604p.

DE ROISSART, 1986.

Bactéries lactiques. In: lait et produits laitiers. Techniques et documentation. Ed Lavoisier, Paris.

DE ROISSART H., 1990.

Les bactéries lactiques. In: lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre. Ed Lavoisier, Paris, 445p

DESMAZEAUD M. et HERMIER J. H., 1973.

Effects de fragments peptidiques du glucagon vis a vis de la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie*, 55 (6-7), 679-684.

FOUCOUD ET POULMAN, 1992

Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques.

In: les bactéries lactiques. T1.Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, 604p.

GADGIL C. J. et VANKATESH K.V., 1997.

Structured model for batch culture growth of *Lactobacillus bulgaricus*. *J.Chem. Tech. Biotechvol.* 1997, 68, 89-93.

GOKSUNGUR Y. et GUVENC U., 1997.

Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbruekii* IFO 3202. *J.Chem. Biotechnol.*,69,399-404.

GARAULT P., LE BARS D., BESSET C., AND MONNET V., 2002

Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 32-39.

GRUFFERY R.C. et GONDON S., 1983

Effect of fermentation sugar on hydrogen peroxide accumulation by *Streptococcus lactis* C10. *J.Dairy Res.*, 50, 481-489.

GUHA A., SOUMITRA B. ET DEBABRATA B.2013,

production of lactic acid from sweet meat industry waste by *Lactobacillus delbrueki*
International Journal of Research in Engineering and Technology Vol.:02 ISSN: 2319-1163

HANSON T. P. et TSAO G. T., 1972.

Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Bioeng.*,14, 233-252.

HEMME D., NARDI M., JETTE D. ,1980.

β -galactosidase et phospho-galactosidase de *Streptococcus thermophilus*. *Lait*: 60, 35-392.

HERVE-JIMENEZ L., GUILLOUARD I., GUEDON E., GAUTIER C., HOLS S., MONNET V., RUL F., ANDMAGUIN E., 2008

Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8: 4273-4286.

HOGG T. 2005

Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

HOLS P., HANCY F., FONTAINE L., GROSSIORD B., PROZZI D., LEBLOND-BOURGET N., DECARIS B., BOLOTIN A., DELORME C., EHRLICH S D., GUEDON E.,

MONNET W., RENAULT P AND KLEEREBEZEM M., 2005

New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMSMicrobiology Reviews.* 29: 435-463.

HOLZAPFEL W.H., HABERER P., GEISEN R., BJORKROTH J., SCHILLINGER U. 2001-
Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.
American Journal of Clinical Nutrition, 73:365S-373S.

HOUICHI M. H., 2016

Etude de la mise en œuvre de l'acide poly (lactique) par le procédé d'extrusion film : relation structure- procédé. Thèse de doctorat de l'université de Lyon (INSA) 108 p.

HUTKINS R., MORRI H. A., MCKAY L.L., 1985 (a).

Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*50, 777-780.

HUTKINS R.W. et MORIS H.A., 1987.

Carbohydrate Métabolisme by *Streptococcus thermophilus*: A Review.
J. Food Protect. : 50 ,878-84.

HUTKINS R. et PONNE W., 1991.

Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In: les bactéries lactiques. T1. Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, 604p.

HUTKINS R.W AND NANNEN N.L., 1993.

pH homostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy. Sci.*, N° 76. pp.2354-2365

ISHISAKI A., OHATA T. et KOYABASHI G., 1989.

Batch culture for lactate fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, 68, 123-130.

JARRY A., 1994.

Production industrielle d'acide lactique. In: les bactéries lactiques T1. Ed Loric, Lavoisier, Paris, 604 p

- JORGENSEN M.H.et NIKOLAJSSEN K., (1987).
Mathematical model for lactic acid formation with *Streptococcus cremoris* from glucose
.Appl.Microbiol.Biotechnol., 25: 313-316.
- KEEN A. R., 1972.
Growth studies on the lactic Streptococci. II. The effect of agitation on growth of
Streptococcus lactis ML8 in batch culture. J.Dairy Res.39:691
- KELLER A. K. et GERHARDT P., 1975.
Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in
crude protein. Biotechnol. Bioeng. : 17, 997-1078.
- KISHIMOTO M., SAWANO T. YOSHIDA T. et TAGUCHI H. 1983.
In Modelling and Control of Biotechnological Process. Ed. A. Halme ; pergamanon Press,
Oxford, p. 161
- KOSIKOWSKI F. V., 1979.
Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. Revue Laitière Française:372,11-
21.
- LALLAI A., MURA G., MILLIDI RK. et MASTINU C., 1988
Modélisation et fermentation lactique. In: les bactéries lactiques T2.Ed. LORICA,
LAVOISIER Paris, p 491-503.
- LAMOUREUX L., 2000.
Exploitation de l'activité β - galactosidase de culture de bifidobacteries
en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. Mémoire de maîtrise,
Université de Laval, Canada.
- LAWRENCE R.C., HEAP H.A. et GILLES J., 1984
A controlled approach to cheese technology. J.Dairy Sci., 67, 1632-1645.
- LEBERTON J. D. et MILLER C., 1982
In Modèles Dynamiques Déterministes en Biologie; Masson, Paris,p. 162
- LEH et CHARLE, 1989 .
Lactic acid production by fermentation of whey permeate: a mathematical model. J.Ind.
Microbiol. , 4, 65-70
- LEVEAU J,Y., BOUIX M., DEROISSART H., 1991.
La flore lactique. In: Contrôle et analyse des aliments dans les industries agro-alimentaires,
vol 3, APRIA, 445p.

LOONES A., 1989

Modification de la composition du lait durant la fermentation du yaourt. In: les laits fermentés.

Actualités de la recherche. Ed. John Libbey Eurotext LTD., 129-137.

LOUAILECHE H., BRAQUART P., SAULNIER F., DESMAZEAUD M., LINDEN G., 1993.

Carbon dioxide effects on growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. *J.Dairy Sci.* 76: 3683-3689

LEUDEKING R. et PIRET E. L., 1959 (a).

A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiolol. Technol. Eng.*, 1, 393-412.

LEUDEKING R. et PIRET E. L., 1959 (b).

Transient and steady states in continuous fermentation: theory and experiments. *J. Biochem. Microbiolol. Technol. Eng.*, 1, 431-459.

MACHACHOU W., 2014

Approche méthodologique à la modélisation par les plans d'expérience pour l'élaboration d'un yaourt. Mémoire de magister en biotechnologie. Université d'Oran, p85

MALETTE M.F., 1969.

Evaluation of growth by physical and chemical means. *Meth.Microbiol.*, J.R. NORRIS et D. W. RIBBONS, edr. Acad. Press, 1, 123-127.

MANUEL SUISSE DES DENREES ALIMENTAIRES, 1973.

Méthodes d'analyse et d'appréciation des denrées alimentaires et des objets usuels. 2nd volume – Partie spéciale. 5e édition. Ouvrage élaboré sur mandat du conseil fédéral par la commission fédérale du manuel suisse des denrées alimentaires et le service fédérale de l'hygiène publique.

MARCELA PB, LUCIANA FC, DAIANE CS, JONAS C (2016).

L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industrywaste.*Braz.J.Microbiol.*47:640-646.

McBEAN R. D., HALL R. J. et LINKLATER P.M., 1979.

Modélisation et fermentation lactique. In: les bactéries lactiques T2.Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, p 491-503.

MECHACHOU W., 2014.

Approche méthodologique à la modélisation par les plans d'expérience pour l'élaboration d'un yaourt. Mémoire de magister en biotechnologie, université d'Oran. P85.

MONOD J., 1942. In: Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermman et Cie, Paris.

MONTEAGUDO J.M., RODRIGUEZ L., RINCON J. et FUERTES J., 1997. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 68, 217-276.

MOTA RM., MOREIRA JLS., SOUZA MR., HORTA M.F., TEIXEIRA S.M.R., NEUMANN E., NICOLI JR., NUNES A.C., 2006
Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology*, 6:1-11.

MOULIN G., GALZY P., RATOMAHEMINA R., 1976.
Selection des levures en vue de la culture sur lactosérum. *Lait* 553-554,

NARAYANAN N., ROYCHOUDHURY P.K AND SRIVASTAVA A., 2004
L (+) lactic acid fermentation and its product polymerisation. *Electronic journal of biotechnology*, 2, 7, 167-179.

OHARA H., 2003. *Bioraffenerie. App. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 474-477.

ONER M.D. et ERICKSON L.E., 1986.
Anaerobic fermentation of *Lactobacillus bulgaricus* and *thermophilus* on 3% non-fat dry milk with pure and mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 883-894.

PANESAR P.S., KENNEDY J.F., GANDHI DN AND BUNKO K., 2007
Bioutilization of whey for lactic acid production. *Div. Dairy . Microbiol .N°3*. pp.1-14.

PARRENTE E., ZOTTOLA A.E., 1991.
Growth of thermophilic starters in whey permeate media. *J. Dairy Sci.*, 74, 20-28.

PASCUAL LM., DANIELE MB., PAJARO C., BARBERIS L. ,2006
Lactobacillus species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception* , 73:78-81.

PECKHAM G.T. et FILACHIONE E. N., 1967.
KIRK-OTHMER *Encyclopaedia of chem. Technol.*, 2nd Ed., 12, 170-188.

PINELLI D., GONSALEZ-VARA A., MATTEUZZI D. et MAGELLI F., 1997.
Assessment of kinetic models for the production of L- and D- lactic acid. Acid isomers by *Lactobacillus casei* DMS 20011 and *Lactobacillus coryniformis* DMS 20004 in continuous Fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, 83 (2), 209-212.

PIRT S.J., 1975.

Principals of microbe and cell cultivation, BLACKWELL, OXFORD.

POWELL G.E., 1984.

Growth kinetics of no competitive product inhibition in batch cultures. J. Chem. Tech. Biotechnol., 34B, 33-38.

RADKE-MITCHELL C., SANDINE W.E., 1986.

Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and lactobacillus bulgaricus. J. Dairy Sci. : 69 ,2558-2568.

REDDY H.E., HENDERSON et ERDMAN M.D., 1976.

Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein, 32: 769-776.

RICHARDS J.W., 1961.

Studies in aeration on agitation. In: HOCKENHULL (D.J.D.) Progress. In industrial microbiology, vol. 3:141-172

ROBINSON R.K., 1988.

Cultures for yoghurt- their selection and use. Dairy Ind. Int. 53: 15-17.

ROY D., GOULETY J. et LEDUY A.,1986.

Batch fermentation of whey ultrafiltrate by lactobacillus helveticus for lactic acid production . Appl. Microbiol. Biotachnol.,24, 206-213.

ROY D., LEDY A. et GOULET J., 1987 (a).

Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by lactobacillus helveticus. Canadian J. Chem. Eng., 65, 597-603.

SAVAGODO A. et TRAORE, 2011

La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et des laits fermentés. Int.J.Biol.Chem Sci 5(5) :2057-2075.

SCHLEIFER K.H., EHRMANN M., KRUSCH U ET NEVE H. ,1991 Revival of the species *Streptococcus thermophilus*. System. Appl. Microbiol. 14: 386-388.

SHAH N. et JELEN P., 1990.

Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acid conditions. J. Food Sci.,55 :506-509.

SOLIS G., C. G. DE LOS REYES-GAVILAN, ET AL. 2010

Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut." Anaerobe16(3): 307-310

SOTTIEZ P., 1990

Produits dérivés des fabrications fromagères. In: laits et produits laitiers; vache, brebis, chèvre. Ed Lavoisier, Paris .633p.

TAYEB J., BOUILLANE C. and DESMAZEAUD M.J.,1984.

Computerized control of growth with temperature in a mixed culture of lactic acid bacteria. J. Ferment. Technol., 62 (5), 461-470.

TERRE S., 1986.

Propriétés technologiques, nutritionnelles et physiologiques de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Technique Laitière et Marketing, 1008, Avril, 1986.

THOMAS T.D. et CROW T. D., 1984.

Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose -limited chemostat culture. Appl. Environ. Microbiol. 48:186.

THOMSON J. et CENTRY-WEEKS C.R.,1994.

Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques.

In: les bactéries lactiques. T1.Ed. LORICA, LAVOISIER Paris ,604p.

TOPIWALLA H.H., 1973.

Mathematical models in microbiology. In : NORRRIS J.R., RIBBONS D.N. Methods in Microbiology, 8, p.35, Academic Press.

TORRIANI S., VESCOVO M. and SCOLARI G., 1994.

An overview on *Lactobacillus helveticus*. Ann.Microbiol.Enzymol. 44: 163-191.

VAHVASELKA M. I. et LINKO P.,1987.

Lactic acid fermentation in milk ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* . Proceedings of the 4th European congress on biotechnology, vol 3:p317-320. Elsevier, Amsterdam.

VENKATESH K. V., OKOS M. R. et WANKAT P. C., 1993.

Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. Process Biochemistry, 28: TOPIWALLA H.H., 1973.

VRIGNAUD Y.,1983.

Valorisation du lactosérum : une longue histoire.Revue laitière française, n°422, p 41-47.

ZWIETERING M.H., JONGENBURGER I., ROMBOUTS F. M.et VAN'T RIET K., 1990.

Modélisation et fermentation lactique. In: les bactéries lactiques T2.Ed. LORICA, LAVOISIER Paris, p 491-503.

ملخص:

ان الغرض من هذا العمل هو ايجاد القيم الحدية للتخمير لـ *Streptococcus.thermophilus* CNRZ 302 لاستغلال المصل الحليبي الناتج عن صناعة الجبن لانتاج حمض اللبن.

لقد تبين أن عملية التخمير الغير المستمرة، ذات حامض هيدروجيني الغير مراقب، أعطت أقصى قيمة للنمو و انتاج حمض اللبن في مصل حليبي مضاف اليه 10 غ/ل من الخميرة، 20 غ/ل من اللاكتوز، في وسط ذات حامض هيدروجيني pH= 6,36 ووسط حراري 42°م.

لقد وضع نموذجا رياضيا لحركة النمو والانتاج الذي سمح لنا بتعديل القيم التجريبية المتحصل عليها و ذلك في عملية التخمير الغير المستمرة.

مفاتيح الكلمات: حمض اللبن، مصل حليبي، ايجاد القيم الحدية، *S.thermophilus* (CNRZ 302), نموذج رياضي.

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'optimiser les paramètres de fermentation de *S.thermophilus* (CNRZ 302) afin de valoriser un sous-produit des fabrications fromagères « lactosérum doux » pour produire de l'acide lactique.

La fermentation en discontinu, à pH libre, a donné son maximum en croissance et production sur lactosérum supplémenté par 10 g/l d'extrait de levures, 20g/l de lactose, à un pH initial de 6,36 et une température d'incubation de 42°C.

Un modèle mathématique décrivant les cinétiques de croissance et d'acidification a été développé, permet de bien ajuster les points expérimentaux, sur la totalité en batch.

Mots-clés : Acide lactique, lactosérum, *S.thermophilus* (CNRZ 302), optimisation, modèle mathématique.

Abstract:

The objective of this work is to optimise parameters of fermentation of *S.thermophilus* (CNRZ 302) in order to produce lactic acid from cheese whey.

The batch fermentation, in free pH, has given the maximum of growth and production on cheese whey supplemented with 10 g/l of yeast extract, 20g/l of lactose, at an initial pH= 6,36 and 42°C.

A mathematical describing the growth and production kinetics, was developed and permeat to adept the experimental points on the totality of fermentation.

Keys-words: lactic acid, cheese whey, optimisation, *S.thermophilus* (CNRZ 302), mathematical model.