



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie
et des Industries Alimentaires

**CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Laboratoire des Sciences
du Génie Chimique

THESE

Présentée à l'I.N.P.L. par

Anissa MAKHLOUF

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR

de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **Biotechnologie et Industries Alimentaires**

**Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un
procédé discontinu alimenté : Application à la production
bactérienne d'arômes laitiers**

Soutenue publiquement le 30 octobre 2006 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :	M. Jean-François CAVIN	Professeur	E.N.S.B.A.N.A. (Dijon)
	Mme. Catherine AZZARO PANTEL	Professeur	E.N.S.I.A.C.E.T. (Toulouse)
Examineurs :	M. Vincent Boly	Professeur	E.N.S.G.S.I. (Nancy)
	M. Ivan MARC	Directeur de recherche (directeur de thèse)	C.N.R.S – L.S.G.C. (Nancy)
	M. Frantz FOURNIER	Maître de conférences (co-directeur de thèse)	E.N.S.A.I.A. (Nancy)
	M. Emmanuel RONDAGS	Maître de conférences	E.N.S.A.I.A. (Nancy)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I.1. MÉTABOLISME DES BACTÉRIES LACTIQUES.....	4
Introduction.....	4
I.1.1. Les bactéries lactiques : caractéristiques et taxonomie.....	4
I.1.1.1. Taxonomie et classification des bactéries lactiques.....	4
I.1.1.2. Taxonomie et caractéristiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	5
I.1.2. Métabolisme carboné chez <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>.....	6
I.1.2.1. Métabolisme du lactose.....	6
I.1.2.2. Métabolisme de l'acide citrique.....	10
I.1.2.3. Métabolisme de l'acide pyruvique.....	12
I.1.3. Métabolisme de l'oxygène chez <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>.....	20
I.1.3.1. Effet positif du métabolisme de l'oxygène.....	21
I.1.3.2. Effet négatif du métabolisme de l'oxygène.....	21
I.1.4. Amélioration de la production de diacétyle.....	21
I.1.4.1. Amélioration de la production de diacétyle <i>via</i> des souches surproductrices.....	21
I.1.4.2. Mise en œuvre de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	24
I.2. MODELISATION.....	31
Introduction.....	31
I.2.1. Généralités.....	31
I.2.1.1. Notion de système.....	31
I.2.1.2. Notion de modèle.....	32
I.2.2. Modélisation des procédés biologiques.....	33
I.2.2.1. Modèles simples inspirés du génie chimique.....	33
I.2.2.2. Modèles basés sur les phénomènes intracellulaires.....	35
I.2.2.3. Modèles métaboliques inspirés du génome.....	36
I.2.2.4. Modèles métaboliques dynamiques.....	36

I.2.3.	Modèles cinétiques de l'activité de <i>Lactococcus lactis</i>	37
I.3.	OPTIMISATION	39
I.3.1.	Optimisation	39
I.3.1.1.	Définition	39
I.3.1.2.	Méthodes d'optimisation.....	40
I.3.2.	Optimisation multicritère (multiobjectif)	44
I.3.2.1.	Introduction.....	44
I.3.2.2.	Définitions.....	45
I.3.2.3.	Procédure de groupement multicritères simples	45
I.3.2.4.	Approximation du domaine de Pareto par les algorithmes évolutionnaires	46
II.	MATERIEL ET METHODES UTILISEES	49
	INTRODUCTION	49
II.1.	MATERIEL	49
II.1.1.	Souche	49
II.1.2.	Réactifs	49
II.1.2.1.	Réactifs pour milieux de culture	49
II.1.2.2.	Réactifs pour analyses	49
II.1.2.3.	Effluents gazeux	50
II.1.3.	Matériel d'analyse	50
II.1.3.1.	Chromatographie liquide haute performance.....	50
II.1.3.2.	Chromatographie en phase gazeuse	50
II.1.4.	Matériel de préparation de culture	51
II.1.4.1.	Fermenteurs de 3 L	51
II.1.4.2.	Fermenteur de 20 L.....	51
II.1.5.	Matériel divers	52
II.2.	MISE EN ŒUVRE DE LA FERMENTATION	52
II.2.1.	Préparation de la culture	52
II.2.1.1.	Préparation du milieu semi-synthétique Y.....	52

II.2.1.2. Conservation de la souche	53
II.2.1.3. Préparation des précultures	53
II.2.1.4. Préparation du fermenteur et conduite des cultures	54
II.2.2. Techniques analytiques.....	55
II.2.2.1. Mesure de la biomasse	56
II.2.2.2. Mesure des concentrations en lactose, acides organiques, acétoïne et 2,3-butanediol.....	57
II.2.2.3. Mesure des concentrations en diacétyle, acétaldéhyde et éthanol	60
II.2.3. Interprétation des résultats	62
II.2.3.1. Calcul des vitesses et des rendements	63
 II.3. OUTILS D'OPTIMISATION.....	 64
II.3.1. L'algorithme génétique.....	64
II.3.1.1. Principe général	65
II.3.1.2. Différents types d'algorithmes évolutionnaires	65
II.3.1.3. Réglages de l'algorithme	67
II.3.2. Problèmes multicritères.....	68
II.3.2.1. Notion de domination au sens de Pareto.....	68
II.3.2.2. Front de Pareto.....	68
II.3.2.3. Zone de Pareto	69
 III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	 71
 III.1. APPLICATION DE LA STRATEGIE EXPERIMENTALE A LA COLLECTE DE DONNEES	 71
 III.2. EFFETS DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR LA CROISSANCE ET L'ORIENTATION DU METABOLISME DE LACTOCOCCUS LACTIS AU COURS DE CULTURES DISCONTINUES.....	 89
 III.3. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE CINETIQUE DE LA CONSOMMATION DE SUBSTRATS, DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE.....	 115
 III.4. OPTIMISATION DU SYSTEME ETUDIE	 141
III.4.1. Introduction.....	141

III.4.2. La paramétrisation	143
III.4.2.1. Elimination des mauvais individus.....	145
III.4.2.2. Classement des temps de bascule avant chaque intégration	146
III.4.2.3. Modification de l'algorithme.....	146
III.4.2.4. Codage de temps de bascule en intervalle	146
III.4.3. Description du problème étudié.....	147
III.4.4. Simulation de la croissance dans les conditions nominales	148
III.4.5. Optimisation monocritère	151
III.4.5.1. Optimisation statique monocritère.....	152
III.4.5.2. Optimisation dynamique monocritère	155
III.4.5.2.1. Optimisation dynamique monocritère à t_b prédéfinis	155
III.4.5.2.2. Optimisation dynamique monocritère à t_b libre	161
III.4.5.2.3. Optimisation dynamique monocritère à t_b prédéfinis et t_f libre	162
III.4.6. Optimisation dynamique multicritère.....	163
III.4.6.1. Validation de l'outil d'optimisation dynamique multicritère sur un problème académique.....	163
III.4.6.2. Optimisation dynamique multicritère de la croissance et de la vitesse moyenne de consommation de citrate.....	166
<i>CONCLUSION GENERALE.....</i>	<i>172</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>177</i>

Liste des abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
AGE	Algorithme génético-évolonnaire
ALS	Acétolactate synthétase
ATP	Adénosine triphosphate
c	Critères modélisés par les modèles polynomiaux du second degré
C4	Composés en quatre carbones (diacétyle et ses précurseurs)
CLHP/HPLC	Chromatographe liquide haute performance
CPG	Chromatographe en phase gazeuse
DCE	Détecteur à capture d'électrons
Dia	Concentration en diacétyle (mg/L)
DIF	Détecteur à ionisation de flamme
EMP	Emden-Meyerhoff-Parnas
FDP	Fructose-1,6-diphosphate
Kd1	Vitesse spécifique de décès cellulaire (h^{-1}), en présence de $S1 > 2$ g/L
Kd2	Vitesse spécifique de décès cellulaire (h^{-1}), en présence de $S1 \leq 2$ g/L
Ks1	Constante d'affinité pour le lactose (g/L)
Ks12	Constante d'affinité pour le lactose qui dépend du citrate (g/L)
Ks2	Constante d'affinité pour le citrate (g/L)
LDH	Lactate déshydrogénase
NAD⁺/NADH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide oxydé/réduit
TOD/OSL	Niveau d'oxygène dissous (%)
ODM	Optimisation dynamique multicritère
P	Concentration en lactate (g/L)
PCM	Paramétrisation constante par morceaux
PDC	Pyruvate décarboxylase
PDH	Complexe pyruvate déshydrogénase
PE/ED	Plan d'expérience
PEM/MED	Plan d'expériences multicritère
PEP	Phosphoénolpyruvate
PFL	Pyruvate formate lyase

PGADH	3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase
PLM	Paramétrisation linéaire par morceaux
PP	Paramétrisation polynomiale
PTS	Phosphotransférases
$q_{\max P}$	Vitesse spécifique maximale de production de lactate (g/g h)
$q_{\max S1}$	Vitesse spécifique maximale de consommation du lactose (g/g h)
$q_{\max S2}$	Vitesse spécifique maximale de consommation du citrate (g/g h)
q_{S1}	Vitesse spécifique de consommation du lactose (g/g h)
q_{S2}	Vitesse spécifique de consommation du citrate, (g/g h)
R^2	Coefficient de corrélation
S1	Concentration en lactose (g/L)
S2	Concentration en citrate (g/L)
T	Température (°C)
t	Temps (h)
TDP	Tagatose-1,6-diphosphate
t_{Fed}, t_i	Instants correspondants aux alimentations en substrats (h)
X	Concentration en biomasse (g/L)
x	Valeurs de pH normalisées entre [-1,1]
y	Valeurs de températures normalisées entre [-1,1]
$Y_{P/S1}$	Rendement du lactate produit par rapport au lactose consommé (g/g)
$Y_{X/S1}$	Rendement de la biomasse produite par rapport au lactose consommé (g/g)
z	Valeurs des niveaux d'oxygène dissous normalisées entre [-1,1]
β_i	Coefficients du modèle polynomial du second degré
μ_{\max}	Vitesse spécifique maximale de croissance (h^{-1})
τ	Constante de retard en mode discontinu alimenté (h)

Introduction Générale

Les bactéries lactiques sont utilisées dans l'élaboration de produits carnés, végétaux et de nombreux produits laitiers dont les laits fermentés, les fromages, les yaourts et le beurre. Ces microorganismes contribuent à améliorer, la conservation, la texture, la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés d'arômes. Ces bactéries inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs telles les bactériocines et en abaissant le pH par la production d'un produit majeur l'acide lactique (Gilliland, 1985). Parmi, les molécules aromatisantes produites par ces bactéries, on peut citer le diacétyl, qui est responsable du goût typique de noisette dans le beurre, dans les crèmes et certains laits fermentés. De ce fait, sa synthèse et son accumulation par voie microbiologique ont fait l'objet de nombreuses études afin de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes de régulation mis en jeu. Aussi bien, à l'échelle de la cellule, avec l'étude du protéome et du métabolome, qu'au niveau du procédé avec la conception de modes de mise en œuvre adaptés. Afin d'augmenter la production de diacétyl, deux axes de recherche ont été explorés :

- le génie métabolique
- et le génie des procédés.

Ainsi, depuis la dernière décennie de nombreuses équipes se sont intéressées à la sélection et à la production de souches surproductrices de diacétyl *via* la voie du génie génétique. Pour plusieurs souches, la totalité de la carte génétique a été identifiée et les résultats obtenus conduisent souvent à l'amélioration des performances. Néanmoins, des limitations subsistent, d'ordre réglementaire pour les mutagenèses non aléatoires ou économique ou encore liées à la mauvaise image des microorganismes génétiquement modifiés dans l'esprit des consommateurs. En conséquence, la deuxième alternative consiste à identifier les meilleures conditions opératoires physico-chimiques favorables à la production de composés d'arômes et de les maîtriser tout au long du procédé et à choisir un mode de conduite adéquat. C'est la voie que nous avons choisie d'exploiter au cours de cette étude.

Cependant, la mise en œuvre optimale de ce type de procédé demeure assez complexe. La multitude des variables opératoires (température, pH, niveau d'oxygène dissous : (TOD), concentration des substrats...), qui régissent le comportement métabolique et l'état physiologique des systèmes biologiques utilisés, rend difficile la maîtrise des bioprocédés. C'est pourquoi ces procédés fonctionnent souvent en mode discontinu et en conditions statiques. Néanmoins ce mode de mise en œuvre et ces conditions ne sont pas optimaux, dans le cas où plusieurs formes de l'état physiologique existent et sont en compétition. Ainsi, une solution consiste à déterminer et appliquer des profils temporels des variables de commande au lieu de valeurs statiques par ajout de matière et/ou modification des paramètres opératoires.

Toutefois, pour être effectivement optimale, cette évolution doit tenir compte des différents critères de performance qualifiés et choisis (productivité, rendements de conversion, concentrations,...) et de contraintes (normes de qualité...). Subséquemment, le défi consiste à développer une méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère du procédé qui permet de déterminer les profils temporels des variables de commande qui représentent les meilleurs compromis par rapport aux performances considérées.

La méthodologie suivie pour résoudre ce type de problème consiste à associer les outils d'optimisation dynamique et d'optimisation multicritère. La mise au point de ces outils nécessite un modèle le plus simple possible, fiable et précis du procédé qui justifie l'utilisation d'outils de planification expérimentale adaptés aux contraintes du problème. Cette méthodologie est développée dans le cadre d'un procédé de production d'arômes laitiers conduit en mode discontinu alimenté. Cette application fait intervenir une bactérie lactique *Lactococcus lactis* ; elle fait apparaître deux comportements physiologiques antagonistes: la croissance et la production d'arômes.

Objectifs des travaux

- Dans un premier temps et dans le but de trouver un modèle le plus pragmatique possible, la stratégie expérimentale qui minimise le nombre d'expériences tout en conservant la qualité et la précision des résultats semble une bonne alternative. Dans ce sens, la démarche proposée consiste à identifier un plan d'expériences compromis de deux critères "techniques", la D-optimalité et le conditionnement. La procédure déployée doit permettre de définir des plans intégrant l'ensemble des contraintes imposées par le procédé de fermentation. Ce plan d'expériences servira à explorer un domaine expérimental le plus large possible. Puis, le plan d'expériences multicritère se devra d'être complété afin d'obtenir le maximum d'informations sur le métabolisme des bactéries concernant les deux phases antagonistes, la croissance et la production de métabolites d'intérêt.

- Dans un second temps une analyse pertinente du comportement métabolique de la souche bactérienne étudiée devra être réalisée. Cette analyse a pour but de déceler les effets combinés des facteurs opératoires (pH, température, et TOD) sur le métabolisme de la bactérie et ce, en mode discontinu et discontinu alimenté.

- Dans un troisième temps, un modèle tenant compte de l'effet combiné des paramètres opératoires sur la croissance, la consommation de substrats et la production d'acide lactique pourra être développé. Ce modèle, se doit d'être le plus représentatif du comportement bactérien et le plus simple possible puisqu'il doit servir de base à l'optimisation dynamique multicritère.

- L'objectif final consistera à développer un outil d'optimisation dynamique multicritère, afin de pouvoir optimiser le procédé de fermentation lactique. Son étude théorique, basée sur l'utilisation du modèle précédemment obtenu, concernera des alimentations en substrats et la détermination de profils des facteurs opératoires. Dans cette première approche, les types de profils étudiés feront intervenir des parties invariantes, des parties linéaires continues et discontinues mais aussi des phases polynomiales.

Plan du manuscrit

La première partie a trait à une étude bibliographique exhaustive, divisée en trois parties. Elle contribue à une meilleure connaissance, aussi bien de l'aspect physiologique des bactéries lactiques et de leur mode de conduite qu'au niveau méthodologique (modélisation et techniques d'optimisation dynamique multicritère).

La deuxième partie présente, d'une part, l'ensemble du matériel et des méthodes appliqués au suivi des fermentations lactiques en mode discontinu et discontinu alimenté et, d'autre part, les outils nécessaires à l'optimisation dynamique multicritère.

La troisième et dernière partie aborde, tout d'abord, la collecte des informations macroscopiques nécessaires à la qualification et à la quantification du comportement métabolique de *Lactococcus lactis* dans un domaine expérimental le plus étendu possible. Cette partie se subdivise en quatre sous parties :

1/ la définition d'une nouvelle méthode de planification expérimentale multicritère dérivée des travaux de Muniglia (2001). Cette stratégie tend à réduire, de manière très significative, le nombre d'expériences servant à explorer des domaines de variation étendus, des trois facteurs opératoires étudiés (pH, température et TOD) et à estimer la valeur de certains paramètres cinétiques de la fermentation lactique étudiée.

2/ l'analyse des données expérimentales afin d'étudier l'influence combinée des trois facteurs opératoires sur la croissance et la production de métabolites, notamment d'arômes.

3/ la construction d'un modèle représentatif de la croissance, de la consommation de lactose et de citrate et de la production d'acide lactique en réacteurs discontinus et discontinus alimentés, et prenant en compte l'influence croisée de trois paramètres opératoires (température, pH, niveau d'oxygénation) qui servira de base à l'optimisation dynamique multicritère du procédé.

4/ la construction d'un outil d'optimisation dynamique multicritère, en appliquant une démarche d'optimisation progressive ; tout d'abord, l'étude portera sur l'optimisation monocritère, puis la méthodologie sera étendue à une optimisation multicritère avec plusieurs variables de commande.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Métabolisme des bactéries lactiques

Introduction

Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisés en industrie alimentaire, dans une grande variété de fermentations. En effet, ces bactéries participent à la transformation de produits animaux tels le lait et certains produits carnés ainsi qu'à l'élaboration de produits végétaux. Elles sont aussi connues pour leur rôle probiotique (Braegger, 2002).

L'application majeure de ces bactéries, concerne l'industrie laitière où leur principale fonction consiste à produire de l'acide lactique à partir des sources de carbone disponibles. L'acidification du milieu qui résulte de l'accumulation du lactate, est à l'origine de la concentration et de la conservation de la matière sèche du lait et de la production de bactériocines (Wardani *et al.*, 2006). Ceci confère aux bactéries lactiques leur rôle coagulant et antimicrobien. Ces bactéries peuvent donner d'autres caractéristiques aux produits telles, la flaveur et la texture (Schmidt *et al.*, 1994 ; Kleerebezem et Hugenholtz, 2003; De Vos et Hugenholtz, 2004). Au niveau des propriétés organoleptiques, le diacétyle est responsable de l'arôme de noisette caractéristique du beurre, des laits fermentés, des crèmes aigres et de certains fromages frais (Marshall et Law, 1984). La formation de cette molécule aromatisante est associée à la capacité des souches à fermenter le citrate, composé présent dans le lait (Hugenholtz, 1993). La production de diacétyle est caractéristique de souches bactériennes mésophiles très répandues dans l'industrie laitière tels *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.

I.1.1. Les bactéries lactiques : caractéristiques et taxonomie

I.1.1.1. Taxonomie et classification des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques est un groupe hétérogène qui regroupe des bactéries qui produisent essentiellement de l'acide lactique. Les différences des bactéries regroupées sous cette appellation ont entraîné un classement utile à leur étude en technologie laitière. Les bactéries lactiques sont des microorganismes hétérotrophes à Gram positif, anaérobies avec un comportement microaérophile et ont un métabolisme fermentaire saccharolytique (Tailliez, 2001).

En 1924, Orla-Jensen les séparent en deux groupes : homofermentaire, qui réunit les

bactéries formant très peu de métabolites autres que l'acide lactique, celui-ci représentant 90 à 97 % du lactose métabolisé ; et hétérofermentaire, qui réunit les bactéries formant du lactate, en proportion moindre, ainsi que des concentrations non négligeables de produits secondaires et du CO₂. Ces deux familles sont ensuite subdivisées en sous-familles selon des critères morphologiques et physiologiques (Dellaglio *et al.*, 1994).

Grâce aux progrès en biochimie, en biologie moléculaire, en immunologie, en cytologie, en enzymologie, en génétique (Gasser *et al.*, 1994 ; Tailliez, 2001) et à l'aide des moyens plus récents d'analyse telle la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Amiel *et al.*, 2001), un grand nombre de caractères a pu être mis en évidence, afin de servir de base aux études taxonomiques qui ont suivi. Actuellement, le séquençage des acides nucléiques, de l'ARN ribosomal, est le critère de référence pour établir le classement des souches (Van Hylckama Vlieg *et al.*, 2006). Cet éventail de critères de classification, est représentatif de la diversité des bactéries lactiques. Dès 1974, selon le Bergey's manual (Holt *et al.*, 1994), les bactéries lactiques se retrouvent dissociées en deux familles : celle des *Streptococcacea* et celle des *Lactobacillacea*. En 1985, Schleifer *et al.* ont proposé la division des streptocoques en 4 genres génétiquement distincts : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* et *Lactococcus*, ces deux derniers regroupant les streptocoques lactiques (Dellaglio *et al.*, 1994).

I.1.1.2. Taxonomie et caractéristiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. diacetylactis appartient au règne des bactéries, le genre *Lactococcus*, établi en 1985 par Schleifer *et al.*, regroupant les streptocoques mésophiles et certains lactobacilles. Néanmoins, selon le Bergey's manual (Holt *et al.*, 1994), cette souche appartient à la catégorie II de la classification bactérienne générale qui regroupe les eubactéries Gram positives à paroi cellulaire, faisant partie de la subdivision II (coques microaérophiles et anaérobies facultatives présentes en paires, tétrades, chaînettes ou agrégats) du groupe 17 (coques Gram positives). Ces bactéries, ont la forme de coques et s'associent entre elles en chaînes de longueur variable. Elles se distinguent par leur température de croissance minimale inférieure ou égale à 10 °C et optimale voisine de 30 °C. Leur métabolisme est généralement homofermentaire avec, principalement, la production de la forme L(+) de l'acide lactique. Une caractéristique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis, est sa capacité à co-métaboliser le lactose et le citrate présents dans le lait.

I.1.2. Métabolisme carboné chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Les composés fermentescibles majeurs du lait, métabolisables par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sont le lactose et l'acide citrique. Durant le métabolisme de ces deux substrats carbonés, il se forme un intermédiaire commun essentiel, le pyruvate, qui peut-être dégradé par plusieurs voies métaboliques.

I.1.2.1. Métabolisme du lactose

Le lactose est un disaccharide. Il représente un constituant majeur du lait après l'eau, présent à une concentration de 4 à 5 %. Il constitue une source importante de carbone et d'énergie pour les cellules et est à l'origine de la production de grandes concentrations de lactate (Cogan, 1980).

I.1.2.1.1. Transport spécifique du lactose

Chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, le transport du lactose à l'intérieur de la bactérie, à travers la membrane cytoplasmique, s'effectue par transport actif. Deux systèmes distincts, sont identifiés pour la pénétration du lactose dans la cellule :

- le système phosphotransférase (PTS), impliqué aussi dans la phosphorylation du lactose, aux dépens de la consommation d'une molécule de phosphoénolpyruvate (De Vos *et al.*, 1990 ; Postma *et al.*, 1993). Le lactose entre ainsi dans la cellule sous sa forme de lactose-6-phosphate (De Vos et Vaughan, 1994) grâce aux enzymes EI et EIIlac, à un facteur soluble EIIlac spécifique du lactose et à une protéine stable HPr. EI et HPr étant des protéines constitutives alors que EIIlac et EIIlac sont induites par la présence de lactose (Cogan, 1980),
- et le système perméase ATP – dépendante, qui représente une voie de transport secondaire. Le fonctionnement de ce système dépend de la force proton-motrice, basée sur un symport lactose-H⁺, qui permet au lactose de pénétrer dans la cellule en même temps qu'un proton, sans subir de phosphorylation (Mac Kay *et al.*, 1969 ; Thompson, 1979).

Ainsi, selon son mode de transport, le lactose sera disponible pour le catabolisme sous forme phosphorylée ou non.

I.1.2.1.2. Catabolisme du lactose

Différentes voies cataboliques

Les voies du catabolisme du lactose dépendent de la forme sous laquelle il se trouve dans la cellule : phosphorylée ou non. Ces voies sont présentées dans la Figure I.1.

Ainsi, le lactose-6-P est hydrolysé en glucose et en galactose-6-P par la phospho- β -galactosidase (Konings *et al.*, 1994) alors que le lactose est hydrolysé en glucose et en galactose par une autre β -galactosidase dont l'activité est plus faible (Desmazeaud et De Roissart, 1994). Les produits formés à travers l'action de ces deux enzymes sont dégradés via différentes voies. Ainsi, le glucose est dégradé dans la voie glycolytique d'Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Thompson et Gentry-Weeks, 1994), le galactose-6-phosphate emprunte la voie du D-tagatose-6-phosphate qui rejoint la voie d'EMP au niveau du glycéraldéhyde-3-phosphate, à la suite de l'action de trois enzymes (Figure I.1) et le galactose est métabolisé suivant la voie de Leloir (Crow et Thomas, 1984 ; Grossiord *et al.*, 1998 ; Grossiord *et al.*, 2003) avant de rejoindre la voie d'EMP au niveau du glucose-6-P. Le produit final principal de la fermentation du lactose est l'acide lactique.

Régulation du catabolisme

Deux catégories de mécanismes contrôlent la régulation du métabolisme du lactose chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* : la répression ou l'induction de la synthèse d'enzymes (cas des enzymes EII^{lac} et EIII^{lac}, citées précédemment, induites par le lactose) et l'activation ou l'inhibition des enzymes synthétisées.

La régulation de l'activité des enzymes du système PT/glycolyse, assurant le transport et l'utilisation du lactose, se fait essentiellement via quatre protéines :

- la protéine transporteuse de phosphate Hpr, qui perd sa capacité à transporter les groupements phosphates provenant du phosphoénolpyruvate (PEP), en présence d'excès glucidique, suite à une phosphorylation au niveau de la fonction hydroxyle du résidu Ser-46, via l'enzyme bifonctionnelle HPr kinase/phosphorylase (Monedero *et al.*, 2001 ; Poncet *et al.*, 2004). Cette HPr permet de contrôler le flux de carbone entrant dans la cellule (Ye et Saier, 1996) ;

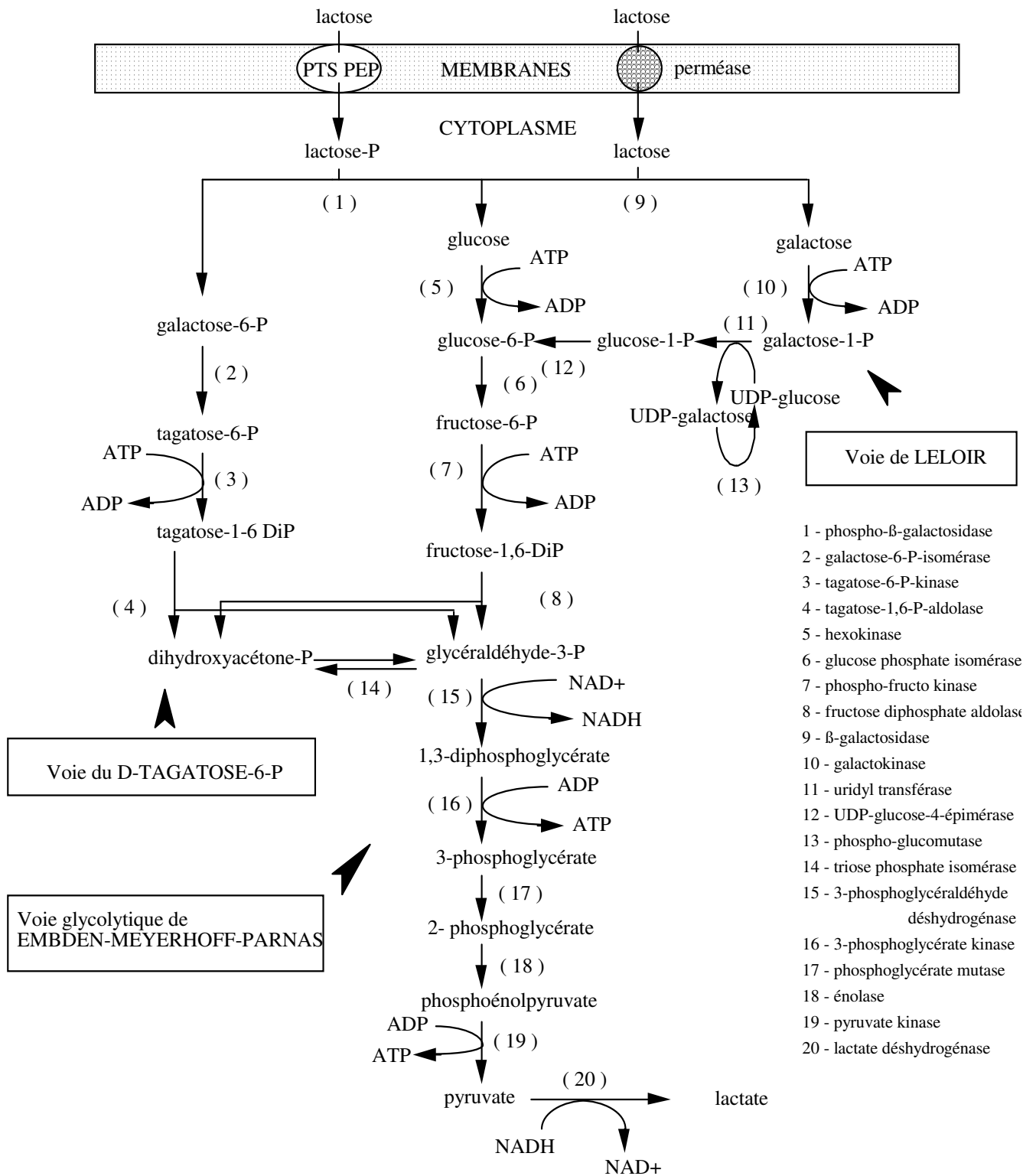


Figure I.1. Transport et catabolisme du lactose chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (d'après Stien, 1993).

- l’HPr kinase, qui est activée par le fructose-1,6-diphosphate (FDP), intermédiaire de la glycolyse, et est inhibée par le phosphate inorganique (Pi) (Thomas, 1976 ; Poncet *et al.*, 2004) ; elle régule ainsi l’entrée du lactose dans la cellule en fonction du flux glycolytique (Ye et Saier, 1996) ;
- la pyruvate kinase, qui subit le même type de régulation que l’HPr kinase, afin de maintenir la concentration intracellulaire de phosphoénolpyruvate (PEP) à un certain taux (Stien, 1993) ;
- la lactate déshydrogénase (LDH), qui est activée soit par le FDP, soit par le tagatose-1,6-diphosphate (TDP) (Crow et Pritchard, 1977 ; Marshall et law, 1984) et est inactivée par le Pi (Jonas *et al.*, 1972). Ainsi, l’activité de la LDH se trouve adaptée au flux glycolytique, de manière à maintenir l’équilibre redox et à éviter l’accumulation de pyruvate et à le réorienter vers d’autres voies métaboliques (Thomas, 1976). La régulation de la voie de la LDH sera détaillée au paragraphe II.3.2.1.

L’orientation du flux, a été aussi expliquée par un autre mécanisme de régulation, qui est basé sur le rapport NADH/NAD⁺ chez différentes souches de *Lactococcus lactis* (Garrigues *et al.*, 1997 ; Lopez de Felipe *et al.*, 1997 ; Neves *et al.*, 2002). La part de contribution de chacun des mécanismes cités dans la régulation du métabolisme du lactose n’est pas identifiée.

D’autres facteurs peuvent conditionner la répartition du flux carboné, à savoir le pH et le taux de dilution. En effet, pour la souche *Lactococcus lactis* NZ9800, qui surexprime la NADH-oxydase, l’augmentation du taux de dilution est défavorable à la production de lactate (Lopez de Felipe et Hugenholtz, 1999). Ces résultats sont à vérifier pour les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis.

I.1.2.1.3. Génétique

Les gènes codant pour la perméation spécifique du lactose par le système PT et l’utilisation du lactose-6-P sont localisés au niveau d’un plasmide. Il en résulte une instabilité génétique qui est à l’origine des irrégularités d’acidification parfois observées avec ce type de souche (Smith *et al.*, 1992).

I.1.2.2. Métabolisme de l'acide citrique

L'acide citrique constitue la seconde source carbonée du lait, présent à une concentration comprise entre 1,2 et 2,2 g/L (Desmazeaud, 1994). Son implication dans la croissance bactérienne reste l'objet de désaccords. Certains auteurs déclarent que le citrate ne participe pas à la croissance chez les Lactocoques (Collins, 1972 ; Cogan, 1981) et d'autres, au contraire, affirment que le citrate stimule la croissance de ces bactéries, en présence d'un sucre fermentescible, ou qu'il contribue seul à la croissance des cellules, quand il constitue l'unique source d'énergie (Cogan, 1987 ; Schmitt et Diviès, 1991 ; Starrenburg et Hugenholtz, 1991 ; Hugenholtz *et al.*, 1993 ; Stien, 1993 ; Boumerdassi *et al.*, 1996).

Bien que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, soit considérée comme une bactérie homolactique, le co-métabolisme du lactose et du citrate, qui permet d'apporter à la cellule un flux supplémentaire de pyruvate en même temps que d'assurer des fonctions essentielles telles que la régénération de coenzymes d'oxydo-réduction ou la production d'énergie, conduit à la production d'autres molécules que l'acide lactique. En effet, Le citrate est considéré comme le principal précurseur des composés aromatisants, tel le diacétyl qui confère le goût typique "noisette" du beurre (Hugenholtz, 1993).

I.1.2.2.1. Transport spécifique de l'acide citrique

Le transport du citrate vers l'intérieur des cellules s'effectue, chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, par le biais d'une protéine inductible (Figure I.2), la citrate perméase de type protonique (CitP), qui assure l'accumulation du citrate dans le cytoplasme de la cellule sans le modifier chimiquement (Magni *et al.*, 1996). Ce mécanisme de transport actif, est induit par un stress acide. L'accumulation de citrate dans le milieu ne contribue pas à l'induction du transport (García-Quintáns *et al.*, 1998).

Néanmoins, à travers des expériences réalisées *in vitro*, faisant intervenir des vésicules membranaires, Bandell *et al.* (1998), ont suggéré un autre mécanisme de transport, qui stipule que la CitP catalyse efficacement l'échange citrate/lactate. Cet échange laisse croire que le rôle de cette enzyme est d'acheminer le citrate vers l'intérieur de la cellule et d'excréter le lactate produit après la glycolyse. Ces observations ont été validées par Magni *et al.* (1999), qui déclarent que la CitP catalyse un échange hétérologue entre le citrate divalent et le lactate monovalent assurant ainsi une résistance à la toxicité du lactate, lors d'un co-métabolisme glucide et citrate.

I.1.2.2.2. Catabolisme et clivage de l'acide citrique

Le catabolisme de l'acide citrique peut être décomposé en deux étapes : son clivage avec formation de l'acide pyruvique et la dégradation de celui-ci à travers différentes voies métaboliques. Une fois à l'intérieur de la cellule, l'acide citrique est scindé en acide acétique et acide oxaloacétique (Figure I.2), par la citrate lyase, protéine constitutive dont le pH optimum de fonctionnement est voisin de 7,5 (Harvey et Collins, 1961). L'acide acétique ainsi formé peut être excrété ou orienté vers la synthèse d'acétyl-CoA par l'acétate kinase au sein des diverses voies cataboliques existantes pour la dégradation du pyruvate, et l'acide oxaloacétique est lui converti en CO₂ et acide pyruvique soit par une oxaloacétate-décarboxylase dont le pH optimum est de 7,0, soit par une décarboxylation spontanée (Diviès *et al.*, 1994).

I.1.2.2.3. Régulation du catabolisme

Le premier point de régulation du métabolisme du citrate se situe au niveau de son transport à travers la membrane cytoplasmique (Hugenholtz, 1993). En effet, la citrate perméase est une enzyme spécifique inductible, par acidification du milieu, qui est inactive à pH neutre (Harvey et Collins, 1962) et active pour une zone de pH optimale étroite, qui se situe entre 4,5 et 5,5. Aussi, la forme divalente du citrate constitue le meilleur substrat pour la perméase (Magni *et al.*, 1996). Ainsi, l'enzyme assure le symport de la forme divalente du citrate et un proton, selon un mécanisme michaëlien, qui a, comme étape limitante, la formation du complexe ternaire perméase-citrate-proton (Cachon *et al.*, 1995).

Les différents mécanismes de régulation qui s'appliquent au métabolisme du pyruvate obtenu à partir du clivage du citrate seront détaillés ultérieurement.

I.1.2.2.4. Génétique

Le gène codant pour le transport du citrate est aussi situé au niveau d'un plasmide. La perte de ce plasmide conduit à une cessation du transport de citrate et, par conséquent, à l'interruption de la production de diacétyle. Ce qui prouve que le transport de citrate constitue une étape cruciale (Dridier *et al.*, 2004). Néanmoins, l'instabilité du métabolisme due à la perte de ce plasmide semble être moins problématique que celle du plasmide portant les gènes codant pour la perméation et l'utilisation du lactose (Smith *et al.*, 1992).

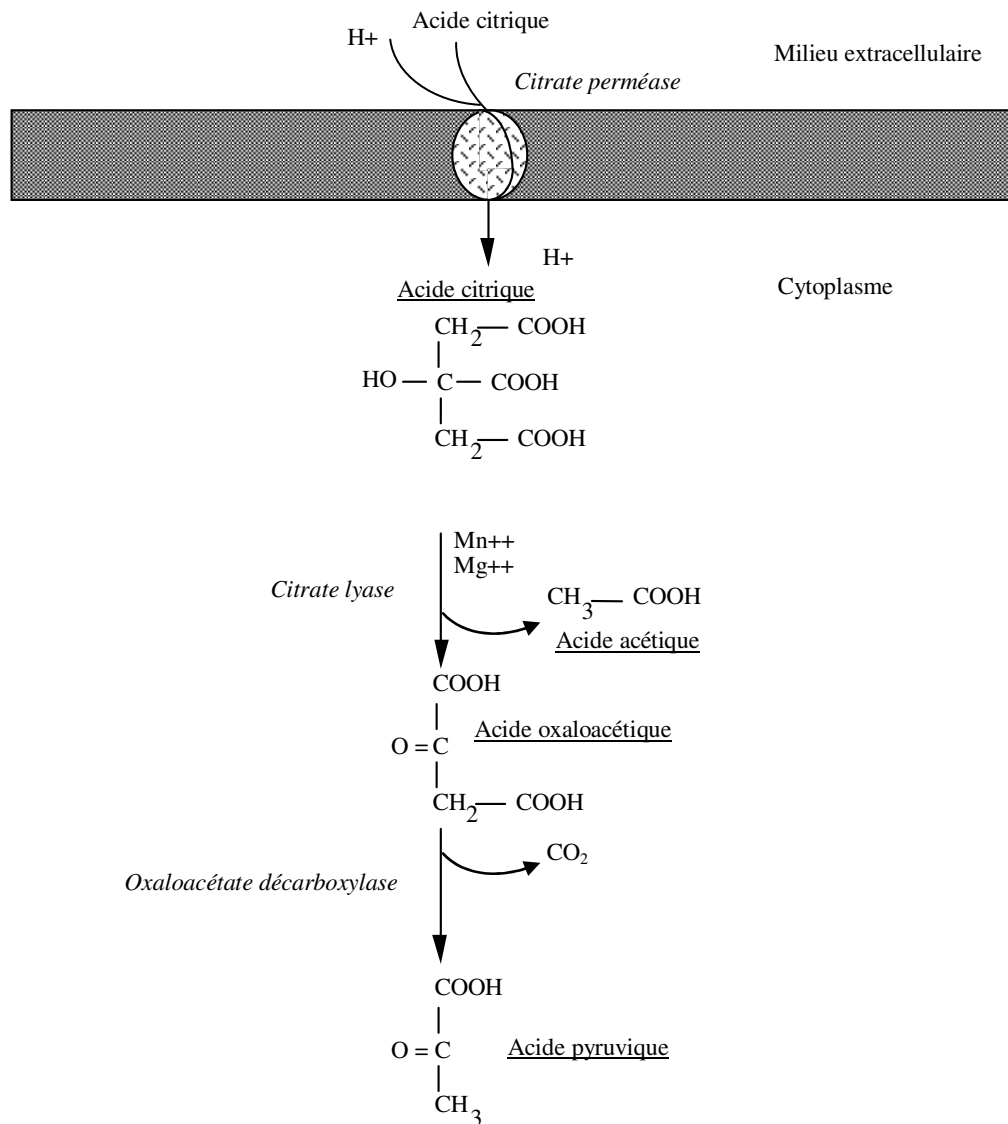


Figure I.2. Transport et clivage du citrate chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis (d'après Stien, 1993).

I.1.2.3. Métabolisme de l'acide pyruvique

I.1.2.3.1. Différentes voies cataboliques du pyruvate

Le pyruvate représente le principal métabolite intermédiaire qui résulte du métabolisme des glucides, notamment du lactose, et du clivage du citrate et beaucoup plus modestement, du métabolisme de certains acides aminés (Lees et Jago, 1978 ; Desmazeaud, 1983 ; Desmazeaud et de Roissart, 1994 ; Monnet et Gripon, 1994 ; Thompson et Gentry-Weeks, 1994 ; Loubière *et al.*, 1996). Chez *Lactococcus lactis*, plusieurs voies métaboliques peuvent être empruntées pour la dégradation de ce métabolite (Figure I.3) :

- la lactate déshydrogénase (LDH) pour la formation de L(+) lactate,

- le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), avec synthèse de dioxyde de carbone, acétate, acétaldéhyde et éthanol, via l'acétyl-CoA,
- la pyruvate formate lyase (PFL) pour la production de formate, acétate, acétaldéhyde et éthanol, via l'acétyl-CoA,
- l'acétolactate synthétase (ALS) et la pyruvate décarboxylase (PDC) pour la formation de composés en C₄ via l' α -acétolactate.

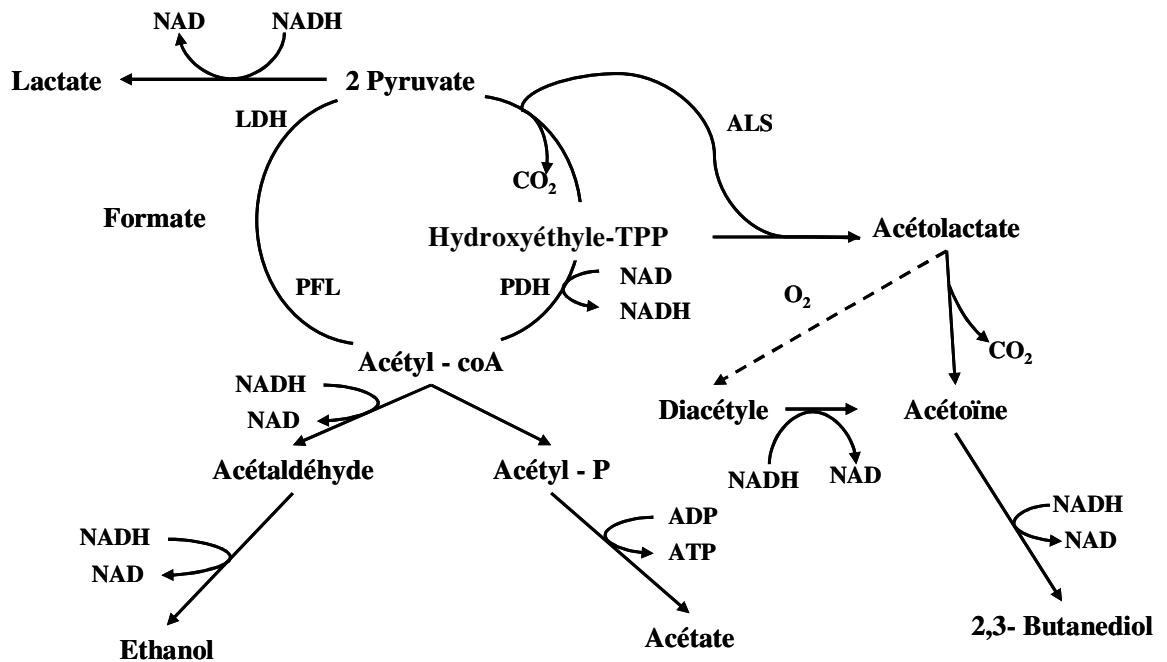


Figure I.3. Voies métaboliques centrales de dégradation du pyruvate (d'après Garrigues *et al.*, 2001).

Voie de la LDH

En présence de lactose ou de glucose, comme unique source de carbone et en absence d'accepteurs d'électrons extérieurs au métabolisme cellulaire, le pyruvate est réduit en acide lactique *via* la voie de la lactate déshydrogénase. Cette réduction permet une régénération des cofacteurs oxydés NAD⁺, nécessaires à la poursuite du catabolisme des sucres (Desmazeaud et de Roissart, 1994; Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Le mode de régulation de la lactate déshydrogénase maintient la concentration intracellulaire d'acide pyruvique à un niveau très bas (Thomas, 1976; Marshall et Law, 1984) qui explique le comportement homolactique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* dans de telles conditions.

Cependant, en présence d'un deuxième substrat carboné de niveau d'oxydation élevé comme l'acide citrique, et dont le catabolisme, qui conduit au pyruvate, ne consomme pas de

NAD⁺ et/ou en présence d'accepteurs extérieurs d'électrons comme l'oxygène, la régénération des NAD⁺ n'est plus indispensable et, par conséquent, l'acide pyruvique s'accumule. Cependant, la présence de ce composé à des concentrations élevées, est toxique pour la cellule. Ainsi, le pyruvate non nécessaire à la réoxydation des cofacteurs NADH et à la synthèse du matériel cellulaire est métabolisé en molécules moins toxiques à travers de voies métaboliques secondaires autres que celle de la LDH (Stien, 1993 ; Hugenholtz, 1993 ; Rondags, 1997). Aussi, la croissance en conditions anaérobies, sur des glucides moins favorables que le glucose, tels le maltose ou le galactose ou la croissance en continu en présence de glucose avec des faibles taux de dilution, ont conduit à la redirection du pool de pyruvate vers d'autres voies métaboliques secondaires conduisant à une fermentation acide-mixte (Thomas *et al.*, 1980 ; Sjöberg *et al.*, 1995 ; Melchiorsen *et al.*, 2001).

Il a été démontré récemment, que la LDH est régulée par deux mécanismes : le rapport FDP/ Pi ou le rapport NADH/NAD⁺. Selon les souches de *Lactococcus lactis* utilisées, soit un des deux mécanismes est mis en jeu, soit les deux (Van Niel *et al.*, 2004).

Voie de la PDH

Le catabolisme du pyruvate, à travers la voie du complexe déshydrogénase, conduit dans un premier temps, à la formation d'acétyl-CoA et de CO₂ avec consommation de NAD⁺. Les réactions qui conduisent à la formation de ces produits intermédiaires, sont catalysées par quatre enzymes formant le complexe déshydrogénase : la pyruvate décarboxylase, la lipote acétyltransférase, l'acétyl-CoA synthétase et la lipoyle déshydrogénase (Selivanov *et al.*, 1994 ; Rondags, 1997 ; Modak *et al.*, 2002).

L'intermédiaire acétyl-CoA, est alors dirigé vers :

- la synthèse d'acide acétique et à la phosphorylation d'un ADP, *via* les enzymes phosphotrans-acétylase et acétate kinase, en une molécule d'ATP hautement énergétique ;
- la formation d'acétaldéhyde par réduction, avec formation de NAD⁺, par le biais de l'acétaldéhyde déshydrogénase ; l'acétaldéhyde ainsi formé, peut être à son tour réduit en éthanol avec régénération d'une molécule de NAD⁺, *via* une alcool déshydrogénase.

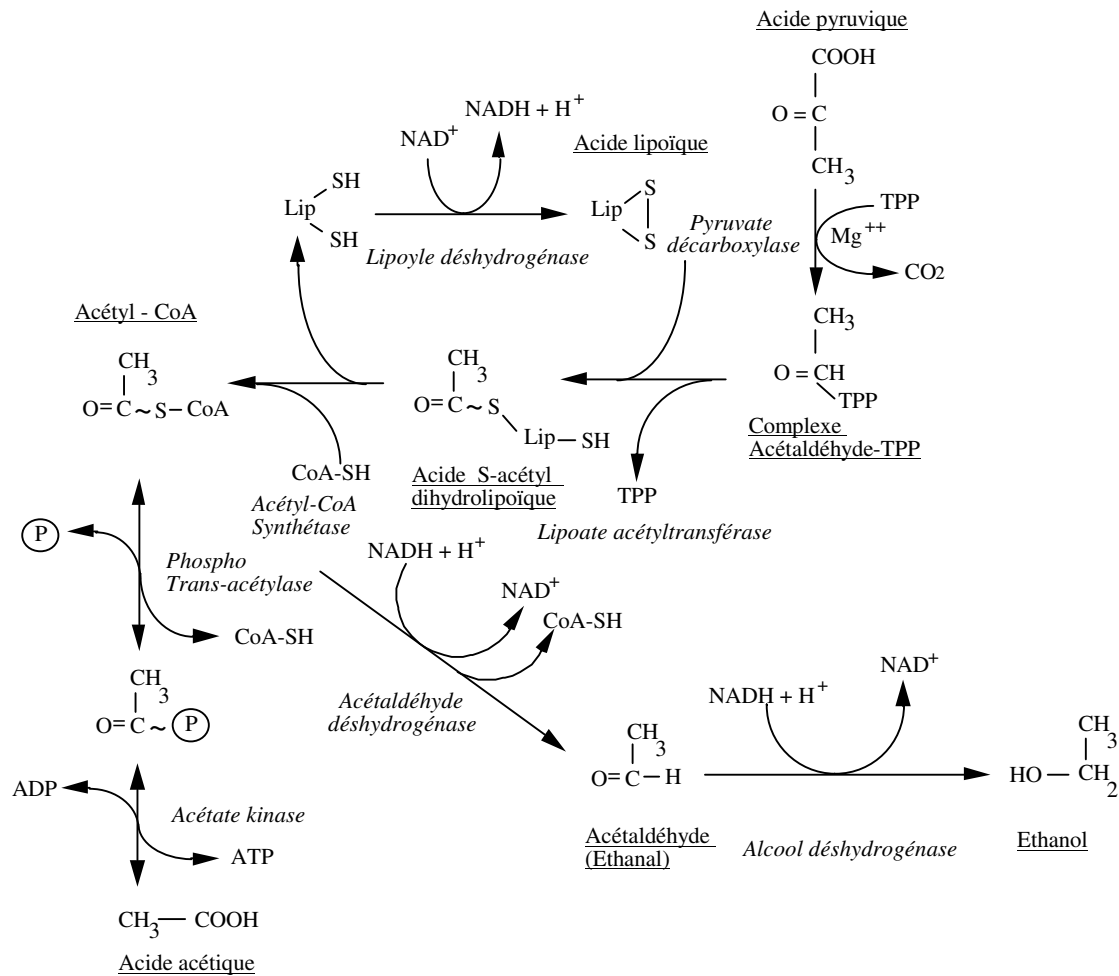


Figure I.4. Devenir du pyruvate métabolisé au niveau du complexe déshydrogénase (d'après Stien, 1993 ; Selivanov *et al.*, 1994 ; Rondags, 1997 ; Modak *et al.*, 2002).

Voie de la PFL

Cette seconde voie catalyse l'hydrolyse du pyruvate en formate et acétyl-CoA, qui est le précurseur de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde et de l'éthanol. Les étapes nécessaires à cette voie sont (Figure I.4) :

- la formation d'acétaldéhyde et d'éthanol, qui permet la régénération du NAD⁺ ;
- la formation d'acide acétique qui conduit à la production équimolaire d'ATP (Diviès *et al.*, 1994). Cependant, les réactions qui conduisent à la formation d'acétate sont réversibles, celui-ci peut être reconstitué pour donner de l'acétyl-CoA (Speckman et Collins, 1973).

La voie PFL ainsi que celle de la LDH constituent, alors, des voies alternatives au métabolisme du pyruvate capables d'accepter le flux glycolytique dans sa totalité (Garrigues *et al.*, 1997).

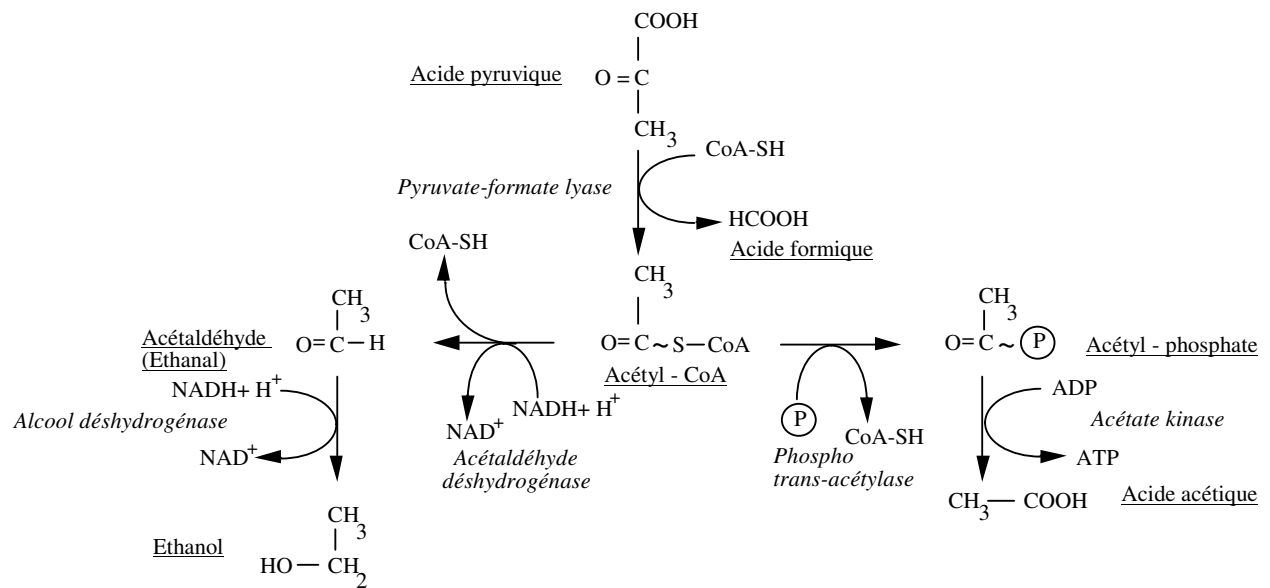


Figure I.5. Devenir du pyruvate métabolisé au niveau de la pyruvate-formate lyase (d'après Stien, 1993).

Voie de l'ALS et PDC ou voie des C4

Le catabolisme du pyruvate, *via* la voie de l'acétolactate synthétase et de la pyruvate décarboxylase, est à l'origine de la synthèse des composés aromatiques en C₄ : diacétyl, acétoïne et 2,3-butanediol. De ce fait, cette voie est particulièrement intéressante d'un point de vue technologique pour améliorer la production du diacétyl, ce qui a conduit à de nombreuses études rendues difficiles à cause des faibles quantités produites de l'ordre de quelques dizaines de mg / L (Stien, 1993).

La première étape de ce métabolisme, consiste en une décarboxylation de l'acide pyruvique, catalysée par les enzymes PDC et ALS en présence de cofacteur TPP, pour obtenir le complexe acétylaldéhyde-TPP.

Plusieurs mécanismes de synthèse du diacétyl sont alors envisageables :

- la condensation directe de l'acétylaldéhyde-TPP avec l'acétyl-CoA sous l'action d'une diacétyl synthétase, enzyme n'ayant pas été encore identifiée chez les bactéries lactiques (Speckman et Collins, 1968),
- et la décarboxylation oxydative réversible de l' α -acétolactate, intermédiaire métabolique instable formé à partir de l'acétylaldéhyde-TPP et du pyruvate sous l'action de l'ALS (Verhue et Tjan, 1991 ; Snoep *et al.*, 1992).

Actuellement, la voie de l' α -acétolactate est considérée comme dominante par rapport à celle de Speckman et Collins. Bien que certaines interrogations sur la réaction de la décarboxylation oxydative restent en suspens, il a déjà été prouvé qu'il s'agissait d'un

mécanisme intracellulaire favorisé par l'aération faisant intervenir un composé thermolabile (Rondags, 1997).

L'acétoïne peut provenir :

- de la décarboxylation simple de l' α -acétolactate catalysée par l'acétolactate décarboxylase,
- ou de la réduction du diacétyl en acétoïne sous l'action de la diacétyl/acétoïne réductase accompagnée de l'oxydation de NADH en NAD⁺.

Le 2,3-butanediol est obtenu suite à la réduction de l'acétoïne catalysée par l'acétoïne réductase permettant, de nouveau, l'oxydation du NADH en NAD⁺.

Ainsi, au niveau métabolique, la voie des composés en C₄ permet la dégradation du pyruvate en molécules moins toxiques sans modifier pour autant le rapport NADH/NAD⁺ ou, au contraire, en régénérant les cofacteurs NAD⁺, selon les différents composés synthétisés au cours du métabolisme du pyruvate à travers cette voie.

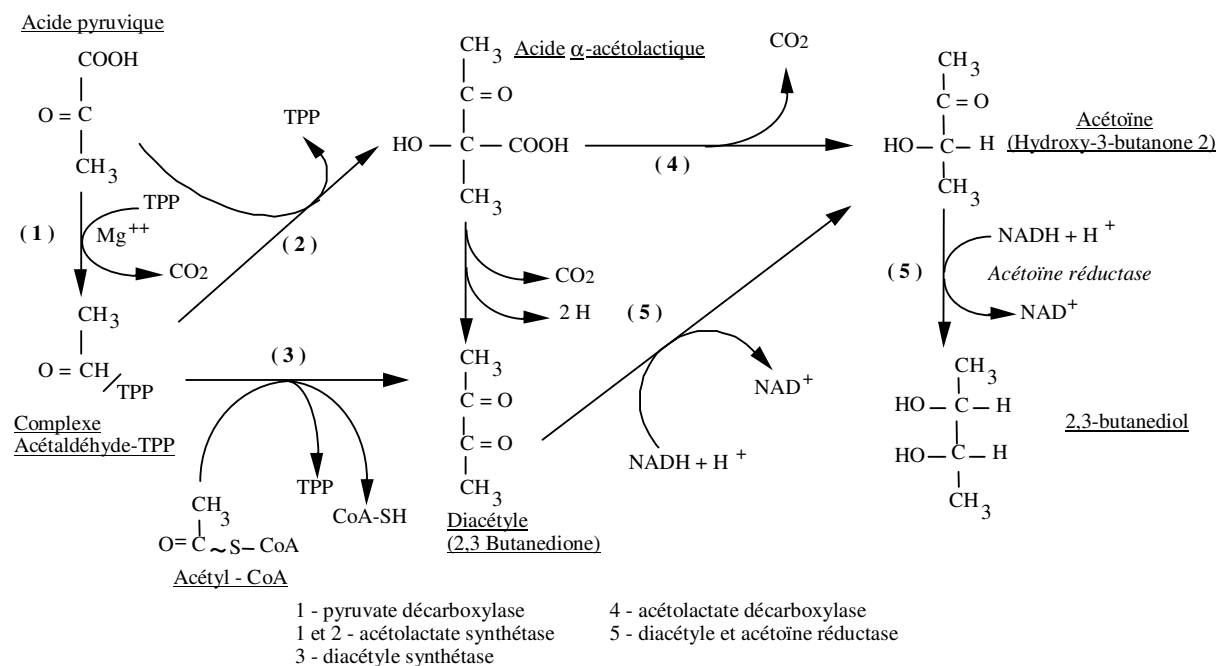


Figure I.6. Devenir du pyruvate métabolisé au niveau de l'acétolactate synthétase et de la pyruvate décarboxylase (d'après Stien, 1993).

I.1.2.3.2. Régulation du catabolisme du pyruvate

La régulation des flux intracellulaires de pyruvate chez *Lactococcus lactis* dépend de :

- (a) la nature du substrat utilisé (Garrigues *et al.*, 1997 ; Melchiorson *et al.*, 2002) ;
- (b) la disponibilité en cofacteurs NADH/NAD⁺;

(c) la disponibilité en accepteur d'électrons tels, l'acide pyruvique, l'acétaldéhyde et l'oxygène ;

(d) l'inhibition ou l'activation des enzymes impliquées dans la dégradation progressive du pyruvate par des substrats, composés glycolytiques intermédiaires ou produits finaux du métabolisme des glucides et de l'acide citrique (Stien, 1993 ; Even *et al.*, 1999).

Régulation des voies de la LDH et de la PFL

Des études, réalisées *in vitro* ont identifié que la LDH et la PFL sont des enzymes allostériques. En effet, la LDH est activée, soit par le fructose-diphosphate (FDP), soit par le tagatose-1,6-diphosphate (TDP). L'adaptation de l'activité de la LDH au flux glycolytique permet d'éviter l'accumulation de pyruvate, composé toxique en concentration élevée, et de le réorienter vers d'autres voies. Également, l'accumulation de glycéraldéhyde-3-P et de dihydroxyacétone-P inhibe la PFL (Takahashi *et al.*, 1982 ; Garrigues *et al.*, 1997 ; Melchiorson *et al.*, 2001).

Dans ce sens, Garrigues *et al.* (1997), ont développé un modèle de régulation qui explique le passage d'un métabolisme homolactique à un métabolisme d'acides mixtes en anaérobiose. Ce modèle relie l'orientation du métabolisme du pyruvate au rapport NADH/NAD⁺. Ainsi, l'accumulation du FDP et des triose-phosphates est la conséquence d'un rapport NADH/NAD⁺ élevé (plus haut que 0,05) qui tend à inhiber la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (PGADH) et à orienter le flux carboné vers la LDH. De même, si NADH/NAD⁺ est faible (plus faible que 0,05), l'inhibition de la PGADH se trouve levée et la pyruvate formate lyase (PFL) entre en compétition avec la LDH pour l'utilisation du pyruvate, faisant apparaître un métabolisme acide mixte (production de lactate, d'acétate et de CO₂) (Garrigues *et al.*, 1997 ; Neves *et al.*, 2005).

Pour les sucres rapidement métabolisables, en présence d'un rapport NADH/NAD⁺ élevé et par conséquent d'un flux glycolytique élevé, la PGADH est inhibée. L'inhibition de la PGADH provoque l'accumulation intracellulaire des triose-phosphates et du FDP (Jensen *et al.*, 1999), qui inhibent l'activité de la PFL. De plus, la disponibilité du NADH et la présence de FDP et TDP activent l'activité de la LDH, aboutissant à une fermentation homolactique. Par contre, pour les sucres lentement métabolisables tel le lactose, le rapport NADH/NAD⁺ est plus bas et le flux glycolytique est réduit, l'activité de la LDH est limitée par la disponibilité en NADH et la PGADH est activée, conduisant à une fermentation acide mixte (Figure I.7). Ces résultats ont été confirmés par Even *et al.*, (1999), qui ont

montré, chez une souche de *Lactococcus lactis* qui croît en discontinue sur du lactose, que la modification de l'activité de la PGADH par ajout d'iode d'acétate provoque le passage d'une fermentation acide mixte vers une fermentation homolactique. Néanmoins, il est important de noter qu'à côté de la régulation au niveau enzymatique de la PFL, Melchiorson *et al.*, (2002) ont montré que la distribution du pyruvate est corrélée au contenu cellulaire en terme de LDH et PFL, qui lui-même dépend de la nature du substrat carboné utilisé. En effet, le taux de PFL était plus élevé et le taux de LDH plus bas en présence de galactose comparé au glucose.

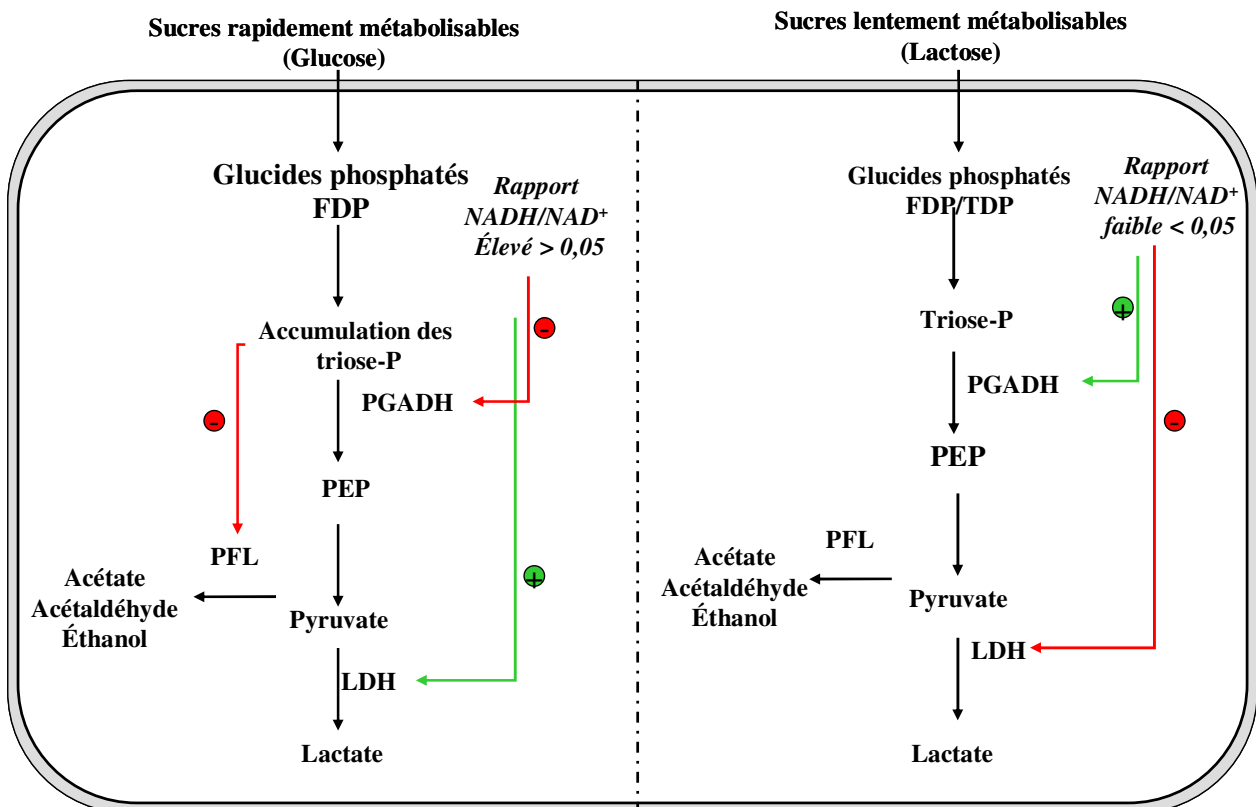


Figure I.7. Représentation schématique de la régulation des voies de la LDH et de la PFL en anaérobiose chez *Lactococcus lactis*. Les différentes concentrations des composés intracellulaires sont représentées par des polices d'écriture différentes (d'après Garrigue *et al.*, 2001 ; Melchiorson *et al.*, 2001 ; Neves *et al.*, 2002 ; Neve *et al.*, 2005).

Régulation de la voie de la PDH

La régulation de l'activité de la PDH se fait de façon allostérique par les intermédiaires du métabolisme des glucides. Elle est réprimée par le glycéraldéhyde-3-P et la dihydroxyacétone-P, en présence d'un flux glycolytique élevé (Diviès *et al.*, 1994). Le complexe enzymatique nécessite, globalement, la disponibilité de TPP, acide lipoiq̃ue et de

NAD⁺. Cette voie, est préférentiellement empruntée en présence d'oxygène. Dans de telles conditions, l'acétyl-CoA formé est transformé en acide acétique plutôt qu'en acétaldéhyde et en éthanol, parce que l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'éthanol déshydrogénase ont besoin de NADH pour fonctionner, ce qui impliquerait une compétition entre ces deux enzymes et la NADH : H₂O₂ oxydase ou la NADH : H₂O oxydase alors que la conversion de l'acétyl-CoA en acide acétique apporterait une molécule d'ATP (Condon, 1987).

Régulation de la voies des C₄

La régulation des voies métaboliques conduisant à la formation des composés en C₄ implique plusieurs enzymes ; l' ALS et la diacétyl/acétoïne réductase qui sont des enzymes constitutives et la diacétyl synthétase qui est inductible.

L'ALS est une enzyme allostérique inhibée à pH 5,4 par les composés suivants : 6-phosphogluconate, 3-phosphoglycérate, 2-phosphoglycérate, PEP et ATP (Cogan *et al.*, 1984). Elle catalyse l'étape limitante pour la production des composés en C₄. En effet, sa faible affinité pour le pyruvate fait que le flux carboné qui emprunte cette voie est limité. Néanmoins, en présence de lactose et de citrate (accumulation de pyruvate sans induction de la LDH), en aérobiose (inhibition de la PFL) et à faible pH, cette voie peut être empruntée.

La diacétyl/acétoïne réductase présente une affinité largement supérieure pour l'acétoïne que pour le diacétyl. De plus, elle est inhibée par des concentrations élevées en acétoïne et la synthèse de celle-ci est réprimée par l'acide citrique (Rondags, 1997).

Ainsi, la régulation du métabolisme du pyruvate, chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, semble entièrement dépendante des conditions opératoires de la fermentation et de la composition du milieu de culture qui influent sur l'activité des enzymes.

I.1.3. Métabolisme de l'oxygène chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Lactococcus lactis a un comportement microaérophile envers l'oxygène, c'est-à-dire que de faibles teneurs en oxygène sont favorables au développement des cellules alors que des concentrations plus élevées ont des effets néfastes (Desmazeud et Roissart, 1994 ; Duwat *et al.*, 2000).

L'oxygène est à l'origine de deux effets antagonistes :

- un effet positif, qui résulte de la présence d'un accepteur d'électrons supplémentaire qui va contribuer au métabolisme cellulaire (Condon, 1987 ; Duwat *et al.*, 2001);

- un effet négatif, qui résulte de la formation ou de l'activation par l'oxygène d'espèces toxiques (Condon, 1987).

I.1.3.1. Effet positif du métabolisme de l'oxygène

Chez cette bactérie, la NADH : H₂O₂ oxydase (Anders *et al.*, 1970) et la NADH : H₂O oxydase (Bruhn et Collins, 1970), sont présentes et entrent en compétition avec d'autres enzymes du métabolisme carboné, telle la LDH, pour les molécules de NADH. Par conséquent, la production d'acide lactique est réduite et le flux de pyruvate est redirigé vers une fermentation acide mixte sous l'action de la PDH et comme la PFL est inhibée par la présence d'oxygène (Melchiorson *et al.*, 2000) ; la voie des C₄ est alors préférentiellement empruntée par le pyruvate, ce qui permet d'améliorer la production en diacétyle (Bassit *et al.*, 1994; Boumerdassi *et al.*, 1996 ; Boumerdassi *et al.*, 1997a ; Nordkvist *et al.*, 2003). Par ailleurs, comme l'oxygène favorise la décarboxylation oxydative de l' α -acétolactate, il est possible d'accroître la production de diacétyle par un facteur de 5 à 15 par la simple aération du milieu de culture (Serebrennikov *et al.*, 1998). Néanmoins, l'aération n'augmente pas systématiquement la production de diacétyle. En effet, des souches mutantes de *Lactobacillus* productrices d' α -acétolactate n'ont pas produit plus de diacétyle par aération du milieu (Monnet et Corrieu, 1998).

I.1.3.2. Effet négatif du métabolisme de l'oxygène

Le métabolisme de l'oxygène conduit à la formation de composés toxiques comme l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène responsables de la toxicité cellulaire (Storz et Imlay, 1999 ; Miyoshi *et al.*, 2003). Leur accumulation peut induire une inhibition de la croissance et la production d'acide (Condon, 1987). Néanmoins, si le système enzymatique cellulaire fonctionne correctement, des voies de détoxification sont disponibles au travers de la catalyse par les enzymes superoxyde dismutase et NADH peroxydase (Britton *et al.*, 1978).

I.1.4. Amélioration de la production de diacétyle

Les bactéries lactiques produisent des faibles concentrations en diacétyle (généralement inférieures à 5 mg/L). Ainsi, l'amélioration de la production du diacétyle représente un important enjeu industriel. Afin d'augmenter la production de ce métabolite, deux axes de recherche ont été explorés : la sélection et le développement de souches surproductrices Hugenholtz et Kleerebezem, 1999 ; De Vos et Hugenholtz, 2004). - la modification de l'environnement : mode et conditions de culture des souches.

I.1.4.1. Amélioration de la production de diacétyle *via* des souches surproductrices

Les bactéries issues de l'ingénierie métabolique sont utilisées comme usine cellulaire pour la production *ex situ* de certains métabolites en bioréacteurs (Hugenholtz *et al.*, 2000 ; Kleerebezem *et al.*, 2002). Ainsi, dans le but d'améliorer les performances des souches, de nombreuses études abordent les modifications génétiques des microorganismes. Cependant, ces solutions se heurtent à des problèmes : (a) de législation dans le cas des mutants obtenus par génie génétique, (b) de mauvaise image des microorganismes génétiquement modifiés (M.G.M.) auprès des consommateurs. Néanmoins, Henriksen *et al.* (1999) rapportent que l'utilisation de MGM, modérément appliquée devrait être bénéfique à la fois aux consommateurs et aux producteurs par l'amélioration des propriétés organoleptiques et la diminution du coût de production. Cependant, en utilisant ce type de technique les risques de contaminations par les bactériophages sont importants.

Les bactéries lactiques ont de petits génomes de 2 à 3 Mb, la plupart vont bientôt être entièrement séquencés ou le sont déjà et représentent des modèles pour l'amélioration rationnelle des souches industrielles (Bolotin *et al.*, 2001 ; Kleerbezem *et al.*, 2002 ; De Vos et Hugenholtz, 2004 ; Oliviera *et al.*, 2005). Ainsi, de telles connaissances extensives des voies métaboliques chez les bactéries lactiques offrent de nombreuses possibilités (Hugenholtz, 1993 ; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996 ; De Vos et Hugenholtz, 2004). Les bactéries lactiques se prêtent bien à ce genre de modifications car leur métabolisme est simple et contrôlable (Hugenholtz *et al.*, 1999). Dans ce sens, plusieurs stratégies, ont été mises en œuvre pour améliorer les performances de production du diacétyle.

L'obtention de souches productrices de diacétyle nécessite soit, la sélection de mutants spontanés ou induits, soit la modification contrôlée de l'expression d'un ou des gènes sélectionnés.

I.1.4.1.1. Criblage des souches mutantes

La sélection des mutants, induits ou spontanés, requiert l'utilisation de cribles efficaces, qui permettent de sélectionner au sein d'une population bactérienne, les souches surproduisant du diacétyle ou accumulant son précurseur l' α -acétolactate.

Un premier type de crible, basé sur l'utilisation de techniques colorimétriques de dosage de diacétyle et d' α -acétolactate a été défini par Monnet *et al.* (1997) et amélioré par Monnet *et al.* (1999). Cette approche a été utilisée pour sélectionner des mutants ALD (-) accumulant de l' α -acétolactate afin de les utiliser, lors d'applications industrielles, telle la production de beurre. Monnet *et al.* (2000), ont augmenté la production de diacétyle et d' α -acétolactate par la production et la sélection de mutants déficients en LDH. Aussi, Curic *et al.* (1999) ont

sélectionné une souche sauvage ALD (-) non mutante, qui peut être incorporée dans les préparations alimentaires.

Un deuxième type de crible, basé sur le phénotype dit d'inhibition par la leucine, pour sélectionner des souches déficientes en ALD a été défini par Goupil *et al.* (1996). Ces mutants déficients en ALD, enzyme à l'origine du diacétyle formé à partir d' α -acétolactate, ont des capacités d'accumulation d' α -acétolactate accrues et un potentiel de synthèse de diacétyle amélioré (Goupil *et al.*, 1996 ; Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997 ; Curic *et al.*, 1999).

I.1.4.1.2. Amélioration des souches par ingénierie métabolique

L'amélioration des souches par ingénierie métabolique consiste à identifier les réactions qui limitent les performances de production en diacétyle et à y remédier en modifiant la synthèse des enzymes ou leur activité (Gasson, 1993). Ainsi, tous les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de cet arôme ont été caractérisés. Afin de surproduire le diacétyle, les activités de ces enzymes ont été augmentées ou diminuées. La première limitation provient de la voie de la LDH, comme l'activité de la PFL peut être réduite par l'aération et l'activité de la PDH étant généralement faible (Platteeuw *et al.*, 1995 ; Gasson *et al.*, 1996). La seconde limitation provient de l'activité ALS assez réduite.

Ainsi, ces dernières années de nombreuses stratégies (Tableau I.1) ont été mises en œuvre pour améliorer la production de diacétyle par ingénierie métabolique. Ces stratégies ont été largement passées en revue dans la littérature (Hoefnagel *et al.*, 2002 ; Kleerbezem *et al.*, 2002 ; De Vos et Hugenholtz, 2004). Ces stratégies tendent soit à inactiver par mutagenèse aléatoire (UV, produits chimiques...) ou par génie génétique les gènes des voies en compétition avec la production de diacétyle (telle la voie de la LDH), soit à surexprimer des gènes responsables de la synthèse de cet arôme (De Vos et Hugenholtz, 2004). Une des applications concerne l'enzyme qui détruit le précurseur direct du diacétyle et qui permet d'augmenter la production de diacétyle d'un facteur 10 (Renault, 1998). Il a ainsi été montré, grâce aux outils de la biologie, qu'en changeant un petit nombre de gènes de *L. lactis*, il est possible d'obtenir des souches produisant une concentration plus importante d'un arôme du beurre (De Vos et Hugenholtz, 2004).

Tableau I.1. Énumération de certaines stratégies mises en œuvre afin d'améliorer la production de diacétyle.

Stratégies d'amélioration	Auteurs
Suppression de l'expression de la LDH	(Phalip <i>et al.</i> , 1994 ; Gasson <i>et al.</i> , 1996 ; Boumerdassi <i>et al.</i> , 1997b)
Surexpression de l'acétolactate synthétase ALS	(Benson <i>et al.</i> , 1996 ; Carroll <i>et al.</i> , 1999)
Suppression de l'activité acétolactate décarboxylase (ALD)	Goupil <i>et al.</i> , 1996 ; Swindell <i>et al.</i> , 1996 ; Aymes <i>et al.</i> , 1999 ; Monnet <i>et al.</i> , 2000)
Surexpression de la NADH oxydase	(Lopez de Felipe <i>et al.</i> , 1998)
Inactivation de l'activité acétolactate décarboxylase (ALD) combinée à la Surexpression de la NADH oxydase	(Hugenhlotz <i>et al.</i> , 2000)

Néanmoins, l'utilisation d'arômes issus de cette technologie se trouve dans certains cas, confrontée à l'impossibilité juridique et à un éventuel surcoût de production d'arôme liquide purifié. Actuellement, même si la législation de l'Union Européenne a autorisé l'utilisation des microorganismes obtenus suite à des mutagenèses aléatoires (induites ou non), sa position reste opposée à l'utilisation de lactocoques obtenus suite à des manipulations génétiques contrôlées (Sybesma *et al.*, 2006), ce qui joue sur la perception du consommateur.

I.1.4.2. Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

L'approche optimisation des procédés consiste à placer la bactérie utilisée, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, dans des conditions environnementales spécifiques (mode de culture, nature des substrats, pH, température...), dans le but d'exploiter au mieux leur potentiel physiologique pour améliorer la croissance et synthétiser les métabolites d'intérêt. Ainsi, la production de diacétyle dépend du mode de culture utilisé et des conditions opératoires appliquées. Dans ce sens, une évolution du mode de culture peut apparaître souhaitable. L'une de ces évolutions est justement basée sur la nature même des régulations cellulaires : la répression ou l'induction de la synthèse d'enzymes d'une part, et la modification du niveau d'activité des enzymes synthétisées par activation ou inhibition d'autre part. En effet, ces deux modes de régulation ont des cinétiques très différentes, avec une action lente pour le premier mode et très rapide pour le second. Il est donc possible, plutôt que de placer les cellules dans un état de production stabilisé en terme de régulation, d'induire une série de chocs physiologiques successifs, en jouant sur les paramètres physicochimiques du milieu (pH, oxygénation, température...) de façon à régulièrement déstabiliser ces régulations et exploiter au mieux les capacités des cellules.

I.1.4.2.1. Mode de mise en œuvre des bactéries lactiques

La mise en œuvre des cultures bactériennes de *Lactococcus lactis* fait appel aux propriétés catalytiques de ces microorganismes, dont à la fois la quantité et la qualité vont varier au cours du procédé. La difficulté de conduite de ce type de culture réside, par conséquent, dans la capacité à placer une concentration maximale de biocatalyseur dans des conditions optimales de production ou de consommation, et ce sur une durée la plus étendue possible. Les bactéries lactiques peuvent être utilisées : en réacteur parfaitement agité, en réacteur à cellules immobilisées ou en fermentation extractive.

A l'échelle industrielle, l'utilisation des bactéries lactiques en réacteur parfaitement agité a suscité un regain d'intérêt grâce à l'évolution de la production du beurre et des probiotiques. En effet, un procédé continu de fabrication de beurre, qui découple la maturation physique de sa maturation biologique, est apparu à la fin des années 1970 (Paquot *et al.*, 1994). Aussi, la production d'arômes dans le beurre tend de plus en plus à être découplée des autres opérations unitaires comme c'est le cas avec le procédé NIZO, dans lequel la production d'arômes, d'acides et de cellules est séparée de la maturation physique de la crème. L'avantage de ce découplage est de simplifier le contrôle et d'obtenir un produit fini ayant une texture, une acidité ou une concentration en arômes données et constantes. Ainsi, plusieurs études se sont intéressées à l'optimisation de l'aromatisation et l'acidification de cultures conduites dans ce type de réacteur (Bassit *et al.*, 1994 ; Gutierrez *et al.*, 1996 ; Boumerdassi *et al.*, 1997). Néanmoins, trois types de modes de conduite existent pour ce type de réacteur (Rani et Ramachandra, 1999) (Tableau I.2).

Tableau I.2. Les différents modes de culture en réacteur parfaitement agité

(a) Mode discontinu (Rondags, 2002 ; Boonmee <i>et al.</i> , 2003)
<u>Avantages</u>
- simplicité de mise en œuvre - limitation des pertes en cas d'accident de fermentation
<u>Inconvénients</u>
- productivité limitée par la disponibilité des substrats dans le milieu de culture - inhibition soit par des concentrations élevées en substrat, soit par le produit
(b) Mode discontinu alimenté (Montville <i>et al.</i> , 1987 ; Rondags, 2002)
<u>Avantages</u>
- limitation des pertes en cas d'accident de fermentation - levée des inhibitions dues à un excès de substrat - mise en œuvre de cultures pluriphases (croissance et production de métabolites).
<u>Inconvénients</u>
- limitation par le volume utile du réacteur - difficulté de définition des profils d'alimentations en substrats
(c) Mode continu (Schmitt <i>et al.</i> , 1990; Starrenburg et Hugenholtz, 1991; Boyaval, 1994 ; Rondags, 2002 ; Boonmee <i>et al.</i> , 2003)
<u>Avantages</u>
- obtention des conditions physiologiques optimales - productivité plus importante - utilisation des installations optimisée
<u>Inconvénients</u>
- pertes trop grandes en cas d'accident de fermentation - pertes en biocatalyseur et réduction des performances

Traditionnellement, le mode de conduite de fermentation lactique le plus utilisé est le mode discontinu ou en terminologie anglo-saxonne « batch » (Gilliland, 1985). Néanmoins, les performances de tels procédés sont faibles car, d'une part, sur une durée donnée de fermentation, seule une période limitée est effectivement productive et d'autre part, le temps de préparation et de remise en état de ces réacteurs est non négligeable par rapport au temps de culture. Aussi, tenant compte que le type de fermentations lactiques étudié implique deux phases antagonistes en terme de conditions opératoires, la croissance de la biomasse et la production du métabolite d'intérêt, il est nécessaire d'allonger la durée de production du diacétyle et ce, par le pilotage des alimentations en substrats et en gérant les transitions entre ces deux phases. De ce fait, le mode de conduite discontinu alimenté semble le plus judicieux

pour ce type de procédé. Ainsi la détermination des profils d'alimentation en substrats représente la clef pour améliorer les performances de ce procédé.

Bioréacteurs à cellules immobilisées

En industrie laitière, la mise en œuvre des lactocoques en culture mixte, la plupart du temps se fait sous forme immobilisée, dans la mesure où le lait coagulé ne représente pas un milieu liquide, qui permet les déplacements de cellules en croissance (Ibrahim *et al.*, 2004). Trois types d'immobilisation peuvent être identifiés : l'adhérence sur une surface, la formation de chaîne (liaisons chimiques) et le piégeage dans la matrice extracellulaire (Rondags, 1997 ; Ibrahim *et al.*, 2004). Ce mode de culture présente des avantages (Champagne *et al.*, 1994 ; Freeman *et al.*, 1998 ; Doleyres et Lacroix, 2005) :

- obtention de hautes densités cellulaires, de l'ordre de 10^{12} UFC/mL de support (Prévost et Diviès, 1987 ; Audet *et al.*, 1988 ; Champagne *et al.*, 1993 ; Lamboley *et al.*, 1997 ; Doleyres *et al.*, 2004a) ;
- affranchissement des phénomènes de lessivage et travail avec des temps de séjour très courts (Pilkington *et al.*, 1998 ;) ;
- réutilisation et séparation aisées des biocatalyseurs (Chinachoti *et al.*, 1997) ;
- limitation des contaminations, de la sensibilité aux bacteriophages et résistance accrue à certains antibiotiques (Champagne *et al.*, 1989 ; Champagne, 1992) ;
- réduction de la sensibilité à l'encontre des variations des facteurs opératoires tels que la température et le pH (Kim *et al.*, 1988 ; Kearney *et al.*, 1990 ; Champagne *et al.*, 1992 ; Doleyres *et al.*, 2004b).

Ainsi, la biomasse immobilisée améliore grandement la robustesse des procédés et assure la co-immobilisation de différents biocatalyseurs, enzymes ou cellules pour améliorer les performances du procédé (Ochi *et al.*, 1991; Audet *et al.*, 1995), ou réaliser des inoculations définies. Néanmoins, l'immobilisation cellulaire présente un certain nombre d'inconvénients :

- issus des limitations diffusionnelles qui perturbent le transfert des substrats vers les cellules et provoquent l'accumulation de métabolites parfois inhibiteurs comme l'acide lactique (Riley *et al.*, 1996; Roukas et Kotzekidou, 1996),
- comme la rétention de molécules environnantes par les matrices d'immobilisation telles les pesticides, les mutagènes (Zhang et Ohta, 1991), les antibiotiques (Champagne *et al.*, 1992 b) ou les pyrolysats d'acides aminés (Hosono *et al.*, 1990).

Par ailleurs il existe un frein législatif face aux produits étrangers au lait tels les supports d'immobilisation et autres polymères d'inclusion et d'encapsulation (Champagne *et al.*, 1994).

Fermentation extractive

La mise en œuvre des bactéries lactiques en fermentation extractive se fait par couplage des bioréacteurs à des modules membranaires qui assurent le confinement des cellules et l'extraction de métabolites qui peuvent nuire aux performances fermentaires des cellules tel l'acide lactique (Rondags, 1997). De plus, dans une optique de production d'arômes laitiers, l'absence de flore microbienne dans le produit fermenté assure une meilleure conservation des molécules produites. Pour le diacétyle, la présence résiduelle de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et particulièrement son activité diacétyle réductase sont à l'origine de pertes importantes lors du stockage (Klaver *et al.*, 1992).

Néanmoins, l'utilisation de la fermentation extractive appliquée à des cultures de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* peut s'avérer très difficile. En effet, l'optimisation de l'installation de fermentation couplée à un module de microfiltration tangentielle, qui présente de fortes contraintes hydrodynamiques augmentant les flux de perméat, risque de nuire à la viabilité et à l'activité des cellules (Bibal *et al.*, 1991). Enfin, une fois le procédé maîtrisé, les gains de productivité doivent se révéler suffisamment importants pour justifier l'emploi de séparateurs coûteux à l'achat et en entretien (Altaba, 1991).

I.1.4.2.2. Influence des conditions opératoires

Le métabolisme des bactéries lactiques dépend étroitement de l'activité des catalyseurs biologiques et ceux-ci sont fortement sensibles aux conditions de culture (Stien, 1993).

Ci-dessous, sont résumés les différents effets, déjà abordés dans cette étude bibliographique, des conditions opératoires (pH, température et oxygénation) sur la croissance et la production de composés en C₄ chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Tableau I.3. Principaux effets du pH, de la température, de l'oxygène et du citrate sur la croissance et la production de composés en C₄ chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis (Schmitt et Diviès, 1992; Schitt *et al.*, 1992 ; Hugenholtz, 1993 ; Bassit *et al.*, 1994 ; Stien, 1993 ; Rondags, 1997 ; Duwat *et al.*, 2001 ; Miyoshi *et al.*, 2003).

	Croissance	voies des C ₄
1- pH		
<u>pH acide</u>	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - En dessous de pH 4,5 croissance très faible à absente. - Optimum de croissance vers pH 6,5. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Energie utilisée pour la régulation du pH intracellulaire. - Epuisement d'énergie conduisant à un abaissement du pH intracellulaire qui conduit à l'absence de synthèse de certaines enzymes et à l'inhibition d'autres nécessaires pour le transport et le catabolisme des sucres. 	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Production maximale de diacétyle/acétoïne et conservation du diacétyle formé à pH 4. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Redirection du pyruvate accumulé, non utilisé pour la croissance, vers la voie des C₄. - Chute du pH interne qui conduit à une activité optimale de l'α-acéto lactate synthétase et à une réduction de l'activité de la diacétyle réductase ;
<u>pH neutre</u>	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Bonne croissance. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Activité optimale de la plupart des enzymes. 	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Production faible de diacétyle/acétoïne. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Réduction de l'activité de la citrate perméase.
<u>pH basique</u>	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - maintien de la croissance jusqu'à pH 9. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Réduction de l'activité des enzymes glycolytiques. 	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de production du diacétyle. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la citrate perméase.
2- Température (°C)		
	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Croissance maximale à la température optimale 30 °C. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Activité optimale de la plupart des enzymes aux alentours de 30 °C. 	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Formation de diacétyle/acétoïne accrue et conservation du diacétyle formé à faible température 18 °C. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Consommation accrue de citrate ; - Réduction de l'activité de la diacétyle réductase.

3- Oxygène dissous (%)		
	<p><u>Présence d'oxygène</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - O₂ permet la régénération du NAD⁺ par les NADH oxydases alors disponibles pour le métabolisme. - Induction de la synthèse de NADH oxydases. 	
	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Effet toxique qui peut soit ralentir la croissance, soit conduire à un décès cellulaire. - Stimulation de la croissance par de faible quantité d'oxygène dissous (caractère microaérophile). <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Réduction de l'O₂ en eau, qui conduit à la formation l'hydroxyle radical OH[*], d'anion radical superoxyde (O₂⁻) et de H₂O₂ qui sont responsables de la toxicité cellulaire de l'oxygène qui conduit à la réduction du taux de croissance et éventuellement au décès cellulaire. 	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Possibilité d'emprunter la voie des C₄, formation de diacétyle/acétoïne optimale. - Production accrue de diacétyle. - Conservation du diacétyle formé - Risque d'entraînement à la vapeur des molécules volatiles en C₄. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Réduction de l'activité de la LDH et inhibition de la PFL. - O₂ oxyde directement l'α-acétolactate en diacétyle. - Réduction de l'activité de la diacétyle réductase par la non disponibilité du NADH. - Aération entraîne les molécules volatiles.
4- Citrate		
	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Stimulation de la croissance. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Disponibilité d'une source carbonée supplémentaire pour la synthèse d'ATP et de composés cellulaires à travers le co-métabolisme du lactose et du citrate. 	<p><u>Effet macroscopique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Production accrue de diacétyle. - Conservation du diacétyle formé. <p><u>Effet intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Accumulation de pyruvate excédentaire qui peut être dégradé par d'autres voies que celle de la LDH. - Répression de la synthèse et inhibition de la diacétyle réductase.

Afin de pouvoir développer la commande optimale du procédé, il est nécessaire d'obtenir un modèle qui décrive avec précision, le comportement dynamique du procédé de fermentation. Ainsi, le premier objectif est de développer un modèle, le plus simple possible, pour prédire les profils de concentrations de la biomasse, des substrats et des produits.

I.2. Modélisation

Introduction

Un modèle peut être défini comme étant un système physique, mathématique ou logique représentant les structures essentielles d'une réalité et capable d'en expliquer ou d'en reproduire dynamiquement le fonctionnement ; c'est une représentation sous une forme quelconque d'un objet, d'un processus ou d'un système (Hubert, 1996). Selon Baudy (1984), en génie des procédés un modèle est l'expression mathématique d'un processus réel qui résulte de l'interaction entre les connaissances (lois physiques) et les hypothèses émises sur les composantes susceptibles d'intervenir dans le résultat et celles inaccessible à la mesure. Cette expression mathématique est conçue dans un but bien défini qui peut être (Walter et Pronzato, 1994 ; Hubert, 1996 ; Viennet, 1997 ; Wiechert, 2002) : la connaissance structurelle, la simulation exploratoire, l'explication des phénomènes complexes, la détermination de grandeurs non mesurées à partir de mesures indirectes, la prédiction d'un comportement et l'exploitation des connaissances, la conduite et l'optimisation d'un procédé afin d'améliorer ses performances. Quelle que soit la finalité du modèle, elle devra être explicitée vu qu'elle influencera la démarche de modélisation (Walter et Pronzato, 1994). Ainsi, il est possible de catégoriser, les modèles en fonction de leur objectif en modèles prédictifs, modèles explicatifs, modèles de stockage de la connaissance et modèles associés à l'automatique (Bernard, 2004).

I.2.1. Généralités

I.2.1.1. Notion de système

Un système représente une partie de l'univers dont les éléments constitutifs, matériels ou non, sont en interrelation pour former un tout. Un système, défini de la sorte, n'est pas inerte et réagit aux sollicitations de l'environnement, regroupées sous le terme de variables ou de grandeurs d'entrée. Ces grandeurs sont divisées en deux groupes (Walter et Pronzato, 1994) :

- les *entrées ajustables*, qu'il est possible de maîtriser et notées u_a ,
- les *perturbations* ou *bruits*, qui sont des facteurs non maîtrisés et notés u_b .

Sous l'action de ces variables d'entrée, le système répond à travers ces variables d'état, z , qui traduisent les variations qu'il subit. Ces variables sont souvent non mesurables. Afin de les estimer un système de mesure est associé au système considéré. Il relie les grandeurs caractéristiques du vecteur de sortie, y , au vecteur d'état z . Généralement ces

variables caractéristiques, évoluent selon une variable indépendante le temps, notée t , et décrivent le système dans un état donné. Quant à la structure du système, elle est définie par un vecteur de paramètres θ . La Figure I.8, reprend cette description de l'approche du système (Viennet, 1997). D'après Richalet (1991), sur le système ainsi défini vient s'appliquer un modèle qui relie les diverses variables entre elles et éventuellement au temps. Il fait intervenir des équations mathématiques nécessitant l'estimation de paramètres.

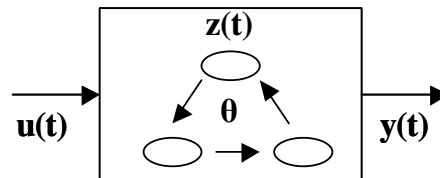


Figure I.8. Schéma simplifié d'un système, avec $u(t)$: vecteur des variables d'entrées, $y(t)$: vecteur des sorties mesurées, $z(t)$: vecteur d'état et θ : vecteur des paramètres.

I.2.1.2. Notion de modèle

Le modèle du système est une règle qui permet de calculer, à partir de l'entrée $u(t)$ du système, une grandeur $\hat{y}(t)$ qui ressemble le plus possible à $y(t)$, et ceci pour les modèles parallèles (Walter et Pronzato, 1994) .

Les modèles sont souvent classés en trois grandes catégories (Viennet, 1997 ; Banga *et al.*, 2003a) :

- les modèles de type “boîte blanche” ou modèles phénoménologiques (de connaissance), basés sur des bilans d'énergie et de matière et sur des relations cinétiques ou physiques ;
- les modèles de type “boîte noire” ou modèles comportementaux (empiriques), qui s'appuient sur des schémas de fonctionnement sans nécessiter de connaissance *a priori* tels les réseaux de neurones et les séries temporelles,
- les modèles de type “boîte grise” ou modèles hybrides, qui peuvent inclure une connaissance partielle.

Plusieurs types de modèles correspondent à ces trois principales catégories. Il est, néanmoins, possible de classer ces modèles par un nombre limité de termes. Ces termes séparent les modèles en deux classes contradictoires. Ces classes sont représentées dans le tableau I.4 (Chouakri, 1993 ; Hubert, 1996). La construction d'un modèle comporte plusieurs

étapes : la collecte des données expérimentales, le choix d'une structure et d'un critère de qualité pour le modèle, l'optimisation de ce dernier (Walter et Pronzato, 1994).

Tableau I.4 classification des différents types de modèle

structurés		non structurés	
prédictifs		non prédictifs	
boîtes blanches	boîtes grises		boîtes noires
verbaux		non verbaux	
mathématiques		non mathématiques	
linéaires		non linéaires	
statiques		dynamiques	
continus		discrets	
déterministes		stochastiques (probabilistes)	
distribués		agrégés	
		cybernétiques	
		flous	

I.2.2. Modélisation des procédés biologiques

I.2.2.1. Modèles simples inspirés du génie chimique

La complexité des procédés microbiologiques a souvent conduit à modéliser le bioréacteur comme une boîte noire (Roels, 1980), échangeant uniquement de la chaleur et certains composés avec l'environnement. En conséquence, dans les modèles macroscopiques classiques les cellules sont considérées uniquement comme des catalyseurs qui convertissent les substrats en produits. Ces biocatalyses sont représentées par un ensemble de macro-réactions reliant les substrats extracellulaires aux produits sans se soucier du comportement intracellulaire (Figure I.9). L'objet de la modélisation macroscopique est de déterminer des modèles simples qui sont utiles dans le domaine de la bioingénierie pour l'établissement d'algorithmes en ligne, assurant le contrôle, la commande et l'optimisation des procédés. Ainsi, des modèles cinétiques issus des bilans de matière sont établis par identification à partir des données expérimentales (Seok et Komisar, 2002).

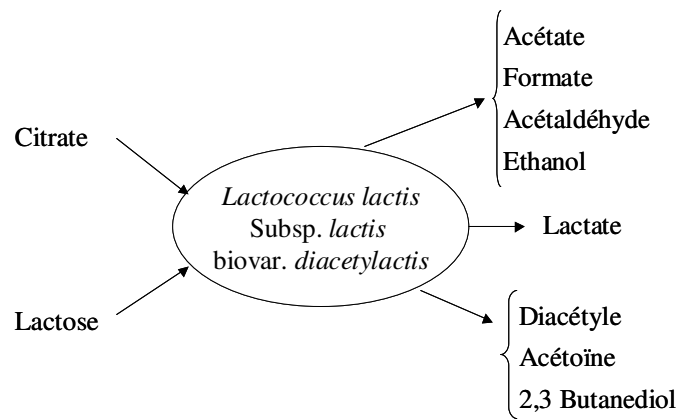


Figure I.9. Représentation macroscopique des réactions biochimiques chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (inspirée de Provost et Bastin, 2004).

Ces modèles sont considérés comme non structurés au sens de Bailey (1998). Une application de ce type de modèle mathématique simple concerne le procédé de croissance de *Candida utilis* dans un bioréacteur aéré (Tobajas *et al.*, 2003). Ce modèle est inspiré des modèles utilisés dans les procédés chimiques. Les bases du modèle sont : le calcul des coefficients stœchiométriques, l'étude cinétique qui permet de décrire la dynamique du système et le transfert de matière qui permet d'évaluer le $k_{L,a}$. Le schéma de la méthodologie, suivie dans la description de ce procédé est représenté dans la Figure I.10.

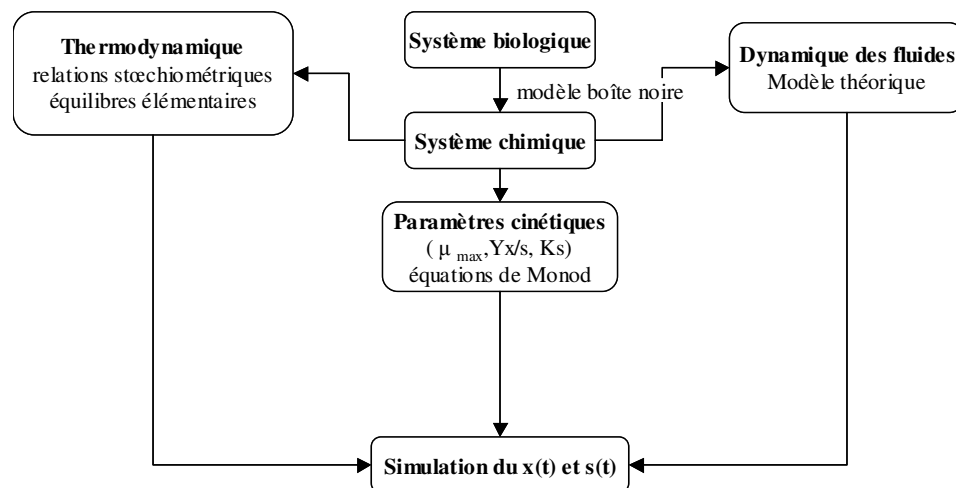


Figure I.10. Organigramme de la méthode de simulation d'un système biologique traité comme un système chimique (Tobajas *et al.*, 2003).

I.2.2.2. Modèles basés sur les phénomènes intracellulaires

L'inconvénient majeur des modèles inspirés du génie chimique est qu'il ne tiennent pas compte de ce qui se passe à l'intérieur de la cellule et du comportement dynamique des bioréacteurs, qui est différent de celui des réacteurs chimiques compte tenu de la régulation métabolique (Ramkrishna, 2003).

De ce fait, durant la dernière décennie, un grand effort a été fourni afin d'améliorer la description des cinétiques microbiennes (Nielsen et Villadsen, 1992), en introduisant la description métabolique du système. Cette dernière, prend en compte les composés non échangeables avec le milieu de culture, qui sont uniquement actifs dans la cellule, comme les enzymes, les intermédiaires métaboliques, les cofacteurs et même l'ATP (Noorman *et al.*, 1991). Afin de mieux appréhender ces modèles, plusieurs outils d'étude des voies métaboliques ont été mis en œuvre comme les matrices stoechiométriques et les matrices à « espace nul », les cônes convexes qui permettent à partir des vitesses de réactions connues d'estimer des vitesses de réactions non mesurables pour des systèmes supposés en état stationnaire (Schilling *et al.*, 1999). L'applicabilité de ces méthodes est illustrée par un modèle du métabolisme central dans les bactéries pourpres non soufrées (Klamt *et al.*, 2002). Cependant, ces outils ne permettent pas de modéliser le comportement dynamique du métabolisme chez les microorganismes (Noorman *et al.*, 1991 ; Schilling *et al.*, 1999).

C'est pourquoi, un grand intérêt a été porté au contrôle des bioréacteurs, qui doit se faire *via* des modèles qui s'adaptent à la régulation des comportements. En effet, la croissance des microorganismes sur des mélanges de substrats, montre différentes dynamiques de croissance, caractérisées par une utilisation simultanée ou préférentielle des sources carbonées. D'où le recours à la modélisation cybernétique qui offre un aperçu clair de la réponse cellulaire à l'histoire des conditions de cultures et aux différents états stationnaires possibles (Guardia *et al.*, 2000) ou par des modèles à base de réseaux de neurones, qui assurent la capture des dynamiques non linéaires des bioréacteurs conduits en mode discontinu alimenté (Tholudur et Ramirez, 1996 ; Chen *et al.*, 2004). La croissance d'*E. coli* à partir du glucose et un mélange d'acides organique a été expliquée, par un modèle cybernétique qui tient compte de la consommation diauxique (consommation séquentielle de sources carbonées chez la levure) et simultanée de ces produits, ainsi que des éventuelles variations de comportement survenant lors des changements des taux de dilution et des concentrations en substrats (Ramakrishna et Ramkrishna, 1996).

I.2.2.3. Modèles métaboliques inspirés du génome

Avec la révolution de la génomique en biologie, et, par conséquent, le séquençage du génome de nombreuses bactéries lactiques, durant ces dernières années, un nouveau type de modèles a vu le jour (Klaenhammer *et al.*, 2002 ; Smid *et al.*, 2005). Ce type de modèle est basé sur la construction du réseau métabolique entier des micro-organismes, provenant des séquences génomiques déjà identifiées, afin d'améliorer la compréhension du métabolisme (Schügerl, 2001 ; Siezen *et al.*, 2004). Ces modèles reposent sur une matrice stœchiométrique qui regroupe toutes les enzymes (protéome) en une dimension et tous les métabolites en une autre (métabolome). Ainsi, ces modèles tendent à améliorer le contrôle de la fermentation et à exploiter au mieux les performances métaboliques des cellules considérées comme usines à métabolites d'intérêt (Cell factory). Cette approche, au niveau génomique est plutôt intéressante, pour l'ingénierie de voies métaboliques biosynthétiques complexes mettant en jeu des métabolites clés (Smid *et al.*, 2005).

Dans ce sens, Oliviera *et al.* (2005), ont établi un modèle représentatif du métabolisme de *Lactococcus lactis*, en se basant sur la modélisation de tout le réseau de réactions métaboliques (621 réactions faisant intervenir 509 métabolites). Ainsi, ils ont pu modéliser la croissance et le passage d'un métabolisme homolactique à un métabolisme hétérolactique. Par conséquent, ce réseau métabolique peut être utilisé afin de mieux comprendre le fonctionnement le potentiel métabolique et afin de mettre en place des stratégies d'amélioration de production du diacétyle.

I.2.2.4. Modèles métaboliques dynamiques

La modélisation dynamique des bioprocédés concerne les procédés où les mesures d'espèces extracellulaires et la mesure de la biomasse constituent les seules données disponibles. Ces modèles sont établis à partir des réseaux métaboliques qui connectent les espèces extracellulaires, disponibles. Ce type de modélisation est basé sur trois étapes ; dans un premier temps une analyse des flux métaboliques (AFM) est réalisée afin de valider la structure du réseau métabolique, ensuite les flux élémentaires sont calculés et retranscrits en un ensemble de macro-réactions connectant les produits extracellulaires aux substrats et, finalement, un modèle dynamique classique est établi à partir des macro-réactions. Ainsi, Provost et Bastin (2004) ont appliqué cette approche à des cultures de cellules CHO. L'avantage de cette méthode réside en la détermination des concentrations en fonction du temps des espèces non mesurées. Cependant, son inconvénient majeur est qu'elle est

strictement limitée à la phase de croissance, en supposant que les cellules sont dans un état quasi statique.

Dans le même esprit, Van Impe *et al.* (2005), ont développé une nouvelle classe de modèle prédictifs de la croissance microbienne, qui reflètent les principaux phénomènes gouvernant les procédés de croissance cellulaire. Ces modèles expliquent la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire, qui est induite soit par une accumulation de produits toxiques soit par l'épuisement des substrats. Cette nouvelle classe de modèles, est applicable aussi bien au niveau macroscopique (population microbienne) qu'au niveau microscopique (cellule individuelle) et est plus facilement extrapolable à des situations réelles (Poschet *et al.*, 2004).

Concernant la production d'arômes laitiers, plusieurs modèles de type boîte noire sont présentés dans la littérature pour décrire la croissance de la souche, la consommation de substrats et la production de métabolites. Ces modèles font intervenir des paramètres, dont l'estimation nécessite un minimum de données recueillies sur le procédé de fermentation en plus des connaissances disponibles. Pour le choix d'une structure adéquate du modèle, il est impératif de déterminer les paramètres du modèle qui sont les plus proches possibles des paramètres réels inconnus. C'est pourquoi, il est utile de faire appel à la méthode d'identification paramétrique.

I.2.3. Modèles cinétiques de l'activité de *Lactococcus lactis*

Les modèles intéressant *Lactococcus lactis*, rencontrés dans la littérature sont présentés sous forme d'équations différentielles issues de bilans réalisés sur les bioréacteurs. Ces équations traduisent l'évolution des espèces présentes dans le milieu réactionnel.

Parmi ces modèles, celui présenté par Cachon et Diviès (1993a et 1993b), qui tient compte de la production du lactate par consommation du lactose et de son inhibition de la croissance bactérienne dans un procédé discontinu. Pour ce modèle, trois états physiologiques de la biomasse X totale sont pris en compte :

- X_i : population inactive,
- X_g : population capable de croissance et d'acidification,
- X_{ng} : population sensible uniquement à l'acidification.

Le modèle proposé est le suivant :

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu Xg, \text{ avec } \mu = \mu_{\max} \left[\frac{S}{Ks + S} \right] \left[\frac{Kp\mu}{Kp\mu + P} \right] \\ \frac{dXg}{dt} &= (\mu - Kng P) Xg \\ \frac{dXng}{dt} &= Kng PXg - KiXng \\ \frac{dXi}{dt} &= KiXng \\ \frac{dP}{dt} &= \pi_{\max} \left[\frac{S}{Ks + S} \right] \left[\frac{Kp\pi}{Kp\pi + P} \right] (Xg + Xng) \\ \frac{dS}{dt} &= -\frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \\ \frac{dCit}{dt} &= -qcit_{\max} \left[\frac{Cit}{Kcit + Cit} \right] (Xg + Xng) \\ \frac{dDA}{dt} &= -Y_{DA/cit} \frac{dCit}{dt} - \omega_{DA} (Xg + Xng) \phi \\ \text{avec } \phi &= 0 \text{ si } Cit > 0 \\ \phi &= 1 \text{ si } Cit = 0 \end{aligned}$$

Avec μ et μ_{\max} respectivement la vitesse spécifique de croissance de la biomasse et la vitesse spécifique maximale de croissance de la biomasse en (h^{-1}), S : concentration en lactose (g/L), P : concentration en produit lactate (g/L), Ks : constante d'affinité de la biomasse pour le lactose (g/L), $Kp\mu$: constante d'inhibition de la croissance par le lactate (g/L), kng : constante de transition entre la biomasse Xg et Xng (g/L/h), Ki : constante de transition entre la biomasse Xng et Xi (h^{-1}), π_{\max} : vitesse spécifique maximale de production du lactate (h^{-1}), $kp\pi$: constante d'inhibition de la production de lactate par lui même (g/L), $qcit_{\max}$: vitesse spécifique maximale d'utilisation du citrate (h^{-1}), Kcit : constante d'affinité du citrate (g/L), DA : concentration diacétyle/acétoïne, $Y_{DA/cit}$: rendement de production du diacétyle/acétoïne par rapport au citrate (g/g), ω_{DA} : constante de disparition du diacétyle/acétoïne (h^{-1}) et ϕ : nombre adimensionnel traduit la réduction du diacétyle/acétoïne en 2,3-butanediol dès que le citrate est totalement consommé.

Aussi, il est possible de citer le modèle de Boonmee *et al.* (2003), dérivé du modèle de Luedeking-Piret, qui tient compte de l'inhibition par le lactose et le lactate et la limitation du glucose, pour *Lactococcus lactis* NZ133. Pour une culture en mode continu le modèle est le suivant :

La vitesse de production de biomasse :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left[\frac{S}{(K_{sx} + S)} \right] \left[\frac{1 - (P - Pix)}{P_{mx} - Pix} \right] \left[\frac{Kix}{(Kix + S)} \right] X - DX$$

La vitesse de production du lactate :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + q_{p\max} \left[\frac{S}{(K_{sp} + S)} \right] \left[\frac{1 - (P - Pip)}{P_{mp} - Pip} \right] \left[\frac{Kip}{(Kip + S)} \right] X - DP$$

La vitesse d'utilisation du lactose :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) q_{s\max} \left[\frac{S}{(K_{ss} + S)} \right] \left[\frac{1 - (P - Pis)}{P_{ms} - Pis} \right] \left[\frac{Kis}{(Kis + S)} \right] X$$

Ce même modèle a été initialement validé en discontinu en considérant $S_0=D=0$.

S_0 : concentration initiale en lactose (g/L), D : taux de dilution (h^{-1}), K_s : constante de limitation du lactose (g/L), K_i : constante d'inhibition du lactate (g/L), π_{\max} : vitesse spécifique maximale de production du lactate (h^{-1}), $k_{p\pi}$: constante d'inhibition de la production de lactate par lui même (g/L), $q_{s\max}$: la vitesse spécifique maximale d'utilisation du lactose (g/g/h), $q_{p\max}$: la vitesse spécifique maximale de production du lactate, (g/g/h), $Y_{P/S}$: rendement de production du lactate par rapport à la consommation du lactose (g/g) et $Y_{X/S}$: rendement de croissance de la biomasse par rapport à la consommation du lactose (g/g), p_i : limite de concentration du lactate (g/L), p_m : concentration maximale de lactate (g/L), α : constante associée à la croissance dans le modèle de Luedeking-Piret (g/g) et β : constante non associée à la croissance dans le modèle de Luedeking-Piret (g/g).

I.3. Optimisation

I.3.1. Optimisation

I.3.1.1. Définition

L'optimisation est un processus, par le biais duquel, on cherche à déterminer des conditions opératoires variables qui tendent à améliorer une performance en se rapprochant d'une solution optimale. Le mot Optimum, vient du latin *Optimus*, qui veut dire « Meilleur » (Foulds L.R., 1981).

De ce fait, l'optimisation implique le changement de certaines conditions appelées variables de décision ou *variables du problème* (le degré de liberté du procédé), afin de maximiser ou de minimiser un critère bien défini (la productivité ou le rendement...), appelé *fonction objectif*. Parmi les solutions possibles, sont acceptables celles qui répondent à certaines exigences, appelées *contraintes* (Beveridge et Schechter R.S. 1970 ; Himmelblau, 1972 ; Fonseca et Fleming, 1993).

I.3.1.2. Méthodes d'optimisation

Les problèmes d'optimisation peuvent être de deux types : problèmes linéaires ou problèmes non linéaires (Foulds, 1981). Plusieurs méthodes d'optimisation sont proposées, afin de chercher les solutions optimales à ses problèmes. Dans le domaine du génie des procédés, les problèmes d'optimisation rencontrés le plus souvent sont des problèmes non linéaires. (Daroux et Latifi, 2001 ; Statnikov *et al.*, 2005).

Les méthodes d'optimisation peuvent être classées, de plusieurs manières. Ainsi, un premier type de classification permet de distinguer deux grandes familles de méthodes (Figure I.11.) :

- les méthodes d'optimisation statique,
- les méthodes d'optimisation dynamique.

Un second type de classification permet de distinguer les méthodes déterministes des méthodes non déterministes.

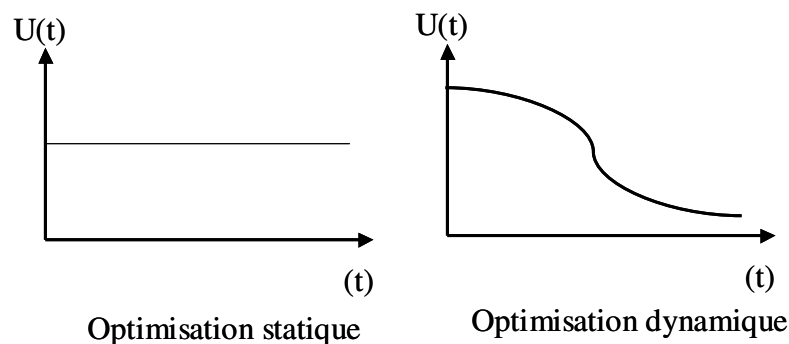


Figure I.11. Optimisation statique et dynamique où U est une variable qui dépend du temps et t est le temps.

I.3.1.2.1. L'optimisation statique

Lorsque les paramètres à optimiser prennent des valeurs constantes pendant toute la durée du procédé, l'optimisation est dite statique. Ce genre d'optimisation est très bien adapté à des procédés continus en régime permanent puisque le temps est une variable qui n'intervient pas. Etant donné qu'aucune grandeur physique n'évolue au cours du temps, si une valeur d'un paramètre est optimale à un instant t , cette même valeur le sera aussi à l'instant $t+dt$.

I.3.1.2.2. L'optimisation dynamique

Pour les procédés discontinu et discontinu alimenté, contrairement à un procédé continu en régime permanent, les grandeurs physiques évoluent au cours du temps. Il n'y a donc plus de raison que la valeur optimale prise par un paramètre à un instant t , soit encore optimale à l'instant $t+dt$. Il est nécessaire de trouver la trajectoire optimale (ou le profil) de ce paramètre au cours du temps. C'est ce qui est appelé l'optimisation dynamique. Cette méthode d'optimisation a été appliquée aux bioréacteurs conduits en mode discontinu alimenté tel que le rapportent dans la littérature Johnson (1987), Rani et Ramachandra (1999) et plus récemment Banga *et al.* (2003b).

Plusieurs méthodes permettent de résoudre ce type de problème :

- les méthodes variationnelles (Kirk, 1970),
- les méthodes du maximum de Pontriaguine (Pontriaguine *et al.*, 1974),
- la programmation dynamique de Bellman (Bellman, 1957).

Une optimisation dynamique est difficile à résoudre de manière analytique. Elle nécessite la résolution d'équations différentielles non linéaires. Ainsi, dans le cas des procédés de fermentation, l'évaluation des critères à maximiser ou à minimiser nécessite l'intégration d'un système d'équations différentielles non linéaires.

L'une des solutions est d'utiliser des méthodes qui calculent des gradients pour parvenir à la solution idéale. Ce genre de techniques demande des temps de calcul qui sont très importants. Une autre solution consiste à avoir recours à la paramétrisation c'est à dire à choisir les profils dans une famille donnée (Banga *et al.*, 2005). Cette méthode est appelée CVP (control vector parametrization). Il reste alors à optimiser de manière statique les paramètres de ce vecteur de contrôle. Par exemple, dans le cas d'une fermentation d'optimiser les valeurs de pH pour chacun des intervalles (Figure I.12.). Ainsi, cette technique consiste à transformer une optimisation dynamique à un paramètre en une optimisation statique à plusieurs paramètres plus facile à résoudre. Quand le mode de paramétrisation est défini, les différents paramètres doivent être optimisés.

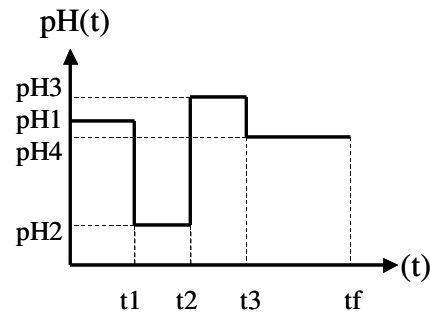


Figure I.12. Exemple de paramétrisation CVP appliquée à une optimisation de pH au cours d'un procédé de fermentation.

I.3.1.2.3. Méthodes d'optimisation déterministes (MOD)

Ces méthodes regroupent deux types de méthodes :

Les méthodes fondées sur le calcul

Les méthodes fondées sur le calcul se subdivisent en deux groupes (Culioli, 1994) :

- 1- les méthodes directes qui cherchent les optimums locaux en émettant des conjectures sur la fonction et en se déplaçant dans une direction dépendante de son gradient.
- 2- les méthodes indirectes qui cherchent à atteindre les extremums locaux en résolvant les systèmes d'équations, souvent non linéaires, en fixant, au vecteur nul, le gradient de la fonction étudiée (Najim et Muratet, 1987 ; Goldberg, 1994).

L'inconvénient de ces méthodes réside dans leur manque de robustesse. Ces méthodes convergent souvent vers des solutions locales (extremum le plus proche du point de départ) et dépendent de l'existence de dérivées. Ces méthodes sont utiles pour des problèmes d'optimisation unimodaux, où l'extremum est atteint rapidement. Néanmoins, de nombreux problèmes non linéaires sont multimodaux (existence de plusieurs solutions locales et probablement d'un seul optimum global).

Les méthodes énumératives

Pour les méthodes énumératives, dans un espace de recherche fini, ou infini discrétisé, l'algorithme scrute, les valeurs de la fonction à optimiser en chaque point de l'espace un par un. Bien que la simplicité de ce type d'algorithme soit attrayante quand le nombre de possibilités est petit, leur manque de robustesse et d'efficacité sont des inconvénients majeurs.

En effet, dans la pratique de nombreux espaces de recherche sont trop grands pour explorer les positions une par une (Goldberg, 1994).

Ces méthodes restent efficaces quand l'évaluation de la fonction est très rapide ou quand la forme de la fonction est connue et simple. De nombreux algorithmes déterministes ont été développés durant cette dernière décennie (Banga *et al.*, 2003a). Cependant, les cas plus complexes (temps de calcul important, fonctions non dérivables, fonctions bruitées...), seront souvent plus efficacement traités par des méthodes d'optimisation non déterministes ou stochastiques (MOS).

I.3.1.2.4. Méthodes d'optimisation non déterministes ou stochastiques (MOS) :

Les MOS, contrairement aux MOD ne nécessitent pas une approche systématique, mais font appel à des tirages de nombres aléatoires. Elles permettent d'explorer l'espace de recherche plus efficacement (Beasley, 1993). Leur principal avantage est qu'elles ne requièrent aucune connaissance de la structure du problème. Les systèmes sont considérés comme des boîtes noires. Les MOS englobent quatre types d'approches différentes (Banga *et al.*, 2003a).

Les méthodes stochastiques adaptatives

Elles ont été développées dans les domaines électriques, ingénierie de contrôle et des mathématiques appliquées. Ces méthodes ont ensuite été améliorées et appliquées aux problèmes dynamiques (Katsogiannis *et al.*, 1999 ; Magoulas *et al.*, 2002 ; Banga *et al.*, 2003a ; Vasudeva et Bhalla, 2004).

Les méthodes évolutionnaires

Par analogie à l'évolution biologique (Darwin), ces méthodes génèrent au fur et à mesure des itérations mathématiques des générations d'individus plus adaptées donc de meilleures solutions. Trois types de méthodes évolutionnaires existent : les algorithmes génétiques (Holland, 1975 ; Goldberg, 1991), la programmation évolutionnaire et les stratégies d'évolution.

Les méthodes de regroupement ou clustering

Elles sont dérivées du concept des méthodes ayant des multiples points de départ (méthodes locales initiées de plusieurs points de départ). Mais ces méthodes sont plus

efficaces et robustes que les méthodes multi-départs. En effet, elles localisent la proximité des optima locaux, évitant ainsi la répétition de la détermination de la même solution locale (Banga *et al.*, 2003a).

Le recuit simulé ou méthode de la descente la plus rapide:

Elles sont dérivées de celle du gradient. Elles consistent, à partir d'une solution initiale quelconque, à tester une nouvelle configuration en effectuant aléatoirement une modification simple de référence ou d'orientation d'une forme. Si cette modification entraîne une diminution de la fonction objectif, on l'adopte et on réitère le processus sur la nouvelle configuration. Cette méthode issue de la thermodynamique s'inspire des méthodes d'amélioration itérative (Maouche *et al.*, 2000).

A côté de ces méthodes, ces dernières années ont vu apparaître d'autres méthodes dites métaheuristiques basées sur d'autres phénomènes biologiques ou physiques avec de l'optimisation combinatoire (Banga *et al.*, 2003a).

Ces diverses méthodes, nous confrontent à une question cruciale : quelle est la meilleure méthode ? Bien que cette question, fait depuis toujours l'objet d'un grand débat, il n'existe pas une méthode idéale pour un problème d'optimisation globale (Wolpert et Macready, 1997).

I.3.2. Optimisation multicritère (multiobjectif)

I.3.2.1. Introduction

Une industrie, quel que soit son champ d'application, cherche toujours au minimum à maximiser sa productivité (quantité de produit formé / durée de production), à respecter les normes de qualité et à minimiser le coût de production. Par conséquent, l'optimisation de tels procédés est implicitement multicritère ; elle implique l'optimisation de plusieurs critères qui sont souvent antagonistes et qui tiennent compte de plusieurs spécifications du système et des contraintes. Pour des problèmes d'optimisation multicritère (OM), il est improbable que tous les critères soient optimisés par une stratégie unique (Tan *et al.*, 2003).

Pendant la dernière décennie, de nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine de l'OM, pour diverses applications. Une partie de ces travaux est présentée dans le tableau I.5.

Tableau I.5. Application de l'optimisation multicritère.

Champs d'activité	Applications
Génie chimique	Systèmes de polymérisation (Tsoukas <i>et al.</i> , 1982 ; Garg et Gupta, 1999, Massebeuf, 2000 ; Silva et Biscaia, 2003).
Procédés alimentaires	Production de plats cuisinés surgelés (Shaw et Fleming, 1996) ; Séchage (Kiranoudis et Markatos, 2000).
Biotechnologie	Production d'éthanol par fermentation (Wang and Sheu, 2000) ; production d'acide gluconique (Halsall-Whitney <i>et al.</i> , 2003) ; production de lysine par fermentation et production d'une protéine induite par une bactérie recombinante (Sarkar et Modak, 2005). Installations discontinues de production de plusieurs produits pharmaceutiques et alimentaires (Dietz <i>et al.</i> , 2005 ; Dietz <i>et al.</i> , 2006).

I.3.2.2. Définitions

L'optimisation classique monocritère conduit à l'obtention d'une solution unique, alors que, pour l'optimisation multiobjectif, les différents critères n'ont généralement pas leur optimum respectif au même endroit. Par conséquent, il n'existe pas forcément une meilleure solution respectant tous les objectifs. En effet, la présence de multiples critères dans un problème implique l'obtention d'un ensemble de solutions, largement connues comme les solutions optimales au sens de Pareto (1986), où chaque élément de solution le long du front de Pareto ne peut être amélioré qu'en dégradant au moins un élément des autres objectifs.

Afin de formuler correctement un problème d'optimisation multicritère, il convient de définir le nombre de variables d'actions (k), le nombre d'objectifs (n) et le nombre de contraintes (q). Ainsi, deux espaces de travail peuvent être définis : l'espace des variables d'action et l'espace des fonctions objectifs.

I.3.2.3. Procédure de groupement multicritères simples

Les problèmes d'OM, doivent satisfaire des objectifs multiples, souvent antagonistes, ce qui implique un compromis. De ce fait, deux classes de méthodes existent pour étudier ces problèmes : par combinaison de critères et par formulation de contraintes. La première classe de méthodes définit plusieurs fonctions objectif f_i , traduisant les différents critères définis, et les combine au sein d'une *fonction d'adaptation* $F(x)$ (Fonseca et Fleming, 1993), tandis que la deuxième considère un seul critère comme fonction objectif et transforme tous les autres, en contraintes.

I.3.2.3.1. Par combinaison des critères :

Une des techniques les plus simples, consiste à construire une combinaison linéaire des critères en accordant des poids à chacun de ceux-ci (Fonseca et Flemeing, 1993 ; Oliveira *et al.*, 1998 ; Trelea *et al.*, 2004). Le problème peut être exprimé par l'expression suivante où les a_i , sont les poids associés aux critères f_i :

$$F(x) = \sum_i a_i f_i(x)$$

L'inconvénient majeur de ce type d'approche, est que la solution du problème dépend du choix des poids attribués aux objectifs. Aussi, cette méthode néglige la portion concave du profil de Pareto (Das and Dennis, 1997).

Une autre approche consiste à combiner les critères en les multipliant :

$$F(x) = \prod_i (f_i(x))^{a_i}$$

Une autre technique dite de « cible » permet de se rapprocher, en terme de distance L_p , d'un optimum théorique (Ignizio, 1981).

I.3.2.3.2. Par formulation de contraintes :

Cette approche consiste à optimiser la réponse, considérée comme la plus importante, et à transformer les autres objectifs en contraintes (Loughlin et Ranjithan, 1997, Massebeuf, 2000). Le problème se ramène à l'expression suivante :

$$F(x) = f_c(x) \text{ où } c \in [1, n]$$
$$f_i(x) \leq b_i \quad \forall i \neq c$$

f_c étant la fonction à optimiser et les b_i , les valeurs seuils à ne pas dépasser pour chacun des (n-1) critères considérés comme contraintes.

L'inconvénient de cette méthode est la justification du choix de la fonction à optimiser par rapport à celles établies comme contraintes (Sarkar et Modak, 2005).

I.3.2.4. Approximation du domaine de Pareto par les algorithmes évolutionnaires

Les algorithmes évolutionnaires (AE) ont été reconnus comme des bons outils de résolution des problèmes d'OM (Knowles et Corne, 2000 ; Deb *et al.*, 2002). Contrairement aux méthodes classiques de programmation mathématique, les AE permettent d'obtenir un ensemble de solutions optimales au sens de Pareto en un temps plus réduit (Fonseca et Fleming, 1995 ; Srakar et Modak, 2005). Un autre avantage, est que les AE sont moins sensibles à la forme du front de Pareto (Coello, 1999).

Par conséquent, lors de la dernière décennie, plusieurs algorithmes évolutionnaires d'optimisation multicritère ont été développés. Ces AE se divisent en deux groupes : les approches non basées sur la domination au sens de Pareto et celles qui le sont.

I.3.2.4.1. Les approches non basées sur l'optimalité de Pareto

Ces approches n'incluent pas directement le concept de l'optimalité de Pareto. Le premier algorithme génétique (AG) proposé pour les POM, est VEGA (Vector Evaluated Genetic Algorithm). Cet algorithme a été introduit par Schaffer (1985), qui a traité les objectifs multiples séparément en évolution, et a obtenu un ensemble de solutions non dominées en une fois. Malgré la simplicité de mise en œuvre de cette méthode et les bons résultats qu'elle a pu fournir, elle ne permet que l'obtention de solutions extrêmes au niveau du domaine de Pareto (Richardson *et al.*, 1989). Par la suite, plusieurs chercheurs ont proposé d'autres algorithmes de ce type, Coello et Christiansen (1999) ont proposé deux méthodes basées sur l'agrégation des fonctions et l'optimisation min-max avec l'AE appelé MOSES (Multiobjective Optimization of Systems in the Engineering Sciences).

I.3.2.4.2. Les approches basées sur l'optimalité de Pareto

Ces méthodes utilisent explicitement le concept d'optimalité de Pareto. De nombreux AE, adaptés aux problèmes d'OM, ont été développés à partir des deux idées suggérées par Goldberg (1989) : la dominance de Pareto et le niching. La dominance au sens de Pareto est utilisée afin d'exploiter l'espace de recherche en direction du front de Pareto alors que les techniques de niching explorent l'espace de recherche le long du front, pour préserver la diversité.

Les algorithmes les plus connus dans cette catégorie sont :

MOGA: Multiple Objective Genetic Algorithm (Fonseca et Fleming, 1993),

NPGA: Niche Pareto Genetic Algorithm (Horn *et al.*, 1994),

NSGA: Nondominated Sorting in Genetic Algorithm (Srinivas et Deb, 1995),

SPEA: Strength Pareto Evolutionary Algorithm (Zitzler et thiele, 1999),

MOEA: Multi-Objective Evolutionary Algorithm (Tan *et al.*, 2001).

Nous pouvons citer aussi, l'algorithme évolutionnaire exploratoire multiobjectif qui incorpore les caractéristiques de la recherche tabu, qui évite les optima locaux (Tan *et al.*, 2003).

Au cours de ce travail, nous allons utiliser un type d'algorithme évolutionnaire qui a été développé au niveau de notre laboratoire (Fonteix *et al.*, 2005), ainsi que la notion de domination au sens de Pareto, qui seront développés dans la partie matériel et méthodes.

II. Matériel et méthodes utilisés

Introduction

Ce chapitre est subdivisé en plusieurs parties qui abordent le matériel et les différentes techniques analytiques utilisées lors du suivi des expériences.

Les fermentations réalisées mettent en œuvre une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* dans des conditions opératoires régulées. Elles se déroulent, dans un premier temps, en réacteur discontinu et, dans un deuxième temps, en réacteur discontinu alimenté.

II.1. Matériel

II.1.1. Souche

La souche utilisée, au cours de cette étude, pour la production d'arômes est *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, commercialisée sous la désignation de PAL D DIA A par Standa Industrie (Caen).

II.1.2. Réactifs

II.1.2.1. Réactifs pour milieux de culture

Lait écrémé en poudre	Régilait	Saint-Martin-Belle-Roche
D(+) lactose monohydraté	Merck	Darmstadt, Allemagne
Peptone de caséine plus	Organotechnie	La Courneuve
Extrait de levure	Organotechnie	La Courneuve
Acétate de sodium	Acros-Organics	New-Jersey, E.U.A.
Acide citrique anhydre	Merck	Hohenbrunn, Allemagne
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	Merck	Darmstadt, Allemagne
Hydroxyde de sodium	Merck	Darmstadt, Allemagne

II.1.2.2. Réactifs pour analyses

Acide formique	Fluka	Buchs, Suisse
Acide sulfurique	Merck	Nogent-sur-Marne
D(+) lactose monohydraté	Merck	Darmstadt, Allemagne
Acide citrique monohydraté	Merck	Hohenbrunn, Allemagne
Ethanol absolu	Fluka	Buchs, Suisse
Acide acétique	Fluka	Buchs, Suisse

Chlorure de sodium	Prolabo	Paris
Acide pyruvique	Fluka	Buchs, Suisse
Acide lactique L(+)	Fluka	Buchs, Suisse
Acétaldéhyde	Fluka	Buchs, Suisse
Diacétyle (2,3-butanedione)	Fluka	Buchs, Suisse
Acétoïne (3-hydroxybutane-2-one)	Fluka	Buchs, Suisse
2,3-butanediol S,S, R,R, et Méso	Fluka	Buchs, Suisse
éthyl-2-acétoxy-2-méthylacétoacétate	Sigma-Aldrich	Milwaukee, WI, E.U.A.
Eau milliQ	Millipore	Saint Quentin en Yvelines

II.1.2.3. Effluents gazeux

Azote de qualité R	Messer	Mitry Mory (77)
Azote de qualité U	Messer	Mitry Mory (77)
Hydrogène de qualité U	Messer	Mitry Mory (77)

II.1.3. Matériel d'analyse

II.1.3.1. Chromatographie liquide haute performance

Chromatographe liquide haute performance

M.6000 A	Waters	Milford, E. U. A.
↻ Réfractomètre différentiel R 410	Waters	Milford, E. U. A.
↻ Spectrophotomètre Lambda-Max 481	Waters	Milford, E. U. A.
↻ Injecteur automatique WISP	Waters	Milford, E. U. A.
↻ Four pour colonne C.L.H.P. HTR	Waters	Milford, E. U. A.
↻ Pompe Spectraphysics P 1000	TSP	Riviera Beach, E. U. A.
↻ Colonne Polypore H (PPH - 257)	Brownlee Lab	Foster City, E. U. A.
↻ Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma	Biosystèmes	Dijon

II.1.3.2. Chromatographie en phase gazeuse

Chromatographe en phase gazeuse	Perichrom	Saulx-les-Chartreux (91)
↻ Vanne d'injection gazeuse automatique		
↻ Détecteur à ionisation de flamme		

- ↵ Détecteur à capture d'électron EC4
- ↵ Coffret d'automatisme, sélection des capteurs
- ↵ Colonne semi-capillaire 50 m, Ø int. 0,53 mm
PEG 40 M, film 1 µm
- ↵ Station d'acquisition et de traitement des
données équipée du logiciel WINILIBAB III
- ↵ Membrane PTFE pur (Ø 25 mm) Sartorius Göttingen, Allemagne

II.1.4. Matériel de préparation de culture

Etuves bactériologiques	Astel	Château Gontier
Etuve à matière sèche, Memmert	Bioblock Scientific	Strasbourg
Hotte à flux laminaire vertical Bio48	Faster	Ferrara, Italie
Autoclave (100 l)	Science Médecine Industrie	Montpellier

II.1.4.1. Fermenteurs de 3 L

Fermenteurs de 3 litres (volume utile 2 litres)	Applikon	Schiedam, Pays Bas
↵ Boîtier de régulation ADI 1030	Applikon	Schiedam, Pays Bas
↵ Système d'agitation ADI 1016	Applikon	Schiedam, Pays Bas
↵ Électrode pH	Ingold	Zürich, Suisse
↵ Pompes péristaltiques 7521-35 et 7544-20	Masterflex	Chicago, E. U. A.
↵ Bain Thermo Circulator ADI 1018	Applikon	Schiedam, Pays Bas

II.1.4.2. Fermenteur de 20 L

Fermenteurs de 20 litres (volume utile 18 litres)	Applikon	Schiedam, Pays Bas
↵ Boîtier de régulation ADI 1030	Applikon	Schiedam, Pays Bas
↵ Système d'agitation ADI 1016	Applikon	Schiedam, Pays Bas
↵ Electrode pH	Ingold	Zürich, Suisse
↵ Pompes péristaltiques 7521-35 et 7544-20	Masterflex	Chicago, E. U. A.
↵ Bain Thermo Circulator ADI 1018	Applikon	Schiedam, Pays Bas

II.1.5. Matériel divers

Microscope LABORLUX 12	Leitz	Wetzlar, Allemagne
pH-mètre PHM62 Standard	Radiometer	Copenhague, Danemark
Balance de précision AT 200	Mettler	Greifensee, Suisse
Balance Precisa 6000D	PAG Oerlikon	Zürich, Suisse
Pipettes automatiques	Biohit Proline	
Cartouche OXYSORB	Messer Griesheim	Saint Denis
Tube 5 mL avec septum Vacutainer®	Becton-Dickinson	Meylan
Membranes filtrantes en acétate de cellulose (diamètre 25 mm; seuil de coupure : 0,2 μ m)	Millipore	Molsheim
Millex GS		
Filtres 0,2 μ P.T.F.E. pour gaz Acrovent™	PALL Gelman Lab.	Ann Arbor, MI, E.U.A.
Bain Marie Polystat 11.33197	Bioblock Scientific	Strasbourg
Vortex Heidolph Top-mix	Bioblock Scientific	Strasbourg

II.2. Mise en œuvre de la fermentation

II.2.1. Préparation de la culture

La préparation de la fermentation comprend trois étapes : une de conservation de la souche utilisée, une de préparation des précultures et, enfin, une de préparation du fermenteur lui-même.

II.2.1.1. Préparation du milieu semi-synthétique Y

Les milieux semi-synthétiques présentent de nombreux avantages qui justifient leur large utilisation comme milieux d'études cinétiques. Leur composition facilement modifiable et leur transparence permettent généralement un suivi simple et précis des fermentations. Le milieu Y, employé lors de ce travail, est un milieu semi-synthétique dérivé du milieu MRS (De Man *et al.*, 1960), qui a été mis au point au laboratoire par Stien (1993) à la suite d'une série d'essais sur d'autres milieux naturels (lait, lactosérum) et semi-synthétiques.

Composition d'1 L de milieu semi-synthétique Y :

- 10 g de D(+) Lactose monohydraté
- 10 g de peptone de caséine
- 5 g d'extrait de levure
- 5 g d'acétate de sodium anhydre

- 1,5 g d'acide citrique monohydraté
- 0,1 g de sulfate de magnésium heptahydraté
- compléter jusqu'à 1 L avec de l'eau osmosée après avoir amené le pH à 6,5.

II.2.1.2. Conservation de la souche

Les souches sont conditionnées sous forme lyophilisée pure dans des sachets destinés à l'inoculation directe des cuves de levains. Régulièrement, un sachet de souche pure commerciale est utilisé pour l'inoculation de 1 L de lait écrémé reconstitué stérile. Cette culture en fiole d'Erlenmeyer est incubée pendant 15 h à 30 °C. 5 mL de cette première culture sur lait sont introduits stérilement dans des fioles contenant 200 mL de milieu Y (pH 7) et à nouveau, l'ensemble est incubé à 30 °C pendant 8 h.

Les stocks de souches destinés à la préparation des inoculum de fermentation sont préparés à partir de ces cultures sur milieu Y. Une série de tubes contenant du milieu Y stérile (pH 7) est inoculée à 10 % à partir des fioles d'Erlenmeyer de seconde culture. L'ensemble des tubes est placé pendant 5 heures à 30 °C puis est rapidement congelé à -18 °C. La conservation des souches pures sous cette forme est limitée à deux mois.

II.2.1.3. Préparation des précultures

II.2.1.3.1. Réacteur de 3 L

Pour les cultures en réacteur de 3 litres, un volume de culture pure décongelée correspondant à 5 % du volume de préculture est transféré dans une fiole de milieu Y stérile contenant 12,5 % du volume de milieu final dans le réacteur. Après incubation à 30 °C pendant 15 h, cette fiole permet d'inoculer le réacteur.

II.2.1.3.2. Réacteur de 20 L

L'élaboration des précultures se fait en deux étapes. Dans un premier temps, deux fioles d'Erlenmeyer contenant 200 mL de milieu Y stérile sont inoculées avec 10 mL de culture décongelée chacune et incubées à 30 °C pendant 15 h. En considérant, que le réacteur contient 10 L de milieu stérile avant inoculation, 70 mL sont prélevés du pré-inoculum et seront transférées dans chacune des deux bouteilles Schott de 2 L contenant 1,4 L de milieu Y stérile.

II.2.1.3.3. Préparation des ajouts ponctuels

A la fin de certaines expériences, seront ajoutés dans le milieu de culture 100 mL de

solutions de citrate ou de citrate et lactose de telle sorte que l'on ait dans le milieu de culture, approximativement, une concentration double de celle présente dans le milieu Y initial, c'est-à-dire, 20 g/L de lactose et 3 g/L de citrate. Ces ajouts se font en procédant de la même manière que pour l'inoculation du réacteur, par l'utilisation de solutions stériles.

II.2.1.4. Préparation du fermenteur et conduite des cultures

II.2.1.4.1. Culture discontinue en réacteur de 3 L

Pour l'ensemble des fermentations réalisées en réacteur de 3 litres, le volume initial de milieu Y est fixé à 1400 mL. Après ajout des 200 mL de pré-culture en fiole, un volume total de 1600 mL de culture est ainsi préparé. Le schéma complet de l'installation est présenté dans la figure II-1. Dans le cas de cultures à pH régulé, le pH est maintenu à la valeur de consigne par ajout de soude 2 N. Le dispositif permet une régulation à 0,02 unité pH près. La température est maintenue à la valeur de consigne par circulation d'eau thermostatée au sein de la double enveloppe entourant le réacteur. Un cryo-thermostat commandé par le bio contrôleur permet une régulation de la température du milieu à 0,2 °C près. Le système d'agitation est composé de deux contre-pales fixes et de trois turbines Rushton fixées sur un arbre entraîné par un moteur placé au dessus de la cuve. La vitesse de rotation est fixée à 250 tr/mn. Les conditions d'oxygénation sont régulées par un débitmètre massique contrôlant le taux d'oxygène dissous dans le milieu et d'une électrovanne assurant l'injection d'azote dans le milieu. Afin d'éviter les surpressions ou dépressions liées à la production de CO₂ et aux prélèvements d'échantillons, une sortie de gaz stérile est aménagée.

II.2.1.4.2. Culture discontinue en réacteur de 20 L

Le déroulement des expériences réalisées en réacteur discontinu de 20 L est semblable à celui des fermentations conduites en réacteur discontinu 3 L. La préparation du fermenteur est identique excepté pour ce qui est de la stérilisation. Celle-ci est faite sur place par injection de vapeur. Cependant la température et la durée de stérilisation sont les mêmes que pour l'autoclavage des fermenteurs de 3 L.

II.2.1.4.3. Culture discontinue alimentée en réacteur de 20 L

La conduite des cultures en discontinu alimenté dans le fermenteur de 20 L est semblable à celle des fermentations menées en réacteur discontinu. La principale différence réside en la mise en place de deux pompes d'alimentation en substrats : une alimentation en

milieu Y avec citrate comme unique source carbonée (120 g/L) et une deuxième alimentation en solution concentrée en lactose (400 g/L).

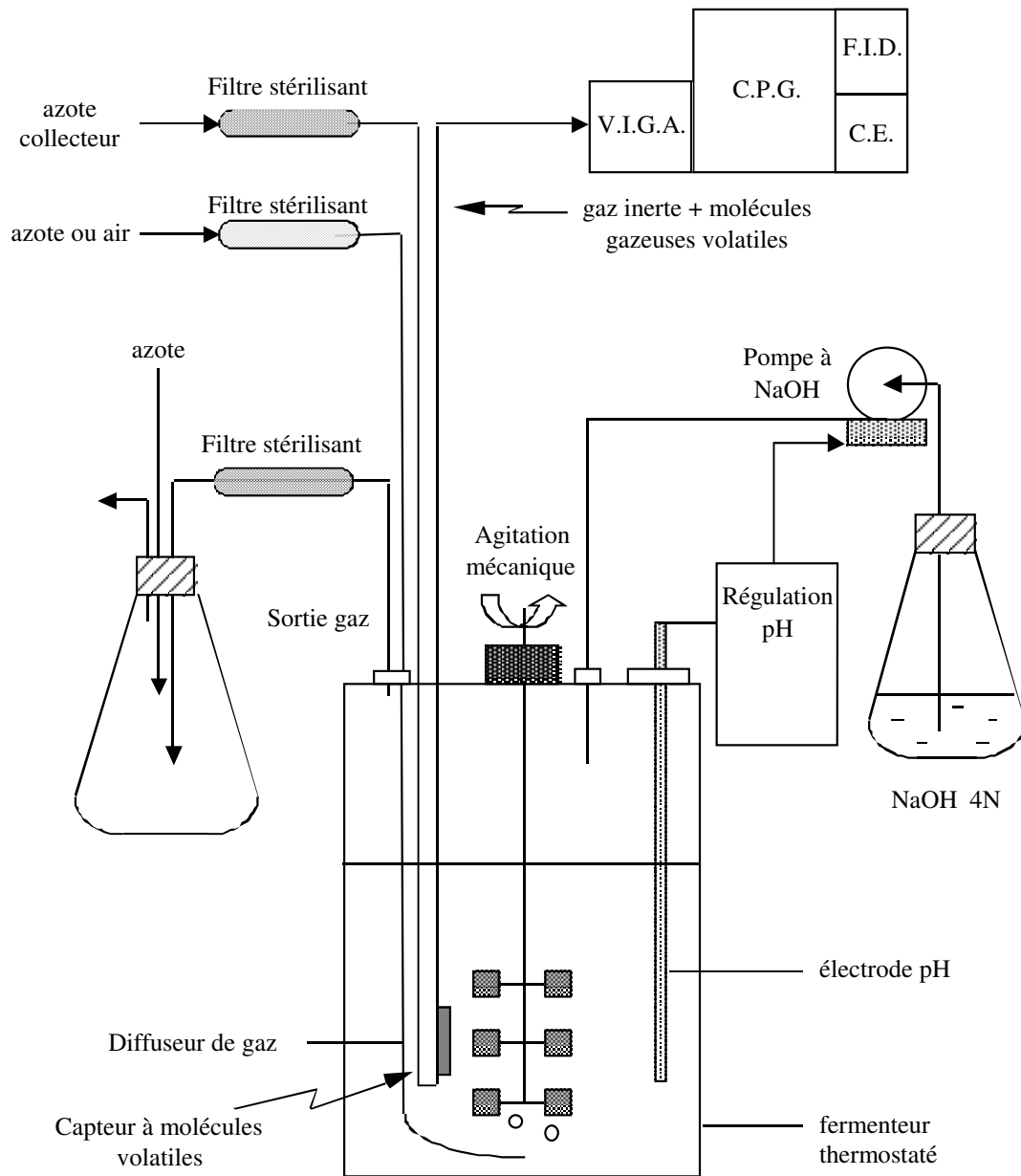


Figure II.1. Schéma du réacteur de 3 et de ses accessoires (d'après Stien, 1993).

II.2.2. Techniques analytiques

Les différents échantillons du milieu de culture, obtenus en ligne ou hors ligne, sont analysés à l'aide des techniques analytiques décrites ci-après. L'objectif est de déterminer les concentrations de chaque échantillon en : biomasse, lactose, citrate, acétate, formate, pyruvate, lactate, α -acétolactate, acétoïne, 2,3-butanediol, diacétyle, acétaldéhyde et éthanol.

II.2.2.1. Mesure de la biomasse

Le suivi de l'évolution de la biomasse est fait en s'appuyant sur deux méthodes : la méthode turbidimétrique et la méthode gravimétrique.

II.2.2.1.1. Méthode turbidimétrique

Toute solution colorée ou comportant des cellules en suspension possède la propriété d'absorber une partie de l'intensité d'un faisceau lumineux qui la traverse en ligne droite. Il est alors possible de mesurer la quantité de lumière absorbée ou absorbance. Le principe de la mesure est fondé sur la proportionnalité qui existe entre l'absorbance et la concentration de la solution en dessous d'un certain seuil appelé limite de linéarité. Ainsi, dans la zone de linéarité, on peut écrire :

$$DO = k \times X$$

avec DO, l'absorbance ou densité optique,

k, le coefficient d'absorption (L/g) et,

X, la concentration de la solution (g/L) (cellules en suspension).

La mesure doit être réalisée avec une lumière de longueur d'onde choisie selon le type de solution analysée. Dans des études antérieures, il a été montré que la limite supérieure de linéarité est de 0,3 unité de DO, et que la longueur d'onde pour laquelle le milieu Y, dépourvu de cellules, absorbe le moins est de 650 nm (Stien, 1993). La courbe d'étalonnage représente les mesures de concentrations de biomasse, réalisées par gravimétrie, en fonction des mesures d'absorbance pour la souche PAL D DIA A. La valeur du coefficient k est donnée par la pente de la droite.

Ainsi, la DO de chaque échantillon est lue, hors ligne, à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm, immédiatement après avoir été prélevé du milieu de culture. Dans le cas où la DO lue serait supérieure à 0,3 nm, les échantillons seront dilués avec de l'eau physiologique (solution NaCl à 9 g/L) afin d'atteindre la gamme de linéarité.

II.2.2.1.2. Méthode gravimétrique

Cette méthode permet de corrélérer la DO avec la concentration en cellules, en termes de masse de cellules sèches par unité de volume de culture.

Pour cela, il faut réaliser plusieurs mesures de DO à partir de dilutions d'une même préculture. Dans un premier temps, des dilutions successives sont réalisées à partir de la préculture. Une ébauche de courbe d'étalonnage représentant la dilution en fonction de la DO

est tracée afin de repérer la zone de linéarité. Ensuite, en se basant sur ces résultats, il est possible d'estimer les dilutions complémentaires à faire à partir de la même préculture, pour préciser cette zone de linéarité grâce à l'obtention de points supplémentaires au niveau de la courbe d'étalonnage.

Enfin, immédiatement après les mesures de DO, 40 mL de la préculture (conservée entre-temps à 4 °C) est filtrée sous vide à travers une membrane de filtration en acétate de cellulose, préalablement placée dans un dessiccateur 24 h avant son utilisation et pesée. Ensuite, la membrane contenant les cellules est placée dans une étuve à 105 °C pendant au moins 24h. Après refroidissement dans un dessiccateur, la membrane est, de nouveau, pesée, et il en est déduit la masse de cellules sèches contenues dans 40 mL de préculture. Cette tâche est répétée trois fois. La courbe d'étalonnage obtenue à partir de cette méthode est représentée dans la figure II.2.

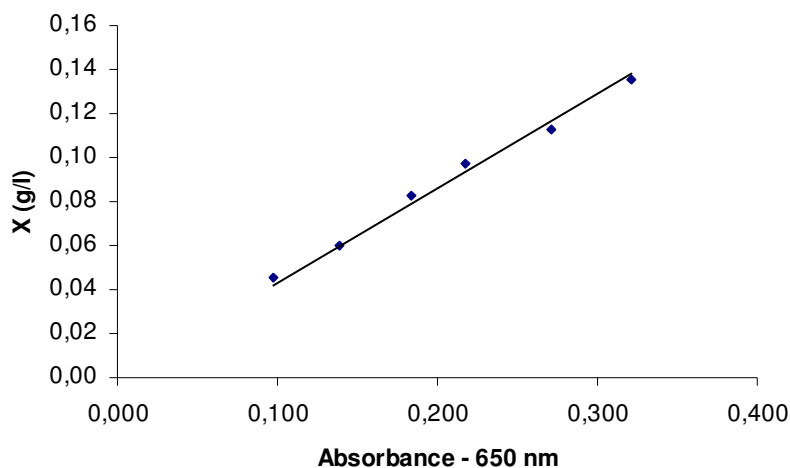


Figure II.2. Relation obtenue sur milieu Y entre l'absorbance à 650 nm d'une culture de souche PAL D DIA A et sa concentration en matière sèche cellulaire.

II.2.2.2. Mesure des concentrations en lactose, acides organiques, acétoïne et 2,3-butanediol

Le dosage hors ligne du lactose, de l'acétoïne, du 2,3-butanediol, de l' α -acétolactate et des acides acétique, formique, pyruvique, lactique et citrique, présents dans le milieu de culture est effectué par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La colonne chromatographique utilisée est une colonne polyphore H qui effectue la séparation de différents composés par un mécanisme mixte d'exclusion et d'échange d'ions. Deux détecteurs sont placés à la sortie de la colonne : le réfractomètre différentiel et le

spectrophotomètre UV. Les signaux issus des détecteurs sont reçus par une station d'acquisition et de traitement de données, équipée du logiciel Chroma (Biosystèmes).

II.2.2.2.1. L'échantillonnage et l'analyse hors ligne des échantillons

Les échantillons sont prélevés du milieu de culture toutes les heures à l'aide d'une seringue. Les cellules libres dans ces échantillons, sont séparées du milieu de fermentation afin de récupérer le filtrat pour analyse. La séparation est réalisée par filtration sur membrane d'acétate de cellulose Millipore™ de diamètre 25 mm et de seuil de coupure de 0,2 µm. Les échantillons ainsi préparés sont analysés directement en CLHP afin d'éviter la dégradation de l' α -acétolactate. Lorsque l'analyse n'est pas possible immédiatement, les échantillons sont stockés à -20°C. Afin d'évaluer la perte occasionnée par le stockage, les cinétiques de décarboxylation de l' α -acétolactate sont étudiées en fonction des conditions de conservation.

Le lactose, le 2,3-butanediol sont détectés par le réfractomètre différentiel alors que l'acétoïne, l' α -acétolactate et les acides organiques sont repérés au niveau du spectrophotomètre UV à 210 nm.

Les paramètres d'utilisation du CLHP sont les suivants : le volume injecté est de 10 µL, l'éluant est le H₂SO₄ (0,04 N), la température du four est fixée à 30 °C et le débit de la pompe est de 0,9 mL/mn

II.2.2.2.2. L'étalonnage

L'étalonnage est réalisé à l'aide des solutions standard des composés à analyser, sauf en ce qui concerne la solution d' α -acétolactate qui doit être préparée à partir d'un précurseur selon le protocole décrit ci-dessous. Une injection de 10 µL de chacune des solutions étalons permet l'élaboration, au niveau du logiciel Chroma, d'une droite d'étalonnage passant par l'origine pour chacun des composés analysés.

Préparation des solutions d'étalonnage

Quatre solutions d'étalonnage sont préparées à partir de solutions standard de chacun des composés en question, en fonction de la concentration désirée. Les valeurs des concentrations retenues pour l'élaboration de 100 mL de chacune de ces solutions sont réunies ci-dessous :

- Solution étalon 1 : solution d'acides organiques

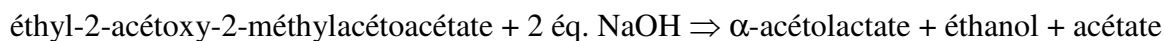
Acétate	5 g/L
Formate	0,5 g/L
Pyruvate	0,5 g/L
Lactate	10 g/L
Citrate	5 g/L

- Solution étalon 2 : solution de lactose à 10 g/L
- Solution étalon 3 : solution d'acétoïne à 0,5 g/L
- Solution étalon 4 : solution de 2,3-butanediol à 0,5 g/L

1 mL de chaque solution étalon est congelé à -20 °C dans des pipettes Eppendorf et décongelé avant chaque utilisation.

Préparation de la solution étalon d' α -acétolactate

L' α -acétolactate est une molécule instable, non disponible dans le commerce. Il est nécessaire de la préparer extemporanément avant tout étalonnage. Le précurseur utilisé est l'éthyl-2-acétoxy-2-méthylacétoacétate. Il est hydrolysé en présence de deux équivalents de soude pour donner l' α -acétolactate, l'éthanol et l'acétate selon la réaction suivante :



Du fait de l'instabilité de l' α -acétolactate, la réaction est conduite dans un tube hermétiquement fermé et conditionné sous atmosphère d'azote. La soude 0,1M est préparée 30 mn avant la réaction et placée sous un courant continu d'azote afin d'éliminer au maximum la présence d'oxygène. 40 mg du précurseur sont pesés exactement et mélangés dans le tube avec 3960 μ L de soude. La réaction est réalisée à température ambiante (25 °C) et sous agitation constante et rapide pendant 30 mn. De cette façon, un rendement proche de 100 % est atteint. On obtient une solution d'environ 4 mL contenant de l'éthanol, de l'acétate et de l' α -acétolactate. Le tableau II.1 fait apparaître la composition de la solution pour un rendement de 100 % (d'après Muniglia, 2001).

Tableau II.1. Composition de la solution étalon après réaction de l'éthyl-2-acétoxy-2-méthylacétoacétate.

	Masses molaires	Concentrations	
	(g)	(mol/L)	(g/L)
Éthanol	46	$4,95 \cdot 10^{-2}$	2,3
Acétate	60	$4,95 \cdot 10^{-2}$	3,0
α -acétolactate	132	$4,95 \cdot 10^{-2}$	6,5

II.2.2.3. Mesure des concentrations en diacétyle, acétaldéhyde et éthanol

Le dosage, en ligne, du diacétyle, de l'acétaldéhyde et de l'éthanol, présents dans le milieu de culture, est effectué au moyen d'un échantillonneur à molécules volatiles couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CPG).

II.2.2.3.1. L'échantillonnage

Le capteur de molécules volatiles (Figure II.3), mis au point au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, est constitué d'une chambre en acier inox intercalée (Figure II.4) dans l'une des branches d'un tube en U, dans lequel circule de l'azote de qualité R qui constitue le gaz collecteur de molécules volatiles. Une membrane microporeuse hydrophobe en polytétrafluoroéthylène pur, disposée sur une grille métallique, permet le transfert des molécules volatiles du milieu de culture vers la chambre de collecte. Le gaz collecteur entraîne les molécules volatiles à travers une tubulure métallique chauffée à 60 °C, pour éviter les phénomènes de condensation, et sont injectées par une vanne d'injection de gaz automatique (Stien, 1993). La colonne utilisée est une colonne semi-capillaire alimentée par de l'azote de qualité U filtré sur cartouche OXYSORB. Deux détecteurs sont placés en série en sortie de colonne : le détecteur à capture d'électron (DCE) puis le détecteur à ionisation de flammes (DIF). Les signaux issus des détecteurs sont reçus par une station d'acquisition et de traitement de données, équipée du logiciel WINILAB III (Perichrom).

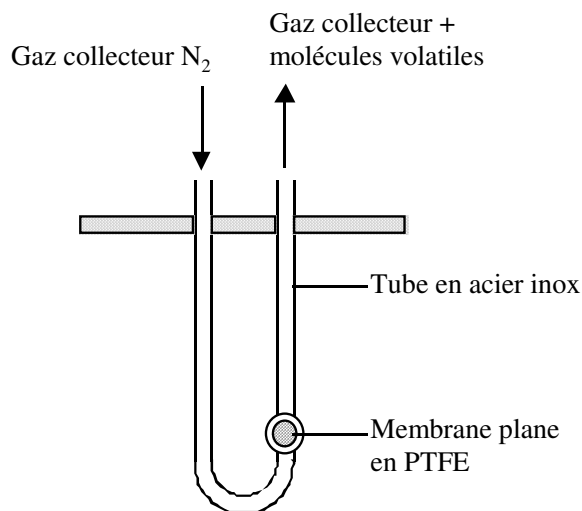


Figure II.3. Schéma général du capteur à membrane plane (d'après Stien, 1993).

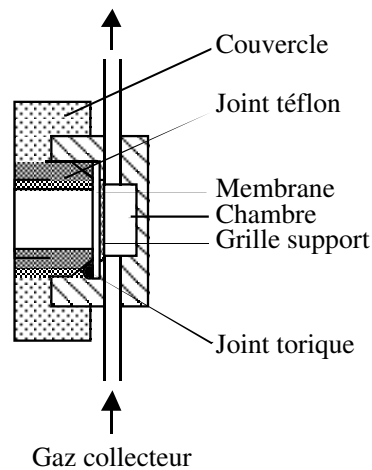


Figure II.4. Vue en coupe de la chambre (d'après Stien, 1993).

II.2.2.3.2. L'analyse en ligne des échantillons

L'acquisition en ligne des chromatographes permettant la détermination des concentrations en molécules volatiles dans le milieu de culture est possible grâce au balayage ponctuel de la boucle d'injection, traversée en continu par l'échantillon collecté au niveau du capteur de molécules volatiles, avec du gaz vecteur entraînant le contenu de la boucle dans la colonne.

L'échantillonnage est réalisé toutes les heures. Le diacétyle est détecté au niveau du DCE. L'acétaldéhyde et l'éthanol sont détectés par le DIF.

Les paramètres d'utilisation du CPG sont les suivants :

- température du four : 60 °C
- température du détecteur à capture d'électrons : 200 °C
- température du détecteur à ionisation de flammes : 220 °C
- débit de gaz vecteur : 20 mL/mn, pour le fermenteur de 3 L, et 30 mL pour celui de 20 L.

II.2.2.3.3. L'étalonnage

L'étalonnage permet de corréliser les aires intégrées des pics correspondant aux 3 composés analysés avec leur concentration dans le milieu de culture. Il est effectué en fin de fermentation en ajoutant, dans le milieu de culture, des volumes exacts de solutions de concentrations connues préparées à partir des standards des différents composés analysés. Ceci doit être fait dans les mêmes conditions opératoires que celles qui ont été adoptées lors de l'expérience afin de respecter l'équilibre établi. Les droites d'étalonnage (Aire - u.a. en fonction de la concentration - mg/L) pour chaque composé sont tracées au moins à partir de 2 points et passent par l'origine.

Pour réaliser l'étalonnage, 1L de solution de diacétyle, d'acétaldéhyde et d'éthanol à 10 g/L sont préparées en diluant 10g de solution standard pure de chaque composé dans de l'eau osmosée. Les solutions obtenues sont conservées en chambre froide et utilisées à chaque étalonnage. Dans un premier temps, 2 mL de solution d'acétaldéhyde contenu dans une seringue est ajouté dans le milieu de culture à travers un septum disponible sur le dessus de la platine du réacteur. Plusieurs analyses successives au niveau du CPG sont nécessaires pour obtenir une aire de pic stable. Après stabilisation, un deuxième ajout de volume identique est effectué. Dans un deuxième temps, les ajouts de 2 mL de diacétyle et 2 mL d'éthanol sont faits en procédant de la même manière que pour l'acétaldéhyde. Ils peuvent être injectés en même temps puisqu'ils n'interagissent pas entre eux, au contraire de ce qui se passe avec l'acétaldéhyde.

La valeur du volume à injecter dans le réacteur a été choisie de telle manière que les concentrations, correspondantes aux ajouts du composé, soient de l'ordre de 15 mg/L dans le cas du premier ajout et de 30 mg/L pour le second ajout. Durant les expériences, les valeurs des volumes prélevés et des volumes d'acide et de base ajoutés pour la régulation pH ont été notés afin de permettre l'évaluation du volume de milieu final dans le réacteur et permettre ainsi le calcul des concentrations des différents composés durant l'étalonnage.

II.2.3. Interprétation des résultats

Pour chaque fermentation, l'évolution de la biomasse, la disparition de substrats carbonés et la formation de nombreux produits sont suivis au cours du temps. L'ensemble des paramètres cinétiques relatifs à la croissance, à l'utilisation des substrats et à la production de métabolites est déterminé à partir des données expérimentales ainsi recueillies.

II.2.3.1. Calcul des vitesses et des rendements

En mode discontinu, les vitesses volumiques de croissance (r_X , $g_X/L\ h$), de consommation de substrats (r_S , $g_S/L\ h$) et de production de métabolites (r_P , $g_P/L\ h$ ou $mg_P/L\ h$) à chaque instant correspondent à la pente de la tangente aux courbes représentant, respectivement, l'évolution de la biomasse, la consommation de substrat et la formation de produits en fonction du temps. Elles sont calculées à partir du logiciel Kaleidagraph, qui ajuste une courbe pondérée aux points expérimentaux et en calcule les dérivées à chaque instant.

Les vitesses spécifiques sont obtenues en divisant les vitesses respectives par la biomasse :

$$\mu = \frac{r_X}{X}$$

$$q_S = \frac{r_S}{X}$$

$$q_P = \frac{r_P}{X}$$

où : μ est la vitesse spécifique de croissance, h^{-1}

q_S est la vitesse spécifique de consommation du substrat, $g_S/g_X\ h$

q_P est la vitesse spécifique de production de métabolites, $g_P/g_X\ h$ ou $mg_P/g_X\ h$

X est la biomasse, g_X/L

S est un substrat, g_S/L

P est un produit, mg_P/L ou g_P/L

En traçant les courbes des vitesses spécifiques en fonction du temps, il est alors possible de déterminer les vitesses spécifiques maximales.

Les rendements globaux sont définis comme le rapport entre la masse de cellules sèches (X) ou métabolite formé et la masse de substrat consommé depuis le début de la fermentation. Ces relations sont :

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

où : $Y_{X/S}$ est le rendement de biomasse formée par rapport au substrat consommé,

g_X/g_S

$Y_{P/S}$ est le rendement de métabolite formé par rapport au substrat consommé, g_P/g_S

ou mg_P/g_S

X_0 est la concentration initiale en biomasse, g_X/L

S_0 est la concentration initiale en substrat g_S/L

P_0 est la concentration initiale en produit g_P/L

Les rendements instantanés sont calculés en divisant les vitesses de production de chaque produit par les vitesses de consommation des différents substrats, à chaque instant. Soit,

$$Yi_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} \quad (3)$$

$$Yi_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} \quad (4)$$

où : $Yi_{X/S}$ est le rendement instantané de biomasse formée par rapport au substrat consommé, g_X/g_S ,

$Yi_{P/S}$ est le rendement instantané de métabolite formé par rapport au substrat consommé, g_P/g_S ou mg_P/g_S .

II.3. Outils d'optimisation

II.3.1. L'algorithme génétique

L'algorithme génétique est une méthode d'optimisation stochastique basée sur la théorie de Darwin sur l'évolution naturelle. Il est nécessaire de distinguer les deux types d'algorithmes génétiques et évolutionnaires.

Les principales différences reposent sur la manière dont sont codés les individus et sur leurs croisements. L'algorithme que nous utiliserons au cours de ce travail sera un algorithme génético-évolutionnaire.

II.3.1.1. Principe général

L'algorithme gère une population où chaque individu correspond à un jeu de paramètres (qui sont ceux à optimiser). Une première génération est générée de manière aléatoire dans un domaine de recherche prédéfini. L'algorithme évalue ensuite les performances de chacun des individus ; c'est-à-dire le critère à optimiser. Ils sont ensuite classés et les moins performants sont éliminés. De nouveaux individus sont ensuite générés soit de manière aléatoire (mutation) soit par croisement entre deux individus conservés de la génération précédente. Parmi ces nouveaux nés, seuls ceux qui sont meilleures que le moins performant des individus rescapés de la génération précédente sont conservés. La répétition de ces processus de croisement et sélection va entraîner une amélioration globale de la population qui devrait converger vers l'optimum global si les paramètres de l'algorithme sont bien choisis.

II.3.1.2. Différents types d'algorithmes évolutionnaires

De la même manière que les organismes vivants, les individus peuvent ici être haploïdes ou diploïdes. Ces deux systèmes n'apportent pas les mêmes avantages au niveau de l'efficacité de l'algorithme à trouver la solution globale ni dans la rapidité de convergence (Fonteix *et al.*, 1995 ; Perrin *et al.*, 1997).

II.3.1.2.1. Algorithme haploïde

Un exemple de codage d'individu haploïde est donné en figure II.5. Chaque individu y est représenté par un unique chromosome qui correspond exactement à son phénotype.

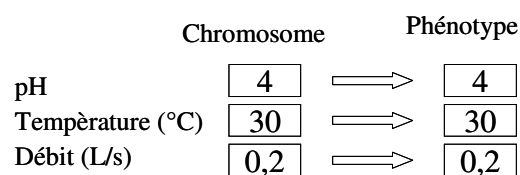


Figure II.5. Codage d'un individu haploïde.

Lors du croisement de deux individus (Figure II.6), chaque gène ou paramètre est généré aléatoirement par une moyenne pondérée des gènes correspondants de chacun des parents. La pondération est gouvernée par un vecteur α de nombre aléatoires compris entre 0 et 1. La taille de ce vecteur est égale au nombre de gènes (ou de paramètres à optimiser). La formule à utiliser lors d'un croisement entre deux individus haploïdes est donc la suivante :

$$X = \alpha X_1 + (1 - \alpha) X_2$$

Dans l'exemple suivant, le vecteur α vaut $[0,4 \ 0,78 \ 0,06]^T$. cette méthode de croisement restreint progressivement le domaine de recherche et permet de trouver rapidement un optimum qui risque cependant d'être local.

	Parent 1	Parent 2		Enfant
pH	6,5	4	⇒	5
Température (°C)	25	30	+ ⇒	27
Débit (L/s)	0,3	0,2	⇒	0,22

Figure II.6. Croisement entre deux individus haploïdes.

II.3.1.2.2. Algorithme diploïde

Les individus diploïdes sont eux codés par trois vecteurs (Figure II.7.) :

- deux chromosomes qui comportent chacun tous les paramètres à optimiser,
- un vecteur de dominance qui permet de savoir, pour chaque gène, quelle est sa version qui va s'exprimer (1 pour celle du 1^{er} chromosome et 0 pour celle du 2^{ème}).

	Chromosome 1	Chromosome 2	Dominance		Phénotype
pH	3	4	1	⇒	3
Température (°C)	16	30	1	⇒	16
Débit (L/s)	0,2	0,3	0	⇒	0,3

Figure II.7. Codage d'un individu diploïde.

Lors d'un croisement entre individus diploïdes, chaque parent donne une version pour chacun des gènes. Le choix de l'allèle transmis est aléatoire. Il faut noter de manière à augmenter la diversité des individus, chaque parent fournit un mélange de ses deux chromosomes et non pas un chromosome entier. Une fois que les deux chromosomes de l'enfant ont été créés, il faut passer à l'établissement du vecteur de dominance. Quatre cas de figures sont alors envisageables :

1. l'allèle fourni par le parent 1 est dominant alors que celui fourni par le parent 2 est récessif. C'est l'allèle du parent 1 qui deviendra dominant au niveau de l'enfant.
2. l'allèle fourni par le parent 1 est récessif alors que celui du parent 2 est dominant. C'est l'allèle du parent 2 qui deviendra dominant au niveau de l'enfant.
3. les deux allèles sélectionnés sont dominants. L'allèle du meilleur parent s'exprimera.
4. les deux allèles sélectionnés sont récessifs. La dominance sera alors aléatoire.

II.3.1.3. Réglages de l'algorithme

Plusieurs réglages sont possibles lors de l'utilisation de l'algorithme d'optimisation. Ils ont chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Les paramètres modifiables sont les suivants :

- la taille de la population : plus elle est grande et plus la population est représentative du domaine de recherche. Augmenter ce paramètre permet d'éviter de converger rapidement vers un optimum local. En revanche, ceci va considérablement augmenter le temps de calcul et risque d'apporter des problèmes de convergence.
- le seuil de sélection correspond à la proportion d'individus qui sont éliminés à chaque génération. Il ne faut pas que cette valeur soit trop faible, sous peine de converger vers un optimum local. A l'inverse une valeur trop élevée ne permet plus de bénéficier du principe de croisement entre les « bons individus ». Il est à noter que sa définition n'est pas la même pour les algorithmes mono et multicritères. En effet, pour l'algorithme monocritère, le nombre d'individus éliminés est fixe alors que pour l'algorithme multicritère, le nombre d'individus éliminés correspond à un pourcentage des individus dominés (il serait absurde d'éliminer des individus non dominés).
- la précision de la solution est liée au critère d'arrêt de l'optimisation. Celle-ci s'arrêtera lorsque l'écart entre le meilleur et le plus mauvais des individus de la population sera inférieur à cette précision.
- le pourcentage d'homozygotie : comme évoqué précédemment les algorithmes haploïdes et diploïdes n'offrent pas les mêmes avantages. Il est alors intéressant de mélanger ces deux systèmes. Pour cela une certaine proportion de la population est haploïde (ces individus ont alors deux chromosomes identiques, ils sont homozygotes). Cette proportion d'individus haploïdes permet d'obtenir une convergence plus rapide.
- la probabilité de mutation : lors des naissances, une partie des individus sont générés aléatoirement ; ce sont les mutants. Cette part de mutants assure un renouvellement de la diversité de la population. Il ne faut cependant pas que cette valeur soit trop grande sous peine de perdre les avantages des croisements entre les individus (à la manière du taux de mortalité).
- L'élargissement du domaine délimité par les allèles des parents : lors des naissances, que ce soit par mutation ou par croisement, les bornes ne sont pratiquement jamais utilisées. La solution est d'élargir le domaine de recherche. Lors d'un croisement haploïde, le gène de l'enfant peut se trouver en dehors de l'intervalle défini par les valeurs des deux parents. En revanche, une valeur en dehors du domaine de recherche est ramenée à l'intérieur de celui-ci.

II.3.2. Problèmes multicritères

II.3.2.1. Notion de domination au sens de Pareto

Dans une population, il est possible de trier les individus suivant le nombre de fois où ils sont dominés au sens de Pareto. Par exemple, pour un problème à trois critères qui sont à minimiser : soient deux individus A et B, chacun des trois critères est évalué pour A et pour B. Si A est au moins aussi bon que B pour les trois critères et que pour l'un des trois il est strictement meilleur, alors A domine B et par voie de conséquence, B est dominé par A. Ceci se traduit par:

$$\text{A domine B si, } \begin{array}{l} f_i(A) \leq f_i(B) \text{ si } \forall i \in \{1, \dots, nc\} \\ \text{et } \exists j \in \{1, \dots, nc\} \text{ tel que } f_j(A) < f_j(B). \end{array}$$

Où nc est le nombre de critères à minimiser.

Le problème est alors rapporté à un seul critère qui est à minimiser. Ce critère est le critère de domination de Pareto. Celui-ci est égal au nombre de fois où chaque individu est dominé dans la population. Ce critère est alors facile à intégrer dans l'algorithme génétique. Lorsque les différents individus ont été évalués pour chacun des critères, on calcule le nombre de domination de chaque individu. Ils sont ensuite classés et ne sont conservés que les non dominés ainsi qu'une partie des moins dominés à chaque génération. A la fin d'une telle optimisation, on dispose d'une population non-dominée qui représente ainsi le meilleur compromis possible. C'est à ce moment qu'un jugement extérieur est nécessaire pour favoriser l'un ou l'autre des critères.

II.3.2.2. Front de Pareto

Le front de Pareto est la représentation des différents critères de la population non-dominée. Il est représenté pour un problème à deux critères par un graphique qui fait figurer chaque individu par ces deux critères (l'un en abscisse et l'autre en ordonnée). Cette représentation est très intéressante pour le choix final du jeu de paramètres car il fait apparaître l'évolution des critères les uns par rapport aux autres. Dans le cas où les deux critères représentés sont à maximiser, l'optimisation correspond au déplacement des points qui constituent ce front vers le coin supérieur droit du graphique comme indiqué dans la figure II.8. Pour un point donné de ce front, il est impossible d'améliorer l'un des deux critères sans dégrader l'autre.

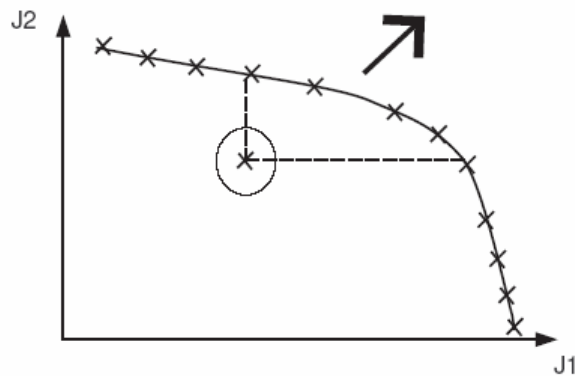


Figure II.8. Représentation du front de Pareto

Le point encerclé dans cette figure n'appartient pas au front de Pareto mais il a été rajouté. Il correspond à un compromis, entre les deux critères, qui n'est pas intéressant. Pour une même valeur de J1, il est possible de trouver un point du front qui offre une meilleure valeur de J2 et réciproquement. Il existe aussi des points qui offre une meilleure performance à la fois pour J1 et pour J2.

II.3.2.3. Zone de Pareto

La zone de Pareto est une autre représentation de la population non-dominée. Cette fois-ci, les individus ne sont plus représentés par leurs valeurs pour chacun des critères mais par le jeu de paramètres. Il n'est alors possible de le représenter que pour des problèmes ne dépassant pas trois paramètres ou alors, il faut les représenter deux-à-deux (en projection). Une représentation de la zone de Pareto correspond en réalité à la zone en dehors de laquelle, il ne faut pas se déplacer pour le bon compromis.

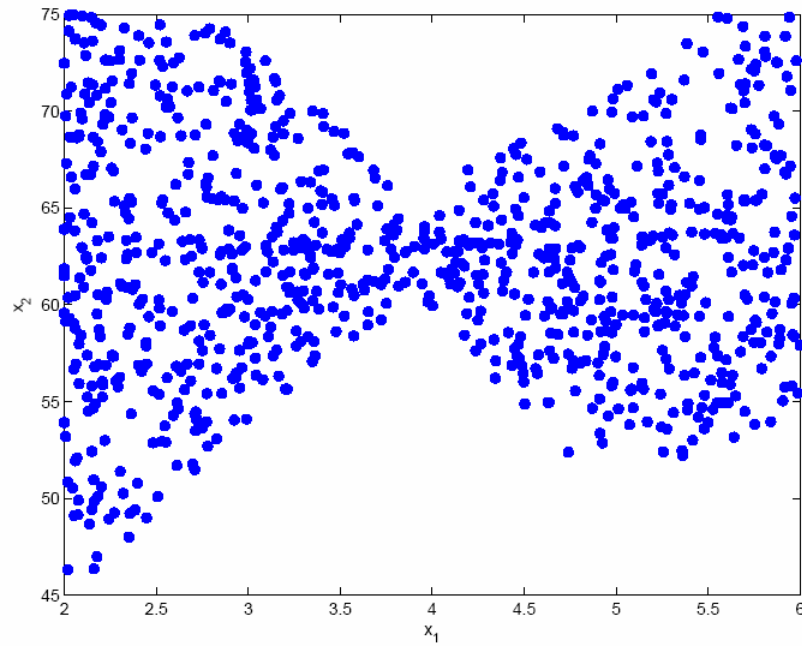


Figure II.9. Représentation de la zone de Pareto.

La figure II.9 représente la zone de Pareto d'un problème à deux variables x_1 et x_2 et trois critères à optimiser. L'ensemble des points forme bien une zone en dehors de laquelle les performances obtenues ne se situeront pas sur le front de Pareto. Tout point dans la zone blanche présenterait un mauvais compromis entre les différents critères.

III. Résultats et discussion

III.1. Application de la stratégie expérimentale à la collecte de données

Cette première partie du travail a pour but de définir et d'utiliser un plan d'expériences multicritère (PEM) dérivé des travaux de Muniglia (2001). Ce PEM correspond aux résultats compromis de deux critères que sont :

- la D-optimalité, comme elle permet de minimiser la variance généralisée sur l'estimation des paramètres. Au niveau mathématique, cela se traduit par la minimisation du déterminant de la matrice d'information de Fisher, ce qui revient à minimiser le volume de l'ellipsoïde.
- et le conditionnement de la matrice de Fisher qui présente la qualité de correcteur de plan. Il permet de décorrélérer les paramètres du modèle. Le conditionnement, ici, est défini comme le rapport des carrés de la plus petite sur la plus grande des valeurs propres de la matrice d'information de Fisher.

Ce type de PEM représente un outil intéressant dans le domaine du génie des procédés biotechnologiques parce qu'il permet de réduire, de manière très significative, le nombre d'expériences et d'améliorer l'estimation de la valeur de certains paramètres cinétiques de la fermentation lactique étudiée. Dans ce sens, le PEM a été appliqué à la modélisation secondaire d'un procédé de production d'arômes du beurre en mode discontinu.

Afin d'identifier les meilleures combinaisons de conditions expérimentales (pH, température et taux d'oxygène dissous) pour la croissance de *Lactococcus lactis* et pour la production de diacétyle, mais aussi d'établir une commande dynamique du procédé, un domaine expérimental étendu a été exploré. Ce travail a permis de confirmer certaines observations antérieures qui traitent de l'effet des conditions opératoires sur la croissance et la production de diacétyle et a montré certaines combinaisons critiques des facteurs opératoires conduisant à des comportements physiologiques inattendus, telle l'observation de croissance de la bactérie à pH 8, $T = 16\text{ °C}$ et à un TOD = 70 %. L'utilisation du PEM a conduit rapidement au développement de modèles polynomiaux prédictifs de la croissance et de la production de diacétyle en fonction des paramètres opératoires.

Ces modèles polynomiaux nécessitent d'être validé avant d'être intégrés dans un modèle cinétique du procédé.

Projet de publication

Methodology of modelling the combined effect of pH, temperature and oxygen saturation level on the metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis using an experimental multicriteria design

1. Introduction

Microbial processes are generally complex systems. One major part of this complexity relies in the variability of the metabolic behaviour of the biocatalysts with respect to the operating conditions (substrates concentrations, temperature, pH, oxygen saturation level, ...). In order to improve fermentation process performances it is necessary to: (i) model the effect of main operating conditions on the process; (ii) keep the experimental domain as large as possible to allow screening of operating conditions which may have been omitted in previous studies; (iii) reduce the modelling cost and experimentation time in minimising the number of experiments. To overcome such problems, and to identify if the combined effect of the operating factors could be correlated to stoichiometric and/or kinetic parameters experimental designs (ED) represent a functional tool. Indeed, ED consists in seeking a reduced number of experiments while maximizing the amount of information collected. Some ED leads to polynomial models which can depict non linear systems. Numerous kinds of ED are available in literature and could be applied, depending on the nature of the problem: factorial designs are suitable for the evaluation of principal effects and interactions between factors [1-3]; fractional designs [4] is used for screening to detect the most significant variables; central composite [5, 6] and Doehlert ED [7] associated to the ED based on the simplex method [8] are employed for optimizing experimental conditions for continuous factors. In some cases, constraints resulting from either, the number of experiments and the experimental domain extension, reduce drastically the statistical properties of these classical experimental designs. Therefore, experimental designs based on optimal statistical qualities such as D-optimality seem useful to account for practical constraints [9, 10]. However, there are several criteria which define the statistical qualities of the design and which may be antagonists.

In this study, an original approach based on multicriteria experimental design (MED), developed in our laboratory [11], was applied to a fermentation process of the production of

an aroma responsible for the “buttery” flavor note: diacetyl [12, 13]. The MED was used to find out the best trade off between D-optimality and the conditioning of the Fisher matrix. Three operating parameters (pH, T and OSL) exploring a large experimental domain, compared to other studies, have been considered for the MED construction. The influence of these parameters was studied in batch culture, in order to define the combined effect of T, pH and OSL on the growth and metabolite production of *Lactococcus lactis* and to look at interactions of operating conditions likely to be encountered during a dynamic process.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial strain and culture medium

The bacterium used throughout this work was *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis PAL D DIA A, purchased from Standa Industry (France). It was grown in batch mode, in the semi synthetic Y medium described by Stien [14, 15] with lactose and citrate as energy and/or carbon sources.

2.2. Fermentation process conditions

The preculture was prepared by cultivating the bacteria in 200 mL of medium at 30 °C for 15 h. The bioreactor already containing 1.4 L of medium was then inoculated with the preculture. The cultivation system consisted of an Applikon 3 L fermenter controlled by ADI 1030 biocontroller and cultivation supervisor software “BioXpert” (Applikon, The Netherlands). The system was equipped with pH, OSL and temperature sensors. Different OSL, in the bioreactor, were obtained by sparging air and/or nitrogen in the culture medium and modifying stirring speed. The pH of the culture was kept at the desired value by feeding the culture vessel with a solution of either NaOH (0.2 N) or HCl (0.2 N). The temperature is maintained by a thermo-circulator bath ADI 1018 (Applikon, The Netherlands).

2.3. Analytical methods

The concentrations of lactose, citrate, in the culture media were analyzed by off-line high performance liquid chromatography (Waters,USA) at room temperature using UV (210 nm) and refractive index detectors [16]. The proportioning of diacetyl was carried out on-line by a membrane sampler of volatile compounds coupled to a chromatographic method in gas phase (Perichrom, France) as described by Stien [14]. The biomass concentration was determined by optical density (OD) measurement at 650 nm and the strain specific biomass conversion factor γ ($\gamma = \text{dwt}/\text{OD}_{650}$, where dwt is biomass dry weight obtained by filtering the

biomass from 40 mL culture, washing and drying at 105 °C overnight).

3. Results and discussion

3.1 General presentation of the methodology

The methodology used in this study is summarized in Figure 1. The use of the D-optimality and the conditioning of the Fisher matrix criteria [17] after having identified the influential factors lead to the definition of an experimental design. From the resulting experimental data, a black box model of the combined effect of pH, temperature and OSL on kinetic parameters such as maximal specific growth rate, maximal specific substrates uptake rates and diacetyl production is described.

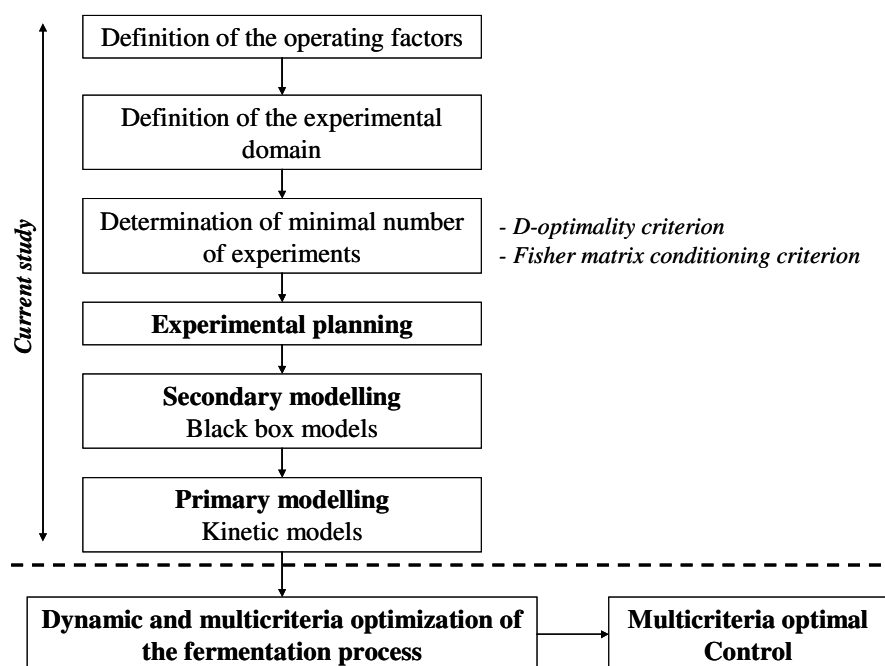


Figure 1. The different steps of the methodology applied to the diacetyl production process. The scattered line separates the steps achieved in this study from the coming work.

In a future work this model will be integrated in a primary model that accurately describes the dynamic behaviour of the fermentation process. The kinetic model will provide a basis for the development and application of an innovative approach combining multicriteria optimization and dynamic optimization techniques as well as the corresponding multicriteria optimal control techniques. Thus, the first objectives are to collect experimental data and to build a secondary model to predict the biomass, substrates and products concentrations, considering three operating factors: temperature (T), pH and oxygen saturation level (OSL) in the medium.

3.2. Factors and domain of study

Taking into account the physiologic and cellular knowledge about *Lactococcus lactis* growth and metabolism, available in the literature, three operating parameters have been considered for the MED construction. In order to explore a larger experimental domain, for three factors studied, than for previous studies, the temperature range was set to [15-30] °C as *Lactococcus lactis* is a mesophilic bacterium and the production of diacetyl is enhanced around 20 °C [18-20], the pH range was set to [4 - 8.5] since the apparent growth is maximal around the neutrality and diacetyl production is maximal at pH 4 [15, 20, 21], and OSL range was set to [0, 80] %, as a result of the microaerophilic behaviour of *Lactococcus lactis* [22-24], and the high limit is fixed at 80 % because of technical constraints resulting from the foam present in this culture media. For the construction of the ED the factors were normalized between [-1, 1].

3.3. Construction of the MED

The selection of the mathematical model which represents the different performances of the process expressed as growth, substrate uptake and the diacetyl production is the second step of the experimental design methodology. Linear model of such biological systems is not expected to suit correctly the effect of pH, T and OSL on the performances of the process whereas, polynomials are black models that allow to simulate, with any precision any set of experimental values. They are a trade-off between accurate prediction and simplicity. In particular, a second degree polynomial model has been considered so as to be able to represent criteria in a satisfactory way. Thus, the equation of the model has the following form:

$$c = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 y + \beta_3 z + \beta_4 xy + \beta_5 xz + \beta_6 zy + \beta_7 x^2 + \beta_8 y^2 + \beta_9 z^2 \quad (1)$$

Where c is the value of the criteria calculated for each experiment.

$\beta_0 \dots \beta_9$, are the model coefficients we have to identify using matrix computational capability of Matlab 5.3 software.

x , y and z represent respectively the three factors (pH, T and OSL) normalized between [-1, 1].

At least, ten experiments are necessary for the computation of the best unbiased estimation of the model coefficients according to the least square error criteria. Consequently, the number of experiments has been set to fourteen with 40 % experiments more than the

minimum needed considering that it would be enough to depict the main trend of the system behaviour.

The same process of parameters calculation is applied for all the criteria. C is the matrix of the criteria for the 14 experiments, X is the matrix of factors with dimensions $n \times P$ (n is the number of experiments and p is the number of coefficients of the model) and β is the matrix of parameters to identify. Therefore the matrix of criteria can be represented as follows:

$$C = X \cdot \beta + \varepsilon \quad (2)$$

Where, ε represents the error (the difference between measurement and prediction).

The estimation of the coefficients of model 2 allows one to know the effect of a factor on the response and is obtained by least squares minimization:

$$\underset{\beta}{\text{Min}} J = \frac{1}{n} \varepsilon^T \varepsilon = \frac{1}{n} (C - X \cdot \beta)^T (C - X \cdot \beta) \quad (3)$$

Derivation of J with respect to β and resolution of the corresponding optimality condition (equation 4),

$$\frac{\partial J}{\partial \beta} = 0 \quad (4)$$

lead to the best estimation of β (equation 5),:

$$\hat{\beta} = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot C \quad (5)$$

Where, C is the criteria measurement, $(X^T X)^{-1}$ the dispersion matrix. $(X^T X)$ is called the information matrix.

The confidence region associated to the estimated coefficients is represented by an ellipsoid and calculated according to the following equation:

$$\left(\beta - \hat{\beta} \right)^T (X^T \cdot X) \left(\beta - \hat{\beta} \right) \leq \left(C - X \cdot \hat{\beta} \right)^2 F_{\alpha(p, n-p)} \quad (6)$$

Where, $F_{\alpha(p, n-p)}$ represents the Fisher-Snedecor test with $(p, n-p)$ degrees of freedom at the significance level, α [25].

Previous equations show that the estimations of the coefficients along with the volume, the shape and the orientation of the confidence ellipsoid (precision) strongly depend on the information matrix. Several criteria based on this information matrix can be defined. The higher the determinant of the information matrix, the so-called D-optimality criteria, is

the more precise the coefficients of the model and the more reliable the conclusions drawn from the analysis of the coefficients. Indeed, determinant of the information matrix is related to the inverse of volume of the confidence ellipsoid [26] and has thus to be maximized. A minimal ellipsoid volume may however correspond to a long shaped ellipsoid which traduces a very strong correlation between factors. The information matrix conditioning represents the ratio of the smallest and largest eigenvectors of the ellipsoid. Maximizing this design corrector enables to reduce correlation between parameters. That's why the matrix of experiments X is found considering the tradeoff between the following criteria: (i) the D-optimality criterion J_1 (equation 7) and (ii) information matrix conditioning criterion J_2 (equation 8).

$$\text{Max } J_1 = \det(X^T X) \quad (7)$$

$$\text{Max } J_2 = \frac{\lambda_s}{\lambda_h} \quad (8)$$

Where, λ_s and λ_h are respectively the smallest and the highest eigenvalues of the information matrix ($X^T.X$).

3.4. Multiobjective optimization method

In the chemical engineering processes field, multiple objectives have been usually treated by: (i) combining all the objectives through linear or empirical arrangement, to form a scalar objective function [27, 28] or (ii) optimizing one criterion and considering the other objectives as constraints [29]. The technique of optimization adopted to solve this multicriteria problem is based on the use of a genetic algorithm associated with the concept of domination within the meaning of Pareto.

3.4.1. Definition of the Pareto concept

Real-world problems require simultaneous optimization of several antagonist objectives. In Multicriteria problems, one alternative, e.g a combination of pH, Temperature and OSL, leads to several performances such as productivity, conversion yield, product quality, ... As optimal conditions for each criterion are usually different, the multicriteria problem has not one single alternative solution but rather a set of alternative solutions which are considered as equivalent with respect to all criteria. One alternative solution is optimal considering that there do not exist other alternative for which all criteria are strictly better. The set of such optimal solutions is known as Pareto-set. The criteria corresponding to the

Pareto-set solutions describe the Pareto front. In other words, considering two alternatives A and B, if criteria of A are better than or equivalent to criteria of B and there is at least one criterion of A which is rigorously better than the criteria of B, it is said that A dominates B. This leads to the following definition:

$$\begin{aligned} & \text{A dominate B, if} \\ & \quad \forall i \in \{1; \dots; nc\} \quad f_i(A) \geq f_i(B) \\ & \text{and} \quad \exists j \in \{1; \dots; nc\} / \quad f_j(A) > f_j(B) \end{aligned} \quad (9)$$

Where nc , the number of criteria (to be maximised, in such case)
 f_i , the objective function corresponding to the i criterion,

Therefore if a set of alternatives are considered, the domination number in the sense of Pareto can be defined. It is equal to the number of times for which each alternative is dominated by the other. The multicriteria problem can thus be transformed into a monocriteria minimisation of the domination number. Such domination number definition can thus be embedded in an optimisation tool provided it is based on a population. Determination of the multicriteria solutions thus consists in identifying the Pareto set i.e. alternatives for which the domination number is null [30, 31].

In our study, this concept of domination is used to distinguish experimental designs (alternatives) by comparing the corresponding designs criteria (D-optimality and conditioning). This concept is integrated into an evolutionary diploid algorithm (EDA) developed within our laboratory and which allow an initial arbitrary population to concentrate into the Pareto zone.

3.4.2. Principles of the evolutionary algorithm

An initial population is created by generating a set of N points from the search space. Each individual (alternative) is compared and evaluated towards other. If this population is not acceptable, then genetic operators are used to make it evolve. Only the better individuals will survive (*elitist selection*) and participate to the creation of a new generation. If the generated child is worse than the worst parent, he is not adapted and another one is created. The population of each generation is evaluated until it satisfies the stop criterion: $f_{max} - f_{min} < \varepsilon$ where f_{max} and f_{min} are respectively the maximum and the minimum objective function values in the current population and ε is the precision on the optimal criteria.

Our algorithm is based individual where chromosomes are described by vectors of real values. A diploid version is used as its performances were found better than those of the

haploid one [32]. The principle of genetic of diploid individuals is reported by Perrin *et al.* [33]. Each individual (which represents a possible solution of the problem) is described by a four-tuple (a_j, a'_j, D_j, x_j) . a_j and a'_j represent the two alleles of the j gene, D_j is the dominance of one allele over the other chosen in $\{0, 1\}$ and x_j represents the phenotype which is the result of the combination of the respective alleles, a_j and a'_j :

$$x_j = D_j \cdot a_j + (1 - D_j) \cdot a'_j \quad (10)$$

The reproduction consists of a multicrossover on the two chromosomes of each parent, and an eventual mutation. The population consists of homozygote and heterozygote individuals, which allows the algorithm to simultaneously benefit from the convergence features of haploid and diploid evolutionary algorithm. The reproduction of homozygote is similar to the reproduction of haploid individual (real cross-over) while the reproduction of the diploid individuals (integer cross-over) enables a fast convergence on the meshgrid defined by the parent chromosomes. The parameters of the algorithm, namely mutation level, rate of survival and homozygosity rate [26, 34], are chosen constant.

The adaptation of our evolutionary algorithm to handle multicriteria problem consists in: (i) defining the objective function as the domination number (ii) stopping the algorithm when all individuals in the population are non-dominated (null domination number). To improve convergence, a fraction of dominated individuals are allowed to survive during our elitist selection. The required experimental design is selected according to an algorithm of decision engineering tool [26, 34].

3.5. Modelling of kinetics

Growth of *L. lactis* on lactose and citrate was investigated in pH-regulated batch cultures. The effects of operating conditions on growth and on diacetyl production were studied both quantitatively and qualitatively by the MED presented in table 1. In fact, a predictive modelling has been used to predict bacterial growth and aroma production as a function of environmental factors. In addition, an analysis of the physiological effect of changing operating conditions was done.

Table 1. Multicriteria experimental design (MED), where, x, y and z represents the three studied factors, pH, T and OSL, normalized between [-1, 1].

Experiments	x	y	z	Experiments	pH	T (°C)	OSL (%)
1	-0.400	0.989	-0.140	1	5.3	29.9	34.0
2	-0.984	0.985	0.703	2	4.0	29.9	68.0
3	-0.949	-0.973	-0.175	3	4.1	15.2	33.0
4	0.943	-0.811	0.961	4	8.4	16.4	78.0
5	0.107	0.010	-0.134	5	6.5	22.6	35.0
6	-0.352	-0.892	0.984	6	5.5	15.8	79.0
7	0.792	0.884	0.987	7	8.0	29.1	79.0
8	0.868	-0.946	-0.997	8	8.2	15.4	0.0
9	-0.994	-0.017	0.726	9	4.0	22.4	69.0
10	-0.202	-0.207	-0.980	10	5.8	20.9	1.0
11	-0.996	0.491	-0.988	11	4.0	26.2	0.0
12	0.968	0.054	0.015	12	8.5	22.9	41.0
13	-0.101	0.038	-0.025	13	6.0	22.8	39.0
14	0.986	1.000	-0.989	14	8.5	30.0	0.0

On the one hand, a mathematical model was developed to investigate growth of *Lactococcus lactis*, as a function of operating factors. The response of *Lactococcus lactis* to the investigated environmental variables was quantified via quadratic polynomial models. Therefore, the maximum specific lactose uptake (q_{maxLo}), the maximum specific citrate uptake (q_{maxCit}) the maximum specific growth rate (μ_{max}), the yield of biomass based on lactose uptake ($Y_{X/Lo}$), and diacetyl production (Dia_{max}) were thus fitted as complete secondary models to describe the combined effects of pH, T and OSL (equation 1).

Consequently, quadratic expressions of the maximum specific uptake for lactose and citrate, maximum specific growth rate, the yield of biomass based on lactose uptake and diacetyl production vs. pH, T and OSL were obtained using respectively equations (11)- (15). Non significant terms (with a 95% confidence level) have been eliminated to keep the most influent parameters in each model.

$$q_{maxLo} = -3.63 - 0.073 \text{ pH} + 0.07 \text{ OSL} + 0.038 \text{ pH T} - 0.0001 \text{ T OSL} - 0.0006 \text{ OSL}^2 \quad (11)$$

$$q_{maxCit} = -0.65 + 0.059 \text{ pH} + 0.044 \text{ OSL} - 0.001 \text{ pH T} - 0.0006 \text{ OSL}^2 \quad (12)$$

$$\mu_{max} = 1.03 - 0.25 \text{ pH} - 0.007 \text{ OSL} + 0.01 \text{ pH.T} + 0.002 \text{ pH.OSL} - 0.0002 \text{ T.OSL} - 0.001 \text{ T}^2 - 0.0001 \text{ OSL}^2 \quad (13)$$

$$Y_{X/Lo} = 0.479 - 0.075 \text{ pH} + 0.003 \text{ OSL} + 0.0012 \text{ pH T} - 0.0001 \text{ T OSL} - 0.00001 \text{ OSL}^2 \quad (14)$$

$$Dia_{max} = 24.27 - 2.77 \text{ pH} + 0.36 \text{ OSL} + 0.04 \text{ pH.T} - 0.06 \text{ pH.OSL} + 0.002 \text{ T.OSL} - 0.01 \text{ T}^2 + 0.001 \text{ OSL}^2 \quad (15)$$

As far as the substrates are concerned, correlation curves, between experimental data and predicted one give regression coefficients of 0.98 for both the maximum specific lactose and citrate uptake (Figure 2 and 3). Therefore, it was found that the models used give a satisfactory approximation to the experimental data.

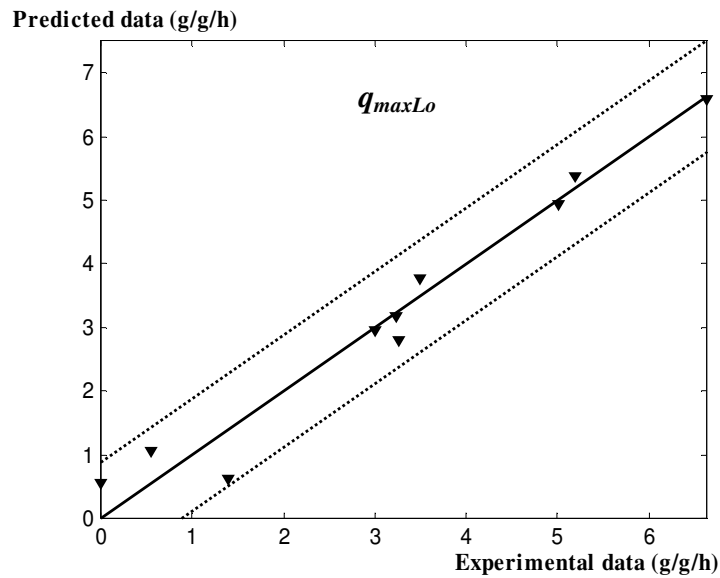


Figure 2. Correlation curves between predicted data and experimental data for maximum specific lactose uptake q_{maxLo} using a quadratic model (equation 2), where the scattered lines represent an estimation of the confidence interval with $p > 0.95$.

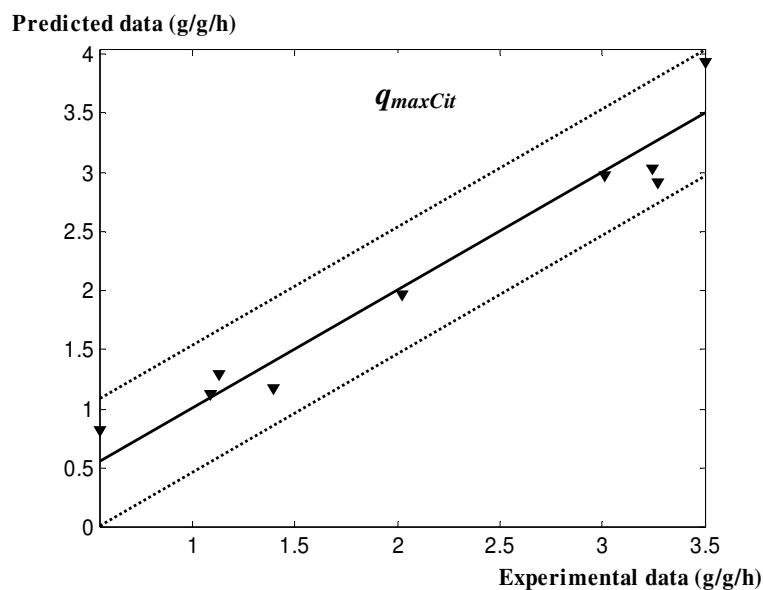


Figure 3. Correlation curves between predicted data and experimental data for maximum specific citrate uptake q_{maxCit} using a quadratic model (equation 3), where the scattered lines represent an estimation of the confidence interval with $p > 0.95$.

Regarding the maximum specific growth rate (Figure 4), correlation curves, between experimental data and predicted one give a regression coefficient of 0.99. Consequently, it was shown that such black box model used give a satisfactory approximation to the experimental μ_{max} .

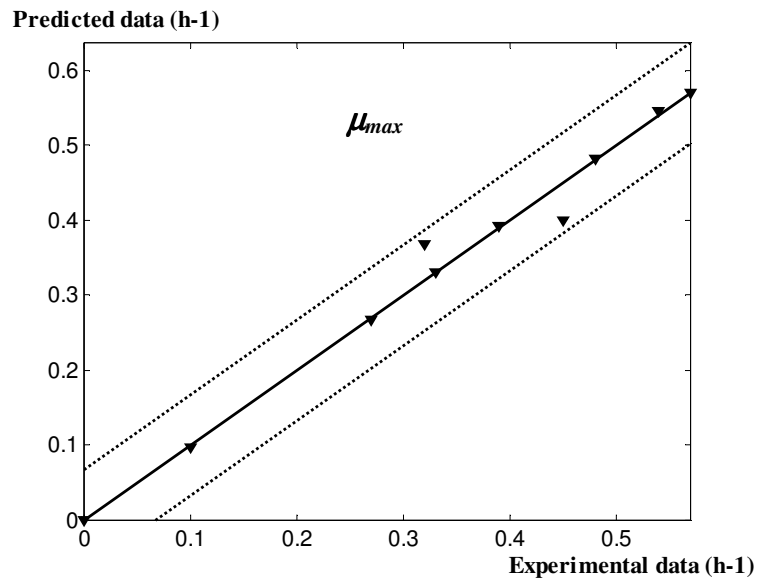


Figure 4. Correlation curves between predicted data and experimental data for maximum growth rate μ_{max} using a quadratic model (equation 4), where the scattered lines represent an estimation of the confidence interval with $p > 0.95$.

As regards correlation curves, between experimental data and predicted one give a regression coefficient the yield of biomass based on lactose uptake (Figure 5) present a regression coefficient of 0.99 and diacetyl production (Figure 6) present a regression coefficient of 0.94. As a result, it was established that the models used give a satisfactory estimation of the experimental data.

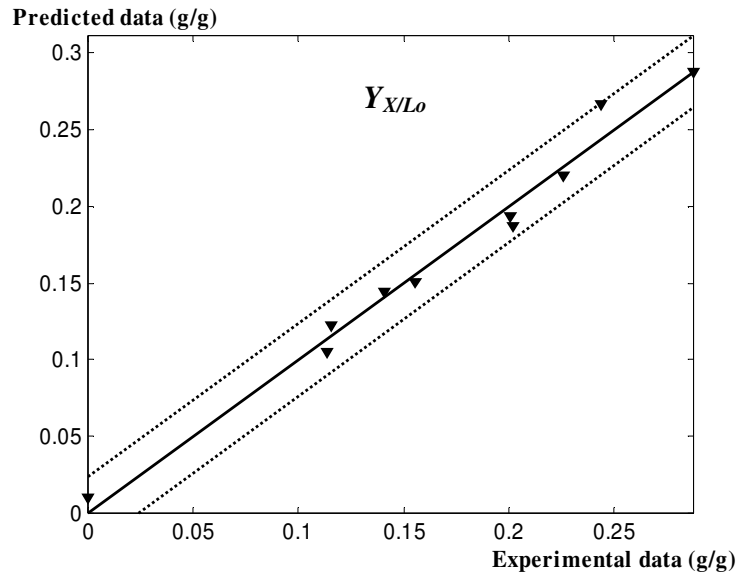


Figure 5. Correlation curves between predicted data and experimental data for biomass yield based on lactose uptake Y_{X/L_0} using a quadratic model (equation 5), where the scattered lines represent an estimation of the confidence interval with $p > 0.95$.

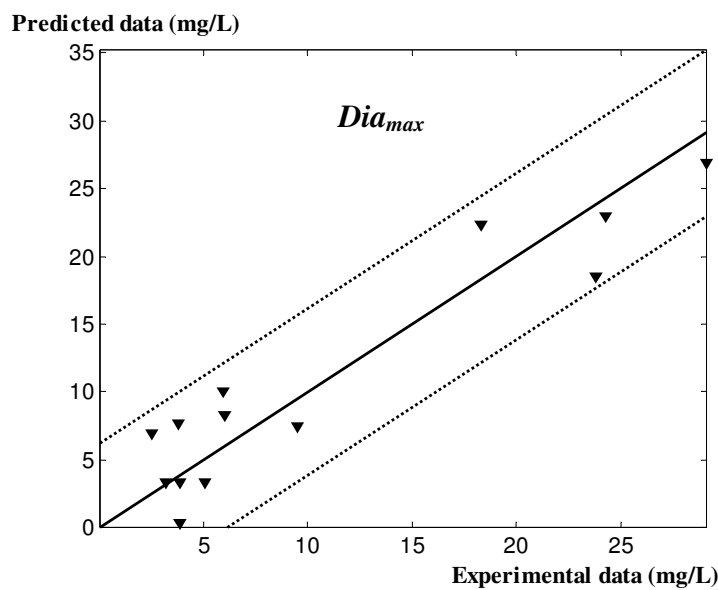


Figure 6. Correlation curves between predicted data and experimental data for maximum diacetyl production Dia_{max} using a quadratic model (equation 6), where the scattered lines represent an estimation of the confidence interval with $p > 0.95$.

These results show that the biomass yield based on lactose uptake: (i) depend on the combined effect of operating conditions applied to the bioprocess and (ii) that it's not constant and has a different profile than the maximum specific lactose uptake and the maximum specific growth rate. These observations are different from those existing in the literature.

On the other hand, a pertinent analysis of the macroscopic behaviour of *Lactococcus lactis* was done. Indeed, the effects of changing pH, T and OSL on growth and diacetyl production are reported Table 2. This analysis will serve as a basis for the further development of the primary model of the fermentation bioprocess.

Table 2. Summary of the major operating conditions effects on substrates consumption, growth and diacetyl production for *Lactococcus lactis* batch cultures.

pH: Level 1, Level 2, Level 3 and Level 4 correspond respectively to [4 - 4.5], [5.3-5.8], [6-6.5] and [8-8.5]

T: Low, intermediate and high correspond respectively to [15-20.5] °C, [20.6 - 27] °C and [27-30] °C

OSL: Level 1, Level 2 and Level 3 correspond respectively to 0 %, 35 % and 80 %.

1: metabolic pathway used, 0: metabolic pathway unused and for diacetyl the signs from ± to +++ express the increasing production indeed ±, +, ++ and +++ correspond to [1-5], [6 -15], [16 - 25] and [26 - 35] mg/L of diacetyl.

pH	T (°C)	OSL (%)	Lactose	Citrate	biomass	Diacetyl
Level 1	Low	Level 2	0	1	0	++
Level 1	Intermediate	Level 3	0	1	0	+++
Level 1	Intermediate	Level 1	0	1	0	+
Level 1	High	Level 3	0	1	0	++
Level 2	Low	Level 3	1	1	1	++
Level 2	Intermediate	Level 1	1	1	1	±
Level 2	High	Level 2	1	1	1	±
Level 3	Intermediate	Level 2	1	1	1	±
Level 3	Intermediate	Level 2	1	1	1	±
Level 4	Low	Level 3	1	0	1	0
Level 4	Low	Level 1	0	0	0	±
Level 4	Intermediate	Level 2	1	0	1	±
Level 4	High	Level 3	1	0	1	±
Level 4	High	Level 1	1	0	1	0

The results presented table 2, established that biomass growth and maximal apparent diacetyl production require antagonists sets of operating conditions. In addition, it confirmed previous observations on the influence of operating factors, when varying one factor at a time, on growth, substrates uptake and metabolites production of this strain.

Therefore, the pH interval [5.3-6.5] ensured total uptake of substrates and pH 6.5 leads to the maximal biomass concentration whereas pH 4 conducted to the production of the target metabolite, diacetyl.

Furthermore, some factor combinations highlighted some original results:

- (i) at pH [4-4.5] and for the highest oxygen saturation level, diacetyl production, Dia_{max} , increases when temperature rises from the intermediate to the highest temperature level.

(ii) at pH 8, at low temperature and for the highest OSL growth was stimulated whereas it was absent for low OSL.

Such unexpected results have been observed since the experimental design proposed operating conditions which are defined with the purpose of black-box modelling instead of understanding the physiological phenomenon. It thus point out some new operating combinations to improve process performances. A physiological study to explain such behaviour might be an interesting perspective for this study.

4. Conclusions

In this study, a new methodology of modelling a fermentation bioprocess as a black box model was used. Indeed, a multicriteria experimental design compromise of the D-optimal criterion and the Fischer matrix conditioning criterion was used with the aim of: (i) modelling the effect of the three operating factors (pH, temperature and oxygen saturation level) on the growth and diacetyl production; (ii) expanding the knowledge on the combined influence of the operating factors in order to direct the metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis PAL D DIA A, with a view to developing a dynamic production process. These lactic fermentation processes involve two antagonist major phases: biomass growth and target metabolite production. That's why it is helpful to explore an extended experimental domain in order to determine the optimal sets of operating conditions leading to both phases.

This work first confirmed previous observations on the influence of operating factors on growth, substrates uptake and metabolites production of this strain. In fact, pH 6.5 ensured total uptake of substrates and the maximal biomass concentration whereas pH 4 conducted to the production of organoleptic compounds such as diacetyl. In addition, the influence of oxygen on growth and metabolites production was in accordance with the literature with a combination of positive effects linked with coenzymes regeneration and negative effects due to oxygen toxicity. Also this work showed that the mathematical model used to predict the effect of the operating factors on the growth and growth kinetic was accurate (with regression coefficients of 0.99 between experimental data and modelled one) even for extreme operating conditions investigated such as the cultures carried out at pH 8, at low temperature approximately 16 °C. Actually at these conditions a high OSL stimulated the growth which is absent for a low OSL = 0 %. In addition at the same pH for a high OSL the raise of temperature between 16 °C and 30 °C did not modify the biomass production yield.

Furthermore, the mathematical model estimated the diacetyl production despite its low concentration in the culture media, with respect to other metabolite concentrations like lactate. Also, it took into account the metabolism orientation toward an acid mixed fermentation at 16 °C and toward homolactic behaviour at 30 °C.

Therefore, this work has successfully allowed the development of a quadratic model that accurately assess the operating condition effects on substrates uptake, growth and metabolism orientation and the identification of both interesting and highly avoidable operating conditions during the process. In the future this model could be integrated in the model that will be used in the dynamic monitoring of the fermentation process.

This methodology was applied to the production of diacetyl by *Lactococcus lactis* and lead to a satisfactory model of the process. Such methodology enables a rapid determination of a suitable ED which can lead to a simple polynomial model of a complex bioprocess without looking into the full metabolism. It is clear that this approach can easily be extended to industrial problems, to rapidly identify process model and determine optimal operating conditions.

References

- [1] Prados-Rosales R C, Luque García J L and Luque de Castro. Rapid analytical method for determination of pesticide residues in sunflower seeds based on focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 993: 121-129.
- [2] Lunde M, Aastveit A H, Blatny J M and Nes I F. Effects of diverse environmental conditions on ϕ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 721-727.
- [3] Rodrigues L, Teixeira J, Oliveira R and van der Mei H C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochem* 2006; 41: 1-10.
- [4] Dron J, García E and Millán E. Optimization of headspace solid-phase microextraction by mean of an experimental design for the determination of methyl *tert.*-butyl ether in water by gas chromatography-flame ionization detection. *J Chromatogr A* 2002; 963: 259-264.
- [5] Mutel B, Bigan M and Vezin H. Remote nitrogen plasma treatment of a polyethylene powder: Optimisation of the process by composite experimental designs. *Appl Surface Sci* 2004; 239: 25-35.
- [6] Jeon Y C, Cho C W and Yun Y S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enz Microb Technol* 2006; 39: 490-495.
- [7] Navalón A, Prieto A, Araujo L and Vilchez J L. Determination of oxadiazon residues by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J chromatogr A* 2002; 946: 239-245.
- [8] Gehin A, Guillaume Y C, Millet J, Guyon C and Nicod L. Vitamine C and reverse effect of herbicide-

induced toxicity on human epidermal cells HaCaT: a biochemometric approach. *Int J pharmaceutics* 2005; 288: 219-226.

[9] Grijspeerdt K and De Reu K. Practical application of dynamic temperature profiles to estimate the parameters of the square root model. *Int J Food Microbiol* 2005; 101: 83-92.

[10] García I, Sarabia L, Cruz Ortiz M and Aldama J M. Usefulness of D-optimal designs and multicriteria optimization in laborious analytical procedures: Application to the extraction of quinolones from eggs. *J Chromatogr A* 2005; 1085: 190-198.

[11] Muniglia L. Elaboration d'une stratégie expérimentale multicritère appliquée à la conception optimale d'un bioprocédé continu de production d'arômes laitiers. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 2001.

[12] Law BA. The formation of aroma and flavour compounds in the fermented dairy products. *Dairy Sci Abstr* 1991; 43: 43-154.

[13] Goupy S, Croguennec T, Gentil E and Robins RJ. Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 82: 207-211.

[14] Stien G, Blanchard F, Rondags E and Marc I. An on-line method for the measurement of diacetyl and acetaldehyde in yoghurt, fermented milk, butter and margarine. *Le Lait* 1999; 79: 615-624.

[15] Rondags E, Halliday and Marc I. Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* bv. diacetylactis: study of α -acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis. *Appl Biochem Biotechnol* 1998; 69: 113-125.

[16] Rondags E, Germain P and Marc I. Quantification of extracellular α -acetolactate oxidative decarboxylation in diacetyl production by an α -acetolactate overproducing strain of *Lactococcus lactis* sp. *Lactis* bv. diacetylactis. *Biotechnol Lett* 1999 ; 21: 303-307.

[17] Goupy J. Plans d'expériences pour surface de réponse. Dunod, Paris, 1999.

[18] Collins EB. Influence of medium and temperature on end products and growth. *J Dairy Sci* 1977; 60: 799-804.

[19] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT and Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 2 ed Williams et Wilkins, Baltimore, 2005.

[20] Adamberg K, Kask S, Laht TM and Paalme T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J food Microbiol* 2003; 85: 171-183.

[21] Cachon R and Diviès C. Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* biovar *Diacetylactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 41: 694-699.

[22] Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol Rev* 1987; 46: 269-280.

[23] Bassit N, Iatrille E, Boquien CY, Picque D and Corrieu G. Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. *Lait* 1994 ; 74: 115-126.

[24] Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, Le Loir Y, Violet F, Loubière and Gruss A. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol* 2001; 183: 4509-4516.

[25] Snedecor GW, Cochran WG, 1989. *Statistical Methods* eighth ed. Iowa State University Press, Ames.

- [26] Muniglia L, Nandor Kiss L, Fonteix C and Marc I. Multicriteria optimization of a single-cell oil production. *Europ J Operational Res* 2004; 153: 360-369.
- [27] Trelea IC, Titica M and Corrieu G. Dynamic optimisation of the aroma production in brewing fermentation. *J Process Control* 2004; 14: 1-16.
- [28] Azzaro-Pantel C, Bernal-Haro L, Baudet P, Domenech S and Pibouleau L. A two-stage methodology for short-term batch plant scheduling: Discrete-event simulation and genetic algorithm. *Comp Chem Eng* 1998; 22: 1461-1481.
- [29] Sarkar D and Modak JM. Pareto-optimal solutions for multi-objective optimization of fed-batch bioreactors using nondominated sorting genetic algorithm. *Chem Eng Sci* 2005; 60: 481-492.
- [30] Zitzler E and Thiele L. Multiobjective Evolutionary Algorithms: A comparative Case Study and the Strength Pareto Approach. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation* 1999; 3: 257-271.
- [31] Suman B. Study of simulated annealing based algorithms for multiobjective optimization of a constrained problem. *Computers and Chemical Engineering* 2004; 28: 1849-1871.
- [32] Fonteix C, Bicking F, Perrin E, Marc I, 1995. Haploid and diploid algorithms, a new approach for global optimization: compared performances. *Int J Systems Sci* 1997; 2: 1919-1933.
- [33] Perrin E, Mandrille A, Oumoun M, Fonteix C and Marc I. Optimisation globale par stratégie d'évolution : Technique utilisant la génétique des individus des individus diploïdes. *RAIRO Rech Op* 1997; 31: 16-201.
- [34] Fonteix C, Masseur S, Pla F and Nandor Kiss L. Multicriteria optimization of an emulsion polymerization process. *Europ J Operational Res* 2004; 153: 350-359.

III.2. Effets des conditions opératoires sur la croissance et l'orientation du métabolisme de *Lactococcus lactis* au cours de Cultures discontinues

Au cours de cette partie, nous allons étudier l'influence combinée des facteurs opératoires sur la croissance et la production de métabolites, notamment d'arômes, afin d'analyser le comportement des bactéries dans des conditions extrêmes. Cette analyse a pour but de comprendre le comportement métabolique global de la bactérie utilisée mais aussi d'acquérir un savoir qui permettra de prévenir les risques d'accidents au cours de la fermentation. Afin de faciliter cette analyse un second plan d'expérience sera utilisé pour valider et compléter les résultats précédemment obtenus. Les données collectées seront à la base, par la suite, de la construction du modèle qui servira lui-même de support à l'optimisation dynamique multicritère.

Les résultats obtenus à la suite de l'utilisation du second plan d'expériences ont permis de valider et de compléter le plan d'expériences multicritère de la première partie de l'étude. Ainsi, l'utilisation du PE a permis de mettre en évidence que les deux phases du procédé, croissance et production de diacétyle, requièrent des conditions opératoires antagonistes. En effet, les conditions optimales retenues pour la croissance sont pH = 6,5, température T = 30 °C, et TOD = 35 % alors que pour la production de diacétyle les conditions optimales identifiées sont pH = 4, température T = 30 °C, et TOD = 35 %.

Aussi, le plan d'expériences utilisé a permis de montrer des combinaisons de facteurs opératoires critiques conduisant à des comportements physiologiques inattendus. En effet, à pH = 8, la combinaison d'une faible température (T = 16 °C) et l'augmentation du TOD qui évolue de 0 à 70 %, stimulent la croissance de la bactérie alors que l'augmentation de température de 16 à 30 °C pour un TOD = 70 % ne modifie pas le rendement de production de biomasse.

Projet de publication

Analysis of the effect of pH, temperature and oxygenation on growth and metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, for batch fermentation

1. Introduction

Microbial processes often suffer from poor production performances due to the lack of optimal control. Classically, fixed set points for the operating parameters are applied all over the process, or during identified phases such as growth or production. However, the levels and physiological abilities of biomass change during the process. Consequently, an approach for achieving higher performance levels should be to adapt the operating conditions to the biomass evolution all over the fermentation.

In order to do so, it is necessary to dispose of a set of data describing the influence of the critical operating parameters on growth and production performances. For numerous processes, such data are available, with “optimal experimental” conditions obtained from single parameter studies. Such kind of data is indeed interesting with a fixed set point approach but is insufficient for the dynamic control of a microbial process. As a consequence, a multifactor approach has to be applied to recover useful sets of data.

In this context, the example chosen is the production of the dairy flavour diacetyl by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis [1, 2], because of its low production performances inherent to (i) different growth and production optimal operating conditions and (ii) complex metabolic pathways with fluxes highly depending on operating factors. Indeed, this microorganism is known as a homolactic bacterium but under certain conditions a metabolic shift from homolactic to mixed acid fermentation can occur in this particular strain [3, 4].

In order to increase the production of diacetyl, two axes of research have been explored:

- (i) the selection and the development of overproducing strains by genetic engineering. Over the last decade several reports on metabolic rerouting of central metabolism in *Lactococcus lactis* were presented and reviewed [5, 6] This axis is very interesting on research scale whereas it constitutes a lawful nonsense on industrial scale,
- (ii) the improvement of the fermentation process by identifying the best operating conditions in a static approach (pH, temperature, oxygen saturation level (OSL) and substrates feeding) and by maintaining them during the process. The improvement could be conducted by changing the operational modes and by exploring different experimental zones.

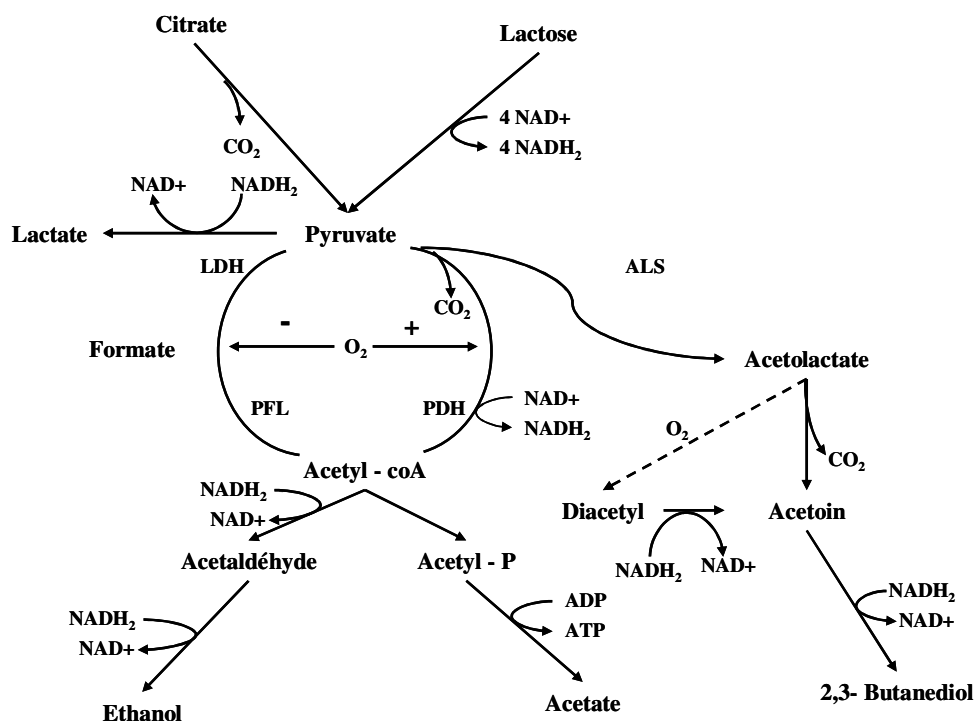


Figure 1. Schematic pathway of citrate/lactose co-metabolism in *Lactococcus lactis*. LDH: lactate dehydrogenase; PDH: pyruvate dehydrogenase complex; PFL: pyruvate formate lyase complex; α -ALS : α -acetolactate synthase.

From a practical point of view, in spite of the considerable metabolic information collected during the last years (Figure 1) and numerous genetic tools available for *Lactococcus lactis* [7], it remains relatively poorly characterized in respect to dynamic response to changing pH, temperature (T) and oxygen saturation level (OSL). Thus, in this study the experimental domain was extended compared with static studies in order to highlight the combined effect of T, pH and OSL on the growth and flavour production of

Lactococcus lactis and to look at interactions of operating conditions susceptible to be encountered during a dynamic process.

To study this effect a multicriteria experimental design was used to collect reliable information. This experimental design (ED) takes into account the physiological and cellular knowledge about *Lactococcus lactis* growth and metabolism, available in the literature. As a consequence three operating parameters have been chosen for the ED construction. The influence of these parameters was studied in batch culture. According to previous studies [3, 8, 7, 11, 18, 26, 28], the temperature, pH and OSL ranges were respectively set to [16, 30] °C, [4.5, 8] and [0, 70] %.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial strain and culture media

The bacterium used throughout this work was *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis PAL D DIA A, purchased from Standa Industry (Caen, France). It was grown on the semi synthetic Y medium [15], with lactose (10.0 g/L) and citrate (1.5 g/L) as carbon sources.

2.2. Fermentation conditions

The preculture was prepared by cultivating the bacteria in 200 mL of medium at 30 °C for 15 h. The fermenter already containing 1.4 L of medium was then inoculated with the preculture. The cultivation system consisted of an Applikon 3L fermenter controlled by ADI 1030 biocontroller and cultivation supervisor software "BioXpert" (Applikon, The Netherlands). The system was equipped with pH, OSL and temperature sensors. The anaerobic conditions were ensured by a constant flow of nitrogen throughout the headspace of the bioreactor. The levels of dissolved oxygen (35 % and 70 %) in the bioreactor were obtained by sparging air and/or in the culture medium and modifying stirring speed. The pH of the culture was kept at the desired value by feeding the culture vessel with a solution of either NaOH (0.2N) or HCl (0.2N) for acid pH. The temperature is maintained by a thermo-circulator bath ADI 1018.

2.3. Analytical methods

The concentrations of organic acids, acetoin, 2,3-butanediol and α -acetolactate in the culture media were analyzed by off-line high performance liquid chromatography (Waters,

USA), isocratic elution with 0.04M H₂SO₄, flow rate 0.9 mL min⁻¹ on Polypore H (PPH - 257) column (Brownlee Lab.,USA) at room temperature using UV (210 nm) and refractive index detectors [14]. The concentration of lactose in fermentation media was analyzed by off-line high performance liquid chromatography (Waters, USA) isocratic elution with deionized water, flow rate 0.9 mL min⁻¹ on Alltech 700 CH carbohydrate column (Alltech,USA) at 85 °C. The proportioning of aroma molecules (diacetyl, acetaldehyde and ethanol) was carried out on-line by a membrane sampler of volatile compounds coupled to a chromatographic method in gas phase (Perichrom, France). This method was described by Muniglia [16]. The biomass concentration was determined by optical density (OD) measurement at 650 nm and the strain specific biomass conversion factor γ ($\gamma = \text{dwt}/\text{OD}_{650}$, where dwt is biomass dry weight obtained by filtering the biomass from 40 mL culture, washing and drying at 105 °C overnight).

2.4. Experimental design

The experimental design used in this study (Table 1), involves two factors with 3 levels and a factor with 2 levels respectively pH, oxygen saturation level (OSL) and temperature.

Table 1. The experimental design used in order to assess the effects of pH, T, and Oxygen saturation level (OSL) on the dynamical behaviour of growth and metabolite production characteristics.

Experiment	pH	T (°C)	OSL (%)
1	4	30	70
2	4	30	0
3	4	30	35
4	6.5	30	35
5	6.5	30	0
6	6.5	30	70
7	6.5	16	70
8	8	16	0
9	8	16	70
10	8	30	70
11	8	30	0

2.5. Model development

In order to highlight the combined effect of operating conditions on growth, substrate consumption and metabolites production, the data obtained from the ED was analysed and a

quadratic model was selected to show this effect. This model has the following form:

$$c = \beta_0 + \beta_1 pH + \beta_2 T + \beta_3 OSL + \beta_4 pH.T + \beta_5 pH.OSL + \beta_6 T.OSL + \beta_7 pH^2 + \beta_8 T^2 + \beta_9 OSL^2 \quad (1)$$

Where c is the modelled criteria and $\beta_0 \dots \beta_9$, are the model coefficients identified by linear regression using Matlab 5.3 software.

3. Results and discussion

Growth of *Lactococcus lactis* on lactose and citrate was investigated in pH-regulated batch cultures. The effects of operating conditions on growth and on carbon flux orientation were studied both quantitatively and qualitatively. In fact, a predictive modelling has been used to predict bacterial growth, intermediate metabolite production (pyruvate) and aroma production as a function of environmental factors. In addition, an analysis of the physiological effect of changing operating conditions was done.

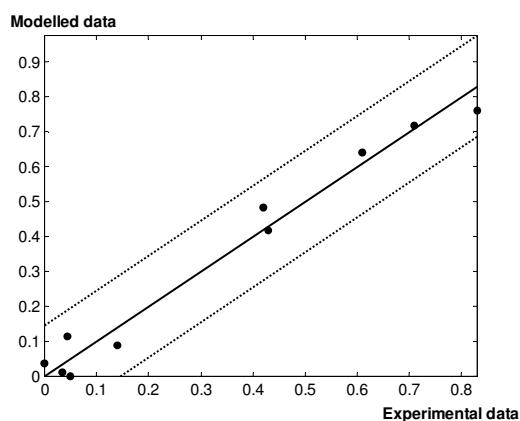
3.1 Effect of operating conditions on growth and substrate consumption kinetics

On the one hand, a mathematical model was developed to investigate growth of *Lactococcus lactis* as a function of operating factors. Consequently, quadratic expressions of the maximum specific growth rate and biomass growth vs. pH, T and OSL were obtained using respectively equations (2) and (3). Non significant terms (with a 95 % confidence level) have been eliminated to keep the most influent parameters in each model. Correlation curves between experimental data and modelled one (Figure 2) give regression coefficients of 0.99 for both maximum growth rate and maximal biomass concentration. Therefore, it was found that the models used give a satisfactory approximation to the experimental data.

$$\mu_{\max} = 0.66pH + 0.02T + 0.06OSL + 0.03pH.T + 0.021pH.OSL + 0.02T.OSL - 0.34pH^2 - 0.03OSL^2 \quad (2)$$

$$X_{\max} = 1.41pH + 0.16T + 0.17OSL + 0.05pH.T + 0.26pH.OSL - 0.04T.OSL - 0.89pH^2 - 0.05OSL^2 \quad (3)$$

(A) Maximum growth rate (μ_{max})



(B) Maximal biomass concentration (X_{max})

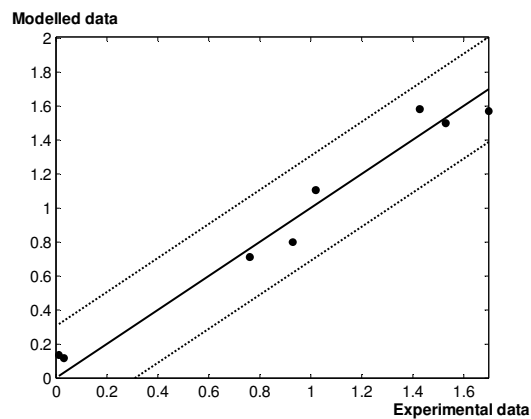


Figure 2. Correlation curves between modelled data and experimental data for maximum growth rate (A) and maximal biomass concentration (B).

On the other hand, a pertinent analysis of the macroscopic behaviour of *Lactococcus lactis* was done. Indeed, the effects of changing pH, T and OSL on growth and substrates consumption were highlighted:

Effect of the pH

The growth kinetics of *Lactococcus lactis* strain PAL D DIA A, were compared under different pH conditions. These results (Figure 3) show that the growth of this strain is affected by the culture medium pH. The maximal biomass concentration 1.5 g/L was measured at pH 6.5 and the amount of biomass obtained was reduced either when the pH increased (pH = 8) or decreased (pH = 4) (Table 2). The maximal biomass concentration was reached faster at pH 6.5 (in 5 hours) than at pH 8 (8 h). In addition no growth was observed at pH 4 with no decisive information on cellular death. The bacteria showed higher maximal specific growth rate at pH 6.5 than at pH 8 with respectively 0.70 h^{-1} and 0.60 h^{-1} . Therefore these results confirm those obtained by Rondags [9] and Adamberg *et al.* [17]. As far as substrates are concerned, at pH 6.5 both lactose and citrate were completely consumed while at pH 4 there was no lactose utilization and at pH 8 there was no citrate uptake.

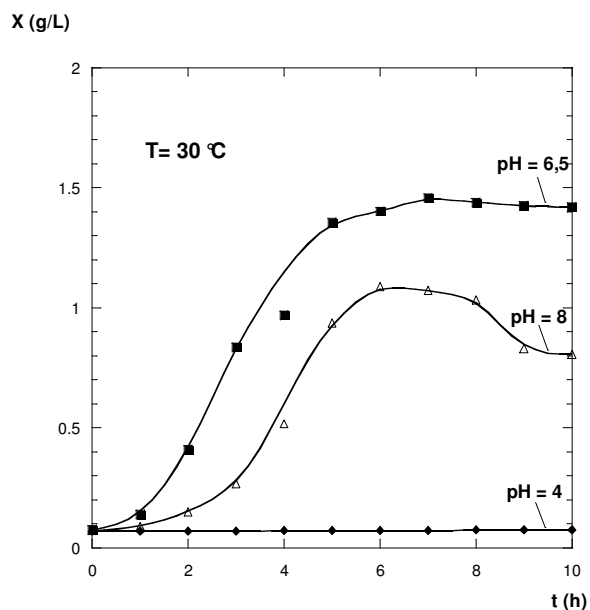


Figure 3. Effect of pH on growth kinetics of *Lactococcus lactis* at 30 °C and at an oxygen saturation level OSL = 70 %.

At very acidic pH (pH 4), citrate consumption is observed to maintain cell activity, associated with the production of some aroma compounds such as diacetyl indicating that these pH conditions do not lead to a total cellular death. The absence of growth under such conditions associated with the lactose conservation could be the consequence of an inhibition of hexokinases activity or the inhibition of some enzymes implicated in fatty acids metabolism. The lack of citrate consumption at pH 8 could be explained by pH activity range of citrate permease 4.5 – 5.5 [18] and inactive at neutral and alkaline pH [19]. This growth absence at pH 4 and at 30 °C represents an important industrial stake. Therefore during a process the strain could be conserved at a defined physiological state and then the culture could be rebooted by fixing the pH around the neutrality. The same behaviour was observed under anaerobic (data not shown) and aerobic conditions.

Table 2. Influence of pH on biomass production and substrates consumptions of *Lactococcus lactis* PAL D DIA A at 30 °C and at OSL = 70 % (with ^a: maximal biomass level achievement time (h), ^b: substrate consumption duration).

pH	4	6.5	8
Maximal biomass concentration (g/L)	0	1.5 (5 h) ^a	1.0 (8 h) ^a
Maximal citric acid uptake (mM)	7 (6 h) ^b	7 (4 h) ^b	1 (10 h) ^b
Maximal lactose uptake (mM)	0	28 (5 h) ^b	28 (8 h) ^b
μ max (h ⁻¹)	0 (\pm 0.02)	0.70 (\pm 0.02)	0.60 (\pm 0.02)

Effect of the temperature

The temperature effect was highlighted by comparing growth kinetics of PAL D DIA A at 16 and 30 °C as shown in Figure 4 and Figure 5.

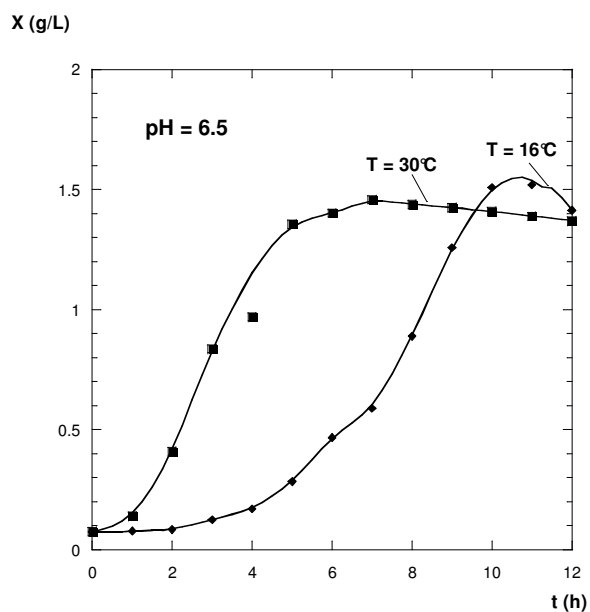


Figure 4. Effect of temperature on growth of *Lactococcus lactis* at pH 6.5 and at OSL = 70 %.

The results summarized in table 3, show that at pH 6.5:

- i. both citrate and lactose were totally consumed.
- ii. growth was observed at both 16 °C and 30 °C and the biomass production yields were not modified.
- iii. the lag phase was longer at 16 °C than at 30 °C.
- iv. growth kinetics were affected by the increase in temperature. Actually maximal biomass concentration was reached two times faster at 30 °C, considered as the optimal temperature for growth, than at 16 °C. From a kinetic point of view at pH 6.5 and 30 °C, bacteria growth follows a perfect sigmoid curve however at 16 °C a biomass concentration decrease began after 10 h of fermentation with a chase of lactose consumption during the decline phase.

Such behaviour could be interesting for process monitoring by accelerating or slowing down the culture without affecting the global yield according for example to industrial scheduling constraints.

Table 3. Effect of temperature on biomass production and substrate consumption of *Lactococcus lactis* PAL D DIA A at pH 6.5 and at OSL = 70 % (with ^a: maximal biomass level achievement time (h)).

Temperature (°C)	16	30
Maximal biomass concentration (g/L)	1.5 (10 h) ^a	1.5 (5 h) ^a
End consumption time for citrate (h)	8	4
End consumption time for lactose (h)	20	5
μ max (h ⁻¹)	0.40 (\pm 0.02)	0.70 (\pm 0.02)

Experiments carried out at pH 8 (Figure 5 and Table 4) show that:

- i. citrate was not consumed and the maximal biomass concentration was reached before the lactose starvation in the culture medium.
- ii. growth was stimulated by the temperature both under anaerobic and aerobic conditions and unexpected results were observed. Actually for OSL = 0 % no growth was found at 16 °C whereas at 30 °C, growth was observed with a maximal biomass concentration of 0.7 g/L. In addition for OSL = 70 % growth was observed at both temperatures and the temperature raise from 16 °C to 30 °C did not modify the biomass production yield.
- iii. the lag phase was longer at 16 °C than at 30 °C at OSL = 70 %.
- iv. kinetic behaviour was affected by the temperature rise. Thus the specific growth rate was increased four times from 16 °C to 30 °C as shown in table 2.
- v. the oxygenation had a positive effect on growth. In fact at 30 °C and under aerobic conditions, the maximal biomass concentration was higher than under anaerobic conditions respectively 0.7 and 1.0 g/L and a comparable behaviour was shown at 16 °C.

These last observations once again display the system complexity. Such intricacy results from the interaction of the operating factors investigated.

(A) pH = 8 and OSL = 0 %

(B) pH = 8 and OSL = 70 %

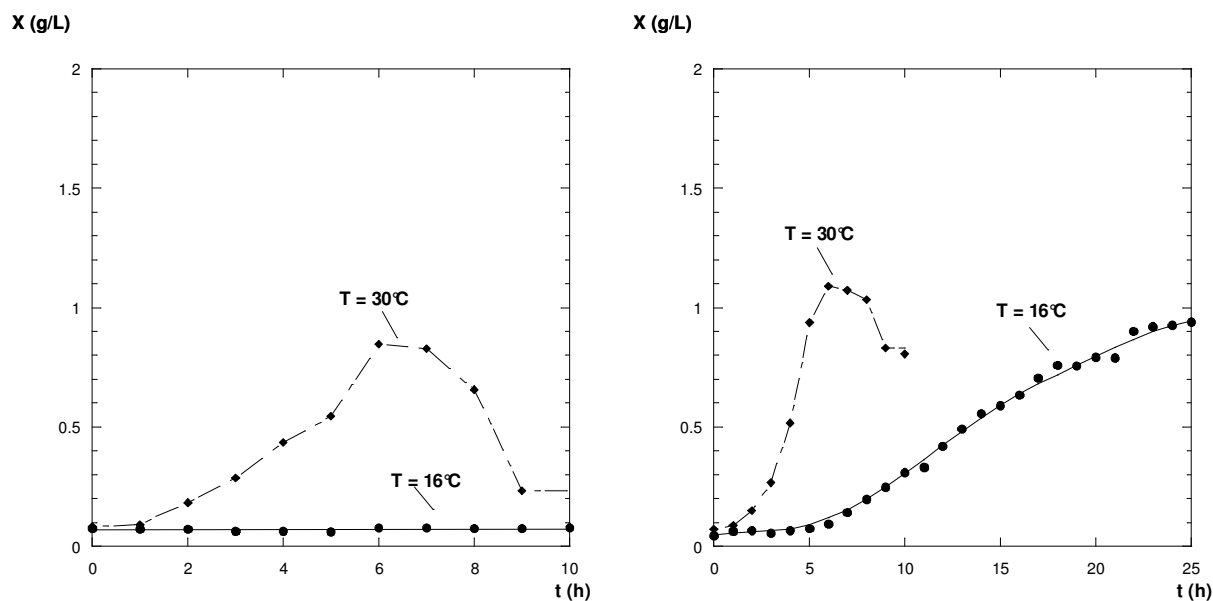


Figure 5. Effect of temperature on growth of *Lactococcus lactis* at pH 8 and at two OSL 0 % (A) and 70 % (B).

Table 4. Effect of temperature on biomass production and substrate consumption of *Lactococcus lactis* PAL D DIA A at pH 8 and under anaerobic and aerobic conditions (with ^a: maximal biomass level achievement time (h) and (cons⁻): consumption absence).

Temperature (°C)	16	30	16	30
Oxygen saturation level (%)	0	0	70	70
Maximal biomass concentration (g/L)	0.00	0.7 (6 h) ^a	1.0 (25 h) ^a	1.0 (7 h) ^a
End consumption time for citrate (h)		(cons ⁻)		
End consumption time for lactose (h)	(cons ⁻)	9	20	8
μ max (h ⁻¹)	0.00 (\pm 0.02)	0.45 (\pm 0.02)	0.15 (\pm 0.02)	0.6 (\pm 0.02)

Effect of the oxygenation

The growth kinetics of *Lactococcus lactis* strain PAL D DIA A, were compared under different oxygenation conditions considering growth favourable operating conditions of pH and temperature. Kinetics of growth corresponding are presented in Figure 6. Also, the results presented in Table 5 show that, whatever the OSL, both citrate and lactose were completely metabolized.

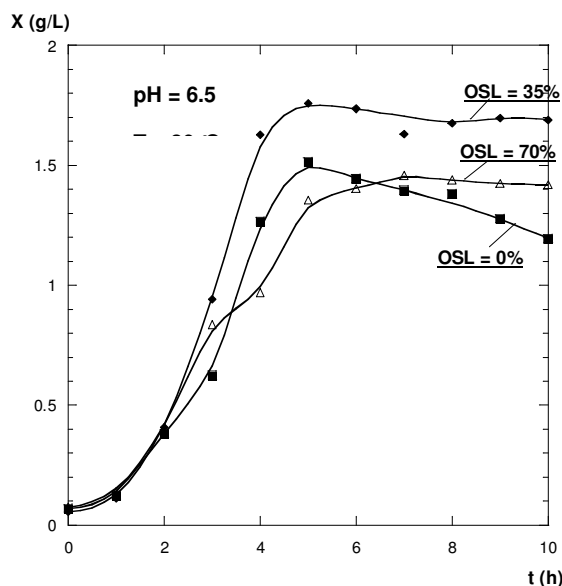


Figure 6. Effect of OSL on growth kinetics of *Lactococcus lactis* at 30 °C and at pH 6.5.

Table 5. Kinetic results of oxygenation effect on production and substrate consumption of *Lactococcus lactis* PAL D DIA A under favourable growth conditions: 30 °C and at pH 6.5 (with ^a: maximal biomass level achievement time (h)).

OSL (%)	0	35	70
Maximal biomass concentration (g/L)	1.5 (5 h) ^a	1.7 (4 h) ^a	1.5 (5 h) ^a
End consumption time for citrate (h)	4	4	4
End consumption time for lactose (h)	6	5	5
μ max (h ⁻¹)	0.75	0.85	0.70

The maximal biomass concentration and the specific growth rate followed a bell-shaped curve showing an optimum of growth at OSL = 35 %. Thus these results confirm the microaerophilic behaviour of the bacterium. Consequently:

- i. when anaerobic conditions were applied the maximal biomass concentration obtained was 1.5 g/L and the maximal specific growth rate was μ max = 0.75 h⁻¹. The kinetic behaviour presented a biomass concentration decrease after 5 h of cultivation. This phase of decline could be due to a beginning of cellular death and to the absence of cofactors regeneration.
- ii. when oxygen was present at low saturation (OSL = 35 %), it stimulated the growth probably by cofactors regeneration. In fact, at this saturation the maximal biomass concentration was the highest (1.7 g/L). Also bacteria reached faster the maximal biomass concentration (after 4 h of cultivation) than under the other aeration conditions. Accordingly at this concentration, the

maximal specific growth rate was the uppermost with 0.85 h^{-1} . Moreover no biomass concentration decrease was shown.

- iii. when oxygen was present at high saturation (OSL = 70 %), the maximal biomass concentration showed was lower than under intermediate oxygen concentration with respectively 1.5 vs. 1.7 g/L. Moreover this biomass concentration was reached one hour later than at OSL = 35 % and the maximal specific growth rate, was inferior to the one measured under anaerobic conditions. This could be due to a threshold oxygenation effect on growth. The known formation of some toxic molecules for the microorganism for much ventilated culture could explain such result. Also the PAL D DIA detoxification system seems to be overflowed when the oxygen concentration rises over 70 %. However no biomass concentration decrease was shown this could be due to a cofactor regeneration that maintains cellular activity.

The observations that the presence of low OSL in the culture medium has a positive effect on the microorganism are in accordance with the observations of Condon [14] and Sakamoto *et al.* [20]. The change of kinetics and the decrease in maximal biomass concentration for culture with a high OSL could be due to the production of metabolic intermediates (hydrogen peroxide and hydroxyl radicals) with high oxidising potential and thus responsible for cellular oxygen toxicity [21,22]. Also Duwat *et al.* [23] revealed that a long-lasting aeration of lactococcal cultures can lead to DNA degradation and cell death.

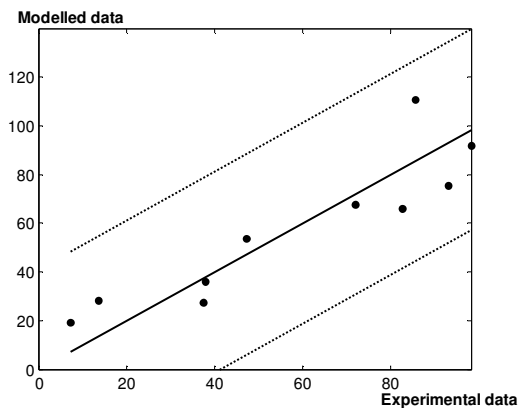
3.2 Effect of the operating conditions on the metabolites production excluding the amount of acetate obtained by the first breakdown of the citrate

First, as for the former case concerning *Lactococcus lactis* growth, quadratic expressions of the maximal pyruvate concentration and the maximal diacetyl concentration vs. pH, T and OSL were obtained using equation (1). Consequently, quadratic expressions of the maximal pyruvate concentration (Pyr_{max}) and the maximal diacetyl concentration (Dia_{max}) vs. operating conditions were obtained using respectively equations (4) and (5). Non significant terms (with a 95 % confidence level) have been eliminated to keep the most influent parameters in each model. Correlation curves between experimental data and modelled one (Figure 7) give regression coefficients of 0.91 for maximal pyruvate concentration and 0.99 for maximal diacetyl concentration.

$$Pyr_{\max} = 85.60pH - 8.13T + 5.10OSL + 1.86pH.T + 1.75pH.OSL + 5.71T.OSL - 46.66pH^2 - 0.50OSL^2 \quad (4)$$

$$Dia_{\max} = 1.89pH - 4.77T + 2.74OSL - 1.88pH.T - 1.26pH.OSL - 0.22T.OSL + 5.53pH^2 - 0.15OSL^2 \quad (5)$$

(A) Pyruvate production (mg/L)



(B) Diacetyl production (mg/L)

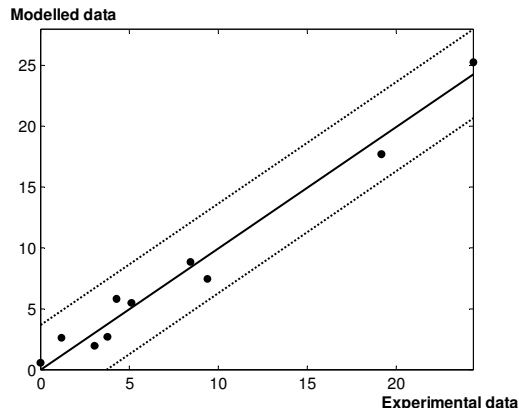


Figure 7. Correlation curves between modelled data and experimental data for (A) pyruvate production (g/L) and (B) diacetyl production (mg/L).

Also, the same work was done with acetaldehyde and ethanol (data not shown) giving regression coefficients respectively of 0.98 and 0.95. Taking into account, low concentrations of volatile molecules (diacetyl, acetaldehyde and ethanol), regression coefficients superior to 0.95, show that the models used gives a satisfactory approximation to the experimental data.

Finally, this part of the study gathers a result synthesis of catabolic fluxes and their orientation. During these experiments both formate and α -acetolactate (AAL) were not detected. If referred to the literature, the absence of formate detection throughout the fermentation could be explained by:

- i. pyruvate formate lyase (PFL) inhibition by an increase in the pool of both glyceraldehyde-3-P and dihydroxyacetone-P due to a high glycolytic flux [24];
- ii. PFL inhibition due to a raised NADH /NAD+ ratio [24];
- iii. PFL inhibition by the oxygen present in the culture medium for ventilated cultures [25].

However, in our study, these statements are inadequate to justify the absence of formate production all over a large experimental domain explored taking into account trials carried out under anaerobic conditions and very acidic pH. This result was at variance with those found by Stien [15] and Rondags [9] who detected formate production under anaerobic

conditions and at acidic pH. Thus, the absence of formate production was probably due to the deficiency in PFL enzyme in that particular strain.

Effect of the pH

The effect of pH on carbon flux distribution for *Lactococcus lactis* PAL D DIA A in lactose/citrate co-fermentation at 30 °C and under OSL = 70 % is shown in Figure 8. Culture conducted at the same temperature and under anaerobic conditions provided similar profile (data not shown). The highest global carbon flux was measured at pH 6.5 and the lowest one was found at pH 4. This is in agreement with previous results which showed that at pH 6.5 citrate and lactose were both totally consumed whereas at pH 4 no lactose uptake was shown and at pH 8 no citrate was catabolized (as a result of the citrate permease inhibition). As can be seen, the co-metabolism of lactose and citrate at pH 6.5 led to 99 % conversion of lactose into lactic acid with a yield, $Y_{P/S1}$ of 0.96 g/g, (theoretical yield of lactate production, in homolactic cultures, 1.05 g/g).

At pH 8, the homolactic behaviour was lost and $Y_{P/S1}$ was equal to 0.73 g/g. This low value is probably due to the orientation of the carbon flux to the pentose phosphate pathway. At pH 4 a very low routing of the carbon flux to the lactate dehydrogenase (LDH) pathway (~5 %) was showed in relation with the absence of lactose uptake.

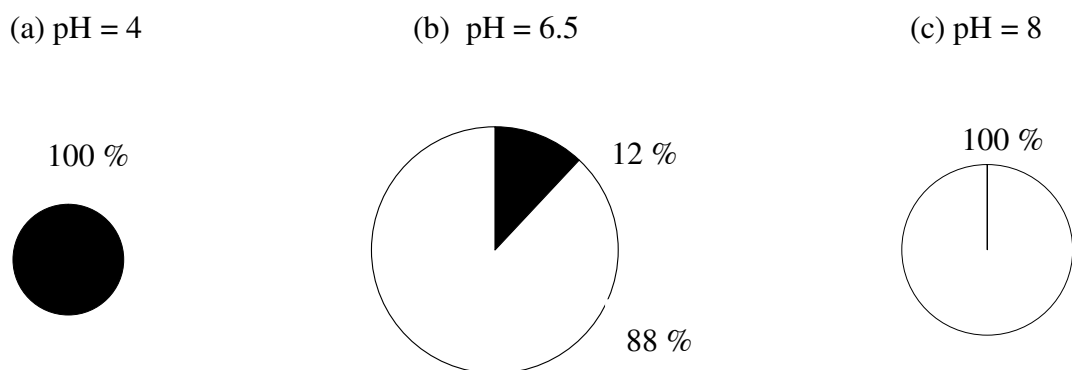
There was no flux through pyruvate dehydrogenase (PDH) at pH 6.5. At pH 8, only 5 % of the carbon flux was routed to the production of acetate and of a little amount of ethanol and acetaldehyde while at pH 4 more than 35% of the carbon flux was directed toward the PDH pathway producing ethanol and acetate.

There was no flux through the pathway of C4 products (C4 pathway) at pH 6.5. At pH 8, no C4 compound was obtained whereas at pH 4 more than 50 % of the carbon flux was oriented to C4 pathway with a maximal diacetyl production of 20 mg/L.

These results confirm that under growth conditions in which the glycolytic flux is low and thus the ratio $NADH/NAD^+$ is low too, most likely due to the inefficient sugar uptake, the cell derives some advantage from switching metabolism toward mixed-acid fermentation [24].

These results confirm the major role played by pH on citrate and lactose metabolisms. As a consequence this function is industrially attractive because it allows the external management and the distribution of the pyruvate fluxes without using genetic engineering.

i/ Catabolic flux and substrates proportions (T = 30 °C and OSL = 70 %)



ii/ Carbon flux distribution (T = 30 °C and OSL = 70 %)

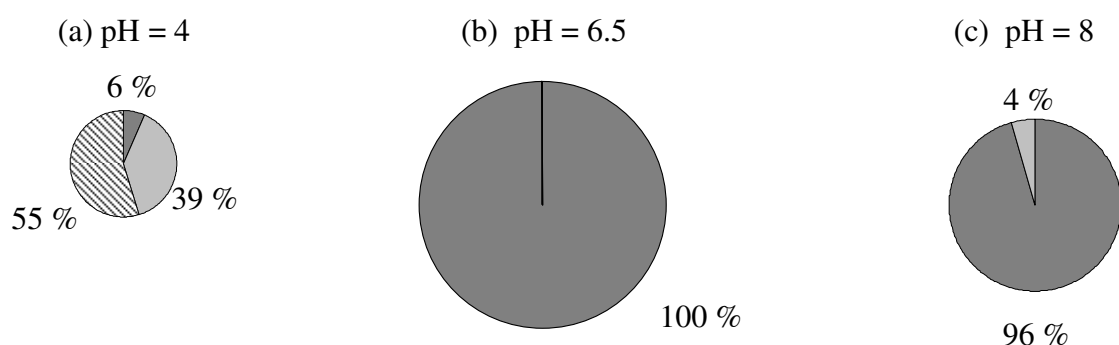


Figure 8. pH effect on the distribution of catabolic and anabolic carbon fluxes at 30 °C and OSL = 70 %, the size of the pie charts indicates total carbon flux contribution with:

Citrate (■) LDH pathway (■) PDH pathway (□) C4 pathway (▨) and lactose (□)

Effect of the temperature

The effect of temperature on carbon flux distribution for *Lactococcus lactis* PAL D DIA A in lactose/citrate co-fermentation at pH 6.5 and pH 8, considering aerobic and anaerobic conditions is shown in Figure 9. Under aerobic conditions, (Figure 9(A) and 9(B)), the temperature did not affect substrates consumption whereas the raise of the temperature conducted to the shift from a mixed acid behaviour to homolactic one as shown by the observations of the orientation of the carbon flux, done at pH 6.5 and 8:

At pH=6.5:

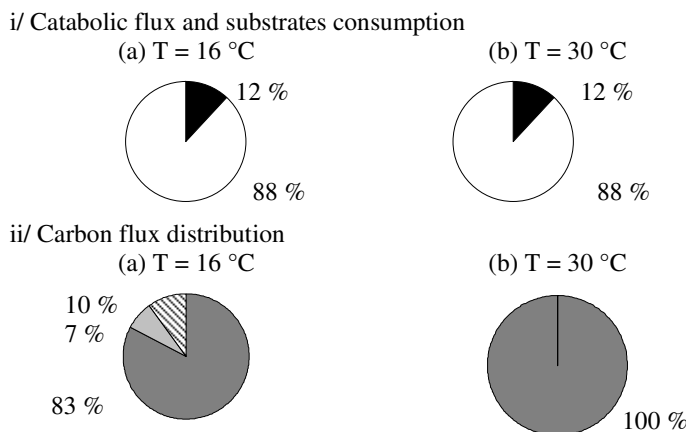
- i. the co-metabolism of citrate and lactose at 16 °C led to 83 % conversion of substrate into lactic acid vs. 100 % at 30 °C with global rates of lactate on lactose $Y_{La/Lo}$ respectively of 0.77 g/g and 0.96 g/g.
- ii. at 16 °C, 7 % of the carbon flux was directed through the PDH pathway for the production of acetate and acetaldehyde whereas at 30 °C no one of these molecules was detected via the PDH pathway.

- iii. at 16 °C, 10 % of the carbon flux was routed to C4 pathway for the production of 2,3-butanediol, acetoin and diacetyl while no one of these metabolites was detected at 30 °C. These results could be explained by the fact that low temperatures below the optimal growth one participate to the production and conservation of aromatic molecules like acetoin and diacetyl.

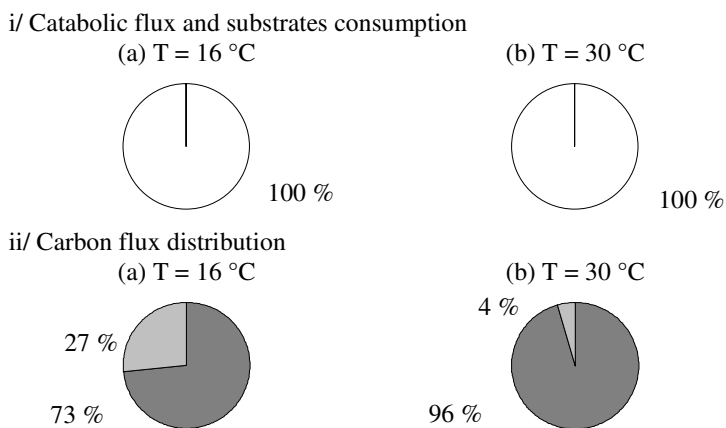
At pH 8:

- i. at 16 °C, 73% of the carbon flux was routed through the LDH pathway vs. 96 % at 30 °C with global rates of lactate on lactose $Y_{La/Lo}$ respectively of 0.5 g/g and 0.73 g/g.
- ii. 27 % of the carbon flux was directed via the PDH pathway for the production of acetate at 16 °C whereas only 4 % of the carbon flux was routed to the PDH pathway at 30 °C for the production of acetaldehyde, ethanol and acetate. This high production of acetate at 16 °C could be justified by the starvation of essential nutriment in the culture media after more than 20 h of culture.
- iii. no C4 metabolite was produced at both 16 °C and 30 °C via the C4 pathway.

(A) pH = 6.5 and OSL = 70 %



(B) pH = 8 and OSL = 70 %



(C) pH = 8 and OSL = 0 %

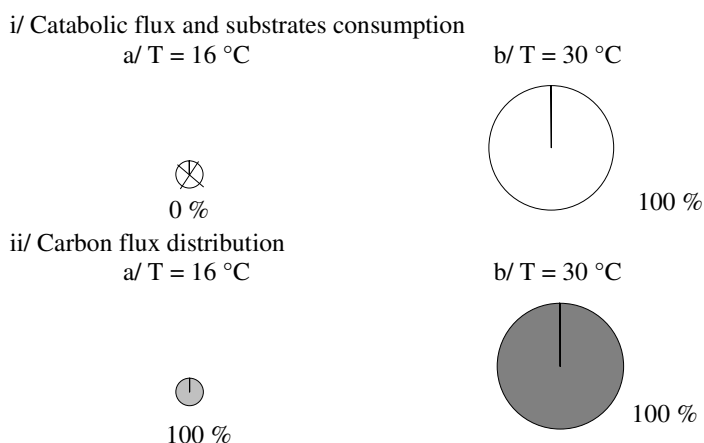


Figure 9. Temperature effect on the distribution of catabolic and anabolic carbon fluxes at (A) pH 6.5, (B) and (C) pH 8 with:

Citrate (■) LDH pathway (■) PDH pathway (□) C4 pathway (▨) and lactose (□)

And the size of the pie charts in figure C/ indicates the uptake absence or presence for lactose and the amount of carbon directed toward the PDH pathway.

Under anaerobic conditions, the temperature had a drastic effect on the substrate consumption. In fact at 16 °C lactose uptake was *quasi* absent while at 30 °C lactose was totally consumed. These results explain the observations concerning the carbon flux orientation:

- i. there was no carbon flux directed toward the LDH pathway at 16°C, while at 30 °C 100 % of the carbon flux went to the LDH pathway with a yield $Y_{P/S1} = 0.76\text{g/g}$.
- ii. at 16 °C around 100 % of the carbon was utilized via the PDH pathway for the synthesis of acetate, whereas at 30 °C no C2 compound was produced via the PDH pathway.
- iii. any C4 compound was synthesized at both 16 and 30 °C through the C4 pathway.

These observations show diverse metabolic behaviours at different temperatures under aerobic and anaerobic conditions. Actually the carbon flux was routed to the LDH pathway systematically at 30 °C with higher conversion yield than at 16 °C. This is in accordance with the results of Krishnan *et al.* [26], who showed that the maximum activity of LDH was obtained at 28 °C. In addition at 16 °C the carbon flux was oriented to the PDH pathway at both pH 6.5 and pH 8 and whereas at 30 °C PDH activity was detected only at pH 8 and at OSL = 70 % this could be explained by an optimal activity of the PDH between 20 and 30 °C with a decreasing activity until 40 °C [27, 28]. The absence of PDH activity at 30 °C at both pH 6.5 and OSL = 70 % and pH 8 and OSL = 0 % could be due to the interaction between the three operating factors investigated. The presence of C4 activity at pH 6.5 and OSL = 70 % is in line with the observations of Bassit *et al.*, [29] who observed maximal concentration of diacetyl at 18 °C and 100 % of oxygen concentration.

These observations show two principal features:

- i. the effect of the temperature on substrates consumption depend on the oxygen saturation level investigated. In fact, under aerobic conditions the temperature has no effect on the substrates consumption while under anaerobic conditions the decrease of the temperature leads to the absence of lactose consumption. Therefore it was interesting to study a novel zone of the experimental domain in order to avoid in the future, at industrial level such combination of operating factors.

- ii. the rise of temperature enhances the lactose uptake and intensifies the homolactic behaviour. This is in accordance with low temperatures used at industrial scale in order to produce organoleptic compounds.

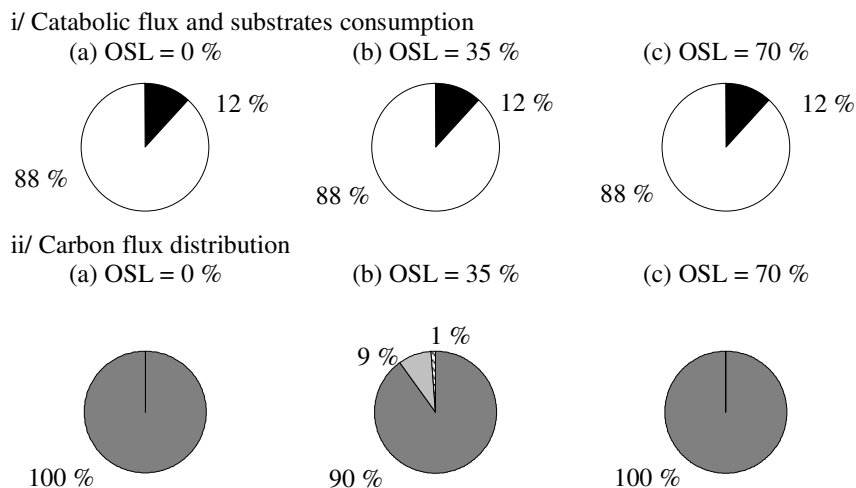
Effect of the oxygenation

Influence of oxygenation on substrates consumption and carbon flux distribution for *Lactococcus lactis* PAL D DIA A in lactose/citrate co-fermentation at 30 °C under anaerobic conditions and at different pH is shown in Figure 10. In the three cases investigated in Figure 10 (A), 10 (B), and 10 (C), OSL had no effect on substrates consumption despite the fact that it affected the kinetic behaviour.

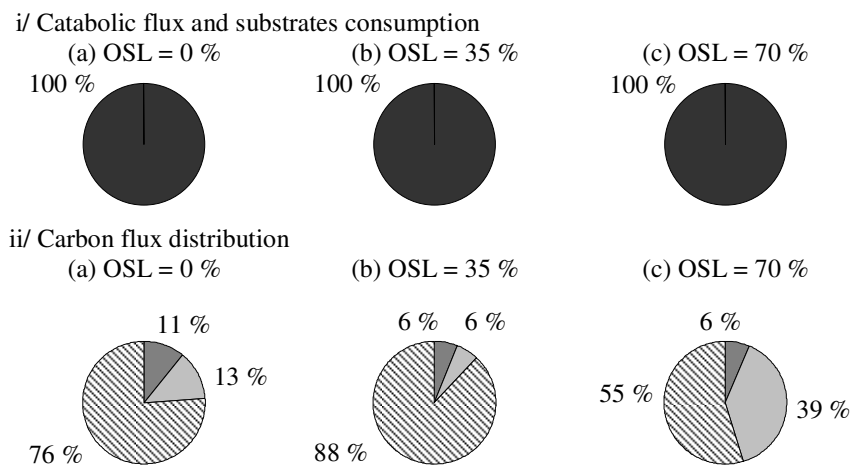
At pH 6.5 and T= 30 °C:

- i. as far as the LDH pathway is concerned, the same behaviour as the global catabolic flux is observed. Also, for anaerobic conditions and high OSL (70 %), 99 % of the carbon flux was routed toward the LDH pathway with $Y_{P/S1}$ respectively 0.76 and 0.96 g/g. While at intermediate OSL (35 %) only 90 % of the carbon flux was directed to the LDH pathway with an $Y_{P/S1}$ yield equivalent to the theoretical one of 1.05 g/g.
- ii. concerning the PDH pathway, under both anaerobic conditions and high level oxygenation, no carbon was oriented through this pathway, whereas under intermediate oxygen level around 9 % of the carbon flux was involved in the production of acetate, acetaldehyde and little amount of ethanol via the PDH pathway.
- iii. regarding the C4 pathway under both anaerobic conditions and high level oxygenation less than 0.05 % of the carbon flux was directed toward the production of acetoin and diacetyl, while under intermediate level of oxygenation 1 % of the flux was routed in the C4 pathway for the production of acetoin, diacetyl and 2,3-butanediol.

(A) pH = 6.5 and T = 30 °C



(B) pH = 4 and T = 30 °C



(C) pH = 8 and T = 30 °C

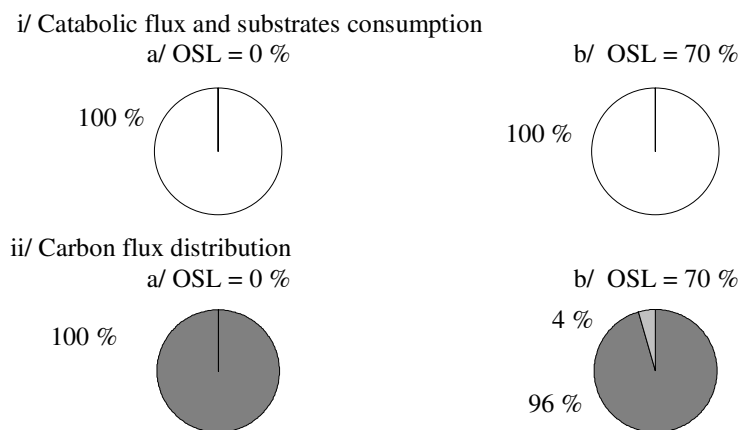


Figure 10. Influence of OSL on the distribution of catabolic and anabolic carbon fluxes at 30 °C and at different pH values: (A) 6.5, (B) 4 and (C) 8 with: Citrate (■) LDH pathway (■) PDH pathway (▨) C4 pathway (▩) and lactose (□)

At pH 4 and T = 30 °C:

- i. with reference to the LDH pathway, quasi no LDH activity was detected under all the aeration conditions due to the lactose uptake absence and consequently to a redox equilibrium.
- ii. concerning the PDH pathway, under anaerobic conditions and intermediate oxygen level around 1 % of the carbon flux was directed to the production of acetate, whereas under high level of oxygenation about 40 % of the carbon flux was routed toward the production of acetate and ethanol using the PDH pathway.
- iii. regarding the C4 pathway, in absence of oxygenation, 75 % of the carbon flux issued from citrate catabolism was utilized for the production of acetoin and diacetyl. Under intermediate level of oxygenation, about 85 % of the carbon flux was directed toward the synthesis of C4 compounds while at high oxygenation level less than 55 % of the carbon flux was directed for the production of acetoin and diacetyl.

At pH 8 and T= 30 °C:

- i. with reference to the LDH pathway, under anaerobic conditions, 100 % of the carbon flux was directed to the LDH pathway vs. 95 % at OSL = 70 % with respective $Y_{P/S1}$ yields of 0.76 and 0.73 g/g.
- ii. concerning the PDH pathway, under anaerobic conditions, no carbon flux was directed to this pathway whereas, under aerobic conditions, 4 % of the carbon flux was routed toward the production of acetaldehyde, ethanol and acetate.
- iii. regarding the C4 pathway, in absence or presence of oxygenation, no carbon flux was directed toward the synthesis of C4 compounds.

Relating to these observations, it is possible to conclude that in major cases, oxygenation of cultures leads to an altered redox state and superior NADH oxidase activity conducting pyruvate metabolism shift toward mixed fermentation [30, 31].

4. Conclusion

The aim of this work was to recover useful information on the combined influences of three operating factors (pH, temperature and Oxygen Saturation Level) on the performances of a flavor production process with a view to developing a dynamic production process. This was done by using an ED over an extended experimental domain compared with previous physiological studies based on the alteration of one factor at a time.

First of all, for each parameter taken separately, the data collected were in full accordance with the existing metabolic studies: (i) the pH controlled growth and substrate consumption rates and the organoleptic profile. In fact, pH 6.5 ensured total consumption of substrates and the maximal biomass concentration whereas pH 4 conducted to the production of organoleptic compounds such as diacetyl, (ii) the temperature oriented the metabolism toward an acid mixed fermentation at 16 °C and toward homolactic behaviour at 30 °C and (iii) the influence of oxygen on growth and metabolites production was in accordance with the literature with a combination of positive effects linked with coenzymes regeneration and negative effects due to oxygen toxicity.

Practically, this work too has confirmed that the best operating conditions identified for growth and diacetyl production are antagonistic. The optimal biomass growth was observed at pH= 6.5, T = 30° C and at OSL = 35 %, while the maximal diacetyl production was obtained at pH= 4, T = 30° C and at OSL = 70 %. As far as interactions are concerned, one striking phenomenon has been observed for temperature and OSL: a drastic effect of combination of anaerobic conditions and low temperature led to the absence of substrate uptake and growth. Growth was stimulated for an OSL = 70 % at both temperatures 16 and 30° C whereas for an OSL = 0 % at 16 °C no growth was observed.

Also, this work showed that:

- (i) the mathematical model used to predict the effect of the operating factors on the growth and growth kinetic was efficient (with regression coefficients of 0.99 between experimental data and predicted one) either for extreme operating conditions,
- (ii) the mathematical model permitted the prediction of pyruvate production which is the metabolite resulting of partial or total catabolism of both substrates function of the operating factors values applied,

- (iii) the mathematical model estimated the diacetyl production despite its low concentration in the culture media, Vs. other metabolite concentrations like lactate. Also, it took into account the metabolism orientation toward an acid mixed fermentation at 16 °C and toward homolactic behaviour at 30 °C.

Therefore, with this data it would be difficult to obtain a knowledge model that could predict the consumption of substrates, the carbon flux orientation through the different pathways involved and the production of intermediate metabolites of C4 pathway with a regression coefficient of 0.99. Consequently the quadratic model constitutes an efficient alternative to knowledge model in order to accurately predict primary and secondary metabolites production. Consequently, from a methodological point of view, the structure and the nature of the information recovered, integrating combined effects of the three operating parameters on the metabolism of the producing strain make it fully usable for the definition of a dynamic control system for this production process.

In addition, this work has successfully allowed the identification of both interesting and highly avoidable operating conditions for the control of the metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* PAL D DIA A (as shown in Table 8). As a consequence, in the short term, this combined multi-factorial and physiological approach appears efficient for the punctual definition of robust operating conditions in order to achieve the desired fermentation performance in terms of either growth or diacetyl production. However this work was performed only with batch mode experiments and, consequently the new phenomena observed now need to be studied in longer term processes with either fed-batch or continuous mode in order to better assess their origin and reversibility. This complimentary study is critical for the achievement of robust dynamic processes by avoiding for example substrates limitations or irreversible metabolic effects.

In the longer term, the next steps are the modelling of the behaviour of the strain and the use of the subsequent model to optimize the transition from a growth to a production phase. If successful on such a complex case, this combined effect study coupled with a dynamic control strategy could be applied either to the numerous existing biological processes in order to improve their performances, or to the development of whole new processes.

References

- [1] Law BA. The formation of aroma and flavour compounds in the fermented dairy products. Dairy Sci Abstr 1991; 43:43-154.
- [2] Goupry S, Croguennec T, Gentil E and Robins RJ. Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ration anlysis. FEMS Microbiol Lett 2000; 82:207-211.
- [3] Cogain-Bousquet M, Garrigues C, Loubière P and Lindley ND. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 70:253-26.
- [4] Cocaign-Bousquet M, Even S, Lindley ND and Loubière P. Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60: 24-32.
- [5] Hugenholtz J and Kleerebezem M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of the pathway rerouting involved in food fermentations. Curr Opin Biotechnol 1999; 10:492-497.
- [6] De Vos W M and Hugenholtz J. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. Trends Biotechnol 2004; 22:72-79.
- [7]Oliviera A P, Nielsen J and Förster J. Modelling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. BMC Microbiol 2005; 1-15.
- [8]Panagou E Z, Skandamis P N and Nychas G J E. Modelling the combined effect of temperature, pH and a_w on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. J Appl Microbiol 2003; 94:146-156.
- [9] Rondags E. Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche de la voie de synthèse du diacétyle et d'une mise en œuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 1997.
- [10] Collins EB. Influence of medium and temperature on end products and growth. J Dairy Sci 1977; 60:799-804.
- [11] Dellaglio F, De Roissart H, Torriani S, Curk M C et Janssens D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, ed Lorica,, Uriage, 1994, (1):26-48.
- [12] Holt jG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT and Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology, ed Williams et Wilkins, Baltimore, 1994.
- [13] Schmitt P, Couvreur C, Cavin JF, Prévost H and Diviès C. Citrate utilization by free and immobilized *Streptococcus lactis* subsp diacetylactis in continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 1988; 29:430-436.
- [14] Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol Rev 1987; 46: 269-280.
- [15] Stien G. Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar diacetylactis et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* en cultures pures et co-cultures : études cinétiques et suivi en ligne de l'influence de l'acide citrique et du pH sur le comportement métabolique PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 1993.
- [16] Muniglia L. Elaboration d'une stratégie expérimentale multicritère appliquée à la conception optimale d'un bioprocédé continu de production d'arômes laitiers. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 2001.
- [17] Adamberg K, Kask S, Laht TM and Paalme T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. Int J food Microbiol 2003; 85: 171-183.
- [18] Cachon R and Diviès C. Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar diacetylactis. Appl Microbiol Biotechnol 1994; 41:694-699.

- [19] Harvey R J and Collins EB. Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*. J Bacteriol 1962; 83:1005-1009.
- [20] Sakamoto M and Komagata K. Aerobic Growth of and Activities of NADH Oxidase and NADH Peroxidase in Lactic Acid Bacteria. J Ferment Bioeng 1996; 82:210-216.
- [21] Anders RS, Hogg DM and Jago GR. Formation of H₂O₂ by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. Appl Microbiol 1970; 19: 608-612.
- [22] Duwat P, Ehrlich SD, and Gruss A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: Characterization and involvement in oxidative and thermal stress. Mol Microbiol 1995; 17:1121-1131.
- [23] Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, Le Loir Y, Violet F, Loubière and Gruss A. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. J Bacteriol 2001; 183:4509-4516.
- [24] Garrigues C, Loubière P, Lindley ND and Coccagn Bousquet M. Control of the shift from homolactic to mixed acid fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. J Bacteriol 1997; 179:5282-5287.
- [25] Desmazeaud MJ Le lait, milieu de culture Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, ed Lorica, Uriage, 1994, (2):25-36.
- [26] Krishnan S, Gowda LR and karanth NG. Studies on lactate dehydrogenase of *Lactobacillus plantarum* spp Involved in lactic acid biosynthesis using permeabilized cells Process. Biochem 2000; 35:1191-1198.
- [27] Hodgson JA, Lowe PN and Perham RN. Wild-type and mutant forms of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Bacillus subtilis*. Biochem J 1983; 211:463-472.
- [28] Packman LC, Stanley CJ and Perham RN. Temperature-dependence of intramolecular coupling of active sites in pyruvate dehydrogenase multienzyme complexes. Biochem J 1983; 213:331-338.
- [29] Bassit N, Iatrilie E, Boquien CY, Picque D and Corrieu G. Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar diacetylactis. Lait 1994; 74: 115-126.
- [30] Smart JB and Thomas TD. Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic streptococci Appl Environ Microbiol 1987; 53:533-541.
- [31] Lopez de Felipe F, Kleerbezem M, De Vos WM and Hugenholtz J .Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. J Bacteriol 1998; 180:3804-3808.

III.3. Développement d'un modèle cinétique de la consommation de substrats, de la croissance et de la production d'acide lactique

Au cours de cette partie, nous développerons les étapes nécessaires à la construction du modèle cinétique de consommation de substrats, de croissance-décès et de production d'un métabolite, en l'occurrence l'acide lactique, en fonction des conditions opératoires (pH, température et oxygénation) du milieu.

Afin de définir les effets des conditions opératoires sur la cinétique des bactéries lactiques, la collecte de données expérimentales est une étape nécessaire. Dans cette étude, trois types d'expériences ont été réalisés pour déterminer les facteurs les plus influents au niveau de la croissance et de la production de métabolites :

- une série d'expériences en mode discontinu, a été réalisée en modifiant la composition du milieu de culture initiale (milieu Y) en terme de concentration des substrats carbonés, afin de mettre en évidence le rôle des constituants, du milieu synthétique utilisé, sur la consommation de substrats carbonés et sur la croissance,
- une série d'expériences conduites en mode discontinu, en fonction de combinaisons des facteurs opératoires (pH, T et TOD),
- une série de fermentations a été réalisée en mode discontinu alimenté avec différentes stratégies d'alimentation en substrats (nature et qualité de l'alimentation : pulse ou flux continu) afin de déceler les effets des perturbations engendrées sur le comportement physiologique de la bactérie en mode dynamique.

A la suite de ces fermentations, nous avons caractérisé les principaux phénomènes métaboliques et la totalité des paramètres métaboliques ont été modélisés par des équations mathématiques simples tenant en compte de l'effet combiné des trois paramètres opératoires. Ensuite, ces modèles primaires ont été incorporés dans un modèle secondaire représentant la consommation des substrats carbonés, la croissance et la production de lactate, aussi bien en mode discontinu qu'en mode discontinu alimenté.

Projet de publication

Batch and fed-batch culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. diacetylactis: experimental data and model development

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are used worldwide as starter cultures for industrial manufacture of several food products. Their major application is the dairy industry notably for butter production. In 2005, world production of butter reached 6.9 millions metric tons.

Fermentation of citrate and lactose using LAB is however a complex process. This complexity could be the consequence of: (i) metabolic behaviour variability of the biocatalysts with respect to the operating conditions: substrate concentrations, temperature (T), pH, oxygen saturation level (OSL); (ii) the presence of two antagonist major phases in the bioprocess: biomass growth and target metabolite production (diacetyl). Moreover, the operating conditions which are kept constant during the bioprocess, thus do not take into account the antagonism between growth and aroma production. Determining time-varying operating conditions leading to the best trade-off between, at least, the two antagonist criteria is a good challenge to improve LAB fermentation performances.

LAB fermentation is thus an ideal problem for the development and application of an innovative multicriteria and dynamic optimization approach. However, such technique requires a model which accurately describes the dynamic behaviour of the fermentation process. Consequently, the first step of such optimization approach is thus to build a model, simple enough, to predict the biomass and substrates concentration profiles, considering three operating parameters: temperature T, pH and OSL.

Our approach is applied to the substrates uptake, growth and lactate production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis [1, 2] which undergoes a metabolic shift from homolactic to mixed acid fermentation under specific conditions [3, 4]. In this first study, we have not considered diacetyl production modelling, because it is time consuming.

Many mathematical models have been reported to describe the kinetics of cell growth and lactic acid production in lactic acid fermentation [5-8] and numerous genetic tools are available [9] for *Lactococcus lactis*. However poor is the available information to describe the biokinetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis notably the response to various environmental conditions [10-13].

The overall objective of the study is to model the response of our strain to temperature, pH and OSL changes. Therefore the initial phase of investigation was to carry out some experiments to collect experimental information. The influence of the three parameters has been studied in batch and fed-batch cultures using an extended experimental domain to explore the widest operating conditions without excluding *a priori* (T, pH, OSL) combinations. According to previous studies the temperature range was set to [16-30] °C as *Lactococcus lactis* is a mesophilic bacterium [14-16] and the production of diacetyl is enhanced around 20 °C [16]. Since the apparent growth is maximal around the neutrality and diacetyl production is maximal at pH 4 [11, 12, 16] the pH range was set to [4-8]. OSL range was set to [0, 70] %, as a result of the microaerophilic behaviour of *Lactococcus lactis* [17-19]. The upper limit of OSL was set to a value below 100 % to avoid foam in the culture media. The second phase involved detailed kinetic observations to determine: (i) the effect of factor combinations on substrate consumption, growth and lactate production and (ii) the development of a model to predict the kinetic behaviour of this *Lactococcus lactis* strain. This model will be used in the future in order to control the bioprocess.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial strain and culture media

The bacterium used throughout this work was *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. diacetylactis PAL D DIA A, purchased from Standa Industry (France). It was grown on a semi synthetic Y medium described by Stien [20], with lactose and citrate as carbon sources.

2.2. Fermentation conditions

The preculture was prepared by cultivating the bacteria in 200 mL of medium at 30 °C for 15 h. The bioreactor already containing 1.4 L of medium was then inoculated with the preculture. The cultivation system consisted of an Applikon 3 L bioreactor controlled by ADI 1030 biocontroller and cultivation supervisor software "BioXpert" (Applikon, The Netherlands). The system was equipped with pH, OSL and temperature sensors. The OSL in

the bioreactor were obtained by sparging air and/or nitrogen in the culture medium and modifying stirring speed. The pH of the culture was kept at the desired value by feeding the culture vessel with a solution of either NaOH (0.2 N) or HCl (0.2 N). Temperature is maintained by a thermo-circulator bath ADI 1018 (Applikon, The Netherlands).

2.3. Analytical methods

The concentrations of organic acids (citrate and lactate) were analyzed by HPLC (Waters, USA) with isocratic elution using 0.04 M H₂SO₄ solution, flow rate 0.9 mL min⁻¹ on Polypore H (PPH – 257) column (Brownlee Lab., USA) at room temperature using UV (210 nm) and refractive index detectors [21,22]. The concentration of lactose in fermentation media was analyzed by HPLC (Waters, USA) with isocratic elution using deionized water, flow rate 0.9 mL min⁻¹ on Alltech 700 CH carbohydrate column (Alltech, USA) at 85 °C. The biomass concentration was determined by optical density (OD) measurement at 650 nm and the strain specific biomass conversion factor γ ($\gamma = \text{dwt}/\text{OD}_{650}$, where dwt is biomass dry weight obtained by filtering the biomass from 40 mL culture, washing and drying at 105 °C overnight).

3. Results and discussion

In order to describe the effect of operating conditions on the kinetic of the lactic bacteria, experimental data are necessary. In our study, three types of experiments were carried out to identify the most important factors involved in the growth and metabolite production.

(i) A series of batch fermentations were carried out with different compositions of the culture medium in order to determine the role of the carbon sources on substrates uptake and growth.

(ii) A series of batch fermentations under a combination of pH, Temperature and OSL were performed. The factor combination used was provided according to an experimental design.

(iii) fed-batch fermentation under constant operating conditions and varying operating conditions were run with different feeding strategies (pulse feeding or continuous substrates feeding).

3.1. Preliminary kinetic analysis

In order to analyze and model the kinetics of substrates consumption and their effect on growth, four experiments were carried out at pH 6.5, 30 °C and an OSL = 0 % on the semi synthetic medium Y and on three derived media Y1, Y2 and Y3. For the derived media initial citrate and lactose concentrations were changed with the purpose to determine the rate of participation of each one of the carbon sources on biomass growth. A reference culture medium Y' (without lactose and citrate) is used as a reference. The modifications applied to the basic medium are described below:

- Y medium described by Stien [20, 21] where citrate and lactose concentrations are respectively 1.5 g/L and 10 g/L;
- Y1 medium with lactose (10.0 g/L) as the unique carbon source;
- Y2 medium with citrate (1.5 g/L) as the unique carbon source;
- Y3 medium enriched with citrate (11.5 g/L) and with a minimal lactose concentration (1.0 g/L).

The substrates uptake and growth kinetics of *Lactococcus lactis* strain PAL D DIA A, were compared using the different culture media. These results (Figure 1 and Table 1) show that the citrate consumption is activated in presence of lactose and that the growth of this strain is affected by the culture medium components. No growth was observed on the reference culture medium Y' (data not shown), in spite of the presence of complex nutrients. Similar biomass production corresponding to 1.5 g/L bacterial concentration is obtained in presence or absence of citrate (Y1 media) under the same operating conditions. However this concentration is reached earlier when citrate is present in the medium. The maximal biomass concentration was reached in 5 h on Y medium while it was reached after 7 h on Y1 medium.

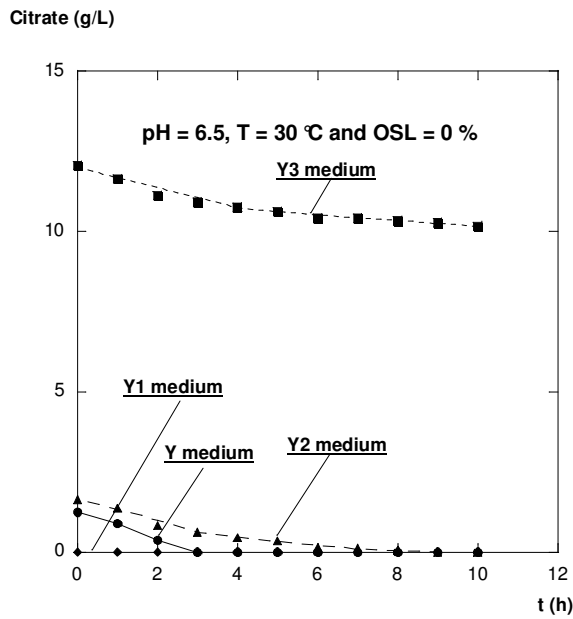
Table 1. Influence of carbon substrates concentration on biomass production and substrates consumption of *Lactococcus lactis* PAL D DIA A at pH 6.5, 30 °C and under anaerobic conditions (with: $Y_{X/S1}$ the yield of biomass on lactose (g/g), in presence of citrate (+Cit) or in absence of citrate (-Cit), $Y_{X/S2}$ the yield of biomass on citrate in absence of lactose (-Lo)).

Culture media	Y	Y1	Y2	Y3
Apparent biomass production (g/L)	1.5	1.5	0.0	0.3
Apparent citric acid uptake (g/L)	1.2	0.0	1.0	1.2
Apparent lactose uptake (g/L)	9.5	9.5	-	1.0
μ max (h ⁻¹)	0.75 (± 0.02)	0.60 (± 0.02)	-	0.60 (± 0.02)
$Y_{X/S1}$ (+Cit) (g/g)	0.34	-	-	0.32
$Y_{X/S1}$ (-Cit) (g/g)	0.21	0.16	-	-
$Y_{X/S2}$ (-Lo) (g/g)	-	-	-	0.03

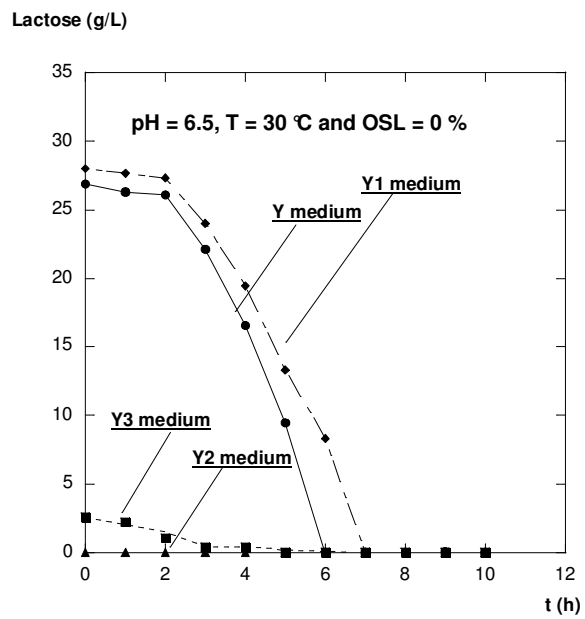
Conversely to the observations done by Stien [23] for the SD933 strain and in accordance with the work of Collins and Bruhn [24], in presence of citrate, the specific maximal growth rate was affected and evolved from 0.6 (without citrate) to 0.75 h⁻¹. Therefore citrate could have a stimulating effect on growth rate. These results are in accordance with Cogan studies [25, 26] and Goupry work [27]. They showed that in presence of glucose or lactose, citric acid stimulates the growth rate and constitutes a carbon source used for the formation of essential cellular constituents that are produced slower in its absence from culture medium components. Moreover it was shown that when the initial concentration of citrate was increased, the specific growth rate of different strains of *Lactococcus lactis* raised until 3.8 times in comparison with the cultures carried out in citrate absence [28] Nevertheless other authors affirmed that the citrate participates to the increase of the quantity of biomass produced [29, 23].

Therefore, from the previous observations, the growth can be considered as the consequence, rather than the cause, of the substrates consumption. Under such natural assumption, the lactose and citrate uptake are thus first modelled and then the growth kinetic parameters resulting from the substrate consumption are identified.

(i) Citrate uptake



(ii) Lactose uptake kinetic



(iii) growth kinetic

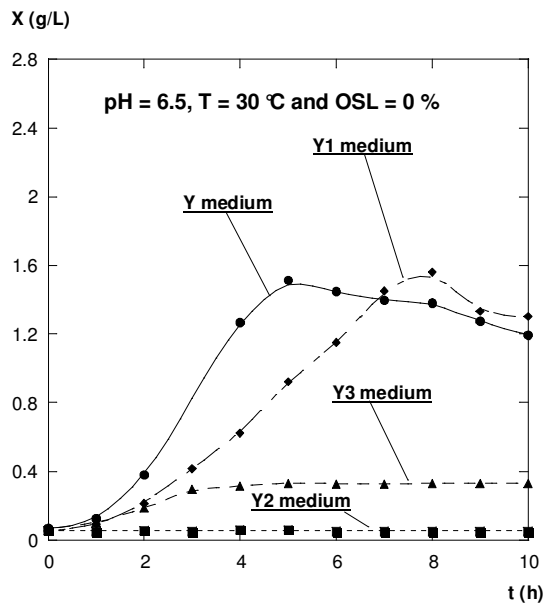


Figure 1. Citrate (i) and lactose (ii) consumption kinetics and (iii) growth kinetic on Y, Y1, Y2 and Y3 media, at pH 6.5, 30 °C and under anaerobic conditions.

3.2. Substrates uptake, growth and lactate production modelling

Two types of bacterial modelling are available: (i) primary modelling, Which describes the kinetic of the growth, consumption and production and (ii) secondary modelling that aims to elucidate the dependence of biokinetic parameters on environmental conditions [30]. In our case this secondary modelling helps to explain the production of functional metabolites by lactic acid bacteria. The first type is performed using basic differential

equations [13, 30] and the second type is carried out using polynomial models, e.g. quadratic expression of the maximum specific growth rate μ_{\max} , or models based on combinations of the gamma concept [31] and cardinal model [32].

In our work an original two-stage method was applied to obtain a model considering the influence of operating conditions on the essential carbon substrate consumption, growth and metabolite production.

Both primary and secondary models have been identified using a set of 12 experiments where the operating conditions, namely pH, temperature and OSL, have been chosen according to an experimental design. The experimental results are expressed as Biomass, Lactose, Citrate, Lactate concentration profiles measured during batch fermentations.

3.2.1. Secondary modelling

The estimated maximum specific lactose uptake $q_{\max S1}$ for each combination of pH, T and OSL are presented in Table 2. They were estimated according to the maximal experimental slopes of lactose concentration, related to mean biomass concentration, for each experimental operation conditions. With respect to the effect of pH, no lactose consumption was observed at pH 4 leading to a $q_{\max S1} = 0 \text{ h}^{-1}$. This result is in accordance with previous studies [16]. In addition, the use of an extended experimental domain highlighted some key factor combinations that led to unexpected results. Indeed at pH 8, 16 °C and OSL = 0 %, no lactose consumption was observed, leading to a $q_{\max S1} = 0 \text{ h}^{-1}$, whereas when the temperature rises upto 30 °C, or when the OSL rises upto 70 %, the maximal specific lactose uptake $q_{\max S1}$ becomes clearly positive.

Table 2. Maximum specific substrates uptake respectively for lactose ($q_{\max S1}$) and citrate ($q_{\max S2}$), biomass yield based on lactose uptake ($Y_{X/S1}$), death rate constants ($Kd1$) and ($Kd2$) and lactate yield based on lactose uptake ($Y_{P/S1}$), at various pH values, temperature and oxygen saturation levels.

pH	T (°C)	OSL (%)	$q_{\max S1}$ (g/g/h)	$q_{\max S2}$ (g/g/h)	$Y_{X/S1}$ (g/g)	Kd1 (g/g)	Kd2 (g/g)	$Y_{P/S1}$ (g/g)
4	30	70	0.00	2.44	0.000	0.000	0.000	-
4	30	0	0.00	1.75	0.000	0.000	0.000	-
4	30	35	0.00	2.30	0.000	0.000	0.000	-
6.5	30	35	3.34	3.60	0.175	0.000	0.016	1.06
6.5	30	70	3.64	3.90	0.180	0.106	0.035	0.96
6.5	16	70	1.98	1.10	0.193	0.006	0.048	0.77
6.5	30	0	1.58	2.70	0.215	0.000	0.073	0.90
6.5	30	0	2.50*	0.00	0.190	0.000	0.087	0.80
8	16	0	0.00	0.16	0	0.000	0.000	0.00
8	16	70	1.74	0.02	0.097	0.035	0.000	0.50
8	30	70	4.20	0.10	0.098	0.019	0.022	0.73
8	30	0	3.00	0.10	0.099	0.031	0.360	0.72

* Experiment carried out without citrate and – Not calculated value.

The response of *Lactococcus lactis* to the investigated environmental variables was quantified with different polynomials models [33]. Therefore, the average maximal specific lactose consumption rate ($q_{\max S1}$) was thus fitted as a complete secondary model to describe the combined effects of pH, T and OSL on lactose consumption (equation 1).

$$Z = a_0 + a_1 pH + a_2 T + a_3 OSL + a_4 pH.T + a_5 pH.OSL + a_6 T.OSL + a_7 pH^2 + a_8 T^2 + a_9 OSL^2 \quad (1)$$

Where Z is the modeled criteria and $a_0 \dots a_9$, are the model coefficients calculated by linear multivariable regression using Matlab 5.3 software.

However, the number of coefficients in such a full polynomial model requires a large number of experimental data for the regression (at least 10 for 3 factors). The use of simpler models is interesting to comply with the number of available experimental data. That is why $q_{\max S1}$ was first modeled, vs. pH, T and OSL with a reduced quadratic model as expressed in equation (2). A second model which is a modified (linear) version of the Arrhenius model as proposed by Davey (equation 3) [34, 35] was also determined. The $q_{\max S1}$, was null at pH 4 because of the inhibition of the enzyme responsible of lactose transport and catabolism [18]. Therefore experiments at pH 4 were not integrated in $q_{\max S1}$ model.

$$q_{\max S1} = -0.376 pH - 0.042 T + 0.051 OSL + 0.030 T.pH - 0.0004 OSL^2 \quad (2)$$

$$q_{\max S1} = 0.8 pH + 0.024 OSL - \frac{1426}{T^2} \quad (3)$$

In this study both the derivative Davey model and the reduced quadratic model gave satisfactory fitting to the current data even for extreme operating conditions investigated. Both exhibited good performances in term of R^2 respectively 0.98 and 0.99. The derivative Davey model showed a similar overall performance with lower number of parameters than the polynomial model (Figure 2). The indices used for statistical comparison of models were the root mean square error (RMSE) and the regression coefficients [33].

The same procedure was applied for the maximum specific citrate uptake and the estimated values of $q_{\max S2}$ are presented in Table 2. These results show that $q_{\max S2}$ values also depend on the three operating factors. Another derivative Davey model was consequently used to fit the maximum specific citrate uptake (equation 4).

$$q_{\max S2} = 13.54 \text{ pH} + 0.01 \text{ OSL} - 0.14 \text{ pH} \cdot T - \frac{527.98}{T} - 0.90 \text{ pH}^2 \quad (4)$$

This model gave satisfactory fitting to the current data even for extreme operating conditions investigated and exhibited good performance in term of $R^2 = 0.98$ (Figure 2B).

(A) Maximum specific lactose uptake ($q_{\max S1}$)

(B) Maximum specific citrate uptake ($q_{\max S2}$)

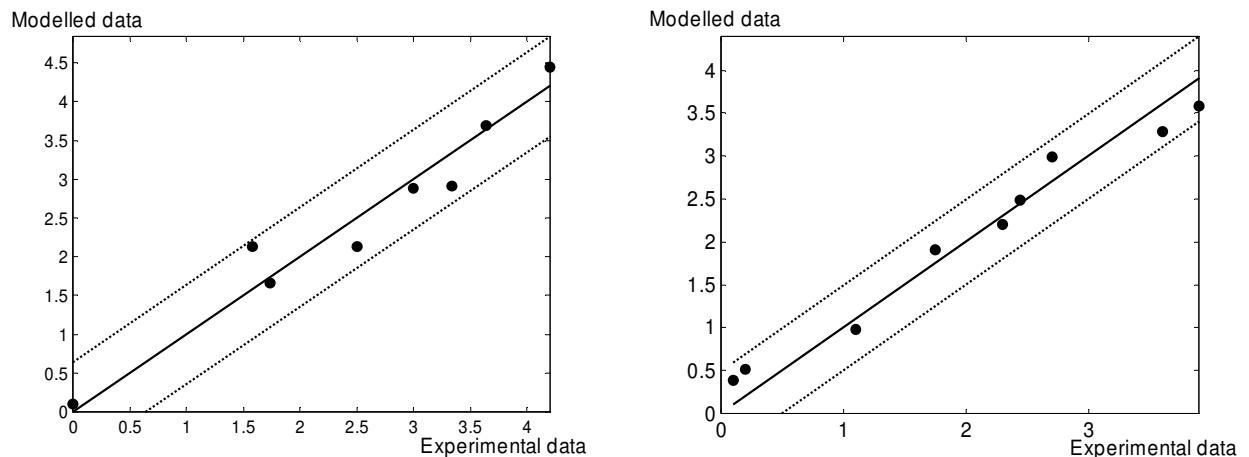


Figure 2. Correlation curves between modelled data and experimental data for maximum specific lactose uptake (A) and maximum specific citrate uptake (B) using derivative Davey models, where the scattered lines represent the confidence interval with $p > 0.95$.

Afterwards the same approach was applied for growth kinetic parameter, namely for lactose/biomass yield $Y_{X/S1}$ and for death rate constant. From the experiments carried out at pH 8 the death rate constant seems to depend on the lactose concentration in the culture medium. That is the reason why two death rate constants were defined : $Kd1$ when lactose concentration in the culture medium is greater than 2 g/L and $Kd2$ when the lactose concentration in the culture medium is less than this threshold concentration. The estimated values of $Y_{X/S1}$, $Kd1$ and $Kd2$ are presented in Table 2. Both, biomass yield based on lactose and death rate constants depend on operating conditions are fitted using reduced quadratic polynomial models as presented in the equations 5-7.

$$Y_{X/S1} = -0.093 pH + 0.003 OSL + 0.002 pH.T - 0.0001 T.OSL + \frac{17.666}{T} - \frac{151.580}{T^2} \quad (5)$$

$$Kd1 = -1.245 + 0.149 pH + 0.035 T + 0.009 OSL - 0.0042 pH.T - 0.0009 pH.OSL - 0.00003 T.OSL \quad (6)$$

$$Kd2 = -0.904 + 0.141 pH + 0.001 T + 0.013 OSL + 0.0001 pH.T - 0.002 pH.OSL \quad (7)$$

Equivalent work was used to fit the lactate biomass yield based on lactose consumption $Y_{P/S1}$. The estimated values of $Y_{P/S1}$ (Table 2) were fitted using:

$$Y_{P/S1} = 0.502 - 0.105 pH + 0.015 OSL - 0.0005 T.OSL + 0.001 T^2 \quad (8)$$

The resulting secondary models where inserted in a primary model. Parameters were then identified. However, due to the strong correlation between all differential equations of the model, some parameters are difficult to identify. Equations are decoupled by substituting some of the state variables of the model by an interpolation of the corresponding experimental data. After such partial identifications, the full parameter set is identified using parameter values relaxed around their first estimate.

For the second step, the substrates uptake was fitted with primary models by integrating the lactose and citrate mass balances during the fermentation process and by comparing to experimental lactose and citrate concentration profiles.

$$\frac{dS}{dt} = -q_s(T, pH, OSL, S1, S2) \quad (9)$$

Where, q_s is the substrate (lactose or citrate – g/L/h) uptake rate, described by a suitable model which accounts for the influence of operating conditions (T, pH, OSL), lactose (S1) and/or citrate (S2) concentrations;

- (ii) the biomass production was fitted with a primary model depending on biomass yield based on lactose, on substrate uptake rates and on death rate;
- (iii) the lactate production was also fitted with a primary model as proportional to lactose uptake.

Indeed, the maximum predicted specific lactose uptake rate and citrate uptake rate obtained from the derivative Davey models was used respectively to integrate the lactose and the citrate mass balances in the primary modelling of lactose and citrate uptake along with interpolated experimental biomass. Interpolated biomass, citrate or lactose concentrations values are used to avoid simultaneous identification of growth, lactose and citrate uptake parameters which are strongly linked in the differential equations of the mass balances. When substrates uptake was modeled, the biomass yield based on lactose and growth rate constants (equations 5-7) were used to integrate the biomass mass balance in order to identify growth. Finally lactate biomass yield based on lactose was integrated in lactate mass balance in order to identify lactate production.

3.2.2 Primary modelling

A series of batch fermentations was performed using media with initial lactose concentration of 10 g/L and initial citrate concentration of 1.5 g/L and two blank experiments were carried out on lactose or citrate alone with the same concentration, under different pH, T and OSL conditions. At pH 4, citrate is fully consumed whereas no lactose uptake is observed leading to a close 0 g/L apparent biomass concentration. At pH 6.5 and in presence of the co-metabolism citrate/lactose, it was found that kinetics of citrate uptake depends on lactose consumption. Indeed at pH 6.5 and 30 °C lactose consumption activated citrate consumption leading to increased specific citrate consumption rate. At higher pH (pH = 8), it was found that only lactose was completely used but not in particular conditions of T (16 °C) and OSL (0 %).

The specific consumption rate for lactose was defined by:

$$q_{S1} = q_{\max S1} \frac{S1}{K_{S1} + S1} \quad (10)$$

As we assumed from the kinetic study that the presence of lactose in the culture and its uptake activates the citrate uptake, the specific consumption rate for citrate was defined according to:

$$q_{S2} = q_{\max S2} \left(\frac{S2}{K_{S2} + S2} \right) \left(\frac{S1}{K_{S12} + S1} \right) \quad (11)$$

Using the defined specific consumption rates, the kinetic model of lactose and citrate uptakes, are expressed as follows:

$$\frac{dS1}{dt} = -q_{S1} X \quad (12)$$

$$\frac{dS2}{dt} = -q_{S2} X \quad (13)$$

The growth of *Lactococcus* is considered as the result of lactose and citrate uptake and death depends on lactose concentration in the culture medium, then the biomass kinetic model can be described by equations 14.

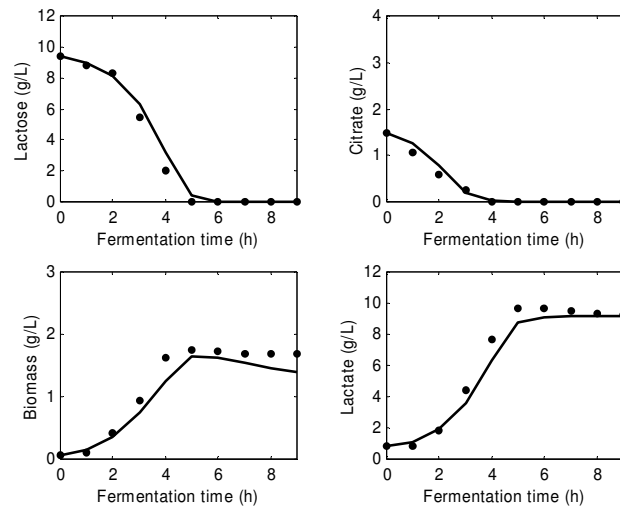
$$\left[\begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = -Y_{X/S1}(q_{S1} + q_{S2}) X - Kd1 X \quad \text{if } S1 > 2g/L \\ \frac{dX}{dt} = -Y_{X/S1}(q_{S1} + q_{S2}) X - Kd2 X \quad \text{if } S1 \leq 2g/L \end{array} \right. \quad (14)$$

The lactate production is directly related to the lactose uptake by the conversion yield $Y_{P/S1}$.

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S1} q_{S1} X \quad (15)$$

As an example of the simulation performance of the full model, Figures 3 and 4 show the accordance between experimental and modeled data for lactose and citrate uptake, growth and lactate production. The results correspond to a very large domain of bacterial physiological behavior depending on the effect of temperature, pH and oxygenation. It can be seen that the model fits the experimental data satisfactory in all conditions.

A/ pH 6.5, T = 30 °C and OSL = 35 %



B/ pH 6.5, T = 30 °C and OSL = 70 %

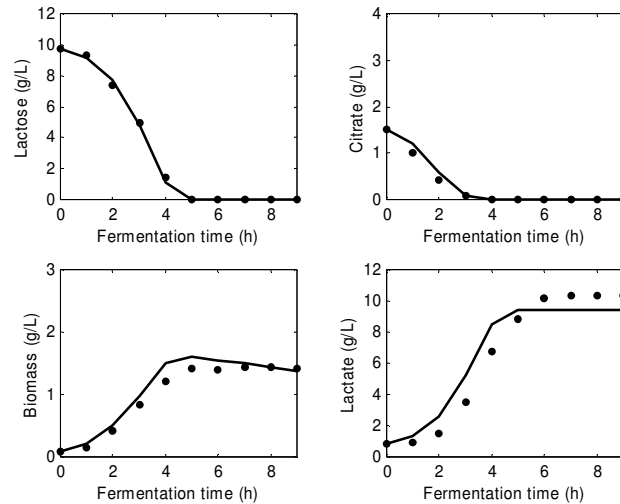
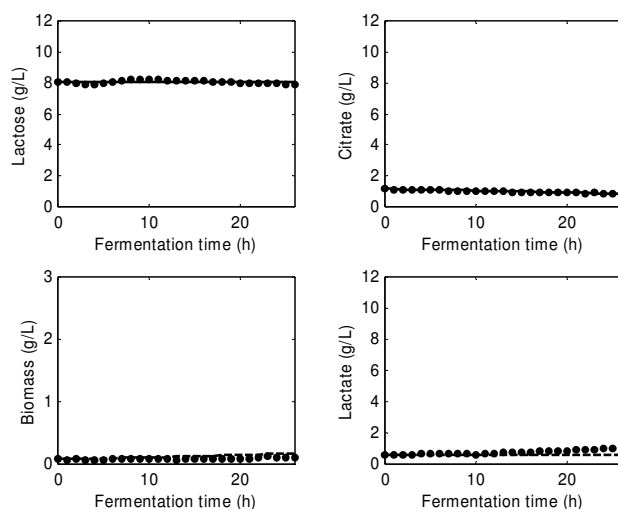


Figure 3. Experimental data (*points*) and model simulation (*lines*) of lactose and citrate uptake growth and lactate production at pH 6.5, at T = 30 °C and A/ OSL = 35 % and B/ OSL = 70 %.

The data obtained from the *Lactococcus lactis* batch cultures with varying operating conditions were used in the determination of the parameter values in the equations previously described. In particular, the lactose limitation constant $Ks1$ was first determined when either citrate was fully consumed or in citrate free medium. For citrate limitation constant $Ks2$, it was shown that it remains constant even when the pH is modified from 6.5 to 4.5 [11]. Therefore, $Ks2$ was first identified for experiments carried out at pH 4 where the lactose is not consumed, whereas $Ks12$ was identified using all experiments. The constant values are: $Ks1 = 1.85$ g/L, $Ks2 = 1.50$ g/L and $Ks12 = 1.95$ g/L.

A/ pH 8, T = 16 °C and OSL = 0 %



B/ pH 8, T = 16 °C and OSL = 70 %

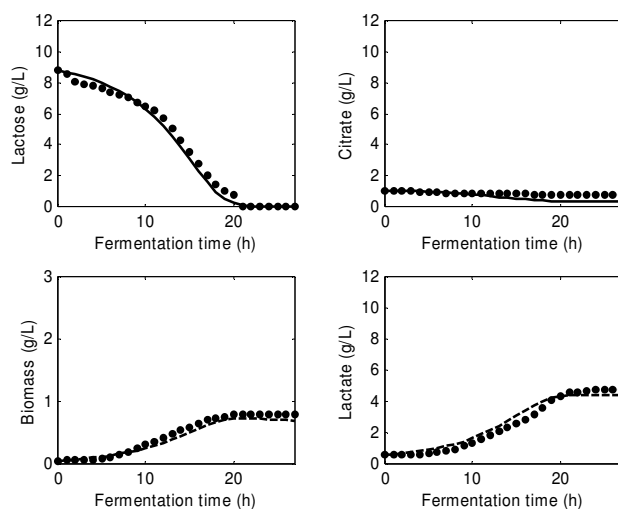


Figure 4. Experimental data (*points*) and model simulation (*lines*) of lactose and citrate uptake growth and lactate production at pH 8, at T = 16 °C and A/ OSL = 0 % and B/ OSL = 0 %.

Furthermore, the model simulation was extended to predict the kinetics of *Lactococcus lactis* in fed-batch culture at constant and varying operating conditions (pH, T, OSL, substrates feed).

3.3. Fed-batch fermentation modelling

A series of fed-batch fermentations was performed using media with initial lactose concentration of 10 g/L and citrate concentration of 1.5 g/L in 3 L and 20 L bioreactors.

The first step of studying these fed-batch lactic cultures was done at optimal

growth and constant operating conditions of pH, T and OSL, respectively 6.5, 30 °C and 35 %. Only a particular supply of 100 mL of lactose and citrate concentrated solution at respectively 280 g/L and 50 g/L after 10 h of culture was added. The kinetic results of this process are shown in Figure 5. It is evident that the first phase before the feeding has the same kinetic behaviour as the batch fermentation carried out in the same operating conditions. But when the substrate supply appears, the same kinetic model seems to overestimate the consumption rates. It was assumed that the feeding policy generates a stress for the bacteria which seems to delay the kinetic

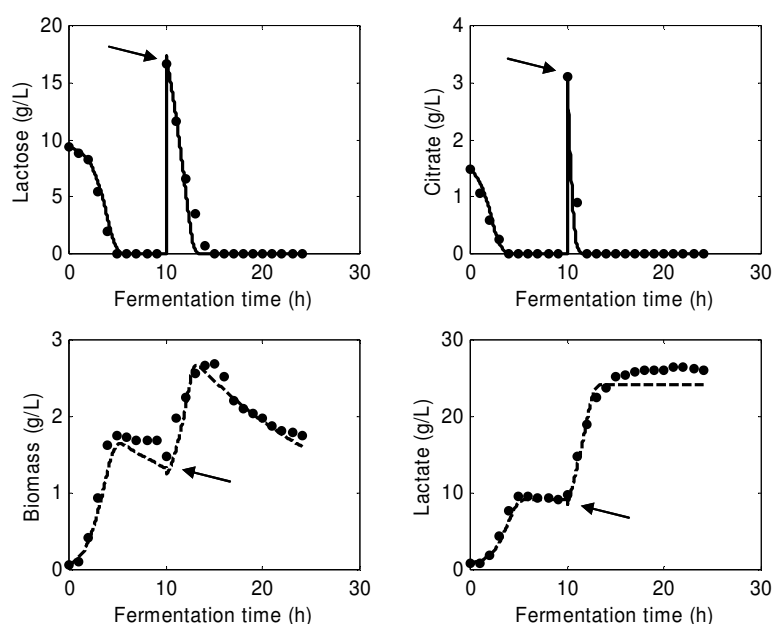


Figure 5. Experimental data (*points*) and model simulation (*lines*) of lactose and citrate uptake growth and lactate production in fed-batch culture of *L. lactis*, in 3 L bioreactor, at pH 6.5, at T = 30 °C and OSL = 35 %. The arrows indicate the instant of feeding with 100 mL of lactose and citrate concentrated solutions of respectively 280 g/L and 50 g/L.

A first order model was used to describe the disturbance of the biomass yield. According observations, the disturbance do not completely stop the growth at feeding time but drastically reduces the growth yield. The amplitude of the disturbance was therefore limited to 95% of the initial value. The time constant τ of this first order disturbance set to 2 h. This modification of the secondary model taking into account this delay was introduced in the equation of biomass yield based on lactose uptake $Y_{X/S1}$ (g/g) used for batch culture (equation 5). The resulting expression obtained is:

$$\text{if } t > t_{Fed} \quad Y_{X/SI} = Y_{X/SI} \left(1 - 0.95 e^{\left(\frac{t-t_{Fed}}{\tau} \right)} \right) \quad (16)$$

With, t = fermentation time (h), t_{Fed} = substrate supply instant (10 h), τ = delay constant (2 h).

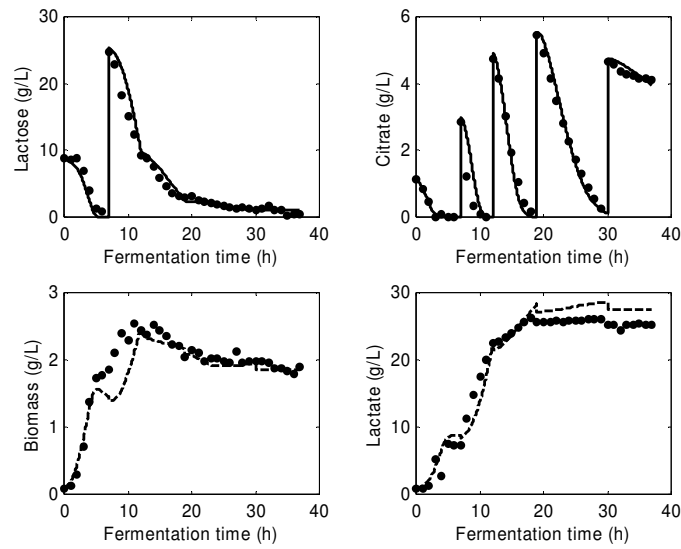
The simulation results provide a very good fit of the experimental data. In order to validate such modification, fed-batch cultures under other operating conditions in term of OSL (0 and 70 %) were simulated with the same delay model. The same kinetic behaviour was observed in the experimental data and confirmed by the model (data not shown).

The second step concerned the study of fed-batch fermentation at T and OSL constant respectively 30 °C and 35 % while the pH decreased in function of time with four substrates supplies at $t_1 = 7$ h, $t_2 = 12$ h, $t_3 = 19$ h and $t_4 = 30$ h as showed in Figure 6. The first feeding was done with a solution of citrate and lactose while maintaining a constant pH to ensure biomass growth and the others were done by using citrate alone while decreasing the medium pH in order to enhance aroma (diacetyl) production. This culture (Figure 6) presents a first phase, before feedings, well fitted with the batch culture model. On top of that, it can be seen that:

- (i) the kinetics of lactose uptake was delayed at each feeding time and that the same behaviour was observed for the citrate uptake and for growth,
- (ii) the lactose specific uptake rate was reduced related to the running time. On the other hand, the citrate feeding contributed to a subsequent decreasing of pH, and a citrate specific uptake was enhanced until the starvation of a limiting factor.

Therefore the fed-batch model needed to be corrected. Among microbiologists it is widely accepted that metabolites play a major role in the transition between different growth phases. Metabolites whether growth or non-growth associated can have a specific effect on cell formation [36]. The mutual interference of microbial cells and products, which represents a characteristic example of interspecies interaction, can be mathematically expressed by a set of couple of quadratic models.

A/ kinetic results at T = 30 °C and OSL = 35 %



B/ Volume and pH profiles

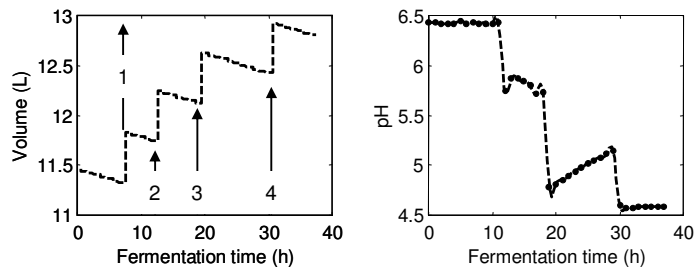


Figure 6. Experimental data (*points*) and model simulation (*lines*) of lactose and citrate uptake, growth and lactate production in fed-batch culture of *L. lactis*, in 20 L bioreactor (A), at T = 30 °C and OSL = 35 %, while varying pH during the fermentation process and feeding the culture medium with concentrated solutions of lactose and citrate (B). The arrows indicate the instants of discontinuous supplies of the culture medium with 0.5 L of concentrated substrate solutions respectively 1: Lactose 600 g/L and citrate 70 g/L, 2: Citrate 120 g/L, 3: Citrate 140 g/L and 4: Citrate 120 g/L.

The correction introduced was feeding time dependent and is expressed in the following equations set:

$$\text{if } t > t_i \quad Z_{\text{corr}} = R_{\text{corr}} Z_{\text{nom}} \left(1 - 0.95e^{-\left(\frac{t-t_i}{\tau}\right)} \right)$$

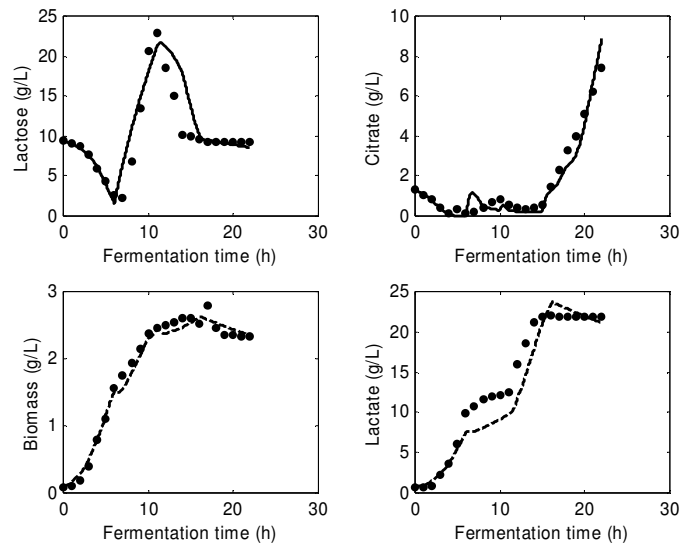
Where, Z_{nom} and Z_{corr} are respectively the nominal and corrected kinetic parameters (q_{maxS1} , q_{maxS2} , $Y_{X/S1}$), t the fermentation time (h), t_i the substrates supplying instants ($i = 1 \dots 4$), R_{corr} the correction ratio and τ = delay constant (2h).

Table 3. Substrates supplying instants and corresponding correction ratios R_{corr} to apply on the secondary kinetic parameters: maximum specific substrates uptake respectively for lactose (q_{maxS1}) and citrate (q_{maxS2}), biomass yield based on lactose uptake ($Y_{X/S1}$) according to the feeding time.

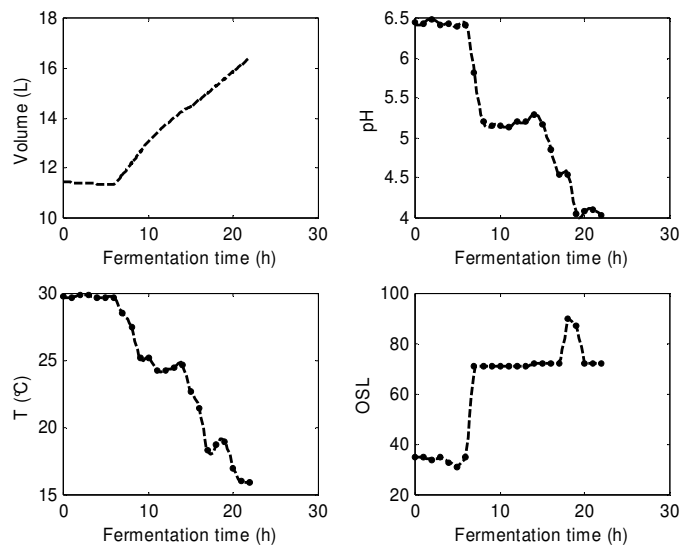
kinetic parameters to be corrected	Feeding time			
	t1 7 h	t2 12 h	t3 19 h	t4 30 h
q_{maxS1}	0.55	0.35	0.25	0.20
q_{maxS2}	0.45	0.55	0.75	0.25
$Y_{X/S1}$	0.55	0.065	0.065	0.065

The final step concerned the study of fed-batch fermentation when varying operating conditions and feeding rates of lactose concentrated solution (400 g/L) and Y medium concentrated solution with only citrate as carbon source (120 g/L) in order to avoid the effect of a substrate uptake limiting factor as showed in the previous fermentation fed with citrate and lactose solutions without other nutrients (nitrogen, vitamins, trace elements,...). The results of this culture are presented Figure 7, using a new set of *Lactococcus lactis* strain inoculums. The first observation concerned the 9th first hours of culture that are similar to the batch fermentation with a lessening of 30 % of all the performances in terms of q_{maxS1} , q_{maxS2} and $Y_{X/S1}$. The performances diminution was attributed to the change of inoculums set. After the first feeding start, a delay appeared in the kinetic behaviour: (i) when the feed rates of lactose and Y medium supplemented in citrate were respectively set at 0.16 L/h and 0.3 L/h, a lactose accumulation in the culture media occurred until the feed rate of lactose was reduced to 0.1 L/h and the Y medium enriched in citrate diminished to 0.2 L/h, (ii) concerning citrate a little accumulation of citrate was observed at the same moment of lactose accumulation and ceased when the feed rate of y medium enriched in lactose was reduced, then the accumulation become very important when the pH decreased to pH 4 and the temperature attained 16 °C. This led to adapt the secondary model taking into account the instants of feed rates changes was needed and a reduced delay was introduced for the q_{maxS1} , q_{maxS2} and $Y_{X/S1}$ operating parameters dependant equations.

A/ kinetic results at $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\text{OSL} = 35\%$



B/ Operating conditions profiles



C/ Feeding rate profiles of Y medium with concentrated citrate as unique carbon source and lactose concentrated solution

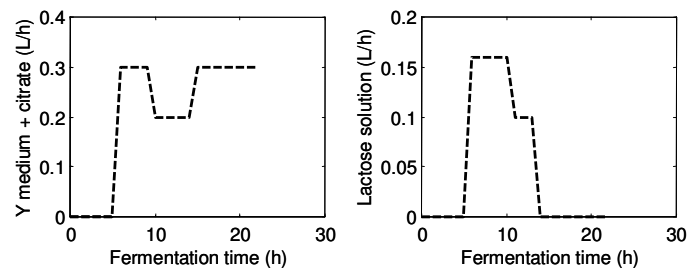


Figure 7. Experimental data (*points*) and model simulation (*lines*) of lactose and citrate uptake, growth and lactate production in fed-batch culture of *L. lactis*, in 20 L bioreactor (A), at varying operating conditions (B) and with changing substrate feed rates (C).

Taking into account the delay the correction introduced was feeding time dependent and is expressed in the following equations set:

$$\text{if } t > t_i \quad Z_{corr} = R_{corr} \cdot Z_{nom} \left(1 - 0.95e^{-\left(\frac{t-t_i}{\tau}\right)} \right)$$

Where, Z_{nom} and Z_{corr} are respectively the nominal and corrected kinetic parameters (q_{maxS1} , q_{maxS2} , $Y_{X/S1}$), t the fermentation time (h), t_i the substrates supplying instants ($i = 1...5$), R_{corr} the correction ratio and τ = delay constant (0.5 h).

Table 4. Substrates supplying instants and corresponding correction ratios R_{corr} to apply on the secondary kinetic parameters: maximum specific substrates uptake respectively for lactose (q_{maxS1}) and citrate (q_{maxS2}), biomass yield based on lactose uptake ($Y_{X/S1}$) according to the feeding time with (-): constant.

kinetic parameters to be corrected	Feeding time				
	t1 5 h	t2 6 h	t3 9 h	t4 11 h	t5 14 h
q_{maxS1}	-	0.2	-	3.9	-
q_{maxS2}	1.5	-	0.75	-	0.5
$Y_{X/S1}$	-	0.55	-	0.065	-

Finally, in the light of these results some observations were done.

- (i) When only an external stress is applied to culture system such as a set up of substrates discontinuous feeding while all the other operating conditions are kept constant, only the $Y_{X/S1}$ is affected and the system needs a certain lag phase to return to its initial state In addition the concentration of diacetyl obtained in this case is about 15 mg/L.
- (ii) When more than two external discontinuous modifications are applied to the system, the stress is more important and affects either the kinetic parameters of substrates uptake and growth. Therefore, a lag time is needed to return to the initial state and the performances in terms of q_{maxS1} , q_{maxS2} are modified. Indeed the discontinuous citrate supply both with a pH medium decrease in a dynamic way leads to a reduction of the kinetic performances. This corresponds to a lower maximum specific lactose uptake and to the enhancement of maximum specific

citrate uptake until the starvation of limiting substrate consumption nutrients. Moreover, the $Y_{X/SI}$ declined while pH decreased in a dynamic way. Furthermore, the maximal concentration of diacetyl obtained in this case is about 30 mg/L.

- (iii) When external continuous modifications are applied to the system (set up of substrates feeding rate and operating conditions profiles), the cells are variously reacting and the lag phase is reduced. But, an initial high feeding rate of lactose leads to the accumulation of lactose in the culture media. Whereas, the maximal concentration of diacetyl obtained here is about 70 mg/L.

The model which has been developed provides an exhaustive understanding of the effect of the various factors that influence, lactose and citrate consumptions, growth and lactate production of the strain of *Lactococcus lactis* studied both in batch and in fed-batch fermentations.

Conclusion

An original model describing the lactose and citrate uptake, growth and lactic acid production of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis PAL D DIA A was successfully developed. The model is different from those described in the literature based on the Ludeking-Piret model [13]. In deed, our model takes into account the main macroscopic observed metabolic phenomena, accurately described the kinetics for batch cultures in a very wide domain for the three operating factors (pH, T and oxygenation), even in ranges of values exceeding those mentioned in previous studies.

In contrast to classical predictive models, applying the batch model to fed-batch processes, it appeared that different kinds of stress modified the bacterial behavior. This could be explained by the fact that for the major studies of fed-batch processes modelling, it was considered that the feeding volume was approximately equal to the out volume of sampling and that the variation of the fermentation broth, thus, could be ignored. In our case the feeding volume was different from the sample volume. Therefore, a simple first order adaptation is able to depict the delay resulting from such stress. In these conditions, the model also provided a good basis for the prediction of typical fed-batch fermentations either in presence of discontinuous substrates supplies or continuous feeding along with a time varying operating conditions.

The use of the satisfactory enough proposed model can serve as a basis in order to optimize the transition from a growth phase to a production phase. If successful on such a complex case, this combined effect study coupled with a dynamic control strategy could be applied either to the numerous existing biological processes in order to improve their performances, or to the development of whole new processes.

References

- [1] Cocaing-Bousquet M, Garrigues C, Loubière P and Lindley ND (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 253-26.
- [2] Cocaign-Bousquet M, Even S, Lindley ND and Loubière (2002). Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 24-32.
- [3] Law BA (1991). The formation of aroma and flavour compounds in the fermented dairy products. *Dairy Sc. Abstr* 43: 43-154.
- [4] Goupy S, Croguennec T, Gentil E and Robins RJ (2000). Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ration analysis. *FEMS Microbiol Lett* 82: 207-211.
- [5] Yeh PLH, Bajpai RK and Iannotti EL (1991). An improved model for lactic acid fermentation. *J Ferment Biotechnol* 71: 75-77.
- [6] Mercier P, Yerushami L, Rouleau D and Dochain D (1992). Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J Chem Technol Biotechnol* 55: 111-121.
- [7] Vereecken K M and Van Impe J F (2002). Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 73: 239-250.
- [8] Lv W, Zhang X and Cong W (2005). Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 322-326.
- [9] Oliviera A P, Nielsen J and Förster J (2005). Modelling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol* 1-15.
- [10] Bassit N, Iatrille E, Boquien CY, Picque D and Corrieu G (1994). Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar diacetyllactis. *Lait* 74: 115-126.
- [11] Cachon R and Diviès C (1994). Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate

bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar diacetylactis. Appl Microbiol Biotechnol 41: 694-699.

[12] Adamberg K, Kask S, Laht TM and Paalme T (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. Int J Food Microbiol 85: 171-183.

[13] Boonmee M, Leksawasdi N, Bridge W and Rogers PL (2003). Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. Biochem Eng 14:127-135.

[14] Collins EB. Influence of medium and temperature on end products and growth (1977). J Dairy Sc. 60: 799-804.

[15] Bassit N, Iatrille E, Boquien CY, Picque D and Corrieu G (1994). Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyl et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar diacetylactis. Lait 74 : 115-126.

[16] Rondags E (1997). Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche de la voie de synthèse du diacétyl et d'une mise en œuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France.

[17] Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen (1987). FEMS Microbiol Rev 46: 269-280.

[18] Dellaglio F, De Roissart H, Torriani S, Curk M C et Janssens D (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, ed Lorica,, Uriage, (1) : 26-48.

[19] Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, Le Loir Y, Violet F, Loubière and Gruss A (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. J Bacteriol 183:4509-4516.

[20] Stien G, Blanchard F, Rondags E and Marc I (1999). An on-line method for the measurement of diacetyl and acetaldehyde in yoghurt, fermented milk, butter and margarine. Le Lait 79, 615-624.

[21] Rondags E, Halliday and Marc I (1998). Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* bv. diacetylactis: study of α -acetolactic acid extracellular accumulation under anerobiosis. Appl Biochem Biotechnol 69, 113-125.

[22] Rondags E, Germain P and Marc I (1999). Quantification of extracellular α -acetolactate oxidative decarboxylation in diacetyl production by an α -acetolactate overproducing strain of *Lactococcus lactis* sp. *Lactis* bv. diacetylactis. Biotechnol Lett 21, 303-307.

[23] Stien G (1993). Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar diacetylactis et *Leuconostoc*

mesenteroides subsp *cremoris* en cultures pures et co-cultures : études cinétiques et suivi en ligne de l'influence de l'acide citrique et du pH sur le comportement métabolique PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France.

[24] Collins EB and Bruhn JC (1970). Roles of Acetate and Pyruvate in the Metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. J Bacteriol 103, 541-546.

[25] Cogan TM (1981). Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. J Dairy Res 48, 489-495.

[26] Cogan TM (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. J Appl Bacteriol 63, 551-558.

[27] Goupry S, Croguennec T, Gentil E and Robins RJ (2000). Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. FEMS Microbiol Lett 182, 207-211.

[28] Kimoto H, Nomura M and Suzuki I (1999). Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. Int Dairy J 9, 857-863.

[29] Drinan D F, Robin S and Cogan T M (1976). Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol 31, 481-486.

[30] Neysens P and De Vuyst L (2005). Kinetics and modelling of sourdough lactic acid bacteria. Trends Food Sc Technol 16, 95-103.

[31] Zwietering MH, de Wit JC and Notermans S (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. Int J Food Microbiol 30, 55-70.

[32] Rosso L, Lobry JR, Bajard S and Flandrois JP (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl Environ Microbiol 61, 610-616.

[33] Makhlof A, Rondags E, Marc I, Fournier F (2006). Modelling of aroma production in lactic fermentation. Symposium on progress in chemical technology and biotechnology, 17th International Congress of Chemical and Process Engineering, Prague, Czech Republic.

[34] Davey KR (1989). A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. J Appl Bacteriol 67, 483-488.

[35] Panagou E Z, Skandamis P N and Nychas G J E (2003). Modelling the combined effect of temperature, pH

and a_w on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. J Appl Microbiol 94, 146-156.

[36] James S, Legge R and Budman H (2002). Comparative study of black-box and hybrid estimation methods in fed-batch fermentation. J Proc Cont 12, 113-121.

[37] Guerra N P, Agrasar A T, Macias C L and Pastrana L (2005). Modelling the fed-batch production of nisin using mussel processing wastes. Proc Biochem 40, 1071-1083.

[38] Lv W, Zhang X and Cong W (2005). Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. Appl Microbiol Biotechnol 68, 322-326.

III.4. Optimisation du système étudié

III.4.1. Introduction

Les problèmes d'optimisation dynamique des bioprocédés sont étudiés depuis de nombreuses années. Les applications d'optimisation dynamique des bioprocédés discontinus alimentés ont souvent pour objectif de maximiser la concentration de biomasse et /ou la production de métabolites d'intérêt et l'optimisation s'est souvent limitée à la seule maîtrise du débit d'alimentation en substrat. Au cours des dernières années, les problèmes d'optimisation dynamique multicritère (ODM), ont également été abordés pour l'optimisation de ce type de bioprocédés mais restent, à l'heure actuelle, trop peu étudiés.

Dans ce chapitre, l'étude portera sur le développement et l'évaluation d'un outil d'optimisation dynamique multicritère conçu au sein de notre laboratoire. Cet outil sera appliqué au procédé de fermentation de *Lactococcus lactis* étudiée au cours des précédents chapitres. Pour le cas de la fermentation étudiée, il va s'agir de déterminer les profils de pH, température, du TOD et des débits des alimentations en substrats (citrates et lactose) qui optimisent indépendamment chacun des critères étudiés. Il est ici question d'une optimisation dynamique, c'est-à-dire que les conditions opératoires (pH, T, TOD et les débits de substrats), vont varier au cours du temps.

La mise au point de notre outil d'optimisation dynamique multicritère nécessite des choix qu'il convient de justifier.

Plusieurs approches existent pour résoudre les problèmes d'optimisation dynamique monocritère. Ces approches reposent sur le Principe du Maximum, les Méthodes Variationnelles ou encore le Principe de Bellman. La résolution des formulations mathématiques qui en découlent est souvent complexe. Dans cette étude, le problème d'optimisation dynamique a été transformé en problème statique par la technique de Paramétrisation du Vecteur de Commande, mieux connue sous sa désignation anglo-saxonne Control Vector Parameterisation (CVP). Il est, en effet, reconnu que cette méthode, bien que conduisant à des solutions sous-optimales, ne dégrade que très faiblement le caractère optimal de la solution mais simplifie grandement la résolution et réduit les temps de calcul (Fournier *et al.*, 1999 ; Banga *et al.*, 2005).

Par ailleurs, à la différence des études dans la littérature, le modèle utilisé pour construire l'outil dynamique multicritère a été spécifiquement développé à partir des données expérimentales. Il est ainsi plus complexe que les modèles académiques habituels. Ce choix réside dans la volonté de développer une démarche intégrant, à terme, la validation expérimentale des solutions optimales proposées. Cependant, l'utilisation d'un tel modèle doit être considérée comme une phase de développement. En effet, les capacités prédictives du modèle utilisé sont limitées au domaine dans lequel ce dernier a été identifié. Toutefois, l'optimisation dynamique de ce procédé peut conduire (et conduira) à des combinaisons de conditions opératoires optimales qui, bien qu'à l'intérieur du domaine opératoire, ne sont pas correctement décrites par le modèle. Les résultats ainsi présentés dans ce chapitre visent à démontrer les performances de notre démarche d'optimisation dynamique multicritère. Le modèle devra si nécessaire être requalifié, dans les domaines de fonctionnement couverts par les solutions, avant la validation expérimentale des conditions optimales multicritères et leur mise en œuvre optimale.

Afin de prendre en compte les différents points précédents, une démarche progressive inspirée de celle de Sarkar et Modak (2003, 2004 et 2005) a été adoptée. Elle consiste à valider les résultats par comparaison à ceux d'un problème qui ne met pas en jeu le choix de la même paramétrisation, du même problème d'optimisation. La démarche utilisée dans ce travail sera évolutive, c'est-à-dire à complexité croissante; le premier cas étudié sera le plus simple possible pour aller crescendo.

Nous utiliserons comme première référence, les résultats du modèle dans les conditions usuelles et nominales de fonctionnement en mode discontinu d'une part, à savoir, pour un pH, une température et un niveau d'oxygène dissous fixés et en mode discontinu alimenté d'autre part en imposant un débit d'alimentation en lactose et un débit d'alimentation en citrate, constant au cours de l'opération.

Dans un premier temps, l'optimisation du procédé sera monocritère et statique, en considérant dans un cas, le mode discontinu, à savoir les trois variables de commandes (pH, T, et TOD) et dans l'autre cas le mode discontinu alimenté, c'est-à-dire en ajoutant aux trois variables de commandes précédentes, les deux débits d'alimentation en lactose et citrate.

Dans une troisième partie, on propose de résoudre des problèmes d'optimisation

dynamique, en mode discontinu alimenté. Deux critères sont considérés séparément en préparation de l'optimisation dynamique multi-(bi) critère. En fonction des résultats obtenus, le type de profil pourra être modulé.

Après avoir déterminé les conditions dynamiques optimales associées à chacun de nos deux critères, les résultats de la démarche dynamique multicritère seront présentés. Les optimisations seront effectuées de manière à déterminer les meilleurs compromis entre les différents critères qui, en général, sont antagonistes. Dans un premier temps, l'outil d'optimisation dynamique multicritère a été appliqué sur deux problèmes académiques (Sarkar et Modak, 2005) correspondant respectivement à la production en mode discontinu alimenté de lysine par fermentation et la production d'une protéine par une bactérie recombinante (Sarkar et Modak, 2005). Lorsque les performances de l'outil d'optimisation dynamique multicritère seront vérifiées, l'outil sera adapté pour résoudre les problèmes d'optimisation dynamique multicritère dans le cas de la production d'arômes laitiers.

Le temps de calcul nécessaire pour réaliser les optimisations sera aussi un paramètre important à prendre en compte dans cette étude. En effet, la méthode implique des opérations (intégration numérique, classement de la zone de Pareto,...) très lourdes en terme de temps de calcul; temps qui doit rester "raisonnable" dans la perspective de mise en œuvre de commande optimale multicritère.

III.4.2. La paramétrisation

La paramétrisation consiste à approximer un profil de commande continu par un profil qui peut être défini par un nombre fini de paramètres. Ainsi, les profils peuvent être définis de la manière suivante :

- Le temps est découpé en un certain nombre (n) d'intervalles dont les bornes sont notées t_{bi} ($i=1, \dots, n$).
- A chaque borne sera associée une valeur de paramètres de commandes u_i ($i=1, \dots, n$).
- La description de la fonction sur un intervalle dépend du mode de paramétrisation. Pour la paramétrisation constante par morceaux, l'approximation du profil est basée sur un polynôme d'ordre 0. Pour l'approximation linéaire par morceaux, on utilise une approximation

polynomiale d'ordre 1. Enfin, pour l'approximation polynomiale, des polynômes de Lagrange sont utilisés. Ces derniers sont définis selon :

$$u(t) = \sum_{i=1}^{n+1} u_i \lambda_i(t) \quad (III.1)$$

avec $\lambda_i(t)$, les polynômes de Lagrange définis par :

$$\lambda_i(t) = \prod_{j=1, j \neq i}^{n+1} \frac{(t - t_j)}{(t_i - t_j)} \quad (III.2)$$

Ces différents modes de paramétrisation sont schématisés dans la Figure III.1 dans le cas d'un problème à $n = 4$ intervalles, c'est-à-dire trois temps de bascule. La paramétrisation est entièrement définie par n valeurs dans le cas constant par morceaux (CPM) et par $(n+1)$ valeurs pour les paramétrisations linéaires par morceaux (LPM) et polynomiales (PP).

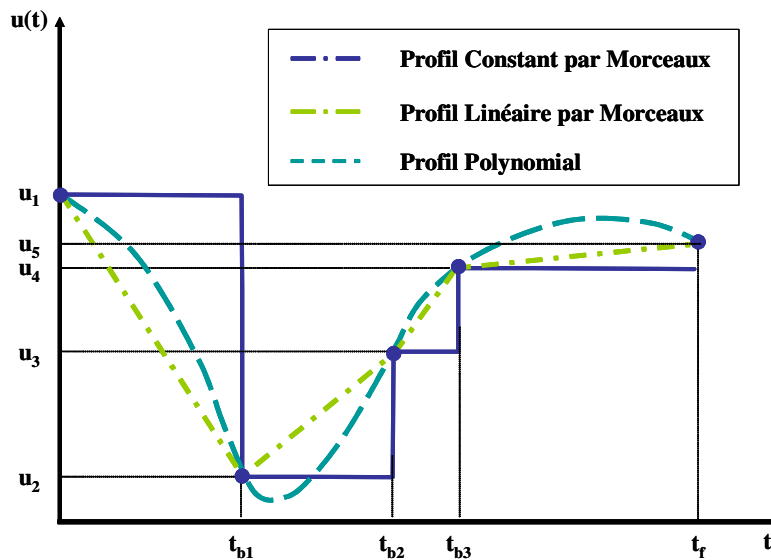


Figure III.1. Représentation des différents types de paramétrisation.

Ainsi, le problème d'optimisation dynamique :

$$\text{Max}_{u(t)} c(u(t))$$

$$\text{soumis à : } \frac{dx}{dt} = f(t, x, u)$$

est transformé en un problème d'optimisation statique

$$\text{Max}_{\substack{t_{b1}, t_{b2}, \dots, t_{bn+1} \\ u_1, u_2, \dots, u_{n+1}}} c(t_{b1}, t_{b2}, \dots, t_{bn+1}, u_1, u_2, \dots, u_{n+1})$$

$$\text{soumis à : } \frac{dx}{dt} = f(t, x, t_{b1}, t_{b2}, \dots, t_{bn+1}, u_1, u_2, \dots, u_{n+1}) \quad (III.3)$$

La transformation du problème d'optimisation dynamique multicritère repose sur la même approximation des variables de commande.

Dans l'algorithme génético-évolonnaire (AGE), le chromosome d'un individu qui décrit une variable de commande de ce problème est ainsi défini par la séquence de gènes suivante :

$$t_{b1} \quad t_{b2} \quad \cdots \quad t_{bn+1} \quad u_1 \quad u_2 \quad \cdots \quad u_{n+1}$$

Dans notre cas multivariable, chaque variable (pH, T, TOD, F₁, F₂) est associée à une séquence similaire dans un seul et même individu.

Dans cette étude, la recherche de solution dynamique a été définie en utilisant les mêmes temps de bascule (t_{bi}) pour toutes les variables de commande. Cette simplification permet tout d'abord de réduire la dimension de l'individu à déterminer et, par conséquent de réduire les temps de calcul. Mais, ce mode de paramétrisation a surtout été choisi pour simplifier l'interprétation des résultats qui peut devenir très difficile lorsque chacune des cinq variables de commande peut subir un changement indépendamment des autres.

Lors de l'utilisation de AGE, la paramétrisation qui fait intervenir explicitement des paramètres temporels, fait apparaître une difficulté. En effet, pour qu'une paramétrisation basée sur des intervalles de temps soit pertinente, il est nécessaire que les temps de bascule (t_b), qui définissent ces intervalles, soient ordonnés. Ce problème se rencontre, au niveau du fonctionnement de l'algorithme, lors de la phase de naissance (croisement, mutation). En effet, même si les individus "parent" sont caractérisés par des temps de bascule croissants, les opérateurs croisement et mutation peuvent donner naissance à des individus où l'ordre chronologique n'est plus respecté. Plusieurs solutions sont alors envisageables :

- les individus avec des t_b non ordonnés sont éliminés,
- au début de chaque intégration du système, les t_b sont classés de manière croissante,
- l'AGE peut être adapté pour intégrer cette condition.

Ces différentes possibilités présentent toutes des avantages et des inconvénients qui doivent être discutés.

III.4.2.1. Elimination des mauvais individus

Cette alternative, présente l'avantage de ne pas avoir à modifier l'AGE qui reste utilisable pour n'importe quel problème d'optimisation. Le processus de convergence de l'algorithme repose sur la génération d'individus mutant dans une proportion généralement très faible. L'élimination des individus ne présentant pas des temps de bascule dans l'ordre chronologique conduit ainsi à faire disparaître une étape essentielle de l'algorithme car la probabilité pour qu'un mutant possède la qualité requise devient quasiment nulle.

D'autre part, ceci ralentit l'optimisation puisque de nombreux individus seront générés pour rien. Le problème des mutants non viables peut facilement être résolu. Il suffit de classer les temps de bascule à l'issue de la création aléatoire des individus. En revanche, ceci ne résout pas les problèmes des mauvais individus issus de croisements. Il faut donc trouver une autre solution.

III.4.2.2. Classement des temps de bascule avant chaque intégration

Afin de satisfaire la condition de chronologie sur les temps de bascule, il est possible de classer les temps de bascule avant chaque intégration lors de l'évaluation de critères. Cependant, cette alternative introduit un processus non bijectif et surtout aléatoire dans la relation entre l'individu et l'algorithme et ses performances. Cette possibilité risque de faire perdre l'intérêt de l'AGE. En effet, ceci reviendrait à croiser les gènes entre eux. Les croisements seraient alors complètement aléatoires et l'AGE ne serait pas meilleur qu'un algorithme où tous les individus de chaque génération seraient des mutants. Cette méthode s'est avérée infructueuse pour l'algorithme diploïde.

III.4.2.3. Modification de l'algorithme

Ce type de méthode s'est avéré intéressant pour les algorithmes haploïdes où à l'issue de chaque croisement, il est envisageable de classer les gènes correspondant aux t_b sur les chromosomes. De cette manière, les t_b correspondent toujours aux gènes qui leur sont associés et les croisements pourront se faire correctement lors de la génération suivante. Cependant, ce type de modification n'est pas approprié pour l'algorithme diploïde, puisque les temps de bascule sont associés à trois chromosomes différents. Ainsi, le classement du phénotype ne peut pas être reproduit sur les deux chromosomes du génotype. La transformation conduit aux mêmes perturbations que dans le cas des classements des temps de bascule avant intégration.

III.4.2.4. Codage de temps de bascule en intervalle

Les difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre de la paramétrisation du vecteur de commande ont conduit à revoir le mode de codage de ces temps de bascule. En effet, une solution pour résoudre le problème de la chronologie consiste à considérer que la variable descriptive, des temps de bascule, soit exprimée en durée d'intervalle. Ainsi, les différentes

durées d'intervalle permettent, par accumulation, de définir les temps de bascule qui sont chronologiquement ordonnés. Dans la suite de l'étude, nous utiliserons l'AGE diploïde où les gènes temporels des chromosomes décrivent les durées des intervalles. La contrainte inférieure sur la durée des intervalles permet de plus de définir un mode d'action dynamique où les actions imposées ne sont pas trop "brèves".

III.4.3. Description du problème étudié

Le modèle cinétique utilisé est celui décrit au chapitre III-3. Les variables de commandes étudiées sont : pH, T, TOD, alimentation en une solution de lactose (F_{S1}) et l'alimentation en milieu Y enrichi en citrate (F_{S2}). Cette fermentation sera optimisée suivant deux critères à maximiser qui sont :

$$\begin{aligned} \text{Max}_u c1 &= X(t_f) \\ \text{Max}_u c2 &= \bar{q}_{Cit} = \frac{1}{t_f} \int_0^{t_f} (q_{Cit}'' X V) dt \end{aligned} \quad (\text{III.8})$$

- **c1** : la concentration de biomasse en fin de fermentation (g/L)
- **c2** : la vitesse de consommation moyenne de citrate (g/L h).

La définition de ce deuxième critère est dictée par le fait que la production de diacétyle est liée à la vitesse de consommation du citrate. L'absence, dans le modèle actuel, d'équations décrivant la production de diacétyle ne permet pas de définir le problème multicritère ou la croissance des bactéries est mise en compétition avec la production du métabolite secondaire.

Le problème est soumis à la contrainte définie par le modèle du procédé établi au chapitre précédent et aux contraintes imposées par le volume utile du fermenteur (V_F) et par les contraintes définissant le domaine opératoire du pH, de la température (T), du niveau d'oxygène dissous (TOD) et des débits maximaux d'alimentation (F_{S1} t F_{S2}) :

$$\begin{aligned} V(t_f) &\leq 18 L \\ 4 &\leq pH(t) \leq 8 \\ 16 &\leq T(t) \leq 30 \text{ } ^\circ\text{C} \\ 0 &\leq NOD(t) \leq 70 \text{ } \% \\ 0 &\leq F_{S1}(t) \leq 0,2 L/h \\ 0 &\leq F_{S2}(t) \leq 0,3 L/h \end{aligned} \quad (\text{III.9})$$

Une formulation complète du problème d'optimisation dynamique multicritère est présentée dans l'annexe A-1.

De plus, les caractéristiques temporelles des profils d'optimisation paramétrés ont été soumises aux contraintes suivantes :

$$\begin{aligned} 1 \leq \Delta t_b &\leq \frac{t_f}{2} \\ 1 \leq t_f &\leq t_f^{\max} \end{aligned} \tag{III.10}$$

Où Δt_b représente la durée séparant deux temps de bascule et t_f^{\max} la valeur maximale de la durée opératoire. La contrainte sur la durée des intervalles suppose ainsi qu'un seul intervalle ne doit pas représenter plus de la moitié de la durée de la fermentation

III.4.4. Simulation de la croissance dans les conditions nominales

Au cours de cette partie, nous avons fait une simulation statique, c'est-à-dire une simulation avec des conditions opératoires statiques, des profils de consommation de lactose et de citrate, de production de biomasse et de lactate, en tenant compte des conditions nominales de croissance (pH 6,5, T = 30 °C et TOD = 35 %), identifiées expérimentalement en mode discontinu. Les résultats sont présentés figure III.2. Ensuite, nous avons simulé le fonctionnement du même procédé en considérant un mode discontinu alimenté en fixant F_{S1} à 0,2 L/h et F_{S2} à 0,3 L/h. Les résultats sont représentés figure III.3 et les performances correspondantes sont fournies dans le tableau III.1. La comparaison des figures III.2 et III.3 montre que lorsque le système est stimulé en présence des deux alimentations de substrats (lactose et citrate), il y a une première phase d'accumulation des substrats dans le milieu, suivie d'une phase de consommation de ces derniers. Ces phases d'accumulation de substrats seraient le résultat d'un stress apporté au niveau du milieu de culture, qui peut freiner les phénomènes de transport du citrate et du lactose à l'intérieur de la cellule. Néanmoins, la durée de la phase d'accumulation du lactose est plus importante que celle du citrate et semble dépendre de la présence du citrate dans le milieu.

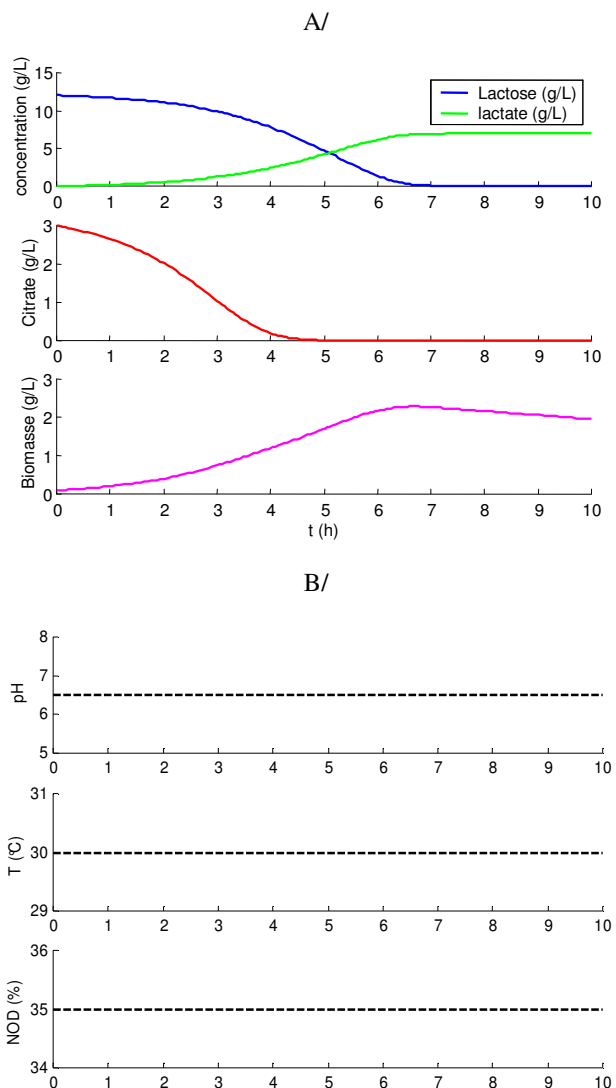


Figure III.2. Résultats de la simulation en conditions statiques nominales en mode discontinu avec A/les profils des variables d'état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD).

Tableau III.1. Résultats de la simulation en conditions statiques nominales (usuelles) de fonctionnement en mode discontinu et discontinu alimenté.

	Mode discontinu	Mode discontinu alimenté
<u>Facteurs opératoires :</u>		
pH	6,5	6,5
T (°C)	30	30
TOD (%)	35	35
<u>Alimentation en substrats :</u>		
F _{S1} (L/h)	0,0	0,2
F _{S2} (L/h)	0,0	0,3
c ₁ (g/L)	2,2	11,0

Le tableau III.1, confirme que les degrés de liberté apportés par les deux alimentations en solutions concentrées en lactose et en citrate, même si elles sont constantes au cours du temps, permettent d'atteindre des performances bien supérieures à celle en mode discontinu. En effet, la concentration en biomasse obtenue en mode discontinu alimenté est cinq fois plus grande que celle obtenu en mode discontinu. Par la suite, les deux modes de fonctionnement discontinu et discontinu alimenté seront comparés pour l'optimisation monocritère en conditions statiques et le mode de culture donnant les meilleurs résultats en terme de maximisation de la concentration en biomasse sera retenu pour la fin de l'étude.

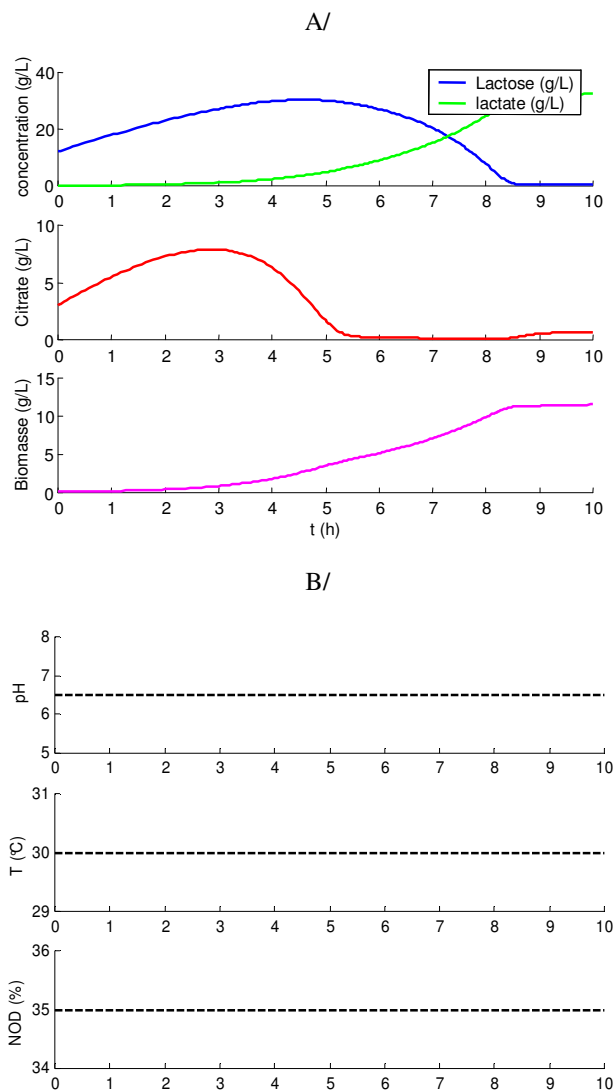


Figure III.3. Résultats de la simulation en conditions statiques nominales en mode discontinu alimenté avec A/les profils des variables d'état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD), avec des débits d'alimentation en substrats constants $F_{S1} = 0,2$ L/h et $F_{S2} = 0,3$ L/h.

III.4.5. Optimisation monocritère

Comme évoqué précédemment, notre approche est progressive et tend à augmenter le nombre de degrés de liberté. Les paramètres utilisés pour toutes les optimisations monocritères sont rassemblés dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Paramètres de l'AGE utilisés pour les optimisations

Taille de la population	200-2000 individus
Seuil de sélection	1/3
Précision de la solution	$1,0 \cdot 10^{-6}$
Pourcentage d'homozygote	50 %
Probabilité de mutation	0,05
Elargissement du domaine de recherche	0,2

La taille de la population sera choisie entre 200 et 2000. Elle est définie en fonction de la dimension du problème, *i.e.* de l'espace dans lequel la solution est recherchée. La valeur maximale a été imposée *a posteriori* en considérant les temps de calcul pour la résolution des différents problèmes d'optimisation traités. L'effet de ce paramètre de réglage de l'algorithme d'optimisation sera étudié. Le seuil de sélection est fixé à 1/3 pour maintenir une diversité suffisante dans la population au fil des générations (recherche de l'optimum global) en conservant une vitesse de convergence acceptable. Les critères considérés dans notre étude sont à maximiser. Les algorithmes mis au point sont des algorithmes de minimisation. La valeur moyenne de ces critères optimaux (inverse du critère « physique ») est voisine de 10^{-2} . La précision pour la convergence est ainsi fixée à 10^{-6} . La proportion d'individu haploïdes et diploïdes est fixée à 50 % pour bénéficier de la vitesse de convergence rapide des algorithmes diploïdes (spécifique des croisements de type hétérozygote) et de la capacité à scruter l'espace de recherche des algorithmes haploïdes (spécifique des croisements de type homozygote)

Compte tenu de la complexité des phénomènes et des interactions qui sont décrits dans le modèle, l'analyse des solutions optimales dynamiques peut s'avérer difficile. Pour faciliter l'analyse de ces solutions, nous avons procédé, dans un premier temps, à la recherche des meilleures conditions opératoires *statiques*, en mode discontinu et discontinu alimenté. Cette optimisation est réalisée en considérant, dans notre outil d'optimisation dynamique, une condition particulière de la paramétrisation de type CPM (un seul intervalle). Par la suite, nous avons déterminé les conditions optimales dynamiques et comparé ces solutions optimales *dynamiques* aux solutions optimales *statiques*.

III.4.5.1. Optimisation statique monocritère

Pour ces optimisations :

- le temps final a été fixé à 10 h
- les concentrations initiales sont $S1_A = 12$ g/L pour le lactose, $S2_A = 3$ g/L pour le citrate, $X_0 = 0,1$ g/L, $P_0 = 0$ g/L pour le lactate et $V_0 = 11$ L pour le volume.

Ces conditions opératoires sont choisies pour être comparables aux conditions opératoires mises en œuvre expérimentalement dans le cas de fermentations en mode discontinu alimenté dans le cas où les variables de commande varient au cours du temps.

Les profils optimaux de consommation de lactose et de citrate, de production de biomasse et de lactate en mode discontinu et en mode discontinu alimenté sont représentés respectivement dans les figures III.4 et III.5. Les performances correspondantes sont fournies au tableau III.3. Ces performances confirment bien la tendance observée pour la simulation statique, que les degrés de liberté apportés par les deux alimentations en solutions concentrées en lactose et en citrate permettent d'atteindre des performances en terme de production de biomasse, cinq fois supérieures à celle en mode discontinu. De plus, la comparaison de ces résultats à ceux obtenus en simulation montre, que l'outil d'optimisation, à partir du modèle utilisé, permet de trouver une combinaison de paramètres opératoires (pH 4,8, $T = 20$ C et $TOD = 60$ %) non explorée expérimentalement, qui maximise la concentration de biomasse. En effet, la concentration en biomasse produite a quasiment doublé entre la simulation et l'optimisation statique monocritère appliquée au procédé en mode discontinu (elle est passée de 2,2 g/L à 4,0 g/L) et en mode discontinu alimenté (elle est passée de 11 g/L à 19 g/L). Néanmoins, cette combinaison, même si elle donne de meilleurs résultats, reste irréaliste d'un point de vue physiologique, sachant que la croissance optimale est obtenue à pH 6,5 et qu'en dessous du pH 4,8 aucune augmentation de la biomasse apparente n'est observée, et qu'une température proche de 20 °C ralentit la croissance. Il ressort de ces résultats, que l'outil d'optimisation afin de maximiser la concentration de biomasse tend à réduire les phénomènes de décès (constante K_d). Aussi, le modèle établi n'est valable que dans la gamme des conditions opératoires explorées. Les conditions opératoires proposées par l'optimisation du modèle montrent que ce dernier nécessite d'être complété pour des combinaisons de pH, T, et OSL non explorées expérimentalement et en présence, en plus, d'un *excès* de lactose et de citrate. Il est notamment souhaitable de tenir compte des phénomènes d'inhibition de la croissance par le lactate qui n'ont pas été rencontrés expérimentalement mais modifieraient les solutions optimales s'ils étaient intégrés dans le modèle.

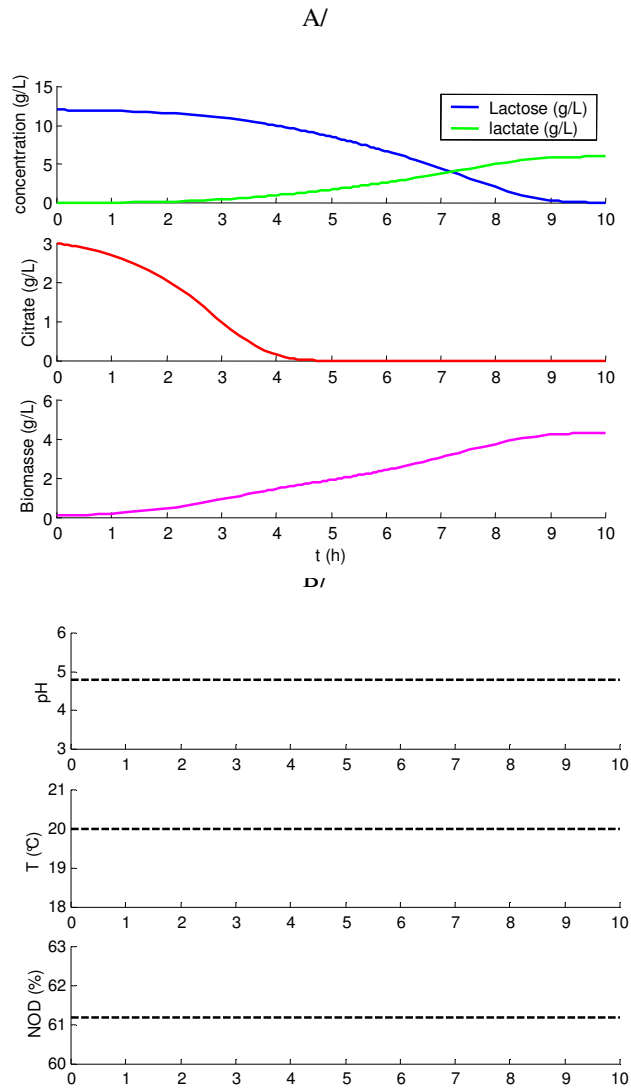


Figure III.4. Résultats de l'optimisation statique monocritère en mode discontinu avec A/les profils des variables d'état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD).

La comparaison de la figure III.4 et de la figure III.2, montre que les valeurs, des facteurs opératoires, optimisées affectent la cinétique de consommation de lactose, qui devient plus ralenti et qui de se fait conduit à une concentration en biomasse en fin de fermentation plus importante.

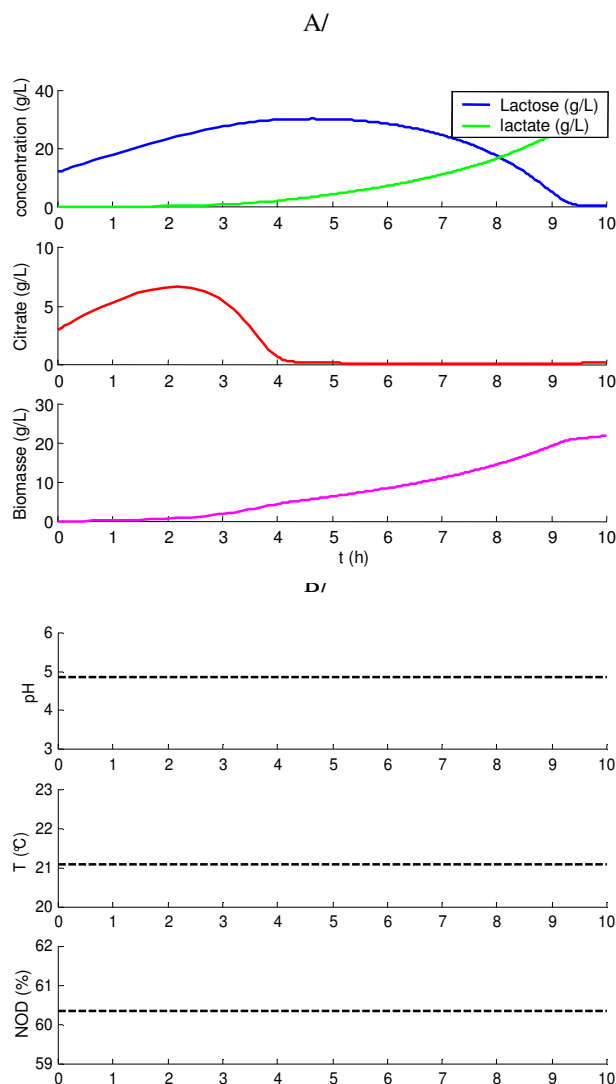


Figure III.5. Résultats de l’optimisation statique monocritère en mode discontinu alimenté avec A/les profils des variables d’état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD), avec des débits d’alimentation en substrats constants $F_{S1} = 0,2$ L/h et $F_{S2} = 0,3$ L/h.

Les résultats observés figure III.4 et III.5, montrent qu’en présence et en absence d’alimentation en substrats, les conditions opératoires optimisées sont très proches. Ceci pourrait être dû à un manque de sensibilité de ces facteurs. Ainsi, l’augmentation de la concentration en biomasse entre ces deux expériences serait le résultat de l’alimentation en substrat en continu. Ce résultat montre que le critère maximisation de la concentration en biomasse est plus sensible à l’alimentation en substrats, qu’à la valeur des facteurs opératoires pH, T et TOD.

Tableau III.3. Résultats de l'optimisation statique monocritère du procédé conduit en mode discontinu et discontinu alimenté.

	Mode discontinu	Mode discontinu alimenté
<u>Facteurs opératoires :</u>		
pH	4,8	4,8
T (°C)	21,1	20,0
TOD (%)	60,3	61,2
<u>Alimentation en substrats :</u>		
F _{S1} (L/h)	0,0	0,2*
F _{S2} (L/h)	0,0	0,3*
c ₁ (g/L)	4,0 (c _{1a} = 2,2 g/L)	19,0 (c _{1b} = 11 g/L)
Nombre de génération	45	64
Durée de l'optimisation (min)	28	84

Avec, c_{1a} et c_{1b}, les valeurs des critères de référence obtenus par simulation des profils dans les conditions nominales et usuelles de fonctionnement en mode discontinu et discontinu alimenté. * valeur maximale autorisée dans l'algorithme.

III.4.5.2. Optimisation dynamique monocritère

Au cours de cette partie nous avons traité plusieurs types d'optimisations dynamiques monocritères du procédé discontinu alimenté :

- avec des temps de bascule prédéfinis (en étudiant l'effet du nombre et des valeurs des t_b sur les performances du procédé),
- avec des temps de bascule libre et communs à toutes les conditions opératoires,
- avec différents types de paramétrisation,
- avec des tailles de populations différentes (500, 1000 et 1500 individus),
- avec un temps final imposé ou libre.

III.4.5.2.1. Optimisation dynamique monocritère à t_b prédéfinis

Pour ces optimisations :

- le temps final a été fixé à 10 h,
- les concentrations initiales sont S_{1A} = 12 g/L pour le lactose, S_{2A} = 3 g/L pour le citrate, X₀ = 0,1 g/L, P₀ = 0 g/L pour le lactate et V₀ = 11 L pour le volume.

Dans un premier, nous avons testé l'effet du nombre et des valeurs des t_b sur l'optimisation du critère c₁, donc de la maximisation de la concentration de la biomasse (tableau III.4). La taille de la population choisie est de 500 individus, ce critère a été fixé pour des raisons pratiques afin de réduire les temps de calcul.

Tableau III.4. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère avec une paramétrisation de type CPM sur une population de 500 individus, $t_f = 10$ h, et des temps de bascule prédéfinis et communs à toutes les conditions opératoires

	c1 (g/L)
Optimisation à 5 t_b (1,3, 5, 7 et 9 h)	19,26
Optimisation à 4 t_b (1,3, 5, 7)	20,09
Optimisation à 3 t_b (3, 5, 7)	21,16
Optimisation à 3 t_b (1, 3, 5)	21,42

Le tableau III.4, montre que les résultats ne sont pas améliorés en augmentant le nombre de temps de bascule. Cette observation est directement liée à la nature des solutions dynamiques optimales. Nous montrerons que pour ce critère, les profils optimaux des variables de commande pour des temps de bascule prédéfinis à 3, 5 et 7 h, sont quasiment constants au cours du temps. Dans de telles conditions, le nombre d'intervalles pour paramétrer les solutions devient peu influant. On constate cependant que les performances optimales sont sensibles au choix des valeurs des temps de bascule. Une meilleure répartition des temps de bascule permet d'adapter l'action à la dynamique du système optimisé. Cette adaptation peut alors conduire à des solutions qui, dans le temps, présentent des évolutions moins uniformes.

Dans un second temps, nous avons testé l'effet des différents types de paramétrisation CPM, LPM et PP sur l'optimisation des deux critères $c1$ et $c2$ (tableau III.5). La taille de la population choisie étant de 500 individus.

Tableau III.5. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère des critères $c1$ et $c2$ avec différentes paramétrisations CPM, LPM et PP sur une population de 500 individus, $t_f = 10$ h, et des temps de bascule prédéfinis et communs à toutes les conditions opératoires (3, 5 et 7 h)

	CPM	LPM	PP
$c1$ (g/L)	21,16 ($c1_c = 19$ g/L)	21,90	20,49
tc1 (mn)	546 ($tc1_c = 84$ mn)	585	416
$c2$ (g/L h)	39,11	39,02	38,81
tc2 (mn)	183	157	161

Avec tc1 : durée de l'optimisation en (mn) pour le critère $c1$, tc2 : durée de l'optimisation en (mn) pour le critère $c2$ et $c1_c$, la valeur optimale du critère dans les conditions *statiques* de fonctionnement en mode discontinu alimenté et son temps de calcul $tc1_c$ (mn).

A partir de la comparaison des résultats du tableau III.5, on observe que l'introduction d'une action dynamique permet d'améliorer les performances du critère $c1$, qui passe de

19 g/L en conditions opératoires statiques à 21,16 g/L.

De plus, les résultats du tableau III.5 permettent de comparer les différentes approches de paramétrisation sur les deux critères : maximisation de la concentration en biomasse et la maximisation de la vitesse de consommation moyenne du citrate. Il ressort de ces résultats que :

les profils linéaires par morceaux PLM et constants par morceaux PCM, sont sensiblement équivalents en terme de performance. Les temps de calculs sont également équivalents (de 546 à 585 min). On remarque, pour le critère *c2*, que les performances sont légèrement plus faibles avec une paramétrisation LPM qu'une CPM.

- Ainsi, les profils polynomiaux présentent des résultats moins bons aussi bien au niveau des valeurs des deux critères, qu'au niveau de la durée d'optimisation pour le cas *c2*. D'un point de vue théorique les PP ne semblent pas adaptés à ce type de problème. L'explication de capacité médiocre à décrire les profils optimaux de commande vient probablement des allures des profils solutions PCM qui sont décrits sur les figures III.7 et III.8.

Les figures III.7 et III.8 représentent les résultats de l'optimisation dynamique monocritère avec une paramétrisation CPM respectivement pour les critères *c1* et *c2*.

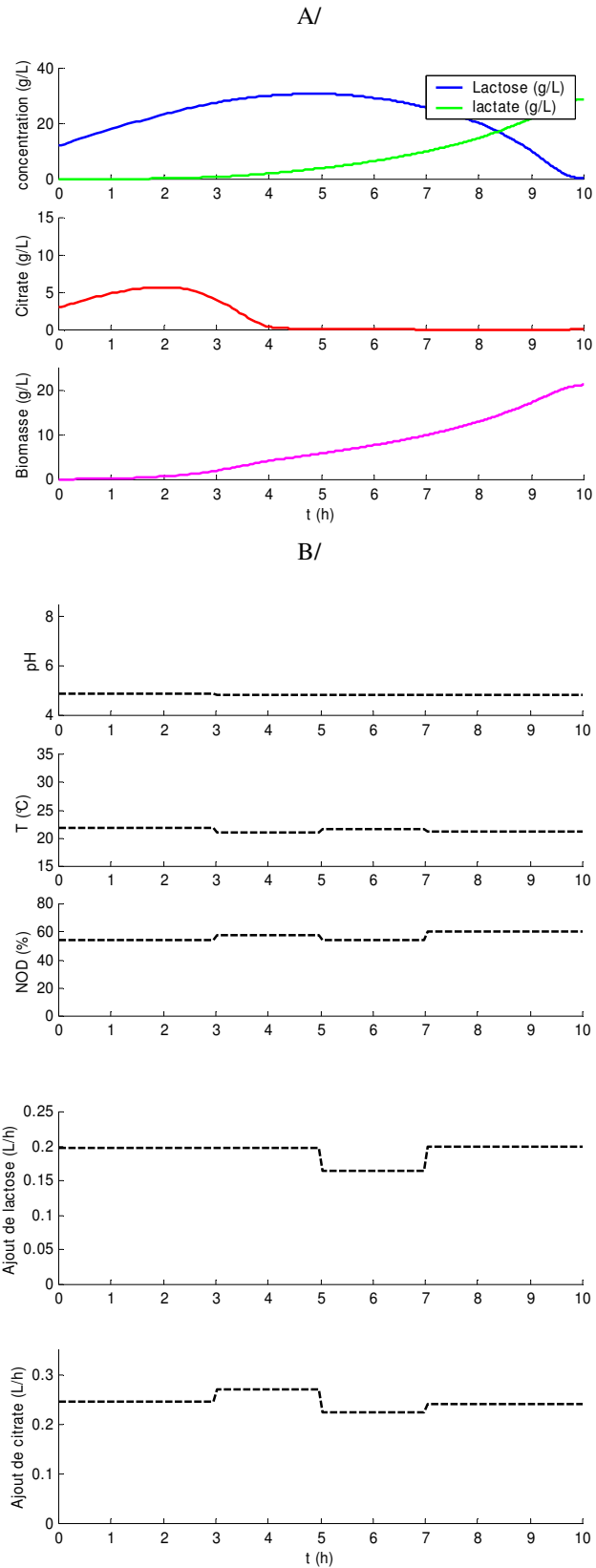


Figure III.7. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère de cI avec une paramétrisation CPM avec A/les profils d'état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD, F_{S1} et F_{S2}).

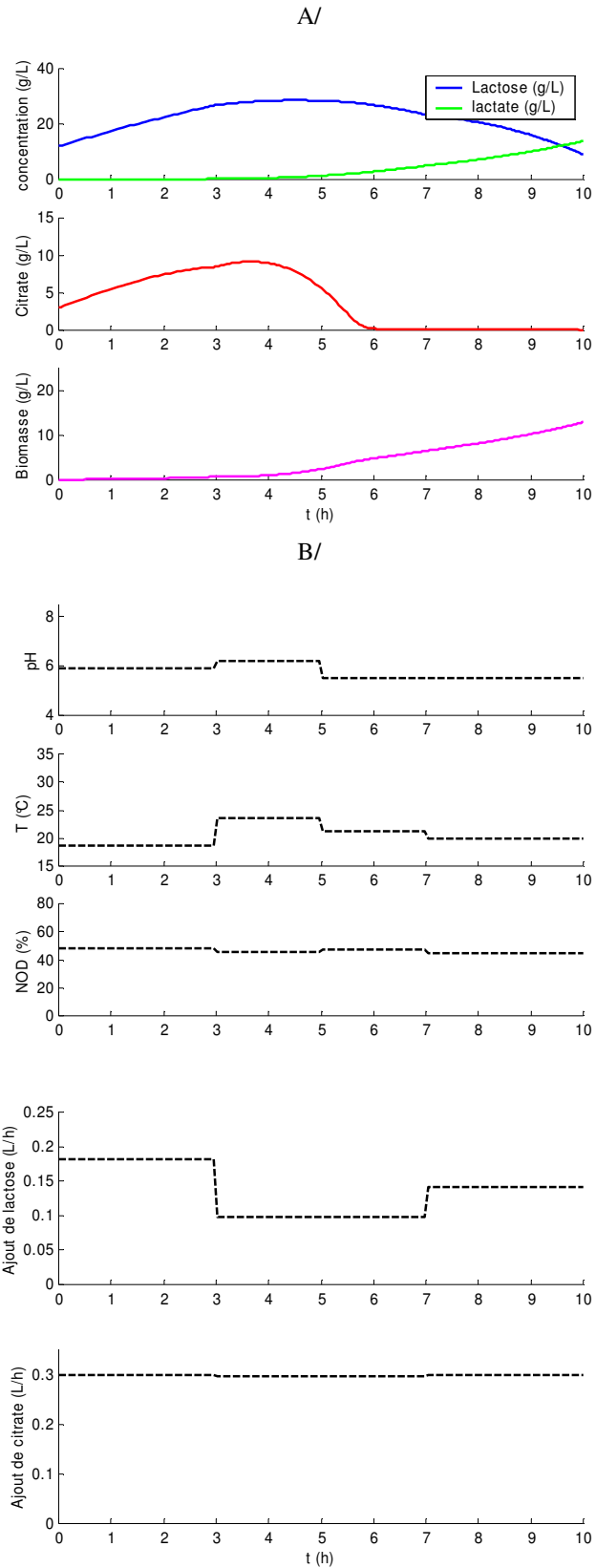


Figure III.8. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère de $c2$ avec une paramétrisation CPM avec A/les profils d'état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD, F_{S1} et F_{S2}).

La comparaison des deux figures III.7 et III.8, permet de voir que pour les variables d'état, l'accumulation de lactose est plus importante pour l'optimisation de $c1$ alors que l'accumulation du citrate est plus importante pour l'optimisation de $c2$ et sa consommation apparente apparaît plus tard. De plus, ces figures permettent de voir que les profils de commandes des variables sont quasi constants dans le cas de l'optimisation de $c1$ avec $\text{pH} = 4,8$, $T = 21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ et un $\text{TOD} = 55 \%$ et des profils d'ajout de citrate et de lactose quasi constant alors que pour le cas de l'optimisation de $c2$, les profils sont dynamiques le pH varie entre 6,5 et 5,2, la température varie entre 20 et 25 $^\circ\text{C}$ et le TOD est quasi constant aux alentours de 50 %, le profil d'alimentation du citrate est constant à 0,3 L/h et le profil d'alimentation du lactose est variable entre 0,1 et 0,18 L/h. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le critère $c2$ est implicitement un bi-critère, c'est-à-dire, pour optimiser la consommation moyenne de citrate, il est nécessaire de maximiser la concentration de biomasse dans le milieu de culture.

De plus, le caractère quasi-constant des profils optimaux observés pour les paramétrisations PCM et PLM fournissent une explication aux faibles performances atteintes pour les profils PP. En effet, les polynômes de Lagrange construits sur les temps de bascule prédéfinis (3, 5 et 7 h) sont totalement inadaptés pour représenter une tendance constante mais bien adaptés pour les tendances présentant de grandes variations.

L'optimisation du critère $c2$ conduit à des profils dynamiques plus « variables » que les profils optimaux correspondant au critère $c1$. Dans toute la suite de cette étude, l'analyse des conditions d'optimisation sur les solutions dynamiques optimales est réalisée en considérant le critère $c2$.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet de la taille de la population utilisée sur l'optimisation de $c2$ (tableau III.6), pour ce faire chaque optimisation a été répétée trois fois.

Tableau III.6. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère de $c2$ avec une paramétrisation de type CPM, $t_f = 10$ h, des temps de bascule prédéfinis et communs à toutes les conditions opératoires (3, 5 et 7h) et des tailles de population différentes.

Taille de la population (individus)	$c2$ (g/L h)
500	39,14
1000	39,17
1500	39,16

Ce tableau indique, que les optimisations dynamiques à 500, 1000 et 1500 individus permettent d’obtenir les mêmes valeurs de critères. L’erreur numérique pourrait expliquer les différences observées. Les profils des variables de commande sont légèrement différents mais la représentation de l’évolution des grandeurs cinétiques (vitesses spécifiques maximales de consommation, rendements, constantes de décès) qui dépendent directement des ces variables de commande montre un effet de compensation entre les différents facteurs.

Dans un quatrième temps, nous avons étudié la répétabilité des optimisations de c_2 (tableau III.7).

Tableau III.7. Résultats de l’étude de répétabilité de l’optimisation dynamique monocritère de c_2 avec une paramétrisation de type CPM, $t_f = 10$ h, des temps de bascule prédéfinis et communs à toutes les conditions opératoires (3, 5 et 7 h) et une taille de population de 1000 individus.

Optimisation	c_2 (g/L h)	tc_2 (mn)
1	39,17	357
2	39,17	350
3	39,17	354

Ces résultats, montrent que pour les répétitions de l’optimisation dynamique monocritère de c_2 avec une paramétrisation de type CPM, $t_f = 10$ h, des temps de bascule prédéfinis et communs à toutes les conditions opératoires (3, 5 et 7h) et une taille de population de 1000 individus, nous retrouvons toujours la même valeur du critère optimisé avec des légères variations au niveau du temps d’optimisation, ce qui provient du caractère stochastique de la méthode. Les profils des variables d’état et des variables de commande présentent rigoureusement les mêmes allures dans les trois cas.

III.4.5.2.2. Optimisation dynamique monocritère à t_b libre

Pour ces optimisations :

- le temps final a été fixé à 10 h,
- la taille de la population a été fixée à 500 individus
- les concentrations initiales sont $S_{1A} = 12$ g/L pour le lactose, $S_{2A} = 3$ g/L pour le citrate, $X_0 = 0,1$ g/L, $P_0 = 0$ g/L pour le lactate et $V_0 = 11$ L pour le volume.

Pour cette partie de l’étude nous avons testé l’effet de temps de bascule libre, en utilisant les différents types de paramétrisations utilisées précédemment pour l’optimisation de c_2 à temps de bascule prédéfinis (tableau III.8).

Tableau III.8. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère de c_2 avec différentes paramétrisations CPM, LPM et PP sur une population de 500 individus, $t_f = 10$ h, et des temps de bascule libre mais communs à toutes les conditions opératoires

	CPM	LPM	PP
c_2 (g/L h)	39,19	39,18	38,92
t_b (h)	(3,5 6,95 10,0*)	(4,76 8,73 10,0*)	(2,31 5,35 9,53)
tc_2 (mn)	132	145	140

Avec tc_2 : durée de l'optimisation en (mn) pour le critère c_2

* : temps de bascule contraint par la durée opératoire imposée $t_f = 10$ h

A partir de ces résultats, nous observons que les performances du critère c_2 ne sont pas améliorées Par rapport au cas où les temps de bascule sont prédéfinis.

III.4.5.2.3. Optimisation dynamique monocritère à t_b prédéfinis et t_f libre

Pour ces optimisations :

- la taille de la population a été fixée à 500 individus
- les concentrations initiales sont $S_{1A} = 12$ g/L pour le lactose, $S_{2A} = 3$ g/L pour le citrate, $X_0 = 0,1$ g/L, $P_0 = 0$ g/L pour le lactate et $V_0 = 11$ L pour le volume.

Pour cette partie de l'étude nous avons testé l'effet de temps de bascule libre et du temps final libre utilisant les différents types de paramétrisation utilisée précédemment pour l'optimisation de (tableau III.9).

Tableau III.9. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère de c_2 avec différentes paramétrisations CPM, LPM et PP sur une population de 500 individus, t_f libre, et des temps de bascule prédéfinis et communs à toutes les conditions opératoires (3, 5 et 7 h).

	CPM	LPM	PP
c_2 (g/L h)	44,18	44,14	38,65
t_f	3,5	3,5	3,5
tc_2 (mn)	52	65	208

Avec tc_2 : durée de l'optimisation en (mn) pour le critère c_2 .

A partir de ces résultats, nous observons que les performances du critère c_2 sont nettement améliorées en relâchant le temps final pour les paramétrisation CPM et LPM améliorées. En effet, le critère c_2 est défini comme une vitesse moyenne de consommation de citrate. La variable « temps final » introduite dans le problème d'optimisation permet donc d'influencer directement la valeur du critère c_2 .

III.4.6. Optimisation dynamique multicritère

III.4.6.1. Validation de l'outil d'optimisation dynamique multicritère sur un problème académique

L'outil d'optimisation dynamique multicritère a été appliqué et validé sur deux problèmes d'optimisation retrouvés dans la littérature :

- la production de lysine par fermentation en mode discontinu alimenté, avec une alimentation unique celle du substrat,
- et la production d'une protéine par une bactérie recombinante, en mode discontinu alimenté avec deux alimentations : le substrat et l'inducteur (Sarkar et Modak, 2005).

Dans cette première partie consacrée à l'optimisation dynamique multicritère, nous présenterons uniquement les résultats inhérents au problème de production de protéine. Ce problème présente en effet des caractéristiques très similaires à notre problème, au moins en ce qui concerne les variables de commande. Il s'agit en effet de la seule référence publiée à ce jour sur un problème d'optimisation dynamique multicritère impliquant plus d'une variable de commande.

III.4.6.1.1. Présentation du problème de production de protéine

Le modèle cinétique, utilisé dans le cas d'une production de protéine par une bactérie recombinante, en mode discontinu alimenté avec deux alimentations, a été développé par Tholdur et Ramiez (1997).

Ce modèle qui servira de base pour valider notre outil d'optimisation est le suivant :

$$\begin{aligned}
 \frac{dx_1}{dt} &= F_1 + F_2 \\
 \frac{dx_2}{dt} &= \mu x_2 - \frac{F_1 + F_2}{x_1} x_2 \\
 \frac{dx_3}{dt} &= \frac{F_1}{x_1} C_n^f - \frac{F_1 + F_2}{x_1} x_3 - \frac{\mu x_2}{Y} \\
 \frac{dx_4}{dt} &= R_{jp} x_2 - \frac{F_1 + F_2}{x_1} x_4 \\
 \frac{dx_5}{dt} &= \frac{F_2}{x_1} C_i^f - \frac{F_1 + F_2}{x_1} x_5 \\
 \frac{dx_6}{dt} &= -k_1 x_6 \\
 \frac{dx_7}{dt} &= k_2 (1 - x_7)
 \end{aligned} \tag{III.4}$$

Où, x_1 est le volume, x_2 , x_3 , x_4 et x_5 sont respectivement les concentrations en biomasse, substrat, protéine produite et en inducteur. x_6 correspond au facteur de choc d'inducteur sur la vitesse de croissance de la bactérie et x_7 au facteur de rétablissement d'inducteur sur la vitesse de croissance de la bactérie. Le débit d'alimentation de substrat est noté F_1 alors que celui de l'inducteur est F_2 . C_n^f représente la concentration en substrat du flux F_1 , alors que C_i^f est la concentration en inducteur du flux F_2 . μ est la vitesse spécifique de croissance de la bactérie, Y est le coefficient de rendement de croissance et R_{jp} représente la vitesse de production de la protéine. k_1 et k_2 correspondent respectivement aux paramètres de choc et de rétablissement de l'inducteur.

$$\begin{aligned}
 \mu &= \frac{x_3}{14,35 + x_3 + \frac{x_3^2}{111,5}} (x_6 + x_7 R_R) \\
 R_R &= \frac{0,22}{0,22 + x_5} \\
 R_{jp} &= \left(\frac{0,233 x_3}{14,35 + x_3 + \frac{x_3^2}{111,5}} \right) \left(\frac{0,0005 + x_5}{0,022 + x_5} \right) \\
 k_1 = k_2 &= \frac{0,09 x_5}{0,034 + x_5}
 \end{aligned} \tag{III.5}$$

Les valeurs des autres paramètres sont les suivantes : $C_i^f = 4,0$ g/L, $C_n^f = 100,0$ g/L et $Y = 0,51$.

La durée du procédé est fixée à 10h alors que les valeurs des débits sont soumises aux contraintes :

$$\begin{aligned}t_f &= 10h \\ 0 \leq F_1 &\leq 1,0 \text{ L/h} \\ 0 \leq F_2 &\leq 1,0 \text{ L/h}\end{aligned}\tag{III.6}$$

Les objectifs considérés dans cette publication sont :

- maximiser la quantité de protéine produite (I_1)
- minimiser le volume d'inducteur ajouté (I_2) pour des intérêts économiques

$$\begin{aligned}I_1 &= x_4(t_f) x_1(t_f) \\ I_2 &= \int_0^{t_f} F_2(t) dt\end{aligned}\tag{III.7}$$

Les conditions initiales de ce problème étant $x_1(0) = 1,0 \text{ L}$, $x_2(0) = 0,1 \text{ g/L}$, $x_3(0) = 40,0 \text{ g/L}$, $x_4(0) = 0,0 \text{ g/L}$, $x_5(0) = 0,0 \text{ g/L}$, $x_6(0) = 1,0 \text{ g/L}$ et $x_7(0) = 0,0 \text{ g/L}$

III.4.6.1.2. Résultat de l'optimisation dynamique multicritère

Pour vérifier notre outil d'optimisation dynamique multicritère (et ses différentes paramétrisations) avant de l'appliquer à notre problème de fermentation, les modes de paramétrisation des variables de commande ont été considérés dans le problème présenté ci-dessus :

- CPM avec des temps de bascule communs aux deux alimentations (ou une série de temps de bascule),
- CPM avec des séries de temps de bascule différentes pour les deux alimentations (ou deux séries de temps de bascule),
- LPM avec deux séries de temps de bascule et PP

Les fronts de Pareto obtenus pour ces différentes paramétrisations sont présentés sur la figure III.9 et comparés au front de Pareto déterminé dans la publication. Les résultats montrent que :

- les différentes paramétrisations conduisent à des résultats multicritères très voisins,
- le paramétrage avec des temps de bascule identiques pour les deux alimentations donne un front légèrement moins convexe,
- ces résultats sont comparables à ceux de Sarkar et Modak (2005), qui obtiennent pour les extrémités du front de Pareto une production de 6,004 g de protéine pour un volume de 0,104 L d'inducteur.

L'outil de résolution des problèmes d'optimisation dynamique est ainsi validé sur un cas académique. Il peut maintenant être adapté à notre propre problème de fermentation à cinq variables de commande.

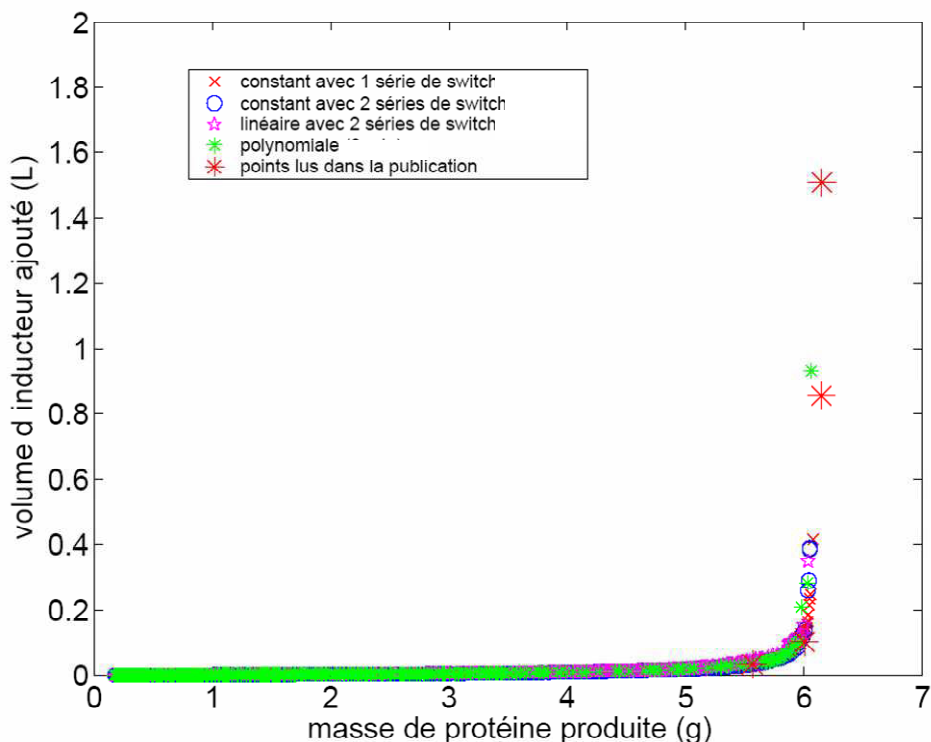


Figure III.9. Superposition des différents fronts de Pareto obtenus pour différents modes de paramétrisation et comparaison à un échantillonnage du front de Pareto de Sarkar et Modak (2005).

III.4.6.2. Optimisation dynamique multicritère de la croissance et de la vitesse moyenne de consommation de citrate

L'optimisation dynamique multicritère est maintenant appliquée au procédé de production d'arômes du beurre. Il s'agit de concilier les deux objectifs la maximisation de la concentration de biomasse en fin de fermentation (g/L) et la maximisation de la vitesse de consommation moyenne de citrate (g/L h).

La combinatoire des réglages et des choix pour définir et résoudre les problèmes d'optimisation dynamique multicritère est très étendue. Pour des raisons de temps, les résultats présentés se limitent à une illustration des solutions dynamiques multicritères et à une description des problèmes rencontrés lors de leur détermination.

L'analyse des résultats de l'optimisation dynamique monocritère a permis de mettre en évidence les effets de certains choix dans la définition du problème (paramétrisation, nombre de temps de bascule, position des temps de bascule prédéfinis,...) ainsi que dans le paramétrage de l'algorithme évolutionnaire (taille de la population dans l'algorithme, répétabilité,...). Dans cette dernière partie, nous avons décidé d'appliquer une paramétrisation de type constant par morceau (PCM) qui représente une solution sous-optimale acceptable et la plus rapide à déterminer. Pour simplifier l'analyse multicritère, nous avons choisi de traiter le cas où les temps de bascule sont prédéfinis et communs aux variables de commande. Enfin, la population de l'algorithme est fixée à 500 individus pour des raisons de temps de calcul.

Les résultats de l'optimisation sont présentés figures III.10 à III.13 et tableau III.10. La zone de Pareto déterminée par notre algorithme contient 500 points. Les solutions sont présentées en superposant l'ensemble des profils correspondants aux individus de la zone de Pareto. Les profils des concentrations sont présentés figures III.10, ceux des variables de commande (alimentation en lactose et citrate et conditions opératoires) figures III.11 et III.12. Le front de Pareto est décrit figure III.13 La tableau III.7 fournit les valeurs numériques des critères c_1 et c_2 pour les deux extrémités du Front de Pareto.

Tableau III.10. Optimisation dynamique multicritère du procédé discontinu alimenté. Valeurs des critères aux extrémités du front de Pareto.

	Optimisation CPM
c_1^{\max} (g/L)	21,7 g/L ($c_{1b}= 11$ g/L)
c_2^{\max} (g/L h)	39,36
Durée de l'optimisation (min)	625

En comparant les profils présentés dans la figure III.7, concernant l'optimisation dynamique monocritère du critère c_1 et ceux multicritères présentés figure III.10, on peut voir que le comportement cinétique de la bactérie change. En effet, pour le problème multicritère, on observe une quantité plus importante de lactose accumulé dans le milieu de culture, la cinétique de consommation du citrate est plus ralentie et le temps de latence est plus important.

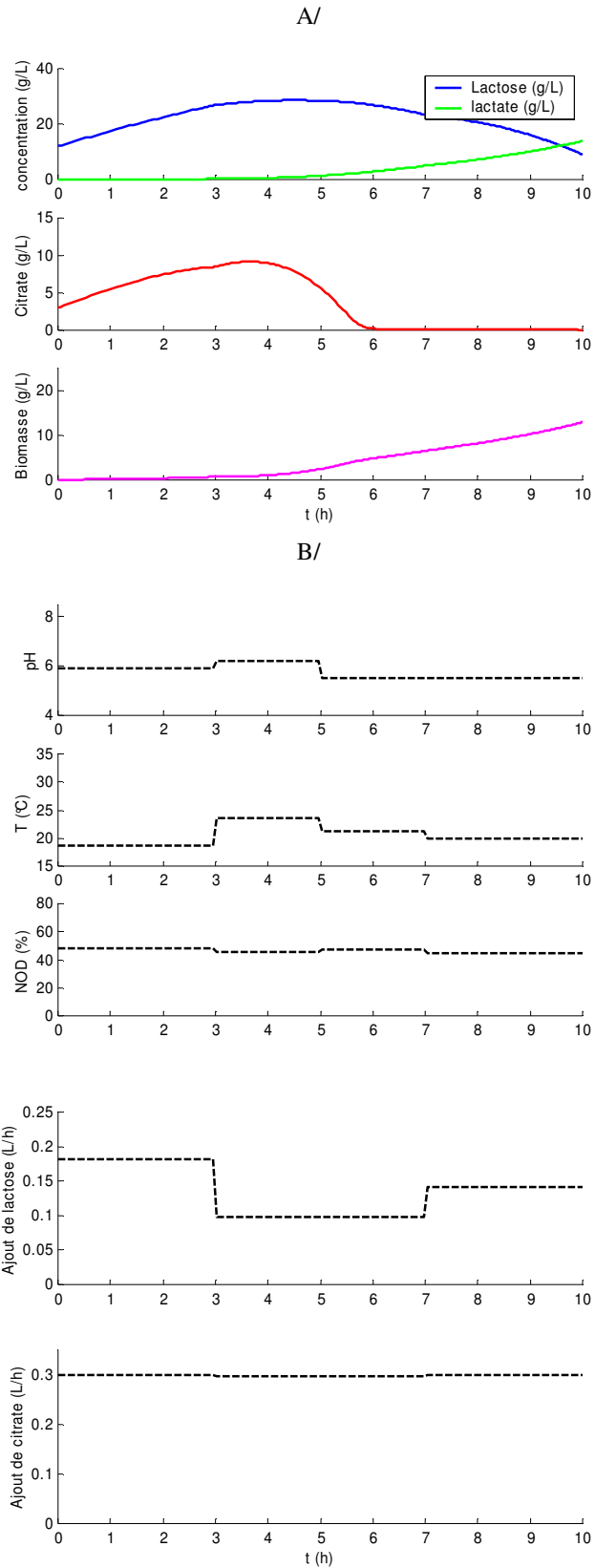


Figure III.10. Résultats de l'optimisation dynamique monocritère de c avec une paramétrisation CPM avec A/les profils d'état et B/ les profils des variables de commande (pH, T et NOD, F_{S1} et F_{S2}).

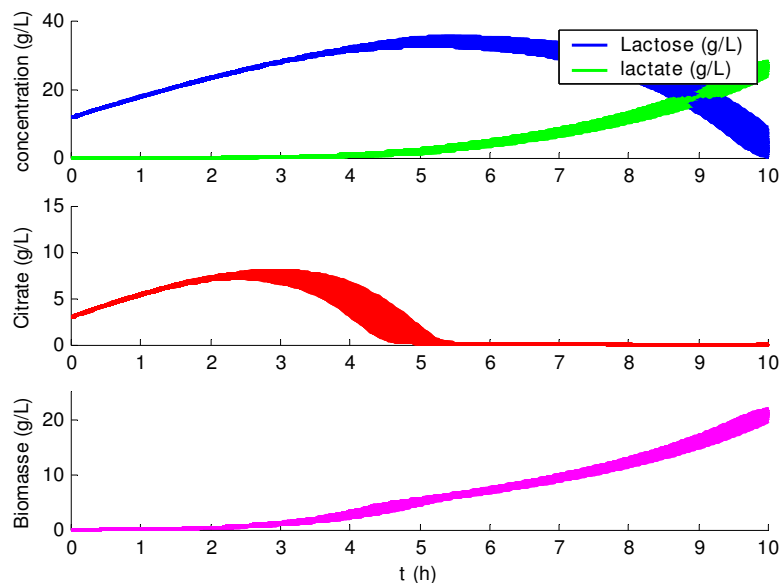


Figure III.11. Profils des concentrations en biomasse, lactose, citrate et lactate correspondant à la zone de Pareto pour une optimisation multicritère avec une paramétrisation PCM, trois temps de bascule fixés (3, 5 et 7 h) et une durée opératoire imposée $t_f = 10$ h.

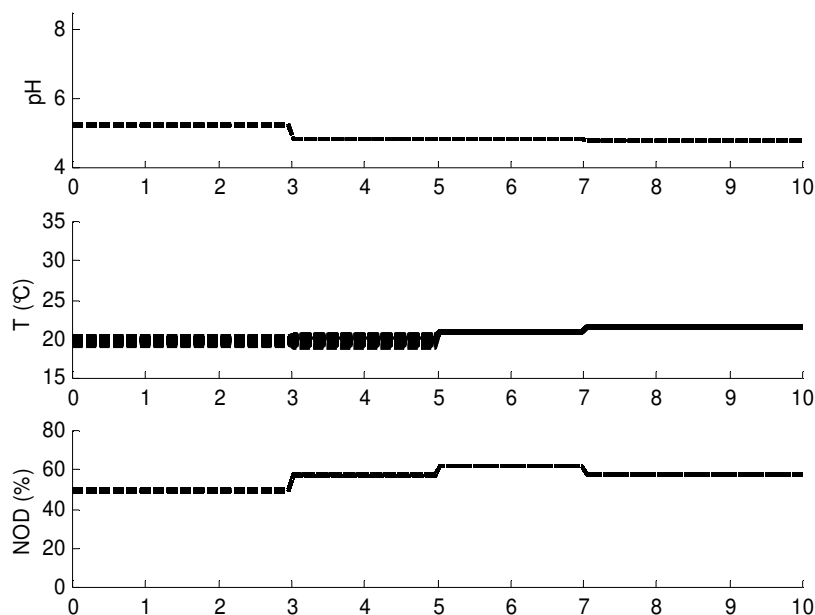


Figure III.12. Zone de Pareto « dynamique » pour une optimisation multicritère avec une paramétrisation PCM, 3 temps de bascule fixés (3, 5 et 7 h) et une durée opératoire imposée $t_f = 10$ h. Les profils d'alimentation de la zone de Pareto correspondent à une alimentation maximale pour le lactose (0,2 L/h)

comme pour le citrate (0,3 L/h).

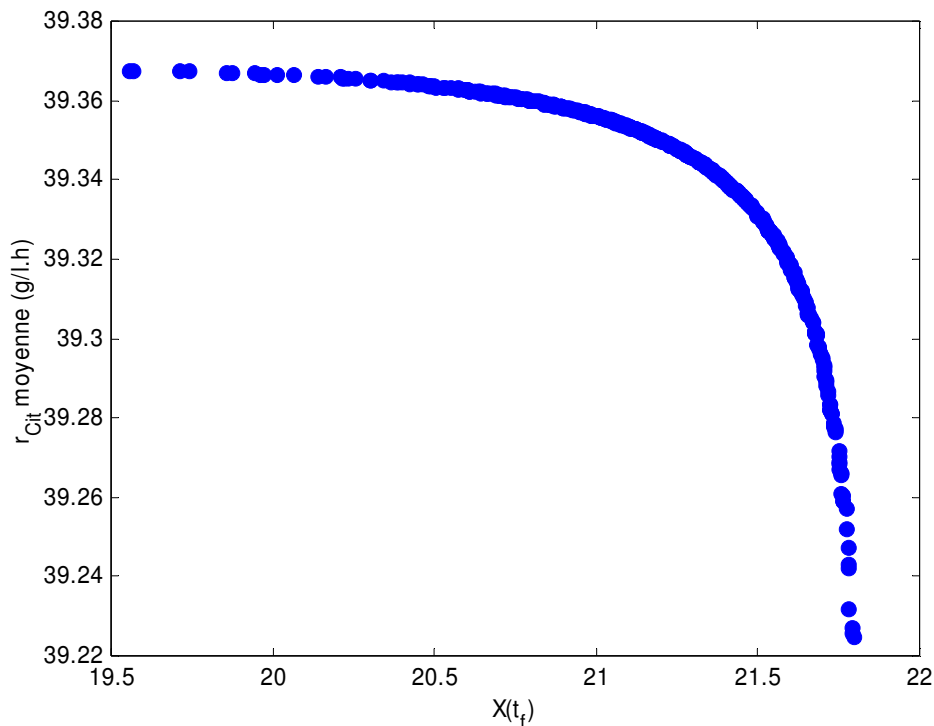


Figure III.13. Front de Pareto pour une optimisation multicritère avec une paramétrisation PCM, trois temps de bascule fixés (3, 5 et 7 h) et une durée opératoire imposée $t_f = 10$ h.

Les résultats du tableau III.10 montrent que les performances optimales en terme de maximisation de la concentration en biomasse identifiées au niveau du front de Pareto, sont meilleures que dans le cas monocritère. Cette différence n'est pas significative au sens physique du terme mais l'écart numérique observé doit être expliqué. Cette incohérence numérique a donc été l'objet de nombreuses vérifications tant au niveau de la programmation, qu'au niveau des méthodes de résolution des problèmes mono- et multicritère. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour justifier cet écart numérique. Toutefois, l'outil d'optimisation monocritère et multicritère a été volontairement programmé dans une même et unique version informatique. Les hypothèses liées à la programmation ou liées à une quelconque différence de méthodes numériques (intégration, discrétisation, paramétrisation,...) entre l'optimisation monocritère et multicritère peuvent être exclues.

L'incohérence observée pourrait être liée à une convergence vers une solution locale dans la résolution monocritère. Les propriétés de convergence de l'optimisation monocritère

ont été vérifiées. Les analyses de sensibilité ont montré que le problème dynamique, même mono critère, est difficile à résoudre mais que l'optimum est atteint. Toutefois, aucune garantie d'avoir atteint un optimum global pour chaque problème monocritère n'a pu être fournie. Les temps de calcul pour des populations supérieures à 2000 individus n'ont pas permis de lever cette incertitude.

La régularité du front de Pareto semble toutefois indiquer que la résolution problème dynamique multicritère est correcte. Par ailleurs, les autres résultats sont cohérents avec ceux de l'optimisation dynamique. Le caractère antagoniste des deux critères n'est pas très marqué. En effet, le front de Pareto ne s'étend pas sur une large amplitude verticale. Ceci confirme le fait que le critère c_2 est implicitement « bi-critère » puisqu'il sous-entend une optimisation croissance de la biomasse. Les profils multicritères de commande sont globalement très semblables pour les mêmes raisons.

On peut en conclure que le développement de l'outil dynamique multicritère est satisfaisant. Même si les résultats obtenus ne sont cependant pas satisfaisants. En effet, ces résultats sont conditionnés par les limites du modèle développé et par la formulation du problème à résoudre qui dépend lui aussi des capacités du modèle à prédire des critères antagonistes.

Conclusion Générale

Ce travail a permis de voir aboutir les différents objectifs de cette étude à savoir :

- utilisation de la stratégie expérimentale multicritère afin d'explorer un domaine expérimental le plus large possible tout en minimisant le nombre d'expériences réalisées. Puis, le plan d'expériences multicritère se devra d'être complété afin d'obtenir le maximum d'informations sur le métabolisme des bactéries concernant les deux phases antagonistes, la croissance et la production de métabolites d'intérêt tel le diacétyle.
- réalisation d'une analyse pertinente du comportement métabolique de la souche bactérienne étudiée afin de déceler les effets combinés des facteurs opératoires (pH, température, et TOD) sur la croissance et l'orientation du flux carboné vers les différentes voies métaboliques et ce, en mode discontinu et discontinu alimenté.
- proposition d'un modèle tenant compte de l'effet combiné des paramètres opératoires sur la croissance, la consommation de substrats et la production d'acide lactique. Ce modèle, se doit d'être le plus représentatif du comportement bactérien et le plus simple possible puisqu'il doit servir de base à l'optimisation dynamique multicritère. La modélisation cinétique de la production de diacétyle ne sera pas prise en compte dans cette étude à la suite de la contrainte « temps ».
- développement d'un outil d'optimisation dynamique multicritère, afin de pouvoir optimiser le procédé de fermentation lactique. Son étude théorique, basée sur l'utilisation du modèle précédemment obtenu, concernera des alimentations en substrats et la détermination de profils des facteurs opératoires.

De ces objectifs découlent les éléments qui suivent.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'identification d'un plan d'expérience compromis entre les deux critères : D-optimalité et conditionnement de la matrice de Fischer. La mise en place de ce plan d'expériences a permis d'explorer un domaine expérimental plus large que dans les précédentes études et ce afin de déceler d'éventuelles interactions et de prévenir les risques d'accidents de fermentation en ligne. De ce fait, les résultats statiques obtenus, ont permis d'établir des corrélations en terme de vitesse maximale spécifique de croissance, de rendements de production de biomasse par rapport à la consommation de substrats et de production de diacétyle en fonction des facteurs opératoires étudiés, à savoir le pH, la température et le pourcentage d'oxygène dissous.

Dans un second temps, une analyse approfondie des expériences réalisées en mode discontinu, a permis de confirmer les observations en terme d'effets des facteurs opératoires considérés séparément sur la croissance et la production de diacétyle. Aussi, cette analyse a conduit à mettre en évidence certains comportements originaux de la souche étudiée qui, placée à pH 8 et à 16 °C en absence d'aération ne croît pas et ne consomme pas les substrats alors qu'en présence d'aération elle se multiplie et produit de l'acide lactique. Par conséquent, cette partie de l'étude a permis de mettre en évidence l'effet combiné des conditions opératoires sur le métabolisme de la bactérie. Afin de valider ces observations et de passer à une échelle de réacteur plus importante, nous avons réalisé des expériences en discontinu alimenté.

A partir des résultats obtenus, un modèle cinétique simple a été développé pour un mode discontinu avec prise en compte des effets des facteurs opératoires sur la consommation de substrats, la croissance et la production de lactate. Ensuite, ce modèle a été transposé aux fermentations discontinues alimentées (alimentation par pulses ou alimentation en continu), tout en y apportant des modifications dues à l'effet de perturbations engendrées soit par les ajouts ponctuels de substrats, soit par les alimentations continues en milieu de culture et substrats. Il s'est alors avéré que, pour les expériences conduites en discontinu alimenté avec des ajouts continus de lactose et de citrate, la vitesse spécifique de consommation de lactose augmente lorsque le débit d'alimentation de lactose est réduit ; on assiste à une inhibition de la consommation du lactose par un excès de lactose et on se rend compte que la vitesse spécifique de consommation du citrate diminue au cours du temps lorsque, en mode discontinu alimenté, les paramètres opératoires du milieu sont modifiés. Néanmoins, vu la complexité du procédé, la modélisation cinétique de la production de diacétyle n'a pu être réalisée avec suffisamment de précision. Cependant, à partir des résultats des fermentations obtenus en mode discontinu alimenté avec une alimentation continue en substrat, nous avons pu observer qu'il était possible d'augmenter la production de diacétyle en alternant progressivement entre des phases de croissance et des phases de production de diacétyle pour lesquelles les conditions opératoires retenues en termes de pH, température et TOD sont, respectivement 6,5, 30 °C et 35 % et 4, 16° C et 70 %.

Ce modèle a ensuite été intégré à l'outil d'optimisation dynamique multicritère. Les optimisations appliquées concernent les débits d'alimentation de deux substrats distincts (milieu Y avec le citrate comme unique source de carbone et une solution concentrée en lactose), ainsi que les profils des facteurs opératoires (pH, température et oxygène dissous) ; le procédé de fermentation a été optimisé suivant deux critères à maximiser qui sont :

- $c1$: la concentration de biomasse en fin de fermentation (g/L),
- $c2$: la vitesse de consommation moyenne de citrate (g/L.h).

La définition de ce deuxième critère est dictée par le fait que la production de diacétyle est liée à la vitesse de consommation du citrate. Ainsi, l'absence, dans le modèle actuel, d'équations décrivant la production de diacétyle, ne permet pas de définir le problème multicritère où la croissance des bactéries est mise en compétition avec la production du métabolite secondaire.

Pour l'étude de l'optimisation, nous avons adopté une méthode progressive, c'est-à-dire à complexité croissante. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'optimisation monocritère et statique, puis à l'étude de l'optimisation dynamique monocritère, pour laquelle un certain nombre de paramétrisations a été essayé ; les profils étudiés ont été tout d'abord constants par morceaux, puis linéaires par morceaux et pour finir polynomiaux. Nous avons alors constaté que les profils linéaires sont les plus difficiles à programmer et qu'ils nécessitent un temps d'optimisation plus long, alors que leurs résultats ne sont pas sensiblement meilleurs que pour les profils constants par morceaux. Par contre, les profils polynomiaux se sont démarqués des autres par le fait qu'ils semblent augmenter la vitesse de convergence, ce qui augmente leur finesse ; néanmoins, d'un point de vue pratique, ils restent difficilement applicables. Nous avons également observé que, plus le degré de liberté apporté au système était grand, plus les temps de calculs devenaient longs. Ensuite, l'étude s'est étendue à l'optimisation dynamique multicritère, pour laquelle les temps de calcul ont été très longs. Aussi, nous avons remarqué que, pour une des performances, l'optimisation dynamique multicritère fournissait des résultats meilleurs que l'optimisation dynamique monocritère ; ceci ne peut être validé dans la pratique, mais s'expliquerait par le fait que l'AGE se soit arrêté sur un optimum local.

A l'issue de cette étude, il apparaît que les temps de calculs obtenus ne sont pas compatibles avec une application « en ligne », c'est-à-dire pour la détermination d'une trajectoire optimale dynamique ou pour que, en cas de perturbation du système, l'optimisateur puisse recalculer les solutions multicritères dynamiques afin de suivre la nouvelle trajectoire optimale en terme de (pH, T, NOD et substrats). Les ODM réalisées ont été faites à partir d'une population aléatoire, sans aucune information sur la zone où se trouvent les solutions « compromis ». Il serait alors plus judicieux, de partir d'une population non dominée, au lieu d'une population aléatoire.

Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus ouvre un champ de perspectives d'études assez large ; ainsi il serait nécessaire de réaliser une étude complémentaire sur le comportement physiologique de cette souche en discontinu alimenté en apportant uniquement, soit des perturbations au niveau de l'alimentation en substrats, soit des perturbations en terme de facteurs opératoires.

Ensuite, il faudra compléter le modèle par une partie basée sur des phénomènes enzymatiques pour expliquer l'orientation des flux carbonés et la production de diacétyle par la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Pour terminer, la méthodologie appliquée doit être complétée par des applications de l'optimisation sur des populations de l'AGE plus importantes, puis validée expérimentalement en définissant les profils d'alimentation en substrats et les profils des facteurs opératoires tout au long de l'expérience.

ANNEXE A-1:

Description du problème d'optimisation dynamique multicritère

$$\underset{pH(t), T(t), NOD(t), F_{S1}(t), F_{S2}(t)}{\text{Max}} \quad c1 = X(t_f)$$

$$\underset{pH(t), T(t), NOD(t), F_{S1}(t), F_{S2}(t)}{\text{Max}} \quad c2 = \bar{q}_{Cit} = \frac{1}{t_f} \int_0^{t_f} (q_{Cit}'' X V) dt$$

Soumis à :

$$\frac{dS1}{dt} = -q_{S1} X$$

$$\frac{dS2}{dt} = -q_{S2} X$$

$$\left[\begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = -Y_{X/S1} (q_{S1} + q_{S2}) X - Kd1 X \quad \text{if } S1 > 2g/L \\ \frac{dX}{dt} = -Y_{X/S1} (q_{S1} + q_{S2}) X - Kd2 X \quad \text{if } S1 \leq 2g/L \end{array} \right.$$

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S1} q_{S1} X$$

$$\text{Avec, } q_{S2} = q_{\max S2} \left(\frac{S2}{Ks2 + S2} \right) \left(\frac{S1}{Ks12 + S1} \right)$$

et

$$V(t_f) \leq 18 L$$

$$4 \leq pH(t) \leq 8$$

$$16 \leq T(t) \leq 30 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$0 \leq NOD(t) \leq 70 \text{ } \%$$

$$0 \leq F_{S1}(t) \leq 0,2 L/h$$

$$0 \leq F_{S2}(t) \leq 0,3 L/h$$

Dans le cas où les débits varient sous forme constant par morceau, chaque transition perturbe les paramètres cinétiques par une action de type réponse d'un système d'ordre 1 à un échelon :

$$\text{if } t > t_{Fed} \quad Y_{X/S1} = Y_{X/S1} \left(1 - 0.95 e^{\left(\frac{t-t_{Fed}}{\tau} \right)} \right)$$

Références bibliographiques

Altaba S., 1991.

Production d'acide lactique en culture continue à haute densité cellulaire dans un bioréacteur à membrane : cinétique, modélisation et analyse économique. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.*

Amiel C., Marley L., Denis C., Pichon P. et Travert J., 2001.

FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria. *Lait*, 81, 249-255.

Anders R.F., Jonas H.A. et Jago G.R., 1970.

A survey of the lactate dehydrogenase activities in group N *streptococci*. *Aust. J. Dairy Technol.*, 19, 73-76.

Audet P., Paquin C. et Lacroix C., 1988.

Immobilized growing lactic acid bacteria with carragenan - locust bean gum gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 11-18.

Audet P., St-Gelais D. et Roy D., 1995.

Production of mixed cultures of non-isogenic *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* using immobilized cells. *Milchwissenschaft*, 50, 18-22.

Aymes F., Monnet C. et Corrieu G., 1999.

Effect of α -acetolactate decarboxylase inactivation on α -acetolactate and diacetyl production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 87-92

Bailey J.E., 1998.

Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Prog.*, 14, 8-20.

Bandell M., Lhotte M.E., Marty-Teyssset C., Veyrat A., Prévost H., Dartois V., Diviès C., Konings W.N. et Lolkema J.s., 1998.

Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1594-1600.

Banga J.R., Balsa-Canto E., Moles C.G. et Alonso A.A., 2003a.

Improving food processing using modern optimization methods. *Food Sci. Technol.*, 14, 131-144.

Banga J.R., Balsa-Canto E., Moles C.G. et Alonso A.A., 2003b.

Dynamic optimization of bioreactors- a review. *Proc. Int. Natl. Acad. Sci.* 69, 257-265.

Banga J.R., Balsa-Canto E., Moles C.G. et Alonso A.A., 2005.

Dynamic optimization of bioprocesses: Efficient and robust numerical strategies. *J. Biotechnol.*, 117, 407-419.

Bassit N., Latrille E., Boquien C.Y., Picque D., Corrieu G., 1994.

Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoïne par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. *Lait*, 74, 115-126.

Baudy B., 1984.

Modélisation et biotechnologies. *Biofutur*, 25, 55-56.

Beasley D., Bull D.R., et Martin R.R., 1993.

An overview of genetic algorithms: part I, fundamentals, *University Computing*, 15, 58-59.

Bellman R., 1957.

Dynamic programming, Princeton Univ. Press.

Benson K.H., Godon J.J., Renault P., Griffin H.G. et Gasson M.J., 1996.

Effect of *ilvBN*-encoded alpha-acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1-2, 107-111.

Bernard O., 2004.

La modélisation des systèmes biologiques : Allers-retours le long des fleuves qui circulent entre l'océan du réel et le lac des modèles. Habilitation à diriger des recherches, Université de Nice-Sophia-Antipolis.

Beveridge G.S.G. et Schechter R.S., 1970.

Optimization: theory and practice. Ed. McGraw-Hill, Chemical Engineering Series New York.

Bibal B., Vayssier Y., Goma G. et Pareilleux A., 1991.

High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor. Biotechnol. Bioeng., 37, 746-754.

Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weis-senbach J., Ehrlich S. D., et Sorokin A., 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res., 11, 731-753.

Boonmee M., Leksawasadi N., Bridge W. et Rogers P.L., 2003.

Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. Biochem. Eng. J., 14, 127-135.

Boumerdassi H., Desmazeaud M., Monnet C., Boquien C-Y. et Corrieu G., 1996. Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control. J. Dairy Sci., 79, 775-781.

Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M. et Corrieu G., 1997a.

Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen. J. Dairy Sci., 80, 634-639.

Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M. et Corrieu G., 1997b.

Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. Appl. Environ. Microbiol., 63, 2293-2299.

Boyaval P., 1994.

Fermentation lactique continue. Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques, éd. Loriga, Uriage, vol. 2/2, 505-517.

Braegger C., 2002. Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aiguë chez l'enfant. Paediatrca, 13, 50-53.

Britton L., Malinowski D.P. et Fridovich I., 1978.

Superoxide dismutase and oxygen metabolism in *Streptococcus faecalis* and comparison with other organisms. J. Bacteriol., 134, 229-236.

Bruhn J.C. et Collins E.B., 1970.

Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase of *Streptococcus diacetylactis*. J. Dairy Sci., 53, 857-860.

Cachon R. et Diviès C., 1993a.

A descriptive model for citrate utilization by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*. Biotechnol. Lett., 15, 837-842

Cachon R. et Diviès C., 1993b.

Modeling of growth and lactate fermentation by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 28-33.

Cachon R., Daniel S. et C. Diviès C., 1995.

Proton-dependent kinetics of citrate uptake in growing cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. FEMS Microbiol. Lett., 131, 319-323.

Carroll N., Ross R., Kelly S., Price N., Sheenan D. et Cogan T., 1999.

Characterization of recombinant acetolactate synthase from *Leuconstoc lactis* NCW1. Enz. Microb. Technol., 25, 61-67.

Champagne C.P., 1992.

Effect of penicillin on free or immobilized lactococci: milk acidification and residual antibiotic level. *J. Food Safety*, 12, 327-339

Champagne C.P., Girard F. et Gardner N., 1989.

Growth of yeast contaminants in an immobilized lactic acid bacteria system. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 207-210.

Champagne C.P., Lacroix C. et Sodini-Gallot I., 1994.

Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14, 109-134.

Champagne C.P., Morin N., Couture R., Gagnon C., Jelen P. et Lacroix C., 1992.

The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Res. Inter.*, 25, 419-427.

Chen L., Nguang S.K., Chen X.D. et Li X.M., 2004.

Modelling and optimization of fed-batch fermentation processes using dynamic neural networks and genetic algorithms. *Biochem. Eng. J.*, 22, 51-61.

Chinachoti N., Zaima T., Matsusaki H., Sonomoto K., Ishisaki A., 1997.

Relationship between fermentative production and aeration condition using *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Fac. Agric. Kyushu. Univ.*, 43, 421-436.

Chouakri N., 1993.

Identification des paramètres d'un modèle de type Monod à l'aide d'un réseau de neurones artificiels. Thèse : Biotechnologies et Industries Alimentaires, I.N.P.L.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P. et Lindley N.D., 1996.

Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 70, 253-267.

Coello C.C.A. et Christiansen A.D., 1999.

MOSES: A multi-objective optimization tool for engineering design. *Engineering Optimization*, 31, 337-368.

Coello C.C.A., 1999.

A comprehensive survey of evolutionary-based multi-objective optimization techniques. *Knowledge and Information Systems: An international journal*, 1, 269-308.

Cogan T. M., 1980.

Les levains lactiques mésophiles. *Lait*, 60, 397-425.

Cogan T.M., 1981.

Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis. *J. Dairy Res.*, 48, 489-495

Cogan T. M., Fitzgerald R. J. et Doonan S., 1984.

Acetolactate synthase of *Leuconostoc lactis* and his regulation of acetoin production. *J. Dairy Res.*, 51, 597-604.

Cogan T.M., 1987.

Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 551-558.

Collins E.B., 1972.

Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 55, 1022-1028.

Condon S., 1987.

Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 269-280.

Crow V.L. et Pritchard G.G., 1977.

Fructose 1,6-Diphosphite-Activated L-Lactate Dehydrogenase from *Streptococcus lactis*: Kinetic properties and factors affecting activation. *J. Bacteriol.*, 131, 82-91.

Crow V.L. et Thomas T.D., 1984.

Properties of *Streptococcus lactis* strain that ferments lactose slowly. J. Bacteriol., 157, 28-34.

Culioli J.C., 1994.

Introduction à l'optimisation. Ellipses, Ecoles des Mines Paris. Ed. Marketing, Paris.

Curic M., Stuer-Lauridsen B., Renault P. et Nilsson D., 1999.

A general method for selection of alpha-acetolactate decarboxylase-deficient *Lactococcus lactis* mutants to improve diacetyl formation. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1202-1206.

Daroux M. et Latifi M.A., 2001.

Revue des méthodes d'optimisation globale en génie des procédés : Application au calcul des équilibres entre phases. Récents Progrès en Génie des Procédés : Information, Modélisation, Simulation et Optimisation. SFGP, 15, ed. Lavoisier Techniques et Documentation, Paris.

Das I. Et Dennis J., 1997.

A closer look at drawbacks of minimizing weighted sums of objectives for Pareto set generation in multi-criteria problems. Structural Optimization, 14, 63-69.

De Vos W. M. et Hugenholtz J., 2004.

Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. Trends Biotechnol., 22, 72-79.

De Vos W. M. et Vaughan E.E. 1994

Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 15, 217-237.

De Vos W.M., Boerrigter I., Van Roooyen R.J., Reichr B. et Hengstenberg W., 1990.

Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem., 265, 22554-22560.

Deb K., Pratap A., Agarwal S. Et Meyarivan T., 2002.

A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. IEEE transactions on evolutionary computation 6: 182-197.

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M. C. et Janssens D., 1994.

Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, éd. Loriga, Uriage, vol 1/2, 26-48.

Desmazeaud M. J., 1983.

L'état de connaissance en matière de nutrition des bactéries lactiques. Lait, 63, 267-316.

Desmazeaud M. J., 1994.

Le lait, milieu de culture. Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, éd. Loriga, Uriage, vol 2/2, 25-36.

Desmazeaud M.J. et De Roissart H., 1994.

Métabolisme général des bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, éd. Loriga, Uriage, vol 1/2, 169-207.

Dietz A., Azzaro-Pantel C., Pibouleau L. et Domenech S., 2005.

A framework for multiproduct batch plant design with environmental considerations: Application to protein production. Ind. Eng. Chem. Res., 44, 2191-2206.

Dietz A., Azzaro-Pantel C., Pibouleau L. et Domenech S., 2006.

Multiobjective optimization for multiproduct batch plant design under economic and environmental considerations. Comp. Chem. Eng., 30, 599-613.

Diviès C., Frey L., Hubert J. C., De Roissart H., 1994.

Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, éd. Loriga, Uriage, vol 2/2, 294-301.

Doleyres Y. et Lacroix C., 2005.

Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. Int. Dairy J., 15, 973-988.

Doleyres Y., Fliss I. et Lacroix C., 2004a.

Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. Biotechnol.Prog., 20, 145-150.

Doleyres Y., Fliss I. et Lacroix C., 2004b.

Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. J. Appl. Microbiol., 97, 527-539.

Drider D., Bekal S. et Prévost H., 2004.

Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. Genet. Mol. Res., 3, 273-281.

Duwat P., Cesselin B., Sourice S. et Gruss A., 2000.

Lactococcus lactis, a bacterial model for stress responses and survival. Int. J. food Microbiol., 55, 83-86.

Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubière et Gruss A., 2001.

Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. J. Bacteriol., 183, 4509-4516.

Even S., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. et Coccain-Bousquet, 1999.

Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. Metabolic Eng., 1, 198-205.

Fonseca C.M. et Fleming P.J., 1993.

Genetic algorithms for multiobjective optimization: Formulation, discussion and generalization, in genetic algorithms: Proceedings of the fifth International Conference, S. Forrest, ed. San Mateo.

Fonseca C.M. et Fleming P.J., 1995.

Multi-objective genetic algorithm made easy: selection, sharing and mating restriction. International Conference on Genetic Algorithm in Engineering System: Innovations and application, 12-14, UK.

Fonteix C., Bicking F., Perrin E. et Marc I., 1995.

Haploid and diploid algorithms, a new approach for global optimization: compared performances. Int. J. Systems Sci., 26, 1919-1933.

Foulds L.R., 1981.

Optimization techniques, An introduction. Ed. Springer Verlag, New York, Inc.

Fournier F., Latifi M.A. et Valentin G., 1999.

Methodology of dynamic optimisation and optimal control of batch electrochemical reactors. Chem. Eng. Sci., 54, 2707-2714.

Freeman A. et Lilly M., 1998.

Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. Enz. Microbial Technol., 23, 335-345.

García-Quintáns N., Magni C., De Mendoza D. et López P., 1998.

The citrate transport system of *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* is induced by acid stress. Appl. Environ. Microbiol., 64, 850-857.

Garg S. et Gupta S.K., 1999.

Multiobjective Optimization of a Free Radical Bulk Polymerization Reactor Using Genetic Algorithm. *Macromol. Theory Simul.*, 8, 46-53.

Garrigues C., Goupil-Feuillerat N., Cocaign-Bousquet M., Renault P., Lindley N. D. et Loubiere P., 2001. Glucose metabolism and regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* strains with decreased lactate dehydrogenase activity. *Metab. Eng.*, 3, 211-217.

Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D. and Cocaign-Bousquet M., 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.*, 179, 5282-5287.

Gasser F., Montel M.C., et Champomier M., 1994. Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éd. Loriga, Uriage, vol 1/2, 117-139

Gasson M.J., 1993. Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12,3-20.

Gasson M.J., Benson K., Swindell S. et Griffin H., 1996. Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Le lait*, 1-2, 33-40.

Gilliland S.E., 1985. Role of starter culture bacteria in food preservation. *Bacterial starter cultures for food*, éd. Gilliland SE CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 175-185.

Goldberg D.E., 1989. Genetic algorithms in search, optimization and machine learning. Ed. Addison-Wesley Publishing Compagny.

Goldberg D.E., 1991. A comparative analysis of selection schemes used in genetic algorithms. In Gregory Rawlins, éd. *Foundations of Genetic Algorithms*. San Mateo, CA: Morgan Kaufmann Publishers.

Goldberg D.E., 1994. Algorithmes génétiques, exploration, optimisation et apprentissage. Ed. Addison-Wesley France.

Goupil N., Corthier G., Ehrlich S. D, et Renault P., 1996. Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2636-2640.

Goupil-Feuillerat N., Godon J. J., Cocaign-Bousquet M., Ehrlich S. D., et Renault P., 1997. Dual role of alpha-acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.*, 179, 6585-6593.

Grossiord B., Luesink E. J., Vaughan E.E., Arnaud A. et De Vos W.M., 2003. Characterization, expression and mutation of the *Lactococcus lactis* galPMKTE genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. *J. Bacteriol.* 185, 870-878.

Grossiord B., Vaughan E.E., Luesink E.J. et De Vos W.M., 1998. Genetics of galactose utilization via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Lait*, 78, 77-84.

Guardia M.J., Gambhir A., Europa A.F., Ramkrishna D. et Hu W.S., 2000. Cybernetic modeling and regulation of metabolic pathways in multiple steady states of hybridoma cells. *Biotechnol. Prog.*, 16, 847-853.

Gutierrez N.A., Debarr A.D. et Maddox I.S., 1996. Production of diacetyl from whey permeate using *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 183-184.

Halsall-Whitney H., Taylor D. et Thibault J., 2003. Multi_criteria optimization of gluconic acid production using net flow. *Bioproc. Biosys. Eng.*, 25, 299-307.

Harvey R. J. et Collins E. B., 1961.

Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. J. Bacteriol., 82, 954-959.

Harvey R.J. et Collins E.B., 1962.

Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*. J. Bacteriol., 83, 1005-1009.

Henriksen C.M., Nilsson D., Hansen S. et Johansen E., 1999.

Industrial applications of genetically modified microorganisms : gene technology at Chr. Hansen A/S. Int. Dairy J., 9, 17-23.

Himmelblau D.M., 1972.

Applied nonlinear programming. Ed. McGraw-Hill, Inc, New York.

Hoefnagel M.H.N., Starrenburg M.J.C., Martens D.E., Hugenholtz J., Kleerebezem M., Van Swam I.I., Bongers R., Westerhoff H.V. et Snoep J. L., 2002.

Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modeling, metabolic control and experimental analysis. J. Microbiol., 148, 1003-1013.

Holland J.H., 1975.

Adaptation in Natural and Artificial Systems. Ed. Ann Arbor, University of Michigan Press.

Horn J., Nafpliotis N., et Goldberg D.E., 1994.

A Niche Pareto GenetiC Algorithm for Multiobjective Optimization. Proceedings of the first IEEE Conference on Evolutionary Computation, 1, 82-87.

Hosono A., Wardojo R. et Otani H., 1990.

Binding of amino acid pyrolysates by lactic acid bacteria isolated from Dadih. Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie, 23, 149-153.

Hubert P., 1996.

Définition du modèle. Dictionnaire français d'hydrologie, ed. Comité National Français des Sciences Hydrologiques Commission de terminologie.

Hugenholtz J. et Kleerebezem M., 1999.

Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of the pathway rerouting involved in food fermentations. Curr. Opin. Biotechnol., 10, 492-497.

Hugenholtz J., 1993.

Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12, 165-178.

Hugenholtz J., Kleerebezem M., Starrenburg M., Delcour J., De Vos W. et Hols P., 2000.

Lactococcus lactis as a cell factory for high-level diacetyl production. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4112-4114

Hugenholtz J., Perdon L. et Abee T., 1993.

Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. Appl. Environ. Microbiol., 59, 4216-4222.

Ibrahim M., Briandet R., Mistou M.Y., Chrétien A., Tremblay J. et Kulakauskas S., 2004.

Immobilisation des lactocoques. Lait, 84, 103-114.

Ignizio J.P., 1981.

The determination of a subset of efficient solutions via goal programming. Comp. Op. Res., 3, 9-16.

Jensen NBS, Jokumsen KV et Villadsen J., 1999.

Determination of the phosphorylated sugars of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Lactococcus lactis* using a fast sampling technique and solid phase extraction. Biotechnol. Bioeng., 63, 356-362.

Johnson A., 1987.

The control of fed-batch fermentation processes-a survey. *Automatica* 23, 691-705.

Jonas H.A., Anders R.F. et Jago G.R., 1972.

Factors affecting the activity of the lactate deshydrogenase of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.*, 111, 397-403.

Katsogiannis A.N., Kornaros M.E. et Lyberatos G.K., 1999.

Adaptive Optimization of a Nitrifying sequencing batch reactor. *Wat. Res.*, 33, 3569-3576.

Kearney L., Upton M. et McLaughlin A., 1990.

Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium alginate beads incorporating cryoprotectants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3112-3116.

Kim H.S., Kamara B.J., Good I.C et Enders G.L., 1988.

Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol.*, 3, 253-257.

Kiranoudis C.T. et Markatos N.C., 2000.

Pareto design of conveyor-belt dryers. *J. Food Eng.*, 46, 145-155.

Kirk D., 1970.

Optimal Control Theory, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.

Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A., Breidt F., Broadbent J., Cano R., Chaillou S. et al., 2002.

Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 29-58.

Klamt S., Schuster S. et Gilles E.D., 2002.

Calculability analysis in underdetermined metabolic networks illustrated by a model of the central metabolism in purple nonsulfur bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 734-751.

Klaver F.A.M., Kingma F., Timmer J.M.K et Weerkamp A.H., 1992.

Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermenter: buttermilk. *Neth. Milk Dairy J.*, 46, 19-30.

Kleerebezem M. et Hugenholtz J., 2003.

Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14, 232-237.

Kleerebezem M., Boels I.C., Groot M.N., Mierau I., Sybesma W. et Hugenholtz J., 2002.

Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *J. Biotechnol.*, 98, 199-213.

Knowles J.D. et Corne D.W., 2000.

Approximating the Nondominated Front Using the Pareto Archived Evolution Strategy. *Evolutionary Computation* 8: 149-172.

Konings W. N., Poolman B., Driessen A. J. M., Smid E. J. et Molenaar D., 1994.

Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, édition Loriga, Uriage, vol 1/2, 209-238.

Lamboley L., Lacroix C. et Champagne J.C., 1997.

Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. *Biotechnol. Bioeng.*, 56, 502-516.

Lees G.J., et Jago G.R., 1978.

Role of acetaldehyde in metabolism : the metabolism of acetaldehyde in cultured Dairy products. *J. Dairy Sci.*, 61, 1216-1224.

Lopez de Felipe F. et Hugenholtz J., 1999.

Pyruvate flux Distribution in NADH-Oxidase-Overproducing *Lactococcus lactis* strain as A function of culture conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179, 461-466.

Lopez de Felipe F., Kleerbezem M., De Vos W.M. and Hugenholtz J., 1998.

Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. J. Bacteriol., 180, 3804-3808.

Lopez de Felipe F., Starrenburg M. et Hugenholtz J., 1997.

The Role Of nADH-oxidation In Acetoin And Diacetyl Production From Glucose In *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* MG 1363. FEMS Microbiol. Lett., 156, 15-19.

Loubière P., Novak L., Cocaign-Bousquet M. et Lindley N.D., 1996.

Besoins nutritionnels des bactéries lactiques : interactions entre flux de carbone et d'azote. Le lait, 1-2, 5-12.

Mac Kay L.L., Walter L.A., Sandrine W.E., Elliker P.R., 1969.

Involvement of phosphoenolpyruvate in lactose utilization by group N streptococci. J. Bacteriol., 99, 603-610.

Magni C., De Mendoza D., Konnings W.N. et Lolkema J.S., 1999.

Mechanism of citrate Metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against Lactate Toxicity at Low pH. J. Bacteriol., 181, 1451-1457.

Magni C., Lopez P. et De Mendoza D., 1996.

The properties of citrate transport catalysed by Cit P of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis*. FEMS Microbil. Lett., 142, 265-269.

Magoulas G.D., Eldabi T. et Paul R.J., 2002.

Adaptive stochastic search methods for parameter adaptation of simulation models. Intelligent Systems, Proceedings, First international IEEE symposium, 2, 23-27.

Maouche S., Bounsaythip C.K. et Roussel G., 2000.

Optimisation du placement des formes irrégulières. Ed. Techniques de l'ingénieur, S 7 212, 1-17.

Marshall V.M.E. et Law B.A., 1984.

The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk, éd. Elsevier Applied Science Publishers, vol 1/1, 67-98.

Massebeuf S., 2000.

Optimisation multicritère de procédés discontinues d'homopolymérisation et de copolymérisation en émulsion. Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.

Melchiorson C.R., Jensen N.B.S., Christensen B., Jokumsen K.V. et Villadsen J., 2001.

Dynamics of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. Biotechnol. Bioeng., 74, 271-279.

Melchiorson C.R., Jokumsen K.V., Villadsen J., Israelsen H. et Arnau J., 2002.

The level of pyruvate-formate lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation in *Lactococcus lactis*.

Melchiorson C.R., Jokumsen K.V., Villadsen J., Johnsen M.G., Israelsen H. et Arnau J., 2000.

Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol., 182, 4783-4788.

Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J.J., Le Loir Y., Oliveira S.C., Langella P. et Azevedo V., 2003.

Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. Genet. Mol. Res., 2, 348-359.

Modak J., Deckwer W.D. et Zeng A.P., 2002.

Metabolic control analysis of \square ukaryotic Pyruvate dehydrogenase Multienzyme complex. Biotechnol. Prog., 18, 1157-1169.

Monedero V., Kuipers O.P., Jamet E. et Deutscher J., 2001.

Regulatory functions of serine-46-phosphorylated Hpr in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol., 183, 3391-3398.

Monnet C. et Corrieu G., 1998.

Selection and proprieties of *Lactobacillus* mutants producing α -acetolactate. J. Dairy Sci., 81, 2096-2102.

Monnet C., Aymes F. et Corrieu G., 2000.

Diacetyl and α -acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis mutants that are deficient in α -acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. Appl. Environ. Microbiol., 66, 5518-5520

Monnet C., Haddad S. et Corrieu G., 1999.

An improved method for screening α -acetolactate producing mutants. J. Microbiol. Meth., 37, 183-185.

Monnet M., Schmitt P. et Diviès C., 1997.

Development and use of a screening procedure for production of α -acetolactate by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis strains. Appl. Environ. Microbiol., 63, 793-795.

Monnet V. et Gripon J.C., 1994.

Métabolisme azoté des bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, éd. Lorica, Uriage, vol 1/2, 331-366.

Montville T.J., Han-Ming Hsu A. et Meyer M.E., 1987.

High-efficiency conversion of pyruvate to acetoin by *Lactobacillus plantarum* during pH-controlled and fed-batch fermentations. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1798-1802.

Muniglia L., 2001.

Elaboration d'une stratégie expérimentale multicritère appliquée à la conception optimale d'un bioprocédé continu de production d'arômes laitiers. Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.

Najim K. et Muratet, 1987.

Optimisation et commande en génie des procédés. Ed. Masson, Paris.

Neves A.R., Pool W.A., kok J., kuipers O.p. et santos H., 2005.

Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – the input from in vivo NMR. FEMS Microbiol. Rev., 29, 531-554.

Neves A.R., Ventura R., Mansour N., Shearman C., Gasson M. J., Maycock C., Ramos A. et Santos H., 2002.

Is the glycolytic flux in *Lactococcus lactis* primarily controlled by the redox charge? J. Biol. Chem., 277, 28088-28098.

Nielsen J. et Villadsen J., 1992.

Modeling of microbial kinetics. Chem. Eng. Sc., 47, 4225-4270.

Noorman H., Heijnen J. J. et Luyben KchAM., 1991.

Linear relation in microbial reaction systems: a general overview of their origin, form and use. Biotechnol. Bioeng., 38, 603-618.

Nordkvist M., Jensen N.B.S. et Villadsen J., 2003.

Glucose metabolism in *actococcus lactis* MG1363 under different aeration conditions: requirements of acetate to sustain growth under microaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol., 69, 3462-3468.

Ochi H., Takahashi M., Kaneko T., Suzuki H. et Tanaka H., 1991.

Diacetyl production by co-immobilized citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 and homogenized bovin liver in alginate fibers with double gel layers. Biotechnol. Lett., 13, 505-510.

Oliviera A. P., Nielsen J. et Förster J., 2005.

Modelling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. BMC Microbiol., 5, 1-15.

Paquot M., Eustache J.M., Roblain D. et Thonart P., 1994.

Crèmes et beurres acides. Bactéries Lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques, éd. Lorica, Uriage, vol. 2/2, 155-167.

Perrin E, Mandrille A, Oumoun M, Fonteic C et Marc I., 1997.

Optimisation globale par stratégie d'évolution : Technique utilisant la génétique des individus des individus diploïdes. *RAIRO Rech Op* 1997; 31: 16-201.

Phalip V., Monnet C., Schmitt P., Renault P., Godon J.J. et Diviès C., 1994.

Purification and properties of the α -acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *FEBS Lett.*, 351, 95-99.

Pilkington P., A. Margaritis, Mensour N. et Russell I., 1998.

Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *J. Inst. Brew.*, 104, 19-31.

Platteeuw C., Hugenholtz J., Starrenburg M. J. C., Van Alen-Boerrigter I. et De Vos W. M., 1995.

Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3967-3971.

Poncet S., Mijakovic I., Nessler S. Guguen-Chaignon V., Chaptal V., Galinier A., Boel G., Maze A. et Deutscher J., 2004.

HPr kinase/phosphorylase, a walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1697, 123-135.

Pontriaguine L., Boltianski V., Gamkrélidzé R. et al., 1974.

Théorie mathématique des processus optimaux. Mir, Moscou.

Poschet F., Vereecken K.M., Geeraerd A. H., Nicolai B.M. et Van Impe J.F., 2004. Analysis of a novel class of predictive microbial growth models and application to co-culture growth. *Int. J. Food Microbiol*, 100, 107-124.

Postma P.W., Lengler J.W. et Jacobson G.R., 1993.

Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 57, 543-594.

Prévost H. et Diviès C., 1987.

Fresh fermented cheese production with continuous prefermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic streptococci entrapped in Ca-alginate. *Biotechnol. Lett.*, 9, 789-790.

Provost A. et Bastin G., 2004.

Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition. *J. Process. Control*, 14, 717-728.

Ramakrishna R. et Ramkrishna D., 1996.

Cybernetic modeling of growth in mixed, substitutable substrate environments: preferential and simultaneous utilization. *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 141-151.

Ramkrishna D., 2003.

On modeling of bioreactors for control. *J. process Control*, 13, 581-589.

Rani K. Y. et Ramachandra V.S.R., 1999.

Control of fermenters: a review. *Bioprocess Eng.*, 21, 77-88, 1999.

Renault P., Calero S., Delorme C., Drouault S., Goupil-feuillerat N., Guedon E., Ehrlich. S. D., 1998.

Du génome à l'application. *Le Lait* 77, 109-122.

Richalet J., el Ata-Doss S.A., Delineau L., Estival J.L. et Butler H., 1991.

Model based predictive control of exotic systems. *IFAC Symposia Series - Proceedings of a triennial world congress vol. 3*, 249-256.

Richardson J.T., Palmer M.R., Liepins G. et Hilliard M., 1989.

Some guidelines for genetic algorithms with penalty functions. Ed. Schaffer, *Proceedings of Third Int. Conf. On Genetic Algorithms*, 191-197.

Riley M.R., Muzzio F.J., Buettner H.M. et Reyes S.C., 1996.

A simple correlation for predicting effective diffusivities in immobilized cell systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 223-227.

Roels J.A., 1980.

Bioengineering report. Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2457-2514.

Rondags E., 1997.

Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche de la voie de synthèse du diacétyle et d'une mise en œuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.*

Rondags E., 2002.

Mise en œuvre de réacteurs microbiologiques : comparaison avec certains réacteurs chimiques. *Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences* 2002, 41, 1-9.

Roukas T. et Kotzekidou P., 1996.

Continuous production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a packed-bed. *Food Biotechnol.*, 10, 231-242.

Sarkar D. et Modak J.M., 2003.

Optimisation of fed-batch bioreactors using genetic algorithms. *Chem. Eng. Sci.*, 58, 2283-2296.

Sarkar D. et Modak J.M., 2004.

Optimization of fed-batch bioreactors using genetic algorithm : multiple control variables. *Comp. Chem. Eng.*, 28, 789-798.

Sarkar D. et Modak J.M., 2005.

Pareto-optimal solutions for multi-objective optimization of fed-batch bioreactors using nondominated sorting genetic algorithm. *Chemical Engineering Science*, 60, 481-492.

Schaffer J.D., 1985.

Multiple-objective optimization using genetic algorithm. *Proceedings of the first Int. Conf. On Genetic Algorithms*, 93-100.

Schilling C.H., Schuster S., Palsson B. O. et Heinrich R., 1999.

Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post genomics era. *Biotechnol. Prog.*, 15, 296-303.

Schleifer K.H., Kraus J., Klipper-Balz, Collins M.D. et Fisher W., 1985.

Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.*, 6, 183-195.

Schmidt J. L., Tourneur C. et Lenoir J., 1994.

Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éd. Loriga, Uriage, vol 2/2, 37-47.

Schmitt P. et Diviès C., 1991.

Co-metabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *J. Ferment. Bioeng.*, 1, 72-74.

Schmitt P. et Diviès C. 1992.

Effect of varying citrate levels on C4 compound formation and on enzyme levels of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* grown in continuous culture. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 426-430.

Schmitt P. et Diviès C. et Cardona R. 1992.

Origin of end-products from the co-metabolism of glucose and citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 679-683

Schmitt P., Diviès C. et Merlot C., 1990.

Utilization of citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* in continuous culture. *Biotechnol. Lett.*, 12, 127-130.

Schügerl K., 2001.

Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. *J. Biotechnol.*, 85, 149-173.

Selivanov V.A., Zakrzhevskaya D.T., Goldstein B.N., 1994.

Activity oscillations predicted for pyruvate dehydrogenase complexes. *FEBS Lett.*, 345, 151-153.

Seok J. et Komisar S. J., 2002.

Sequential kinetic parameter estimation of anaerobic fluidized bed bioreactor using an optimisation technique. *Biotechnol. Lett.*, 24, 1579-1586.

Serebrennikov V., Kisrieva Y., Zagustina N., Gavrilova L. et Seminikhina V., 1998.

Production of diacetyl and acetoin by industrial strains of *Lactococcus* under various growth conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 34, 251-254.

Shaw K.J. et Fleming P.J., 1996.

Initial study of multi-objective genetic algorithms for scheduling the production of chilled ready meals. Proceedings of the second Int. Conf. On Genetic Algorithms, Technical University of Brno, République Tchèque, 1-6.

Siezen R.J., Van Enkevort F.H.J., Kleerebezem M. Et Teusnik B., 2004.

Genome mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 105-115.

Silva C.M. et Biscuais Jr. E.C., 2003.

Genetic algorithm development for multi-objective optimization of batch free radical polymerization reactors. *Computers and Chemical Engineering*, 27, 1329-1344.

sjöberg A., Person I., Quednau M. et Hahn-Hägerdal B., 1995.

The influence of limiting and non-limiting growth conditions on glucose and maltose metabolism in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 931-938.

Smid E.J., Van Enkevort F.J.H., Wegkamp A., Boekhorst J., Molenaar D., Hugenholtz J., Siezen R.J. et Teusink B., 2005.

Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories: A review. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 1326 – 1321.

Smith M. R., Hugenholtz J., Mikoczi P., De Ree E., Bunch A. W. et De Bont J. A. M., 1992.

The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Biotechnol.*, 39, 94-98.

Snoep J.L., de Matos M.J.T., Starrenburg M.J.C. et Hugenholtz J., 1992.

Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *J. Bacteriol.*, 14, 4838-4841.

Speckman R. A. et Collins E. B., 1973.

Incorporation of radioactive acetate into diacetyl by *Streptococcus diacetylactis*. *Appl. Microbiol.*, 5, 744-746.

Speckman R. A. et Collins E. B., 1968.

Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.*, 1, 174-180.

Srinivas N. et Deb K., 1995.

Multiobjective optimization using nondominated sorting in genetic algorithm. *Evolutionary Computation*, 2, 221-248.

Starrenburg M.J.C. et Hugenholtz J., 1991.

Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 12, 3535-3540.

Statnikov R.B., Bordetsky A. et Statnikov A., 2005.

Multicriteria analysis of real-life engineering optimization problems: statement and solution. *Nonlinear Analysis*, 63, e685-e696.

Stien G., 1993.

Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. diacetylactis et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* en cultures pures et co-cultures : études cinétiques et suivi en ligne de l'influence de l'acide citrique et du pH sur le comportement métabolique. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*.

Storz G. et Imlay J.A., 1999.

Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 188-194.

Swindell S.R., Benson K.H., Griffin H.G., Renault P., Ehrlich S.D. et Gasson M.J., 1996.

Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 7, 2641-2643.

Sybesma W., Hugenholtz J., De Vos W. M. et Smid E. J., 2006.

Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups and industry. *Electronic J. Biotechnol.*, 9, 425-448.

Tailliez P., 2001.

Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il ya près de 3 milliards d'années. *Lait*, 81, 1-11.

Takahashi S., Abbe K. et Yamada T., 1982.

Purification of pyruvate formate lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *J. Bacteriol.*, 149, 1034-1040.

Tan K.C., Khor E.F., LEE T.H. et YANG Y.J., 2003.

A Tabu-based exploratory evolutionary algorithm for multiobjective optimization. *Artificial Intelligence Review*, 19, 231-260.

Tan K.C., LEE T.H., Khoo D., Khor E.F., 2001.

A multi-objective evolutionary algorithm toolbox for-computer aided multi-objective optimization. *IEEE transactions on Systems, man and Cybernetics-partB: Cybernetics*, 31,537-556.

Tholodur A. et Ramirez W. F., 1996.

Optimization of fed-batch bioreactors using neural network parameter function models. *Biotechnol. Prog.*, 12, 302-309.

Tholodur A. et Ramirez W.F., 1996.

Optimization of fed-batch bioreactors using neural network parameter function models. *Biotechnol. Prog.* 12, 302-309.

Thomas T. D., 1976.

Regulation of lactose fermentation in group N streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 474-478.

Thomas T.D., Turner K.W. et Crow V.L., 1980.

Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: Pathways, products, and regulation. *J. Bacteriol.*, 144, 672-682.

Thompson J. et Gentry-Weeks C. R., 1994.

Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques*, éd. Loriga, Uriage, vol 1/2, 239-290.

Thompson J., 1979.

Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose Moieties in vivo. *J. Bacteriol.*, 140, 774-785.

Tobajas M., Garcia-Calvo E., Wu X. et Merchuk J. C., 2003.

A simple mathematical model of the process of *Candida utilis* growth in bioreactor. World J. Microbiol. Biotechnol., 19, 391-398.

Trelea I.C., Titica M. et Corrieu G., 2004.

Dynamic optimisation of the aroma production in brewing fermentation. J. Process Control, 14, 1-16.

Tsoukas A., Tirrell M. et Stephanopoulos G., 1982.

Multi-objective dynamic optimization of semibatch copolymerization reactors. Chem. Eng. Sci., 37, 1785-1795.

Van Hylckama Vlieg E.J., Rademaker J. L., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W. J. Et Siezen R.J., 2006.

Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. Curr. Op. Microbiol., 17, 1-8.

Van Impe J.F., Poschet F., Geeraerd A. H. et Vereecken K.M., 2005.

Towards a novel class of predictive microbial growth models. Int. J. Food Microbiol., 100, 97-105.

Van Niel E.W., Palmfeldt J., Martin R., Paese M. et Hahn-Hagerdal B., 2004.

Reappraisal of the regulation of lactococcal L-lactate dehydrogenase. Appl. Environ. Microbiol., 70, 1843-1846.

Vasudeva Karan et Bhalla U.S., 2004.

Adaptive stochastic-deterministic chemical kinetic simulations. Bioinformatics, 20, 78-84.

Verhue W. M. et Tjan F. S. B., 1991.

Study of citrate metabolism of *Lactococcus lactis* susp. *lactis* biovar. *diacetylactis* by mean of ¹³C nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol., 11, 3371-3377.

Viennet R., 1997.

Nouvelle méthodologie de planification expérimentale pour l'optimisation multicritères de procédés. Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine.

Walter E. et Pronzato L., 1994.

Identification des modèles paramétriques à partir des données expérimentales. Collection M.A.S.C. ed. Masson, Paris.

Wang F.S. et Sheu J.W., 2000.

Multi-objective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. Chemical Engineering Science, 55, 3685-3695.

Wardani A. K., Egawa S., Nagahisa K., Shimizu H., et Shioya S., 2006.

Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin by *Lactococcus lactis*. Biochem. Eng. J., 28, 220-230.

Wiechert W., 2002.

Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. J. Biotechnol., 94, 37-63.

Wolpert D.H. et Macready W.G., 1997.

No free lunch theorems for optimization. IEEE transactions on Evolutionary Computation, 1, 67-82.

Ye J. J. et Saier M. H., 1996.

Regulation of sugar uptake via the phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase systems in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. J. Bacteriol., 12, 3557-3563.

Zhang X.B. et Ohta Y., 1991.

Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton on lactic acid bacteria. J. Dairy Sci., 74, 1477-1481.

Zitzler E. et Thiele L., 1999.

Multiobjective evolutionary algorithms: a comparative case study and the strength Pareto approach. IEEE Transactions on Evolutionary Computation, 3, 257-271.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Catherine AZZARO PANTEL, Maître de Conférences, LGC, ENSIACET, Toulouse

Monsieur Jean-François CAVIN, Professeur, LM, ENSBANA, Dijon

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame MAKHLOUF Anissa

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu
alimenté : application à la production bactérienne d'arômes laitiers"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 20 octobre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

