

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je saisis l'occasion offerte par l'achèvement de ma thèse de Doctorat pour remercier vivement, en premier lieu, ma directrice de thèse Professeur Halima ZADI-KARAM, qui a dirigé ce travail pas à pas, avec beaucoup d'attention, de patience et d'intérêt, et qui m'a fait bénéficier durant ces années de ses conseils et de sa très grande compétence. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son soutien dans les moments difficiles, la liberté accordée dans ce travail et merci pour votre confiance.

Mes vifs remerciements vont également au Professeur Nour-Eddine KARAM, de m'avoir fait le grand honneur d'accepter de présider ce jury. Je tiens aussi à lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide précieuse, ses meilleurs conseils et ses qualités scientifiques et humaines qui nous servent de modèle et d'exemple.

Il m'est particulièrement agréable de pouvoir exprimer mes vifs et sincères remerciements à Monsieur Fouad BAHRI, Professeur à l'Université de Mostaganem, Monsieur Miloud BELLAHCENE, Professeur au Centre Universitaire de Ain-Temouchent, Monsieur Mohamed Ali BEKADA, Professeur au Centre Universitaire de Tissemsilt, Monsieur Omar HASSAINE, Maître de Conférence «A» à l'Université d'Oran 1, qui m'ont fait un grand honneur en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse et de m'avoir accordé de leur temps si précieux pour apprécier et juger ce travail.

Un remerciement particulier est adressé à Monsieur Abdelatif AMRANE, Professeur à l'université de Rennes 1, de m'avoir accueilli au sein de son Equipe Chimie et Ingénierie des Procédés, de m'avoir fait part de son expérience dans le domaine de la modélisation et pour tous les conseils scientifiques dont il m'a fait part. J'exprime aussi ma profonde reconnaissance à Monsieur Abdellah BOUGUETTOUCHA, Maître de Conférence «A» à l'Université de Sétif 1 et à Monsieur Omar ROUANE-HACENE, Maître de Conférence «A» à l'Université d'Oran 1, de m'avoir, eux aussi, dirigé et guidé avec beaucoup de savoir-faire et de rigueur scientifique.

Mes remerciements vont aussi au LBMB où j'ai pu réaliser mon étude ainsi qu'aux membres du LBMB et à ceux du Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE) d'Oran qui m'ont toujours chaleureusement accueilli. Un grand merci à Monsieur Samir le directeur de l'unité de fabrication du fromage à pâte molle "Santa Cruz", qui a généreusement fourni le lactosérum utilisé dans ce travail.

Enfin, j'exprime un remerciement particulier à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, encouragé, soutenu tout au long de toutes ces années, qu'elles se reconnaissent.

Dédicaces

A ma chère mère

A ma chère femme

A toute ma famille et mes ami(e)s

A mon bout de chou Bisma Nihel

Résumé

Nous avons cherché à optimiser un milieu de culture à base de lactosérum doux pour la culture d'une soixantaine de souches lactiques appartenant à trois genres (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*). Le lactosérum déprotéinisé et additionné d'un mélange de sérum de tomate et d'extrait de levure s'est révélé pauvre en matière grasse et a un pH neutre, ce qui en fait un lactosérum doux. La teneur moyenne en lactose est de 47 g/L et en cendre de 6,32 g/L, le potassium étant en concentration de 16,4 g/Kg.

Nous avons par la suite réalisé l'étude de la croissance bactérienne et de certaines caractéristiques d'intérêts technologiques : activité protéolytique, production d'acide lactique et de diacétyl sur le milieu optimisé à base de lactosérum, en utilisant comme milieux témoins des milieux de culture décrits et/ou commerciaux.

Les résultats enregistrés avec le milieu BMK sont tout à fait comparables et parfois meilleurs que ceux obtenus avec les milieux témoins Mayeux, Mayeux m, et le milieu M17 et MRSm.

Ces activités se sont exprimées de manière hétérogène, ce qui nous a amené à recourir à une analyse en composantes principales (ACP) afin d'élire la ou les souches les plus performantes sur le milieu optimisé (milieu BMK). Cette analyse a permis de montrer que certaines souches, forment un groupe distinct, notamment les souches CHBK 309, CHBK 325, CHBK 327, CHT 27, BH 14 et CHTD 27, qui s'avèrent présenter les propriétés technologiques les plus intéressantes dans le milieu BMK (croissance, production d'acide lactique, ..), en fermenteur en mode discontinu et dans des conditions de pH non contrôlé. Nous avons établi un modèle mathématique de fermentation.

La modélisation de cette fermentation lactique a révélé que le modèle Verlhust décrit correctement la cinétique de croissance des bactéries. La cinétique de la production d'acide lactique est décrite par une modification du modèle Luedeking-Piret, qui révèle que la croissance de la bactérie et la production d'acide lactique seront inhibées par l'acide lactique indissocié [HL]. De plus, les résultats calculés, d'après les modèles de la croissance et la production d'acide lactique, concordent bien avec ceux obtenus expérimentalement.

Mots clés: Bactéries lactiques, lactosérum doux, extrait de levure, jus de tomate fraîche, milieu BMK, croissance bactérienne, acidification, activité protéolytique, fermentation, modélisation.

Abstract

We sought to optimize a culture medium based on sweet whey for the culture of sixty lactic strains belonging to three genera (*Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc*). Whey deproteinized and supplemented with a mixture of tomato serum and yeast extract is found to be low in fat and has a neutral pH, making it a mild whey. The average lactose content is 47 g/L and ash of 6.32 g/L, potassium being in a concentration of 16.4 g/Kg.

We then realized the study of the bacterial growth and some characteristics of technological interests: proteolytic activity, production of lactic acid and diacetyl on the optimized whey-based medium, using as described control media described and/or commercial culture media.

The results recorded with the BMK medium are quite comparable and sometimes better than those obtained with the control media Mayeux, Mayeux m, and the medium M17 and MRSm. These activities were expressed in a heterogeneous way, which led us to use a principal component analysis (PCA) in order to elect the most efficient strain(s) on the optimized medium (BMK medium). This analysis has shown that certain strains form a distinct group, in particular strains CHBK 309, CHBK 325, CHBK 327, CHT27, BH 14 and CHTD 27, which prove to have the most interesting technological properties in the BMK medium (growth, lactic acid production, etc.), in a batch fermented and under uncontrolled pH conditions. We have established a mathematical model of fermentation.

Modeling this lactic fermentation revealed that the Verlhust model correctly describes the growth kinetics of bacteria. The kinetics of lactic acid production are described by a modification of the Luedeking-Piret model, which reveals that the growth of the bacterium and the production of lactic acid will be inhibited by the leached lactic acid [HL]. Moreover, the calculated results, based on growth models and lactic acid production, are in good agreement with those obtained experimentally.

Keywords: lactic bacteria, sweet whey, yeast extract, fresh tomato juice, BMK medium, bacterial growth, acidification, proteolytic activity, Modeling.

ملخص

سعيًا إلى تحسين وسط غذائي لمصل اللبن الحلو لحوالي ستين سلالة من بكتيريا حمض اللبن تنتمي إلى ثلاثة أجناس (*Lactobacillus* و *Lactococcus*، *Leuconostoc*) أضفنا لمصل اللبن منزوع البروتينات مصل الطماطم وخلاصة الخميرة، حيث أثبتت التحاليل الكيميائية أن مصل اللبن منزوع البروتينات، يحتوي على نسبة دهون منخفضة جداً، ودرجة حموضته معتدلة، مما يجعله يصنف إلى مصل اللبن الحلو، مع متوسط محتوى اللاكتوز 47 غ/لتر والرماد 6,32 غ/لتر، أين البوتاسيوم هو المعدن الرئيسي مع تركيز 4,16 غ/كغ. قمنا لاحقاً بدراسة النمو وبعض الخصائص التكنولوجية: النشاط البروتيني، وإنتاج حمض اللبن وثنائي الأسيتيل لهذه السلالات على الوسط الغذائي المتحصل عليه وذلك باستخدام الأوساط الغذائية العادية كشهود.

النتائج المسجلة مع الوسط المسمى BMK، هي مقبولة جداً وأحياناً أفضل من تلك التي تم الحصول عليها مع الأوساط الغذائية العادية MRSm و M17، Mayeux، Mayeux m. لقد تم التعبير عن هذه الأنشطة بطريقة غير متجانسة جداً، مما أدى بنا إلى استخدام تحليل المكونات الرئيسية (ACP) وقد أظهرت هذه التحليلات أن بعض السلالات تشكل مجموعة منفصلة، خاصة السلالات CHBK309، CHBK325، CHBK 327، CHT27، BH14 و CHTD27 التي أظهرت نتائج تكنولوجية مهمة تسمح لنا بدراسة حركة النمو وإنتاج حمض اللبن في الوسط الغذائي BMK في جهاز المفاعل الحيوي في وضع متقطع وذلك في حالة pH غير خاضع للمراقبة مع تطوير نموذج رياضي للتخمير.

النتائج المتحصل عليها للتخمير اللبني، أظهرت أن معادلة Verlhust مناسبة لإظهار النمو البكتيري، ومعادلة Pirt-Luedeking مناسبة لإنتاج حمض اللبن وتوضح تأثير هذا الأخير على النمو البكتيري.

كلمات مفتاحية: بكتيريا حمض اللبن، مصل اللبن الحلو، خلاصة الخميرة، مصل الطماطم، وسط BMK، النمو البكتيري، إنتاج حمض اللبن، نشاط بروتيني، التخمر، نموذج رياضي.

SOMMAIRE

	Page
<i>Liste des figures</i>	i
<i>Liste des tableaux</i>	iii
<i>Liste des abréviations</i>	iv
<i>Introduction</i>	1
1. Analyse bibliographique	5
1.1. Lactosérum	6
1.1.1. Définition	6
1.1.2. Différents types de lactosérum	6
1.1.3. Composition biochimique du lactosérum	7
1.1.4. Valorisation du lactosérum	8
1.1.4.1. Utilisation du lactosérum à l'état brut	8
1.1.4.2. Utilisation lactosérum traité	9
1.1.4.3. Fermentations diverses du lactosérum	12
1.2. Généralités sur les bactéries lactiques	14
1.2.1. Définition	14
1.2.2. Taxonomie des bactéries lactiques	14
1.2.3. Habitat des bactéries lactiques	15
1.2.4. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	16
1.2.4.1. Exigences en vitamines	16
1.2.4.2. Exigences en bases azotées	17
1.2.4.3. Exigences en acides aminés	17
1.2.4.4. Influence des cations	20
1.2.5. Milieux de culture pour les bactéries lactiques	21
1.2.6. Principales propriétés métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques	24
1.2.6.1. Métabolisme glucidique	24
1.2.6.1.1. Métabolisme des sucres	28
1.2.6.1.2. Régulation du métabolisme des sucres	31
1.2.6.1.3. Régulation du système de transport des sucres	31
1.2.6.2. Protéolyse et nutrition azotée des bactéries lactiques	34
1.2.6.3. Métabolisme du citrate	39
1.3. Généralités sur la fermentation lactique	41
1.3.1. L'acide lactique	41
1.3.2. Applications de la fermentation lactique	42
1.3.3. Fermentation discontinue (ou Batch)	43
1.3.3.1. Etude de quelques modèles de cinétique de croissance	44
1.3.3.2. Modélisation de la production d'acide lactique	49
1.3.3.3. Modélisation de la consommation du substrat	51

	Page
2. Matériel & Méthodes	55
2.1. Souches bactériennes	56
2.2. Milieux de culture	57
2.2.1. Préparation du milieu de culture BMK	57
2.2.1.1. Déprotéinisation du lactosérum	57
2.2.1.2. Préparation du jus de tomate	57
2.3. Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique et de leur pureté	57
2.4. Conservation des souches	58
2.5. Analyses physicochimiques du lactosérum	58
2.5.1. Mesure de l'acidité	58
2.5.2. Teneur en matière sèche totale	58
2.5.3. Teneur en cendres	59
2.5.4. Détermination des minéraux	59
2.5.5. Détermination de la matière grasse	60
2.5.6. Teneur en glucides	60
2.6. Études des caractères technologiques	61
2.6.1. Mesure de la croissance	61
2.6.2. Mesure de l'acidité produite	62
2.6.3. Recherche du diacétyl	62
2.6.4. Mise en évidence de l'activité protéolytique cellulaire	62
2.6.5. Analyses statistiques des résultats	62
2.7. Cinétique de croissance, de production d'acide lactique et de consommation du lactose en fonction du temps	63
2.8. Modèle cinétique et estimation des paramètres	63
3. Résultats & discussion	64
3.1. Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique et de leur pureté	65
3.2. Analyses physicochimique du lactosérum	65
3.2.1. pH et acidité	65
3.2.2. Teneur en matière sèche total	66
3.2.3. Teneur en lactose	66
3.2.4. Teneur en matière grasse	66
3.2.5. Teneur en cendres	66
3.2.6. Analyse des sels minéraux	67
3.3. Étude des caractéristiques technologiques en milieu BMK	69
3.3.1. Résultats des paramètres de croissance et production d'acide lactique en milieu BMK	69
3.3.1.1. Croissance des souches lactiques en milieu BMK	71
3.3.1.2. Étude du pouvoir acidifiant des souches	76
3.3.2. Analyse en composantes principales (ACP)	82
3.3.3. Recherche du diacétyl	89
3.3.4. Etude de l'activité protéolytique	92

	Page
3.4. Cinétique de croissance, de production d'acide lactique et de consommation du lactose en fonction du temps	97
3.4.1. Croissance et production d'acide lactique	97
3.4.2. Consommation du substrat	103
3.5. Modèle cinétique et estimation des paramètres	104
4 . Conclusion	116
5 . Références bibliographiques	119
6. Annexes	137

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait	6
Figure 2 : Les produits finis résultants des différents procédés industriels appliqués au lactosérum	10
Figure 3 : Phosphorylations d'Hpr, PEP-dépendante par P~ EI ou ATP- dépendante par Hprk/P, en présence de glucose	25
Figure 4 : Principaux systèmes de transport des substrats à travers la membrane cellulaire	26
Figure 5 : Voies de transport et de métabolisme des glucides par les bactéries lactiques	27
Figure 6 : Principale voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.	29
Figure 7 : Transport et métabolisme du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques.	30
Figure 8 : Modèle d'exclusion de l'inducteur chez les bactéries à Gram positif.	33
Figure 9 : Modèle du mécanisme d'expulsion de l'inducteur chez les bactéries à Gram positif	34
Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines composants les protéases de parois	36
Figure 11 : Catabolisme des acides aminés par <i>Lc. lactis sp.</i>	38
Figure 12 : Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques	40
Figure 13 : Les deux structures isomères d'acide lactique L(+), D(-)	41
Figure 14 : Croissance des leuconostocs en milieu BMK après 24 h d'incubation	71
Figure 15 : Croissance des leuconostocs en milieu BMK après 48 h d'incubation	72
Figure 16 : Croissance des lactocoques en milieu BMK après 24 h d'incubation	72
Figure 17 : Croissance des lactocoques en milieu BMK après 48 h d'incubation	73
Figure 18 : Croissance des lactobacilles en milieu BMK après 24 h d'incubation	74
Figure 19 : Croissance des lactobacilles en milieu BMK après 48 h d'incubation	75
Figure 20 : Production d'acide lactique par des souches de <i>Leuconostoc</i> en milieu Mayeux, Mayeux m et BMK après 24 h d'incubation à 30 °C	77
Figure 21: Production d'acide lactique par des souches de <i>Leuconostoc</i> en milieu Mayeux, Mayeux m et BMK après 48 h d'incubation à 30 °C	78
Figure 22 : Production d'acide lactique par des souches de <i>Lactococcus</i> en milieu M17 et BMK après 24 h d'incubation à 30 °C	78
Figure 23 : Production d'acide lactique par des souches de <i>Lactococcus</i> en milieu M17 et BMK après 48 h d'incubation à 30 °C	79
Figure 24 : Production d'acide lactique par des souches de <i>Lactobacillus</i> en milieu MRSm et BMK après 24 h d'incubation à 30 °C	80
Figure 25 : Production d'acide lactique par des souches de <i>Lactobacillus</i> en milieu MRSm et BMK après 48 h d'incubation à 30 °C	81
Figure 26: Représentation graphique des valeurs propres de la matrice des corrélations des leuconostocs	83
Figure 27 : Représentation graphique des valeurs propres de la matrice des corrélations des lactocoques	84
Figure 28 : Représentation graphique des valeurs propres de la matrice des corrélations des lactobacilles	85
Figure 29 : Analyses en composantes principales pour les souches de <i>Leuconostoc</i> , pour les variables milieu, pH, production d'acide lactique et croissance	86
Figure 30 : Analyses en composantes principales pour les souches de <i>Lactococcus</i> , pour les variables milieu, pH, production d'acide lactique et croissance	87
Figure 31: Analyses en composantes principales pour les souches de <i>Lactobacillus</i> , pour les variables milieu, pH, production d'acide lactique et croissance	88

	Page
Figure 32 : Production de diacétyl par la souche LVK12 en milieux MRSm et BMK	92
Figure 33 : Activité protéolytique des <i>Leuconostocs</i> en milieux Mayeux, Mayeux m et BMK	93
Figure 34 : Activité protéolytique des lactocoques en milieu M17 et BMK	94
Figure 35 : Activité protéolytique des lactobacilles en milieu MRSm et BMK	95
Figure 36 (a) et (b) : Activité protéolytique des souches de <i>Lactobacillus</i>	96
Figure 37 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu M17 de la souche CHT27	97
Figure 38 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHT27	97
Figure 39 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu Mayeux m de la souche CHBK309	98
Figure 40 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHBK309	98
Figure 41 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu Mayeux m de la souche CHBK325	99
Figure 42 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHBK325	99
Figure 43 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu Mayeux m de la souche CHBK327	100
Figure 44 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHBK327	100
Figure 45 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu MRSm de la souche BH14	101
Figure 46 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche BH14	101
Figure 47 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu MRSm de la souche CHTD27	102
Figure 48 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHTD27	102
Figure 49 : Cinétique de croissance de la souche CHBK309 en milieu Mayeux m et BMK	107
Figure 50 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHBK 309 en milieu Mayeux m et BMK	108
Figure 51 : Cinétique de croissance de la souche CHBK325 en milieu Mayeux m et BMK	108
Figure 52 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHBK325 en milieu Mayeux m et BMK	109
Figure 53 : Cinétique de croissance de la souche CHBK327 en milieu Mayeux m et BMK	109
Figure 54 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHBK327 en milieu Mayeux m et BMK	110
Figure 55 : Cinétique de croissance de la souche BH14 en milieu MRSm et BMK	110
Figure 56 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche BH14 en milieu MRSm et BMK	111
Figure 57 : Cinétique de croissance de la souche CHTD27 en milieu MRSm et BMK	111
Figure 58 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHTD27 en milieu MRSm et BMK	112
Figure 59 : Cinétique de croissance de la souche CHT27 en milieu M17 et BMK	112
Figure 60 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHT 27 en milieu M17 et BMK	113

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Composition de différents types de lactosérum	7
Tableau 2 : Les fermentations du lactosérum	13
Tableau 3 : Familles et principaux genres des bactéries lactiques	14
Tableau 4 : Besoins en acides aminés de <i>Sreptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> et <i>Lactococcus lactis</i>	18
Tableau 5 : Besoins en acides aminés des lactobacilles	19
Tableau 6 : Compositions physico-chimiques de l'extrait de levure et jus de tomate	23
Tableau 7 : Code et origine des bactéries lactiques	56
Tableau 8 : Analyse physicochimique du Lactosérum	65
Tableau 9 : Dosage des sels minéraux du lactosérum	67
Tableau 10 : Résultats de l'analyse de variance (Test F, ANOVA) des paramètres de croissance, pH et production d'acide lactique	70
Tableau 11 : Production de diacétyl par les leuconostocs	90
Tableau 12 : Production de diacétyl par les lactobacilles	91
Tableau 13 : Production de diacétyl par les lactocoques	91
Tableau 14 : Concentration du substrat	103
Tableau 15 : Les paramètres optimaux estimés pour la fermentation lactique	106
Tableau 16 : Les paramètres expérimentales pour la fermentation lactique	107

Liste des abréviations

- 0:** initiale
- A:** coefficient de la production associé à la croissance (sans dimension)
- AL:** acide lactique
- B:** coefficient de la production non associé à la croissance (h^{-1})
- cal:** calculer
- ddl:** degré de liberté
- DO:** densité optique
- exp:** expérimentale
- F:** facteur
- f:** final
- [HL]:** concentration d'acide lactique non dissocié (g/L)
- [L]:** concentration d'acide lactique dissocié (g/L)
- Lb.:** *Lactobacillus*
- Lc.:** *Lactococcus*
- Ln.:** *Leuconostoc*
- μ :** vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
- m:** modifié
- M:** molle
- max:** maximum
- mM:** millimolaire
- M.S:** matière sèche
- P:** concentration d'acide lactique
- S₀:** concentration du sucre initiale (g/L)
- SD²:** somme des carrés résiduels
- S_R:** concentration du sucre résiduelle (g/L)
- tr/min:** tour par minute
- X:** biomasse cellulaire ($\text{DO}_{600\text{nm}}$)

Introduction

L'industrie agroalimentaire constitue un réceptacle de premier choix pour les déchets qu'elle génère. Jadis, les processus de valorisation étaient abandonnés au profit des techniques d'élimination simples et rapides: l'incinération et la mise en décharge, le règne de la décharge s'est installé pour atteindre son apogée dans les années 60-70. Aujourd'hui, cette situation n'a plus cours. La prise en compte de l'intérêt croissant des populations pour la préservation de l'environnement a conduit à modifier cette gestion des déchets. La valorisation des résidus agroindustriels revient à l'ordre du jour et la notion de déchet a bien évolué pour être remplacée par le terme coproduit.

De nombreux sous-produits sont rejetés par l'industrie alimentaire tels que, le lactosérum, les déchets d'oranges, de datte, le sérum de tomate,...etc, peuvent être récupérés et utilisés dans différents secteurs industriels et agricoles, selon leurs caractéristiques et les possibilités des marchés (alimentation animale et humaine).

Le lactosérum, coproduit de l'industrie laitière, est incontestablement une matière noble et riche. En effet, il est devenu une source intéressante de composés actifs et de nutriments spécifiques, présentant des propriétés incomparables, tant sur le plan nutritionnel que sur le plan techno-fonctionnel, tels que le lactose, les protéines solubles, les vitamines hydro-solubles, les matières grasses et les éléments minéraux.

Une production fromagère type permet un rendement massique moyen de 10% (Lapointe-Vignola, 2002). Chaque kilogramme de fromage retrouvé sur le marché aura donc entraîné une production approximative de neuf fois son équivalent massique en coproduit de production avant de se retrouver au supermarché. Ce faible rendement en fromage est expliqué par la séparation du lait en deux grandes fractions lors de la fabrication fromagère : le fromage et le lactosérum.

Depuis 2013, la production algérienne de fromage est de 1540 tonnes, ce qui se traduit par une production d'environ 14 million de litre de lactosérum (FAO-ONU, 2017). Ces quantités massives font de la gestion du lactosérum un enjeu à la fois économique et écologique. Économique puisque la gestion de chaque kilogramme de produit (le terme produit inclut produits finis, coproduits et sous-produits) représente un coût pour le transformateur industriel, et écologique puisque le lactosérum, s'il n'est pas géré correctement, représente un polluant majeur (Smithers, 2008).

L'accroissement considérable des quantités de fromages fabriqués par unité de production ne permettent plus d'éliminer le sérum directement, soit par une consommation animale proche, soit par déversement dans les cours d'eau, où il serait à l'origine de pollution grave due à la fermentation de ses matières organiques (lactose et matières azotées) et à la diminution de la teneur en oxygène dissous de l'eau au dessous d'un seuil acceptable. La DBO (demande biologique d'oxygène) du sérum est de 40 000, c'est-à-dire qu'un litre de sérum nécessite 40 g d'oxygène pour que ses matières organiques soient détruites par oxydation microbienne. Dans ces conditions, il est devenu indispensable de le traiter de sorte qu'il ne constitue plus une matière gravement polluante. Encore faut-il que son traitement soit économiquement acceptable (FAO,1995).

Le développement de nouvelles technologies pour la valorisation du lactosérum est donc nécessaire. Par ailleurs, depuis quelques années, le lactosérum a suscité l'intérêt des industries, plusieurs produits à haute valeur ajoutée ont vu le jour depuis 1970, sous une forme concentrée et fractionnée de ce lactosérum (Mulvihill et Fox, 1989; Hambraeus, 1992), et c'est la production de poudre de lactosérum (destiné à l'alimentation humaine et animale) et de lactose qui prédomine. Cependant, la tendance actuelle est d'obtenir de nouveaux produits tel que les acides carboxyliques ou l'acide succinique et la production d'acide lactique par fermentation du lactosérum (Zeikus *et al.*, 1999; Gana et Touzi, 2001; Boudjema, 2009). Enfin, il peut être aussi envisagée de l'utiliser pour la culture des micro-organismes à moindre coût.

Parmi les microorganismes utilisés, les bactéries lactiques, qui possèdent des qualités exceptionnelles et un potentiel métabolique important, peuvent utiliser le lactosérum pour croître, se multiplier et donner une importante quantité de biomasse et des métabolites souvent indispensables pour l'homme.

En Algérie, l'inexistence d'une mise en valeur du lactosérum se pose avec acuité en raison de l'absence d'une réglementation stricte, émanant des pouvoirs publics, pouvant interdire le rejet de ce produit dans la nature. Le rejet de lactosérum dans les égouts représentant une perte sèche de l'élément nutritif. Au cours de ces dernières années, plusieurs travaux apportant de nouvelles connaissances sur la valorisation du lactosérum ont été réalisés au niveau des universités algériennes.

C'est dans ce contexte, que le Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, a envisagé un travail de recherche qui vise à explorer une voie de valorisation

jusque-là peu entreprise en Algérie comme alternative au milieu de culture commercialisé, très coûteux. Par ailleurs, au regard des résultats d'une étude préliminaire (Benaïssa, 2010), visant l'élaboration d'un milieu de culture à base de lactosérum doux, pour des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*, cette tentative a été encouragée.

L'objectif de cette thèse a été de valoriser un milieu de culture BMK (Benaïssa, 2010) à base de lactosérum doux pour les bactéries lactiques et étudier l'influence de la composition de ce milieu sur l'aptitude à croître et le comportement microbien de différents genres de souches lactiques

Les travaux réalisés durant cette thèse sont décrits au travers de trois parties.

La première partie consiste en une synthèse bibliographique qui permettra de rappeler la composition physico-chimique du lactosérum, de passer en revue les différentes voies de valorisation de ce coproduit et de souligner les exigences nutritives des bactéries lactiques. Et enfin, de définir la fermentation lactique et d'étudier quelques modèles de cinétique en mode de fermentation discontinue.

La seconde partie expose les différents matériels et méthodes développés pour mener à bien les travaux décrits par la suite.

La dernière partie présente les résultats obtenus et s'articulent en quatre volets principaux :

- i. Le premier décrit l'étude de la composition physico-chimique du lactosérum doux brut et déprotéinisé provenant de l'unité de fabrication de fromage à pâte môle type « camembert » à Oran.
- ii. Nous avons ensuite examiné la croissance d'une soixantaine de souches lactiques appartenant à trois genres (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*) sur milieu optimisé à base de lactosérum, en utilisant leurs milieux de culture témoins.
- iii. Etude des caractéristiques technologiques de ces souches sur le même milieu à base de lactosérum : activité protéolytique, production d'acide lactique et de diacétyl.
- iv. Et enfin, la dernière partie traite de l'étude cinétique de la croissance, de la production d'acide lactique, et de la consommation du substrat dans le même milieu à base de lactosérum, en fermenteur en mode discontinu et dans des conditions de pH non contrôlé avec établissement d'un modèle mathématique de fermentation (modélisation de production d'acide lactique).

Rapport-Gratuit.com

1- Analyse bibliographique

1.1. Lactosérum

1.1.1. Définition

Appelé autrefois petit lait, le lactosérum est un co-produit de l'industrie fromagère et de la préparation des caséinates (Jouan, 2002). Le lactosérum est un produit découvert il y a plus de 3000 ans avant Jésus-Christ, par des Bédouins lors du transport de lait. L'acidification et la coagulation par la chaleur provoquaient la formation d'une phase liquide au-dessus d'un caillé de lait (De Witt, 2001). Le lactosérum représente 90 % du volume original de lait utilisé en fromagerie et en est le principal sous-produit (Moletta, 2002).

Le terme lactosérum se rapporte au liquide translucide et jaune verdâtre qui se sépare du caillé (Heslot, 1996), après séparation des caséines par coagulation acide ou par processus enzymatique au moyen de la présure ou de la chymosine (Jouan, 2002).

1.1.2. Différents types de lactosérum

Selon le procédé d'obtention, différents types de lactosérums peuvent ainsi être obtenus comme illustré sur la figure 1. Ces lactosérums peuvent être classés en deux principales catégories selon l'acidité du liquide obtenu (Alais, 1984) :

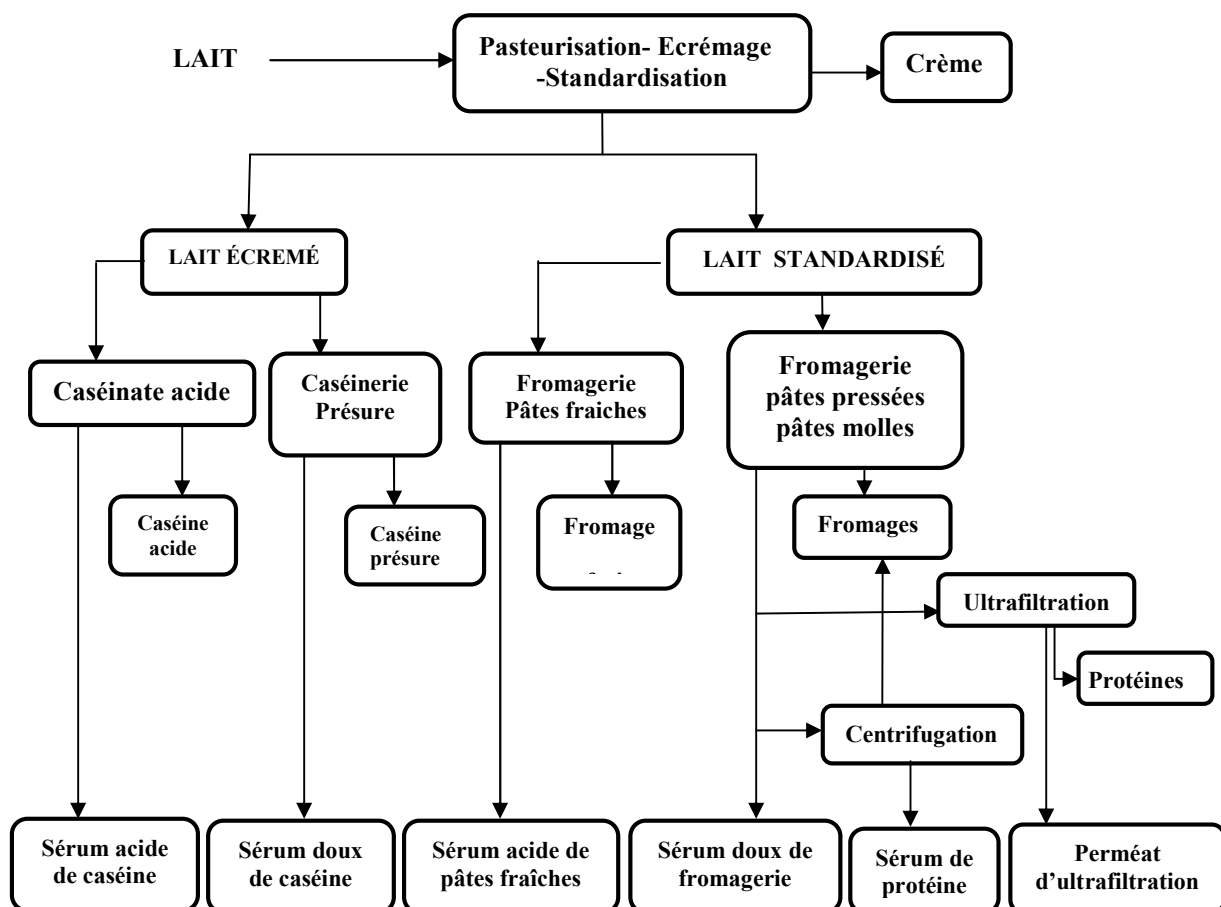


Figure 1 : Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait (Alais, 1984).

- ◆ **Les lactosérums doux** : dont l'acidité varie entre 15 et 22 °D (pH=6,5). Ils sont issus de la production de pâtes pressées et/ou cuites ou molles (Edam, St Paulin, Emmental).
- ◆ **Les lactosérums acides** : obtenus lors de la fabrication des pâtes fraîches ou lors de la production des caséines atteignent 120 °D, soit un pH proche de 4,5.

1.1.3. Composition biochimique du lactosérum

La composition dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines. Le tableau ci-dessous présente les chiffres approximatifs de la composition des sous-produits issus de la fabrication du fromage et de la caséine.

Tableau 1:
Composition de différents types de lactosérum (Sottiez, 1990)

	Lactosérum doux			Lactosérum acide	
	Pate pressée cuite	Pate pressée non cuite	Camembert	Pate fraîche	Caséine
Liquide (%)	93,5	95	93,5	94	94
Extrait sec (%)	6,5	5	6,5	6	6
pH	6,7	6,5	6,1	6	4,6
Constituants (g/L)					
Lactose	76	75	75	65,5	74
Protéines	13,5	13,5	12	12	12
Cendres	8	8	8,25	9	12
Matière grasse	1	1	1	0,5	0,50
Acide lactique	1,80	2,80	2,20	10	18
Minéraux (%)					
Ca	0,60	0,65	0,70	1,90	1,80
P	0,60	0,65	0,70	1,50	1,50

En industries fromagères, la plus grande partie de l'eau contenue dans le lait se retrouve dans le lactosérum et avec elle, toutes les substances solubles: le lactose, les protéines solubles et des peptides, les sels minéraux solubles (lactates, chlorures...) et les matières grasses. Les protéines présentes sont les matières azotées ne précipitant pas; elles représentent 20 % des protéines du lait; ce sont les albumines (75 %), les globulines (10 %) et divers autres (15 %).

En plus de cette composition s'ajoutent les vitamines, avec des quantités importantes de riboflavine (B2) ce qui donne la couleur jaune verdâtre du lactosérum, l'acide pantothénique (B5), la thiamine (B1), la pyridoxine (B6) et l'acide ascorbique (C) (Woo, 2002).

1.1.4. Valorisation du lactosérum

Le lactosérum peut être utilisé aussi bien sous sa forme la plus simple, en tant qu'aliment du bétail, que sous sa forme la plus élaborée pour la pharmacie, pour la diététique ou pour l'alimentation humaine. Ces extrêmes sont économiquement possibles et encadrent toute une série de possibilités technologiquement faisables (Sottiez, 1990; Bardy *et al.*, 2016).

1.1.4.1. Utilisation du lactosérum à l'état brut

Le lactosérum est un aliment intéressant, mais la teneur relativement élevée en matières salines constitue un inconvénient qui limite la consommation, à l'état brut, de ce produit par l'homme. C'est la raison pour laquelle l'alimentation animale est restée pendant longtemps le débouché privilégié (Rerat *et al.*, 1984).

- **Alimentation animale**

Le débouché principal des lactosérums est l'alimentation des veaux et de façon plus fluctuante l'alimentation animale dans son ensemble (Adrian, 1971). C'est sur cette utilisation croissante que se sont penchées de nombreuses équipes de recherches spécialisées dans ce domaine, pour améliorer cette alimentation et diminuer les troubles gastro-intestinaux, ainsi :

- l'utilisation du lactosérum fermenté avec *Lactobacillus acidophilus* pour l'alimentation des veaux a montré une meilleure croissance sans aucun désordre gastro-intestinal. Cet essai a également réussi chez les volailles et les porcs.
- l'enrichissement du lactosérum en azote non protéique par fermentation et neutralisation a donné des résultats satisfaisants pour l'alimentation de bœufs et de vaches laitières.
- de nombreux travaux ont signalé le développement réussi d'un ensilage de paille avec le lactosérum pour l'alimentation des ruminants. (Bardy *et al.*, 2016)

- **Alimentation humaine**

- L'incorporation du lactosérum dans la fabrication des laits fermentés :

Le lactosérum est incorporé dans la fabrication du yaourt et du leben comme remplaçant de l'eau dans le processus de reconstitution du lait à partir de la poudre du lait. Cette incorporation permet une amélioration notable du point de vue aspect et arôme du yaourt, due

essentiellement à l'effet bénéfique exercé par les protéines sériques et le lactose du lactosérum.

➤ Boisson de lactosérum :

Un lactosérum pasteurisé a été additionné à cinq types de jus de fruits différents (orange, raisin, fraise, banane et pomme) en plus de l'ajout de saccharose et d'acide ascorbique. Les résultats ont effectivement montré la bonne qualité des boissons obtenues, en particulier celui du jus d'orange, de pomme et de fraise. Ainsi, on peut avoir à partir du lait, du fromage et des boissons fruitées à base de lactosérum (Vojnovic *et al.*, 1993).

1.1.4.2. Utilisation lactosérum traité

L'un des développements les plus significatifs de l'industrie laitière concerne la transformation du lactosérum en de nombreux dérivés, dont les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressent différents secteurs de l'industrie agroalimentaire, en dermatologie et en cosmétologie. Le diagramme illustré dans la figure 2 résume les différents procédés utilisés dans le traitement du lactosérum et montre les produits finis obtenus.

- **Utilisation du lactose**

- Industries chimiques : l'utilisation du lactose par ces industries a été mise au point dans les années 70, où un procédé original de fabrication d'écumes de polyuréthane a connu une réussite importante. Ces écumes sont largement utilisées dans la construction, l'isolation thermique et phonique et la fabrication des emballages (Bardy *et al.*, 2016).
- Industrie pharmaceutique : elle utilise de grandes quantités de lactose raffiné comme charge dans la préparation de nombreux médicaments. En effet le lactose est considéré comme l'un des glucides les mieux adaptés à la préparation des milieux de fermentation destinés au développement des moisissures dans la fabrication des antibiotiques (Harper, 1992).
- Industries alimentaires : les industriels diversifient de plus en plus les débouchés du lactose en industrie alimentaire, notamment en charcuterie, confiserie, boulangerie, biscuiterie et pâtisserie ; dans la fabrication des chips et des pommes de terre frites pour favoriser les réactions de brunissement et de caramélisation (Hoppe et Higgins, 1992; Sottiez, 1990)
- Autres utilisations : le lactose peut être utilisé en aliment pour enfant et destiné à remplacer le lait maternel.

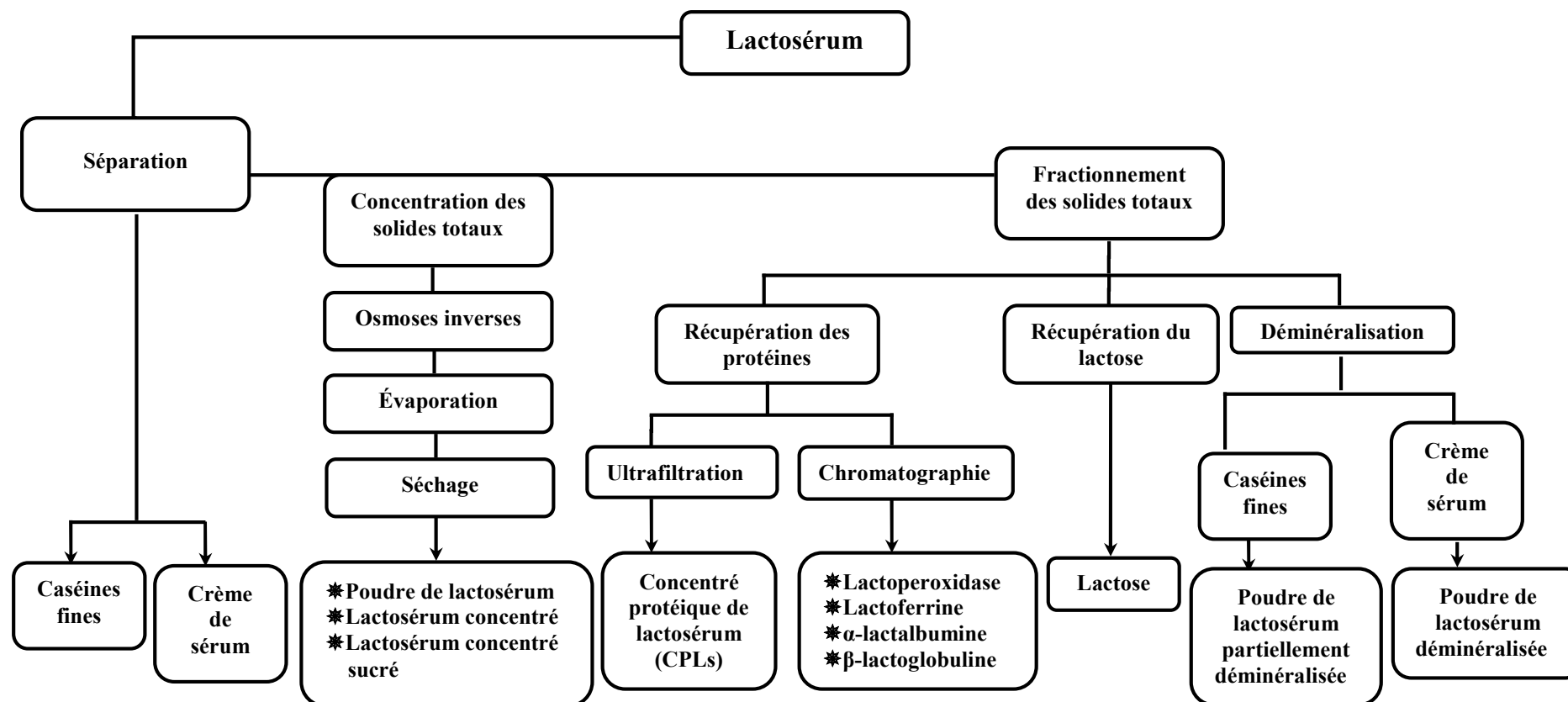


Figure 2 : Les produits finis résultants des différents procédés industriels appliqués au lactosérum (Dairy processing handbook, 1995).

- **Utilisation des protéines**

Les protéines du lactosérum constituent 20 % de la totalité des protéines contenues dans le lait (Morr, 1982; Bardy *et al.*, 2016). Elles sont composées de plusieurs types de protéines dont la β -lactoglobuline et l' α -actoglobuline sont majoritaires. Les immunoglobulines, la sérum albumine bovine (BSA), le glycomacropeptide (GMP) et les protéoses-peptones font partie des constituants protéiques mineurs du lactosérum.

- En industrie pharmaceutique la lactoferrine et la lactoperoxidase, possédant des propriétés antibactériennes, sont utilisées pour fabriquer différents produits de désinfection utilisés en oto-rhino-laryngologie, comme les solutions pour bain de bouche, les pastilles pour la gorge et les dentifrices (Bardy *et al.*, 2016).
- La β -lactoglobuline peut remplacer le sérum de veau fœtal dans la culture de cellules d'hybridomes de souris avec des résultats satisfaisants tant en croissance qu'en production d'anticorps, avec un prix de revient beaucoup moins cher (Capiaumont *et al.*, 1994).
- L' α -lactalbumine, permettrait de lutter contre la déficience hormonale en sérotonine, puisqu'elle contient dans sa chaîne, en 4 exemplaires, un acide aminé rare, le tryptophane, qui rentre dans la composition de la sérotonine. Les expériences de production par génie génétique de cet acide aminé, aux USA et au Japon, ne semblent pas concluantes (Pearce, 1983).
- Pour certains types d'alimentation spécifique ou généralement pour tous ceux qui pour une raison quelconque (ablation partielle de l'intestin, maladie immunodéficitaire, syndromes allergiques...) ne peuvent s'alimenter normalement, l'INRA (France) a mis au point, à partir du lactosérum, une solution nutritive composé uniquement de petits fragments protéiques, directement assimilables par l'organisme pour synthétiser les protéines dont il a besoin (Roger, 1979).
- Les protéines du lactosérum sont utilisées dans les laits infantiles pour augmenter le taux des protéines sériques (plus élevé dans le lait maternel que dans le lait de vache) (Hilpert *et al.*, 1977; Fukumoto *et al.*, 1994).
- Elles sont utilisées dans le monde du conditionnement physique et "bodybuilding", car ces protéines jouent un grand rôle dans la construction des fibres musculaires qui ont subi des micro-déchirures lors de l'entraînement (FAO, 1995).
- Les protéines du lactosérum peuvent donner d'excellents gels pouvant être utilisés dans certains desserts comme les glaces, les crèmes et les flans (Kinsella, 1984). Elles sont également utilisées en boulangerie, biscuiterie, charcuterie et salaisonnerie pour l'apport

protéique, leur valeur nutritionnelle, la rétention d'eau, leur pouvoir gélifiant et leurs propriétés moussantes (Plock et Kessler, 1992; Bardy *et al.*, 2016).

1.1.4.3. Fermentations diverses du lactosérum

Le lactosérum constitue un excellent milieu de culture, notamment pour tous les micro-organismes susceptibles de métaboliser le lactose. Il peut être soumis à de nombreuses fermentations conduisant à des acides, des alcools, des enzymes, des vitamines, des boissons alcoolisées ou non (Veisseyre, 1979). En effet, l'utilisation des micro-organismes a trouvé dans ces industries un champ d'application privilégié pour obtenir toute une gamme de produits de plus en plus élaborés (Hansen, 1980; Roukas *et al.*, 1991).

Quelques types de fermentations réalisées jusqu'à présent sur le lactosérum sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les fermentations du lactosérum (Yang et Silva, 1995; Benaissa, 2010).

Produits	Organismes	Milieu	Référence
P.O.U	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Lactosérum doux Lactosérum acide Lactosérum + E.L	Reinbold et Takemoto, 1988 Marwson, 1988 Gomez et Castillo, 1983 Sandhu et Waraich, 1983 Djaghri <i>et al.</i> , 2007a
Alcool	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactosérum des fromages blanc Lactosérum acide	Gawel et Kosikowski, 1978 Tin et Mawson, 1993
Bio-éthanol	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactosérum	Sooch et Singh, 2002
Levure de boulangerie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Perméat de lactosérum	Champagne <i>et al.</i> , 1990
Acide lactique	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Perméat de lactosérum acide + E.L Perméat de lactosérum Lactosérum doux Lactosérum	Mehaia et Cheryern, 1986 Chiarini <i>et al.</i> , 1992 Boudjemaa, 2009 Amrane et Prigent, 1997 Amrane et Prigent, 1998
Acide acétique	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Clostridium formicoaceticum</i>	Lactosérum + E.L	Tamura <i>et al.</i> , 1993
Propionate	<i>Propionobacterium acidipropionici</i> <i>Propionobacterium</i> sp.	Perméat de lactosérum Lactosérum doux Lactosérum	Yanq <i>et al.</i> , 1994 Crow, 1988 Briczinski et Roberts, 2002
Polysaccharide	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> RR <i>Apiotrichum curvatum</i> <i>Candida curvata</i>	Perméat de lactosérum	Ykema <i>et al.</i> , 1988 Floetenmeyer <i>et al.</i> , 1985
Huile			
Enzymes	<i>Aspergillus niger</i>	Lactose	Leuchtenberger <i>et al.</i> , 1989
β-Galactosidase	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Lactosérum + E.L	Gomez et Castillo, 1983
Acétone-butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Perméat de lactosérum + E.L	Ennis et Maddox, 1985
Lysine	Mutant d' <i>Escherichia coli</i>	Lactosérum	Sobotkova <i>et al.</i> , 1989
Vitamine B12	<i>Propionibacterium</i> sp <i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Aspergillus niger</i>	Perméat de lactosérum Lactosérum doux + E.L	Marwaha <i>et al.</i> , 1983
Acide citrique		Perméat de lactosérum	Somkuti et bencivengo, 1981
Acide L-ascorbique	Mutant de <i>Candida norvegensis</i>	Perméat de lactosérum doux	Cayle <i>et al.</i> , 1989
Glycerol	<i>K. fragilis</i>	Perméat de lactosérum	Jeng <i>et al.</i> , 1989
Insecticides	<i>K. marxianus</i>		Rapin <i>et al.</i> , 1994
Gomme de Xanthane	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Xanthomonas campestris</i>	Lactosérum doux Perméat de lactosérum hydro- lysé + E.L	Salama <i>et al.</i> , 1983 Maldonado, 1992

P.O.U. : Protéines d'Organisme Unicellulaire

1.2. Généralités sur les bactéries lactiques

1.2.1. Définition

Les bactéries lactiques regroupent plusieurs genres dont le caractère commun est la production de l'acide lactique suite à la fermentation de glucides (Labioui *et al.*, 2005). Elles sont non pathogènes et comptées, pour la majorité, parmi les microorganismes « GRAS » (« Generally Recognized As Safe ») par la « Food and Drug Administration » (FDA) (Trias *et al.*, 2008). Néanmoins, certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets, Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative et généralement nitrate réductase négative. Elles sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème. Elles sont capables de croître dans un intervalle de températures allant de 5 °C à 45 °C. Le pH optimal de croissance varie de 5,0 à 9,0 mais elles tolèrent les milieux acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6) (Caplice et Fitzgerald, 1999; Van de Guchte *et al.*, 2002). Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Larpent, 1989; Novel, 1993).

1.2.2. Taxonomie des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen en 1919. Actuellement et suite à plusieurs révisions taxonomiques, ce groupe compte plusieurs genres qui appartiennent tous au phylum Firmicutes, à la classe *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. Par contre, il est représenté par différentes familles (Brenner *et al.*, 2005) (Tableau 3).

Tableau 3: Familles et principaux genres des bactéries lactiques
(Brenner *et al.*, 2005).

Familles	Principaux genres
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Weissella sp.</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Tetragenococcus sp.</i> , <i>Vagococcus sp.</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus sp.</i>

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont parfois considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de leurs propriétés physiologiques et biochimiques et à leur présence dans le même habitat écologique. Cependant, ces microorganismes appartiennent au phylum *Actinobacteria* et sont donc phylogénétiquement éloignés des bactéries lactiques (Trias, 2008). Les bactéries lactiques forment donc un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect et de leur habitat.

1.2.3. Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très répandues dans la nature, elles peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. Dans certains écosystèmes comme le lait elles sont dominantes, dans d'autres elles sont minoritaires.

Leurs grandes exigences nutritionnelles les associent à des environnements naturels particulièrement riches en nutriments; plantes, animaux, produits laitiers et carnés. Grâce à des phénomènes de synergie ou de coopération, différentes espèces de bactéries lactiques sont très souvent associées dans un habitat donné (Marshall, 1987).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (Sandine, 1988).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (Jones, 1978).

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification (Suhigara, 1985) et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Devoyod et Poullain, 1988). Tandis que, Ryhänen *et al.*, (1996) ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus*, *Ln. Citreum* et *Ln. Mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté. Seule l'espèce *Leuconostoc oenos* est isolée du vin (cette bactérie est absente du lait) (Fleming *et al.*, 1985; Sugihara, 1985; Devoyod et Poullain, 1988; Hounhoïgan *et al.*, 1993).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (saucisses, anchois salés

ou sauce de soja) (Chapman et Sharpe, 1981; Dellaglio *et al.*, 1981; Uchida, 1982; Bacus et Brown, 1985; Villar *et al.*, 1985).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Demazeaud, 1996).

1.2.4. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Les besoins nutritionnels varient beaucoup d'un groupe bactérien à un autre. Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont, en principe, incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de l'environnement, elles sont considérées comme un groupe bactérien exigeant du point de vue nutritionnel. Ces exigences ont été déterminées par leur aptitude à croître ou non dans un milieu chimiquement défini (MCD). Les MCDs contiennent des sels minéraux, une source de carbone, des vitamines, des acides aminés et des bases azotées, et ont été développés pour différents genres bactériens: *Lactobacillus* (Morishita *et al.*, 1974; Morishita *et al.*, 1981; Ledesma *et al.*, 1977; Lauret *et al.*, 1996; Grobbsen *et al.*, 1998; Chervaux *et al.*, 2000; Christensen et Steele, 2003), *Lactococcus* (Poolman et Konig, 1988), *Leuconostoc mesenteroides* (Foucaud, 1997), *Streptococcus thermophilus* (Letort et Juillard, 2001) et *Enterococcus* (Murray *et al.*, 1993).

1.2.4.1. Exigences en vitamines

Toutes les espèces de bactéries lactiques présentent une exigence absolue en acide pantothénique (B5) et en niacine (B3) et des exigences différentes pour les autres vitamines.

Les déficiences en cobalamine (B12) peuvent induire une diminution de la synthèse d'ADN et entraîner des changements morphologiques, les cellules devenant filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a aussi été rapportée pour *Lb. helveticus* subsp. *jugurti* lors de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique (B9).

Bien que les résultats obtenus par les différents auteurs sur les besoins en vitamines ne concordent pas toujours, il apparaît clairement que plusieurs vitamines du groupe B sont essentielles au métabolisme de l'ensemble des bactéries lactiques (de Roissart et Luquet, 1994).

1.2.4.2. Exigences en bases azotées

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques, il semble que l'influence des composés nucléotidiques soit plus forte sur les lactobacilles que sur les lactocoques et les leuconostocs.

Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanosine, de thymidine et d'uracile (Ledesma *et al.*, 1977). L'acide orotique, qui est un intermédiaire de la synthèse des bases puriques, est un facteur de croissance pour *Lb. bulgaricus*. Il régule la synthèse des acides ribonucléiques, tandis que la synthèse des acides désoxyribonucléiques n'est pas affectée. En général, chez les lactobacilles, les exigences en bases azotées sont très variables selon les souches; l'addition de ces composés peut même, chez certaines souches, entraîner des phénomènes d'inhibition de la croissance (Desmazeaud, 1992).

La production d'acide par les lactocoques peut être stimulée, notamment dans le lait, par le mélange adénine, guanine, uracile et xanthine (Selby-Smith *et al.*, 1975), pour cette espèce, la présence de glucose stimule fortement la prise d'adénine mais aucun effet sur celle de la guanine (Hillier *et al.*, 1978).

1.2.4.3. Exigences en acides aminés

Les besoins en acides aminés (ou auxotrophie) des bactéries lactiques sont variables entre les différents genres bactériens, voire au sein d'une même espèce. Ainsi, *St. thermophilus* est la bactérie lactique la moins exigeante (tableau 4). Seules la leucine et la valine semblent nécessaires à sa croissance en MCD, même si plusieurs autres acides aminés (cystéine, méthionine, phénylalanine, tryptophane) peuvent stimuler son développement. Les genres *Enterococcus* et *Leuconostoc* sont caractérisés par 5 à 9 auxotrophies très proches (tableau 4). Les auxotrophies de *Lactococcus lactis* se situent entre 7 et 12 selon les souches. la sous-espèce *lactis* n'exige que 7 acides aminés par contre la sous-espèce *cremoris* est plus exigeante. Les lactobacilles homofermentaires (comme *Lb. delbrueckii* et *Lb. helveticus*) ainsi que les hétérofermentaires facultatifs (comme *Lb. casei*, *Lb. sakei* et *Lb. curvatus*) sont les bactéries lactiques les plus exigeantes, avec de 11 à 17 auxotrophies. On note une exception avec l'espèce *Lb. plantarum* qui est caractérisée par au maximum 7 auxotrophies, proches de celles des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires (comme *Lb. brevis*, *Lb. buchneri* et *Lb. fermentum*). Le tableau 5 montre les exigences en acides aminés de quelques souches *Lactobacillus*.

Tableau 4 : Besoins en acides aminés de *Sreptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*et *Lactococcus lactis* (Stiles et Holzapfel, 1997)

Acide aminé	<i>Sreptococcus thermophilus</i>					<i>Enterococcus faecalis</i>				<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				<i>Lactococcus lactis</i>						
														Ssp. lactis		Ssp. cremoris				
	ST 1	ST 7	ST 8	ST 11	ST 18	OG 1	JH 262	ATCC 29212	10 isolats	CNRZ 1463	CNRZ 1697	CNRZ 1750	CNRZ 1694	CNRZ 1076	CNRZ 1124	MG 1363	AM 1	E 8	SK 11	Wg 2
L-Acide aspartique	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Acide glutamique	-	-	-	S	-	S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL/L Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-Arginine	-	-	S	-	-	S	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
L-Asparagine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L-Cystéine	S/+	S	S	S	S	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Glycine	-	-	-	-	-	S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Isoleucine	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucine	S/+	S/+	S/+	S/+	S/+	S/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lysine	S	-	S	S/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-
L-Méthionine	S	S	S	S	S	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Phénylalanine	-	S	S	S	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
L-Proline	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L-Sérine	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	S	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Thréonine	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-	-	S	-	S	S
L-Tryptophane	S	-	S	S	S/+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
L-Valine	S	S/+	S/+	S/+	S/+	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Auxotrophie totale	2	1	4	3	3	5	9	9	9	7	9	5	5	7	7	6	10	12	10	11

+ : essentiel ; - : non essentiel ; ND : non déterminé ; S : effet stimulant

Tableau 5 : Besoins en acides aminés des lactobacilles (Stiles et Holzapfel, 1997)

Acide aminé	Lactobacilles homofermentaires								Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires			Lactobacilles Hétérofermentaires facultatifs								
	<i>Lb. acidophilus</i>		<i>Lb. delbrueckii</i>			<i>Lb. helveticus</i>			<i>Lb. brevis</i> NCTC 8107	<i>Lb. buchneri</i> NCDO 110	<i>Lb. fermentum</i> ATCC 9338	<i>Lb. casei</i>		<i>Lb. plantarum</i>		<i>Lb. sakei</i>			<i>Lb. curvatus</i>	
	NCTC 1899	ATCC 11506	NCDO 213	<i>Ssp bulgaricus</i> CNRZ 397	<i>Ssp bulgaricus</i> NCFB 2772	CRL 1062	CRL 974 ATCC 15009	CNRZ 32				ATCC 7469	S1	ATTC 8414	ATCC 10241	23	55	64	LR 102	LR 126
L-Acide aspartique	ND	+	ND	-	S	-	-	ND	ND	ND	-	ND	+	S	ND	-	-	-	+	+
L-Acide glutamique	+	+	+	+	S	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
DL/L Alanine	-	S	-	+	+	-	S	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	S	S
L-Arginine	S	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	S	-	+	+	+	+	+
L-Asparagine	S	-	+	-	S/+	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	ND	ND
L-Cystéine	-	+	+	-	+	-	S	ND	-	+	-	+	S	S	-	-	-	-	+	+
L-Glutamine	-	-	-	-	S	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	ND	ND
Glycine	-	S	+	-	S	-	S	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
L-Histidine	-	+	+	+	+	+	+	ND	S	-	S	-	-	-	-	+	+	+	+	+
L-Isoleucine	S	+	-	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+	S	+	+	+	+	+
L-Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/+	+	+	+	+	+
L-Lysine	-	S	-	-	+	-	+	ND	-	-	-	S/-	+	-	-	+	+	+	+	+
L-Méthionine	-	+	+	+	+	+	+	+	S	-	+	S/-	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Phénylalanine	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	S	+	-	+	+	+	+	+
L-Proline	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
L-Sérine	-	+	-	+	+	+	S	ND	-	-	-	S/-	+	-	-	S	S	S	+	+
L-Thréonine	-	+	-	-	S/+	+	+	+	-	-	-	S/-	+	S	-	+	+	+	+	+
L-Tryptophane	S	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	+	S/+	S	S	S	S	+
L-Tyrosine	S	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	S	S	+	+	+	+	+
L-Valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Auxotrophie totale	3	15	11	13	16	13	13	14*	8	5	9	10	12	7	4	14	13	15	16	17

+ : essentiel ; - : non essentiel ; ND : non déterminé ; S : effet stimulant ; * : détermination incomplète

1.2.4.4. Influence des cations

- **Magnésium**

C'est le principal cation divalent chez les cellules vivantes. Il est lié aux nucléotides intracellulaires et intervient dans les systèmes de transport intra-membranaires. Le magnésium est un activateur des différentes réactions métaboliques : division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique. De plus, le magnésium est essentiel pour les phosphokinases impliquées dans la glycolyse. Cet ion serait indispensable pour la croissance de *Lb. helveticus* et essentiel pour celle de *Lb. delbrueckii* (Desmazeaud, 1992).

Amouzou *et al.* (1985) ont montré le rôle de Mg^{2+} sur les lactocoques : leurs formes ionisées entraînent une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres.

- **Manganèse**

Le manganèse est nécessaire à la structure et le fonctionnement des enzymes, dont l'ARN polymérase, la LDH, la NADH oxydase (Archibald, 1986), la superoxyde dismutase et la catalase formée lors de la croissance sur hématine de *Lactobacillus*. (Johnston et Delwiche, 1965).

Il est nécessaire pour la détoxification des cellules mises en présence de l'oxygène. Dans ce cas notamment chez *Lb. plantarum*, le manganèse se substituerait au superoxyde dismutase pour éliminer les radicaux $O_2^{\cdot-}$ superoxyde (Desmazeaud, 1992).

Par ailleurs, l'addition de Mn^{2+} au milieu de culture peut stimuler considérablement la croissance des lactobacilles durant la fermentation (Leroy *et al.*, 2004).

- **Fer**

Le fer n'a pas d'action générale sur la croissance ou sur la production d'acide lactique (Boyaval, 1989). *Lb. plantarum* n'exige pas le fer et ne l'accumule pas (Archibald et Fridovich, 1981). Certaines souches de leuconostocs peuvent être stimulées par des ions Fe^{3+} à une concentration comprise entre 10 et 100 mg/L. (De Roissart et Luquet, 1994)

- **Calcium**

Il est souvent cité pour son rôle dans la paroi cellulaire en particulier pour l'activité des protéases de paroi. Il stimule la croissance de *Lb. casei*.

- Autres cations :

- Le **Potassium**, joue un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire. Cet ion est exigé pour la croissance de *Lb. helveticus* et *Lb. casei*.
- Le **Sodium**, exerce un effet sélectif sur les différentes espèces.
- Le **Cadmium**, contaminant du lait à faible concentration (6.10^{-5} mM), peut inhiber la croissance et la production d'acide chez *Lb. delbrueckii* et *Lb. helveticus* (Korkeale *et al.*, 1984).
- Le **Césium** inhibe la croissance de *Lb. arabinosus* dès 2,25 mM (Boyaval, 1989).
- Le **Cuivre**, inhibe la croissance de *Lb. casei* et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dans le lait et la production d'acide lactique pour des concentrations variant selon les espèces, entre 10^{-2} et 10^{-4} M (Boyaval, 1989). Le cuivre augmente la production de diacétyle (Kaneko *et al.*, 1987).
- Le **Cobalt**, partie intégrante de la vitamine B12, n'est pas exigé par *Lb. arabinosus* ni par *Lb. delbrueckii* (Boyaval, 1989).

1.2.5. Milieux de culture pour les bactéries lactiques

Malgré une importance considérable dans le domaine agro-alimentaire, la croissance des bactéries lactiques reste un phénomène fastidieux qui nécessite un apport complexe, aussi bien qualitativement que quantitativement, en éléments nutritifs. Actuellement de nombreux milieux riches et complexes, comme le milieu MRS (De Man *et al.*, 1960) ou M17 (Terzaghi et Sandine, 1975), sont disponibles et conviennent spécialement à la culture des bactéries lactiques. Ils contiennent des sources d'azote complexes tels que la peptone, l'extrait de levure et l'extrait de viande, ainsi que d'autres facteurs de croissance. Cependant leur utilisation est limitée à des usages spécifiques à cause de leurs coûts élevés.

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'optimisation des milieux de culture pour les bactéries lactiques par l'ajout de sources d'azote. Diverses sources d'azote ont été testées : extrait soluble de maïs (Kurbanoglu, 2004), hydrolysats protéiques du lactosérum (Cornelius *et al.*, 1996; Marcela *et al.*, 2016), extrait de germes de malt (Mc Comas et Gilliland, 2003 ; Watanabe *et al.*, 2004), hydrolysats de caséines (Vahvaselkä et Linko, 1987; Chiarini *et al.*, 1992; Horáčková, 2014), cellules de levure (Altaf *et al.*, 2007), substrat végétal (Gardner *et*

al., 2001; Nancib *et al.*, 2001; Chalampopoulos *et al.*, 2002; Djeghri-Hocine *et al.*, 2006; Djeghri-Hocine *et al.*, 2007a), jus de la canne à sucre (Preeti *et al.*, 2016), jus de palme (Reddy Tadi *et al.*, 2017), hydrolysats de viscères de poisson (Horn *et al.*, 2007), jaune d'œuf (Djeghri-Hocine *et al.*, 2007b). La source d'azote la plus efficace semble être l'extrait de levure, mais ce produit est onéreux en production industrielle. Pour réduire les coûts, des tentatives ont été donc faites de remplacer l'extrait de levure par des extraits de bactéries lactiques (Amrane, 2000 ; Gaudreau *et al.*, 2005; Guha *et al.*, 2013; Vethakanraj *et al.*, 2013). La substitution de l'extrait de levure par des autolysats des cellules de levures a été également testé (Barallé et Borzani, 1988; Amrane et Prigent, 1993; Timbuntam *et al.*, 2006).

Gibson et Abdel-Malek (1945) ont mis en évidence un milieu de culture pour la recherche du type fermentaire des souches. Parmi les constituants de ce dernier on trouve le jus de tomate. Le jus de tomate est riche en sources de sucres simples (essentiellement glucose et fructose), en minéraux et en vitamine B. Une augmentation de la biomasse bactérienne a été observée, un temps de génération plus court et une amélioration de la production d'acide dans le milieu.

Benaissa (2010) a optimisé un milieu de culture à base de lactosérum déprotéiné, par l'ajout d'extrait de levure et de jus de tomate qui a conduit à l'élaboration d'un milieu "peu couteux" permettant ainsi la croissance de certains lactobacilles de manière similaire à celle obtenue en milieu MRS, le tableau 6 permet de comparer les compositions physico-chimiques de l'extrait de levure et du jus de tomate (Cotte, 2000; Ghaly *et al.*, 2003).

Tableau 6: Compositions physico-chimiques de l'extrait de levure et jus de tomate
(Cotte, 2000; Ghaly *et al.*, 2003)

Constituant	Extrait de levure	Tomate crue
Composition (%)		
Eau	-	93,5
Azote total	8,8	0,75
Protéines	55	1
Glucides	-	2,57-3.6
Lipides	-	0,3
Acides aminés (%)		
Alanine	3,4	-
Acide aminobutyrique	0,1	-
Arginine	2,1	-
Asparagine	3,8	-
Cystéine	0,3	-
Acide glutamique	7,2	-
Glycine	1,6	-
Histidine	0,9	-
Isoleucine	2,0	-
Leucine	2,9	-
Lysine	3,2	-
Méthionine	0,5	-
Ornithine	0,3	-
Phénylalanine	1,6	-
Proline	1,6	-
Sérine	1,9	-
Thréonine	1,9	-
Tryptophane	-	-
Tyrosine	0,8	-
Valine	2,3	-
Sels minéraux (ppm)		
Calcium	-	2,95-3,95
Fer	-	0,6-0,8
Magnésium	-	2,5-4
Potassium	-	18,7-29,5
Sodium	-	15,7-17,6
Phosphore	-	2,4-2,9
Vitamines (ppm)		
Thiamine	20-30	0,6
Riboflavine	50-70	0,4
Pyridoxine	25-35	0,8
Niacine	600	0,5
Pantothénate de calcium	200	-

1.2.6. Principales propriétés métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques

Les bactéries lactiques ont pour principale fonction de produire de l'acide lactique et, dans certains cas, de produire des composés d'arôme ou des précurseurs. Les principales activités métaboliques impliquées sont la glycolyse, la protéolyse et la lipolyse.

Les paragraphes suivants porteront principalement sur les voies de métabolismes des sucres, du citrate et des protéines.

1.2.6.1. Métabolisme glucidique

Les bactéries lactiques transportent et accumulent les glucides soit sous forme de radicaux libres, par transport actif, soit sous forme de dérivés phosphorylés, par des systèmes phosphotransphérase-phosphoénolpyruvate dépendant (PEP-PT).

- **Systèmes de transport actif**

En 1961, Peter Mitchell a proposé une théorie pour expliquer comment le transport des électrons peut être couplé à la génération d'ATP. D'après ce concept chimiosmotique, une enzyme membranaire, l'adénosine 5'-triphosphate-phosphohydrolase, activée par le complexe $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$, couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons (2H^+) de la cellule. Le flux de protons sortant de la cellule crée une différence dans la concentration de protons et de charge électrique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique de la bactérie. Par la suite, en réponse à cette force promotrice, le sucre peut être assimilé grâce à un gradient de concentration (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

- **Systèmes PEP-PT**

Les systèmes de translocation de groupe les mieux connus sont les systèmes phosphotransférases, dépendantes du phosphoénolpyruvate (PEP-PT). Trois protéines au moins (EI, HPr et EII) sont requises pour le transport et la phosphorylation du sucre.

Ces protéines forment une chaîne de transporteurs qui prélèvent des groupes phosphate riches en énergie sur le phosphoénolpyruvate et les transfèrent au sucre qui doit pénétrer dans la cellule. Les deux premiers transporteurs sont identiques dans toutes les chaînes PTS ; il s'agit de l'enzyme EI et d'une petite protéine thermostable HPr (Heat resistant Protein). L'enzyme I, cytoplasmique est capable de s'autophosphoryler aux dépens du PEP. Suite à cette première réaction, EI catalyse le transfert du groupement phosphate acquis vers la protéine HPr. La phosphorylation de cette dernière a lieu sur l'histidine

(Kalbitzer *et al.*, 1982 ; Weigel *et al.*, 1982). Chez les bactéries à Gram positif et à faible pourcentage en GC, la protéine HPr peut également être phosphorylée sur la sérine (Figure 3). Cette réaction est catalysée par une enzyme bifonctionnelle, l'HPr kinase/phosphatase (Kravanja *et al.*, 1999). L'enzyme III cytoplasmique est inductible par le sucre, accepte le radical phosphoryl de l'HPr pour former l'EIII~P. L'EIII~P transfère le radical phosphoryle à l'EII qui effectue la reconnaissance, la liaison, la phosphorylation et la translocation du sucre à travers la membrane de la cellule. Les voies de transport et le métabolisme des glucides par les bactéries lactiques sont résumées dans les Figures 4 et 5.

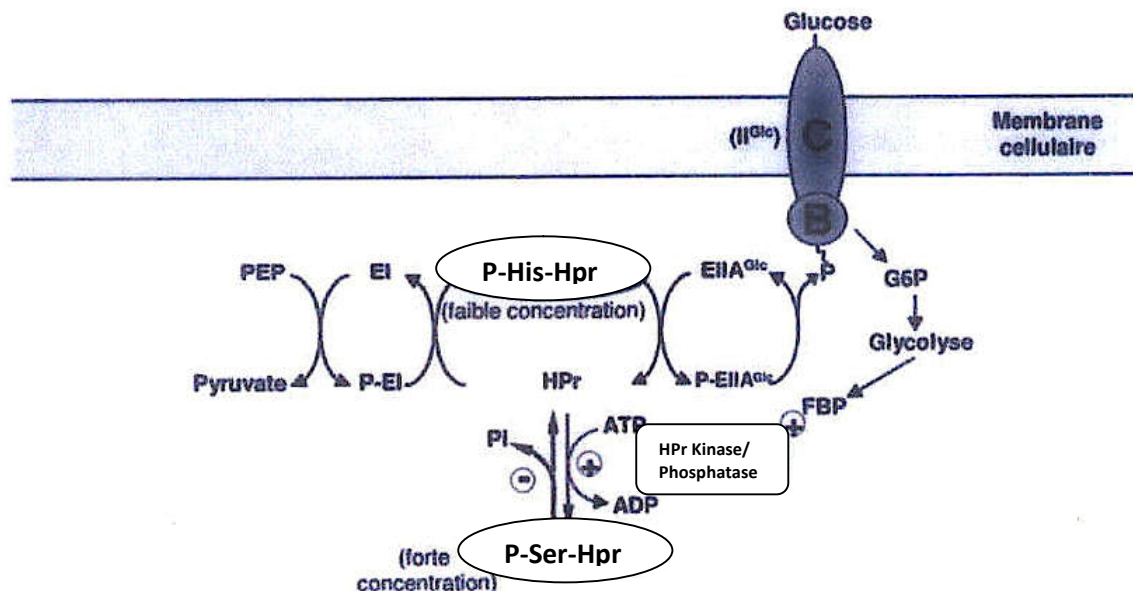
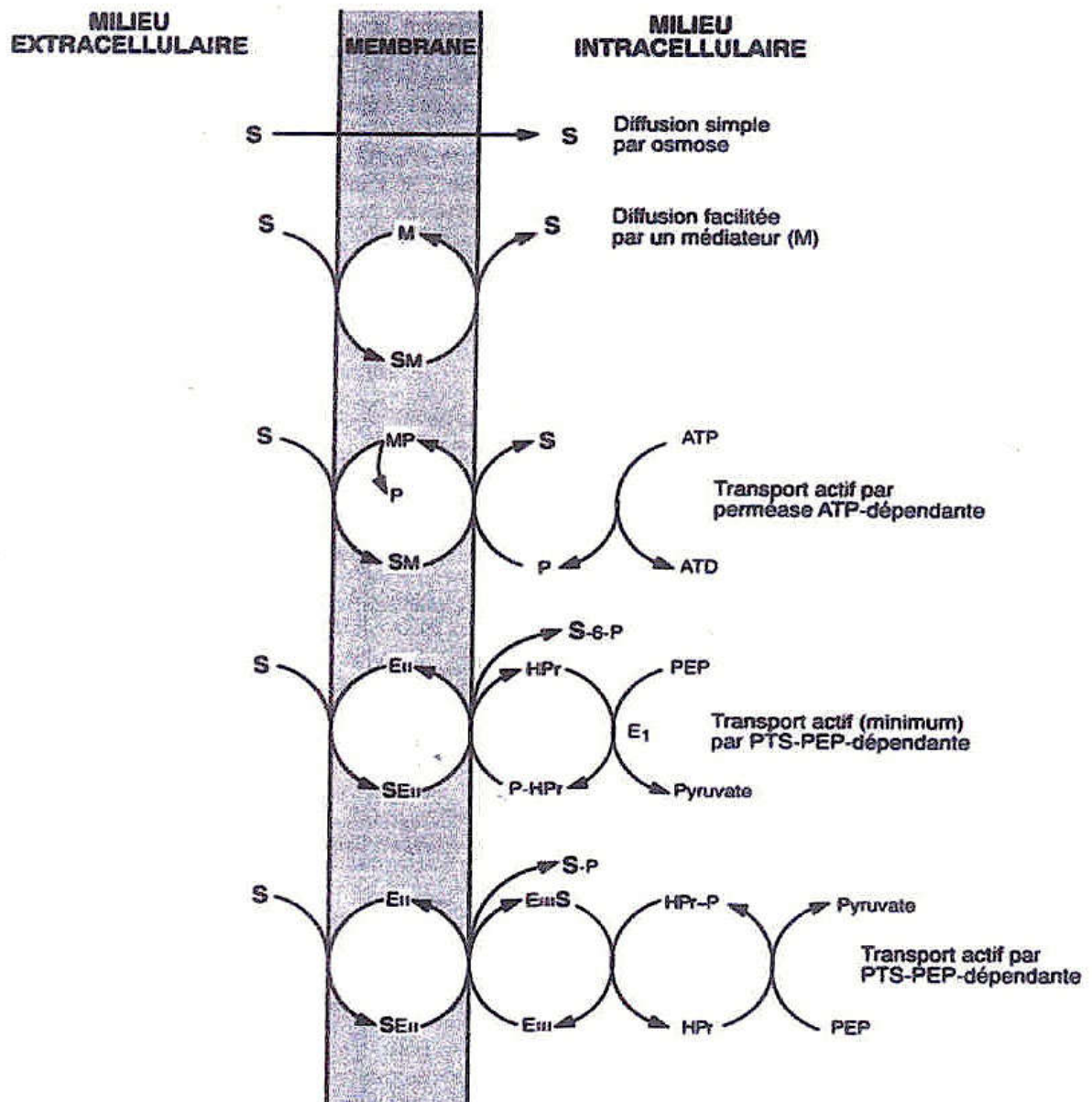


Figure 3 : Phosphorylations d'Hpr, PEP-dépendante par P~ EI ou ATP- dépendante par Hprk/P, en présence de glucose (Deutcher *et al.*, 2002)



S : Substrat assimilable
M : Médiateur de transport
ATP : Adénosine triphosphate
PEP : Phosphoénolpyruvate

Hpr : Protéine membranaire non spécifique du substrat
EI : Enzyme cytoplasmique non spécifique du substrat
EII : Enzyme membranaire spécifique du substrat
EIII : Enzyme cytoplasmique spécifique du substrat

Figure 4 : Principaux systèmes de transport des substrats à travers la membrane cellulaire (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

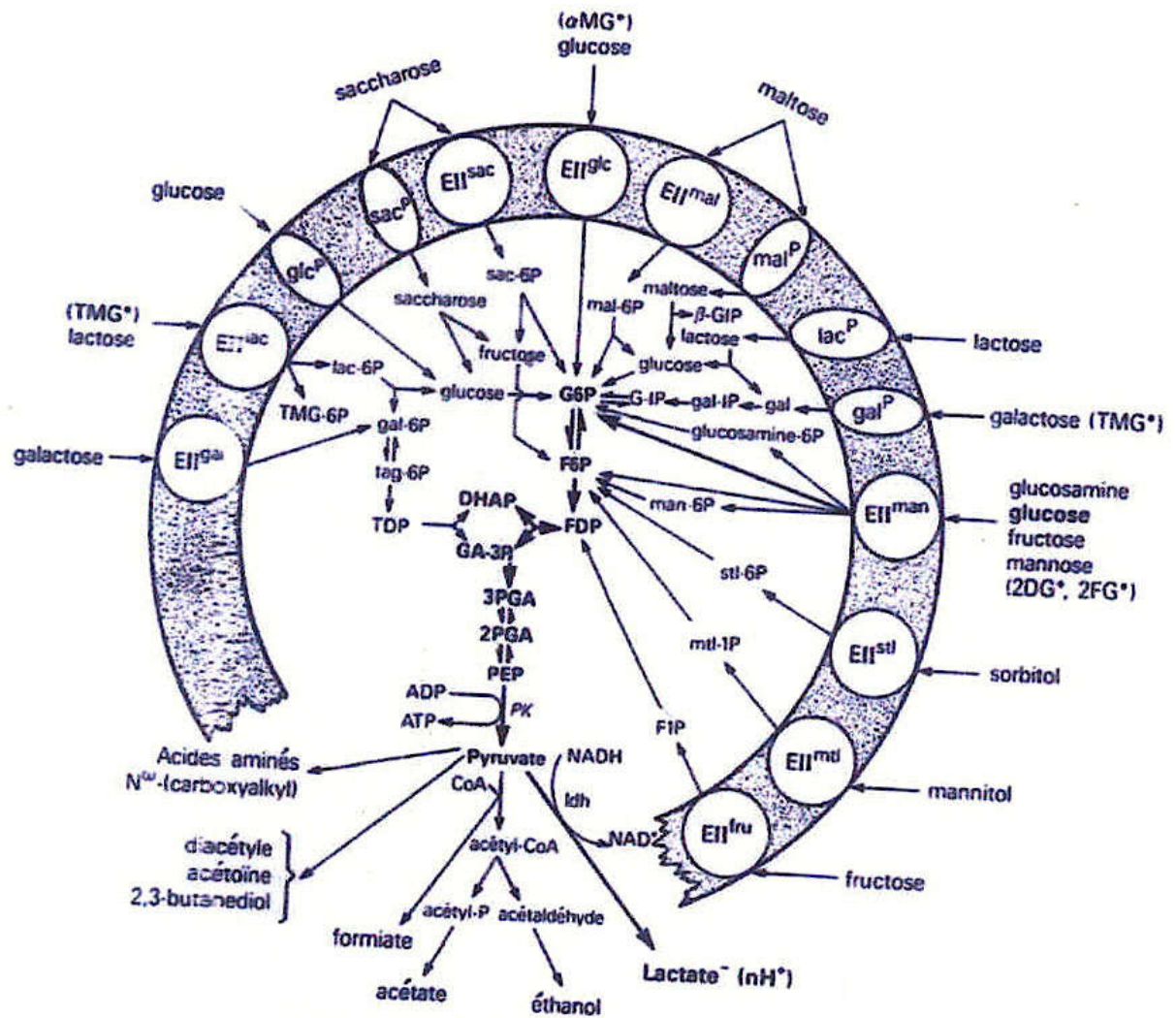


Figure 5 : Voies de transport et de métabolisme des glucides par les bactéries lactiques (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

1.2.6.1.1. Métabolisme des sucres

Comme écrit plus haut les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces, homofermentaires ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation des sucres (Figures 6 et 7).

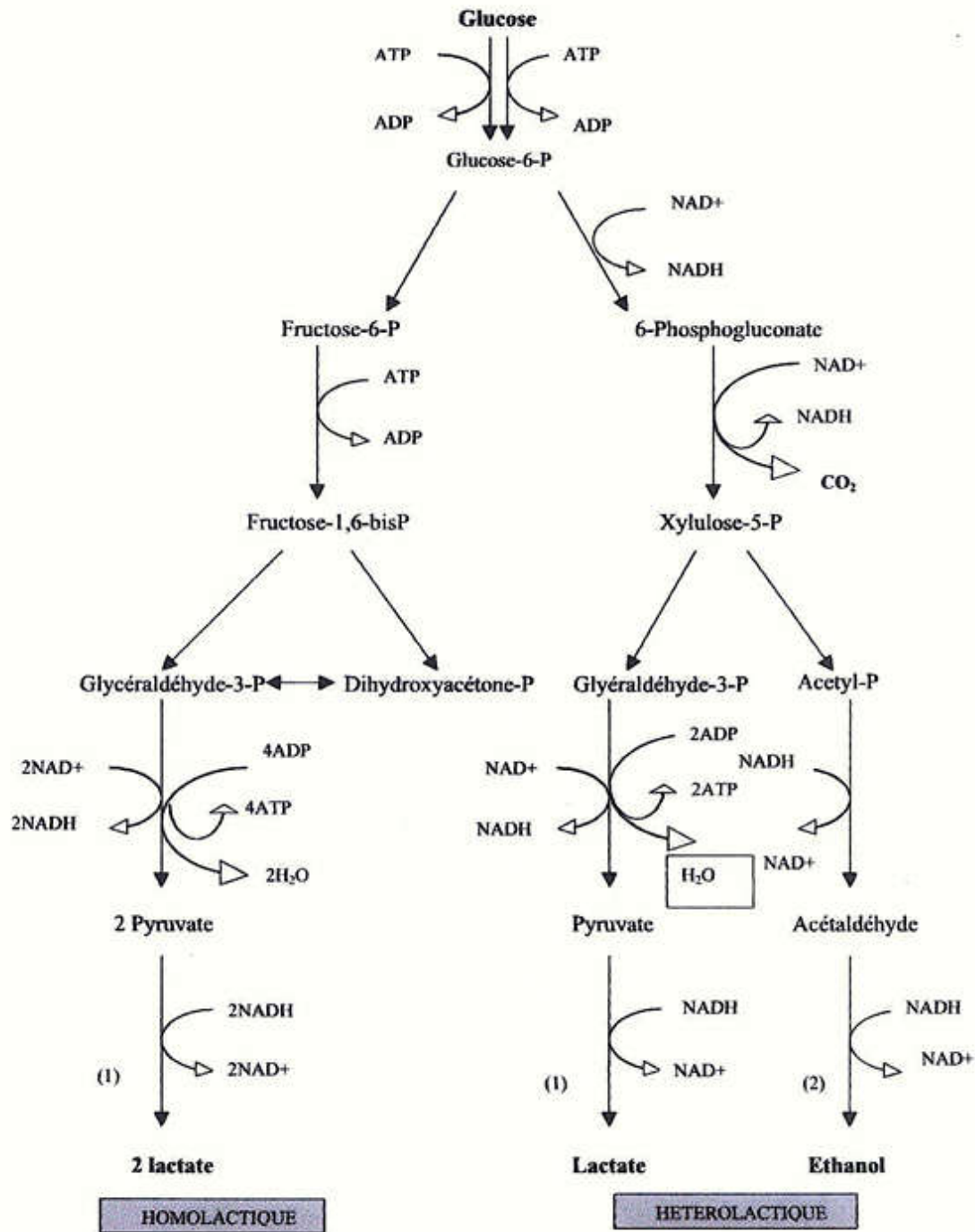
- **Voie homofermentaire ou EMP (EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS)**

Les lactobacilles homofermentaires convertissent presque exclusivement le glucose en acide lactique (90-95%). Une des enzymes clé de la glycolyse, présente dans toutes les espèces homo-fermentaires, est la fructose-1,6 diphosphate aldolase. C'est une enzyme qui transforme le fructose diphosphate en deux trioses phosphates.

Les bactéries homolactiques contiennent habituellement de fortes concentrations de fructose diphosphate (FDP). Cette molécule, importante pour la régulation, sert d'activateur de la synthèse des enzymes terminales de la voie glycolique (pyruvate kinase et lactate déshydrogénase).

- **Voie hétérofermentaire ou PPC (PENTOSE PHOSPHOCETOLASE)**

La fermentation hétérolactique doit sa dénomination au fait qu'en dehors du lactate, elle aboutit à la formation d'éthanol, de CO₂ et éventuellement d'acétate. Les bactéries lactiques hétérofermentaires ne contiennent pas de FDP aldolase ni de triose-phosphate isomérase. Elles sont également dépourvues d'un système phosphotransphérase-PEP pour le glucose. Chez ces bactéries, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif, puis est phosphorylé par une glucokinase ATP-dépendante. Le glucose-6P est transformé en acide 6P-gluconique puis décarboxylé en 5P avec libération de CO₂. Ce pentose-P est métabolisé en triose phosphate et en acétyl-P. Enfin l'acétyl-P est réduit en éthanol, et le triose phosphate est métabolisé en acide lactique par les dernières réactions de la voie EMP (Djidel, 2007).



P : Phosphate

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

(1) : Lactate déshydrogénase

(2) : Alcool déshydrogénase

Figure 6 : Principale voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.

(Wee *et al.*, 2006)

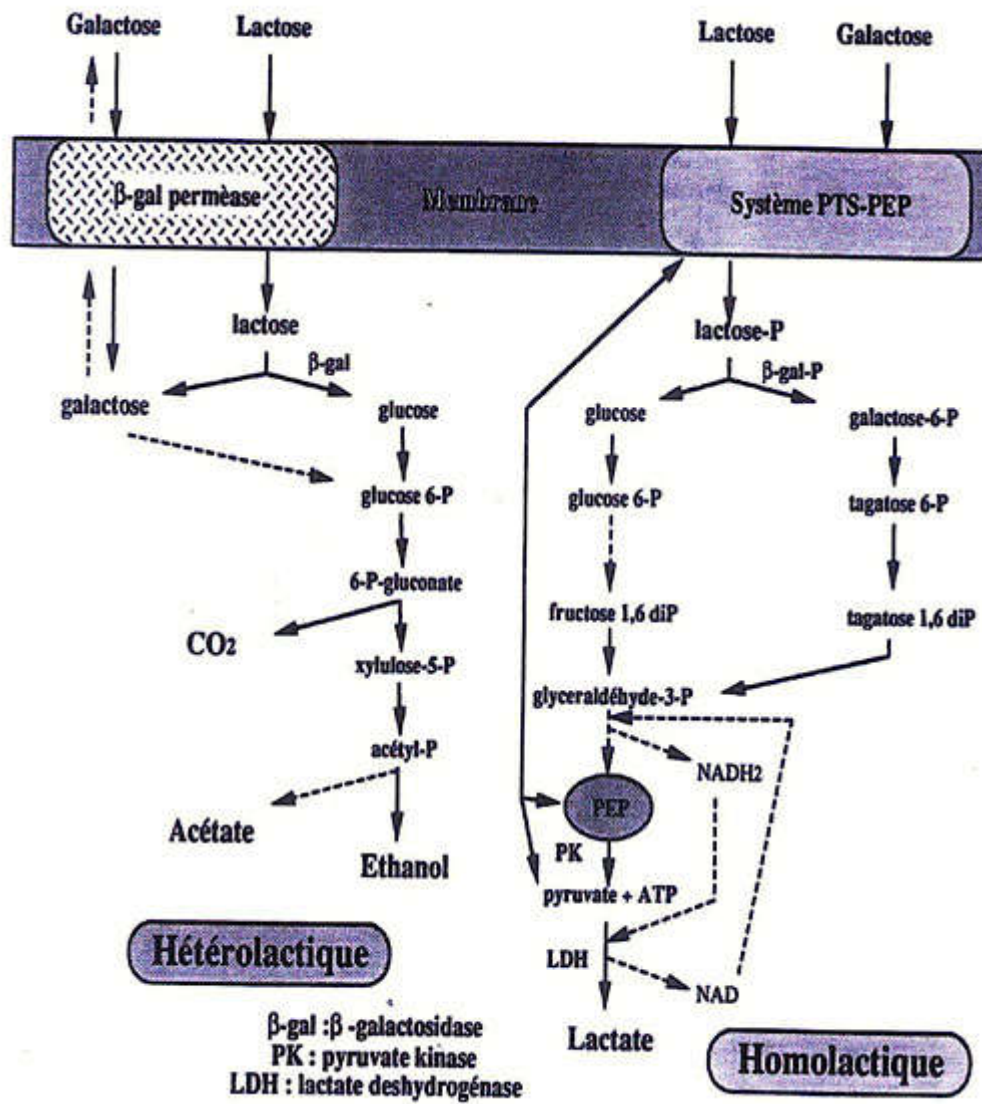


Figure 7 : Transport et métabolisme du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques. (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

1.2.6.1.2. Régulation du métabolisme des sucres

La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes :

1. le transport du sucre à travers la membrane cellulaire
2. le catabolisme intracellulaire du sucre
3. la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Cette fermentation aboutit principalement à la production d'ATP et d'acide lactique. La dégradation des hexoses est soumise à un mécanisme rapide d'activation-inhibition des enzymes allostériques dont le rôle est important pendant la croissance bactérienne. Ainsi la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en lactate fait intervenir deux enzymes allostériques : la pyruvate kinase (PK) et la lactate déshydrogénase (LDH) (toutes les deux stimulées par le fructose-1-6-diphosphate) (Crow et Pritchard, 1976 et 1977).

Le PEP constitue non seulement une étape de la chaîne glycolytique, mais intervient aussi dans le transport des sucres à travers la membrane. Il a été constaté que lorsqu'une bactérie lactique est soumise à une carence en sucre, la teneur en PEP croît notablement (inhibition de la pyruvate kinase), tandis que les intermédiaires métaboliques qui stimulent la PK décroissent (Otto *et al.*, 1985; Poolman *et al.*, 1987). Dans ces conditions, la dégradation se ralentit mais produit assez d'ATP pour entretenir la vie cellulaire et la concentration élevée en PEP permet la reprise du transport du sucre dès que celui-ci est à nouveau disponible (Thomas, 1976; Thompson et Thomas, 1977).

1.2.6.1.3. Régulation du système de transport des sucres

De nombreux facteurs déterminent si un sucre donné sera ou non transporté par des bactéries lactiques, et les mécanismes de transport sont soumis à diverses contraintes génétiques ou environnementales. Pour accumuler un sucre donné, une bactérie doit posséder l'information génétique correspondante à la protéine de transport appropriée.

- **Transport préférentiel des sucres**

La protéine HPr peut être présente sous trois formes : HPr phosphorylée, HPr phosphorylée par l'enzyme EI sur l'histidine et HPr phosphorylée par une protéine kinase (HPrK/P) sur la sérine. Cette dernière enzyme joue un rôle clé dans la régulation du transport par le PTS et dans la répression/activation catabolique. En présence d'un sucre rapidement métabolisable comme le glucose, l'activité augmente et conduit à l'augmentation de la concentration en fructose diphosphate (FDP) et en ATP (Thompson

et Torchia, 1984; Neves *et al.*, 1999; Mijakovic *et al.*, 2002), l'HPK/P, stimulée par ces effecteurs, va phosphoryler l'HPr de façon ATP-dépendante sur la sérine (Galinier *et al.*, 1997; Galinier *et al.*, 1998; Reizer *et al.*, 1998; Jault *et al.*, 2000; Ramstrom *et al.*, 2003).

Lors d'études concernant le transport des sucres pour de cellules au repos de *Lactococcus lactis* ML₃, Thompson *et al.*, (1978) ont montré que dans un mélange de sucres métabolisables (glucose, galactose et lactose) et d'analogues non métabolisables (2-désoxy-glucose ou 2-DG et méthyl-β-D-thiogalactopyranoside ou TMG) la souche transporte de préférence le glucose et son analogue. Ce transport préférentiel a été attribué (1) à la compétition entre les différents enzymes II (EII) pour le donneur commun de phosphoryles, L'HPr-P, (2) à la compétition entre les substrats (lactose et TMG) pour EII^{lac} commune.

• Exclusion de l'inducteur

De manière générale, on peut distinguer deux facettes dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme du carbone. Le mécanisme global de la répression/activation catabolique qui permet, d'une part de réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone non préférentielles en présence de sucre rapidement métabolisable comme le glucose (Luesink *et al.*, 1998) et d'autre part, à l'opposé, de stimuler l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation de ces sources préférées de carbone et d'énergie. En présence d'un mélange de glucose, lactose et galactose, les cellules de *Lactococcus lactis* ML3 co-métabolisent le glucose et le lactose, mais le galactose n'est consommé qu'après épuisement des sucres précédents (Thompson *et al.*, 1978). Liberman et Bleiwiss (1984) ont décrit lors de la croissance en présence de glucose et de lactose dans le milieu de culture, des profils de croissance diauxique, ainsi qu'un métabolisme sélectif du glucose par rapport au lactose pour plusieurs espèces bactériennes. L'utilisation préférentielle du glucose est une conséquence de l'exclusion des molécules non préférentielles de la cellule (Figure8) (Saier et Crasnier, 1996). Chez *Lactococcus lactis* la protéine HPr-sérine interagit avec la perméase PTS spécifique du lactose pour inhiber son activité (Ye *et al.*, 1994).

On peut citer aussi l'exemple de l'accumulation de galactose dans différents milieux de culture et qui est due à la fermentation incomplète du lactose par *Streptococcus thermophilus* (Hutkins *et al.*, 1985). Contrairement à l'idée qui a longtemps prévalu, l'incapacité de cette souche à métaboliser le galactose n'est pas dû à l'absence de l'information génétique requise pour la synthèse des voies cataboliques appropriée. Les

causes de ce phénotype ne sont pas connues : il serait dû en partie à une répression sévère de la synthèse de ces enzymes exercée par le glucose issu de l'hydrolyse du lactose. Ce phénomène d'inhibition de l'utilisation d'une source de carbone secondaire par la présence d'un sucre métabolisable est appelé répression catabolique (Miwa *et al.*, 2000).

- **Expulsion de l'inducteur**

Il s'agit de mécanisme par lequel l'ajout d'un sucre rapidement métabolisable dans le milieu de culture conduit à l'expulsion des autres sucres préalablement accumulés dans le cytoplasme (Reizer et Panos, 1980; Thompson et Saier, 1981; Luesink *et al.*, 1998).

Chez *Lactococcus lactis* le méthyle- β -D-thiogalactopyranoside (TMG) est accumulé dans la cellule sous forme phosphorylée (TMG-6P). mais l'ajout d'un sucre rapidement métabolisé provoque une expulsion du TMG sous forme déphosphorylée (Thompson et Saier, 1981). Ainsi en présence de glucose, HPr se trouve majoritairement sous la forme HPr-Ser-P (Deutcher et Saier, 1983; Deutcher *et al.*, 1986). Celle-ci stimule l'activité d'une hexose-phosphate-phosphohydrolase qui va alors déphosphoryler le sucre phosphate pour permettre son expulsion hors la cellule (Reizer *et al.*, 1983; Thompson et Chassy, 1983). La figure 9 illustre ce mécanisme d'expulsion de l'inducteur.

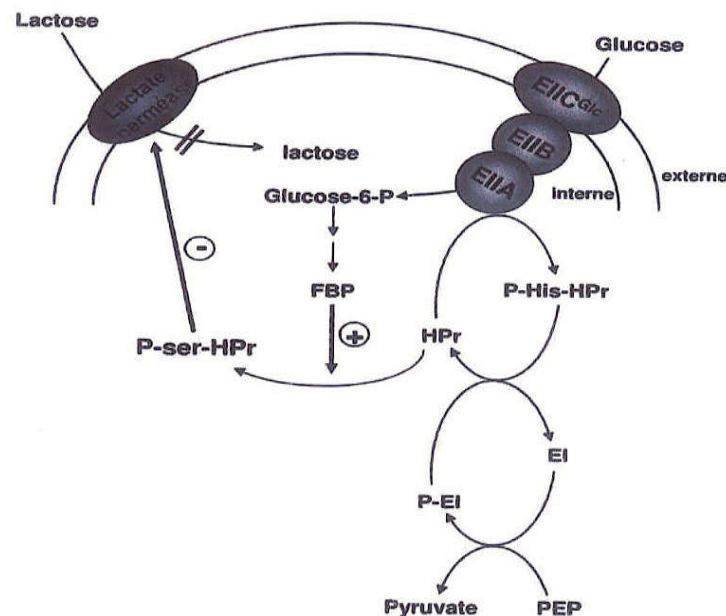


Figure 8 : Modèle d'exclusion de l'inducteur chez les bactéries à Gram positif.
(Saier et Crasnier, 1996)

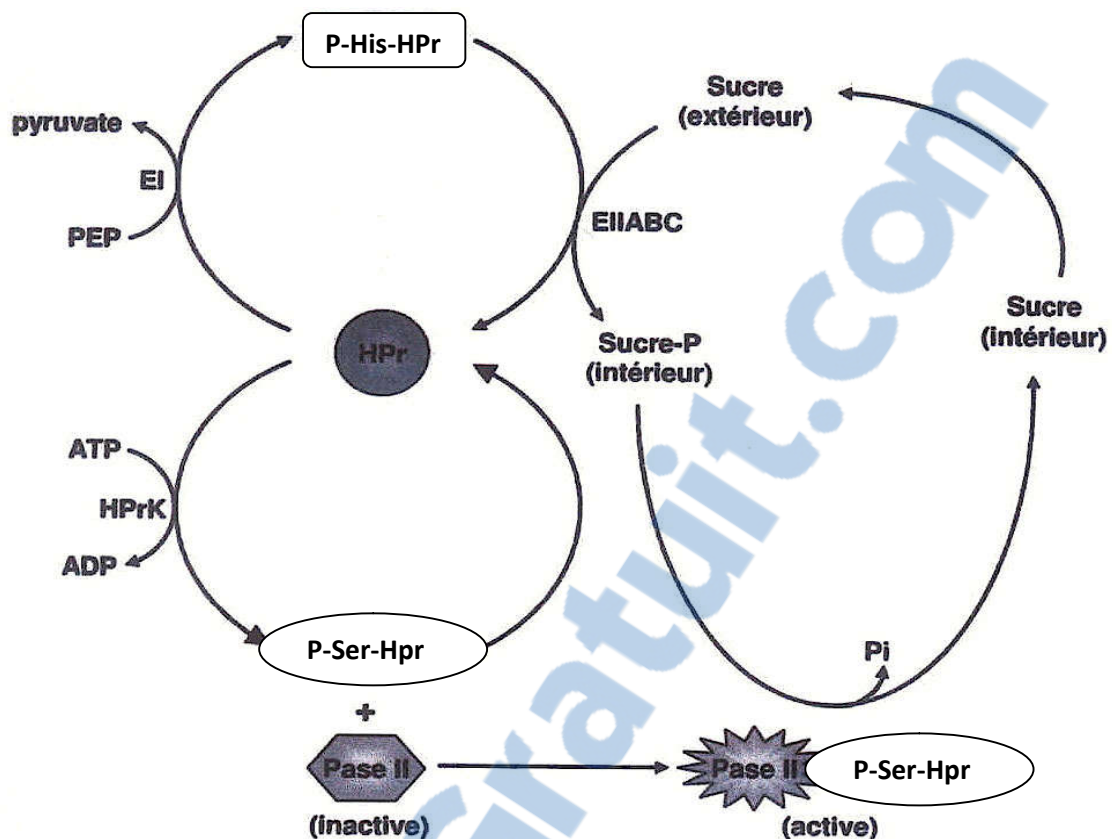


Figure 9 : Modèle du mécanisme d'expulsion de l'inducteur chez les bactéries à Gram positif (Saier et Crasnier, 1996).

1.2.6.2. Protéolyse et nutrition azotée des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques forment la flore bactérienne principale des aliments fermentés, elles ont un mécanisme intrinsèque pour la métabolisation des protéines (notamment alimentaires). Cette activité protéolytique apporte aux cellules de bactéries lactiques les acides aminés essentiels pour leur croissance et donc par conséquent, ces bactéries ont des capacités limitées pour la synthèse des acides aminés à partir de source d'azote inorganiques (Salminen et Von Wright, 2009). Elles restent donc dépendantes des acides aminés pré-formés présents dans le milieu de culture comme sources d'azote. Néanmoins des variations existent entre les souches (Salminen et Von Wright, 2009):

- certaines souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* sont capables de synthétiser la plupart des acides aminés dont elles ont besoin.
- les souches de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* et *Lb. helveticus* ont besoin d'une quinzaine d'acides aminés.

Leur croissance dans un milieu de culture minimum est généralement faible et il est clair que les bactéries lactiques se sont adaptées à des environnements riches en développant des systèmes pour exploiter efficacement les sources d'azote présentes. Le système le plus étudié est le système des bactéries lactiques laitières, en particulier celui de *Lc. lactis*, pour le développement des technologies fermentaires laitières.

La machinerie protéolytique développée chez ces bactéries est assez complexe du fait de la présence limitée d'acides aminés libres dans le milieu lait et des auxotrophies de ces bactéries pour plusieurs acides aminés. Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acides aminés à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait.

La protéolyse chez les bactéries lactiques commence par l'action d'une protéase de paroi, enzyme à sérine qui hydrolyse les caséines du lait en oligopeptides. Certaines souches de bactéries lactiques ne possèdent pas de protéase de paroi et dépendent de la protéase de paroi présente chez les autres souches pour se développer dans le lait (Savijoki *et al.*, 2006). Cinq types de protéases de paroi de la même famille mais présentant certaines différences ont été caractérisées chez les bactéries lactiques: PrtP chez *Lb.paracasei* et *Lc. lactis*, PrtH chez *Lb. helveticus*, PrtR chez *Lb. rhamnosus*, PrtB chez *Lb. bulgaricus* et PrtS chez *St. thermophilus* (Savijoki *et al.*, 2006). Elles contiennent différents domaines (Figure 10). Le domaine correspondant au peptide signal (PP), le domaine catalytique des protéases à sérine (PR), un domaine d'insert (I) qui régule probablement leur spécificité, le domaine A de fonction inconnue, le domaine B participant probablement à la stabilité, le domaine hélix (H) qui positionne A et B à l'extérieur de la cellule et un domaine hydrophobe W (Siezen, 1999)

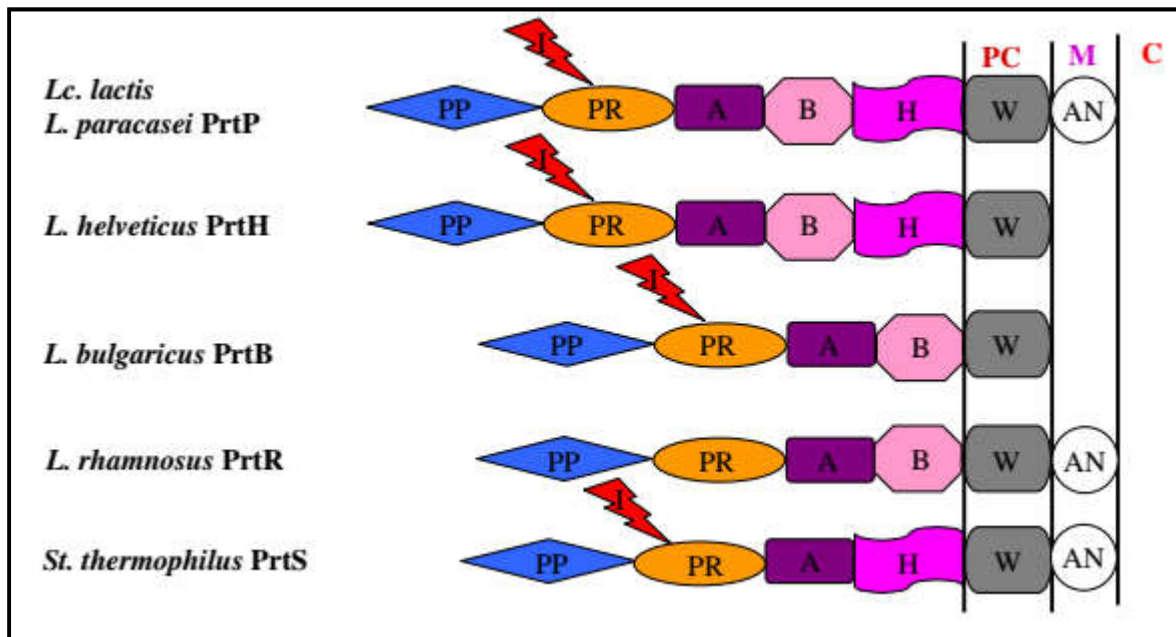


Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines composant les protéases de parois (Siezen, 1999; Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Savijoki *et al.*, 2006)

PC: paroi cellulaire, M: membrane cellulaire, C: cytoplasme, PP: préprodomaine, PR: domaine catalytique, I: domaine d'insertion, A: domaine globulaire, B: domaine B, H: domaine hélicoïdal, W: domaine espaceur, AN: domaine d'ancrage.

Les oligopeptides produits par l'action de la protéase constituent la source principale d'acides aminés pour les lactocoques. Ces derniers sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule (Tynkkynen *et al.*, 1993) par l'intermédiaire de trois ou quatre transporteurs selon la souche. Une fois à l'intérieur, des peptidases coupent les oligopeptides en acides aminés.

Bruinenberg *et al.*, en 1992, ont montré une augmentation du taux de croissance de *Lc. lactis* dans le lait pour des souches où une surproduction de protéase membranaire avait été induite. Il a aussi été montré que dans l'ensemble du processus de dégradation des protéines en peptides puis en 12 acides aminés libres, l'absorption des peptides de taille importante du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule, dictée par le transporteur d'oligopeptides (Opp), est une étape cruciale dans la croissance de *Lc. lactis* dans le lait. Kunji *et al.*, en 1995, n'ont pas pu faire se développer des mutants Opp-négatif dans un milieu de culture où la caséine était la seule source d'acides aminés. En effet, Juillard *et al.*, en 1995, ont analysé les peptides dans le lait pendant une croissance de lactocoques et ont montré que les oligopeptides acceptés par le système de transport représentaient 98 % de la source d'azote utilisé par les

cellules. La transposition de ce système à d'autres LAB que *Lc. lactis* ne peut pas encore être énoncé, les travaux sont encore trop rares. Néanmoins, lorsqu'ils ont été identifiés pour d'autres souches, ces systèmes protéolytiques sont identiques à celui de *Lc. lactis* (Salminen et Von Wright, 2009). Par exemple, le génome de *Lb. plantarum* contient tous les gènes (dont les gènes codant pour le système Opp (transporteur d'oligopeptides) pour mettre en place la dégradation de protéines (Salminen et Von Wright, 2009).

La figure 11 présente le catabolisme des acides aminés par *Lactococcus lactis* sp.

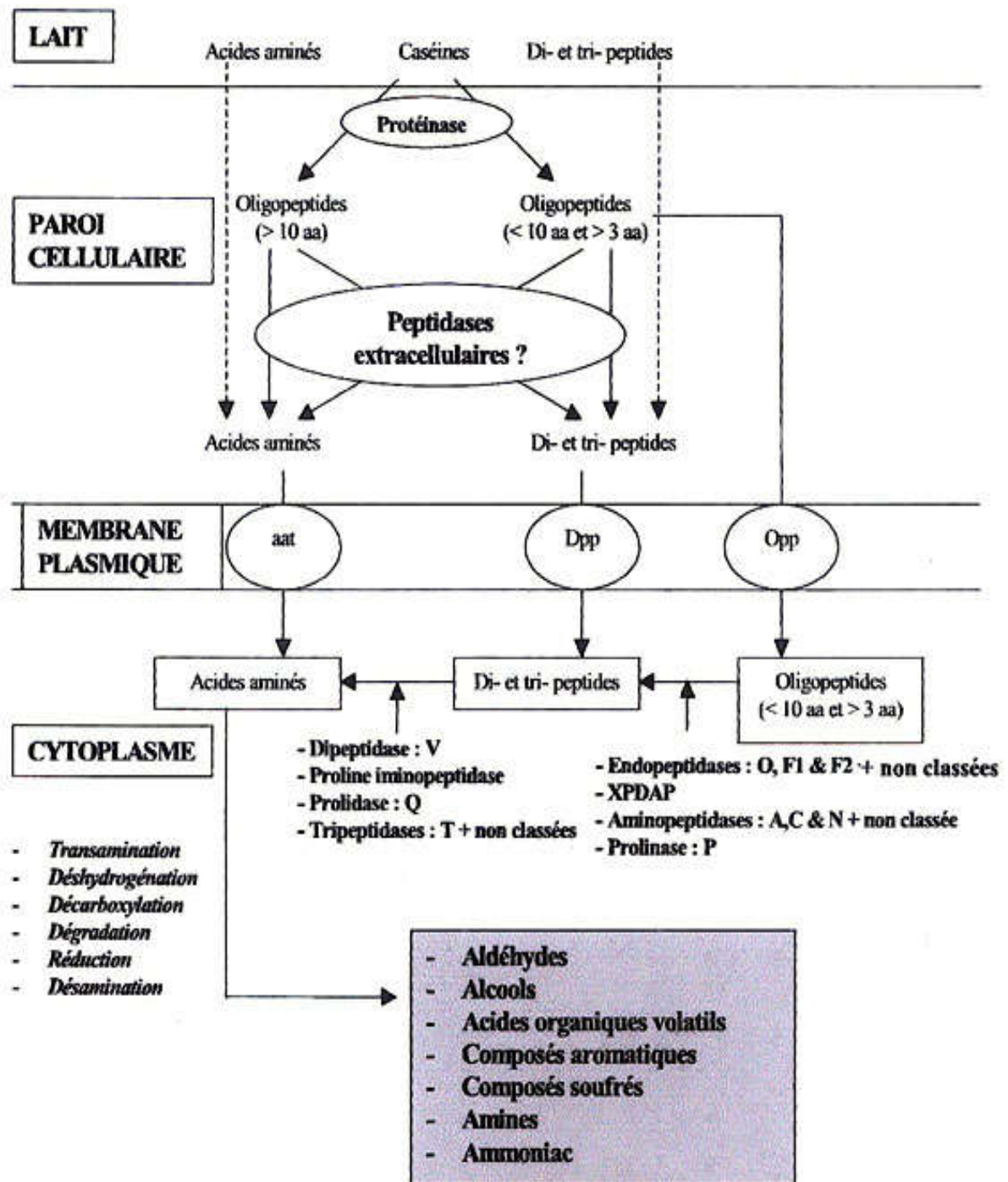


Figure 11 : Catabolisme des acides aminés par *Lc. lactis* sp.
(Grattepanche, 2005)

Dpp : système de transport des di- et tripeptides; **Opp** : système de transport des oligopeptides;
aat : système de transport des acides aminés

1.2.6.3. Métabolisme du citrate

Le diacétyl (2,3-butanedione) est le principal composé qui participe à l'arôme de très nombreux produits laitiers. La présence de ce composé carbonylé dans le beurre, les laits et les crèmes fermentés, dans certains fromages et, pour le diacétyl, dans les margarines est désirable et même indispensable à la flaveur caractéristique de ces produits. Ce composé volatile à l'arôme de beurre est issu du métabolisme du citrate par différentes espèces de bactéries lactiques.

Chez les bactéries lactiques, le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par une citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par une citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate qui est transformé en diacétyl par le biais d'une série de réactions intermédiaires. Le pool du pyruvate disponible pour les voies de synthèse du diacétyl dépend de l'activité des enzymes impliquées dans la bioconversion du citrate en pyruvate (figure 12). Il est à noter que le maintien du gradient de concentration dépend de la vitesse de disparition du citrate dans le milieu intracellulaire, donc de l'activité du citrate lyase (dégradation du citrate en oxaloacétate et acétate) et de l'oxaloacétate décarboxylase (décarboxylation de l'oxaloacétate en pyruvate). L'activité de la citrate lyase est inductible par le citrate et disparaît rapidement après épuisement du citrate dans le milieu.

Lindegreen *et al.* (1990) ont pu démontrer le co-métabolisme du lactate et du citrate chez *Lactobacillus plantarum* dans des conditions d'anaérobiose. Le citrate est ainsi transformé en acétate et en succinate. Dans ces conditions, il y a aussi induction de la pyruvate formate lyase sans formation de diacétyl et d'acétoïne. L'acide succinique a été retrouvé par Kanenchi *et al.* (1988) dans le métabolisme de l'acide citrique des lactobacilles. Ces auteurs ont pu constater que l'acide succinique pouvait être formé à partir de l'acide fumarique, mais pas à partir de l'acide pyruvique ni de l'acide α -cétoglutarique.

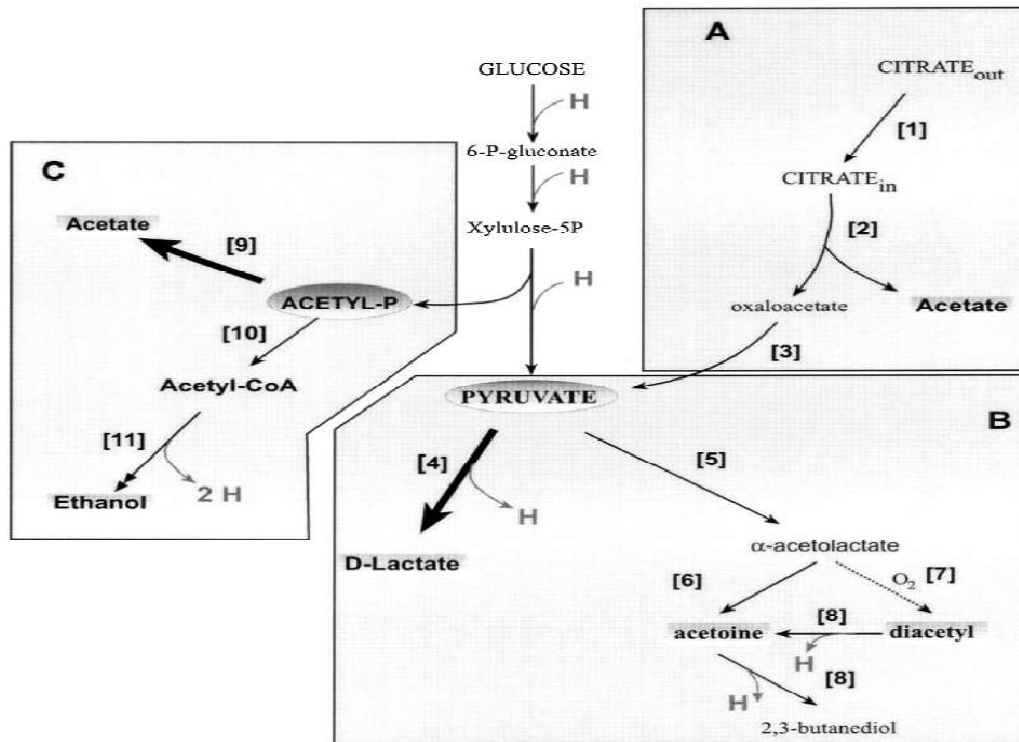


Figure 12 : Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (Bourel *et al.*, 2001).

- (1) :Citrate perméase, (2): Citrate lyase, (3): Oxaloacétate décarboxylase, (4): Lactate déshydrogénase, (5): α -acétolactate synthase, (6): α -acétolactate décarboxylase, (7): Décarboxylation non enzymatique, (8): 2,3-butanediol déshydrogénase, (9): Acétate kinase, (10): Phosphotransacétylase (11): Alcool déshydrogénase

1.3. Généralités sur la fermentation lactique

La fermentation microbienne est un procédé qui consiste à faire croître une population de microorganismes (bactéries, levures, moisissures...) aux dépens de certains éléments nutritifs sous des conditions environnementales (température, pH, agitation, aération...) favorables. Elle correspond à la transformation de substances (substrats carbonés généralement) en produits résultant de l'activité métabolique des cellules (Grisales Palacio, 2007).

On entend par fermentation lactique la transformation de certains sucres tels que: sucre de lait, glucose, sucre de canne (lactose) en un acide liquide et soluble dans l'eau, qui est l'acide lactique.

La fermentation lactique concerne une part importante des produits alimentaires. On peut citer pour les produits animaux : les laits fermentés, les fromages et pour les produits végétaux : le vin, le pain au levain, la choucroute, les olives, etc. Cette fermentation met en jeu des bactéries lactiques qui sont de plus en plus souvent des bactéries lactiques sélectionnées, produites par des industries spécialisées (Spinnler, 1998; Toumi, 2009).

1.3.1. L'acide lactique

L'acide lactique est l'un des acides organiques les plus importants, produit par des bactéries lactiques, découvert par Scheel en 1780 dans le lait fermenté. Il est également un acide organique hydrosoluble, aliphatique et fortement hygroscopique et un produit chimique énigmatique polyvalent, ayant un large champ d'applications (Reddy *et al.*, 2008). L'acide lactique existe en deux stéréo-isomères optiquement actifs, le L(+) et D(-) (Figure 13). Puisque les niveaux élevés de l'acide lactique D(-) sont nocifs aux humains, l'acide lactique L(+) est l'isomère préféré dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Zhang *et al.*, 2008).

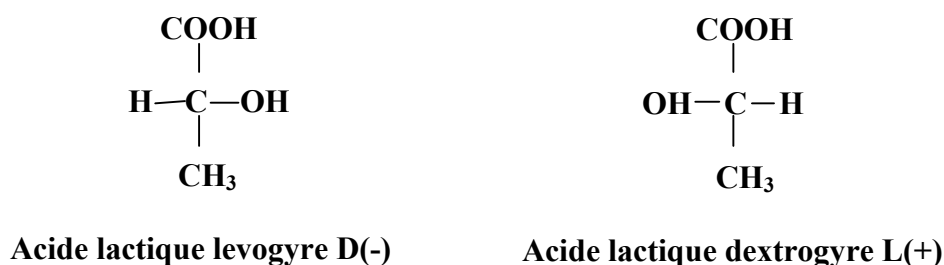


Figure 13 : Les deux structures isomères d'acide lactique L(+), D(-) (Reddy *et al.*, 2008)

L'acide lactique peut être fabriqué par une synthèse chimique ou par fermentation microbienne (Lin et Wang, 2007). La synthèse chimique est le résultat d'un acide lactique racémique D-L, tandis que la fermentation nous donne les formes stéréospécifiques L(+) et D(-) et un mélange D-L (Lin *et al.*, 2007). L'avantage significatif que présente la production biologique par rapport à la synthèse chimique réside dans l'utilisation des matières premières à bon marché telles que : petit lait, mélasse, betterave, amidon, sucre de canne et d'autres matériaux riches en hydrates de carbone (Reddy *et al.*, 2008).

1.3.2 Applications de la fermentation lactique

L'acide lactique est un produit du processus de la fermentation lactique existant dans le fromage, beurre, bière, levain, et beaucoup d'autre d'aliments fermentés, on utilise comme un additif alimentaire. Litchfield (1996) a résumé des applications alimentaires typiques pour l'acide lactique et leurs sels. Le marché de la consommation d'acide lactique est dominé par le secteur alimentaire et boissons depuis 1982. Plus de 50% d'acide lactique produit est employé comme un agent émulsionnant dans des produits de boulangerie (Litchfield, 1996). Il est utilisé comme agent acidulant ou inhibiteur de la détérioration bactérienne dans une large variété d'aliments traités tels que : sucre, pain, et produits de boulangerie, boissons non alcooliques, bière, mayonnaise, et les œufs traités, produits laitiers, confitures, ainsi que d'autres acidulants. L'acide lactique ou ses sels sont utilisés dans la désinfection et emballage des carcasses, en particulier ceux de volaille et poissons. Les esters de calcium et les sels de sodium de lactate avec une longue chaîne des acides gras ont été développés en tant que excellents émulsifiants dans les produits de boulangerie (Datta *et al.*, 1995 ; Naveena *et al.*, 2004; Toumi, 2009).

La capacité de retenue d'eau de l'acide lactique le rend approprié à l'usage comme produit hydratant dans les formulations cosmétiques. Le lactate d'éthyle est un ingrédient actif dans plusieurs préparations anti-acné. L'occurrence naturelle de l'acide lactique dans le corps humain fait qu'il est très utile comme substance active dans les produits cosmétiques (Reddy *et al.*, 2008).

L'acide lactique a été longtemps utilisé dans les formulations pharmaceutiques, principalement les onguents (pommades) et les solutions parentérales. Il est également utilisé dans la préparation des polymères biodégradables pour des usages médicaux tels que les sutures chirurgicales et les prothèses (Wee *et al.*, 2006). La présence des deux groupes fonctionnels réactifs donne à l'acide lactique un élément de base le plus potentiel pour les

conversions chimiques en produits potentiellement utiles comme l'acide acétique et l'acide acrylique, etc.

L'acide lactique est utilisé, dans divers procédés industriels, comme : agent de détartrage, dissolvant, nettoyant, mouillant, etc. En raison de l'augmentation des quantités de déchets plastiques, dans le monde entier, des efforts considérables de recherches et de développement ont été consacrés afin de substituer les thermoplastiques conventionnels par des matériaux biodégradables, à une seule utilisation (Reddy *et al.*, 2008).

Les polymères biodégradables sont classifiés en tant que famille de polymères qui se dégradent complètement en monomères correspondants ou en produits non toxiques par l'action métabolique des microorganismes vivants (Senthuran *et al.*, 1997).

On prévoit une augmentation de la demande de l'utilisation de l'acide lactique suite à l'augmentation dans la production industrielle des plastiques biodégradables comme l'acide polylactique (Sun *et al.*, 1999; Balannec *et al.*, 2007; Nandasana et Kumar, 2008); car l'acide polylactique, qui suscite une attention considérable, est utilisé comme précurseur pour la synthèse de plastiques biodégradables (Reddy *et al.*, 2008). Les polymères de l'acide lactique présentent de nombreux avantages comme : biodégradabilité, thermo-plasticité, potentiellement pour de grands marchés. La propriété physique de l'acide polylactique dépend de la composition isomérique de l'acide lactique, la production de l'acide lactique optiquement pure est essentielle pour la polymérisation.

L'acide polylactique est utilisé dans plusieurs applications biomédicales telles que : la fixation orthopédique, les applications cardiovasculaires, dentaires et intestinales (Wee *et al.*, 2006).

1.3.2. Fermentation discontinue (ou Batch)

Dans ce mode de fonctionnement la totalité des éléments nutritifs nécessaires à la croissance biologique est introduite lors du démarrage de la réaction. Aucun apport ni prélèvement (excepté bien sûr pour quelques mesures hors lignes éventuellement) n'est réalisé par la suite et la réaction se déroule à volume constant (Manyri, 2005). Les seules actions possibles de l'opérateur ne concernent que les variables d'environnement (pH, température, vitesse d'agitation,...). Peu de moyens sont ainsi nécessaires à sa mise en œuvre, ce qui en fait son attrait du point de vue industriel (Grisales Palacio, 2007).

1.3.2.1. Etude de quelques modèles de cinétique de croissance

La croissance bactérienne peut se mettre sous la forme:

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

où x représente la concentration cellulaire et μ la vitesse spécifique de croissance.

Pendant la phase exponentielle, l'intégration entre t_1 et t_2 , en prenant μ constant et égal à sa valeur maximale (μ_{\max}), donne la relation (2), correspondant à la phase exponentielle de croissance.

$$x = x_0 e^{\mu_{\max}(t_2 - t_1)} \quad (2)$$

Lorsque la croissance est limitée par un manque de substrat S et en l'absence d'inhibition par le produit, le modèle le plus utilisé est celui de Monod (1942):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (3)$$

Où : S et K_s sont respectivement la concentration et la constante de saturation du substrat limitant.

Pirt (1975) a intégré le système formé par les équations (1) et (3), en considérant μ_{\max} , K_s et $Y_{X/S}$ (le rendement de transformation du substrat S en biomasse X) comme constants :

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

Où : X_0 et X_f sont respectivement les concentrations initiales et finales en biomasse.

Tayeb et al., (1984) ont considéré que la variation du taux spécifique de croissance avec la concentration en produit peut être décrite par une relation hyperbolique de type d'inhibition non compétitive :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{K_p}{p + K_p} \quad (5)$$

Où : P et K_p sont respectivement la concentration et la constante d'inhibition du produit.

Plusieurs auteurs ont tenu compte des deux effets à la fois la limitation par le substrat carboné et l'inhibition non compétitive par le produit formé. La vitesse spécifique de croissance devient :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s} \frac{K_p}{p + K_p} \quad (6)$$

Luedeking et Piret (1959) ont proposé un modèle où μ vari linéairement avec la concentration du produit :

$$\mu = \mu_{\max} - h \cdot p \quad (7)$$

Cette relation où h est une constante, rend bien compte de leurs résultats obtenus avec le type de bactérie *Lactobacillus delbrueckii* utilisant le glucose comme un substrat.

Belhocine (1987) a montré que les résultats obtenus en continu avec la bactérie *Lactobacillus helveticus* ne donnent une bonne concordance qu'avec ceux obtenus par la loi d'inhibition proportionnelle (7).

Roy *et al.*, (1987) ont utilisé, pour la modélisation de la croissance de la bactérie *Lactobacillus delbrueckii* sur le glucose, une loi de Verhulst qui dépend uniquement de la concentration de la biomasse :

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (8)$$

Où : X_{\max} est la concentration maximale atteinte par la biomasse.

Leh et Charles (1989) ont proposé un modèle mathématique qui tient compte des deux limitations de l'azote et le substrat carboné par une modification de la loi de Monod (3) :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_{PR}}{P_r} + \frac{K_S}{S} + \frac{K_S}{S} \cdot \frac{K_{PR}}{P_r}} \quad (9)$$

Dans cette relation, P_r et K_{PR} sont respectivement la concentration et la constante de saturation des protéines utilisables.

Lorsque K_S est négligeable devant S (Leh, 1987), l'équation précédente (9) est ramenée à la loi de Monod, c'est-à-dire à un seul substrat limitant qui est l'azote :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{P_r}{P_r + K_{PR}} \quad (10)$$

Lorsqu'on tient compte de l'inhibition par le produit dans l'équation (10), l'expression de la vitesse spécifique de croissance devient :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{P_r}{P_r + \left(\frac{P}{K_p + 1} \right)^2 \cdot K_{PR}} \quad (11)$$

Le modèle logistique, qui est très utilisé par plusieurs auteurs pour décrire la cinétique de croissance de la phase exponentielle de décélération sous la forme suivante:

$$\text{Log}X_2 - \text{Log}X_1 = \mu_{\max} (t_2 - t_1) \quad (12)$$

Au cours de cette phase, la composition cellulaire est constante, et bien que la composition du milieu de culture varie beaucoup, pour permettre les synthèses cellulaires, le taux de croissance reste constant. Cette phase correspond, particulièrement pour les bactéries à taux de croissance élevé, à un potentiel de multiplication et de synthèse considérable, justifiant à lui seul leur emploi en biotechnologie (Leveau et Bouix, 1999).

Le modèle mathématique exprimé par l'équation (8) est un modèle logistique qui tient compte des trois premières phases de croissance, à savoir celles de latence, exponentielle et de décélération. L'arrêt de la production à la fin de la phase stationnaire démontre bien l'insuffisance de ce modèle pour décrire la cinétique de la croissance jusqu'à la fin de la phase stationnaire.

Amrane (1991) a développé un modèle mathématique qui prend en considération la phase stationnaire. L'expression de la vitesse spécifique de croissance est donnée par la relation suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + \left(\frac{ce^{dt}}{\mu_{\max} - c} \right)} \quad (13)$$

A partir de la loi précédente, il est possible d'obtenir la loi décrivant la croissance :

$$X = X_0 \exp \left(\mu_{\max} t - \frac{\mu_{\max}}{d} \left[\ln \frac{\mu_{\max} - c + ce^{dt}}{\mu_{\max}} \right] \right) \quad (14)$$

Dans cette expression, c et d sont des constantes sans signification biologique évidente. Kumar Dutta *et al.*, (1996) ont développé un modèle mathématique de la fermentation du glucose en acide lactique par *Lactobacillus delbrueckii* en considérant l'inhibition par le produit formé, en tenant compte de l'effet d'une puissance toxique (n). Ces auteurs ont utilisé le modèle de Levenspiel (1980) qui propose une généralisation simple de l'équation de Monod en tenant compte de l'effet d'inhibition par le produit formé pour les différents types de réacteurs ainsi que Keller et Gerhardt (1975) qui ont confirmé cette idée d'inhibition dans la formulation de leur modèle pour la fermentation continue. La cinétique de croissance est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{dx}{dt} = \left[\mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P^*} \right)^n \right] \left[\frac{SX}{(K_s + S)} \right] \quad (15)$$

Où,

$$\frac{dx}{dt} = \mu' \left[\frac{SX}{(K_s + S)} \right] \quad (16)$$

Où:

$$\mu' \neq \mu = \left[\mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P^*} \right)^n \right] \quad (17)$$

Avec : P^* , la concentration maximale d'inhibition par le produit ; n la puissance toxique qui caractérise la manière dont on peut approcher la concentration limite supérieure pour l'inhibition par le produit P^* , au-dessus de laquelle la fermentation est stoppée.

Les travaux de Berry *et al.* (1999) ont développé un milieu de culture pour la croissance de la bactérie *Lactobacillus rhamnosus*. Ce milieu offre une gamme d'études métaboliques pouvant être réalisée favorablement. Par contre elle n'est pas faisable dans des milieux complexes traditionnels. Celui-ci inclut l'utilisation des acides aminés. Leurs études préliminaires ont identifié quatre acides aminés principaux : sérine, glutamine, asparagine et cystéine.

Ces auteurs ont modifié un modèle non structuré qui a été proposé par Yabannavar et Wang (1991) pour décrire la croissance du *Lactobacillus rhamnosus* dans ce milieu défini. Cette modification inclue un terme de la mortalité des cellules dans la cinétique de croissance. La cinétique de croissance peut être décrite par l'équation (18), où le taux spécifique de croissance est inhibé par l'acide lactique dissocié et non dissocié (équation (19)) :

$$\frac{dx}{dt} = \mu X - K_d X \quad (18)$$

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{L}{K_{\mu L}} \right) \exp \left(- \frac{HL}{K_{\mu HL}} \right) \quad (19)$$

Dans cette relation, $K_{\mu L}$, $K_{\mu LH}$, L , HL sont respectivement la constante d'inhibition d'acide lactique dissocié, la constante d'inhibition d'acide lactique non dissocié, concentration d'acide lactique dissocié, concentration d'acide lactique non dissocié.

Biazar *et al.*, (2003) ont utilisé pour décrire la croissance de *Lactobacillus helveticus* un modèle de la croissance qui tient compte des effets de limitation par le substrat, les inhibitions par le substrat et le produit ainsi que la mortalité des cellules :

$$\frac{dx}{dt} = \left[\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} e^{-(S/K_i)^{n_1}} e^{-(P/K_{ip})^{n_2}} - K_d \right] X \quad (20)$$

Où:

K_i la constante d'inhibition du substrat à laquelle le facteur d'inhibition par le substrat est : $e^{-(S/K_i)^{n_1}} = 0.368$ g/L ; K_{ip} la constante d'inhibition d'acide lactique à laquelle le facteur d'inhibition par le produit est $e^{-(P/K_{ip})^{n_2}} = 0.368$ g/L ; n_1 , n_2 les constantes de forme (allure) pour la fonction exponentielle et K_d le taux de mortalité spécifique de cellules.

Nandasana et Kumar (2008) ont développé leur modèle en se basant sur les résultats expérimentaux de Boonmee *et al.*, (2003) de la croissance de la bactérie *Enterococcus faecalis*, utilisant la mélasse comme matière première à bon marché. Ces auteurs ont proposé un modèle cinétique qui tient compte des effets de la limitation de substrat, l'inhibition de substrat et du produit aussi bien que l'effet de la mortalité des cellules. La cinétique de croissance est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - K_d) X \quad (21)$$

Où le taux spécifique de croissance :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S K_{ix}}{(K_{SX} + S)(K_{ix} + S)} e^{-P/K_{PX}} \quad (22)$$

Dans cette relation : K_{ix} , K_{SX} , K_{PX} sont respectivement les constantes : d'inhibition du substrat, de limitation par le substrat, et d'inhibition par le produit pour la croissance de la biomasse.

1.3.2.2. Modélisation de la production d'acide lactique

Dans le cas général de la fermentation lactique, Luedeking et Piret (1959 a et b) ont montré que la production d'acide lactique est partiellement associée à la croissance, d'où la loi suivante:

$$q_p = \frac{dP}{Xdt} = \alpha\mu + \beta \quad (23)$$

Dans cette relation, 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 de q_p en fonction du temps (obtenues 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 $q_p = \mu \cdot \alpha$

Cogan (1978) a résolu le système formé par les deux équations (1) et (23), en prenant μ constant et égal à sa valeur maximale μ_{\max} , et a trouvé l'équation suivante:

$$P = X_0 \frac{\alpha\mu_{\max} + \beta}{\mu_{\max}} (s^{\mu_{\max}t} - 1) \quad (24)$$

Cette loi décrit la cinétique de la production de la phase exponentielle de croissance. Son intérêt est qu'elle permet de calculer la pente μ_{\max} (pente de la courbe $\ln(dp/dt) = f(t)$).

Roy *et al.*, (1987) ont proposé que la quantité d'acide lactique totale soit égale à la somme des deux termes :

$$P = P_\alpha + P_\beta \quad (25)$$

Le premier est la quantité d'acide lactique synthétisée par le mécanisme associé à la croissance (P_α) et le deuxième est celui correspondant à la quantité synthétisée par le mécanisme non associé à la croissance (P_β) :

$$p_\alpha = \alpha \frac{dX}{dt} = \alpha X_0 \left(\frac{e^{\mu_{\max}t}}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}}(1 - e^{\mu_{\max}t})} - 1 \right) \quad (26)$$

et

$$p_\beta = \beta X = \beta \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_{\max}}(1 - e^{\mu_{\max}t}) \right) \quad (27)$$

D'après Amrane (1991), ce modèle est insuffisant car il ne permet de calculer que P à partir de X, alors que l'inverse aurait été souhaitable. Leh et Charles (1989) ont utilisé une loi de production qui dépend de la consommation en substrat:

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S,G} \left(\frac{dS}{dt} \right)_G - Y_{P/S,M} \left(\frac{dS}{dt} \right)_M \quad (28)$$

Où :
 $Y_{P/S,G}$ et $Y_{P/S,M}$ sont respectivement les rendements de conversion du substrat en produit, pour la croissance et la maintenance (G est un indice désignant la croissance et M un indice désignant la maintenance).

Kummar Dutta *et al.*, (1996) ont estimé la vitesse de production d'acide lactique par l'incorporation de l'équation (17) dans l'équation (23) et par une analogie avec l'équation de Michaelis-Menten on obtient une modification de l'équation de la formation du produit :

$$\frac{dP}{dt} = \left[\alpha \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P^*} \right)^n + \beta \right] \left[\frac{SX}{(K_s + S)} \right] \quad (29)$$

Kummar Dutta *et al.*, (1996) ont observé d'après le graphe du taux spécifique de croissance en fonction de la production d'acide lactique une courbe et non pas une droite linéaire comme le présente le modèle de Keller et Gerhardt (1975). Cependant, la courbe non linéaire est justifiée par l'introduction de la valeur de n dans leur modèle qui est égale à 0,88, par contre le modèle de Keller n = 1.

Selon Toumi (2009), Les résultats expérimentaux concordent assez bien avec ceux obtenus à partir du modèle de Kummar Dutta *et al.*, (1996). Cependant l'insuffisance du modèle de Keller qui sous-estime le taux de croissance en fonction de la production.

Berry *et al.*, (1999) ont utilisé pour la production d'acide lactique une bactérie *Lactobacillus rhamnosus* dans un milieu bien défini, un modèle mathématique suppose que la formation d'acide lactique est une combinaison des mécanismes associés et non associés à la croissance, et que la part de production non associée à la croissance est également liée par la dépendance des approvisionnements de substrat par l'intermédiaire de la cinétique de Monod. La cinétique de formation du produit peut être décrite par une équation de Luedeking et Piret (1959) modifiée :

$$\frac{dP}{dt} = [\alpha \mu X + \beta XS / (K_s + S)] \quad (30)$$

Biazar *et al.*, (2003) ont exprimé la vitesse de production par la relation suivante :

$$\frac{dP}{dt} = X \left[(\mu_{\max} \alpha \frac{S}{K_S + S} e^{-(S/K_i)^{n_1}} e^{-(P/K_{ip})^{n_2} - K_d}) + \beta \right] \quad (31)$$

Les travaux de Bouguettoucha *et al.*, (2007) ont montré que la fermentation lactique utilisant une souche *Lactobacillus helveticus* se déroule en deux étapes; une première à pH libre, suivie d'une seconde à pH régulé. Concernant le pH libre: ceci, en introduisant la part non dissociée de l'acide lactique, qui est la principale espèce inhibitrice de la croissance (Balannec *et al.*, 2007) :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \left(1 - \frac{HL}{HL_{inh}} \right) \quad (32)$$

Où HL_{inh} représente la concentration d'acide lactique non dissocié inhibitrice. Le pH a été également inclus dans le modèle par l'équation de Henderson-Hasselbach suivante:

$$HL = \frac{L^-}{10^{pH - pK_A}} \quad (33)$$

Le modèle correspondant simule correctement les résultats expérimentaux, et a été validé pour différents milieux de culture.

Pour ce qui de l'étape à pH régulé, le modèle repose sur une limitation par le substrat carboné. La signification biologique des paramètres a été améliorée et le modèle a été validé dans différentes conditions de culture. Le modèle est décrit par l'équation suivante (Amrane, 2005):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \left(1 - \frac{S_{lim}}{S} \right) \quad (34)$$

Où : S_{lim} la concentration limitante du lactose.

Afin d'éviter l'utilisation de deux modèles, selon les conditions de culture, un modèle généralisé a été développé, qui tient compte à la fois de l'effet inhibiteur par l'acide non dissocié (et le pH) et des limitations nutritionnelles. Ce modèle décrit bien les résultats à pH libre et à pH régulé.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \left(1 - \frac{S_{lim}}{S} \right) \left(1 - \frac{HL}{HL_{inh}} \right) \quad (35)$$

1.3.2.3. Modélisation de la consommation du substrat

Il y a trois types de consommation du substrat dans le processus de la fermentation qui produit des métabolites :

- d'une part, la consommation nécessaire à l'élaboration de cellules nouvelles ou synthèse de la biomasse;
- d'autre part, la consommation nécessaire à la production de métabolites ;
- ensuite, la consommation de substrat nécessaire au maintien des cellules dans un état viable.

Dans la plupart des modèles cités dans la littérature, la vitesse de consommation du substrat est la somme de deux termes de la croissance et la maintenance des cellules:

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_T = \left(\frac{dS}{dt}\right)_G + \left(\frac{dS}{dt}\right)_M \quad (36)$$

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

Pirt (1975) a exprimé les termes liés à la croissance et à la maintenance par les équations suivantes :

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_G = -\frac{\mu.X}{Y_{X/S,G}} = -\frac{1}{Y_{X/S,G}} \frac{dX}{dt} \quad (37)$$

et

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_M = -m_s.X \quad (38)$$

Où m_s est le coefficient de maintenance et $Y_{X/S,G}$ est le rendement vrai de la conversion du substrat en biomasse, pour la croissance, qu'il est défini par :

$$Y_{X/S,G} = -\left(\frac{dX}{dS}\right)_G \quad (39)$$

En combinant les équations (36), (37) et (38), la consommation spécifique du substrat est:

$$q_s = -\left(\frac{dS}{Xdt}\right) = \frac{\mu}{Y_{X/S,G}} + m_s \quad (40)$$

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

$$\frac{1}{Y_{X/S,obs}} = -\left(\frac{dS}{dX}\right) = \frac{m_s}{\mu} + \frac{1}{Y_{X/S,G}} \quad (41)$$

Où $Y_{X/S,obs}$ est le rendement observé de conversion du substrat en biomasse.

Roy *et al.*, (1987) ont utilisé une loi dérivant du modèle de Luedeking-Piret qui exprime le taux spécifique de la consommation du substrat :

$$q_s = -\left(\frac{dS}{Xdt}\right) = \alpha_s \mu + \beta_s \quad (42)$$

Ces auteurs ont remarqué que le rendement de la transformation du substrat en produit est constant dans un processus de la fermentation lactique, ce qui a été confirmé par Belhocine (1987) et l'équation s'écrit :

$$q_s = \frac{1}{Y_{P/S}} q_p = \frac{\alpha}{Y_{P/S}} \mu + \frac{\beta}{Y_{P/S}} \quad (43)$$

Par analogie avec l'équation (39), on a :

$$\frac{\alpha}{Y_{P/S}} = \frac{1}{Y_{X/S,G}} \quad (44)$$

et

$$\frac{\beta}{Y_{P/S}} m_s \quad (45)$$

Cette relation est faisable car quand S_0 est grand (48 g/L, dans le cas de lactosérum), la plus grande partie du substrat consommé convient à la production de l'acide lactique, alors que quelques g/L de sucre contribuent à la croissance de la biomasse.

Berry *et al.*, (1999) ont proposé pour la prise de substrat une fonction linéaire associée au produit d'acide lactique. De ceci, la relation entre la consommation de glucose et l'acide lactique peut être décrite :

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{S/P} \frac{dP}{dt} \quad (46)$$

Où $Y_{S/P}$ est le rendement du substrat pour la formation du produit.

Biazar *et al.*, (2003) ont signalé que la vitesse de consommation du substrat par la bactérie *Lactobacillus helveticus* peut être décrite par l'équation suivante :

$$\frac{dS}{dt} = -\left[\frac{X}{Y_{X/S}} \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} e^{-(S/K_i)^{n_1}} e^{-(P/K_p)^{n_2}} - K_d \right) + m_s X + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \right] \quad (47)$$

Cette équation prend en considération tous les effets à savoir : limitation par le substrat, l'inhibition par le substrat et le produit ainsi que la mortalité des cellules, et le coefficient de maintenance.

Où : $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ sont respectivement les rendements de la biomasse et du produit par rapport au substrat.

Ces auteurs ont utilisé, pour la résolution numérique de système des trois équations différentielles, une méthode de décomposition par domaine. Ces équations représentent la cinétique de croissance (20), production (31), et la consommation du substrat (47).

Nandasana et Kumar (2008) ont utilisé l'expression de la vitesse de consommation du sucre suivante :

$$\frac{dS}{dt} = q_{S,\max} \frac{SK_{is}}{(K_{SS} + S)(K_{is} + S)} e^{-P/K_{PS}} X \quad (48)$$

Où $q_{S,\max}$ la consommation spécifique maximale du substrat, K_{is} , K_{SS} , K_{PS} sont respectivement les constantes : d'inhibition du substrat, de limitation par le substrat, et d'inhibition par le produit pour la consommation du substrat.

En plus, ces auteurs ont montré l'effet du pH sur les paramètres cinétiques du modèle, et ont conclu que les paramètres K_{is} , K_{SS} , K_{PS} , $q_{S,\max}$ sont sensibles au changement du pH et par conséquent les valeurs extrêmes du pH peuvent influencer défavorablement sur la production d'acide lactique. Le pH optimum étant de 7.

Ce modèle peut être utilisé pour la fermentation continue et discontinue, en utilisant les substrats à bon marché tels que la mélasse.

2- Matériel & Méthodes

2.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude appartiennent à la collection du Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB). Elles ont été isolées à partir de différents écosystèmes et appartiennent à divers genres bactériens (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*).

Le tableau 7 montre le code et l'origine des bactéries lactiques utilisées.

Tableau 7 : Code et origine des bactéries lactiques

Genre	Code	Origine	Référence
<i>Lactobacillus</i>	CHM9, CHM11, CHM12, CHM16, CHM17, CHM18, CHM19, CHM20	Lait cru de chamelles (Mauritanie)	Cheikh, 2008
	BH14, BH21	Lait cru de chamelles (Illizi)	Bounoua, 2005
	CHTD25, CHTD27, CHTD29	Lait cru de chamelles (Tindouf)	Belkheir, 2004
	9(b)	Saumure d'olive (Sig)	Hebali, 2006
	H3	Hamoum (Relizane)	Bouziani et Sabaha, 2006
	V7, V8, V14, V20, V21, V23	Viande bovine fraîche (Mostaganem)	Benbernou, 2008
	LVK9, LVK11, LVK12, LVK13, LVK14, LVK15, LVK29, LVK30, LVK31, LVK32	Lait cru de vache (Oran)	Karam, 1995
<i>Lactococcus</i>	CHT3, CHT4, CHT5, CHT16, CHT17, CHT19, CHT22, CHT24, CHT25, CHT26, CHT27	Lait de chamelle (Timimoune)	Karam et Karam, 2006
	V10-1, V11, V17	Viande bovine fraîche (Mostaganem)	Benbernou, 2008
	H2.3	Hammoum (Relizane)	Bouziani et Sabaha, 2006
	OV5	Saumure d'olive (Sig)	Hebali, 2006
	GHB15	Ghars (Biskra)	Benmouna, 2008
	LV4, LV8, LV12	Leben (Oran)	LBMB
<i>Leuconostoc</i>	CHBK309, CHBK310, CHBK312, CHBK314, CHBK315, CHBK316, CHBK318, CHBK319, CHBK320, CHBK323, CHBK325, CHBK326, CHBK327,	Lait de chamelle (Béchar)	Belkheir, 2009; Kalbaza, 2010

2.2. Milieux de culture

Les principaux milieux employés sont :

- **Milieu M17** (Terzaghi et Sandine, 1975): Milieu spécifique des lactocoques.
- **Milieu MRS** (De Man *et al.*, 1960): Milieu spécifique des lactobacilles.
- **Milieu MRS modifié (MRSm)**: Le glucose est remplacé par le lactose.
- **Milieu Mayeux** (Mayeux *et al.*, 1962): Milieu spécifique des Leuconostocs.
- **Milieu Mayeux modifié (Mayeux m)**: Le saccharose et le glucose sont remplacés par le lactose
- **Milieu BMK** : Milieu à base de lactosérum doux mis au point par Benaissa en 2010 (le lactosérum utilisé provient de la fabrication de fromage à pâte molle type "Camembert" d'une unité de production située à Maraval, Oran, Algérie).

La composition par litre de chacun des milieux utilisés est indiquée en annexe.

2.2.1. Préparation du milieu de culture BMK

2.2.1.1. Déprotéinisation du lactosérum

Cette étape consiste à faire chauffer le lactosérum au bain Marie à 100 °C pendant 30 min, le centrifuger deux fois de suite à 5000 tr/min pendant 15 min, le surnageant obtenu est ensuite filtré sur un papier filtre standard (DURIEUX, réf: 66301130).

2.2.1.2. Préparation du jus de tomate

La tomate est lavée et broyée, le broyat obtenu est ensuite centrifugé à 5000 tr/min pendant 15 min, le surnageant recueilli est par la suite filtré sur un papier filtre standard (DURIEUX, réf: 66301130).

70 % du lactosérum déprotéiné est supplémenté en extrait de levure (Biochem) à 1 % et en 30 % de jus de tomate fraîche (le pH est ajusté avec NaOH ou HCl 5 N, selon le pH optimum de croissance pour chaque genre bactérien) ainsi que 0,1 g sulfate de magnésium et 0,05 g de sulfate de manganèse (Benaissa, 2010).

2.3. Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique et de leur pureté

L'observation macroscopique des colonies après culture des souches sur milieu MRS (De Man *et al.*, 1960), la recherche de catalase et l'examen microscopique à l'immersion des

bactéries après coloration de Gram permettent de déterminer l'appartenance de nos souches au groupe lactique. Le dernier test permet également de vérifier leur pureté.

2.4. Conservation des souches

Les bactéries étaient conservées sur milieu gélosé incliné MRS en double exemplaire à +4 °C, ainsi qu'en lait écrémé à 10 % ou en milieu MRS additionné de 20 % de glycérol sous forme congelée à -20 °C (Herrero *et al.*, 1996; Samelis *et al.*, 1994).

2.5. Analyses physicochimiques du lactosérum

Les analyses physicochimiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de contrôle de qualité et répression des fraudes (CACQE) d'Oran. Elles permettent de déterminer les paramètres physicochimiques du lactosérum selon des techniques standards officielles, décrites dans l'ouvrage de référence AFNOR, édition 1986. Les analyses des sels minéraux ont été réalisées au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique et Marine (LCAM) de l'université des Sciences et Technologies de Lille 1 (France).

2.5.1. Mesure de l'acidité

Elle se fait immédiatement après prélèvement d'un échantillon de 30 ml de la culture bactérienne, réparti dans 3 béchers, à raison de 10 ml chacun. On mesure d'abord le pH et on dose ensuite l'acidité par titration avec de la soude N/9 en présence de quelques gouttes de phénophtaléine (à 1 % dans l'éthanol). Le volume de soude utilisé pour obtenir le virage de la couleur au rose pâle est alors noté et les résultats sont exprimés en degrés Dornic suivant la relation :

$$\text{Acidité } ^\circ\text{D} = V_{\text{NaOH}} \cdot 10$$

avec V_{NaOH} : volume moyen de la soude utilisé pour titrer 10 ml.

2.5.2. Teneur en matière sèche totale

Le principe de cette méthode consiste à peser le résidu après dessiccation à l'étuve à plus de 103 °C ± 2°C. Une capsule sèche et tarée contenant 5 ml de l'échantillon est pesée puis placée dans l'étuve à 103 °C pendant 3 h. Après refroidissement dans le dessiccateur la capsule avec le résidu sec est de nouveau pesée.

Le taux de la matière sèche est calculé (en g/L ou en %) selon les formules :

$$M.S \text{ (g/L)} = ((m_2 - m_0)/5). 1000$$

$$M.S \text{ (%) } = ((m_2 - m_0)/(m_1 - m_0)). 100$$

avec :

m_0 : masse de la capsule vide.

m_1 : masse de la capsule avec l'échantillon.

m_2 : masse de la capsule avec le résidu sec.

2.5.3. Teneur en cendres

Le principe de cette méthode réside dans l'incinération de la matière sèche de l'échantillon à $530 \text{ }^\circ\text{C} \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Dans une capsule calcinée et tarée, on introduit 5 ml de l'échantillon puis on procède à une préincinération en maintenant la capsule au-dessus d'une petite flamme de bec Bunsen.

Le résidu obtenu est alors incinéré dans le four à mouffles réglé à $530 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à disparition des particules charbonneuses. Ce résultat est généralement obtenu au bout de 2 à 4 h. La capsule est pesée après refroidissement dans un dessiccateur.

La teneur (en g/L ou en %) est donnée par les formules :

$$C \text{ (g/L)} = ((m_2 - m_0)/5). 1000$$

$$C \text{ (%) } = ((m_2 - m_0)/(m_1 - m_0)). 100$$

avec:

m_0 : masse de la capsule vide.

m_1 : masse de la capsule avec l'échantillon.

m_2 : masse de la capsule avec les cendres.

2.5.4. Détermination des minéraux

L'analyse des minéraux a été effectuée par ICP-AES (Spectromètre d'Emission Atomique par Plasma à Couplage Inductif); l'appareil utilisé est le Vista Pro à visée axiale (Varian).

L'analyse ICP-AES se réalisant à l'état liquide, on met une fraction de 0,5 g de chaque échantillon (Lactosérum brut et déprotéiné lyophilisés) en réaction avec 10 ml d'acide nitrique concentré (69%). Le mélange est déposé sur une plaque chauffante et amené graduellement à la température juste sous le point d'ébullition ($\sim 85 \text{ }^\circ\text{C}$) pendant 1 h. Après refroidissement, le mélange est filtré.

L'échantillon liquide est transformé en aérosol (composé de gouttelettes microniques) par un nébuliseur. Cet aérosol est ensuite envoyé dans une torche à plasma d'argon à une température de l'ordre de 6000 à 10000 °K. Cette dernière doit être suffisante pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. Les électrons des atomes excités, lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, émettent une série d'ondes électromagnétiques caractéristiques de chaque élément dans la gamme du spectre UV-visible. Les différentes longueurs d'ondes sont séparées grâce à un spectromètre contenant un réseau et un prisme, puis détectées simultanément par un détecteur CCD (Coupled Charge Device ou dispositif à couplage de charge). L'intensité de la radiation est proportionnelle à la concentration de l'élément sur une large gamme (Frayret *et al.*, 2012).

Le spectromètre est calibré avec des solutions standards préparées dans 2 % HNO₃. Les résultats sont exprimé en mg/Kg, excepté pour K, Na, Ca et Mg (g/Kg)

2.5.5. Détermination de la matière grasse

Le principe consiste dans un premier temps à faire dissoudre totalement les protéines, puis dans une deuxième étape à mesurer le taux de la matière grasse (après chauffage à 65 °C) directement dans le butyromètre.

11 ml de lactosérum sont introduits dans un butyromètre contenant 10 ml d'acide sulfurique. A ce mélange, on ajoute 1 ml d'alcool isoamylique. On agite délicatement jusqu'à dissolution totale des protéines (aucune particule blanche). Par la suite, le mélange est centrifugé à une vitesse maximale pendant 10 min. Après centrifugation, le butyromètre contenant le mélange est placé au bain Marie à 65 °C pendant 5 min.

La matière grasse apparaissant avec une couleur jaunâtre dans la colonne du butyromètre est estimée comme suit :

$$M.G (g/L) = (B - A). 10$$

avec :

A : valeur de la graduation au-dessous de la colonne lipidique.

B : valeur de la graduation au-dessus de la colonne lipidique.

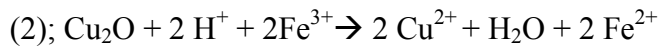
2.5. Teneur en glucides

Elle est estimée en réalisant un dosage par la méthode de Bertrand, qui repose sur les propriétés réductrices des glucides. Le dosage se déroule en trois étapes :

➤ Réduction de la liqueur de Fehling par les glucides réducteurs :

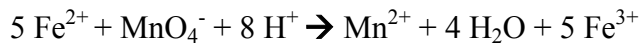
(1); 2 glucides réducteurs + 2n Cu²⁺ + 2n OH⁻ → 2 produits d'oxydation + n Cu₂O + n électron

➤ Isolement du cuivre formé :



➤ Dosage du cuivre par manganimétrie:

Grâce à l'équation bilan (2) on peut écrire ; $n(\text{Cu}^{2+}) = n(\text{Fe}^{2+})$



On procède de la manière suivante:

- 20 ml de l'échantillon à traiter sont mis dans un ballon à col rodé, on y ajoute 50 ml d'eau distillée et 20 gouttes de HCl concentré.
- après chauffage au bain Marie bouillant pendant 4h, on filtre puis on neutralise avec NaOH 30% en présence de phénolphtaléine (1 %) jusqu'à l'obtention d'une coloration rose.
- on y ajoute 2 ml de ferrocyanure de K (10,6 %) et 2 ml d'acétate de zinc (30 %), et on complète avec l'eau distillée jusqu'à 100 ml. On laisse reposer à température ambiante pendant 15 min puis on filtre.
- à 20 ml du filtrat obtenu on ajoute 20 ml de liqueur tartrique et 20 ml de liqueur cuivrique. Après un chauffage pendant 3 min sur une petite flamme, l'oxyde cuivreux rouge se dépose au fond de l'eren et la couleur bleue de la liqueur surnageante indique la présence d'un excès de cuivre.
- on filtre la liqueur surnageante avec un entonnoir en verre fritté (N°4), en ayant soin d'entraîner le moins possible le précipité. On dissout entièrement l'oxyde cuivreux par la liqueur ferrique, ce qui donne une liqueur vert limpide qui est filtrée puis titrée par du permanganate de K (0,1 N), jusqu'à virage de la couleur au rose.

Le résultat est déduit d'une table établie expérimentalement par Bertrand, qui relie la quantité de cuivre isolé à celle des glucides dosés (Annexe 2).

2.6. Études des caractères technologiques

2.6.1. Mesure de la croissance

Des cultures jeunes ($\text{DO} \sim 1$) ont étéensemencées à 1 % dans 40 ml de chaque milieu. Après incubation de 24 et 48 h à 30 °C, la croissance bactérienne est estimée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

2.6.2. Mesure de l'acidité produite

L'acidité est mesurée par pH métrie et par titration. Sous agitation mécanique on ajoute goutte à goutte de la soude (N/9) tout en mesurant le pH. Dès que la valeur du pH atteint celle du pH initial on note le volume de la soude utilisée. Les résultats sont exprimés en degrés Dornic.

$$\text{Acidité} = n \cdot 10$$

n = volume de la soude utilisé pour atteindre la valeur du pH initial.

$$1^{\circ}\text{D} = 0,1 \text{ g/L d'acide lactique produit}$$

2.6.3. Recherche du diacétyle

1 ml du milieu ensemencé est placé dans un tube à hémolyse stérile, la réaction de Voges-Proskauer est effectuée en ajoutant 1 ml de réactif α -naphtol à 6 % dans l'éthanol absolu (VPI) et 1 ml de la soude (NaOH) à 16 % dans l'eau distillée (VPII). Après agitation des tubes et un délai de quelques minutes à température ambiante, une coloration rose traduit la présence de l'acétoïne. Cette substance se transforme en diacétyl sous l'action de la soude qui se combine avec l' α -naphtol en un complexe rouge.

2.6.4. Mise en évidence de l'activité protéolytique cellulaire

L'activité protéolytique est recherchée en milieu solide (BMK, MRSm, M17 et Mayeux m) tamponné à pH 7 par le tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M) additionné de 1% de lait écrémé stérile reconstitué à 10 %, selon la méthode décrite par Van Den Berg *et al.* (1993), les souches bactériennes à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface du milieu de culture. Après incubation à 30 °C pendant 48h, l'activité protéolytique est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de chaque colonie bactérienne. On mesure la dimension des halos.

2.6.5. Analyses statistiques des résultats

Les résultats des paramètres technologiques (principalement production d'acide lactique et la croissance bactérienne) sont présentées par la moyenne \pm écart type. Tous les paramètres mesurés ont été testés en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) afin d'analyser les effets des facteurs "souche" et "milieu" et l'interaction entre les deux facteur (souche x milieu). Les différences significatives ont été établies au niveau $p < 0,05$ ou très significatives $p < 0,001$ selon le test de Tukey.

Une analyse exploratoire des données est appliquée pour classer les souches bactériennes les plus performantes selon leur pouvoir acidifiant et de croissance sur milieu BMK et les milieux témoins. Nous avons employé à cet effet une méthode d'analyse multidimensionnelle, l'analyse des composantes principales ou ACP. Pour cela, le logiciel STATISTICA (Version 6.1.478.0 Statsoft) a été utilisé.

2.7. Cinétique de croissance, de production d'acide lactique et de consommation du lactose en fonction du temps

Nous avons réalisé des cultures en conditions de pH non contrôlé (en Batch), dans un fermenteur (OMNI CULTURE VIRTIS) avec une capacité de 2 litres, la température est maintenue constante à 30 °C et l'agitation est réglée à 75 tr/min pendant 30 heures.

Un litre de milieu de culture stérile est inoculé à l'aide d'un injecteur automatique avec une pré-culture fraîche ($DO \sim 1$), à raison de 1 % (v/v).

L'évolution de la biomasse, la production d'acide lactique dans le milieu, sont suivis par prélèvements d'échantillons toutes les deux heures, suivant les techniques de mesure décrites précédemment. Le dosage du sucre est réalisé au début et à la fin de fermentation.

2.8. Modèle cinétique et estimation des paramètres

Les paramètres cinétiques des modèles ont été déterminés sur la base des données expérimentales.

Pour identifier les paramètres cités ci-dessus et ajuster les courbes théoriques aux résultats expérimentaux, nous avons utilisé deux routines d'optimisation : la méthode des moindres carrés utilisant la fonction « **Isqcurvefit** » mise à disposition dans le module optimisation de Matlab pour l'estimation des paramètres cinétiques (X_0 , X_{\max} , μ_{\max} , SD^2) des modèles représentant la cinétique de croissance, puis la méthode de **Newton-Gauss** incluant une intégration numérique par la méthode de Runge-Kutta d'ordre 4 pour l'identification des paramètres A , B de la cinétique de production (Bouguettoucha, 2009).

3- Résultats & discussion

3.1. Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique et de leur pureté

L'ensemble des bactéries lactiques étudiées ont poussé après 24 à 48 heures d'incubation. Les colonies observées présentent les caractéristiques macroscopiques suivantes : blanchâtres, lisses, rondes, légèrement bombées, à aspect crémeux et à pourtour régulier ou irrégulier. Selon les souches, la taille des colonies varient de petite à un peu plus grande. En général, les colonies des lactobacilles sont plus grandes que celle des coques.

Les bactéries sont toutes catalase négative et l'examen microscopique a révélé qu'elles sont toutes à Gram positif.

Ces résultats confirment l'appartenance des souches utilisées dans cette étude au groupe lactique, où elles se répartissent comme suit : 31 souches appartiennent du genre *Lactobacillus*, 20 souches au genre *Lactococcus* et 13 au genre *Leuconostoc*.

3.2. Analyses physicochimique du lactosérum

L'utilisation du lactosérum doux comme milieu de culture pour les bactéries lactiques, nécessite au préalable une connaissance de sa composition physicochimique. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Analyse physicochimique du Lactosérum

Paramètre \ Echantillon	Lactosérum brut	Lactosérum déprotéiné
pH	6,3	6,1
Acidité (°D)	18	21
Matière sèche total (g/L)	88,2	82,6
Lactose (g/L)	55	47
Matière grasse (g/L)	5,5	0
Cendres (g/L)	8,4	6,3

3.2.1. pH et acidité

D'après le tableau 8, l'acidité du lactosérum déprotéiné est légèrement plus élevée que celle du lactosérum brut. Cette différence peut être expliquée par le fait qu'une faible concentration des ferments utilisée lors de la fabrication du camembert, principalement les bactéries lactiques, a pu se développer et produire de l'acide lactique entre le temps d'échantillonnage et le traitement thermique de déprotéinisation. Malgré cette légère différence les deux échantillons de lactosérum ont un pH neutre, ce qui les classe en lactosérum doux.

3.2.2. Teneur en matière sèche total

Il ressort du tableau 8 que les deux types de lactosérum (brut et déprotéiné) ne présentent pas de grande différence en matière sèche totale. Cette légère différence est tout à fait justifiée. En effet, après le traitement de déprotéinisation, on a enregistré une diminution de 6 g/L en matière sèche, ce qui représente principalement la fraction protéique.

D'après la littérature, la teneur en matière sèche des lactosérums doux varie généralement entre 5 % et 6,7 % (Alais, 1984; Sottiez, 1990). Les valeurs obtenues dans notre étude sont plus élevées que cet intervalle, ceci peut être expliqué par l'utilisation par l'unité de fabrication de lait reconstitué à partir de poudre et non pas de lait de vache cru pour la fabrication du camembert.

3.2.3. Teneur en lactose

On remarque que le lactose est le constituant le plus important du lactosérum brut, il représente plus de 60 % de l'extrait sec. Dans le lactosérum déprotéiné la concentration de ce dernier a diminué de 8 g/L par rapport au lactosérum brut.

La diminution en lactose est peut être due à son hydrolyse thermique à 100 °C pendant le traitement de déprotéinisation.

3.2.4. Teneur en matière grasse

Les deux échantillons se révèlent très pauvres en matière grasse, voire absence totale dans le lactosérum déprotéiné. La matière grasse a probablement sédimenté avec les protéines.

Ces teneurs enregistrées pour les deux échantillons rejoignent celles rapportées dans la littérature (Alais, 1984; Sottiez, 1990).

3.2.5. Teneur en cendres

La valeur enregistrée avec le lactosérum brut (8,04 g/L) rejoint les données de la littérature. En effet, d'après Sottiez (1990) la teneur en cendres dans le lactosérum doux varie entre 8 et 8,5 g/L. De plus, on observe une teneur en cendres un peu plus faible (6,32 g/L) après déprotéinisation.

La différence peut être expliquée par le fait que l' α -lactoglobuline est une des protéines majoritaire dans le lactosérum ; cette dernière est une métalloprotéine (protéine qui a la propriété de fixer spécifiquement des ions, plus particulièrement le calcium) qui va être éliminé au cours du processus de déprotéinisation (Jacquet-Violleau, 1999).

3.2.6. Analyse des sels minéraux

Dans cette étude, une attention particulière est portée sur l'analyse des différents éléments minéraux, en raison de leur implication potentielle dans la stimulation de la croissance, l'activation des différentes réactions métaboliques ainsi que dans les systèmes de transports chez les bactéries lactiques. Les teneurs en sels minéraux sont exposés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Dosage des sels minéraux du lactosérum

Echantillon	Lactosérum brut	Lactosérum déprotéiné
Sels minéraux		
(g/Kg M.S):		
Potassium	17,4	16,4
Sodium	6,45	6,12
Calcium	5,41	5,13
Magnésium	1,16	1,2
(mg/Kg M.S):		
Aluminium	50,6	20,4
Bore	32,6	32,2
Fer	6,1	3,29
Zinc	3,49	1,91
Cuivre	1,4	1,12
Manganèse	0,988	1,382
Chrome	0,7	1,05
Plomb	<1	<1
Nickel	0,64	0,592
Baryum	0,58	0,53
Cadmium	0,523	0,329
Vanadium	0,29	0,2
Arsenic	<0,2	<0,2
Beryllium	<0,2	<0,2
Bismuth	<0,2	<0,2
Cobalt	<0,2	<0,2
Thallium	<0,2	<0,2
Titane	<0,2	<0,2

D'après le tableau 9, les deux échantillons montrent que la teneur en macroéléments la plus importante est celle du potassium, suivie du sodium et du calcium.

Les valeurs enregistrées pour les oligoéléments montrent que l'aluminium et le bore sont les plus dominants.

On remarque pour tous les sels minéraux dosés une diminution légère après le traitement de déprotéinisation à l'exception du manganèse et du chrome.

La présence du Potassium, Calcium et Magnésium à des concentrations dominantes dans le lactosérum est souhaitable car d'après Desmazeaud (1992) et Amouzou *et al.* (1985), le potassium et le calcium vont stimuler la croissance des bactéries lactiques ainsi que le magnésium. De plus, ce dernier est un activateur des différentes réactions métaboliques : division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique. Il est aussi essentiel pour les phosphokinases impliquées dans la glycolyse.

En comparant les valeurs trouvées pour le lactosérum doux brut avec les données de la littérature dans le cas de la technologie pâte molle, on peut dire que:

Pour le potassium, les résultats se rapprochent de ceux de Hargrove *et al.* (1976), Adrian et Bourlier (1980) ainsi que Moulin et Galzy (1984), qui constatent également une teneur importante en potassium. En revanche, Saulnier *et al.* (1996) trouve des valeurs plus élevées (31,4 g/Kg M.S).

La concentration en calcium est en parfait accord avec celle rapportée par Adrian et Bourlier (1980) mais elle est beaucoup plus faible de celles rapportées par d'autres auteurs (Hargrove *et al.*, 1976; Moulin et Galzy, 1984; Saulnier *et al.*, 1996) qui ont obtenu des valeurs comprises entre 12,3 et 30,7 g/Kg M.S.

La valeur du sodium obtenue est proche de celles rapportées par Hargrove *et al.* (1976) et Moulin et Galzy (1984). Par contre, Saulnier *et al.* (1996) ont trouvé une teneur moyenne en sodium d'approximativement le double (11,5 g/Kg M.S).

La teneur en magnésium pour nos résultats est en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature (Hargrove *et al.*, 1976; Adrian et Bourlier, 1980; Moulin et Galzy, 1984; Saulnier *et al.*, 1996).

Peu de données concernant les autres sels minéraux ont été relevées dans la littérature, à l'exception du zinc, fer, cuivre, manganèse et cadmium pour lesquelles les valeurs enregistrées dans la présente étude sont beaucoup plus élevées que celles d'Adrian et Bourlier (1980), qui sont respectivement de 2; 2,8; 0,0047; 0,2 et moins de 0,6 mg/Kg M.S.

La variation de composition des différents lactosérums doux vient principalement du lait, car la composition et les caractéristiques physicochimiques de ce dernier varient sensiblement selon l'espèce, la race et l'âge de l'animal. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite (Cagnin, 1993; Martin, 2001; Guiraud, 2003).

Au vu des analyses physicochimique du lactosérum, il est évident que ce coproduit est très riche en nutriments.

En 2010, nous avons élaboré un milieu nommé "BMK" à base de lactosérum doux déprotéiné, auquel est additionné un extrait de tomate et de l'extrait de levure (à des concentrations 30 % et 1% respectivement). En effet, le lactosérum doux issu de la fabrication du camembert et l'extrait de tomate fraîche sont riches en matières nutritives et présentent des qualités adéquates pour élaborer des milieux de culture de bactéries.

L'extrait de tomate est beaucoup moins riche en matière grasse, présente un pH acide (3,95), et une teneur moyenne en glucides (25,73g/L) et en cendres (3,72g/L) par rapport au lactosérum. Le potassium est le principal minéral présent dans les cendres avec plus de 238 mg/L. Selon Cotte (2000), les sucres sont essentiellement représentés par le glucose et le fructose. Par ailleurs, l'acidité augmente avec la maturité du fruit, elle est due à la présence des acides organiques tels que l'acide malique et citrique. On trouve aussi des vitamines (acide ascorbique, vitamines A, E et B), en quantités notables.

Les premiers résultats indiquent que le milieu BMK peut donc être utilisé pour cultiver ces bactéries lactiques, c'est la raison pour laquelle nous avons voulu examiner si leurs principales caractéristiques technologiques étaient exprimées dans ces conditions trophiques.

3.3. Étude des caractéristiques technologiques en milieu BMK

3.3.1. Résultats des paramètres de croissance et production d'acide lactique en milieu BMK

L'analyse de variance effectuée sur les paramètres de croissance, pH et production d'acide lactique des souches appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Lactobacillus*, à 24 et 48 h d'incubation en milieu BMK et des milieux témoins (Mayeux, Mayeux m, M17 et MRSm) à travers le test F (Tableau 10) révèle que l'interaction entre les deux facteurs (souche et milieu) affecte très significativement ($p < 0,001$) les trois paramètres testés.

Tableau 10: Résultats de l'analyse de variance (Test F, ANOVA) des paramètres de croissance, pH et production d'acide lactique

	<i>Leuconostoc</i>			<i>Lactococcus</i>			<i>Lactobacillus</i>		
	F (souche)	F (milieu)	F (souche x milieu)	F (souche)	F (milieu)	F (souche x milieu)	F (souche)	F (milieu)	F (souche x milieu)
pH 24h	7,55 **	68,36 **	9,60 **	3,48 **	29,23 **	4,65 **	46,38 **	21,34 **	6,26 **
pH 48h	20,98 **	38,16 **	10,60 **	1,87 *	0,77 ns	6,64 **	14,32 **	24,18 **	13,50 **
A. lactique (g/L) 24 h	0,40 ns	4,77 *	8,39 **	45,79 **	49,26 **	7,44 **	26,41 **	19,04 **	8,79 **
A. lactique (g/L) 48 h	0,99 ns	4,43 *	8,15 **	22,22 **	0,29 ns	9,37 **	65,61 **	58,25 **	7,60 **
DO 24 h	1,89 *	34,62 **	7,93 **	27,98 **	28,63 **	5,44 **	86,72 **	62,54 **	7,60 **
DO 48 h	1,55 ns	21,97 **	9,31 **	41,01 **	2,65 ns	4,97 **	74,90 **	74,95 **	8,86 **
ddl (souche)	12,10			19,1			30,15		
ddl (milieu)	2,11			1,12			1,18		
ddl (souche x milieu)	38,78			39,8			61,12		

*: Significatif ($p < 0,05$)**: Très significatif ($p < 0,001$)

ns: Non significatif

3.3.1.1. Croissance des souches lactiques en milieu BMK

La croissance des bactéries lactiques reste un phénomène fastidieux qui nécessite un apport complexe aussi bien qualitativement que quantitativement, en éléments nutritifs.

Les résultats de la croissance obtenus d'une soixantaine de souches lactiques en milieu BMK après une incubation de 24 et 48 h, sont montrés dans les figures (14, 15, 16, 17, 18, 19), où on peut constater que toutes les souches testées croissent dans le milieu BMK et atteignent des densités cellulaires importantes ($0,5 < DO_{600nm} < 8$) ce qui indique que ce milieu leur est favorable.

Les leuconostocs et, encore plus, les lactobacilles donnent des valeurs de densités optiques plus élevée que les lactocoques, comprises entre 1 et 5. La densité optique la plus élevée en milieu BMK a été enregistrée pour la souche BH14 ($DO \approx 4,92$), et la plus faible est enregistrée pour la souche CHBK323 ($DO \approx 0,2$) après 48 h d'incubation. On peut aussi remarquer que certaines souches ont une croissance élevée après 24 h d'incubation par rapport à celle enregistrés à 48 h, et d'autres ont une croissance élevée à 48 h.

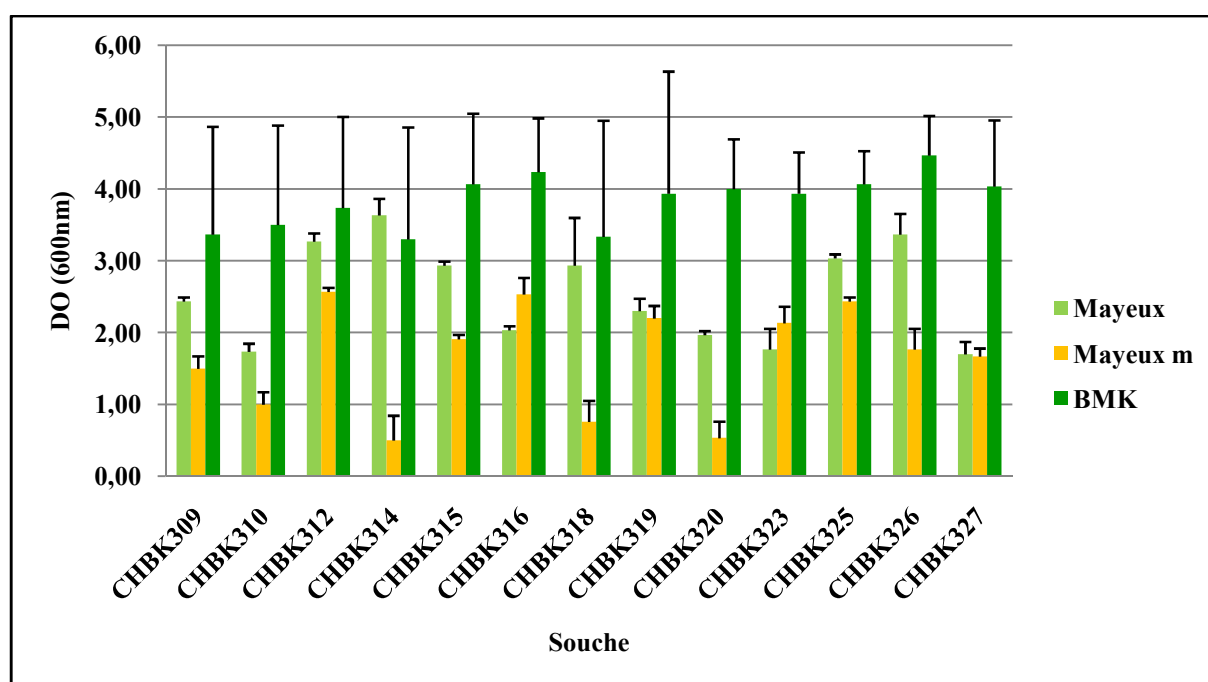


Figure 14:

Croissance des leuconostocs en milieu BMK après 24 h d'incubation

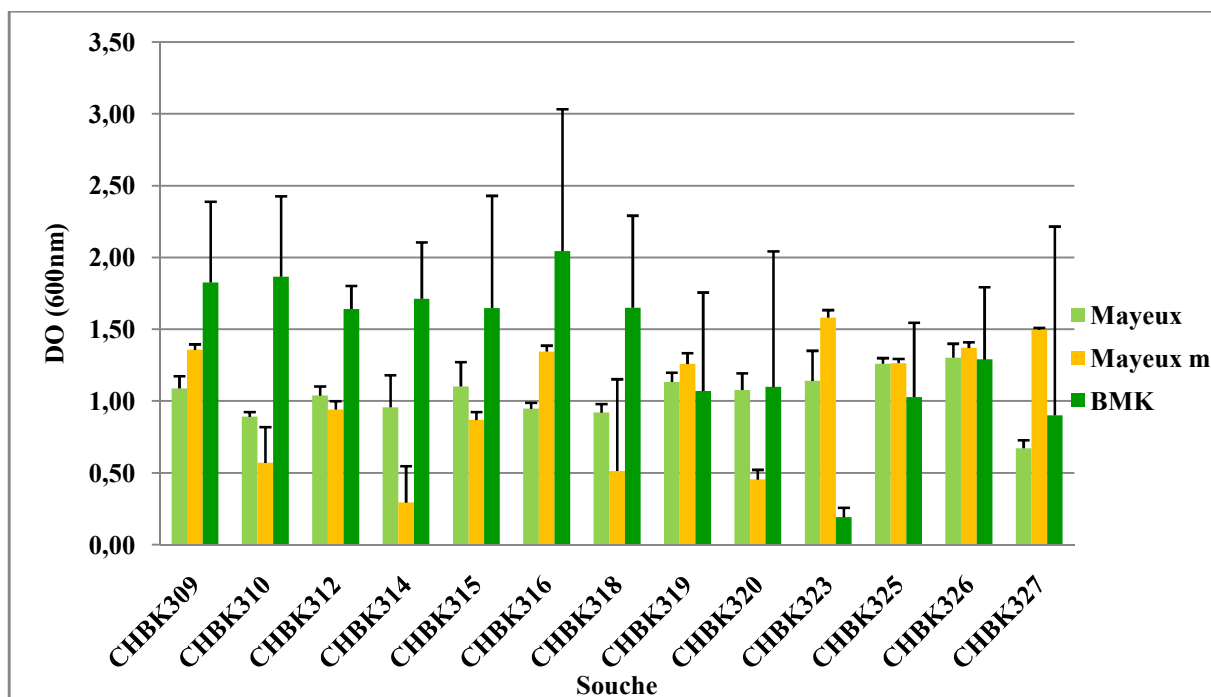


Figure 15:

Croissance des leuconostocs en milieu BMK après 48 h d'incubation

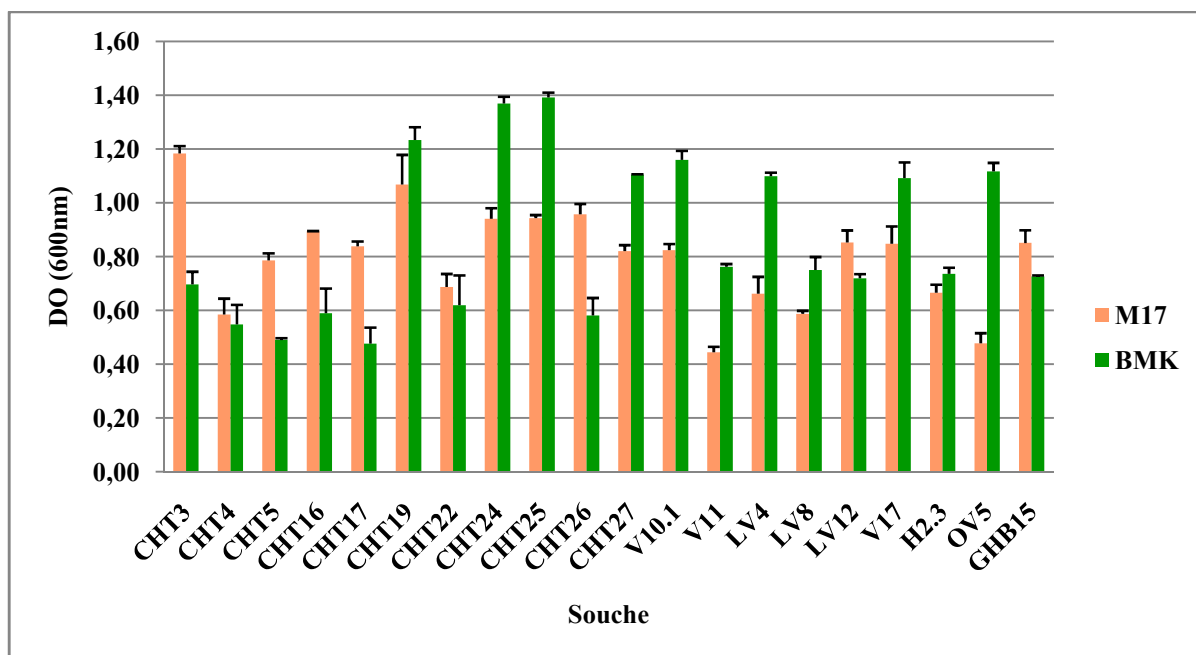


Figure 16 :

Croissance des lactocoques en milieu BMK après 24 h d'incubation

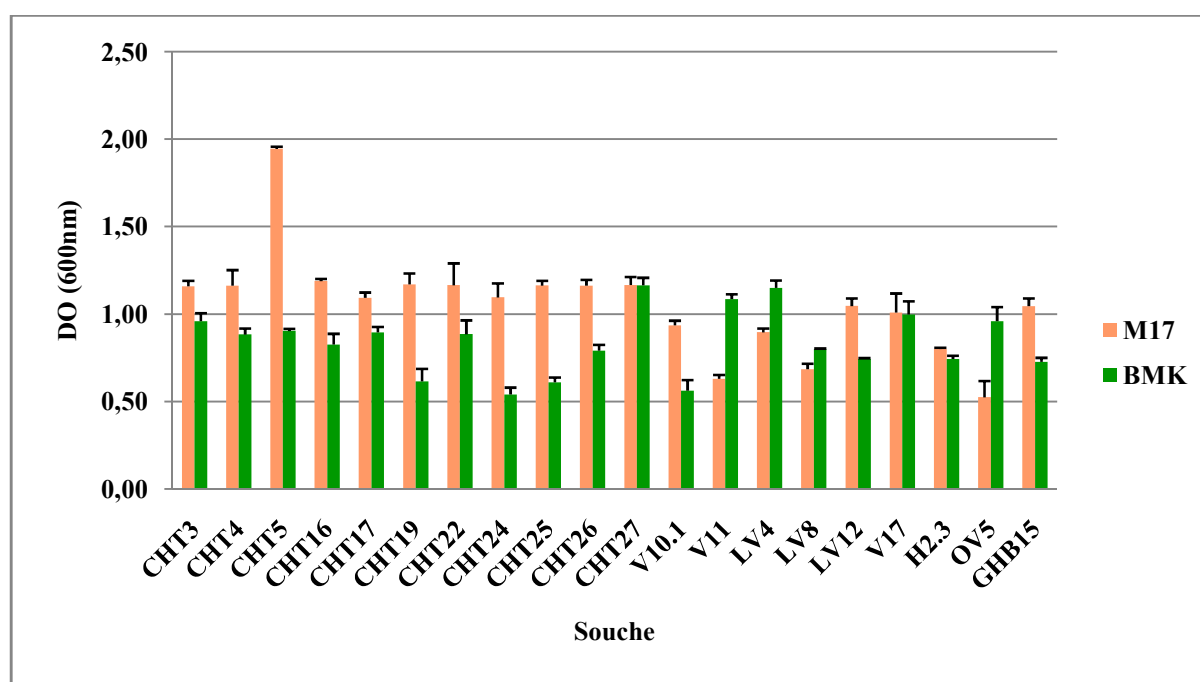


Figure 17 :

Croissance des lactocoques en milieu BMK après 48 h d'incubation

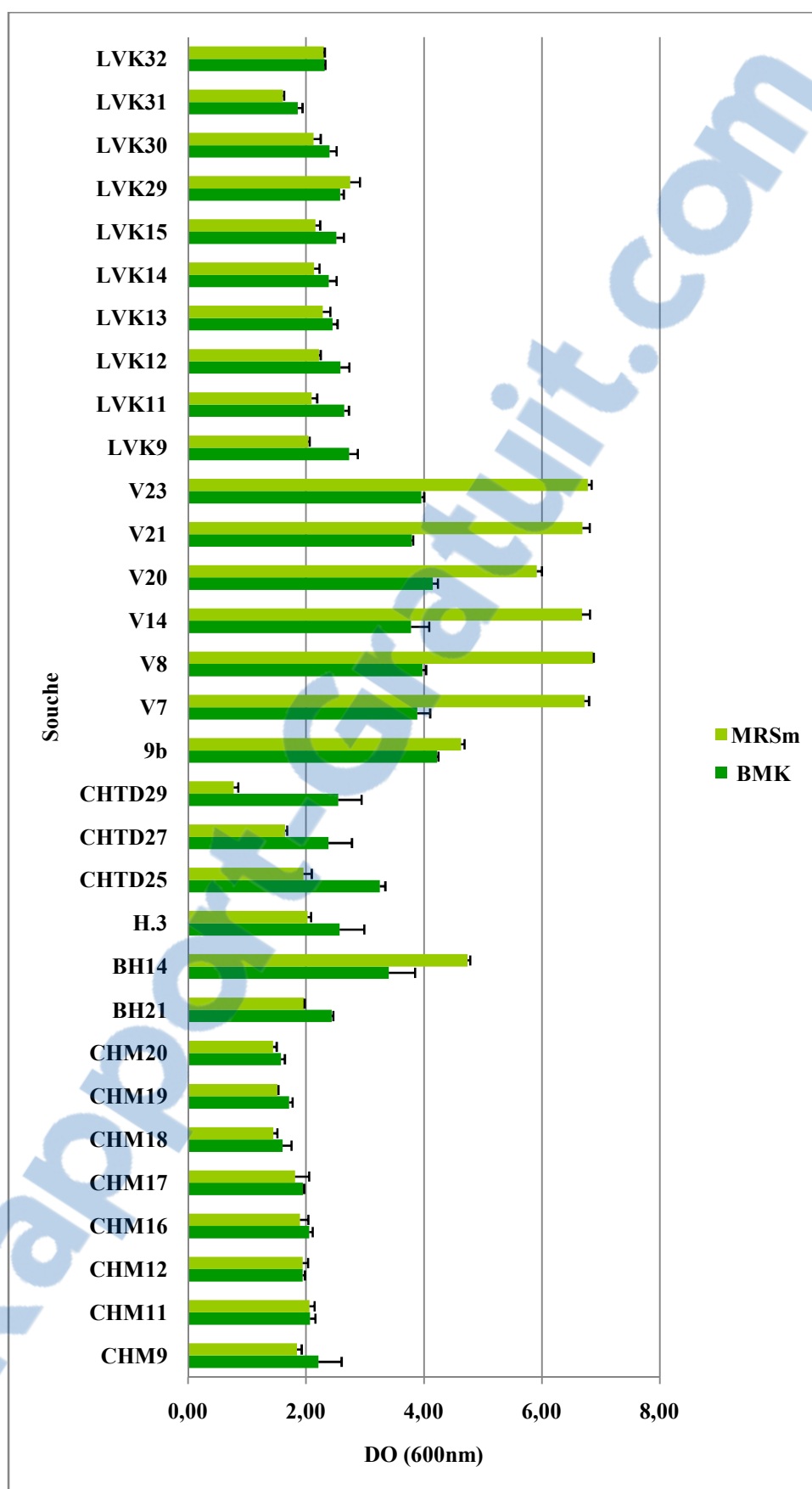


Figure 18 : Croissance des lactobacilles en milieu BMK après 24 h d'incubation

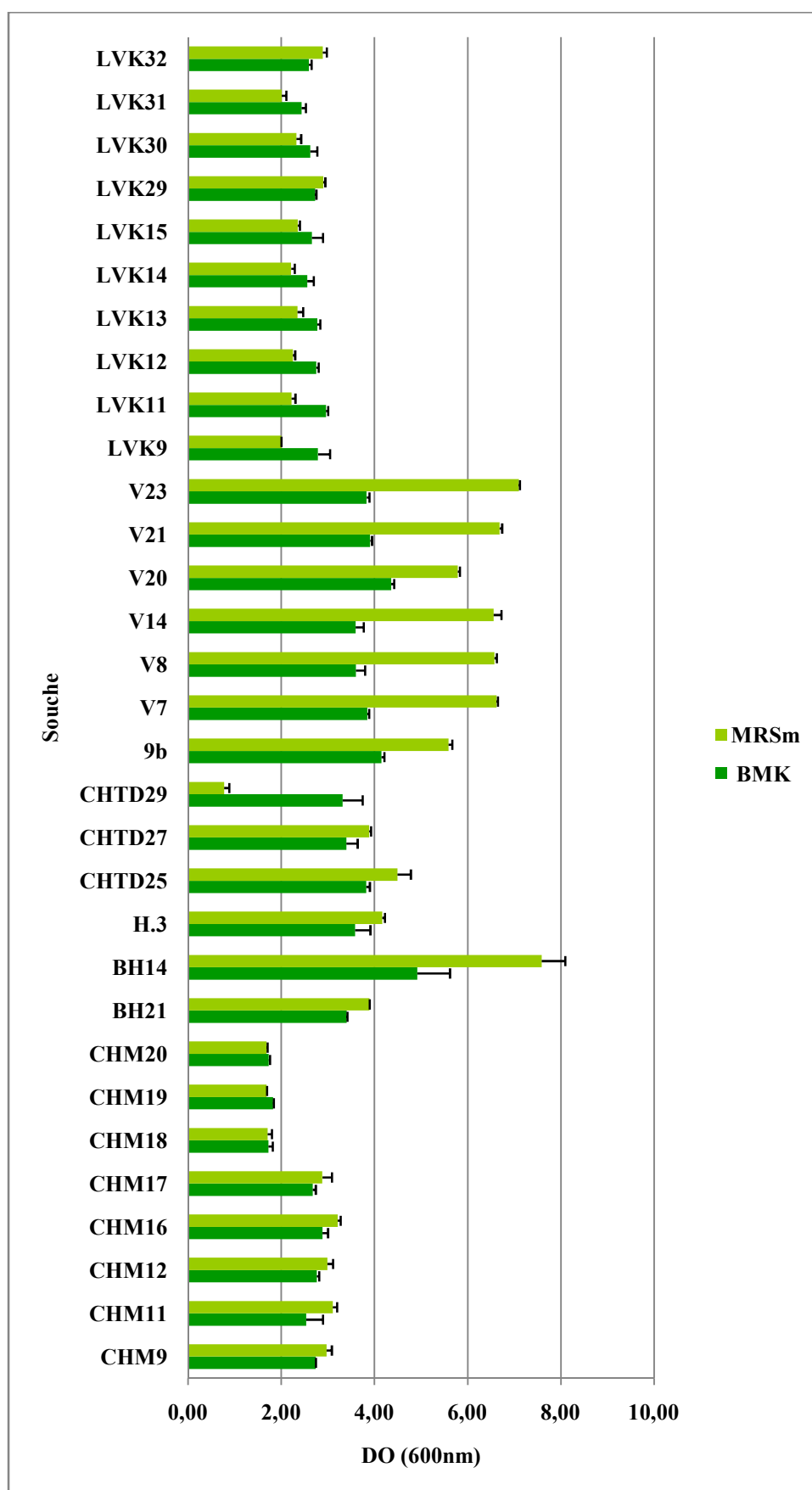


Figure 19 : Croissance des lactobacilles en milieu BMK après 48 h d'incubation

On remarque après 24 h d'incubation, que la croissance est aussi en fonction de la souche considérée : en effet on peut distinguer trois catégories de souches selon leur croissance dans ce milieu :

- Des souches présentant des croissances identiques avec le milieu témoin ($p > 0,05$). C'est le cas des souches de lactocoques CHT4, CHT22, LV12, H2.3 et GHB15; de leuconostocs CHBK309, CHBK310, CHBK312, CHBK315, CHBK316, CHBK319, CHBK323, CHBK325, CHBK 326 et CHBK327; ainsi que des souches de lactobacilles CHM9, CHM11, CHM12, CHM16, CHM17, CHM18, CHM19, CHM20, BH21, 9b, LVK12, LKK13, LVK14, LVK14, LVK15, LVK29, LVK30, LVK3 et LVK32.
- Des souches présentant une différence de croissance significatif ($p < 0,05$): on peut les diviser en celles qui poussent mieux en milieu BMK et celles qui poussent mieux en milieux témoins:
 - Sur Milieu BMK : CHT19, LV8, H.3 et LVK11.
 - Sur Milieu témoin : CHT26 et CHT17.
- Des souches présentant une différence de croissance très significative ($p < 0,001$) :
 - Sur Milieu BMK : CHTD25, CHTD27, CHTD29, LVK9, CHBK314, CHBK318, CHBK320, CHT24, CHT25, CHT27, V10.1, V11, LV4, LV8, V17 et OV5.
 - Sur Milieu témoin : V7, V8, V14, V20, V21, V23, CHT3, CHT5, CHT16, CHT19 et CHT26.

On constate après 48 h d'incubation, que toutes les souches de leuconostocs et lactobacilles ont présenté des croissances similaires en milieu témoin et BMK. Par contre, les lactocoques présentent une différence significative ou très significative en faveur du milieu M17 à l'exception des souches V11, LV4 et OV5 qui poussent mieux en milieu BMK. Les souches CHT27, LV8, V17 et H2.3 présentent une croissance identique dans les deux milieux. Ceci confirme les remarques faites précédemment.

3.4.1.2. Étude du pouvoir acidifiant des souches

Le pouvoir acidifiant des souches lactiques demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière. La production d'acide lactique est effectivement une des principales fonctions désirées des bactéries lactiques car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière du lait, en intervenant comme coagulant et aussi comme antimicrobien (Schmidt *et al.*, 1994). L'acide lactique produit est aussi très demandé dans divers procédés industriels et pharmaceutiques (Reddy *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus sont montrés dans les figures (20, 21, 22, 23, 24, 25), où on peut constater que le comportement acidifiant de ces bactéries est variable d'une souche à l'autre. En effet, la quantité de lactate produite après 24 h d'incubation se situe au voisinage de 4 g/L chez les lactobacilles tels que CHM9, CHM11, CHM12, LVK9, LVK12, LVK32, à l'exception des souches BH21, BH14, 9B,V7,V8,V14,V20,V21,V23 qui se démarquent en produisant une quantité d'acide lactique plus élevée, entre 7 et 10 g/L, par rapport à la moyenne de l'ensemble des souches testées.

Les leuconostocs et encore plus les lactocoques donnent des valeurs d'acidification moyennes, voire faibles, comprises entre 1,5 et 4,2 g/L. La quantité d'acide lactique la plus élevée produite a été enregistrée chez les souches de leuconostocs CHBK327, CHBK326 avec 4,2 g/L, et la plus faible, 1,5 g/L, est enregistrée chez les lactocoques CHT3, CHT22 et CHT25.

Toutes les souches testées ont montré une augmentation considérable de la production d'acide lactique après 48 h d'incubation ; les souches de lactobacilles sont les plus acidifiantes, la quantité la plus élevée a été enregistrée chez la souche BH14 avec 18 g/L. Les lactocoques et les leuconostocs sont moyennement acidifiants avec une moyenne de 4 g/L.

En accord avec Hassaine (2012), une accélération de croissance et de production de lactate chez les lactobacilles est observée dès que le pH baisse, contrairement aux lactocoques qui atteignent rapidement un degré d'acidité plus avancé, causant ainsi chez ces bactéries une auto-inhibition.

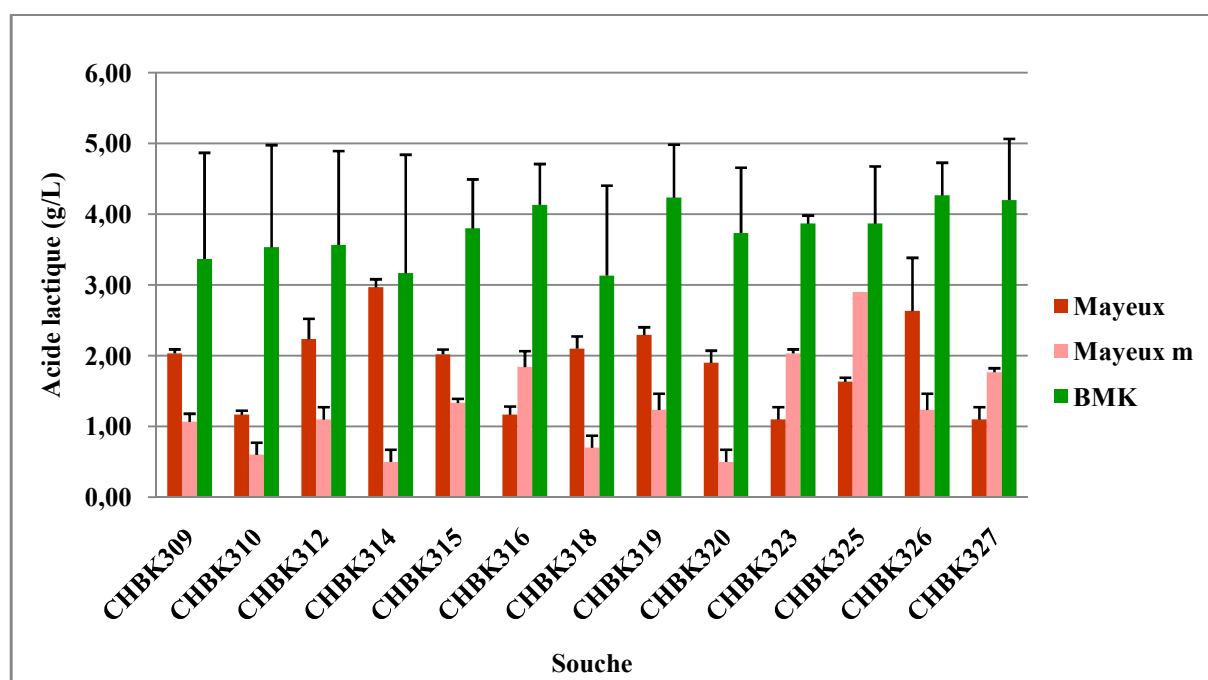


Figure 20 : Production d'acide lactique par des souches de *Leuconostoc* en milieux Mayeux, Mayeux m et BMK après 24 h d'incubation à 30 °C

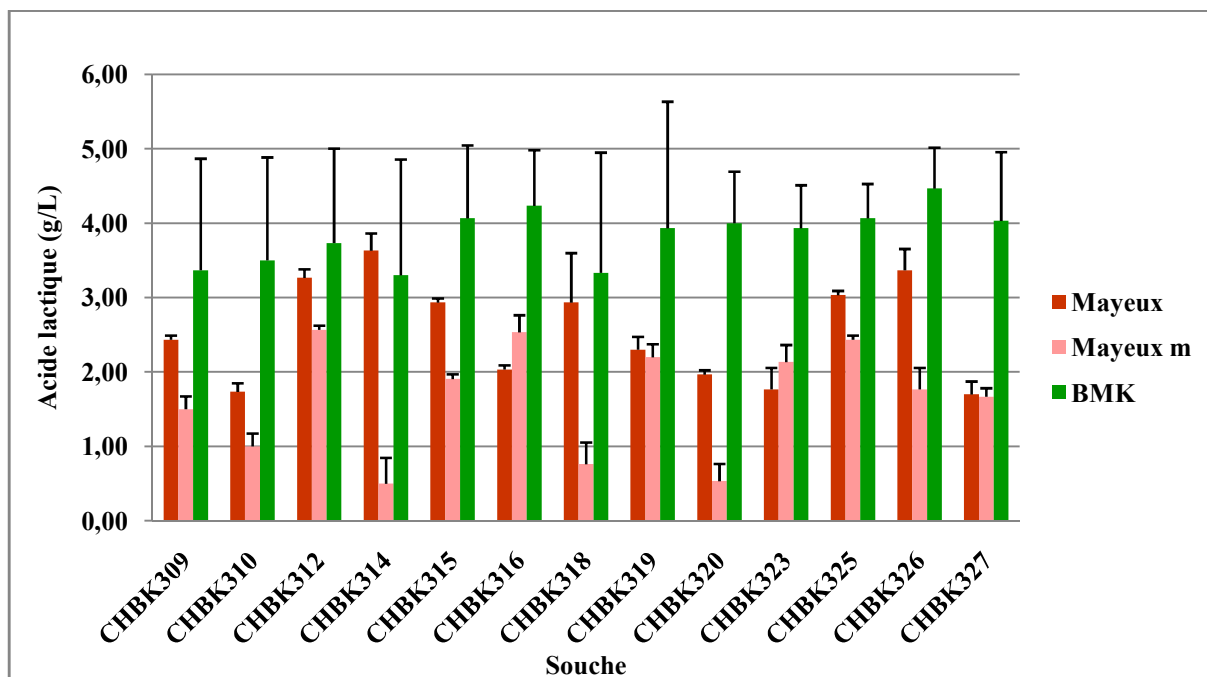


Figure 21: Production d'acide lactique par des souches de *Leuconostoc* en milieux Mayeux, Mayeux m et BMK après 48 h d'incubation à 30 °C

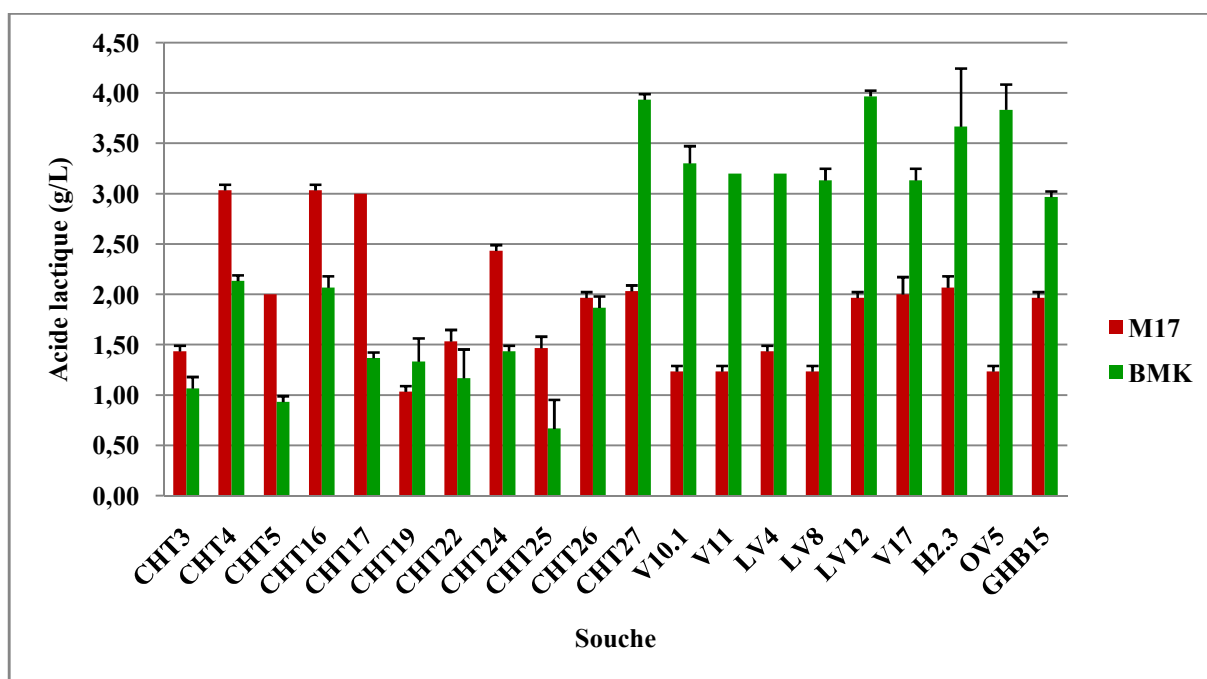


Figure 22: Production d'acide lactique par des souches de *Lactococcus* en milieux M17 et BMK après 24 h d'incubation à 30 °C

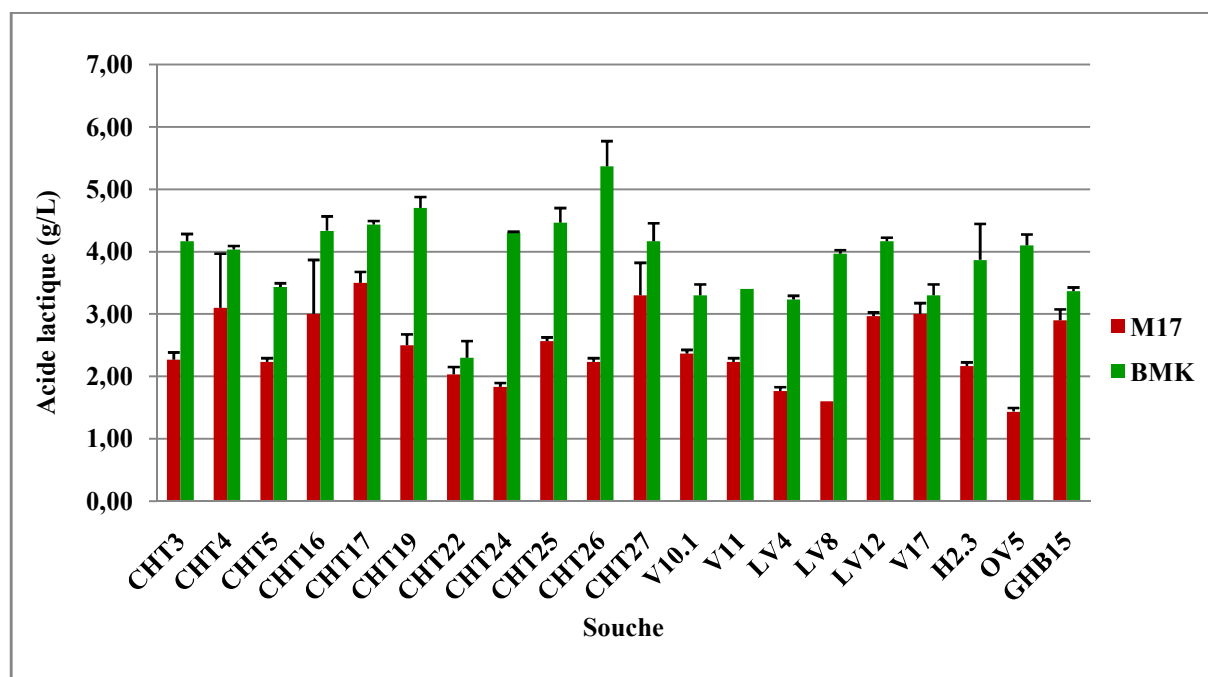


Figure 23: Production d'acide lactique par des souches de *Lactococcus* en milieux M17 et BMK après 48 h d'incubation à 30 °C

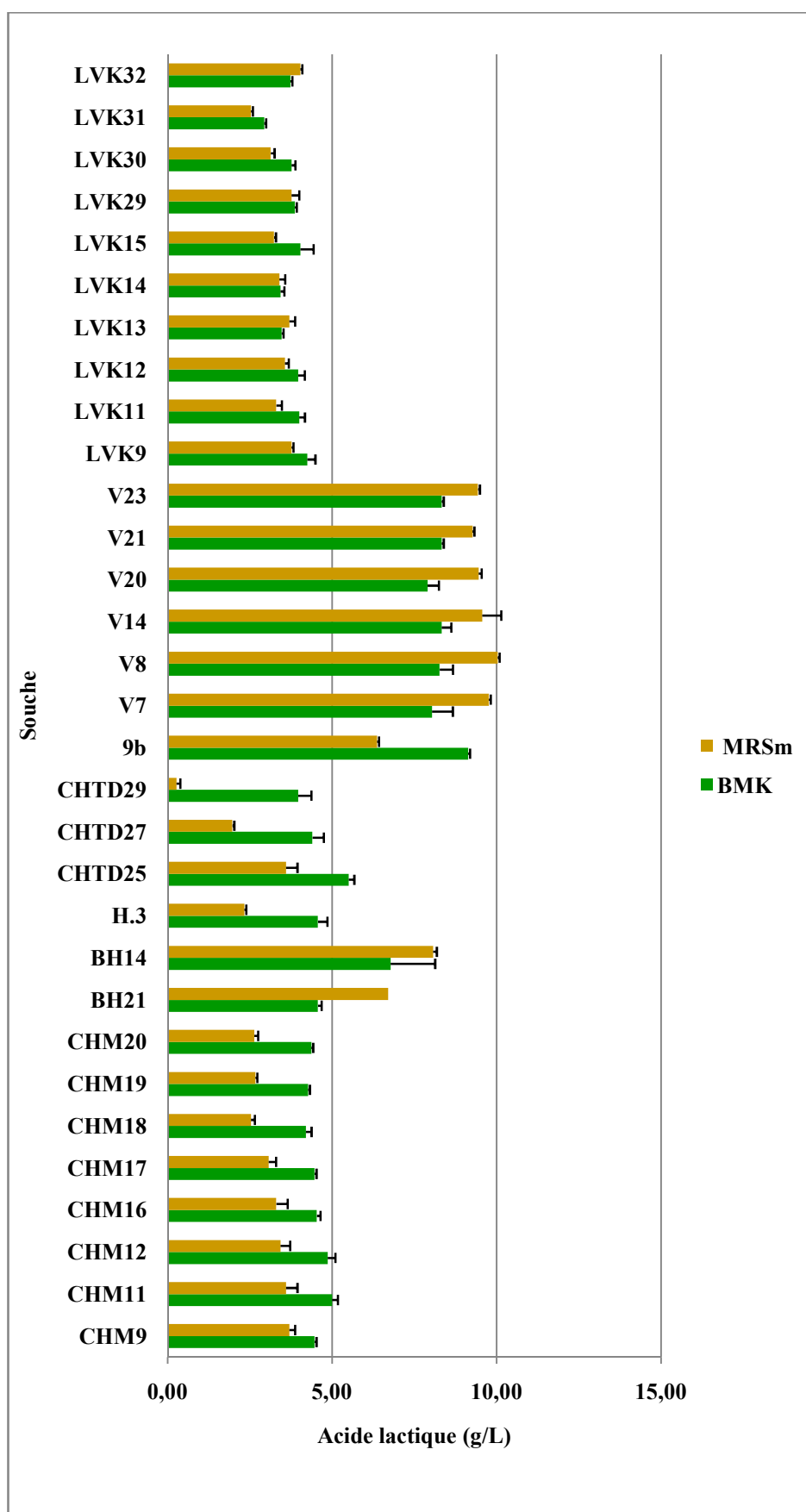


Figure 24 : Production d'acide lactique par des souches de *Lactobacillus* en milieux MRSm et BMK après 24 h d'incubation à 30 °C

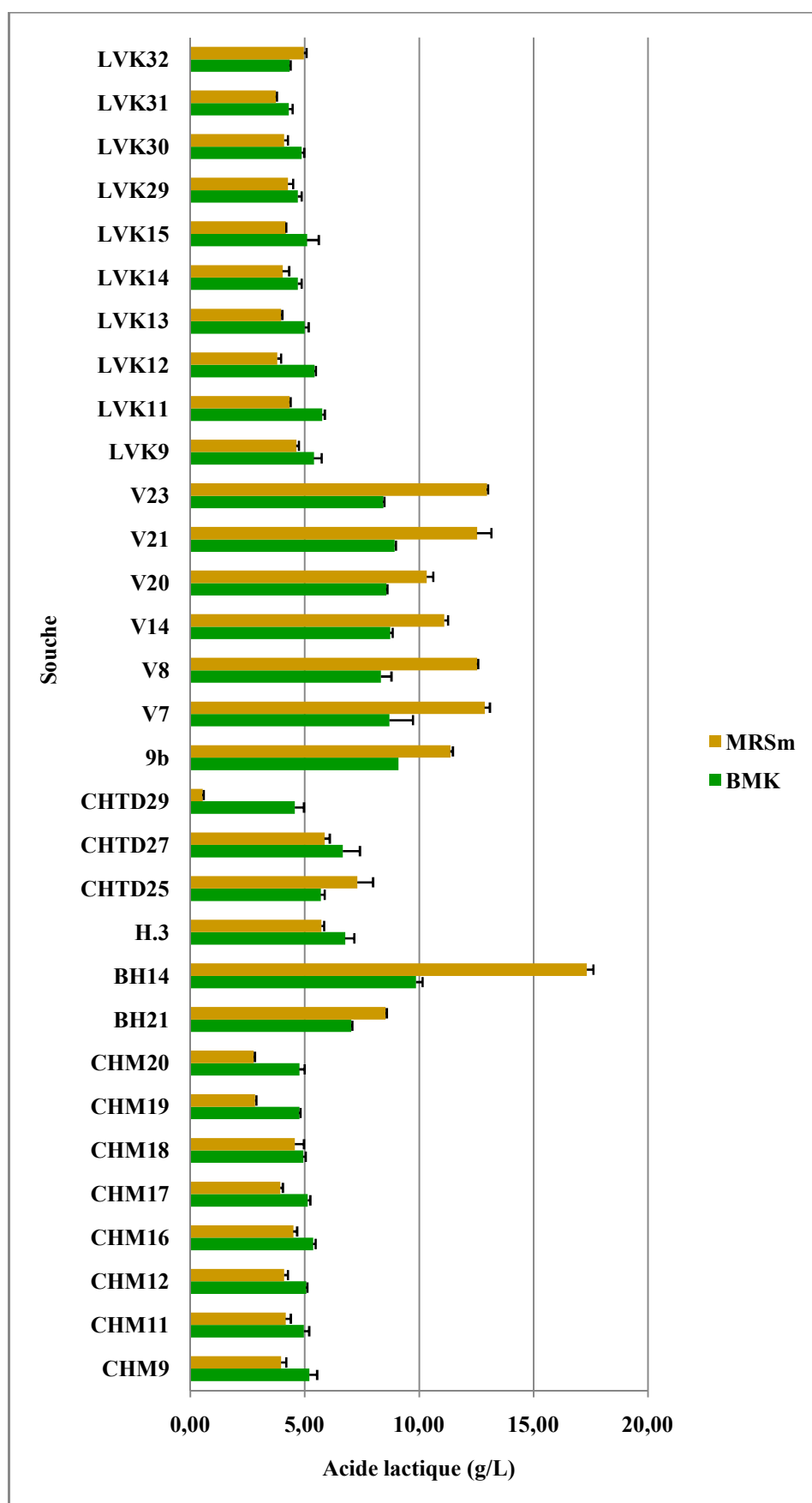


Figure 25 : Production d'acide lactique par des souches de *Lactobacillus* en milieux MRSm et BMK après 48 h d'incubation à 30 °C

Après 24 h d'incubation, des différences sont également observées pour un même milieu et en fonction de la souche : en effet, on peut distinguer trois catégories de souches selon leur pouvoir acidifiant dans ce milieu :

- Celles produisant des quantités d'acide lactique identiques ($p>0,05$) avec le milieu témoin : c'est le cas des lactocoques CHT3, CHT19, CHT22 et CHT26; des lactobacilles CHM9, LVK9, LVK11, LVK12, LVK13, LVK14, LVK15, LVK29, LVK30, LVK31, LVK32; et des leuconostocs CHBK314, CHBK318 et CHBK325.
- Celles qui présentent une différence significative ($p<0,05$) en quantité d'acide lactique produite : trois souches de leuconostocs (CHBK309, CHBK312 et CHBK315) et une souche de lactocoque (GHB15) possèdent un pouvoir acidifiant élevé en milieu BMK et aucune souche sur les milieux témoins.
- Celles qui présentent une différence très significative ($p<0,001$) en quantités d'acide lactique produites : presque toutes les souches restantes sont plus acidifiantes en milieu BMK à l'exception de six souches de lactocoques (CHT4, CHT5, CHT16, CHT17, CHT24 et CHT25) et huit lactobacilles (BH14, BH21, V7, V8, V14, V20, V21 et V23).

Après 48 h d'incubation le tiers des souches produit des quantités identiques en milieu BMK et milieu témoin, le reste des souches sont plus acidifiantes en milieu BMK (différences significative et très significative), à l'exception de quelques souches de lactobacilles (BH21, BH14, CHTD25, 9b, V7, V8, V14, V20, V21 et V23) qui sont plus acidifiantes sur milieu MRSm.

3.3.2. Analyse en composantes principales (ACP)

La sélection des souches a été réalisée à partir d'une ACP des résultats obtenus précédemment, dont on retient les contributions spécifiques sur les axes factoriels.

De plus, la similitude exprimée par deux ou plusieurs souches, nous a conduit à classer ces derniers sur la base de leur pouvoir acidifiant et leur croissance.

Les variables propres de la matrice de corrélation obtenus pour cette analyse (ACP) comme combinaisons linéaires des variables de départ sont montrés dans les figures (26, 27 et 28). La variation totale (100%) est répartie selon 7 ou 8 valeurs propres (selon le groupe bactérien étudié) dont on ne garde que les valeurs propres (et direction propres) qui représentent au moins 18% de variations. Seulement deux valeurs propres les plus élevés de la matrice de corrélation sont retenues.

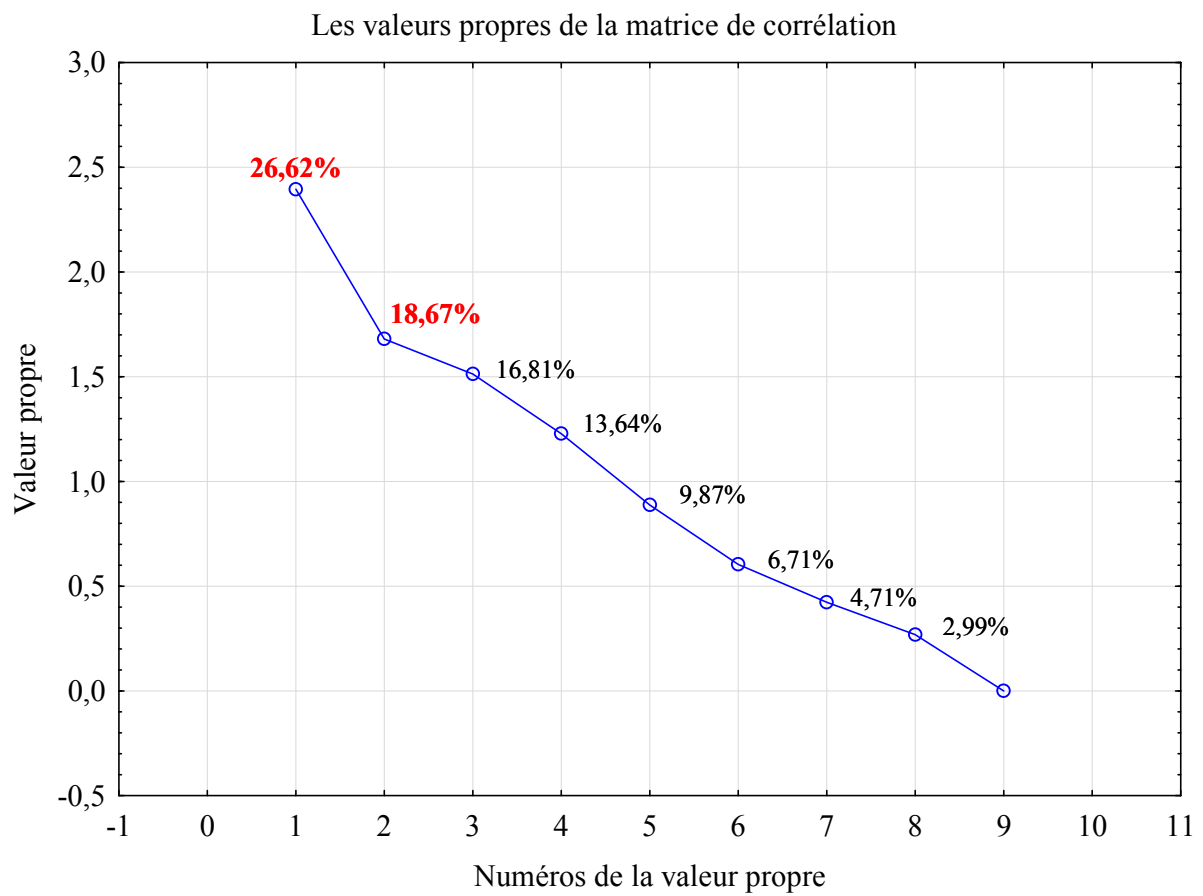


Figure 26: Représentation graphique des valeurs propres de la matrice des corrélations des leuconostocs

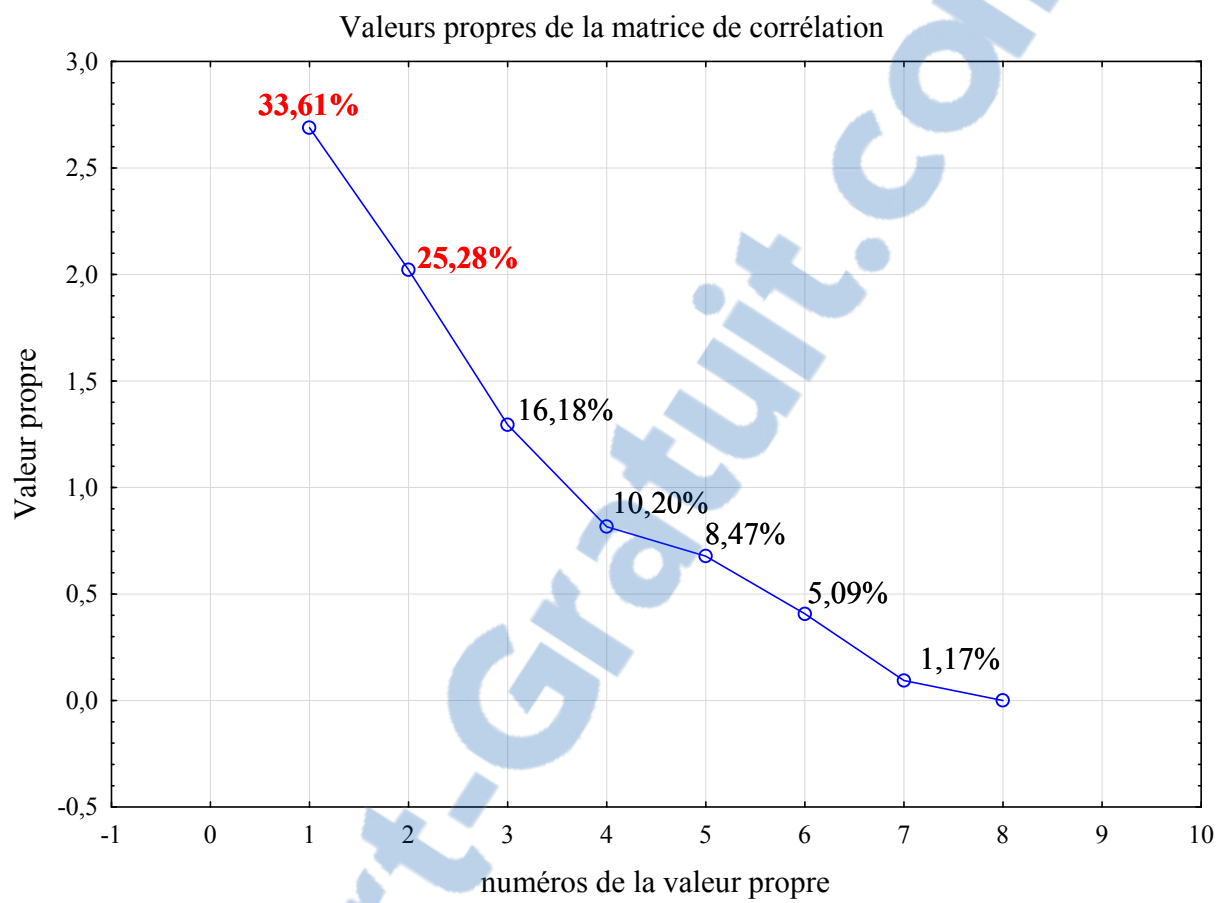


Figure 27 : Représentation graphique des valeurs propres de la matrice des corrélations des lactocoques

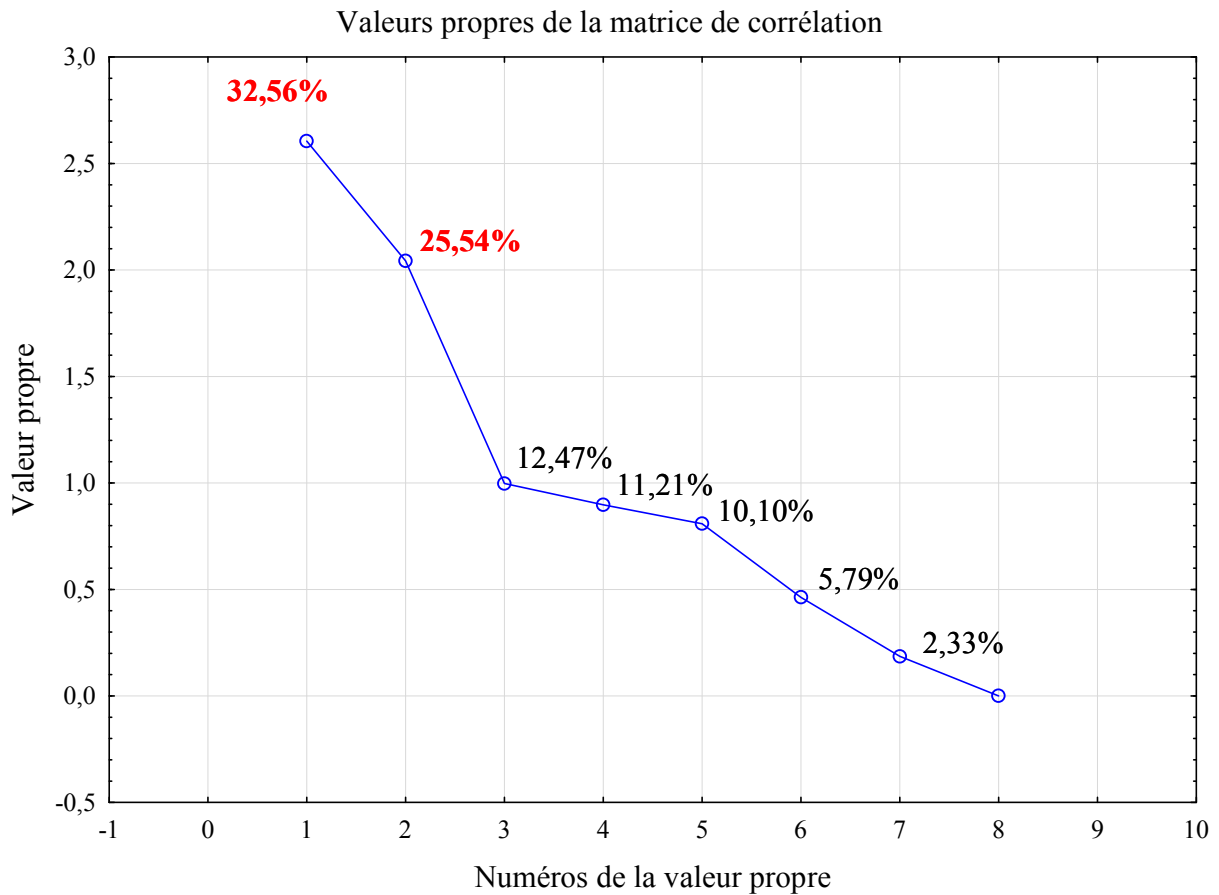


Figure 28 : Représentation graphique des valeurs propres de la matrice des corrélations des lactobacilles

Les deux premiers axes (Facteur 1, Facteur 2), ensemble, expliquent plus de 40% des variances totales par rapport à la matrice de corrélation. La projection du nuage des points représentant les souches étudiées et la position des variables utilisées sur le plan (F1, F2) sont représentés dans les figures (29, 30 et 31).

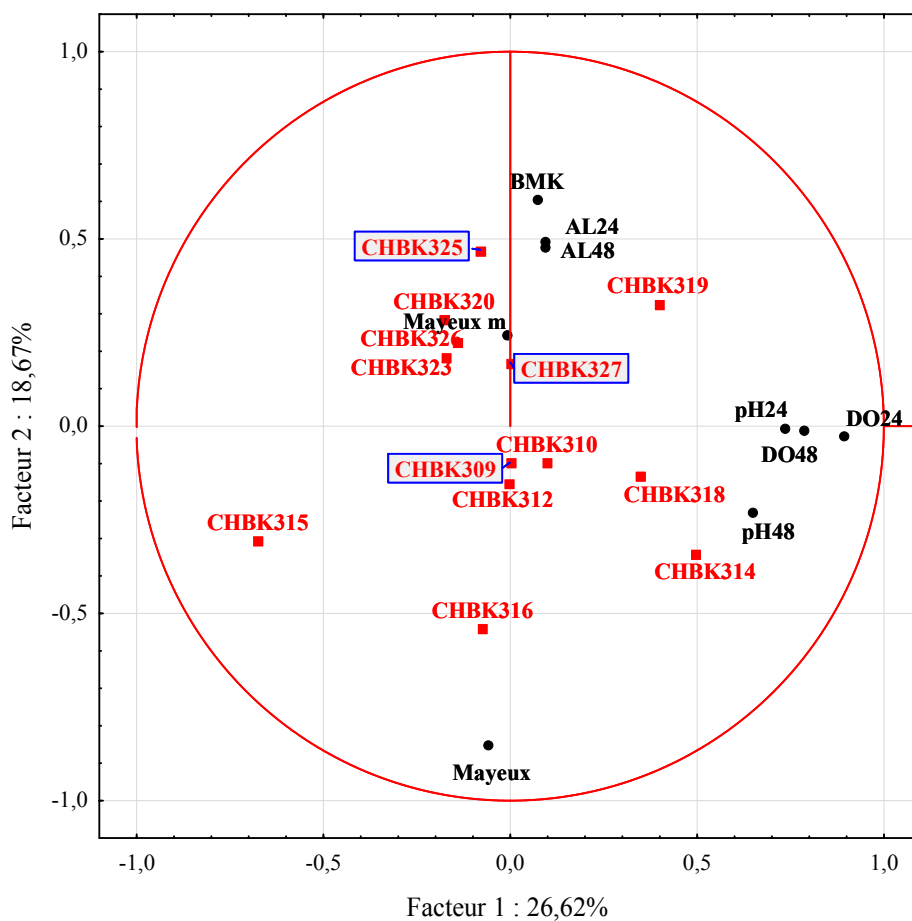


Figure 29 : Analyses en composantes principales pour les souches de *Leuconostoc*, pour les variables milieu, pH, production d'acide lactique et croissance

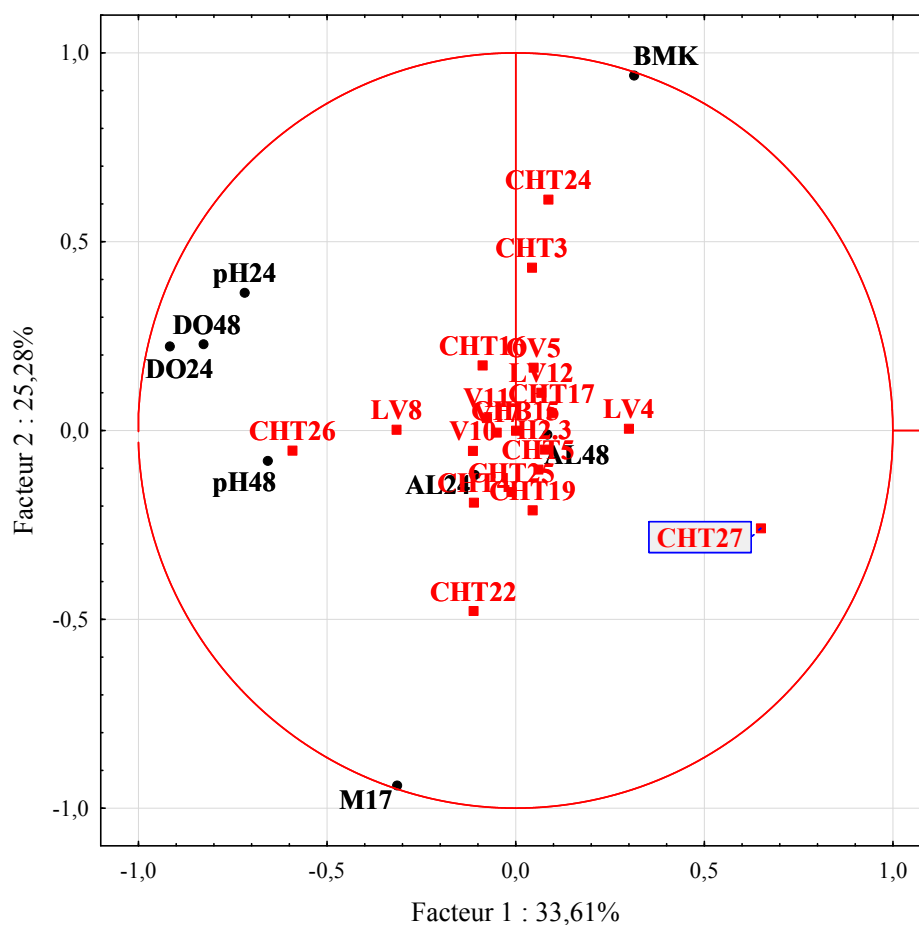


Figure 30 : Analyses en composantes principales pour les souches de *Lactococcus*, pour les variables milieu, pH, production d'acide lactique et croissance

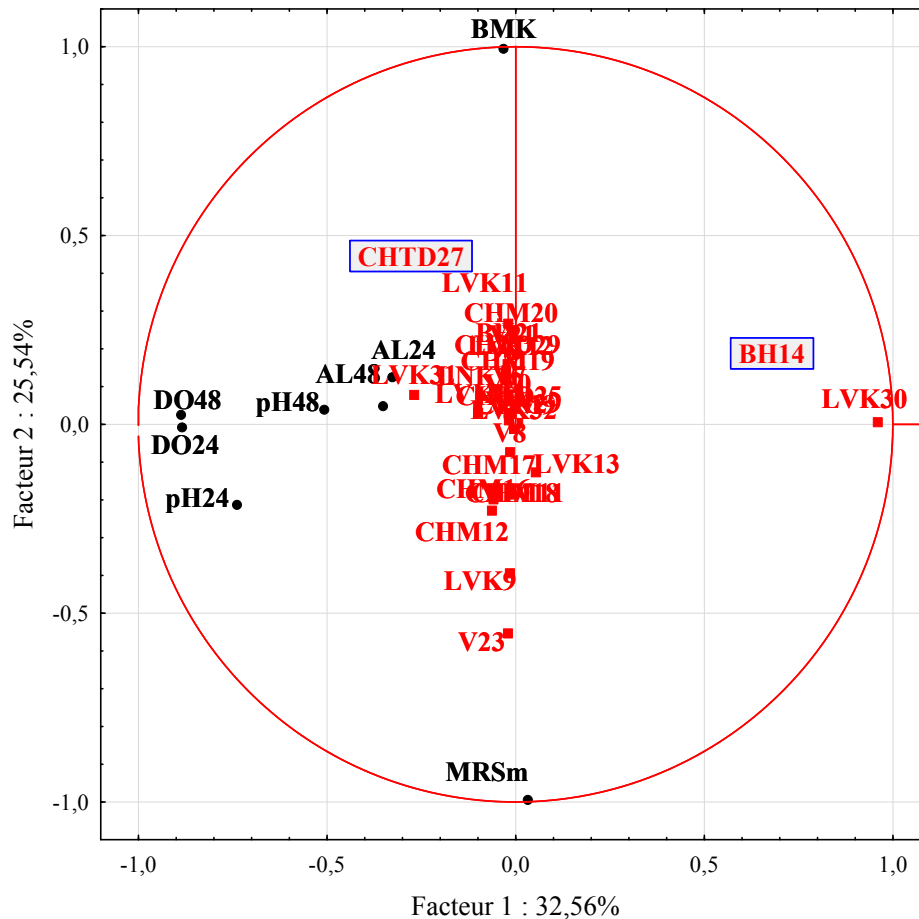


Figure 31: Analyses en composantes principales pour les souches de *Lactobacillus*, pour les variables milieu, pH, production d'acide lactique et croissance.

Les différentes souches sont réparties selon deux axes, décrits par les variables "croissance", "acidité produite" et les milieux utilisés "Mayeux", "Mayeux m", "M17", "MRSm" et "BMK".

La proximité de l'extrémité du vecteur représentant une variable avec le cercle des corrélations renseigne sur la qualité de représentation de cette variable, démontrant ainsi que ces variables sont bien représentées dans le plan factoriel. En revanche, on observe clairement la faible corrélation entre ces variables renseignées par l'angle formé entre vecteur de chaque variable, sauf dans le cas des variables exprimant la même activité métabolique tel que l'acidité produite après 24 et 48 h qui semble être fortement corrélée avec un angle formé qui

tend vers 0°. La même remarque peut être faite pour la variable du milieu "BMK" et milieu «Mayeux m» où l'ongle formé ne dépasse pas les 3°.

Sur le plan factoriel (F1, F2), les souches de leuconostocs ayant des fortes contributions spécifiques positives sont : CHBK309 (+ 0,57), CHBK310 (+ 0,38) et CHBK325 (+ 0,29). En opposition les variables qui possèdent des contributions spécifiques majeurs négatives sont : CHBK327 (- 0,44), CHBK323 (- 0,27) et CHBK 325 (- 0,20). Chez les lactocoques, la souche CHT27 a une forte contribution positive (+ 0,64). Les contributions spécifiques négatives regroupent : CHT22 (- 0,47), CHT27 (- 0,25) et CHT19 (- 0,21). Par les résultats des contributions spécifiques positives impliquent que les souches de *Lactobacillus* LVK30 et BH14 ont une forte similarité respectivement (+ 0,88) et (+ 0,79). Les valeurs négatives sélectionnent une seule souche CHTD27 (- 0,51).

A l'issue de cette analyse, il apparaît évident que les souches CHBK309, CHBK325, CHBK327, CHT27, BH14 et CHTD27 s'avèrent présenter un pouvoir acidifiant intéressant, d'où l'intérêt de les retenir pour la suite des travaux expérimentaux.

3.3.3. Recherche du diacétyle

Le diacétyle a été identifié comme étant un des principaux composés d'arôme des laits et crèmes fermentées tels le babeurre, le yaourt (Lee *et al.*, 1995), le beurre, le fromage cottage (Hugenholtz et Starrenburg, 1992) et les fromages frais (Boumerdassi *et al.*, 1996).

La production de diacétyle a été recherchée chez toutes les souches sur les différents milieux témoins et le milieu BMK. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux (11, 12 et 13) et montrés dans la figure 32, où on peut remarquer que l'intensité de la couleur rouge, qui reflète la quantité de diacétyle est variable d'une souche à l'autre et d'un milieu à l'autre. En effet, aucune production de diacétyle n'est détectée chez les leuconostocs sur le milieu Mayeux et Mayeux m. Ces résultats confirment ceux de Kalbaza (2010), qui elle aussi n'a trouvé aucune production de diacétyle sur milieu Mayeux. Par contre la production sur milieu BMK est plus importante et pour pratiquement toutes les souches testées.

Les lactocoques et, encore plus les lactobacilles montrent une production plus importante en milieu BMK qu'en milieux témoins pour certaines souches, c'est le cas de V11, V17, OV5, V20. D'autres présentent le même résultat positif en milieu témoin et en milieu BMK à l'exception de cinq souches de lactobacilles (BH21, H3, CHTD25, CHTD27 et CHTD29) et deux lactocoques (CHT26 et CHT3) qui ne produisent pas de diacétyle quelque soit le milieu.

Ces résultats concernant les souches de lactobacilles confirment nos précédentes observations (Benaïssa, 2010).

Ces observations nous permettent de dire que la production de diacétyle dépend en partie de la composition chimique du milieu de culture, en particulier la présence de forte concentration de citrate. De nombreux auteurs ont montré que plusieurs bactéries lactiques, spécialement *Lactococcus diacetylactis*, utilisent le citrate pour produire les composés d'arôme tel que le diacétyle et l'acétoïne (Schmitt *et al.*, 1990; Starrenburg et Hugenholtz, 1991; Bassit *et al.*, 1993; Hugenholtz *et al.*, 1993). Il a été également démontré que la croissance de *Leuconostoc cremoris* en présence du lactose est stimulée par le citrate, mais en présence de citrate seul, aucune croissance n'est observée (Cogan, 1987; Schmitt *et al.*, 1990; Schmitt et Diviès, 1991; Starrenburg et Hugenholtz, 1991).

De plus, Schmitt *et al.* (1988) ont conclu que certaines conditions de culture, telles qu'une température de 22 °C et un pH de 4,8 augmentent la production de diacétyle.

Tableau 11 : Production de diacétyle par les leuconostocs

Souches	Milieux		
	Mayeux	Mayeux m	BMK
CHBK309	-	-	++
CHBK310	-	-	+
CHBK312	-	-	+
CHBK314	-	-	+/-
CHBK315	-	-	+
CHBK316	-	-	+/-
CHBK318	-	-	+
CHBK319	-	-	++
CHBK320	-	-	+
CHBK323	-	-	+
CHBK325	-	-	+
CHBK326	-	-	+
CHBK327	-	-	+

+ : réaction positive ; ++ : réaction positive intense ; - : réaction négative, +/- : réaction douteuse

Tableau 12 : Production de diacétyle par les lactobacilles

Souches	Milieux		Souches	Milieux	
	MRSm	BMK		MRSm	BMK
CHM9	+	+	V8	+	+
CHM11	+	+	V14	+	+
CHM12	+	+	V20	++	++
CHM16	+	+	V21	+	+
CHM17	+	+	V23	+	+
CHM18	+	+	LVK9	+	+
CHM19	+	+	LVK11	+	+
CHM20	+	+	LVK12	+	+
BH14	+	+	LVK13	+	+
BH21	-	-	LVK14	+	+
H3	-	-	LVK15	+	+
CHTD25	-	-	LVK29	+	+
CHTD27	-	-	LVK30	+	+
CHTD29	-	-	LVK31	+	+
9b	+	+	LVK32	+	+
V7	+	+			

Tableau 13 : Production de diacétyle par les lactocoques

Souches	Milieux	
	M17	BMK
CHT3	-	-
CHT4	+	+
CHT5	+	+
CHT16	+	+
CHT17	+	+
CHT19	+	+
CHT22	+	+
CHT24	+	+
CHT25	+	+
CHT26	-	-
CHT27	+	+
V10.1	+	+
V11	+/-	++
V17	+/-	++
H2.3	+/-	+
OV5	+	++
GHB15	+/-	+/-
LV4	+/-	+/-
LV8	+/-	+/-
LV12	+/-	+/-

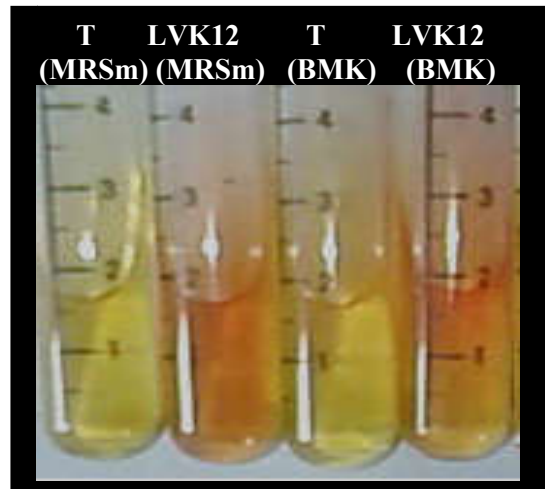


Figure 32 :
Production de diacétyle par la souche LVK12 en milieux MRSm et BMK

3.3.4. Etude de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches a été recherchée sur milieu BMK et comparée à ceux obtenus sur les milieux M17, MRSm, Mayeux et Mayeux m additionnés de 1% de lait écrémé reconstitué à 10% (m/v). Après incubation, cette activité s'est manifestée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies ensemencées en touches à la surface des géloses. Les résultats sont exprimés en rapport (h/c) [h : diamètre du halo clair (mm) ; c : diamètre de la colonie (mm)].

Les résultats obtenus sont montrés dans les figures (33, 34 et 35). On peut faire les remarques suivantes :

- toutes les souches ont exprimé une activité protéolytique, à l'exception la souche de *Lactobacillus* CHTD29.
- le comportement protéolytique de ces souches est variable selon la souche et le genre : c'est le cas des souches de lactobacilles (CHM18, CHM19, CHM20, V7, V20, V21 et V23) qui manifestent un halo de protéolyse plus élevé.
- l'activité protéolytique est comprise dans l'intervalle 1,25-5 pour les lactobacilles, l'intervalle 1,2-1,5 pour les lactocoques et l'intervalle 1,2-1,6 pour les Leuconostocs. Ceci indique que les bactéries du genre *Lactobacillus* sont plus protéolytiques que les lactocoques et les Leuconostoc.

Ces observations rejoignent celles de plusieurs auteurs (Donkor *et al.*, 2007; Monnet *et al.*, 2008; Roudj *et al.*, 2009). Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes,

liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée et les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques.

On remarque aussi que le comportement protéolytique des souches testées en milieu BMK est sensiblement similaire (rapport h/c) à celui obtenu en milieux témoins, à l'exception de certaines souches où ce comportement est variable d'un milieu à l'autre : c'est le cas de la souche CHTD27 qui manifeste un halo de protéolyse plus élevé dans le milieu BMK, et la souche V8 qui est plus protéolytique en milieu MRSm.

Ces observations nous permettent de confirmer que l'activité protéolytique dépend en partie de la composition chimique du milieu de culture. Ces mêmes observations ont été constatées au niveau de notre laboratoire par Zadi-Karam (1998), Drici (2000), Benaissa (2010) et Hassaïne (2012).

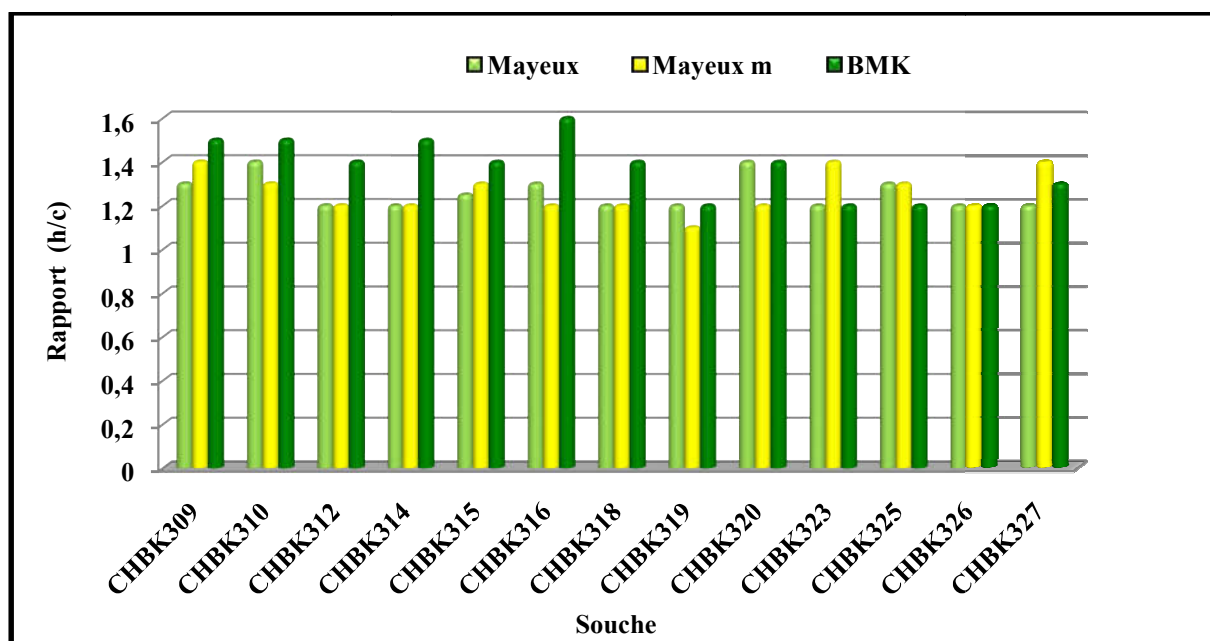


Figure 33 :
Activité protéolytique des *Leuconostocs* en milieux Mayeux, Mayeux m et BMK

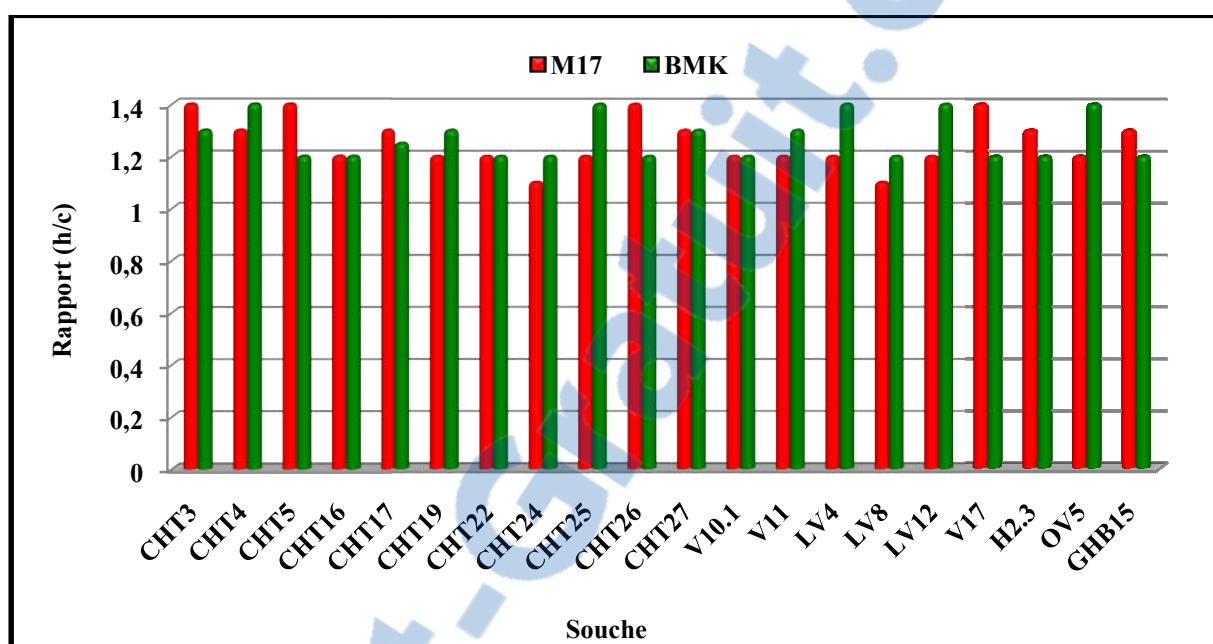


Figure 34 :
Activité protéolytique des lactocoques en milieu M17 et BMK

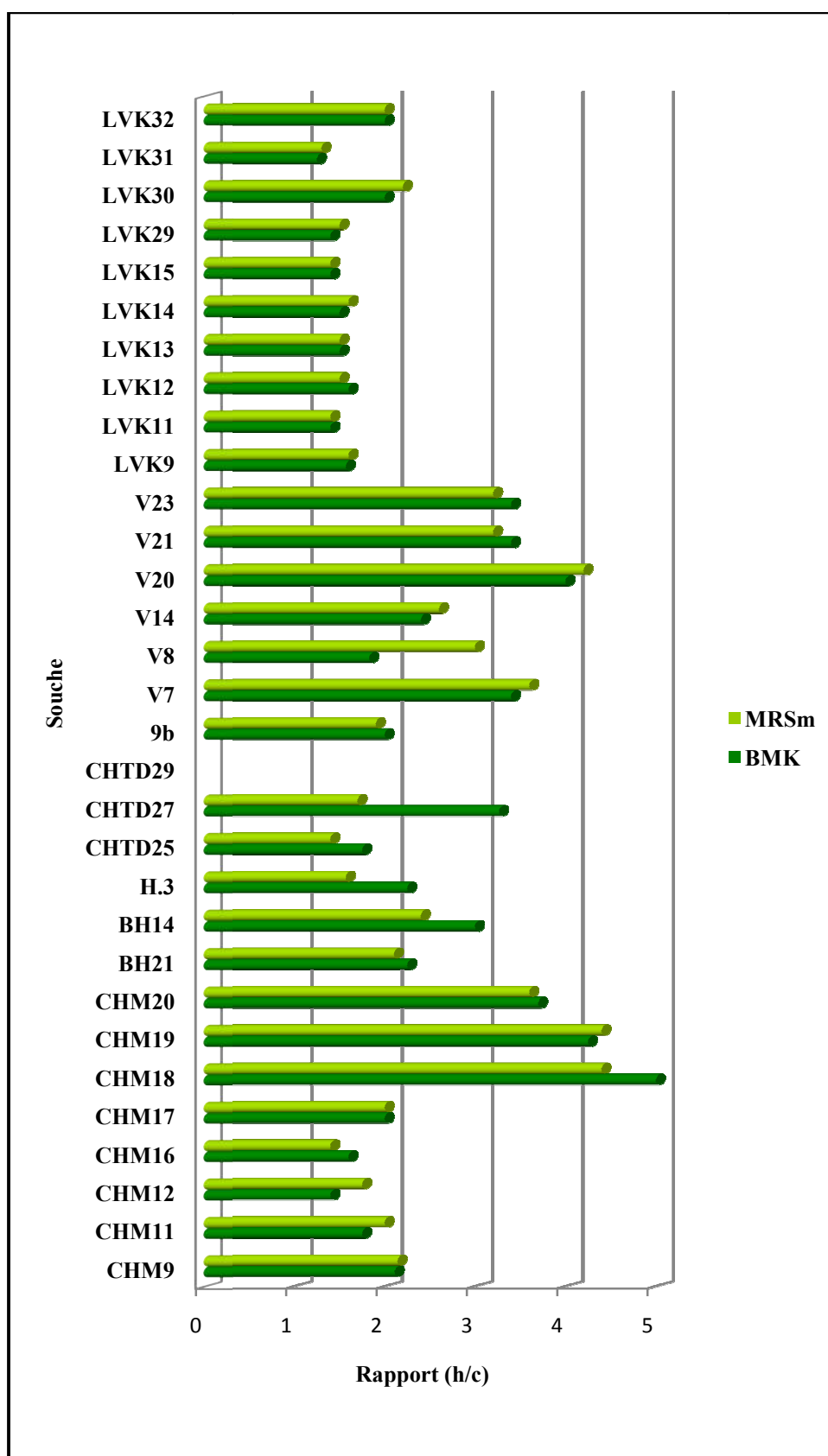


Figure 35 :
Activité protéolytique des lactobacilles en milieu MRSm et BMK

Les résultats précédents montrent l'absence d'une éventuelle relation entre cette activité protéolytique et le pouvoir acidifiant pour ces mêmes souches. Cette observation a été aussi rapportée par d'autres auteurs (Bottazi, 1962; Fontina *et al.*, 1998; Hassaïne, 2012). Dans notre étude, les leuconostocs et lactocoques se révèlent potentiellement acidifiants et ne montrent pas d'activité protéolytique élevée. A l'inverse d'autres souches s'avèrent faiblement acidifiantes et potentiellement protéolytiques, telles que la souche CHM18, et enfin des souches révélant un double potentiel en pouvoir acidifiant et en protéolyse, comme la souche V20.

Un exemple de ces résultats obtenus est montré dans la figure 36 (a et b).

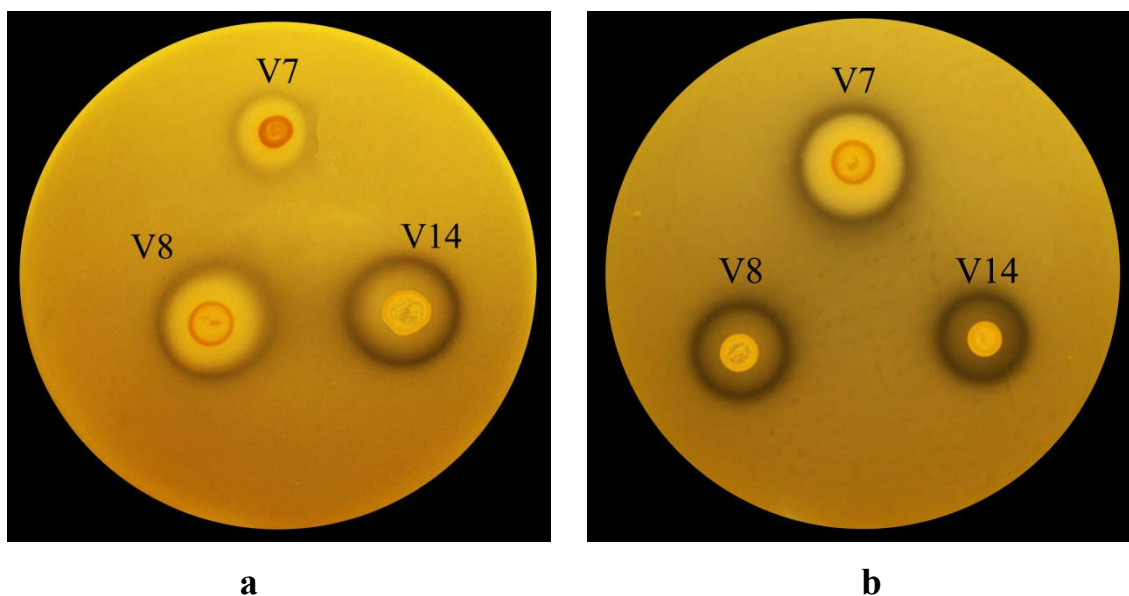


Figure 36 : Activité protéolytique des souches de *Lactobacillus*
(a) en milieu solide MRSm-lait (1%), (b) en milieu solide BMK-lait (1%)

L'ensemble de ces résultats indiquent que le milieu BMK peut tout à fait être substitué aux milieux témoins pour cultiver des bactéries lactiques et rechercher des propriétés d'intérêt technologiques. Ceci nous a encouragés à tester ce milieu en condition de fermenteur.

3.4. Cinétique de croissance, de production d'acide lactique et de consommation du lactose en fonction du temps

Pour cette étude nous avons retenu les souches CHBK309, CHBK325, CHBK327, CHT27, BH14 et CHTD27.

3.4.1. Croissance et production d'acide lactique

Les figures 37 à 48 montrent les cinétiques de croissance et d'acidification pour les souches cultivées en fermenteur en mode discontinu à pH libre en milieu BMK et les milieux témoins.

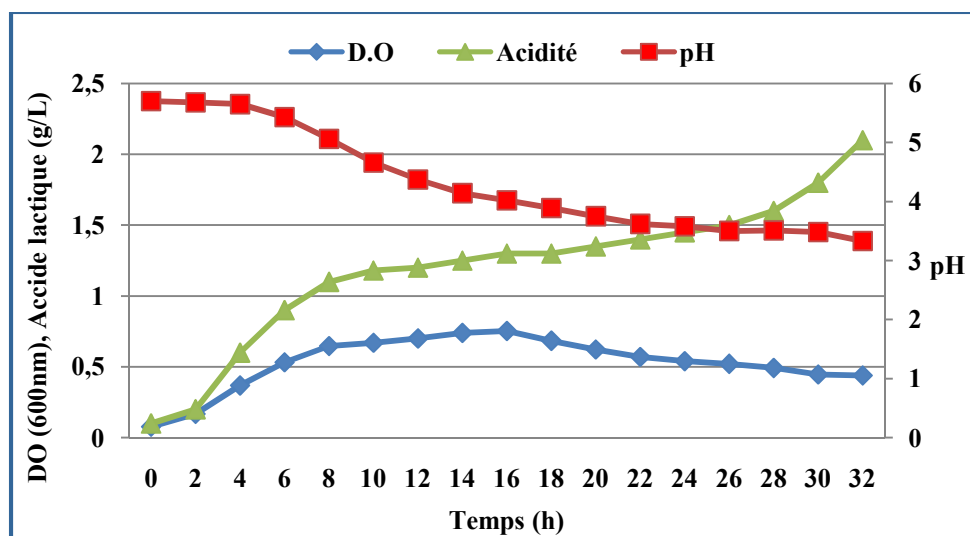


Figure 37 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu M17 de la souche CHT27

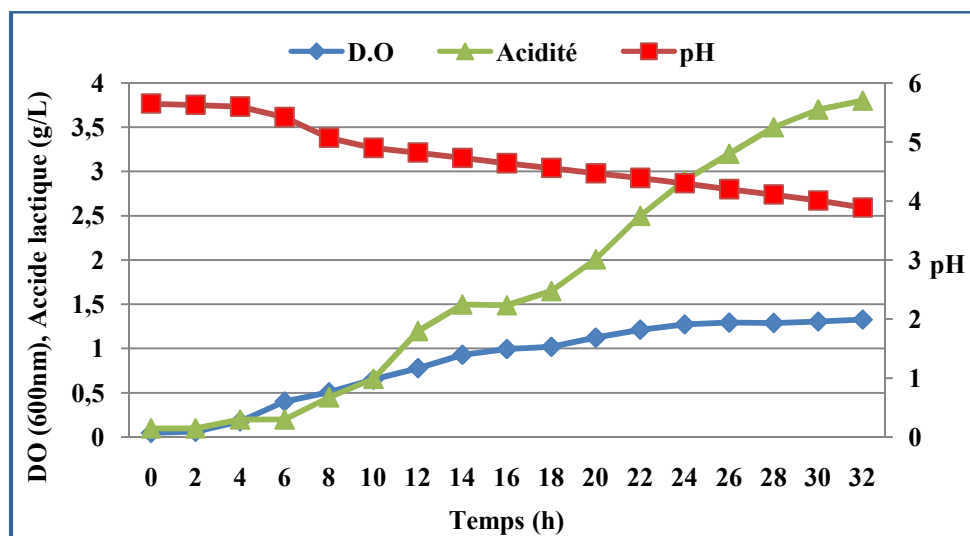


Figure 38 : Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHT27

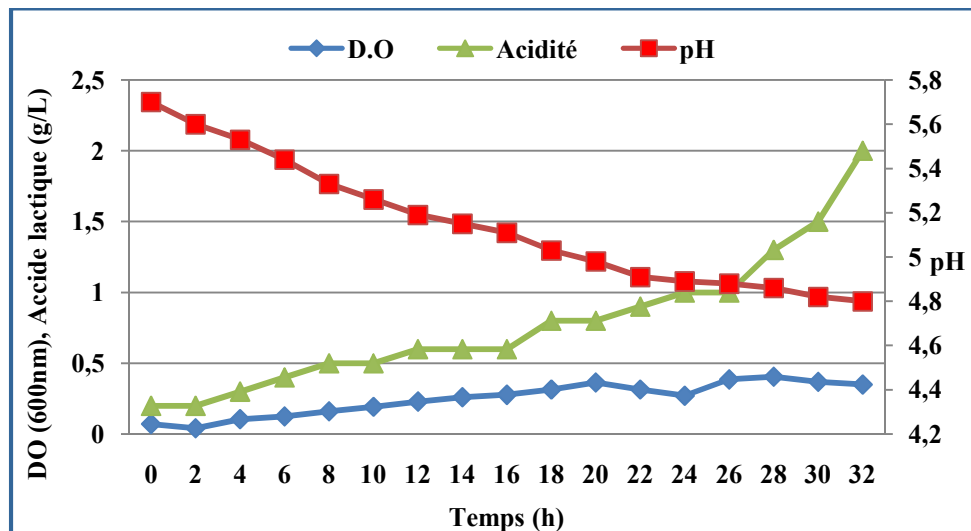


Figure 39 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu Mayeux m de la souche CHBK309

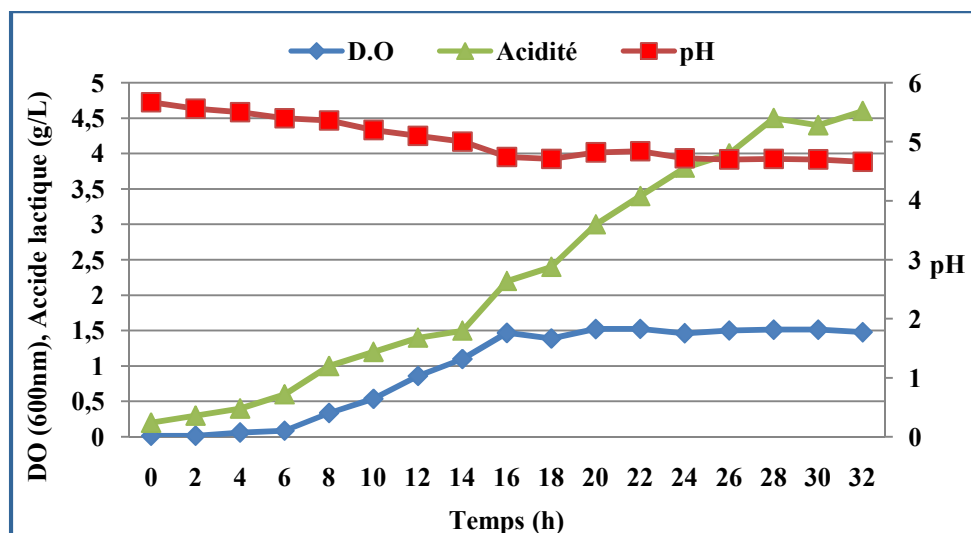


Figure 40 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHBK309

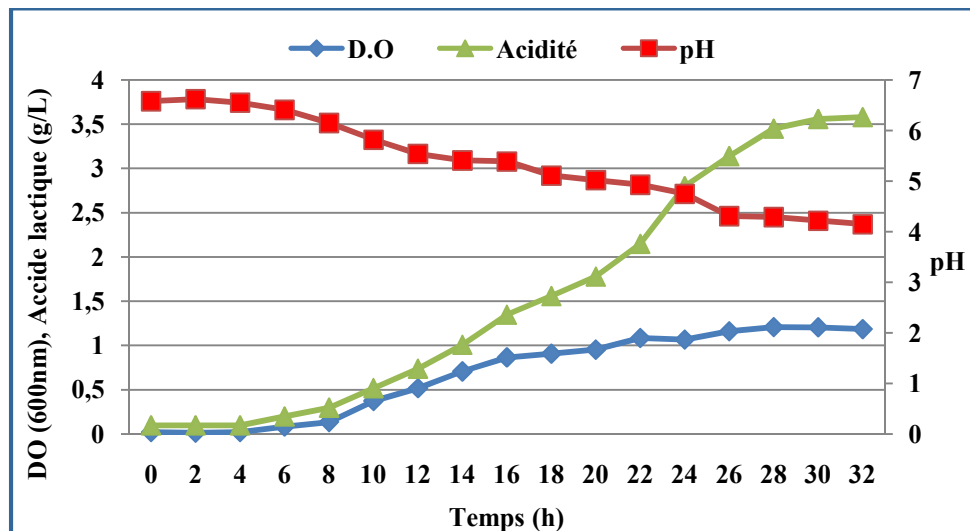


Figure 41 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu Mayeux m de la souche CHBK325

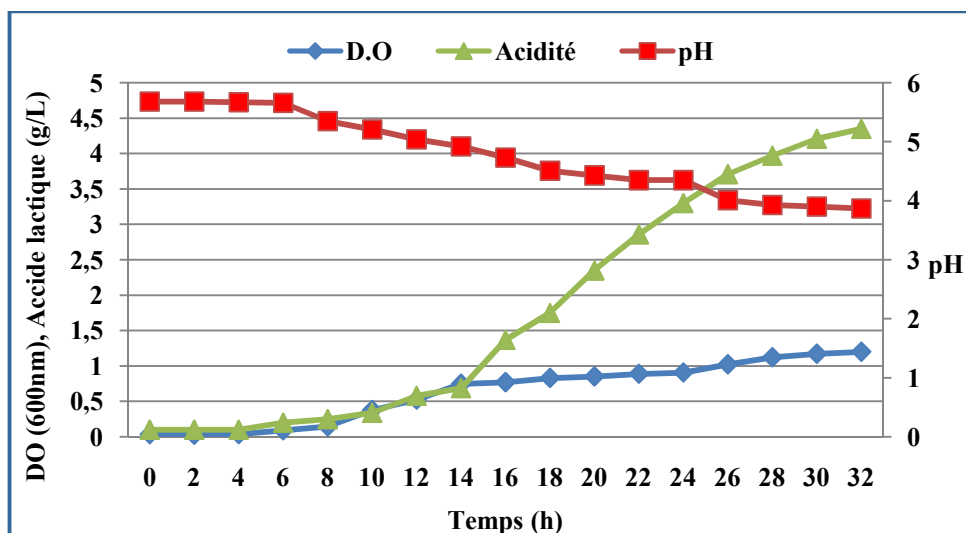


Figure 42 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHBK325

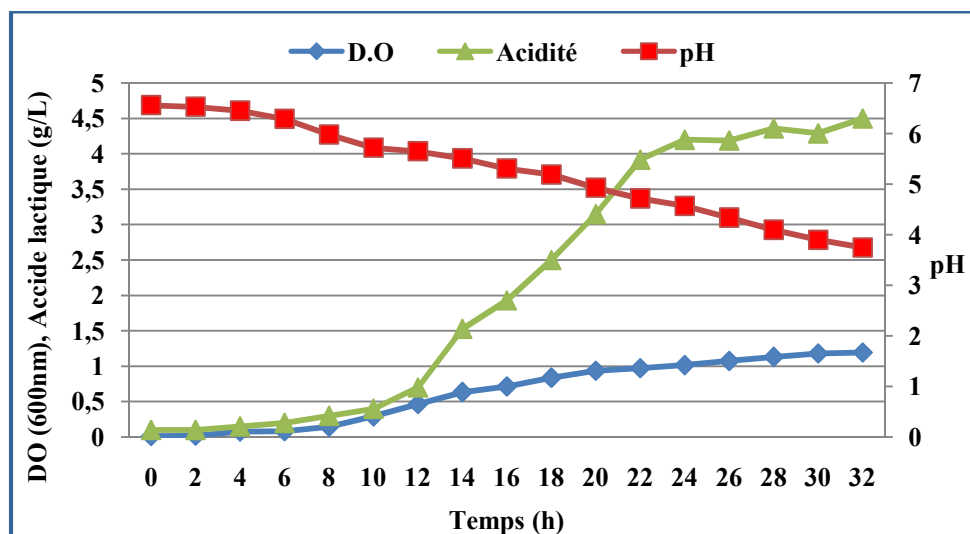


Figure 43 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu Mayeux m de la souche CHBK327

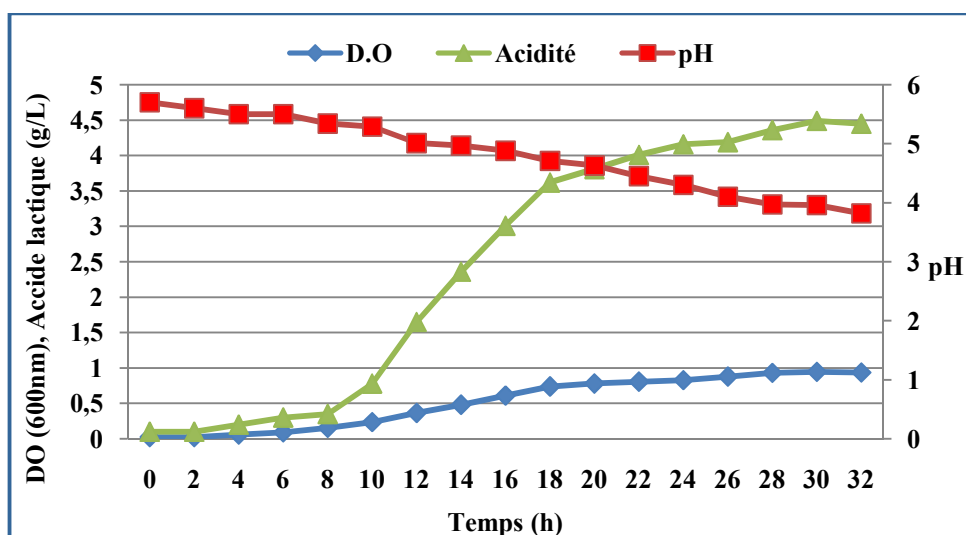


Figure 44 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHBK327

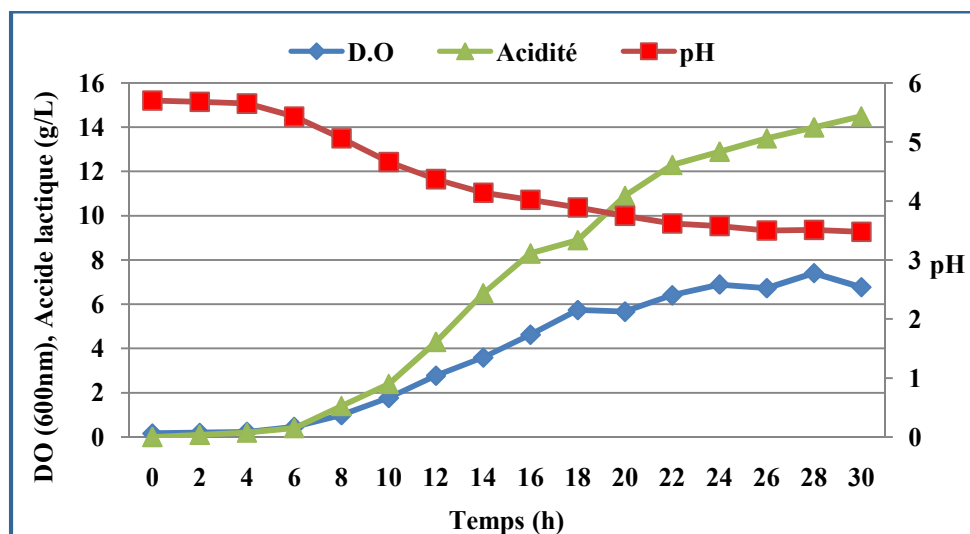


Figure 45 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu MRSm de la souche BH14

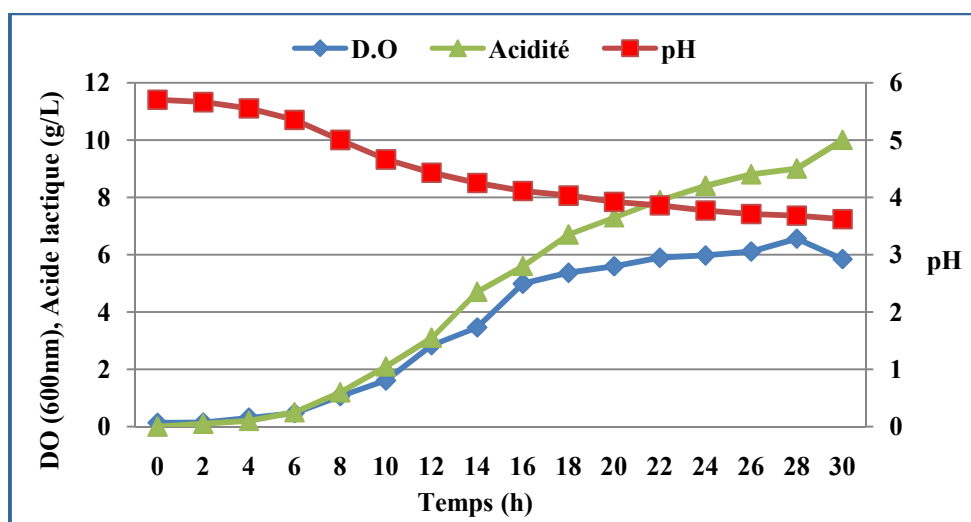


Figure 46 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche BH14

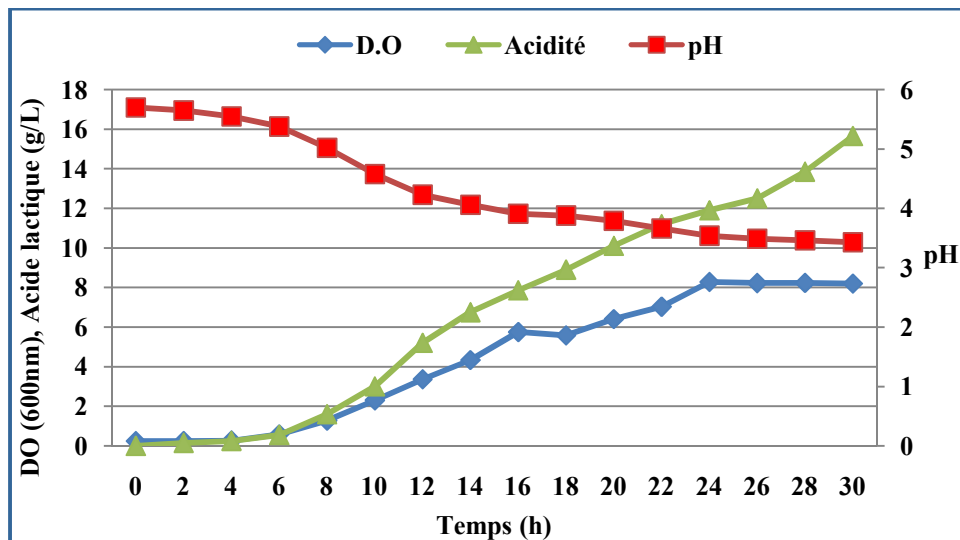


Figure 47 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu MRSm de la souche CHTD27

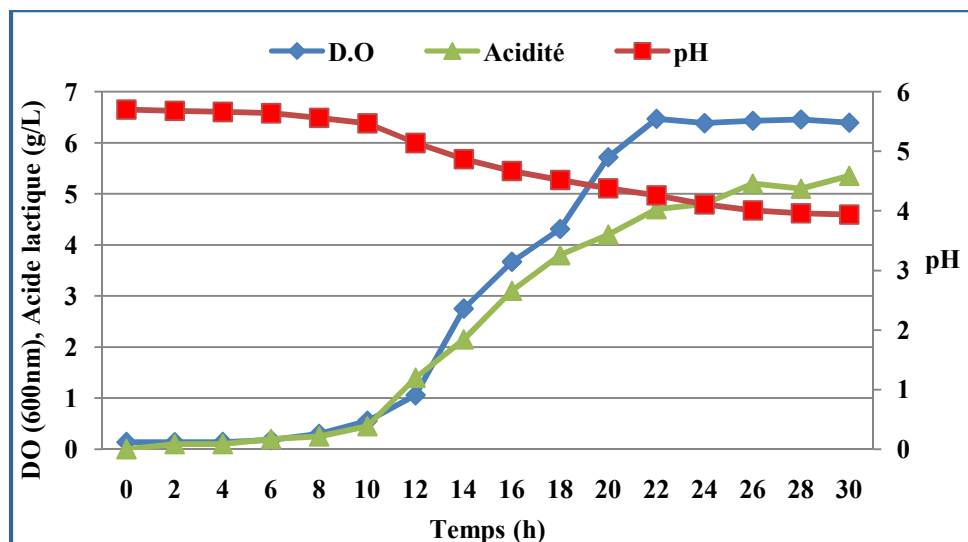


Figure 48 :
Croissance, production d'acide lactique et évolution du pH en milieu BMK de la souche CHTD27

On peut faire les remarques suivantes :

- La croissance bactérienne, pour toutes les souches et dans les différents milieux, se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue. Pendant la phase exponentielle et simultanément à la croissance bactérienne il ya production d'acide lactique : c'est le cas d'une production associée à la croissance.
- Pour les souches CHBK309 et CHTD27, la phase exponentielle de croissance débute plus tôt dans le milieu témoin (après environ 2 h et 6 h respectivement) que dans le milieu BMK (après environ 6 h et 8 h respectivement), par contre pour les autres souches, il n'y a pas de différence dans les deux milieux de culture.
- On remarque aussi qu'après la phase exponentielle, il y a production d'acide lactique même si la croissance cellulaire est pratiquement arrêtée. Ceci s'explique par le fait qu'en fin de fermentation, la croissance s'arrête plus rapidement que la production d'acide lactique, car elle est plus sensible aux phénomènes d'inhibition par l'acide lactique. La production d'acide lactique devient dépendante de la concentration bactérienne et l'activité bactérienne existe encore pendant cette période. Les deux phénomènes sont alors découplés.

3.4.2. Consommation du substrat

Le tableau 14 montre les concentrations du substrat dans les milieux au début et à la fin de la cinétique bactérienne.

Tableau14 : Concentration du substrat

Souche		Milieu	S ₀	S _R
<i>Leuconostoc</i>	CHBK309	Mayeux m	20	0
		BMK	49,32	24,82
	CHBK325	Mayeux m	20	0
		BMK	49,32	23,5
	CHBK327	Mayeux m	20	0
		BMK	49,32	28,5
<i>Lactobacillus</i>	BH14	MRSm	20	0
		BMK	49,32	30,15
	CHTD27	MRSm	20	0
		BMK	49,32	31,4
<i>Lactococcus</i>	CHT27	M17	5	0
		BMK	49,32	29,32

S₀: Concentration du sucre initiale (g/L) ; S_R: Concentration du sucre résiduelle (g/L)

Pour toutes les souches après 32 h de croissance sur les milieux témoins la totalité du sucre a été consommée ; par contre dans le milieu BMK en moyenne 23 g/L de sucre restent non consommés alors que la croissance est pourtant arrêtée.

Ces observations rejoignent celles faites par Engasser (1993), qui lors de la modélisation de la fermentation lactique par *Lactobacillus casei*, a montré que le glucose continu à être transformé en acide lactique alors que la croissance bactérienne est pratiquement arrêtée.

3.5. Modèle cinétique et estimation des paramètres

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus avec le milieu BMK et les milieux témoins, à l'aide des méthodes de Gauss-Newton et des moindres carrés (Isqcurvefit), qui ajustent les courbes théoriques et les résultats expérimentaux et ce en optimisant les paramètres des modèles (figures 49-60). Les valeurs optimisées sont données dans le tableau 15.

A partir des données des paramètres cinétiques et d'une synthèse bibliographique de plusieurs modèles comme nous l'avons vu précédemment, il a été déduit qu'il est convenable de travailler selon le modèle non structuré pour des cultures en batch sans pH contrôlé de Balannec *et al.* (2007). Ce modèle correspond tant à la croissance expérimentale qu'aux données de la production d'acide lactique, et a été validé dans des conditions de culture diverses, à savoir pour une grande gamme de supplément d'azote au lactosérum.

Dans le modèle développé, il a été considéré le modèle de Verlhust pour décrire la cinétique de croissance (Eq. (1)), qui peut facilement être intégré pour donner la biomasse (Eq. (2)).

$$\frac{dp}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{x}{x_{\max}} \right) x \quad \text{Eq. (1)}$$

$$x = x_0 x_{\max} \frac{e^{\mu_{\max} t}}{x_{\max} - x_0 + x_0 e^{\mu_{\max} t}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Dans ce travail, les expériences ont été effectuées en pH non contrôlé. Pour décrire la production d'acide lactique, le modèle de Luedeking-Piret (Luedeking et Piret, 1959) a été modifié par Balannec *et al.* (2007), en introduisant un terme supplémentaire qui prend en compte l'inhibition par l'acide lactique non dissocié (Eq. (3)).

$$\frac{dp}{dt} = A \frac{dx}{dt} + Bx \left(1 - \frac{[HL]}{[HL]_{inh}} \right) \quad \text{Eq. (3)}$$

où A et B sont les coefficients de croissance associée ou non associée à la production, respectivement ; $[HL]_{inh}$ est la concentration inhibitrice d'acide lactique non dissocié, 8,5 g/L (Amrane et Prigent, 1999). La concentration d'acide lactique non dissociée [HL] est calculée en utilisant l'équation de Henderson-Hasselbach (Eq. (4)), la concentration d'acide lactique totale et le pH correspondant, la valeur du pKa de l'acide lactique étant de 3,8.

$$[HL] = \frac{P}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad \text{Eq. (4)}$$

Il a été montré par Amrane et Prigent (1997) que le meilleur critère pour caractériser la relation entre la croissance et la production d'acide lactique est sa détermination à partir d'une comparaison directe des coefficients A et B, qui sont déduits par l'intégration des équations (5) et (6) respectivement.

$$\frac{dp}{dt} = A \frac{dx}{dt} \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\frac{dp}{dt} = Bx \left(1 - \frac{[HL]}{[HL]_{inh}} \right) \quad \text{Eq. (6)}$$

Tableau 15 : Paramètres optimaux estimés pour la fermentation lactique

Souche		Milieu de culture	Paramètres optimisés								
			X_0	X_{\max}	μ_{\max}	A	B	SD^2	$P_{\text{cal,f}}$	$[HL]_{\text{cal,f}}$	$[L]_{\text{cal,f}}$
<i>Lactobacillus</i>	BH14	MRSm	0,11	7,05	0,30	0,22	0,39	22,84	13,09	8,90	4,19
	CHTD27		0,22	8,39	0,26	2,49	-0,15	7,59	14,07	9,90	4,17
	BH14	BMK	0,07	6,15	0,35	0,95	0,06	0,62	9,46	5,69	3,76
	CHTD27		0,01	6,56	0,40	0,79	-0,0002	0,49	5,16	2,16	3,00
<i>Leuconostoc</i>	CHBK309	Mayeux m	0,05	0,37	0,19	3,30	0,47	0,47	4,89	0,04	4,85
	CHBK325		0,02	1,17	0,30	0,68	0,14	0,25	3,83	3,23	2,65
	CHBK327		0,03	1,15	0,26	2,36	0,10	1,41	4,68	2,47	2,21
	CHBK309	BMK	0,01	1,51	0,45	0,97	0,10	0,79	4,82	0,58	4,24
	CHBK325		0,04	1,10	0,25	0,31	0,23	0,50	4,68	2,17	2,53
	CHBK327		0,02	0,93	0,27	4,75	0,005	0,46	4,45	2,18	2,27
<i>Lactococcus</i>	CHT27	M17	0,15	1,17	0,17	0,61	0,07	0,40	2,38	0,67	1,71
		BMK	0,10	1,31	0,23	0,31	0,40	0,13	3,96	1,77	2,19

Tableau 16 : Paramètres expérimentaux pour la fermentation lactique

Souche		Milieu de culture	Paramètres expérimentaux			
			X_{\max}	$P_{\exp,f}$	$[HL]_{\exp,f}$	pH_f
<i>Lactobacillus</i>	BH14	MRSm	7,41	14,5	9,86	3,48
	CHTD27		8,27	15,65	11,02	3,43
	BH14	BMK	6,55	10,00	6,02	3,62
	CHTD27		6,47	5,35	2,24	3,94
<i>Leuconostoc</i>	CHBK309	Mayeux m	0,41	4,60	0,41	4,8
	CHBK325		1,21	3,58	1,10	4,15
	CHBK327		1,19	4,27	2,25	3,75
	CHBK309	BMK	1,52	4,7	0,57	4,66
	CHBK325		1,20	4,35	2,00	3,87
	CHBK327		0,94	4,45	2,18	3,82
<i>Lactococcus</i>	CHT27	M17	1,21	2,50	0,71	4,20
		BMK	1,33	3,80	1,70	3,89

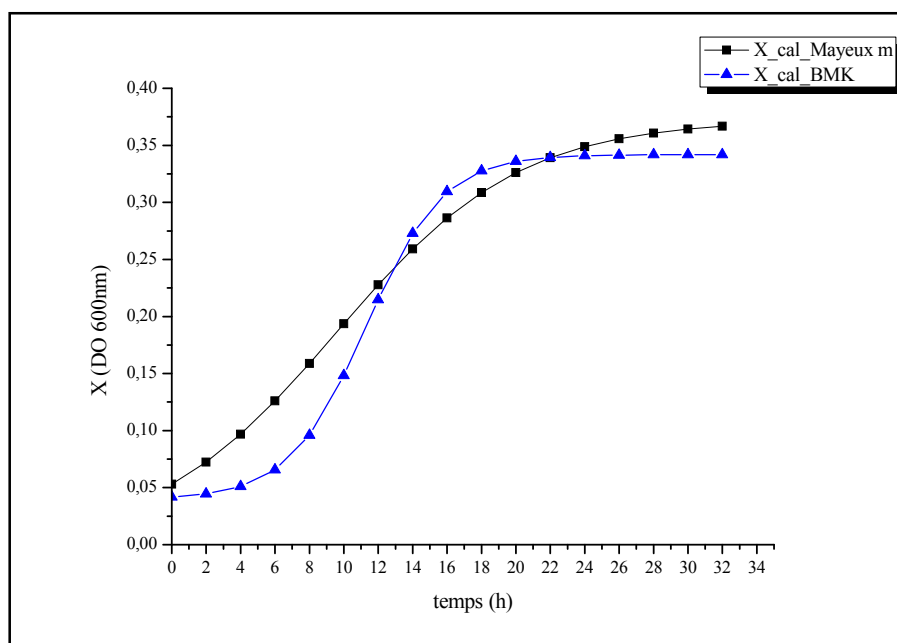


Figure 49 : Cinétique de croissance de la souche CHBK 309 en milieu Mayeux m et BMK

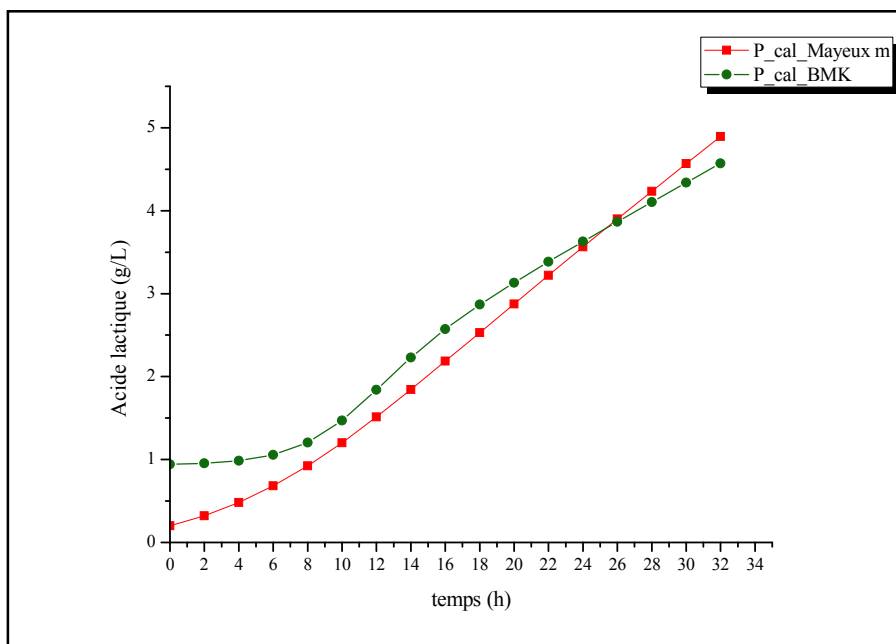


Figure 50 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHBK 309 en milieu Mayeux m et BMK

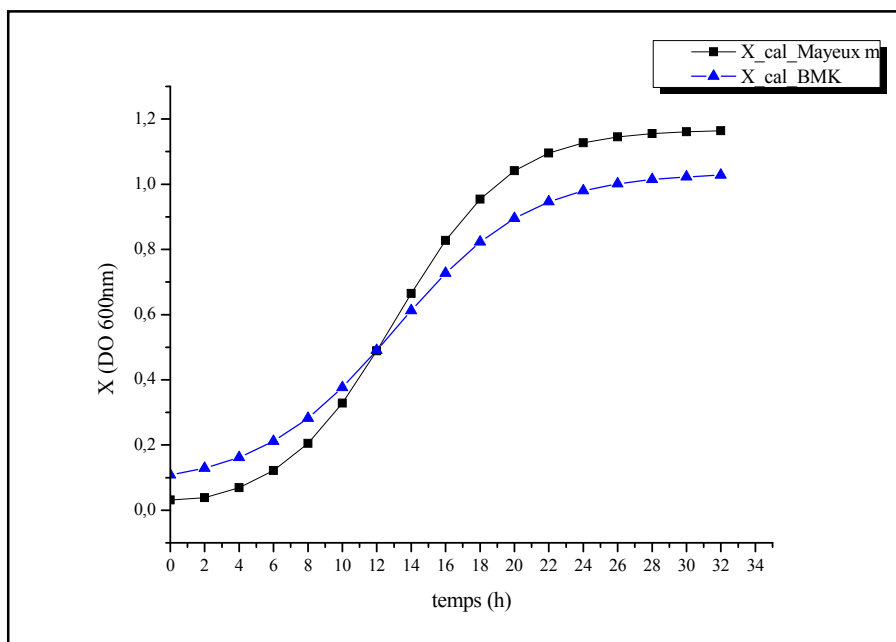


Figure 51: Cinétique de croissance de la souche CHBK 325 en milieu Mayeux m et BMK

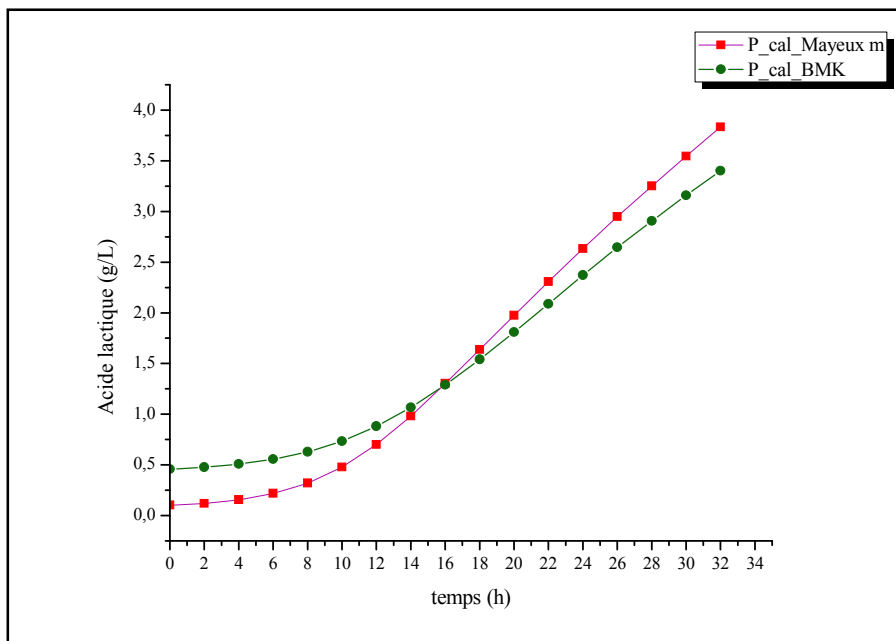


Figure 52 : Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHBK 325 en milieu Mayeux m et BMK

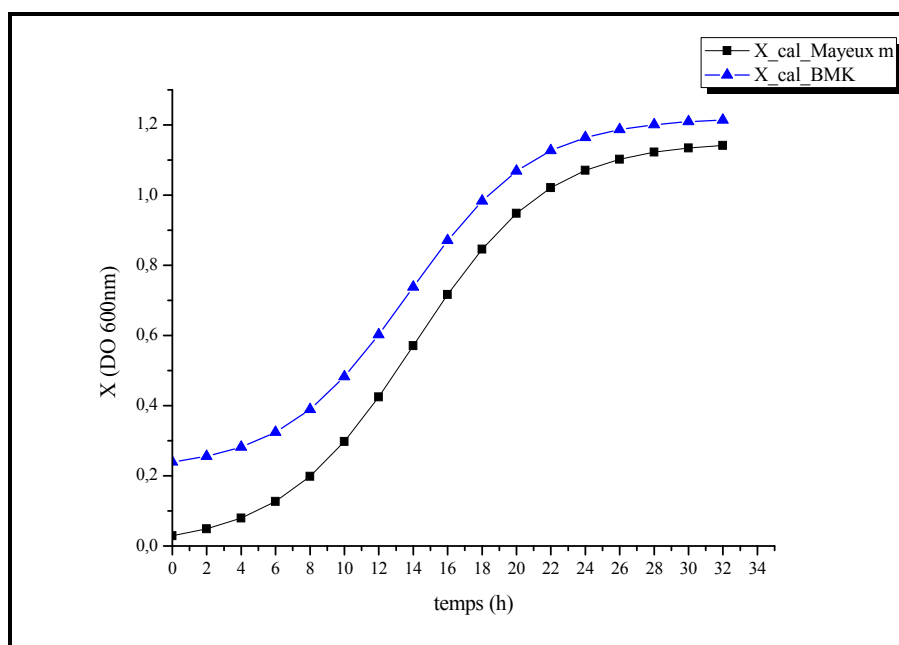


Figure 53: Cinétique de croissance de la souche CHBK 327 en milieu Mayeux m et BMK

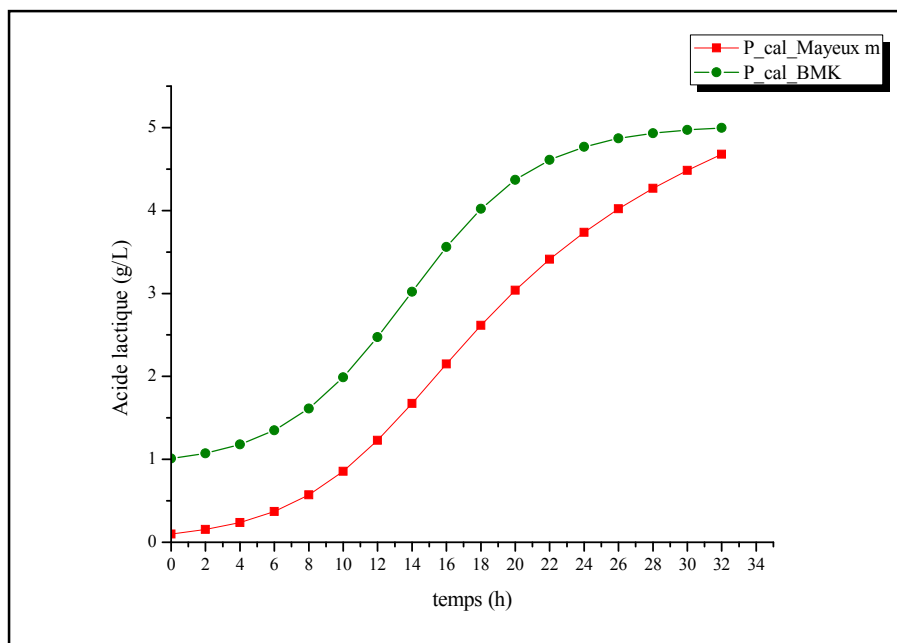


Figure 54: Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHBK327 en milieu Mayeux m et BMK

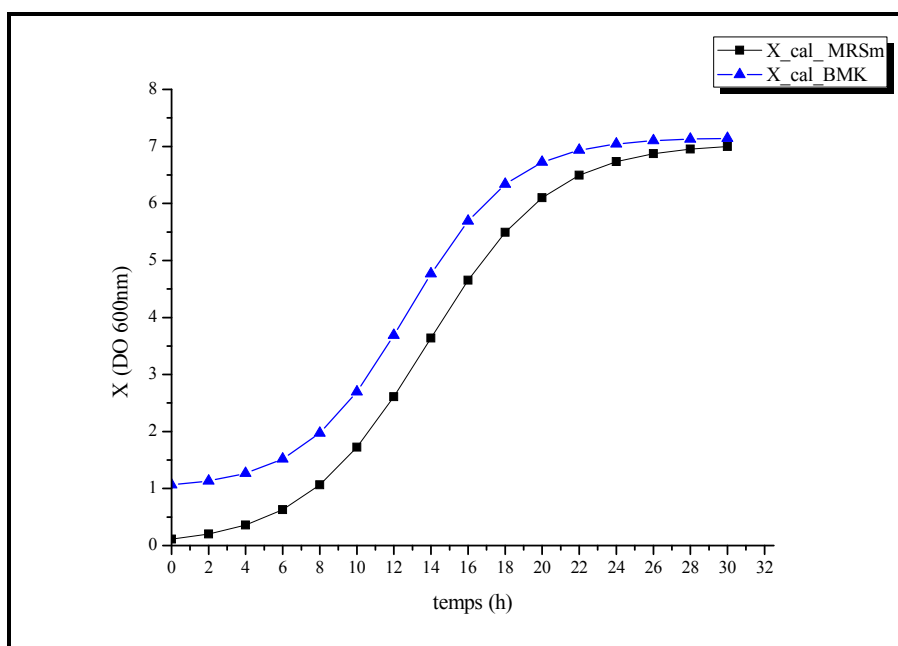


Figure 55: Cinétique de croissance de la souche BH 14 en milieu MRSm et BMK

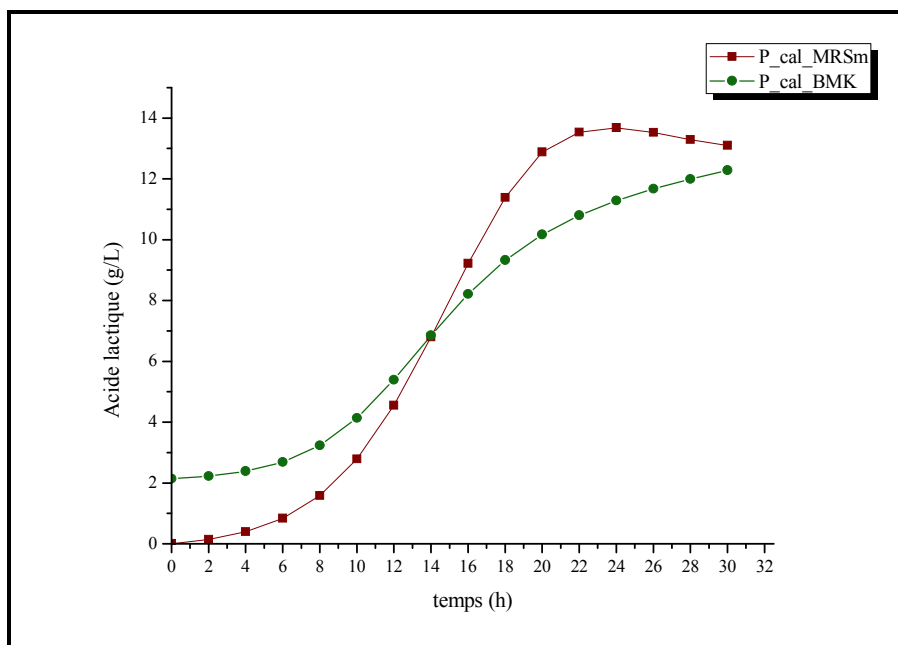


Figure 56: Cinétique de production d'acide lactique de la souche BH14 en milieu MRSm et BMK

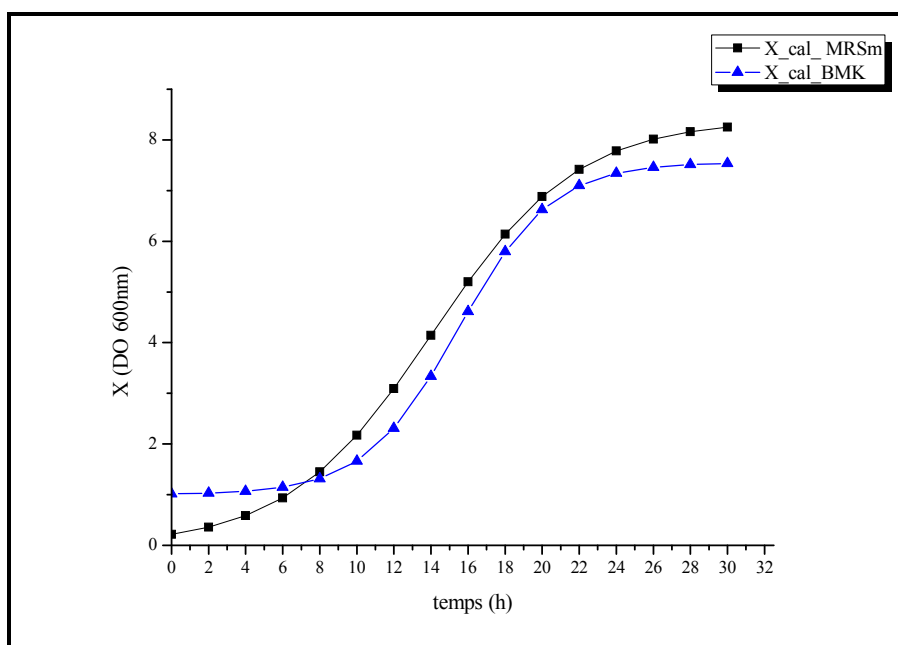


Figure 57: Cinétique de croissance de la souche CHTD 27 en milieu MRSm et BMK

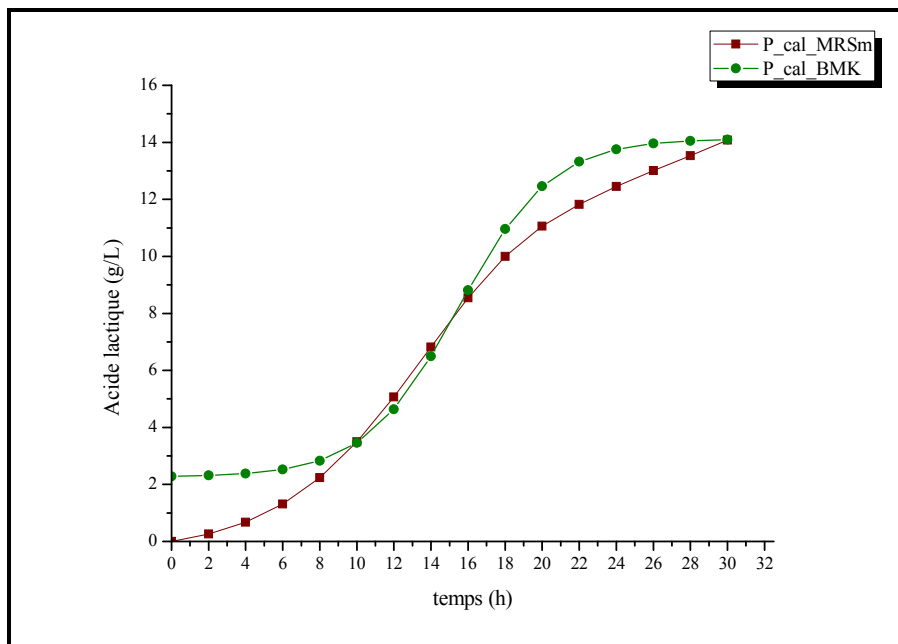


Figure 58: Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHTD 27 en milieu MRSm et BMK

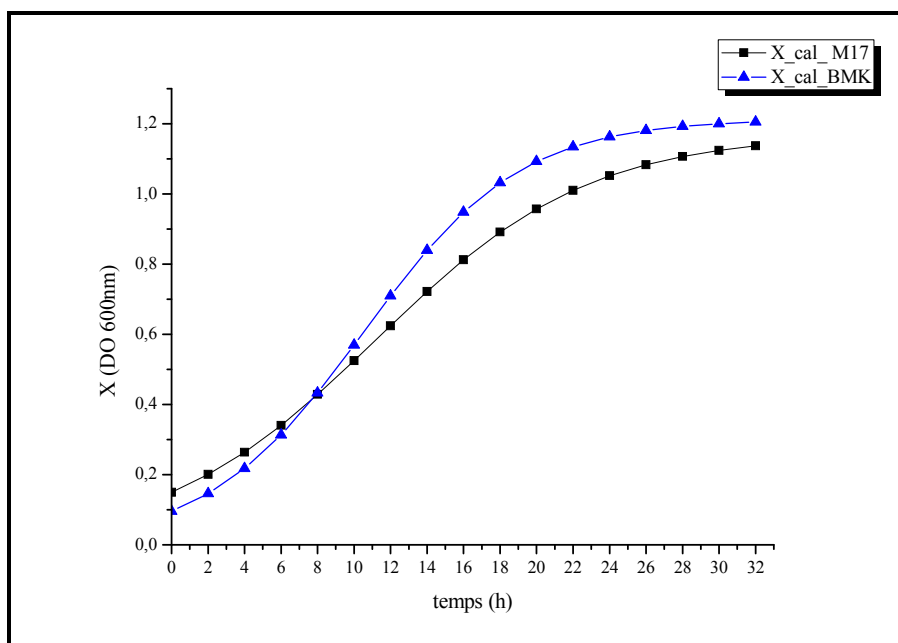


Figure 59: Cinétique de croissance de la souche CHT27 en milieu M17 et BMK

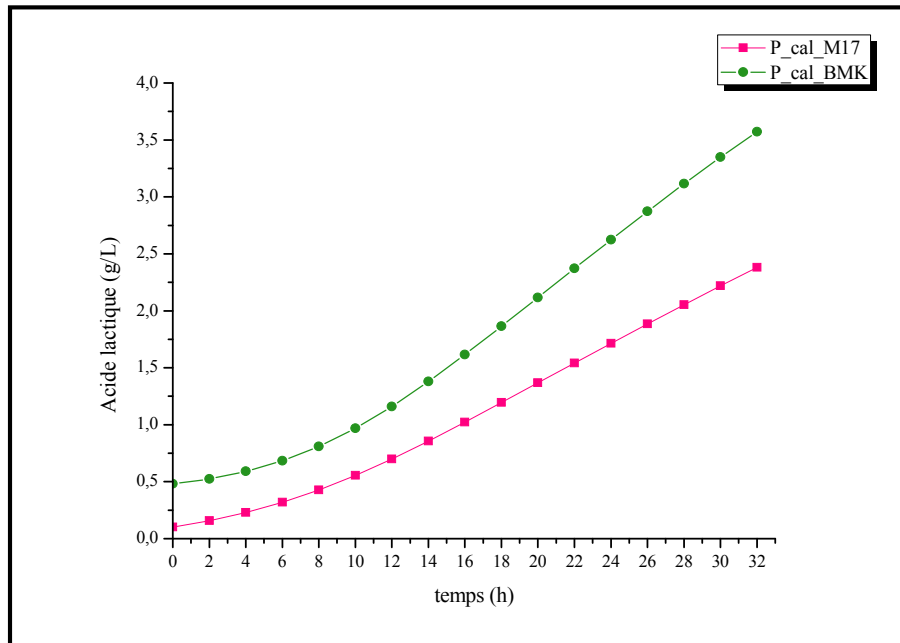


Figure 60: Cinétique de production d'acide lactique de la souche CHT 27 en milieu M17 et BMK

Pour tous les milieux et les souches testés le modèle de Verlhust correspond aux données de croissance expérimentale.

En effet, comme attendu, la concentration en biomasse maximale des souches de lactocoques et leuconostocs testés (à l'exception de la souche CHBK327) est plus élevée en milieu BMK (tableau 15).

De plus toutes les souches ont montré une vitesse spécifique de croissance maximale plus rapide en milieu BMK à l'exception de la souche CHBK325.

Il est à noter, que comme pour la concentration en biomasse maximale, la production d'acide lactique finale et la quantité finale d'acide lactique non dissociée des souches de lactocoques et leuconostocs testés (à l'exception de la souche CHBK327) est plus élevée en milieu BMK (tableau 16).

Pour tous les milieux et les souches testés le modèle de Luedeking-Piret correspond aux données de production expérimentale.

Les valeurs les plus élevées du coefficient A pour la croissance associée à la production et les valeurs les plus faibles du coefficient B pour la croissance non-associée à la production

sont enregistrées pour toutes les souches de *Leuconostoc* sur milieu BMK et milieux témoins, pour la souche BH14 sur milieu MRSm et pour la souche CHT17 sur milieu BMK (tableau 15).

On remarque aussi qu'après la phase exponentielle, il y a production d'acide lactique même si la croissance cellulaire est pratiquement arrêtée. Ceci s'explique par le fait qu'en fin de fermentation, la croissance s'arrête plus rapidement que la production d'acide lactique, car elle est plus sensible aux phénomènes d'inhibition par l'acide lactique. Plusieurs recherches ont montré que les deux concentrations de l'acide lactique dissocié et non dissocié ont des effets d'inhibition, dans lesquels on peut citer les travaux effectués par Fu et Mathews (1999). Ces auteurs ont noté que la forme non dissociée est la plus inhibitrice.

Amrane (1990) et White *et al.* (1976) ont montré qu'un milieu limitant en phosphore augmente considérablement la productivité volumique en acide lactique. Les auteurs expliquent ce résultat de la manière suivante : lorsque le phosphore est limitant, le pool d'ATP doit être rephosphorylé plus vite, ce qui entraîne une production plus rapide de l'acide lactique.

Les travaux de Konings et Otto (1983) et Amrane (2001), ont montré que lorsque le pH du milieu extérieur diminue, par l'accumulation des acides organiques (acide lactique), la bactérie lactique maintient son pH intracellulaire plus alcalin (pH=6,6) que le milieu extracellulaire, car les cellules excrètent rapidement l'acide lactique dissocié dans le milieu extracellulaire. De plus la membrane cellulaire est imperméable pour les protons extracellulaires (molécule de lactate) (Hutkins et Nannen, 1993). La différence de pH entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire forme un gradient de pH (ΔpH). Pour excréter les protons à l'extérieur, la bactérie consomme l'ATP en activant l'enzyme H^+ , ATPase (Nannen et Hutkins, 1991), mais en fin de phase exponentielle de croissance, la quantité d'ATP disponible ne suffit plus, le gradient de pH disparaît, les activités hexokinasiqes baissent et entraînent l'inhibition de la croissance et de l'activité des enzymes intracellulaires telles que la β -galactosidase.

Chez les souches de *leuconostocs* et *lactocoques* testées la concentration d'acide lactique libre finale est au-dessous du seuil d'inhibition, mais malgré cela la croissance est arrêtée. Plusieurs auteurs ont montré qu'en absence d'inhibition par l'acide lactique, l'arrêt de la croissance est dû à une limitation nutritionnelle, déficience en sources de peptide (Turner et Thomas, 1975; Mozzi *et al.*, 1994) ou en facteurs de croissance (Major et Bull, 1985;

Aeschlimann et Von Stockar, 1989). Fu et Mathews (1999) ont remarqué que les valeurs des rendements de la biomasse par rapport au substrat carboné ($Y_{X/S}$) mentionnés n'indiquent pas la quantité exacte du substrat qui a été transformée en produit, parce que le milieu utilisé dans la fermentation anaérobie ne contient pas seulement le lactose, mais aussi de la peptone et de l'extrait de levure. Ces produits contiennent des protéines, des vitamines et d'autres éléments nutritionnels nécessaires pour la croissance de la bactérie *Lactobacillus plantarum*.

Ceci confirme bien les résultats des concentrations des sucres résiduels mentionnés dans le tableau 14.

4- Conclusion

Au regard de la pénurie constante des matières premières énergétiques et alimentaires, la valorisation des sous-produits constitue une des premières étapes de l'engagement environnemental de la société et permet de majorer l'image des entreprises auprès des différents interlocuteurs (clients, fournisseurs, média...) de plus en plus exigeants en terme d'éthique et de respect de l'environnement. La valorisation des sous-produits s'inscrit aussi dans une démarche de développement durable.

A travers ce travail, nous avons développé un milieu de culture à base de lactosérum doux que nous avons testé pour la culture d'une soixantaine de souches lactiques appartenant à trois genres (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*).

Les analyses physico-chimiques du lactosérum doux issu de la fabrication du camembert montrent que ce dernier est riche en matières nutritives et qu'il présente des qualités adéquates pour élaborer des milieux de culture de bactéries.

Dans ce milieu de culture (lactosérum additionné d'un mélange de jus de tomate et d'extrait de levure), le lactosérum déprotéinisé s'est révélé pauvre en matière grasse, à pH neutre, ce qui en fait un lactosérum doux, avec une teneur moyenne de lactose de 47 g/L et de cendres de 6,32 g/L, dont le potassium est le principale minéral avec une concentration de 16,4 g/Kg.

L'étude de la croissance et de certaines caractéristiques d'intérêts technologiques (activité protéolytique, production d'acide lactique et de diacétyl de ces souches sur milieu optimisé à base de lactosérum, par rapport aux milieux de culture témoins) a révélé que les résultats enregistrés avec le milieu BMK sont tout à fait comparables et parfois meilleurs que ceux obtenus avec les milieux témoins Mayeux, Mayeux m, M17 et MRSm.

Ces activités se sont exprimées d'une manière très hétérogène, ce qui nous a amené à recourir à une analyse en composantes principales (ACP) afin d'élire la ou les souches les plus performantes sur le milieu optimisé (milieu BMK). Cette analyse a permis de montrer que certaines souches forment un groupe distinct dans le sens positif et négatif des vecteurs des variables formés : c'est le cas des souches CHBK309, CHBK325, CHBK327, CHT27, BH14 et CHTD27. Ces souches présentent des propriétés d'intérêt technologique intéressantes (croissance, production d'acide lactique dans le milieu BMK, en fermenteur en mode discontinu et dans des conditions de pH non contrôlé) pour lesquelles nous avons établi un modèle mathématique de fermentation.

L'étude comparative des cinétiques d'acidification, de croissance, de consommation du substrat, réalisée avec les souches CHBK309, CHBK325, CHBK327, CHT27, BH14 et CHTD27, a montré que la croissance bactérienne se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue, pour les six souches et dans les deux milieux (BMK et milieu témoin). Pendant la phase exponentielle, et simultanément à la croissance bactérienne, il y a production d'acide lactique : c'est le cas d'une production associée à la croissance. Après cette phase, il y a production d'acide lactique même si la croissance cellulaire est pratiquement arrêtée. Pour toutes les souches après 30 h de croissance sur les milieux témoins, la totalité du sucre a été consommée, par contre dans le milieu BMK une moyenne de 23 g/L de sucre reste non consommée et la croissance est pourtant arrêtée.

D'après la modélisation de la fermentation lactique en condition de pH non contrôlé, il a été déduit que le modèle Verlhust décrit correctement la cinétique de croissance des bactéries. La cinétique de la production d'acide lactique, décrite par une modification du modèle Luedeking-Piret, révèle que la croissance de la bactérie et la production d'acide lactique seront inhibées par l'acide lactique indissocié [HL]. Les paramètres cinétiques de ces modèles ont été estimés par l'utilisation des deux routines d'optimisation : la méthode des moindres carrés (Iscurvefit) et la méthode de Gauss-Newton. Les résultats calculés d'après les modèles de la croissance et la production d'acide lactique concordent bien avec ceux obtenus expérimentalement.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet d'envisager plusieurs perspectives :

- Tester le milieu BMK pour des cultures mixtes, en vue de mettre en évidence les interactions bactériennes (inhibitions, stimulations).
- Tester ce milieu en conditions de fermenteur en mode de fermentation en continu.
- Evaluer la production des métabolites en utilisant ce milieu (production d'EPS, ...).
- Tester le milieu BMK pour d'autres caractéristiques technologiques (protéolyse, lipolyse, ...).

5 - Références bibliographiques

- Adrian, J. (1971).** A propos des poudres de lait et des lactoprotéines levurées. *Ind. Alim. Agric.* **88** : 1607.
- Adrian, J. & Bourlier, G. (1980).** Composition minérale du lactosérum. Influence des facteurs technologiques, saisonniers et géographiques. *Lait*. **60**: 447-457.
- Aeschlimann, A. & Von Stockar, U. (1989).** The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol. Lett.* **11**: 195–200.
- AFNOR. (1986).** Contrôle de la qualité des produits laitiers 3ème édition. P 107-343.
- Aguirre, M. & Collins, M.-D. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Microbiol.* **75**: 95–107.
- Alais, C. (1984).** Sciences du lait. Principes des Techniques Laitières, SEPAIC, Paris, 4^eedn.
- Altaf, M., Naveena, B.-J. & Reddy, G. (2007).** Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L (+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresour. Technol.* **98**: 498-503.
- Amouzou, K.-S., Prevost, H. & Divies, C. (1985).** Influence de la supplémentation du lait en magnésium sur la fermentation lactique réalisée par *S.lactis* et *S. thermophilus*. *Lait*. **65** : 21-34.
- Amrane, A. (1991).** Optimisation de la productivité d'un fermenteur effectuant la conversion en acide lactique de perméat de lactosérum supplémenté. Thèse de doctorat, Université de Rennes I, France.
- Amrane, A. & Prigent, Y. (1993).** Influence of media composition on lactic acid production rate from whey by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol. Lett.* **15**:239-244.
- Amrane, A. & 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 Biochem.* **34**: 1-10.
- Amrane, A. & Prigent, Y. (1999).** Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. *Process Biochem.* **34**: 1-10.
- Amrane, A. (2000).** Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**:223-228.
- Amrane, A. (2001).** Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 827-834.
- Amrane, A. (2005).** Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**: 345-352,
- Archibald, F.-S. & Fridovich, I. (1981).** Manganese and defences against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **145**: 442-451.

- Bacus, J.-N. & Brown, W.-L. (1985).** The pediococci: meat products. In: Bacterial Starter Cultures for foods. Gilliland S. E., 7, pp: 86-96. CRC Press Inc. Boca Baton. Florida.
- Balannec, B., Bouguettoucha, A. & Amrane, A. (2007).** Unstructured model for batch cultures without pH control of *Lactobacillus helveticus*-Inhibitory effect of the undissociated lactic acid, *Biochem. Engin. J.* **35**: 289–294.
- Baralle, S.-B. & Borzani, W. (1988).** Use of yeast autolysate to improve batch lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *Arq. Biol. Tecnol.* **31**:273-274.
- Bardy, S., Bentz, M., Bussière, T., Chatras, J., Fontaine, L., Gaugler, M., Lechat A., Leugronne, O. & Fick M. (2016).** Valorisation du lactosérum. Rapport de projet . Université de lorraine, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy, France.
- Bassit, N., Boquien, C.-Y., Picque, D. & Corrieu, G. (1993).** Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59** (6): 1893-1897.
- Belhocine, D. (1987).** Etude de la valorisation du lactose par fermentation lactique. Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1, Rennes, France.
- Belkheir, K. (2004).** Identification des souches de *Lactobacillus* isolées de lait de chamelle de Tindouf .Etude de leur activité protéolytique .Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Biotechnologie. Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Benaissa, M. (2010).** Elaboration d'un milieu de culture à base de lactosérum doux pour *Lactobacillus*. Mémoire de magister. Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Benasla, A. & Benchagra, K. (2009).** Effet des substrats carbonés sur la croissance et les caractéristiques technologiques de *Lactobacillus*. Mémoire d'ingénieur d'état en Biotechnologie. Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Benbernou, S. (2008).** Effet inhibiteur des bactéries lactiques isolées de viandes bovines sur des germes indésirables. Mémoire de Magister. école nationale vétérinaire, Alger, Algérie.
- Benmouna, Z. (2008).** Bactériocines des coques lactiques isolées de “Ghars” de la région de Biskra. Mémoire d'ingénieur d'état, Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Berry, A.-R., Franco, M.-C.-M., Zhang, W. & Middelberg, A.-P.-J. (1999).** Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnol. Lett.* **21**:163–167.
- Biazar, J., Tango, M., Babolian, E. & Islam, R. (2003).** Solution of the kinetic modelling of lactic acid fermentation using a domain decomposition method. *Appl. Math. Comput.* **144**:433-439.
- Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W. & Rogers, P.-L. (2003).** Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. *Biochem. Eng. J.* **14**:127-135.
- Bottazi, V. (1962).** Il potere proteolitico dei lactobacilli e il processo di maturazione dei fromaggi. *Latt.* **36**: 597-603.
- Boudjema, K.-A, Fazouane-Naimi, F., Hellal A. & Mechakra, A. (2009).** Optimisation et modèle de production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactosérum. *Sci. Technol.* **29**:80-90.

- Bouguettoucha, A. (2009).** Optimisation de la production de l'acide lactique par voie fermentaire- description du processus à l'aide de modèles structurés et non structurés. Thèse de doctorat en science. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie.
- Bouguettoucha, A., Balannec, B., Nacef, S. & Amrane, A. (2007).** A generalised unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microb. Technol.* **41**:377–382.
- Boumerdassi, H., Desmazeaud, M., Monnet, C., Boquien, C.-Y. & Corrieu, G. (1996).** Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control. *J. Dairy Sci.* **79**: 775-781.
- Bounoua, M.-D. (2005).** Isolement et pré identification de bactéries lactiques de différents laits de chamelles du sud Algérien. Mémoire d'Ingénieur d'Etat . Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Divies, C. & Garmyn, D. (2001).** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Lait.* **81**: 75–82.
- Boyaval, P. (1989).** Lactic acid bacteria and metal ions. *Lait.* **69**: 87-113.
- Bouziani, I. & Sebaha, F.-Z. (2006).** Isolement et Identification des bactéries lactiques à partir de Blé Fermenté. Etude Technologique et extraction d'ADN plasmidique. Mémoire d'Ingénieur d'Etat. Université de Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Garrity, G. M., et Staley, J. T. (2005).** Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria Springer.
- Briczinski, E.-P. & Roberts, R.-F. (2002).** Production of an Exopolysaccharide-Containing Whey Protein Concentrate by Fermentation of Whey. *J. dairy sci.* **85(12)**: 3189–3197.
- Bruinenberg, P.-G., Vos, P., & De Vos, W.-M. (1992).** Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains: regulation and effect on growth and acidification in milk. *Appl. environ. microbiol.* **58**: 78–84.
- Cagnin, C. (1993).** La microflore bactérienne psychrotrophe des laits et produits laitiers. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, France .
- Capiaumant, J., Legrand, C., Dausset, B., Parmentelet, I., Liden, G., Belleville, F. & Nabet, P. (1994).** Whey and 3-lactoglobulin: 2 milk by products which can replace fetal calf serum in mousse hybridoma cell culture. *Lait.* **74**: 127-137.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G.-F. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. food. microbiol.* **50**: 131–149.
- Cayle, T., Roland, J., Mehnert, D., Dinwoodie, R., Larson, R., Mathers, J., Raines, M., Alm, W., Ma'ayeb, S. Kiang, S. & Saunders, R. (1989).** Production of L-ascorbic acid from whey. Page 57 in *Biotechnology in food Processing*. Harlander S.K. & Labusa T.P. ed. Noyes Publ . Park Ridge . NJ.
- Chapman, H.-R. & Sharpe, M.-E. (1981).** Microbiology of cheese. In: Dairy Microbiology, Robinson R.K., Eds., Vol. 2, The microbiology of milk products, Applied Sciences Publishers LTD, London, pp: 157-243.
- Champagne, C.-P., Goulet, J. & Lachance, R.-A. (1990).** Production of baker's yeast in cheese whey ultrafiltrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 426.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.-S. & Webb, C. (2002).** Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal based substrates. *J. Appl. Microbiol.* **92**:851-859.

- Cheikh, O.-A.-M. (2008).** Résistance et adaptation au sel chez des lactobacilles isolées de lait de chamelle de Mauritanie. Mémoire d'ingénieur d'état en biotechnologie. Université d'Oran. Algérie.
- Chervaux, C., Ehrlich, D. & Maguin, E. (2000).** Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5306-5311.
- Chiarini, L., Mara, L. & Tabacchioni, S. (1992).** Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:461-464.
- Christensen, J. & Steele, J. (2003).** Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* Peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.* **185**: 3297-3306.
- Cogan, T.-M. (1978).** Determination of growth rates of lactic starter cultures. *Irish J. Food Sci. Technol.* **2(1)**: 105-116.
- Cogan, T.-M. (1987).** Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc ssp.*: Effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* **63**: 551-558.
- Cornelius, C., Erpicum, T.-H., Jacques, P.-H. & Thonart, P.-H. (1996).** Comparison of fermentation industrial components such as corn steep and yeast extract for lactic acid bacteria production. *Med. Fac. Landbouww Univ. Gent.* **61**: 1461-1463.
- Cotte, F. (2000).** Etude de la valeur alimentaire des pulpes de tomates chez les ruminants. Thèse à l'université Claude-Bernard. Lyon I. France.
- Crow, V.L. & Pritchard, G.G. (1976).** Purification and properties of pyruvate Kinase from *Streptococcus lactis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **438**: 90-101.
- Crow, V.-L. & Pritchard, G.-G. (1977).** Fructose 1,6 diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*; Kinetic properties and factors affecting activation. *J. Bacteriol.* **131(1)**: 82-91.
- Crow, V.-L. (1988).** Polysaccharide production by Probionibacteria during lactose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1892-1895.
- Dairy processing handbook . (1995).** Ed. Teknotext AB. Publisher, Tetra Pak Processing Systems AB S-221 86 Lind, Sweden. Chap. 6.4, 15.
- Datta, R., Tsai, S.-P., Bonsignor, P., Moon, S. & Frank, J. (1995).** Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 221-231.
- De Man, J.-C, Rogosa, M. & Sharpe, M.-E. (1960).** A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* **23**:130-135.
- De Roissart, H. & Luquet, F.-M. (1994).** Bactéries lactiques Vol. I et II, Edition Loriga.
- De Witt, J.-N. (2001).** Manuel de l'Enseignant sur le Lactosérum et les Produits de Lactosérum, 1ère édition. European Whey Products Association, Bruxelles, Belgique.
- Dellaglio, F., Sarra, P.-G., Vescovo, M. (1981).** DNA-DNA homology of *Pediococcus* strains isolated from some Italian cheeses. *Zentralbi. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg., 1 Abt. Orig. C2*, pp: 278-281.

- Desmazeaud, M.-J. (1992).** Les bactéries lactiques. In les groupes microbiens d'intérêt laitier, Eds.J.Hermier, J. Lenoir et F. Weber ; CEPIL, Paris. pp 9-60.
- Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricul.* **5**: 331-343.
- Deutcher, J. & Saier, M.-H. (1983).** ATP-dependent protein Kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 6790-6794.
- Deutcher, J., Pevec, B., Beyreuther, K., Kiltz, H.-H. & Hengstenberg W. (1986).** Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system ; amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochem.* **25** : 6543-6551.
- Deutscher, J., Galinier, A. & Martin-Verstraete, I. (2002).** Carbohydrate Uptake and Metabolism. In *Bacillus subtilis* and its Closets Relatives : from Genes to Cells. Edited by Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick. R. et Washington D.C. : *Am. Soc. Microbiol. Press.* 129-150.
- Devoyod, J.J. & Poullain F. (1988).** Les Leuconostocs propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait.* **68** (3): 249-280.
- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N. & Amrane, A. (2006).** Horse bean extract for the supplementation of lactic acid bacteria culture media. *J. Food Technol.* **4**:299-302.
- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N. & Amrane, A. (2007a).** Growth of lactic acid bacteria on oilseed crop pea and chickpea based media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 765-769.
- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N., Amrane, A. (2007b).** Evaluation of de-lipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture. *Int. J. Dairy Technol.* **60**: 292-296.
- Djidel, A. (2007).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *raamnosus* sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. Ecole National Supérieur d'Agronomie et des Industries Alimentaires. France.
- Donkor, O.-N., Henriksson, A., Singh, T., Vasiljevic, T. & Shah, N.-P.(2007).** ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* **17**:1321–1331.
- Drrici, H. (2001).** Etude biochimique de la protéolyse chez *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* et recherche du support génétique des protéases. Mémoire de Magister, Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Engasser, J.-M.(1993).** Modélisation des procédés de fermentation. In Biotechnologie , 4^{ème} édition, coordonnateur : René Scriban. Edition Technique et Documentation : 281-290.
- Ennis, B.-M. & Maddox, I.-S. (1985).** Use of *Clostridium acetobutylicum* P262 for production of solvents from whey permeate. *Biotechnol. Lett.* **7**: 601.
- FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Alimentation et nutrition n° 28. ISBN 92-5-20534-6. <http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f00.htm>. date de consultation 28/08/2017.
- FAO-ONU (2017).** Production alimentaire: fromage (Algérie). <http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMTendanceStatPays?codeTheme=5&codeStat=RSA.FAO.CheeseAllKinds&codePays=DZA&optionsPeriodes=Aucune&codeTheme2=5&codeStat2=>

- RSA.FAO.CheeseAllKinds&codePays2=DZA&optionsDetPeriodes=avecNomP&forceAx
e=on. date de consultation 06/09/2017.
- Fernandez Espla, M.-D., Garault, P., Monnet, V. & Rul, F. (2000).** *Streptococcus thermophilus* cell wall anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4772-4778.
- Fleming, H.-P., Mc Feeters, R.-F. & Daeschel, M.-A. (1985).** The lactobacilli, pediococci and leuconostocs; vegetable products. In: Bacterial Starter Cultures for foods. Gilliland S. E., pp: 98-118, CRC Press Inc, Boca Raton. Florida.
- Floetenmeyer, M.-D., Glatz, B.-A. & Hammond, E.-G. (1985).** Continuous culture fermentation of whey permeate to produce microbial oil. *J. Dairy Sci.* **68**: 633.
- Fontina, M.-G., Nicastro, G., Garminati, D., Neviani, E. & Manachini, P.-L.(1998).** *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 72-80
- Frayert, J., Mermet, J.-M. & Paucot, H. (2012).** ICP-OES: couplage plasma induit par haute fréquence-spectrométrie optique: Ed. Techniques Ingénieur.
- Fu, W. & Mathews, A.-P. (1999).** Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* **3**: 163-170.
- Fukumoto, L.-R., Li-Chan, E., Kwan, L. & Nakai, S. (1994).** Isolation of immunoglobulin from cheese whey using ultrafiltration and immobilized metal affinity chromatography. *Food Res. Int.* **27**: 335-348.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Jaquinod, M., Stulke, J., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1997).** The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proceeding of National Academy of sciences USA.* **94**: 8439-8444.
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M.-C., Deutscher, J. & Heiech, J. (1998).** Now protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A .* **95**: 1823-1828.
- Gana, S. & Touzi A. (2001).** Valorisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren : Production et valorisation -Biomasse* : 51-58.
- Gardner, N.-J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G. & Champagne, C.-P. (2001).** Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.* **64**:261-275.
- Gaudreau, H., Champagne, C.-P. & Jelen, P. (2005).** The use of crude cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* 11482 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk. *Enzyme and Microbial Technology.* **36**: 83-90.
- Gawel, J. & Kosikowski, F.-V. (1978).** Improving alcohol fermentation in concentrated ultrafiltration permeates of cottage cheese whey. *J.Food Sci.* **43**: 1717.
- Ghaly, A.-E., Tango, M.-S.-A. & Dams, M.-A.-A. (2003).** Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. *Agric. Eng. int. The CIGR J.sci res. and dev.* <http://www.cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/view/369/364>.

- Gibson, T. & Abdel-Malek, Y. (1945).** The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* **14**: 35-44.
- Gomez, A. & Castillo, F.-J. (1983).** Production of biomass and β -D-galactosidase by *Condida pseudotro-picalis* in continous culture on whey. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 1341.
- Grattepenche, F. (2005).** Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse. Université Laval. Quebec .Canada.
- Grisales Palacio, V.-H. (2007).** Modélisation et commande floues de type Takagi-Sugeno appliquées à un bioprocédé de traitement des eaux usées, Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Grobben, G., Chin-Joe, I., Kitzen, A., Boels, C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M. & De Bont, J. (1998).** Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* NCFB 2772 with a simpliefied defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 1333- 1337.
- Guha, A., Banerjee, S. & Bera, D. (2013).** Production of lactic acid from sweet meat industry waste by *Lactobacillus delbruki*. *Int. J. Res. Eng. Technol.* **2**:630-634.
- Guiraud, J.-P. (2003).** Microbiologie alimentaire. *Edition Dunod*, Paris. 651 pages.
- Hambraeus, L. (1992).** Nutritional aspects of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), *Elsevier Appl. Sci.*, .London & NY, Vol. 1, chap. 11, pp. 470-478.
- Hansen, R. (1980).** Carbery milk products in Ireland produces alcohol from whey. *Nordeuropaisk Mejeri Tidsskr.* **46**: 10-13.
- Hargrove, R.-E., McDonough, F.-E., Lacroix, D.-E. & Alford, J.-A. (1976).** Production and properties of deproteinized whey powder. *J. Dairy Sei.* **59**: 25-33.
- Harper, W.-J. (1992).** Lactose and lactose derivatives in : Whey and lactose processing/ed. by Zadow J.G., London : *Elsevier Appl. Sci.* 317-360.
- Hassaïne, O. (2012).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de Doctorat, Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Hebali, M. (2006).** Bactéries lactiques: isolement à partir de saumure d'olives fermentées et données de la nouvelle taxonomie des bactéries lactiques. Mémoire d'Ingénieur d'Etat. , Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B. & Suarez J.-E. (1996).** Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 565-570.
- Heslot, H. (1996).** L'ingénierie des protéines et ses applications . *Lavoisier Tec et Doc* : 424-432.
- Hillier, A.-J. & Jago, G.-R., (1978).** Metabolism of [14C]bicarbonate by Streptococcus lactis: identification and distribution of labelled compounds. *J. Dairy Res.* **45** : 231–240.
- Hilpert, H., Gerber, H., Amster, J.-J., Pahud, A., Ballabriga, L., Arcalis, F., Farriaux E., DePeyer, E. & Nussle, D. (1977).** Bovine immunoglobulins: their possible utilization in industrially prepared infant's milk formula. Page 182 in Food and Immunology. L. Hambraeus, L. A. Hanson and M. Mcfarlane, eds. Almquist and Wiksel Int., Stockholm, Sweden.

- Hoppe, G. & Higgins, J. (1992).** Demineralization. In: Whey and lactose processing (JG Zadow, ed), *Elsevier*, London.
- Horácková, S., Sedláčková, P., Sluková, M. & Plocková, M. (2014).** Influence of Whey, Whey Component and Malt on the Growth and Acids Production of Lactobacilli in Milk. *Czech J. Food Sci.* **32**:526-531.
- Horn, S.-J., Aspino, S.-I. & Eijsink, V.-G.-H. (2007).** Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 1328-1334.
- Hounhoigan, D.-J., Nout, M.-J.-R., Nago, C.-M., Houben, J.-H. & Rombouts, F.-M., (1993).** Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of maw fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Microbiol.* **18** (4): 279-287.
- Hughenoltz, J., & Starrenburg, M.-J.-C. (1992).** Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* ssp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:17–22.
- Hughenoltz, J., Perdon, L. & Abee, T. (1993).** Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4216-4222.
- Hutkins, R., Horward, A., Morris, A., Larry, L. & McKay. (1985).** Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 772-776.
- Hutkins, R.-W. & Nannen, N.-L. (1993).** pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**(8): 2354-2365.
- Jacquet Violleau, V. (1999).** Déminéralisation par électrodialyse en présence d'un complexant application au lactosérum. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. France.
- Jault, J.-M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscheret J. & Galimier, A. (2000).** The HPr Kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive coöperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* **275**: 1773-1780.
- Jenq, W., Speckman, R.-A., Crang, R.-E., Steinberg, M.-P. (1989).** Enhanced conversion of lactose to glycerol by *Kluyveromyces fragilis* utilizing whey permeate as a substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:573.
- Johnston, M.-L. & Delwiche E.-A. (1965).** Distribution and characteristics of the catalase of *Lactobacillaceae*. *J. Bacteriol.* **50**: 347-357.
- Jones, D. (1978).** Composition and differentiation of genus *Streptococcus*. In: *Streptococci*. Skinner, F. A., Quesnel, L. B., Eds. Academic Press, London, pp: 1-49.
- Jouan, P. (2002).** Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Ed. Quae. INA. 127p.
- Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J.-C. & Richard, J. (1995).** Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3024–3030.
- Kalbaza, K. (2010).** Identification et étude des caractéristiques technologiques de 18 souches de *Leuconostoc* isolées du lait de chamelle de Bechar. Mémoire d'ingénieur d'état, Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.

- Kalbitzer, H.-R., Hengstenberg, W., Rosch, P., Muss, P., Bernsmann, P., Engelmann, R., Dorschug, M. & Deutscher J. (1982).** HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high-resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. *Biochem.* **21** : 2879-2885.
- Kaneko, T., Susuki, H. & Tkahashi, T. (1987).** The effects of metal ions on diacétyle production by *Streptococcus lactis* ssp. *Diacetylactis* 3022. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2315-2320.
- Kanenchi, C., Seki, M. & Komagata, K. (1988).** Production of Succinic Acid from Citric Acid and Related Acids by *Lactobacillus* Strains. *Appl. Env. Microbiol.* **54 (12)**: 3053-3056.
- Karam, N-E. (1995).** Constitution d'un souchier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique: Etude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'État, Université d'Oran 1 Ahmed BEN BELLA, Oran, Algérie.
- Keller, A.-K. & Gerhardt P. (1975).** Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 997-1018.
- Kinsella, J.-E. (1984).** Milk proteins: physicochemical and functional properties. *CRC Crit Rev Food Sei. Nutr.* **21**: 197-262.
- Konings, W.-N. & Otton, R. (1983).** Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **49** : 247 - 257
- Korkeala, H., Soback, S. & Hirin, J. (1984).** Effet of cadium on the growth of *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* in milk. *J. dairy Res.* **51**: 591-596.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H.-E., Frank, R., Galinier, A., Dentscher, J., Schnell, N. & Hengstenberg, W. (1999).** The hpr K gene of *Enterococcus faecalis* . encodes a novel bifunctional enzyme ; the HPr Kirase /phosphatase. *Mol. Micobiol.* **31**:59-66.
- Kumar Dutta, S., Mukherjee, A. & Chakraborty P. (1996).** Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 410–413.
- Kunji, E.-R., Hagting, A., De Vries, C.-J., Juillard, V., Haandrikman, A.-J., Poolman, B. & Konings, W.-N. (1995).** Transport of-casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 1569–1574.
- Kurbanoglu, E.-B. (2004).** Enhancement of lactic acid production with ram horn peptone by *Lactobacillus casei*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 37-42.
- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M. & Ouhssine, M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin-societe de pharmacie de bordeaux.* pp:144-237.
- Lapointe-Vignola, C. (2002).** Science et technologie du lait: *Transformation du lait*. Montréal, QC: Presses inter Polytechnique, 600p.
- Lauret, R., Morel-Deville, F., Berthier, F., Champomier-Verges, M., Postma, P., Ehrlich, D. & Zagorec, M. (1996).** Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sake*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1922-1927.

- Larpent, J.-P. (1989).** Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans : Microbiologie alimentaire, Tome 2, Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., Eds. Techniques et documentation Lavoisier. pp: 3-15.
- Lee, K.-D., Lo, C.-G., Richter, R.-L., & Dill, C.-W. (1995).** Effect of milk composition on the partition coefficient of diacetyl, acetaldehyde and ethanol in acidified milk products. *J. Dairy. Sci.* **78**: 2666-2674.
- Leh, M.-B. (1987).** The effect of whey protein hydrolyzates on the lactic acid fermentation. Thèse de doctorat, Université de Lehigh, USA.
- Leh, M.-B. & Charles, M. (1989).** Lactic acid production by batch fermentation of whey permeates: a mathematical model. *J. Ind. Microbiol.* **4**: 65-70.
- Ledezma, O.-V., De Ruiz Holgado, A.-P., Oliver, G., De Giori, G.-S., Raibaud, P. & Galpin, J.-V. (1977).** A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **42**: 123-133.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food Sci. Technol.* **15**: 67-78.
- Leuchtenberger, A., Friese, E. & Ruttloff H. (1989).** Synthesis of variable enzyme spectrum by immobilized mycelium of *A. niger*. *Zentralbl. Mikrobiol.* **144**: 139-149.
- Leveau, J.-Y. & Bouix, M. (1999).** Bio-ingénierie. Dans Biotechnologie. *Tech et Doc, Lavoisier, Paris* : pp 229-313.
- Levenspiel, O. (1980).** The Monod equation: a revisit and a generalisation to product inhibition situation. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 1671-1687.
- Liberman, E.-S & Bleiweis, A.-S. (1984).** Role of the phosphoenolpyruvate dependent glucose phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* GS5 in the regulation of lactose uptake. *Infect. Immun.* **43**: 536-542.
- Lin, H.-T. & Wang F.-S. (2007).** Optimal Design of an Integrated Fermentation: Process for Lactic Acid Production. *Am. Inst. Chem. Eng. J.* **53 (2)**: 449-459.
- Lindgreen, S.-E., Axelsson, L.-T. & Mc Feeters, R.-F. (1990).** Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 209-214.
- Litchfield, J.-H. (1996).** Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 45-95.
- Luedeking, R. & Piret, E.-L. (1959a).** A kinetic study of the lactic acid fermentation: Batch process at controlled pH. *Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **4**: 393-412,
- Luedeking, R. & Piret, E.-L. (1959b).** Transient and steady states in continuous fermentation: Theory and experiments. *Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **4**: 431-459.
- Luesink, E.-J., Kuiper, O.-P. & De Vos, W.-M. (1998).** Regulation of the carbohydrate metabolism in *Lactococcus Lactis* and other lactic acid bacteria. *Lait.* **78**: 69-76.
- Major, N.-C. & Bull, A.-T. (1985).** Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol. Lett.* **7**: 401-405.
- Maldonado, A. (1992).** Effect of medium composition on xanthan gum production from whey permeate using *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. M.S. Thèse, The Ohio State University Columbus, États-Unis
- Manyri, L. (2005).** Analyse automatique d'images de populations microbiennes, Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.

- Marcela, P.-B., Luciana, F.-C., Daiane, C.-S. & Jonas, C. (2016).** L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Braz. J. Microbiol.* **47**: 640-646.
- Marshall, V.-M. (1987).** Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 327-336.
- Martin, B. (2001) .** L'homme et ses aliments : initiation à la science des aliments, 2ème édition .Les presses de l'université Laval, Saint Nicolas (Québec) ,370 pages.
- Marwaha, S.-S., Kennedy, J.-F. & Sethi, R.-P. (1983).** Vitamine B12 production from whey and simulation of optimal cultural conditions. *Proc. Biochem.* **18 (4)**: 11-24.
- Mawson, A.-J. (1988).** Yeast biomass production from acid whey permeate. *Biotechnol. Lett.* **10 (7)**: 503-508.
- Mayeux, J.-V., Sandine, W.-E. & Elliker, P.-R. (1962) .**A selective medium for detecting leuconostoc organisms in mixed-strainstartercultures. *J.Dairy.Sci.* **45**: 655–656.
- Mc Comas, K.-A.-J & Gilliland, S.-E. (2003).** Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *J. Food Sci.* **68**: 2090-2095.
- Mehaia, M.-A. & Cheryan, M. (1986).** Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme Microbiol. Technol.* **8 (5)**: 289-292.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Galimier, A., Monedero, V., Fieulaine, S ., Janin, J., Nessler, S., Marquez, J.-A, Scheffzek, K., Hasenbein, S., Hengstenberg, W. et Deutscher, J. (2002).** Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr Kinase/phosphatase : A relic of early life? Proceeding of National Academy of Sciences USA.
- Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M. & Fujita, Y. (2000).** Evalution and charaterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research.* **28**: 1206-1210.
- Moletta, R.(2002).** Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Ed. Tech et Doc, Paris .600p.
- Monnet, C., Ulvé, V., Sarthon, A.-S. & Irlinger, F.(2008).** Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **74 (12)**: 5724-5730.
- Morishita, T., Fukuda, T., Shiota, M. & Yura T. (1974).** Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **120**: 1078-1084.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. & Yura, T. (1981).** Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthesis pathways. *J. Bacteriol.* **148**: 64-71.
- Morr, C.-V. (1982).** Functional Properties of Milk Proteins and their Use as Food Ingredients. In : Dairy Chemistry-1 , Ed., P. F. Fox, NY, 375-398.
- Moulin, G. & Galzy, P. (1984).** Whey, a potential substrate for biotechnology. In: *Biotechnology genetic engineering reviews*, vol 1 (GE Russell, ed), Intercept, Newcastle upon Tyne, 347-374.
- Mozzi, F., Savoy de Giori, G.-S., Oliver, G. & Font de Valdez, G. F. (1994).** Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft.* **49**: 667–670.

- Mulvihill, D.-M. & Fox, P.-F. (1989).** Physico-chemical and functional properties of milk proteins. *Adv. Dairy Chem. Vol. I.* Fox PF (ed.). Elsevier Appl. Sci., London, 131-172.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. & Boudrant, J. (2001).** The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. *Bioresour. Technol.* **78**:149-153.
- Nandasana, A.-D. & Kumar, S. (2008).** Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Biochem. Eng. J.* **38**: 277–284.
- Nannen, N.-L. & Hutkins, R.-W. (1991).** Proton-translocating Adenosine Triphosphatase Activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **74**: 745-751.
- Naveena, B.-J., Altaf, M.-D., Bhadriah, K. & Reddy, G. (2004).** Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran, *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 147–152.
- Neves, A.-R., Ramos, A., Nunes, M.-C., Kleerebezem, M., Hugenholtz- J., De Vos, W.-M. Almeida, J. & Santos H. (1999).** In vivo magnetic resonance studies of glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.* **64**:200-212.
- Novel, G. (1993).** Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.
- Otto, R., Vije, T., Ten Brink, B., Klont, B. & Konings W.-N. (1985).** Energy metabolism in *Streptococcus cremoris* during lactose starvation. *Archives Microbiol.* **141**: 348-352.
- Pearce, R.-J. (1983).** Thermal separation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *J. Dairy Technol.* **38** : 144-149.
- Pirt, S.-J. (1975).** Principles of microbe and cell cultivation. BLACKWEL, OXFORD.
- Plock, J. & Kessler, H.-G. (1992).** Whey protein preparations - Gelling and water-holding properties under neutral pH conditions. *DMZ- Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft* **113**: 895-899.
- Poolman, B., Smid, E.-J., Velkamp, H. & Knings W.-N. (1987).** Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* **169**: 1460-1468.
- Preeti, C., Dimpi, G., Raman, K., Pooja, A. & Suman, D. (2016).** Lactic Acid Production Vis-à-Vis Biowaste Management Using Lactic Acid Bacteria. *World. Appl. Sci. J.* **34**: 1542-1552.
- Ramstrom, H., Samglier, S., Leize-Wagner, E., Philippe, C., Van Dorsselaer, A. & Haiech J. (2003).** Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr.kinase/ phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **278** : 1174-1185.
- Rapin, J.-D. Marison, I.-W. & Reilly, P.-J. (1994).** Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. *Enzyme Microbiol. Technol.* **16 (2)**: 143-150.
- Reddy, G., Altaf, M.-D., Naveena, B.-J., Venkateshwar, M. & Vijay Kumar, E. (2008).** Amylolytic bacterial lactic acid fermentation . A review, *Biotechnol. Adv.* **26**: 22–34.
- Reddy Tadi, S.-R., EVR, A., Limaye, A.-M. & Sivaprakasam, S. (2017).** Enhanced production of optically pure d (-) lactic acid from nutritionally rich *Borassus flabellifer* sugar and whey protein hydrolysate based-fermentation medium. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **64**: 279-289.

- Reinbold, R.-S. & Takemoto, J. (1988).** Use of Swiss cheese whey permeate by *Kluyveromyces fragilis* and mixed culture of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Bacillus megaterium*. *J. Dairy Sci.* **71** (7): 1799-1802.
- Reizer, J. & Penos, C. (1980).** Regulation of beta-galactoside phosphate accumulation in *Streptococcus pyogenes* by an expulsion mechanism. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* **77**: 5497-5501.
- Reizer, J., Navotny, M.-J., Panos, C. & Saier M.-H. (1983).** Mechanism of inducer expulsion in *Streptococcus pyogenes* : a two-step process activated by ATP. *J. Bacteriol.* **156**: 354-361.
- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stulke, J., Karameta, D., Saier, M.H. & Hillen, W. (1998).** A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* **27**: 1157-1169.
- Rerat, A., Lacrois, M., Simoes-Munes, C. Vaugelade, P. & Vaissade, P. (1984).** Absorption intestinale comparée d'un mélange d'hydrolysats ménagés de protéines laitières et d'un mélange d'acides aminés libres de même composition chez le porc éveillé. *Bull. Acad. Natl. Med.* **168** : 385-391.
- Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H. & Karam, N. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest algérien. *Euro. J. Sci. Res.* **34** (2) : 218-227.
- Roger, L. (1979).** Contributions à la recherche d'une meilleure utilisation en alimentation humaine des composants glucidiques et protéiques du lactosérum grâce à l'emploi des techniques à membranes. Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Rennes (ENSAR).France.
- Roukas, T., Lazarides, H. & Kotzekidou, P. (1991)** Ethanol Production from Deproteinized Whey by *Saccharomyces cerevisiae* Cells Entrapped in Different Immobilized Matrices. *Milchwissenschaft.* **46** (7): 438-441.
- Roy, D., Luedy, A. & Goulet, J. (1987).** Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *The Canadian J. Chem. Eng.* **65**: 597-603.
- Ryhänen, E.-L., Särkkä-Tirkkonen, M. & Mantere-Alhonen, S. (1996).** Isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented wheat drink. *Microbiol. Alim. Nutr.* **14** (4): 369-372.
- Saier, M.-H. & Crasnier, M. (1996).** Inducer exclusion and the regulation of sugar transport. *Res. Microbiol.* **147**: 482-489.
- Salama, H.-S., Foda, M.-S., El-Sharaby, A. & Selim M.-H. (1983).** A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. *Entomophaga.* **28** (2): 151-160.
- Salminen, S. & Von Wright, A. (2009).** Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Third Edition Taylor & Francis.*
- Samelis, J., Maurogenakis, F. & Metaxopoulos, J. (1994).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented creak dry Somali. *Int. J. food. Microbiol.* **23**: 179-196.
- Sandine, W.-E. (1988).** New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochim.* **70** : 519-522.
- Sandhu, D.-K. & Waraich, M.-K. (1983).** Conversion of cheese whey to single-cell protein. *Biotechnol. Bioeng.* **25** (3): 797-808.

- Saulnier, F., Calco, M., Humbert, G. & Linden, G. (1996).** Composition minérale et organique de différents lactosérums acides industriels, analysée par électrophorèse capillaire. *Lait*. **76 (598)**: 423-432.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 394-406.
- Schmidt, J., Tourneur, C. & Lenoir, J. (1994).** Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. In Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques, pp. 37-54. Edité par De Roissart, H. & Luquet, F. Paris, France: Loriga, Uriage.
- Schmitt, P., Couvreur, C., Cavin, J.-F., Prévost, H. & Diviès, C. (1988).** Citrate utilisation by free and immobilised *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 430-436.
- Schmitt, P., Diviès, C. & Merlot, C. (1990).** Utilisation of citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris* in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* **12**: 127-130.
- Schmitt, P. & Diviès, C. (1991).** Co-metabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *crenoris*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 72-74.
- Seizen, R.-J. (1999).** Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**: 139-155.
- Selby Smith, J., Hillier, A.-J. & Lees, G.-J. (1975)** The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.* **42**: 123-138.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Mattiasson, B. & Kaul R. (1997).** Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 843-853.
- Smithers, G.-W. (2008).** Whey and whey proteins From 'gutter-to-gold'. *Int. Dairy J.* **18 (7)**: 695-704.
- Sobotková, L., Sikyta, B. & Smékal, F. (1989).** Production of lysine by mutants of *Escherichia coli* K12 in medium with lactose. *Acta. Biorechnol.* **9 (2)**: 173-177.
- Somkuti, G.-A. & Bencivengo, M.-M. (1981).** Citric acid fermentation in whey permeate. *Dev. Ind. Microbiol.* **22**: 557-563.
- Sooch, B.-S. & Singh, R.-S. (2002).** Characterization of cheese whey and its suitability for ethanol production by alginate entrapped yeast cells. *J. Food sci. Technol.* **39**: 21-25.
- Sottiez, P. (1990).** Produits dérivés des fabrications fromagères in : lait et produits laités ; vache, brebis, chèvre. Edition Lavoisier, Paris. 633p.
- Spinnler, H.-E. (1998).** Technologies de transformation des produits agroalimentaires, Technique de l'Ingénieur, F 1 170, pp.1-14.
- Starrenburg, M.-J.-C. & Hugenholtz, J. (1991).** Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. environ. Microbiol.* **57 (12)**: 3535-3540.
- Stiles, M.-E. & Holzapfel, W.-H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.* **36**: 1-29.
- Suhigara, T.-F. (1985).** The Lactobacilli and Streptococci: bakery products. In: Bacterial Starter Cultures for Foods. Gilliland S.E. Eds. CRC Press Boca Raton. Florida, **9**, pp: 120-125.
- Sun, Y., Li, Y.-L. & Bai, S. (1999).** Modeling of continuous L(+) lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor, *Biochem. Eng. J.* **3**: 87-90.

- Tamura, Y., Mizota, T., Shimamura, S. & Tomita, M. (1993).** Lactulose and its application to food and pharmaceutical industries. Page **43** in *Bull. Int. Dairy Fed.* No. **289**. *Int. Dairy Fed.* Brussels Belgium.
- Tayeb, J., Bouillance, C. & 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.
- Terzaghi, B.-E. & Sandine, W.-E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Microbiol.* **29**: 807-813.
- Thomas, T.-D. (1976).** Regulation of lactose metabolism in group N Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 474-478.
- Thompson, J.-T. & Thomas, D. (1977).** Phosphoenol pyruvate and 2-phosphoglycerate : endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **130**: 583-595.
- Thompson, J., Turner, K.-W. & Thomas, T.-D. (1978).** Catabolite inhibition and sequential metabolism of sugars by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **133**: 1163-1174.
- Thompson, J. & Saier, M.-H. (1981).** Régulation of methyl- β -D-thiogalatoside-6-phosphate accumulation in *Streptococcus lactis* by exclusion and expulsion mechanisms. *J. Bacteriol.* **146**: 885-894.
- Thompson, J. & Chessy, B.-M. (1983).** Intracellular hexose-6-phosphohydrolase from *Streptococcus lactis* : purification, properties, and fonction. *J. Bacteriol.* **156**: 70-80.
- Thompson, J. & Torchia, D.-A. (1984).** Use of ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ^{14}C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **158**: 791-800.
- Thompson, J. & Gentry-Weeks, C.-R (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Ed. De Roisserd H et al. lolica-Uriage. **1** : 229-239.
- Timbuntam, W., Sriroth, K. & Tokiwa, Y. (2006).** Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* **28**:811-814.
- Tin, C.-S.-F. & Mawson, A.-J. (1993).** Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Proc. Biochem.* **28 (4)**: 217-221.
- Toumi, K.-H. (2009).** Modélisation et identification paramétrique des processus de fermentation lactique. Magistère en Génie Chimique. Université Ferhat ABBAS, Setif, Algérie.
- Trias, R. (2008).** Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. *Thèse de doctorat, University de Girona*. Espagne.
- Turner, K.-W. & Thomas, T.-D. (1975).** Uncoupling of growth and acid production in lactic streptococci. *J. Dairy Sei. Technol.* **10**: 162-167.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G. & Haandrikman, A. (1993).** Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **175**: 7523-7532.
- Uchida, K. (1982).** Multiplicity in soy pediococci carbohydrate fermentation and its application for analysis of their flora. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, pp: 215-223.

- Vahvaselkä, M.-I & Linko, P. (1987).** Lactic acid fermentation in milk ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. In: Neyssel OM, van der Meer RR, Huyben KCAM (eds) Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology, vol 3, Elsevier, Amsterdam, pp 317-320.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **82**: 187–216.
- Van Den Berg, D.-J.-C., Smits, A., Pot, B., Ledebøer, A.-M., Kersters, K., Verbakel, J.-M.-A. & Verrips, C.-T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food biotechnol.* **7**: 189-205.
- Veisseyre, R. (1979)** *Technologie du lait*, 3e edn, La Maison Rustique, Paris
- Vethakanraj, H.-S., Sayanti, S., Ashoke, R.-T. & Shaon, R.-C. (2013).** Screening of bacteria for lactic acid production from whey water. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **9**:118-123.
- Villar, M., De Ruiz Holgado, A., Sanchez, J.-J., Trucco, R.-E. & Oliver, G. (1985).** Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 664-666.
- Vojnovic, V., Ritz, M. & Vahcic, N. (1993).** Sensory evolution of whey-based fruit beverages. *Nahrung*. **37**: 285-304.
- Watanabe, M., Kaburagi, T., Seto, Y., Morita, F., Suzuki, Y. & Nakajima, H. (2004).** Whey protein hydrolyzate for growth promotion of lactic acid bacteria. Japan Kokai Tokkyo Koho. pp 11.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N. & Ryu, H.-W. (2006).** Biotechnological production of lactic acid and its recent applications, *Food Technol. Biotechnol.* **44** (2): 163–172.
- Weigel, N., Powers, D.-A. & Roseman, S. (1982).** Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Primary structure and active site of a general phosphocarrier protein (HPr) from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **257**: 14499-14509.
- Woo, A. (2002).** La grande diversité du lactosérum. Agriculture et agroalimentaire. Canada. p 3-13.
- Yang, S.-T., Zhu, H. & Silva, E.-M. (1993).** Production of value-added products from agricultural and food processing by products. Page 47 in *biotechnol. Ogy in the 21st Century*. C. Ayyanna, ed tate McGraw-Hill Publ. Co. Lid., New Delhi. India.
- Yang, S.-T. & Silva, E.-M. (1995).** Novel Products and New Technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy Sci.* **78**: 2541-2562.
- Ybannavar, V.-M. & Wang, D.-I.-C. (1991).** Extractive fermentation for lactic acid production. *J. Biotechnol. Bioeng.* **37** (11):1095-1100.
- Ye, J.-J., Reizer, J., Cui, X. & Saier, M.-H. (1994).** Inhibition of the phosphoenolpyruvate : lactose phosphotransferase system and activation of cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein HPr. *J. Biol. chem.* **269**: 11837-11844.
- Ykema, A., Verbree, E.-C., Kater, M.-M. & Smit, H. (1988).** Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:211-218.

- Zadi-Karam, H.(1998).** Bactéries lactiques isolées de lait *Camelus dromedarius*: Etude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Constantine, Constantine, Algérie.
- Zadi-Karam, H. & Karam, N-E. (2006).** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicul*. **24**: 153-156.
- Zeikus, J.-G., Jain, M.-K. & Elankovan, P. (1999).** Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 545-552.
- Zhang, B., He, P.-J., Ye, N.-F. & Shao, L.-M. (2008).** Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. *Biores. Technol.* **99**: 855–862.

5 - Annexes

Annexe 1

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) :

Peptone tryptique	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papaïnique de soja	5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5,5g
β -glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose	5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH=7,2

Stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes

Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	1g
Sulfate de magnésium	0.1g
Sulfate de manganèse	0,05g
Phosphate dipotassique	2g
Tween 80	1ml
Eau distillée qsp	1000ml
Agar	15g

pH= 6,5

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu MRS modifié (MRSm):

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Lactose	20g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	1g
Sulfate de magnésium	0.1g
Sulfate de manganèse	0,05g
Phosphate dipotassique	2g
Tween 80	1ml
Eau distillée qsp	1000ml
Agar	15g

pH= 6,5

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu Mayeux (Mayeux *et al.*, 1962) :

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Citrate de sodium	1g
Glucose	5g
Saccharose	100g
Gélatine	2,5g
Azide de sodium	0,0075g
Eau distillée qsp	1000ml

pH=7

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

5. Milieu Mayeux modifié (Mayeux m) :

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Citrate de sodium	1g
Lactose	20g
Gélatine	2,5g
Azide de sodium	0,0075g
Eau distillée qsp	1000ml

pH=7

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu BMK (Benaissa, 2010) :

La composition de ce milieu à base de lactosérum doux est pour 1 litre :

Lactosérum	700ml
Jus de tomate	300ml
Extrait de levure	10g
Sulfate de magnésium	0,1g
Sulfate de manganèse	0,05g
Agar	15g

pH= 5,7

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

Lait écrémé :

Utilisé pour la conservation des souches et l'étude de l'activité protéolytique des bactéries :

Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée qsp	100ml

Stérilisation à 120°C pendant 10 minutes.

Tampon phosphate sodium:

KH ₂ PO ₄ 1M	1,36% (m/v)
Na ₂ HPO ₄ 1M	3,58% (m/v)

Annexe 2

Réactifs utilisés pour la méthode de Bertrand :**➤ Liqueur Tartrique :**

Tartrate double Na,K	200 g
Soude	150g
Eau distillée qsp	1000ml

➤ Liqueur cuivrique :

Sulfate de cuivre	40g
Eau distillée qsp	1000ml

➤ Liqueur ferrique :

Sulfate ferrique	50g
Acide sulfurique	200g
Eau distillée qsp	1000ml

➤ Ferrocyanure de K₄ 106 g/l**➤ Acétate de zinc** 30%

Le taux du sucre interverti est calculé (en %) selon la formule :

$$[\%] = \frac{\text{Masse du sucre interverti (Tableau)}}{\text{Volume de l'échantillon à dosé}} \cdot \frac{\text{volume de la prise d'essai}}{\text{Masse de la prise d'essai}} \cdot \frac{100}{1000}$$

Dosage des sucres par la technique de G. Bertrand :**Table de conversion**

KMnO ₄ N/10 en ml	GLUCOSE en mg	SUCRE INTERVERTI en mg
7,0	22,2	22,0
7,1	22,5	22,4
7,2	23,0	22,7
7,3	23,2	23,0
7,4	23,5	23,4
7,5	24,0	23,7
7,6	24,2	24,1
7,7	24,5	24,4
7,8	25,0	24,7
7,9	25,2	25,1
8,0	25,5	25,5
8,1	26,0	25,8
8,2	26,2	26,1
8,3	26,6	26,5
8,4	27,0	26,8
8,5	27,2	27,1
8,6	27,6	27,5
8,7	28,0	27,8
8,8	28,2	28,1
8,9	28,6	28,5
9,0	29,0	28,8
9,1	29,2	29,1
9,2	29,6	29,5
9,3	30,0	29,8
9,4	30,2	30,1
9,5	30,6	30,5
9,6	31,0	30,8
9,7	31,3	31,1
9,8	31,6	31,5
9,9	32,0	31,8
10,0	32,3	32,2
10,1	32,7	32,5
10,2	33,0	32,9
10,3	33,4	33,3
10,4	33,7	33,6
10,5	34,0	33,9
10,6	34,4	34,3
10,7	34,7	34,6
10,8	35,1	35,0
10,9	35,5	35,3
11,0	35,8	35,6
11,1	36,1	36,0
11,2	36,5	36,4
11,3	36,8	36,7
11,4	37,1	37,0
11,5	37,5	37,4
11,6	37,8	37,7
11,7	38,2	38,1
11,8	38,5	38,4
11,9	38,8	38,7
12,0	39,2	39,1
12,1	39,6	39,4
12,2	39,9	39,7
12,3	40,3	40,2
12,4	40,6	40,5
12,5	41,0	40,8
12,6	41,3	41,2
12,7	41,7	41,5
12,8	42,0	42,0
12,9	42,4	42,3
13,0	42,7	42,6
13,1	43,1	43,0

KMnO ₄ N/10 en ml	GLUCOSE en mg	SUCRE INTERVERTI en mg
13,2	43,4	43,3
13,3	43,8	43,7
13,4	44,1	44,1
13,5	44,5	44,4
13,6	45,0	44,7
13,7	45,2	45,2
13,8	45,6	45,5
13,9	46,0	45,9
14,0	46,3	46,3
14,1	46,7	46,6
14,2	47,0	47,0
14,3	47,4	47,3
14,4	47,7	47,6
14,5	48,1	48,0
14,6	48,5	48,4
14,7	48,8	48,8
14,8	49,1	49,1
14,9	49,5	49,5
15,0	49,8	49,8
15,1	50,2	50,2
15,2	50,5	50,5
15,3	51,0	51,0
15,4	51,3	51,3
15,5	51,6	51,6
15,6	52,0	52,1
15,7	52,4	52,4
15,8	52,7	52,7
15,9	53,1	53,1
16,0	53,5	53,5
16,1	54,0	53,9
16,2	54,2	54,2
16,3	54,6	54,6
16,4	55,0	55,0
16,5	55,3	55,3
16,6	55,7	55,7
16,7	56,1	56,1
16,8	56,4	56,4
16,9	56,8	56,9
17,0	57,1	57,2
17,1	57,5	57,5
17,2	57,8	57,9
17,3	58,2	58,3
17,4	58,6	58,7
17,5	59,0	59,0
17,6	59,3	59,4
17,7	59,7	59,8
17,8	60,0	60,1
17,9	60,4	60,4
18,0	60,8	61,0
18,1	61,2	61,3
18,2	61,6	61,6
18,3	62,0	62,1
18,4	62,3	62,4
18,5	62,8	62,9
18,6	63,1	63,2
18,7	63,4	63,5
18,8	63,8	64,0
18,9	64,2	64,4
19,0	64,5	64,8
19,1	65,0	65,1
19,2	65,2	65,4
19,3	65,7	65,9

KMnO ₄ N /10 en ml	GLUCOSE en mg	SUCRE INTERVERTI en mg
19,4	66,0	66,2
19,5	66,4	66,5
19,6	66,8	67,1
19,7	67,1	67,4
19,8	67,5	67,8
19,9	68,0	68,2
20,0	68,3	68,7
20,1	68,7	69,0
20,2	69,0	69,3
20,3	69,4	69,7
20,4	69,8	70,1
20,5	70,2	70,5
20,6	70,5	71,0
20,7	71,0	71,3
20,8	71,3	71,6
20,9	71,7	72,1
21,0	72,1	72,4
21,1	72,5	72,9
21,2	72,8	73,2
21,3	73,3	73,6
21,4	73,6	74,1
21,5	74,0	74,4
21,6	74,5	74,9
21,7	74,8	75,2
21,8	75,3	75,6
21,9	75,6	76,0
22,0	76,0	76,4
22,1	76,4	76,8
22,2	76,8	77,2
22,3	77,2	77,6
22,4	77,6	78,0
22,5	78,0	78,3
22,6	78,4	78,8
22,7	78,7	79,2
22,8	79,1	79,5
22,9	79,5	80,0
23,0	80,0	80,3
23,1	80,3	80,8
23,2	80,6	81,1
23,3	81,1	81,5
23,4	81,5	82,0
23,5	81,8	82,3
23,6	82,3	82,8
23,7	82,6	83,2
23,8	83,0	83,5
23,9	83,5	84,0
24,0	84,0	84,4
24,1	84,3	84,8
24,2	84,7	85,2
24,3	85,1	85,6
24,4	85,5	86,0
24,6	90,3	90,9
24,7	90,6	91,2
24,8	91,0	91,6
24,9	91,5	92,1
26,0	92,0	92,5
26,1	92,3	93,0
26,2	92,7	93,3
26,3	93,1	93,8
26,4	93,5	94,1
26,5	94,0	94,5
26,6	94,3	95,0
26,7	94,7	95,3
26,8	95,1	95,8
26,9	95,5	96,2
27,0	96,0	96,6

KMnO ₄ N /10 en ml	GLUCOSE en mg	SUCRE INTERVERTI en mg
27,1	96,3	97,0
27,2	96,6	97,3
27,3	97,1	97,9
27,4	97,5	98,2
27,5	98,0	98,6
27,6	98,3	99,1
27,7	98,7	99,4
27,8	99,1	99,9
27,9	99,5	100,0
28,0	100,0	

Rapport-Gratuit.com

Full Length Research Paper

Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*

Miloud BENAÏSSA, Halima ZADI-KARAM and Nour-Eddine KARAM*

Laboratory of Biology of Microorganisms and Biotechnology, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, 31000, Algeria.

Received 28 May, 2017; Accepted 20 July, 2017

In this study, the potential use of sweet whey as a base medium for lactic acid bacteria culture and its effect on the technological characteristics of lactobacilli was evaluated. Bacteria were grown on raw or deproteinized whey supplemented with different amounts of yeast extract and/or tomato juice. Results obtained showed that biomass production on whey supplemented with yeast extract was higher than those observed with tomato juice. Whilst, supplementation by either whey, tomato juice or yeast extract increased significantly the growth of both lactic acid bacteria, the performance was in the same range as that on a modified MRS medium. Additionally, acidification and proteolytic activities resulting from control and modified MRS medium were of comparable values. The present investigation demonstrates that sweet whey can be used as an alternative substrate for lactic acid bacteria cultural purposes and provide opportunity to make a new growth medium with low cost.

Key words: Acidification, bacterial growth, *Lactobacillus*, proteolytic activity, sweet whey, tomato juice, yeast extract.

INTRODUCTION

Many sub-products of food industry that are released into the environment are a source of pollution. Among these, we are interested in whey from dairy industry. This sub-product is still poured in large quantities, simply in rivers and sewers. Because of its biochemical composition (lactose, proteins, vitamins), whey is an excellent culture medium for microorganisms and thus is a great source of pollution (Boudjema et al., 2009). In order to promote these high tonnages whey, we are interested in using

sweet whey as a culture medium for lactic acid bacteria (LAB).

Indeed, LAB are demanding nutritionally (Desmazeaud, 1983), and culture media have to be supplemented with various peptide sources and growth factors (Pritchard and Coolbear, 1993; John et al., 2007). Rich and complex media, like MRS (De Man et al., 1960) or M17 (Terzaghi and Sandine, 1975) are available and especially suitable for the culture of LAB: they contain

*Corresponding author. E-mail: nek1948@yahoo.fr. Tel: +213 699 85 27 26.

complex nitrogen supplementation, like peptones, yeast extract and meat extract, supplying LAB growth with peptidic nitrogen and growth factors. But, their use is limited to specific uses because of their high costs. This is why many researchers are interested in optimization of culture media for LAB by adding different sources of nitrogen like ram horn (Kurbanoglu, 2004), corn steep liquor (Cornelius et al., 1996; Marcela et al., 2016), whey protein hydrolysates (Mc Comas and Gilliland, 2003; Watanabe et al., 2004), malt sprout extract, casein hydrolysates (Vahvaselkä and Linko, 1987; Chiarini et al., 1992; Horáčková, 2014), baker's yeast cells (Altaf et al., 2007), vegetal substrates (Gardner et al., 2001; Nancib et al., 2001; Charalampopoulos et al., 2002; Djeghri-Hocine et al., 2006; Djeghri-Hocine et al., 2007a), sugarcane juice (Preeti et al., 2016), Palmyra palm jaggery (Reddy Tadi et al., 2017), and de-lipidated egg yolk (Djeghri-Hocine et al., 2007b). The most efficient nitrogen source seems to be yeast extract (Aeschlimann and Von Stokar, 1990; Arasaratnam et al., 1996; Göksungur and Güvenç, 1997; Guha et al., 2013; Vethakanraj et al., 2013). But this is costly in industrial production. Therefore, attempts have been made to replace the yeast extract (Baralle and Borzani, 1988; Amrane and Prigent, 1993; Amrane, 2000; Gaudreau et al., 2005; Timbuntam et al., 2006).

Furthermore, other interesting constituents for the growth of bacteria and especially *Lactobacillus* genus that was studied, is the tomato juice, rich in simple sugars, minerals and vitamins. It stimulates growth, increases bacterial biomass, with shorter generation time and improves production of acid in medium (Gibson and Abdel-Malek, 1945; Miller and Puhon, 1980; Babu et al., 1992).

In our work, we investigated the possibility of valorization of sweet whey as culture medium for lactic acid bacteria belonging to *Lactobacillus* genus.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The following strains used in this work belong to the collection of the Laboratory of Biology of Microorganisms and Biotechnology, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algeria: *Lactobacillus plantarum* BH14; *Lactobacillus casei* CHTD27, *Lactobacillus sp.* CHM11 isolated from raw camel milk, *Lactobacillus sp.* V8 and V14 isolated from fresh ovine meat and *Lactobacillus sp.* LVK9, LVK11, LVK12 isolated from cow's raw milk.

Media

Culture medium used was upon sweet whey, from local manufacturing plant soft cheeses (camembert) and tomato juice (TJ). Whey was deproteinized by heating in a water bath at 100°C for 30 min, then centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The supernatant was filtered through a standard paper filter (DURIEUX, ref: 66301130). The same procedure, except the heat treatment

was performed on the tomato after scraping (Boudjema et al., 2009).

Deproteinized whey was then supplemented with various concentrations of yeast extract (YE) and/or fresh tomato juice (pH is adjusted to 5.7 with 5N NaOH or 5N HCl) supplemented with 0.1 g of magnesium sulfate and 0.05 g of manganese sulphate. The whole was autoclaved at 120°C for 15 min.

Culture

After incubation for 24 h at 30°C, bacterial growth was measured by turbidimetry at a wavelength of 600 nm and a microbial count on MRS solid medium (results are expressed as U.F.C / ml).

Measuring the acidity produced

Measurement of the acidity produced by the bacterial strains was done by Dornic titration as described by Karam and Karam (1994).

Detection of cellular proteolytic activity

Proteolytic activity was sought in a solid medium on a Petri dish buffered to pH 7 with phosphate buffer (KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0.1 M) supplemented with 1% sterile reconstituted skim milk at 10%. According to the method described by Van den Berg et al. (1993), bacterial strains tested were seeded simultaneously on the surface of culture medium using multipoint inoculator. After incubation at 30°C for 48 h, proteolytic activity was revealed by the appearance of a clear halo around each bacterial colony. The dimension of this halo was later measured.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of culture medium

WY growth medium (Whey + yeast extract)

Results obtained clearly show that biomass production was improved by the non-supplemented whey (Figure 1). *L. casei* CHTD27 biomass was proportional to the amount of yeast extract added until concentrations above 8%, and then stabilized. For *L. plantarum* BH14, biomass continues to increase up to 10% of yeast extract. There are differences in biomass between the two strains for the same yeast extract concentration; this is probably due to the strain effect.

The stimulant effect of YE on bacterial growth was often reported (Baralle and Borzani, 1988; Amrane and Prigent, 1993; Champagne et al., 1999; Nancib et al., 2005; Djeghri-Hocine et al., 2007b). However, Boudjema et al. (2009) and Ghaly et al. (2003) reported that at high concentrations of YE, the cell concentration decreases, under the effect of a high toxicity of YE.

From the viewpoint of medium cost, the use of a culture medium with such concentrations of YE is not profitable. For this reason we have substituted yeast extract by the tomato juice.

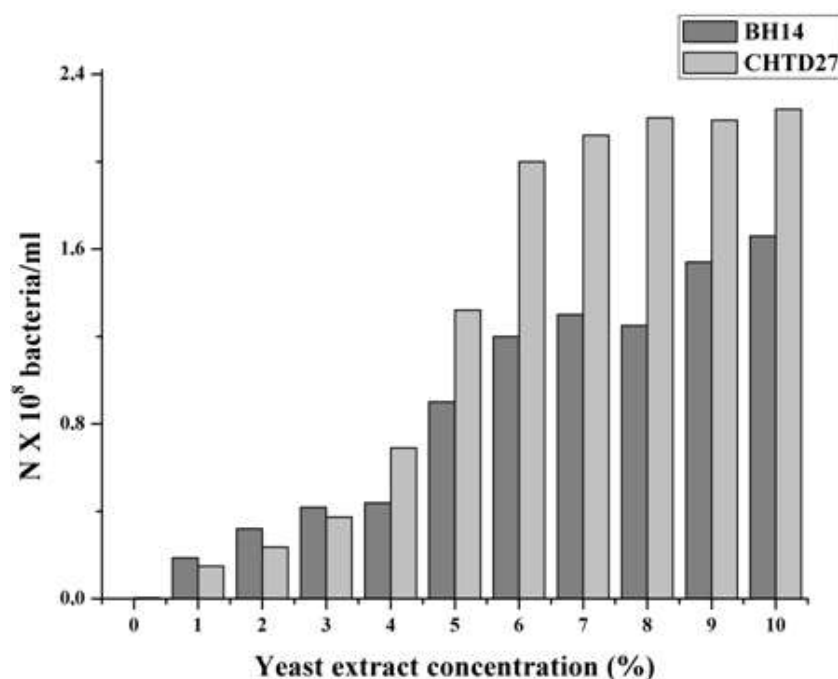


Figure 1. Growth of lactic acid bacteria BH14 and CHTD27 in WY medium.

WT growth medium (Whey + tomato juice)

Figure 2 shows the results obtained. The addition of tomato juice to increase concentrations stimulates bacterial biomass proportionally, except for the strain *L. plantarum* BH14 where we recorded maximum growth in the presence of 35% (v / v) tomato juice (WT7 medium). A decrease in biomass was observed with higher quantities of tomato juice (WT 8, WT 9 and WT 10 medium).

This could be explained by the reduction of activity of β -galactosidase because of the high concentration of acids found in tomato juice.

Also, Inagawa et al. (1987) showed that phytic acid found in the corn syrup at a concentration of 4.4% reduces the activity of β -galactosidase *in vivo*, and therefore assimilation of lactose by bacteria.

Small biomass differences between the two strains were observed for the same concentration of tomato juice. Our observations agree well with the work of Babu et al. (1992) which showed that the addition of tomato juice in the skimmed milk stimulates the growth of lactobacilli.

However, the amount of biomass produced in a medium enriched with the tomato juice is significantly lower than that obtained with YE, which is probably due to a source of nitrogen deficiency in the tomato juice.

To overcome these limitations, and in order to obtain good productivity of biomass, we performed bacterial growth assays in a whey-based medium containing the two supplements (yeast extract and tomato juice).

WT growth medium (Whey + tomato juice+ yeast extract)

From results obtained previously, we chose the medium WT6 containing 30% tomato juice, because beyond this concentration the medium becomes cloudy, which influences the spectrophotometric reading.

In addition, we limited ourselves to a maximum concentration of 1% YE, because there was a good biomass production at this concentration. Amrane (2000) worked on the production of lactic acid by *Lactobacillus helveticus* cultured in the supplemented whey by YE and concluded that the concentrations of yeast extract greater than 20 g/L become toxic to the microorganism. Similarly, Ghaly et al. (2003) reported that at high concentrations of yeast extract, the cell concentration decreases as a result of the high toxicity of yeast extract. Bouguettoucha et al. (2007), Kulozik and Wilde (1999), Amrane and Prigent (1997), who worked on a milk free thermophilic bacterium *L. helveticus* and Norton et al. (1994), Schepers et al. (2006) and Sirisansaneeyakul et al. (2007), who have worked respectively on thermophilic lactic bacteria immobilized *Lactobacillus lactis* IO1, *L. helveticus* found that 10 g/L yeast extract was the optimal concentration for these strains, so they can give good growth and production of lactic acid.

All previous results led us to retain WT6 medium at which we have added 1% yeast extract: the so-called BMK medium was chosen for remain study. Figure 3 shows the results obtained.

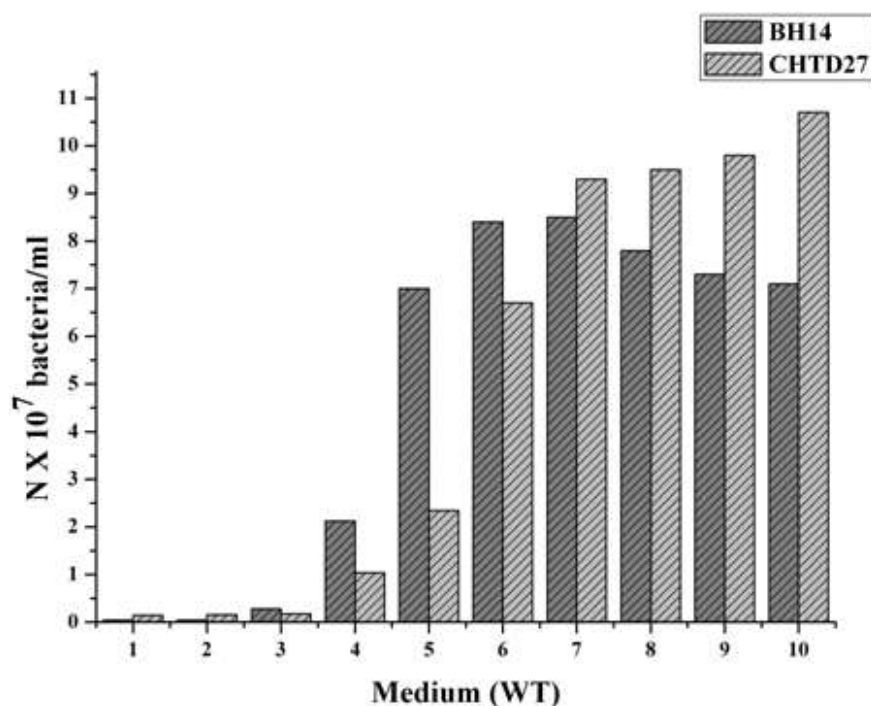


Figure 2. Growth of lactic acid bacteria BH14 and CHTD27 in supplemented WT medium. Whey was supplemented with increasing amounts of tomato juice: **1** - WT1 : 5%; **2** - WT2 : 10%; **3** - WT3 : 15%; **4** - WT4 : 20%; **5** - WT5 : 25%; **6** - WT6 : 30%; **7** - WT7 : 35%; **8** - WT8 : 40%; **9** - WT9 : 45%; **10** - WT10 : 50%.

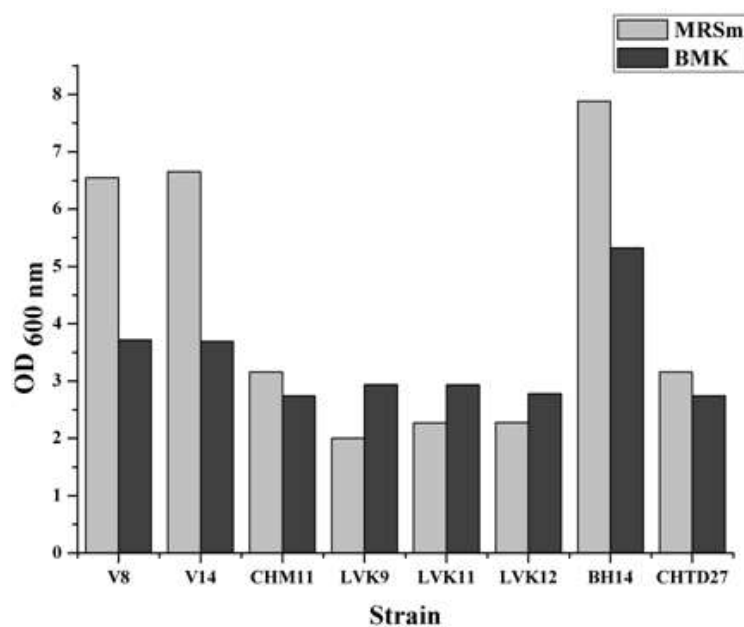


Figure 3. Growth of lactobacilli in BMK medium.

We noticed that all tested strains grew in BMK medium to the extent that we achieved important cell densities

indicating that it was favourable. The second observation was that growth was also a function of the strain. Indeed,

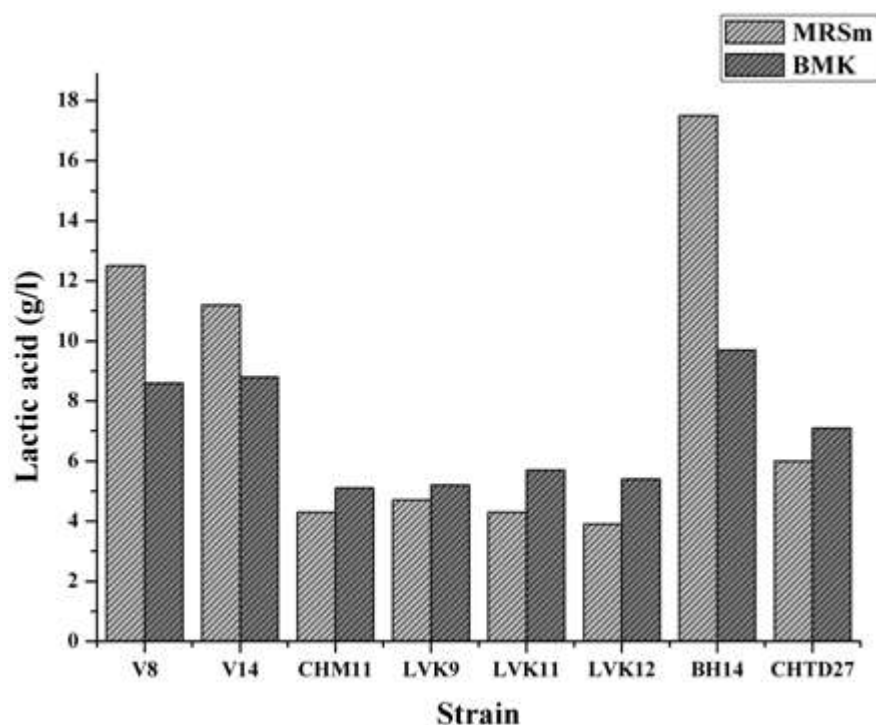


Figure 4. Lactic acid production of lactic acid strains in BMK medium.

we can distinguish three categories of strains according to their growth in that environment: those whose growth was much larger in the MRSm medium than BMK medium, those with almost identical growth in both media and those whose growth was higher in the BMK medium than MRSm medium.

All these observations indicate that BMK medium can be used to grow lactic acid bacteria and we wanted to examine whether the main technological characteristics of these bacteria were expressed in these trophic conditions.

Technological characteristics of lactobacilli grown in BMK medium

Production of lactic acid

On BMK medium, the strain CHTD27 gives an amount of lactic acid almost equivalent to that produced on MRSm medium (5 and 5.5 g/L respectively), but a very significant difference is observed for BH14 strain wherein the amount of lactic acid produced in MRSm is double that produced in BMK medium (Figure 4). Differences were also observed for the same medium depending on the strain.

These results are consistent with observations reported by several authors on the effect of yeast extract and

differences in acidifying power of strains. Amrane and Prigent (1999), Kulozik and Wilde (1999) and Sherpers et al. (2006) showed that for a full use of the lactose, it is essential to supplement whey with nitrogen sources. According to Zhang et al. (2007), the addition of yeast extract to deproteinized whey has greatly increased not only the rate of acidification by *Lactobacillus bulgaricus* 11842 but also the activity of β -galactosidase. This activation leads to degradation of lactose and a good uptake of glucose which results in a good growth.

Proteolytic activity of the lactic acid bacterial strains

Results obtained (Figures 5, 6 and 7) show unequivocally that proteolytic activity observed is manifested in the same way in the two culture media tested. The result, (h/c) [h: diameter of the clear halo (mm); c: diameter of the colony (mm)] is substantially identical in the two culture media.

Conclusion

Our culture tests on deproteinized whey showed that it is too poor to the needs of lactobacilli. Its optimization through the addition of yeast extract and/or tomato juice led to the development of an "inexpensive" media for the

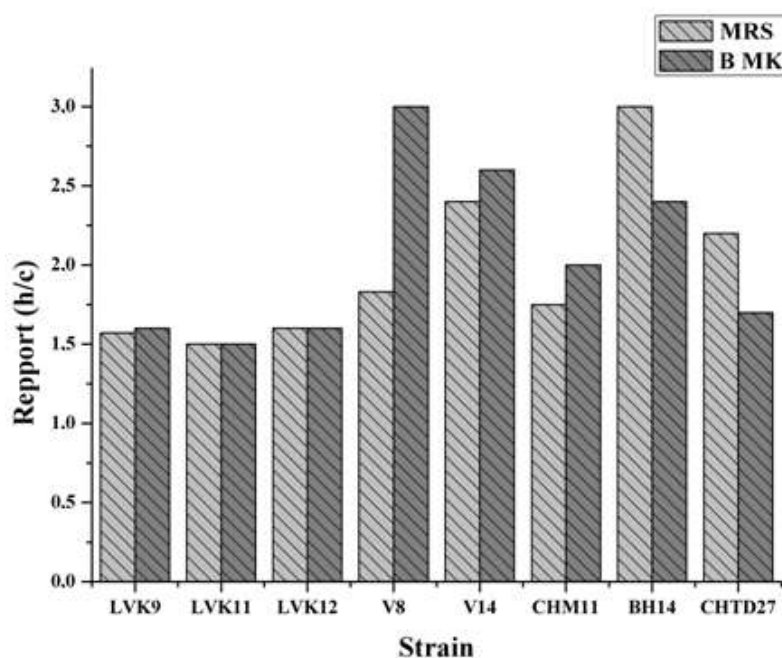


Figure 5. Proteolytic activity of lactobacilli in BMK and MRSm medium.

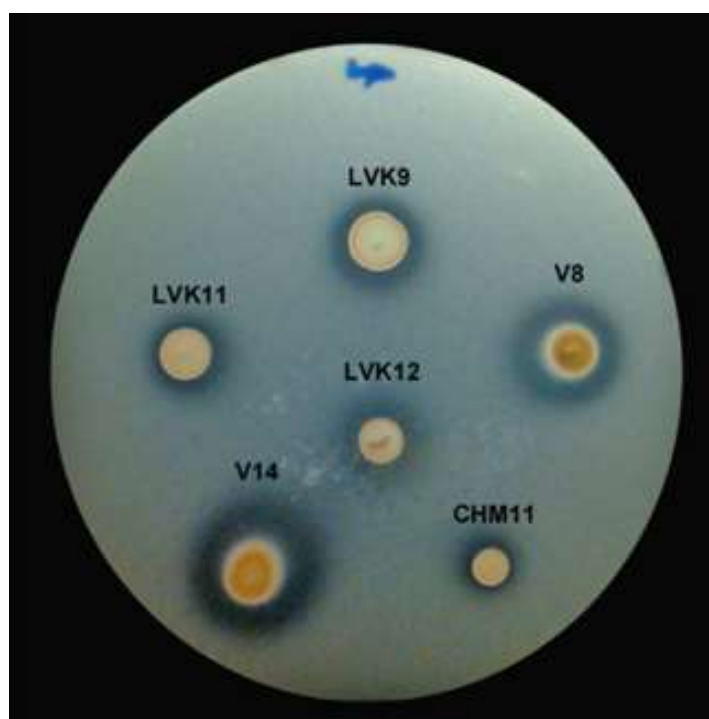


Figure 6. Proteolytic activity on MRSm solid medium- milk (1%).

growth of certain Lactobacilli in a similar way to that obtained in MRS medium. In addition, the results show that on BMK medium [whey supplemented with a mixture

of tomato juice and yeast extract (at concentrations of 30 and 1%, respectively)], the biomass obtained is comparable to that observed in MRS medium.

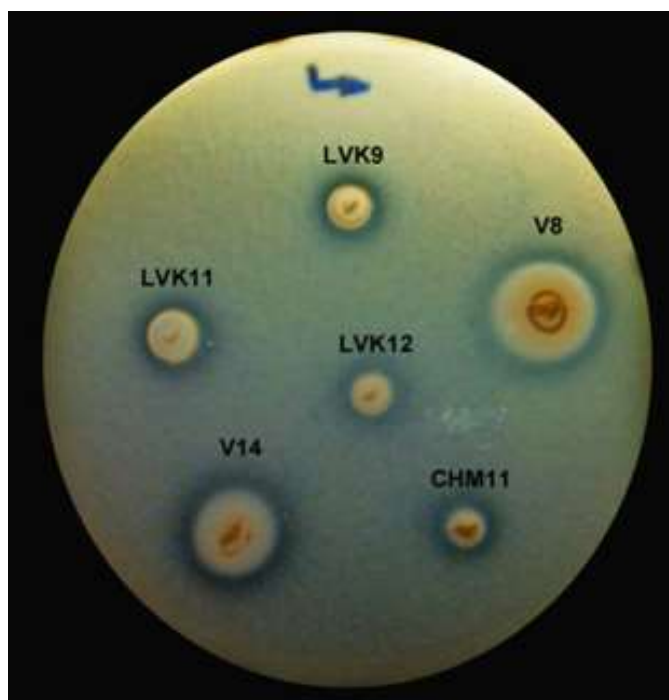


Figure 7. Proteolytic activity on BMK solid medium- milk (1%).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Aeschlimann A, von Stockar U (1990). The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:398-402.
- Altat M, Naveena BJ, Reddy G (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L (+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresour. Technol.* 98:498-503.
- Amrane A (2000). Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:223-228.
- Amrane A, Prigent Y (1993). Influence of media composition on lactic acid production rate from whey by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol. Lett.* 15:239-244.
- Amrane A, 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 (1999). Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. *Process Biochem.* 34:1-10.
- Arasaratnam V, Senthuran A, Balasubramaniam K (1996). Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme Microb. Technol.* 19:482-486.
- Babu V, Mital BK, Garg SK (1992). Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 17:67-70.
- Baralle SB, Borzani W (1988). Use of yeast autolysate to improve batch lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *Arq. Biol. Tecnol.* 31:273-274.
- Boudjema KA, Fazouane-Naimi F, Hellal A, Mechakra A (2009). Optimisation et modèle de production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactosérum. *Sci. Technol. C* 29:80-90.
- Bouguettoucha A, Balannec B, Nacef S, Amrane A (2007). A generalised unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microb. Technol.* 41:377-382.
- Champagne CP, Gaudreau H, Conway J, Chartier N, Fonchy E (1999). Evaluation of yeast extracts as growth media supplements for lactococci and lactobacilli by using automated spectrophotometry. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45:17-21.
- Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal based substrates. *J. Appl. Microbiol.* 92:851-859.
- Chiarini L, Mara L, Tabacchioni S (1992). Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:461-464.
- Cornelius C, Ericum T, Jacques P, Thonart P (1996). Comparison of fermentation industrial components such as corn steep and yeast extract for lactic acid bacteria production. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen (Rijksuniversiteit te Gent)*. 61:1461-1463.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960). A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 23:130-135.
- Desmazeaud M (1983). Nutrition of lactic acid bacteria: state of the art. *Le Lait* 63:267-316.
- Djehri-Hocine B, Boukhemis M, Zidoune N, Amrane A (2006). Horse bean extract for the supplementation of lactic acid bacteria culture media. *J. Food Technol.* 4:299-302.
- Djehri-Hocine B, Boukhemis M, Zidoune N, Amrane A (2007a). Growth of lactic acid bacteria on oilseed crop pea and chickpea based media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:765-769.
- Djehri-Hocine B, Boukhemis M, Zidoune N, Amrane A (2007b). Evaluation of de-lipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture. *Int. J. Dairy Technol.* 60:292-296.

- Gardner NJ, Savard T, Obermeier P, Caldwell G, Champagne CP (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.* 64:261-275.
- Gaudreau H, Champagne CP, Jelen P (2005). The use of crude cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk. *Enzyme Microb. Technol.* 36:83-90.
- Ghaly AE, Tango MSA, Dams MAA (2003). Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. *Agricultural Engineering international: the CIGR J. Sci. Res. Dev.* 5:364-369.
- Gibson T, Abdel-Malek Y (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14:35-44.
- Göksungur Y, Güvenç U (1997). Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69:399-404.
- Guha A, Banerjee S, Bera D (2013). Production of lactic acid from sweet meat industry waste by *Lactobacillus delbrueckii*. *Int. J. Res. Eng. Technol.* 2:630-634.
- Horáčková S, Sedláčková P, Sluková M, Plocková M (2014). Influence of Whey, Whey Component and Malt on the Growth and Acids Production of *Lactobacilli* in Milk. *Czech J. Food Sci.* 32:526-531.
- Inagawa J, Kiyosawa I, Nagasawa T (1987). Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with β -galactosidase. *Agr. Biol. Chem.* 51(11):3027-3032.
- John RP, Nampoothiri KM, Pandey A (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:524-534.
- Karam NE, Karam H (1994). Alimentation, génétique et santé de l'enfant, Eds J.F. Desjeux et M.Touhami, L'harmattan, Paris. pp. 257-264.
- Kulozik U, Wilde J (1999). Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microb. Technol.* 24:297-302.
- Kurbanoglu EB (2004). Enhancement of lactic acid production with ram horn peptone by *Lactobacillus casei*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:37-42.
- Marcela PB, Luciana FC, Daiane CS, Jonas C (2016). L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Braz. J. Microbiol.* 47:640-646.
- Mc Comas KA, Gilliland SE (2003). Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *J. Food Sci.* 68:2090-2095.
- Miller B, Puhon Z (1980). Möglligkeiten zur Verkürzung deer. Fermentation bei Acidophilus-Milch. *Schweig. Milchwissenschaft.* 9:49-56.
- Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J (2005). Join effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresour. Technol.* 96:63-67.
- Nancib N, Nancib A, Boudjelal A, Benslimane C, Blanchard F, Boudrant J (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresour. Technol.* 78:149-153.
- Norton S, Lacroix C, Vuilleumard JC (1994). Reduction of yeast extracts supplementation in lactic acid fermentation of whey permeate by immobilized cell technology. *J. Dairy Sci.* 77:2494-2508.
- Preeti C, Dimpi G, Raman K, Pooja A, Suman D (2016). Lactic Acid Production Vis-à-Vis Biowaste Management Using Lactic Acid Bacteria. *World Appl. Sci. J.* 34:1542-1552.
- Pritchard GG, Coolbear T (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:179-206.
- Reddy Tadi SR, EVR A, Limaye AM, Sivaprakasam S (2017). Enhanced production of optically pure d(-) lactic acid from nutritionally rich *Borassus flabellifer* sugar and whey protein hydrolysate based-fermentation medium. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64:279-289.
- Schepers AW, Thibault J, Lacroix C (2006). Continuous lactic acid productions in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two stage process: model and experiments. *Enzyme Microb. Technol.* 38:324-337.
- Sirisansaneeyakul S, Luangpipat T, Vanichsriratanana W, Srinophakun T, Chen HH, Chisti Y (2007). Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:381-391.
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Microbiol.* 29:807-813.
- Timbuntam W, Sriroth K, Tokiwa Y (2006). Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 28:811-814.
- Vahvaselkä MI, Linko P (1987). Lactic acid fermentation in milk ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. In: Neyssel OM, van der Meer RR, Huyben KCAM (eds) *Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology*, vol 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 317-320.
- Van den Berg DJC, Smits A, Pot B, Ledeboer AM, Kersters K, Verbakel JMA, Verrips CT (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnol.* 7:189-205.
- Vethakanraj HS, Sayanti S, Ashoke RT, Shaon RC (2013). Screening of bacteria for lactic acid production from whey water. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 9:118-123.
- Watanabe M, Kaburagi T, Seto Y, Morita F, Suzuki Y, Nakajima H (2004). Whey protein hydrolyzate for growth promotion of lactic acid bacteria. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, pp 11. Coden: JKXXAF JP 2004057047.
- Zhang ZY, Jin B, Kelly JM (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochem. Eng. J.* 35:251-263.

Résumé

Nous avons cherché à Valoriser un milieu de culture à base de lactosérum doux pour la culture des souches lactiques appartenant à trois genres (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*). Le lactosérum a un pH neutre, il s'est révélé pauvre en matière grasse et riche en lactose. L'étude de la croissance bactérienne et de certaines caractéristiques d'intérêts technologiques : activité protéolytique, production d'acide lactique et de diacétyl sur le milieu valorisé à base du lactosérum déprotéinisé et additionné d'un mélange de sérum de tomate et d'extrait de levure (milieu BMK). Les résultats obtenus sont tout à fait comparables et parfois meilleurs que ceux obtenus avec les milieux témoins. L'analyse ACP a permis de montrer que certaines souches, forment un groupe distinct, qui s'avèrent présenter les propriétés technologiques les plus intéressantes dans le milieu BMK, en fermenteur en mode discontinu et dans des conditions de pH non contrôlé. L'étude de la modélisation de cette fermentation lactique a révélé que le modèle Verlhust décrit correctement la cinétique de croissance. La cinétique de la production d'acide lactique est décrite par une modification du modèle Luedeking-Piret, qui révèle que la croissance de la bactérie et la production d'acide lactique seront inhibées par l'acide lactique indissocié [HL].

Mots clés:

Bactéries lactiques; Lactosérum doux; Extrait de levure; Sérum de tomate; Milieu BMK; Croissance bactérienne; Acidification; Activité protéolytique; Fermentation; Modélisation.